

T.C.
Süleyman Demirel Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji
Anabilim Dalı

**SİKLOSPORİN A'NIN SIÇANLARDA OLUŞTURDUĞU
NEFROTOKSİSİTEYE VİTAMİN C İLE VİTAMİN
E'NİN VE VERAPAMİLİN ETKİLERİNİN IŞIK
MİKROSKOBUNDA DEĞERLENDİRİLMESİ**

DR. MEHMET URAL

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Meltem ÖZGÜNER

ISPARTA - 2004

T.C.
Süleyman Demirel Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji
Anabilim Dalı

**SİKLOSPORİN A'NIN SIÇANLARDA OLUŞTURDUĞU
NEFROTOKSİSİTEYE VİTAMİN C İLE VİTAMİN
E'NİN VE VERAPAMİLİN ETKİLERİNİN IŞIK
MİKROSKOBUNDA DEĞERLENDİRİLMESİ**

DR. MEHMET URAL

TIPTA UZMANLIK TEZİ

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 832 TU-04
proje numarası ile desteklenmiştir.**

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Meltem ÖZGÜNER

ISPARTA - 2004

1.GİRİŞ

Siklosporin A (CsA), organ nakillerinde reddi önlemede önemli bir kullanım alanına sahiptir (1) ve en önemli yan etkisi nefrotoksisitedir (2,3).

CsA'nın kullanımı transplantasyon hastalarının yaşam kalitesini ve süresini arttırmıştır (4,5). CsA hastalarda yaşam süresinin artmasında, atılımın ve hastanede kalma süresinin azalmasında çok etkilidir. CsA bağışıklık sistemini baskılayıcı özelliği nedeniyle üveit, romatoid artrit, birincil bilier siroz, psöriazis, nefrotik sendrom gibi hastalıklarda kullanılmasına karşın (6,7) hipertrikozis, gingival hipertrofi, tremor ve artmış kan basıncı gibi yan etkileri de vardır (8,9)

Akut CsA nefrotoksisitesi kendini geri dönüşümlü olarak böbrek kan akımında azalma ve glomerüler filtrasyon hızında düşüş ile gösterir; kronik nefrotoksisite ise geri dönüşümsüz tubulointerstisyel fibrozis ile karakterizedir (10,11,12,13). CsA'nın afferent arteriollerde vazokonstrüksiyon yaparak nefrotoksisiteye neden olabileceği ileri sürülmüşse de bu yan tesirin mekanizması henüz tam olarak açıklanamamıştır (14,15,16). Vazokonstrüksiyona bağlı olarak gelişen iskemi ve nekroz sırasında açığa çıkan serbest oksijen radikallerinin de CsA'nın nefrotoksik etkisinde rol oynayabileceği düşünülmüştür.

Bazı yayınlar CsA'nın böbrekte mikrozomal lipid peroksidasyonuna yol açtığını ve CsA uygulamasının antioksidan glutatyon seviyelerini düşürdüğünü söylemektedir (17,18,19). Başka bir çalışmada, Vitamin E'nin lipid peroksidasyonunu baskılayıcı etkisinin CsA nefrotoksisitesini azalttığı tespit edilmiştir (19). CsA uygulamasını takiben lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA)'nın böbrek korteksinde arttığı gösterilmiştir (20). Bu nedenle lipid peroksidasyonunu baskılayan antioksidanlar CsA nefrotoksisitesinde reaktif oksijen radikalleri tarafından oluşturulan böbrek hasarını sınırlandırabilirler (19).

Vitamin E (Vit E), oksijen radikallerinin hücre membranı lipitlerine karşı başlattıkları oksidatif reaksiyonu antioksidan etkisi ile önler ve hücreyi koruyucu etkinlik gösterir (21,22). Yapılan çalışmalarda Vit E'nin böbrek, karaciğer (KC),ve miyokard iskemisine karşı koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır (23,24). C vitamini de güçlü indirgeyici etkisi nedeniyle ideal bir antioksidandır (25,26).

Bu çalışmalara dayanarak CsA uygulanan deneklere antioksidan özelliği olan vitamin E ve vitamin C ile birlikte kalsiyum kanallarını bloke ederek vazodilatatör etkinlik gösteren verapamili vererek, böbrek korteksindeki yapısal değişiklikleri

değerlendirmek ve bu değişikliklere antioksidan ve vazodilatatör ajanların tek tek ve birlikte etkilerini araştırmak amacıyla bu çalışmayı planladık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Bağışıklık Sistemi

B ve T lenfositleri ile diğer özel hücrelerin (öldürücü hücreler ve makrofajlar gibi) ve onların salgıladıkları faktörlerin oluşturduğu bağışıklık reaksiyonu (cevap)'nun iki yönü vardır. Bağışıklık sistemi, dokuyu istila etmeye çalışan çeşitli mikroorganizmalara karşı savunma yapar. İlaç allerjisinin, diğer allerjik olayların ve bağışıklık sistemi ile ilgili bazı hastalıkların esasını oluşturmaları ise bağışıklık reaksiyonunun tıbbi sorun oluşturan zarar verici yönleri olarak kabul edilir (27).

Yabancı antijenin vücuda girişi sonucu oluşan bağışıklık cevabının birbirini takip eden 5 dönemi vardır:

- i) Antijenin makrofajlara alınışı ve işlenişi (processing)
- ii) İmmün mesajın, bağışıklık sisteminin etkili hücreleri olan T ve B lenfositlerine transferi ve onların o antijene has alt gruplarının (klonunun) tetiklenmesi
- iii) Bu özgül lenfosit klonunun çoğalımı, farklılaşması ve olgunlaşması
- iv) Özel antikörlerin, interlökinlerin ve diğer bağışıklık araçlarının salıverilmesi
- v) Dokularda antikörlere, diğer araçlara ve aktive edilmiş T hücrelerine reaksiyon oluşması

Antijenin vücuda girmesine kadar o antijene has etkin lenfositler istirahat halindedir; antijenin vücuda girmesi ile yukarıdaki olaylar zinciri başlatılır. Hücre çoğalımı, bağışıklık sistemini düzenleyici ilaçların etkisine en duyarlı basamaktır. Bu nedenle çoğalım önleyici yani antineoplastik ilaçların bir kısmı aynı zamanda, bağışıklık sistemini baskılayıcı tipteki en önemli bağışıklık sistemini düzenleyici ilaçlardır (27).

Transplantasyon hastalarında, alıcının vücuduna girmiş olan yabancı dokuya yani allogreft (transplant) karşı hücrenel nitelikte şiddetli akut bağışıklık reaksiyonu gelişir. Bunun sonucu nakledilen doku yok edilmeye çalışılır, sonuçta organ reddedilir. Allografta karşı gelişen red reaksiyonunun hücrenel mekanizması şu şekildedir:

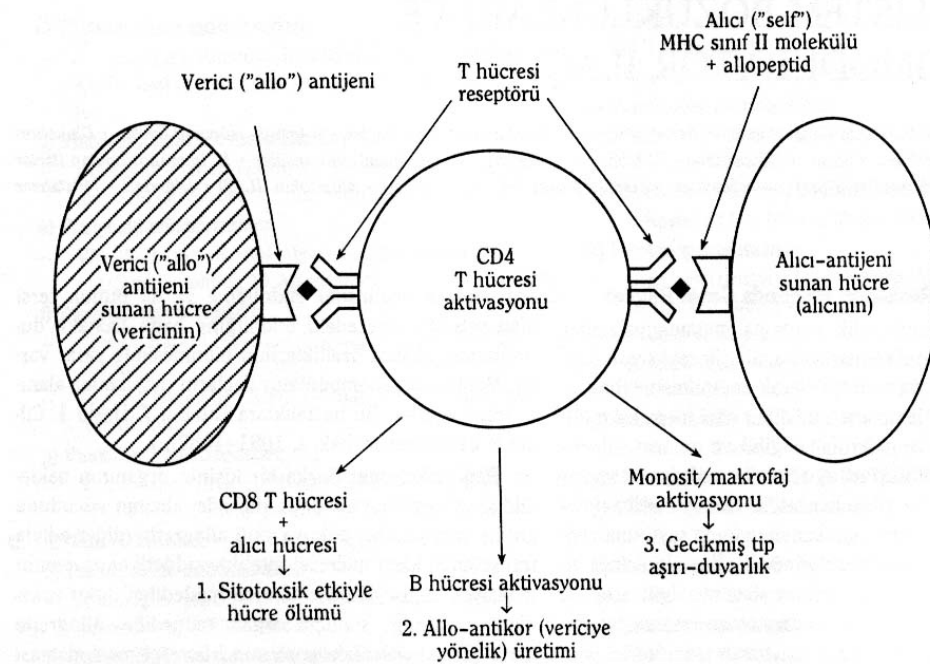
CD4 tipi (indükleyici/yardım edici) T hücreleri red reaksiyonunun başlatılmasında ve düzenli bir şekilde geliştirilmesinde temel rol oynarlar.

Reaksiyonun başlatılması için T hücrelerinin allografttan kaynaklanan yabancı antijenleri tanımaları gerekir. Transplantasyon bağlamında tanıma (allo-tanıma ya da yabancı antijeni tanıma) iki şekilde olur: i) T hücreleri, verici (allogreft) hücreleri üzerindeki, 6. kromozomunda major histokompatibilite kompleksi (MHC) lokuslarına yerleşmiş polimorfik genlerin sentezlettiği yabancı MHC moleküllerini tanırlar (dolaysız allo tanıma). ii) T hücreleri, yabancı MHC moleküllerinden kopup alıcının dolaşımına girdikten sonra onun ("self") antijen sunan hücreleri tarafından tutulup işlenen ve bu hücrelerin yüzeyinde alıcının sınıf II MHC molekülleri ile kombine edilmiş yabancı peptidleri tanır (dolaylı allo-tanıma). (27).

Dolaysız tanıma çok fazla sayıda CD4 tipi T hücrelerini aktive eder ve akut red olayındaki şiddetli bağışıklık reaksiyonuna neden olur. Dolaylı tanıma, çok daha az oranda T hücrelerini aktive eder, kronik red olayında görülen yavaş gelişen sinsi bir bağışıklık reaksiyonuna yol açar.

Ancak yukarıdaki iki türlü antijen tanıma olayı CD4 tipi T hücrelerinin tam olarak işlevliğini sağlayamaz. Ayrıca ikinci bir uyarı (eş-uyarı)'ya gerek vardır. Bu iki uyarının birlikte etkimesi ile T hücresi yeterli derecede uyarılarak otokrin bir büyüme faktörü olan interlekin-2 (İL-2) salgılar. İL-2 hem kendini salgılayan ve hem de çevredeki CD4 tipi T hücrelerinin çoğalmasına, klon genişlemesine ve sitokin üretimine neden olur. T hücresi yüzeyindeki CD28 ve CD154 türü moleküllerin, antijen sunan hücre yüzeyindeki kendilerine has sırasıyla B7 ve CD4D moleküllerine bağlanmasına bağlı uyarılar veya etkileşmeler en iyi tanımlanmış eş uyarılardır. (27).

Yabancı antijen ve MHC molekülleri ile böylece işlev kazanan CD4 pozitif T hücreleri, hücre-hücre teması ve sitokin salgılama suretiyle: i) antikor salgılayan B hücrelerini harekete geçirerek yabancı antijene karşı antikor (allo-antikor) üretiminin artmasına, ii) sitotoksik CD8 tipi T hücrelerini faaliyete geçirerek antijene özgül hücre lizisine ve iii) monosit/makrofajları harekete geçirerek gecikmiş tipte aşırı duyarlılık reaksiyonlarına neden olur (şekil 1). İşlevlik kazanmış CD4 pozitif T hücrelerin tetiklediği bu üç olay, greftin parçalanıp yıkılmasına yol açar (27).

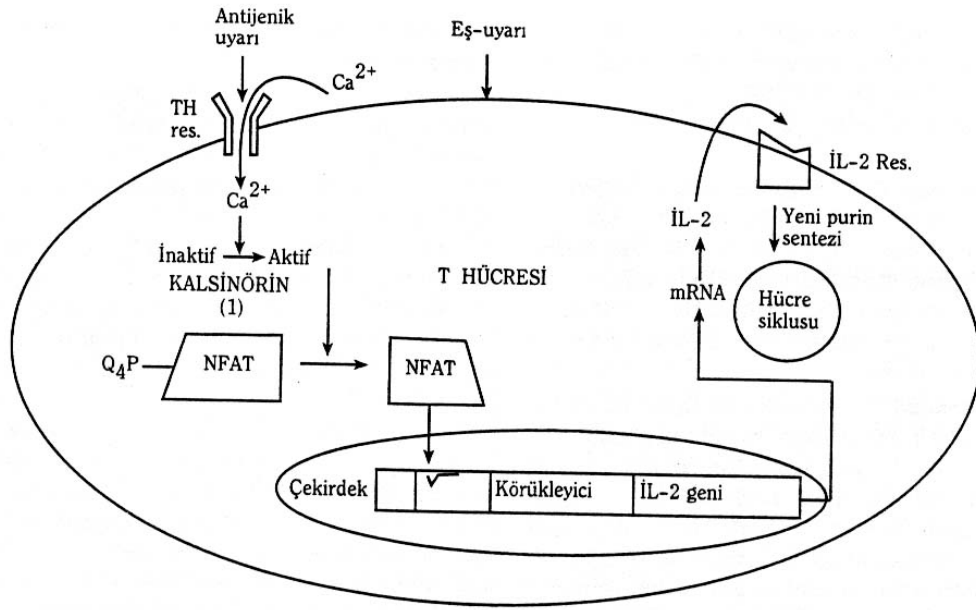


Şekil 1: Allogreft reddi olayında vericinin antijen sunan hücrelerinin ve yabancı ("allo") antijenin, alıcının CD4 tipi T lenfositleri tarafından "tanınması", bu lenfositlerin aktivasyonu ve bunun üç sonucu (Kayaalp O'dan)

2.2. Siklosporin A

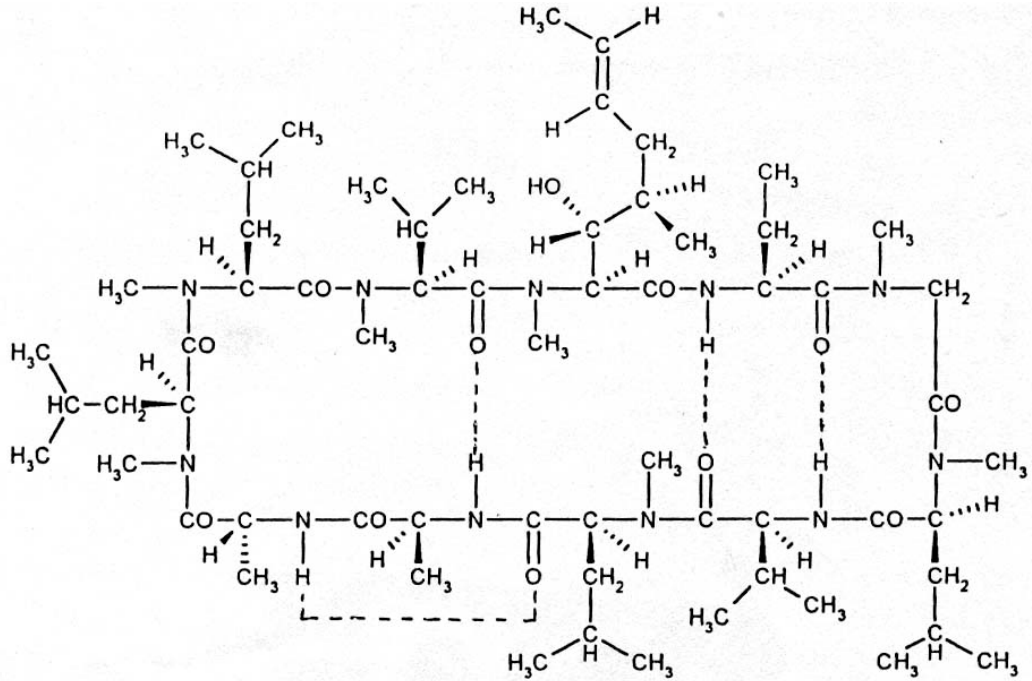
Bağışıklık sistemini düzenleyici ilaçların bağışıklık sistemini baskılayıcı grubunda yer alır. Bağışıklık sistemini baskılayıcı ilaçların çoğu, CD4 tipi T lenfositlerin aracılığı ile oluşturulan red reaksiyonunun, otoimmünite gelişmesine yol açan hastalıkların (romatoid artrit, sistemik lupus eritamatozis gibi), psöriyazis ve atopik dermatitin tedavisinde kullanılır. Akut allogreft reddi reaksiyonunu güçlü bir şekilde önlerler; organ transplantasyonunda başarı oranını ileri derece arttırmışlar ve bu tür girişimin son 40 yıl içinde rutin hale gelmesine olanak sağlamışlardır. Ancak geç gelişen kronik red reaksiyonu üzerindeki etkinlikleri düşüktür (27).

Red reaksiyonunun önlenmesinde kullanılan ilaçların temel etki yeri CD+ tipi T lenfositlerdir. Bu hücrelerde antijenik uyarının eş-uyarı ile birlikte başlattıkları, sinyalleme basmakları ve CsA'nın etki yeri şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2: CD4 tipi T hücrenin sunulan antijenle ve eş uyarı ile uyarılması ve sinyalleme basamakları. İL-2:interlökin-2;NFAT: aktive edilmiş T hücresi nükleer faktörü; TH Res.: T hücresi resptörü; İL-2 Res.: İL-2 resptörü. 1) Siklosporin'in etki yeri (Kayaalp O'dan)

CsA Tolypocladium inflatum Gams. adlı mantardan elde edilen 11 aminoasitli (undekapeptit), siklik bir polipeptittir (28). Bu mantarın 24 °C sıcaklıkta maya-malt agarda üretilmesi ve bir dizi kültür işleminden sonra CsA elde edilir. CsA suda çözünmez, fakat bir çok organik çözücüde ve lipitlerde oldukça fazla çözünme özelliği vardır (29). Açık kimyasal formülü aşağıdaki gibidir (30) (Şekil 3)

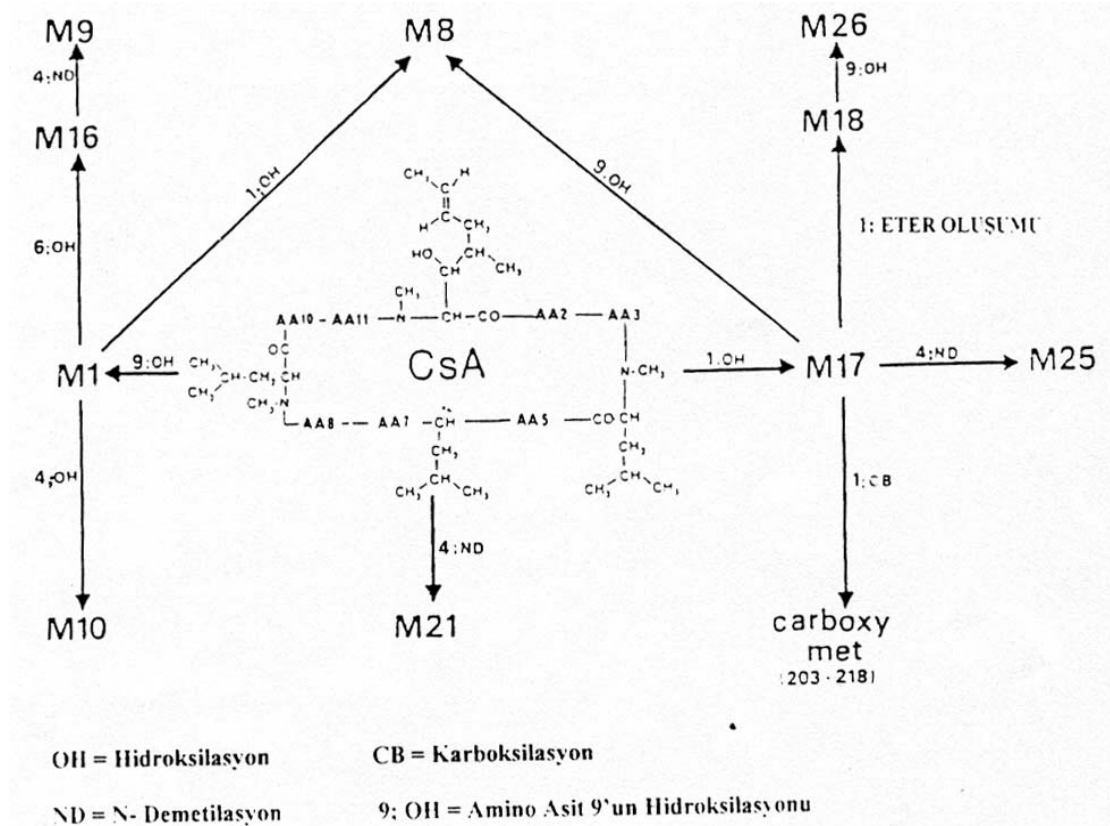


Şekil 3 : Siklosporin A'nın açık kimyasal formülü

CsA mide-barsak kanalından kısmen absorbe edilir. Bu nedenle ağızdan alınabilir; fakat biyoyararlanımı az ve fazla değişkendir (27). CsA büyük oranda ince bağırsaktan emilir, emilim oranı %4-26 arasında değişir. Kana geçen CsA %70 oranında hücrelere (bunun %80'ini eritrositler oluşturur), %30 oranında plazma proteinlerine bağlanır (29). Alınan yiyeceklere, diğer ilaçlara ve hatta ilacın verilmiş saatlerine göre, emilim oranı değişir. Bu yüzden vücut ağırlıklarına göre belirlenen dozlarda, CsA alan hastaların kan konsantrasyonlarında, bireysel farklılıklar ortaya çıkabilir (31). Plazma proteinleri içinde, albümin'e düşük oranda bağlanırken özellikle YDL (yüksek dansiteli lipoprotein) ve DDL (düşük dansiteli lipoprotein)'den oluşan lipoproteinlere yüksek oranlarda bağlanır (29). İlaç kan konsantrasyonunda 2-4 saat sonra pik oluşturur (32,33). Dokularda dağılımı DDL reseptörlerinin dağılımına uyar; bu nedenle karaciğer, endokrin bezler, böbrekler ve yağ dokusu hücrelerinde toplanır. Barsak ve beyinde çok az bulunur (27).

CsA'nın %99'u karaciğerde metabolize edilir (34). Burada karma fonksiyonlu oksidazlar (özellikle CYP3A4) tarafından metabolize edilmek suretiyle elimine edilir; metabolitleri büyük ölçüde safra ile itrah edilir (27). Metabolik reaksiyonlar hidroksilasyon ve N-demetilasyon olup bunların sonucunda CsA en önemlileri M1, M17 ve M21 olmak üzere yirmiden fazla metabolite dönüşür (şekil 4) (35,36). CsA'nın hemen hemen tamamı metabolize olur (37,38). Metabolitleri CsA kadar

bağışıklık sistemini baskılayıcı etkiye sahip değildir. Böbrek morfolojisi ve işlevi üzerinde herhangi bir değişiklik oluşturmazlar (27,39). Eliminasyon hızı bireyler arasında fazla değişkenlik gösterir. Eliminasyon yarılanma ömrü uzundur (ortalama 27 saat kadar) (27). İnsanlarda hastalığın tipine, ilacın alım süresi ve yoluna bağlı olarak bazı değişiklikler yapılmakla birlikte, genel olarak klinikte kullanılan tedavi dozları 5-25 mg/kg/gün arasında değişmektedir (27,40).



Şekil 4: CsA'nın Metabolitleri (Kayaalp O'dan)

Sitokrom p450 enzim baskılayıcısı olan ilaçlar (oral kontraseptifler, metil prednizolon, ketokanazol, eritromisin vs) CsA metabolizmasını yavaşlatarak CsA'nın kan düzeyini yükseltirler. Buna karşın Sitokrom p450 enzim aktivatörleri (rifampisin, fenitoin, fenobarbital, karbamazepin vs) CsA metabolizmasını hızlandırarak, CsA kan düzeyinin düşmesine neden olurlar (40,41).

CsA halen kullanılan bağışıklık sistemini baskılayıcı ilaçların etkinliği (efikasitesi) en yüksek olanıdır. Antijenin tanınmasını izleyen otoimmün cevabın erken basamaklarını önleyerek bağışıklık sistemini baskılar (27).

CD4 tipi T lenfositlerinde, T lenfosit reseptörünün antijenle uyarılması ile başlatılan sinyalleme basamaklarından birini oluşturan ve Ca^{++} a bağımlı bir enzim olan kalsinörin'i selektif bir şekilde baskılar (şekil 2).

Bağıışıklık sistemini baskılayıcı etkisinin üç önemli özelliği vardır:

-Baskılayıcı T lenfositlerin işlevini bozmaz; CD4 tipi (yardımcı) T lenfositleri tarafından yapılan ve baskılayıcı hücreleri teşvik eden lenfokinlerin yapımına dokunmaz.

-Benzeri diğer ilaçların aksine myelosupresyon yapmaz.

-Doğal öldürücü lenfositleri baskılamaz.

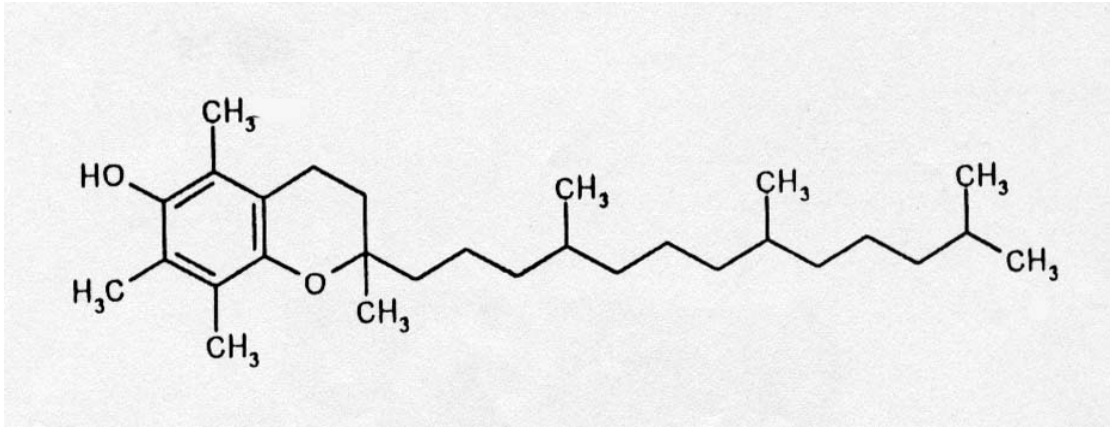
CsA'nın yan etkileri:

ORGAN	ETKİ
Böbrek	BUN (kan üre azotu), ürik asit ve kreatinin yükselmesi, glomerüler filtrasyon oranının ve serum Mg'un düşmesi
Kardiyovasküler	Hipertansiyon, hiperlipidemi
Gastrointestinal	Bulantı, kusma, ishal, transaminaz, ALP (alkalen fosfataz) seviyelerinin artması, pankreatit.
Mukokutanöz	Hipertirikozis, gingival hiperplazi
Hematolojik	Normositik, normokrom anemi
Bünyesel	Yorgunluk, kilo kaybı
Sinir sistemi	Ensefalit , tremor
Diğer	Ei ve ayaklarda yanma. İlaç etkileşimleri (azoller, makrolit antibiyotikler, hormonal kontraseptifler, Ca^{++} antagonistleri, antiepileptikler,sülfonlar.)

2.3. E Vitamini

E vitamininin gerekli bir besin maddesi olduğu ilk defa 1922 yılında Evans ve Bishop tarafından gösterilmiştir ve dişi sıçanların gebeliklerini sürdürebilmeleri için E vitaminine ihtiyaç duydukları bulunmuştur (42,43). Önceleri X, daha sonra antisterilite vitamini, 1936 yılında buğday tohumundan ekstrakte edildikten sonra ise tokoferol olarak isimlendirilmiştir (43).

E vitamini tokoferol yapısındadır ve kimyasal yapısı aşağıdaki gibidir (şekil 5)(29,44). İnsanlar tokoferolü sentezleyemezler ancak diyetteki kaynaklardan alırlar (45).



Şekil 5: E vitamininin kimyasal yapısı

α -tokoferol, besinler içinde en fazla bulunan ve en güçlü E vitamini etkinliği gösteren türevdir. Bu madde doğal olarak D izomeri halinde bulunur; sentetik olarak rasemik şekli yapılır ve ilaç olarak bu şekli kullanılır. Fiziksel özellikleri bakımından bir sıvı yağdır (46).

E vitamini hububat tanelerinde (bunların yağ fraksiyonunda), mısır yağı, soya yağı ve diğer bitkisel sıvı yağlarda ve bunlardan yapılan margarinlerde, et, hayvansal yağ, karaciğer, balık eti, tavuk eti ve yumurtada bulunur. Kızartma, kaynatma ve saklama sırasında önemli ölçüde parçalanır. Anne sütünde oldukça fazladır (46).

E vitamini gastrointestinal kanaldan absorbe edilir. Esterleri ise, bağırsaklarda kolayca absorbe olduktan sonra, şilomikronlarla karaciğere taşınır. Emilebilmesi için yağ emiliminin ve safra asitlerinin normal olması gereklidir. Herhangi bir taşıyıcı protein olmadan, pasif difüzyonla emilir. Önce, şilomikron yapısına dahil olur. Şilomikronlar lipoprotein lipaz aracılığı ile hidroliz olurken E

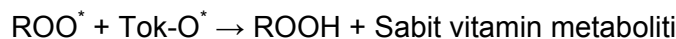
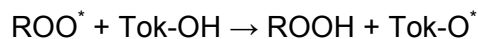
vitamininin bir bölümü dokulara taşınır. Arta kalan E vitamini ise, şilomikron kalıntıları ile birlikte karaciğer tarafından alınıp, karaciğer kökenli ÇDDL (çok düşük dansiteli lipoprotein)'ler aracılığı ile tekrar dolaşıma salınır veya YDL'ye taşınır. E vitamini sıklıkla DDL 'nin dış tabakasında ve kromonal halkası sulu faza yönelmiş şekilde yerleşiktir. Ortalama bir DDL partikülünde 6 tane α -tokoferol molekülü vardır. E vitamininin en önemli depolanma yeri yağ dokusudur (26,47).

α -Tokoferol, dokularda değişik konsantrasyonlarda bulunur. En yüksek E vitamini konsantrasyonları, mitokondriyon ve mikrozoimler gibi membrandan zengin hücre fraksiyonlarında bulunur. Sitozol ve peroksizomda ise daha az bulunur (45,48).

Normal durumda plazmadaki konsantrasyonu bireyler arasında değişkenlik gösterir ve ortalama 0.4-0.5 mg/dl kadardır. Plazmadaki total lipid düzeyinde meydana gelen değişimler E vitamini düzeyine de yansır (46).

E vitamininin önemli bir kimyasal özelliği antioksidan etkinliğinin olması, peroksitleri ve serbest oksijen radikallerini nötralize edebilmesidir. Bu etkinliği insan vücudunda da gösterir. Hücrelerde membran fosfolipitlerinin poli-doymamış yağ asitleri (linoleik asit, araşidonik asit gibi), spontan olarak veya oksidan metabolitlerin etkisi (challenge) sonucu kolayca oksitlenebilirler ve peroksit türevlerine dönüşebilirler. Bu olaya lipid peroksidasyonu veya otooksidasyonu olayı adı verilir. Serbest oksijen radikalleri oluşmasının eşlik ettiği bu olay zincirini membranda önleyen ve oluştuğunda nötralize eden en güçlü antioksidan faktör E vitaminidir. Vücudun diğer antioksidan sistemleri (C vitamini, glutatyon peroksidaz ve β -karoten gibi) E vitamini kadar etkili değildirler. E vitamini hücre ve subselüler yapıların membran lipitleri üzerindeki bu etkisi nedeniyle membranları oksidatif zedelenmeye karşı korur. Böylece eritrosit membranının sabitliğini artırır; aynı etkiyi diğer hücrelerde de gösterir. (46).

E vitamini (tok-OH), peroksitler üzerindeki nötralize edici etkisini, kendinin bir fenolik hidrojen atomunu peroksil radikaline (ROO^*) taşımak suretiyle aşağıdaki şekilde iki basamakta yapar:



Sonuçta, oluşan tokoferoksil metaboliti nispeten sabittir ve lipid peroksidasyonunu başlatmak için yeterince reaktif değildir. Bu oksidasyon ürünü, glukuronik asit ile konjugasyona uğrayarak safra yolu ile atılır. Tokoferolün

antioksidan etkisi, yüksek oksijen konsantrasyonlarında etkilidir. En yüksek oksijen kısmi basıncına eritrosit membranları ve solunum sistemi membranlarında yoğunlaşarak gösterir (47,49).

İnsan eritrositlerinin hidrojen peroksit ile in vitro ortamda hemolizi, E vitamini tarafından önlenir. Eritrositlerin hidrojen peroksit duyarlılığının ölçülmesi esasına dayanan testler, insanda E vitamini eksikliği olup olmadığını ortaya koymak için kullanılırlar (46).

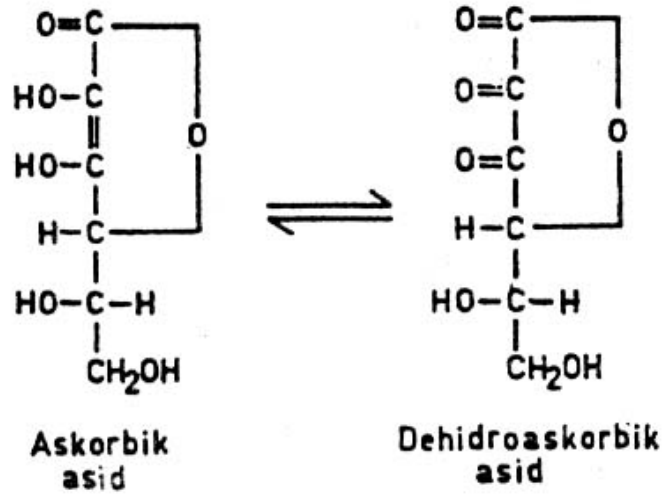
Farmakolojik dozlarda α -tokoferol trombositlerin adezyon ve agregasyonunu azaltır, K vitaminine bağımlı pıhtılaşma faktörlerini baskılar ve oksitlenmiş DDL'nin damar endotelinden endotelin'in saliverilmesinde yaptığı uyarıyı ve nitrik oksit üretimindeki baskılayıcı etkisini azaltır (46).

Günlük E vitamini ihtiyacının 10-12 mg olduğu söylenmektedir. Çeşitli hastalıklarda 50-100 mg'dan 4000mg'a kadar olan tedavi dozları kullanılmaktadır (46).

2.4. C Vitamini (Askorbik Asit)

Askorbik asit yapıcı, glukoza ve diğer altı karbonlu monosakkaritlere benzeyen, kapalı formülü $C_6H_8O_6$ olan ve suda çözünen bir vitamindir. İnsan ve diğer primatlarda, kobaylarda vücutta sentez edilemez, bu yüzden insanlar askorbik asidi diyetle almak zorundadırlar (45,46,50,51).

Askorbik asit dokularda bir enzimin katalitik aracılığı olmadan bile kolayca dehidroaskorbik aside oksitlenir (Şekil 6). Bu özelliği nedeniyle askorbik asit indirgeyici nitelik gösterir; dehidro şekline dönüşmesi molekül başına iki hidrojen atomunun serbest kalmasına neden olur. Dehidroaskorbik asit ortamda iki hidrojen atomu almak suretiyle kolaylıkla askorbik aside indirgenir. Bu kimyasal özelliklerinden dolayı, askorbik asit ve dehidroaskorbik asit vücut sıvılarında denge halinde bulunurlar, birbirlerine kolayca dönüşürler ve böylece redoks niteliği gösterirler. İki şekilde aynı derecede fizyolojik etkinlik gösterirler (46).



Şekil 6: Askorbik asit ve dehidroaskorbik asidin kimyasal yapıları (Kayaalp O'dan)

Askorbik asit en fazla limon, portakal ve greyfurt gibi turuncu meyvelerde bulunur. Yeşil yaprak şeklindeki sebzeler, domates, kuşburnu bitkisinin meyvesi, yeşil biber, lahana, üzüm, çilek, kavun, karpuz, muz ve taze patatesten de vardır. Portakal suyunun ml'sinde yaklaşık 0.5 mg askorbik asit bulunur. Hayvansal besinlerin askorbik asit kaynağı olarak önemi yoktur (46).

Askorbik asit mide-barsak kanalından doyurulabilir bir taşıma olayı ile kolayca absorbe edilir. Bir kezde alınan miktar 1 g'ın altında ise biyoyararlanım tam veya tama yakındır; 1 g dozunda absorpsiyon yaklaşık %75'tir ve bunun üstünde dozla ters orantılı bir şekilde biyoyararlanım giderek daha da düşer. Hücrelerin içi dahil vücutta geniş bir alana dağılır. Plazmadaki konsantrasyonu 1 mg/dl dolayındadır. Günde 75 mg veya daha yüksek dozlarda C vitamini verildiğinde vücut bu vitamin bakımından doymuş hale gelir. Böbreklerden atılımında, tıpkı glukoz da olduğu gibi eşik değer söz konusudur ve bu eşik değer yukarıda belirtilen doyumluk konsantrasyonuna aşağı yukarı eşittir. Fazla C vitamini alındığında eşik değer aşıldığından C vitamininin fazlası hızla atılır edilir. Normal durumda C vitamininin vücuttan eliminasyonunun yarılanma ömrü yaklaşık 16 gün olarak hesaplanmıştır (46).

C vitamini güçlü indirgeyici aktivitesi nedeniyle aynı zamanda güçlü bir antioksidandır (25,26) hatta hücre dışı sıvıda bulunan en önemli antioksidan maddedir. Hücrelerin içinde de antioksidan etkinlik gösterir. Superoksit anyonunu, hidrojen peroksit, hipoklorit, hidroksil radikali, peroksil radikalleri ve singlet oksijeni güçlü bir şekilde bağlayarak işlevsiz kılar. Plazma lipitleri ile yapılan incelemeler,

peroksil radikali oluşmasını teşvik eden maddelerin yaptığı lipid peroksidasyonunu baskılayan en önemli plazma komponentinin askorbik asit olduğunu göstermiştir. Böylece biyomembranları ve DNA'yı peroksidatif zedelenmeden koruyabilir. Ayrıca tokoferol'un antioksidan etkinliğini güçlendirir (46).

C vitamininin, ferri demiri ferro demire indirgeyen, süperoksit radikali dışındaki tek hücresel ajan olduğu düşünülmektedir. Böylece askorbat, aynı zamanda proteine bağlı ferri demiri uzaklaştırıp Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit ile etkileşmeye uygun olan ferro demire dönüştürdüğünden dolayı serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalizörüdür (25).



C vitamini organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici ajan olarak görev yapar. Kollagen sentezinde lizin ve prolinin hidroksilasyonu için gereklidir. Epinefrinin tirozinden sentezinde dopamin β -hidroksilaz basamağında, tirozin yıkımında p-hidroksi -fenil piruvatın homogentisata oksidasyonunda ve safra asitlerinin oluşumunda 7 α -hidroksilaz başlangıç basamağında gereklidir. Demirin emiliminde enzimatik olmayan bir yol ile indirgeyici rol oynar. Midede ferri demirin ferro demire indirgenip absorpsiyonunda görev alır. Bağışıklık ve yara iyileşmesinde gereklidir (46,47,50,52).

Erişkinler için C vitaminine olan günlük gereksinim 10 mg kadardır (46).

2.5. Verapamil

Kalsiyum kanal blokerleri, damar düz kası ve miyokard hücre membranında adrenerjik (α_1 , β_1) ve angiotensin II tip 1 reseptörlerin uyarılması ile çalışan, voltaja bağımlı L-tipi yavaş kalsiyum kanallarını baskırlar. Damar düz kası ve miyokard hücrelerine Ca^{2+} girişini azaltır ve böylece sitosolik Ca^{++} düzeyini düşürerek uyarım-kasılma ikili ilişkisini bozar, sonuçta vazodilatasyon meydana gelir. Kalsiyum kanal blokerlerinin düz kas hücreindeki etkisi, venöz yatağa göre arteriyel duvarda çok daha fazladır. Kalsiyum kanal blokerlerinin başlıca antihipertansif etki mekanizması, meydana gelen arteriyel dilatasyon sonucu periferik direncin azalmasıdır. (53).

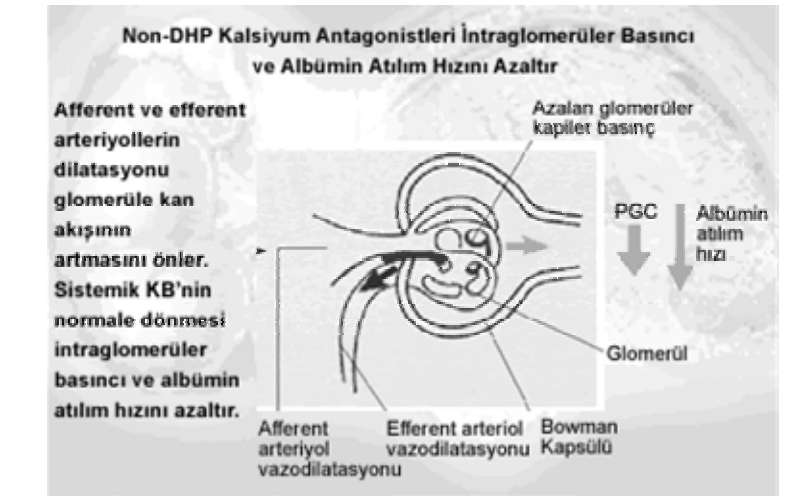
Verapamil, koroner ve periferik vazodilatör etkili olan kalsiyum kanal blokörü bir ilaçtır. Kan basıncında diğer kalsiyum kanal blokerlerinden daha az düşme yapar.

Koroner kan akımını artırır ve miyokardın oksijen gereksinimini düşürür. Negatif inotrop etkisi, kan basıncını düşürmesinden doğan refleks sempatik etkisi ile kısmen tamponlanır.

Genellikle, sinoatrial düğümü deprese eder ve bradikardi yapar. İzole kalpte belirgin negatif kronotrop etki gösterir. A-V (atriyoventriküler) iletimi yavaşlatır; yüksek dozda A-V blok oluşturabilir. Verapamil'in zayıf alfa-adrenerjik reseptör blokörü etkisi vardır; bu etkinin kan basıncını düşürücü etkisine katkısı vardır ve deney hayvanlarında, kısa süre koroner oklüzyonu ile iskemi yaptıktan sonra oklüzyonun açılmasını izleyen "reperfüzyon aritmileri"nin önlenmesine katkısı olabilir.

Periferik damarlar üzerindeki etkileri

- Damar Tonüsü azalır
- Perifrik Damar Direnci azalır
- Kan Basıncı (yüksekse) azalır
- Kalp Yüğü (after load) azalır
- Oksijen Gereksinimi azalır (54).



Şekil 7 : Verapamilin böbrek üzerine etkileri

Verapamil, mide-barsak kanalından çabuk ve tam olarak absorbe edilmesine karşın, ağızdan verilen verapamilin sistemik biyoyararlanımı oldukça düşüktür (% 10-20). Çünkü karaciğerden ilk geçişi sırasında ileri derecede etkisiz hale gelir. Bu nedenle antiaritmik olarak parenteral yoldan kullanılan dozu, oral dozunun yaklaşık 1/10'udur. Akut verilışten sonra eliminasyon yarılanma ömrü 3-6 saattir; kronik tedavi ile 9 saatin üstüne çıkar.

Sirozlu hastalarda biyoyararlanımı ve yarılanma ömrü belirgin şekilde artar. Norverapamil metaboliti ana bileşiğin 1/5'i kadar etkinlik gösterir. Verapamil plazma proteinlerine % 90 oranında bağlanır.

Kabızlık, verapamilin en sık görülen yan tesiridir. Nifedipin gibi ciltte vazodilatasyon, yüzde kızarma, başağsı, baş dönmesi, ayak bileğinde ödem ve ortostatik hipotansiyon yapar. Ondan farklı olarak bradikardi ve A-V blok (2. ve 3. derece) oluşturabilir. Ayrıca bulantı, kusma ve pruritus yapabilir. Pankreas beta-hücrelerinden insulin salıverilmesinde rol oynayan Ca^{2+} 'un girişini az da olsa baskıladığından, verapamil ve diğer kalsiyum kanal blokörleri glukoz toleransı azaltabilirler. Verapamil nadiren hiperprolaktinemi yapabilir. Köpeklerde uzun süre yüksek dozda verildiğinde katarakt oluşturur; insanda katarakt yaptığı gözlenmemiştir. (55)

2.6. Böbrek Anatomisi

Böbrekler retroperitoneal organlardır. Ortalama ağırlığı erkeklerde 150 gram, kadınlarda 135 gramdır.

Sağ böbreğin üst ucu, T12 (torakal) vertebra seviyesinde, sol böbreğin üst ucu ise T11 vertebra seviyesindedir. Alt uçları L3 (lumbal) vertebra seviyesinde olup, krista iliaka'dan yaklaşık 2.5 cm yukarıdadır. Karaciğer nedeniyle sağ böbrek, soldakinden yaklaşık 2 cm daha aşağıdadır.

Sağ böbreğin ön yüzü; böbreküstü bezi, karaciğerin sağ lobu, kolon ascendens, fleksura coli dekstra, duodenum'un ikinci parçası (pars descendens) ve jejunum kıvrımları ile komşudur. Karaciğer ve ince bağırsakla komşu alanları peritonla örtülüyken, diğer organlarla komşu olduğu alanlar peritonsuzdur.

Sol böbreğin ön yüzü; böbreküstü bez, dalak, mide, pankreas gövdesi, splenik damarlar, fleksura coli sinistra, kolon descendens'in başlangıcı ve jejunum kıvrımları ile komşuluk yapar. Mide, dalak ve jejunum'un komşu olduğu bölgeler peritonla örtülüyken; böbreküstü bezi, pankreas ve fleksura coli sinistra'nın komşu olduğu alanlar peritonsuzdur (56)

Böbreklerin üst-iç yüzleri, böbreküstü bezi ile komşudur. Böbreküstü bezi, böbrekten fasiya renalis'e ait bir bölme ayırır. Böbreklerin arka yüzleri; diyafragma, m. psoas major, m. quadratus lumborum, m. transversus abdominis, v.a.n.

(ven,arter,sinir) subcostalis, n. iliohipogastrikus ve n. ilioinguinalis'le komşudur. Resessus kostodiyafragmatikus'un da küçük bir bölümü komşuluk yapar.

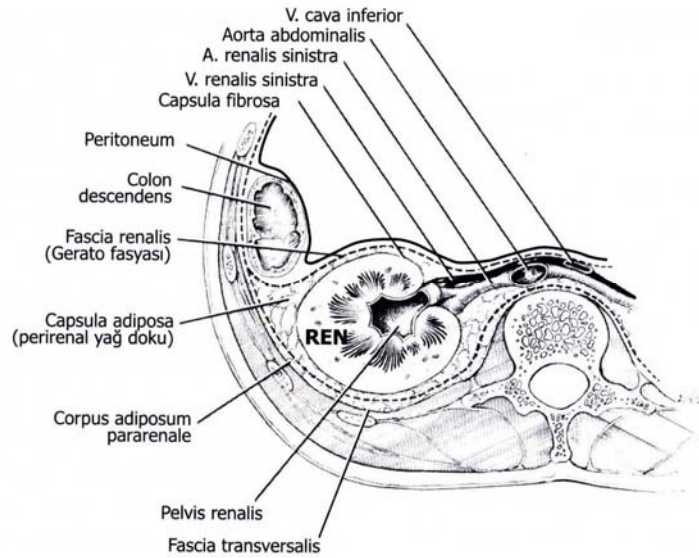
Böbreklerin medial kenarlarında bulunan yarığa hilum renale denir. Böbrek içindeki sinüs renalis denilen boşluğa uzanır. Bu boşlukta; kaliks'ler, böbrek damarları ve yağ dokusu bulunur. Toplayıcı kanalların açıldığı papilla renalis'ler, sinüs renalis'in duvarındadır.

Sayıları 7-13 arasında olan kaliks minor'ların 2 yada 3 tanesi birleşerek kaliks major'ları oluşturur. Her böbrekte, 2 yada 3 tane olan kaliks major'lar birleşerek pelvis renalis'i yapar.

Hilum renale'deki yapıların önden arkaya dizilimi; v. renalis, a. renalis, pelvis renalis yada ureter şeklindedir.

Böbrekler, dıştan-içte doğru;

- Korpus adiposum pararenale; dışında fasiya transversalis vardır.
- Fasiya renalis (Gerota fasiyası, Zuckerkand fasiyası)
- Kapsula adipoza (perirenal yağ tabakası)
- Kapsula fibroza ile sarılıdır (şekil 8)



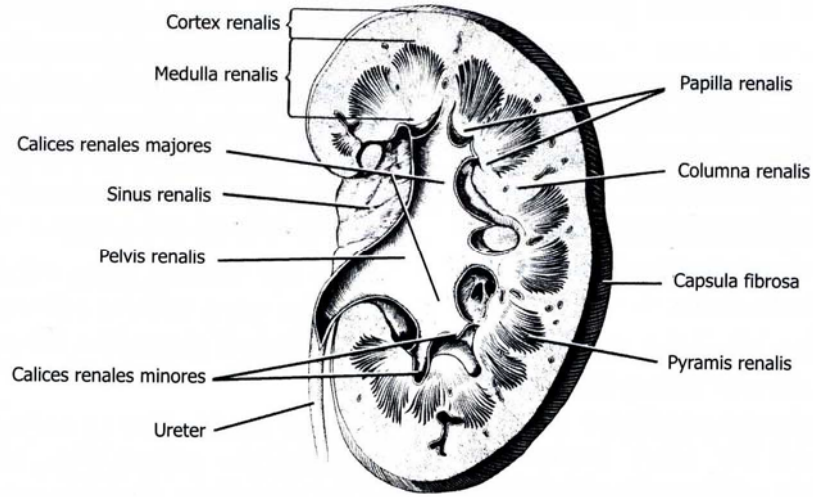
Şekil 8: Böbreği saran yapılar (Ozan H'den)

Böbrekleri pozisyonunda tutan esas faktör, komşu organların pozisyonudur. Fasiya renalis (Gerota fasiyası)'in de böbreklerin normal pozisyonunda tutulmasında

rolü vardır. Bu fasiya, böbreküstü bezini sardıktan sonra, yukarıda diyafragmanın fasyası, aşağıda ise fasiya iliopsoas ile devam eder.

Böbrek kesitlerinde; cortex renalis (dışta), ve medulla renalis (içte) denilen iki tabaka görülür.

Medulla renalis'i, piramis renalis denilen 5-11 (genellikle 8) tane koni şeklindeki oluşumlar yapar. Renal piramidlerin uçlarına papilla renalis denir. Her bir kaliks minor'a, 1-3 tane papilla renalis açılır Bir piramis renalis ve onu kuşatan korteks parçasına birlikte lobus renalis (bir böbrek lobu) denir. Buna göre, bir böbrekte piramid sayısı kadar böbrek lobu bulunur. Piramis renalis'lerin arasında, sinus renalis'e doğru uzanan korteks parçasına columna renalis (Bertini sütunu) adı verilir (56)(şekil 9).



Şekil 9: Böbreğin iç yapısı (Ozan H'den)

Piramis renalis'lerin tabanlarından kortekse doğru olan ışınal uzantılara radii medullares (Ferrein piramidleri) denir. Bir stria medullaris ile onun her iki yanındaki korteks parçasına birlikte lobulus renalis (bir böbrek lobçuğu) denir.

İki stria medullaris arasında kalan korteks parçasına pars konvoluta adı verilir. Korpuskulum renale'ler ve idrar kanalcıklarının bir bölümü buradadır. (56)

Lenf damarları, nodi aortisi laterales paraaortik lenf düğümlerime gider. Sempatikleri T10-L1 den, parasempatikleri n. vagus'tan gelir.

Böbrekler, L1-L2 vertebralar arası diskus seviyesinde, aorta abdominalis'ten ayrılan a. renalis'ler tarafından beslenir. Renal arter organa girmeden önce genellikle iki dala ayrılır. Dallardan birisi böbreğin ön bölümüne giderken, diğeri arka kısma uzanır. Bu iki dal henüz hilumda, renal piramidler arasındaki interlober

arterleri oluşturan dalları uzatır. Kortikomedüller sınır düzeyinde, interlober arterler arkuat arterleri oluşturur. Arkuat arterlerden dik açılarla dallanan interlobüler arterler böbrek kapsülüne dik şekilde korteks içinde ilerler. Bu arterler, bir medüller ışın ve bitişiğindeki kortikal labirentten oluşan renal lobüllerin sınırını çizer. Glomerül kapillerlerine kan taşıyan afferent arteriyoller, interlobüler arterlerden ayrılır. Kan buradaki kapillerlerden geçerek efferent arteriyollere aktarılır. Efferent arteriyoller, proksimal ve distal tübüleri besleyecek ve düşük molekül ağırlıklı maddelerle iyonları dolaşım sistemine taşıyacak olan peritübüler kapiler ağı oluşturmak üzere bir dal verir. Jukstamedüller nefronlarla ilişkili olan efferent arteriyoller ince, uzun kapiler damarları oluşturur. Medüllada düz bir yol izleyen ve sonra yeniden kortikomedüller sınıra doğru geriye kıvrılan bu kapiler damarlara vaza rekta (düz damarlar) adı verilir. İnen damar sürekli tip kapiler özelliği gösterirken, çıkan damarın endoteli pencerelidir. Glomerülden süzülen kanı taşıyan bu damarlar medüllerin beslenmesini ve oksijen gereksinimi sağlarlar. Kangal biçimindeki yapıları yüzünden bu damarlar Henle kangalının interstisyumda oluşturduğu yüksek osmotik gradyanı uzağa taşımazlar.

Dış korteksteki ve böbrek kapsülündeki kapillerler interlobüler venlere boşalan yıldızsı (stellat) venleri oluşturmak üzere birleşirler. Venler de arterlerle aynı yolu izler. Kan, interlobüler venlerden arkuat venlere ve oradanda interlober venlere akar. İnterlober venler renal veni oluşturmak üzere birleşir, buradan kan böbreği terkeder (57).

2.7. Böbrek Histolojisi

2.7.1. Nefronlar

Her bir böbrek 1 ila 4 milyon nefron içerir. Nefron genişlemiş bir bölüm olan renal cisimcik (renal korpuskül), proksimal kıvrımlı tübül, Henle kangalının ince ve kalın uzantıları ve distal kıvrımlı tübülden oluşmaktadır. Embriyolojik kökeni Nefrondan farklı olan toplayıcı tübüller ve kanallar Nefronlarda üretilen idrarı toplayarak böbrek pelvisine iletirler. Nefron ve içine boşaldığı toplayıcı kanal böbreğin işlevsel birimi olarak kabul edilen ünifer tübülü oluşturur.

Renal cisimciğin çapı yaklaşık 200 μm 'dir ve kapiler bir yumak olan glomerülden oluşmuştur. Bu yumak Bowman kapsülü olarak adlandırılan iki tabakalı epitelyal bir kapsülle sarılmış durumdadır. Kapsülün iç tabakası (visseral

tabaka) glomerülün kapillerlerini örter. Dış tabaka renal cisimciğin en dıştaki sınırını oluşturur ve Bowman kapsülünün pariyetal tabakası adını alır. Bowman kapsülünün iki tabakası arasında, kapiler duvarından ve viseral tabakadan süzülen sıvının toplandığı idrar boşluğu bulunmaktadır. Renal cisimcikte, afferent arteriyollerin girdiği ve efferent arteriyollerin çıktığı bir damar kutbu, proksimal kıvrımlı tübüllerin başladığı noktada ise bir idrar kutbu bulunur. Afferent arteriyol renal cisimciğe girdikten sonra genellikle herbiri kapillerlere dönüşen ve renal glomerülü oluşturan iki ila beş birincil dala ayrılır (57).

Bowman kapsülünün pariyetal tabakası ince bir retiküler lif tabakası ve bazal lamina ile desteklenen tek katlı yassı epitelden oluşur. İdrar kutbunda epitel, proksimal tübül için karakteristik olan tek katlı prizmatik epitele değişir. Embriyonik gelişim sırasında pariyetal tabakanın epiteli nispeten değişmeksizin kalırken içteki viseral tabaka büyük ölçüde modifiye olur. Bu iç tabakadaki hücrelerin gövdelerinden birkaç birincil uzantı şekillenir ve bu hücreler podositler (ayak) adını alır. Her bir birincil uzantı pedisel (ayakçık) denen çok sayıda ikincil uzantı oluşturur. Pediseller glomerülün kapillerlerine sarılmış durumdadır. İkincil uzantılar, 25 nm'lik sabit bir mesafede, bazal lamina ile doğrudan temas halindedirler (57). Podositlerin hücre gövdeleri ve birincil uzantıları bazal laminaya değmez. Tek bir podositten uzanan pediseller birden fazla sayıda kapilere kenetlenmiş durumdadır; tek bir kapiler üzerinde bazal laminaya tutunan iki farklı podosite ait pediseller birbirleriyle değişimli olarak sıralanırlar. Pediseller çok az organel içermelerine ya da hiç içermemelerine karşın, çok sayıda mikrofilament ve mikrotübül bulundurlar.

Podositlerin ikincil uzantıları birbirleriyle aralarında 25 nm'lik mesafe olacak şekilde kenetlenirler; bu aralıklar filtrasyon yarıklarını oluşturur. Komşu uzantıları bağlayan (bu şekilde filtrasyon yarıkları arasında köprü kurulur) 6 nm kalınlığında bir diyafram bulunur. Bu diyafram pencereci endotel hücrelerinin diyaframıyla hemen hemen aynı kalınlıktadır. Podositlerin sitoplazması çok sayıda serbest ribozom, az sayıda kaba endoplazma retikulumu sisternası, seyrek mitokondriyonlar ve belirgin bir Golgi kompleksi içerir. Podositlerin sitoplazmasında bunların kasılabilmelerini sağlayan aktin mikrofilament demetleri vardır (57).

Glomerül kapillerlerindeki endotel hücreleriyle, bunların dış yüzeyini örten podositler arasında kalın (~ 0,1 μm) bir bazal membran bulunur. Bu tabakanın kapillerlerdeki kanla idrar boşluğunu birbirinden ayıran bir filtrasyon engeli oluşturduğu düşünülmektedir. Bazal membran kapillerin ve podositin oluşturduğu bazal laminaların kaynaşmasından meydana gelmiştir. Elektron mikroskopta ortada

elektron-yoğun bir tabaka (lamina densa) ve her iki yanda daha fazla elektron-geçirgen bir tabaka (lamina rara) fark etmek mümkündür. Her iki elektron-geçirgen lamina rara bunları hücelere bağlamaya yarayabilecek olan fibronektin içerir. Lamina densa ise negatif yüklü bir proteoglikan olan heparan sülfat içeren bir matriks içinde tip IV kollajen ve lamininin oluşturduğu ağ şeklinde bir yapıdır. Yani glomerül bazal laminası, lamina densanın fiziksel bir filtre olarak iş gördüğü, lamina raradaki anyonik bölgelerin ise elektriksel bir engel oluşturduğu seçici bir makromoleküler filtredir. 10 nm'den daha büyük partiküller bazal laminadan geçemez. Molekül ağırlığı albüminin molekül ağırlığından (69.000 MW) daha fazla olan negatif yüklü proteinler ise membrandan eser miktarda geçmektedir. Diabetes mellitus ve glomerülonefrit gibi hastalıklarda glomerüler filtre proteinlere karşı daha geçirgen hale gelir, bunun ardından protein idrara geçer (proteinüri). Glomerül kapillerlerinin endotel hücreleri ince bir sitoplazmaya sahiptir. Organellerin çoğu, sitoplazmanın çekirdek çevresinde kalınlaştığı kısımda yoğunlaşmıştır. Bu hücrelerin pencereleri daha büyüktür (70-90 nm çapında) ve sayısı pencereli kapillerlerin bulunduğu diğer organlardaki endotel hücrelerindeki kadar değildir. Bu hücrelerde, diğer pencereli kapillerlerde gözlenen kapiler açıklıklarını birbirine tutturarak ince diyafram yapısı bulunmaz (57).

Glomerül kapillerlerinde, endotel hücreleri ve podositlerin yanısıra iki ya da daha fazla sayıdaki kapileri ortak olarak saran bazal laminanın kılıfının bulunduğu bölgelerde kapiler duvarına tutunan mezangiyal hücreler yer alır. Mezangiyal hücrelerin sitoplazmik uzantıları kapiler lümenine ulaşacak şekilde endotel hücrelerinin arasına sokulur. Hücreler kendilerini saran ve kapiler duvarına destek olan amorf matriksi sentezler. Bunların işlevlerine ilişkin başka pek az bilgi vardır: Perisite benzer hücre grupları oluştururlar. Ferritin enjeksiyonu yapıldıktan sonra (elektron-dağıtıcı, demir içeren bu protein, elektron mikroskopta kolaylıkla tanınır) mezangiyal hücrelerin sitoplazmasının bu proteinle dolduğu görülür. Bu hücreler makrofajlar gibi davranarak süzme işlemi sırasında bazal laminaya biriken partiküllü maddeleri temizleme görevi görüyor olabilir (57).

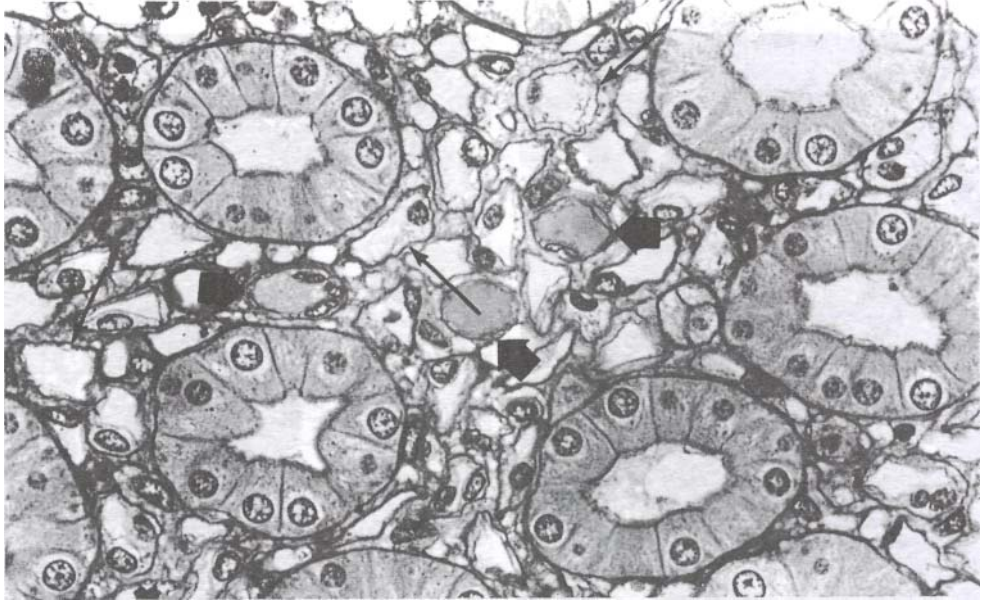
2.7.2. Proksimal Kıvrımlı Tübüller

Renal cisimciğin idrar kutbunda, Bowman kapsülünün pariyetal yaprağının tek katlı yassı epiteli proksimal kıvrımlı tübüllerde prizmatik epitel şeklinde devam eder. Bu kısım distal kıvrımlı tübüllerden daha uzundur ve bu yüzden kortikal labirent içindeki renal cisimciklerin yanında daha sık görülürler.

Proksimal kıvrımlı tübüller tek katlı kübik yada prizmatik epitelle örtülüdür. Bu epiteldeki hücreler, içerdikleri çok sayıda uzamış mitokondriyon nedeniyle asidofilik sitoplazmaya sahiptir. Hücre apeksinde fırçamsı kenarı oluşturan yaklaşık 1 nm uzunluğunda, çok sayıda mikrovilluslar bulunur. Hücrelerin büyük olması nedeniyle enine kesitte, hücrelerin merkezinde yer alan üç ile beş adet küre biçiminde çekirdek bulunur (resim 1).

Canlı hayvanlarda proksimal kıvrımlı tübüllerin lümeni geniştir ve bunlar peritübüler kapillerler tarafından sarılmış durumdadır. Rutin histolojik örneklerde ise fırçamsı kenar genellikle düzensizleşmiş, peritübüler kapillerlerin lümeni büyük oranda küçülmüş ve daralmıştır.

Hücrelerin apikal sitoplazmalarında, mikrovillusların tabanları arasında çok sayıda kanalikül bulunur; kanaliküller proksimal tübül hücrelerinin makromolekülleri emme kapasitesinde etkin rol oynarlar. Apikal membranların içe doğru yaptığı girintiler pinositotik vezikülleri oluşturur. Bu veziküller içinde glomerül süzgecinden geçen makromoleküller (esas olarak moleküler ağırlığı 70000'den düşük olan proteinler) bulunur. Makromoleküllerin parçalandığı yer olan lizozomlarla pinositotik veziküller kaynaşır ve oluşan monomerler dolaşıma geri döner. Bu hücrelerin bazal bölümlerinde yoğun membran katlanmaları ve komşu hücreler arasında lateral kenetlenmeler bulunmaktadır. Sodyum iyonlarının aktif olarak hücre dışına atılmasından sorumlu olan Na⁺/K⁺ -ATPaz (sodyum pompası) bu bazolateral membranlarda bulunur. Mitokondriyonlar hücrenin tabanında yoğunlaşmıştır ve hücrenin uzun eksenine paralel dizilim gösterirler. Mitokondriyonların bu şekilde yerleşimi ve hücrenin tabanında membran yüzey alanını arttıran bu düzenlenme, aktif iyon taşınmasında rol üstlenen hücrelere özgüdür. Lateral membran kenetlenmesinin çok sıkı olması yüzünden, ışık mikroskopunda incelenen proksimal tübül hücreleri arasındaki hücre sınırları belirgin olarak seçilemez (57).



Resim 1: Sıçan böbreğinin medüllasından geçen enine kesitte toplayıcı tübüller, vaza rektaya ait kapiler damarlar (ok başları) ve Henle kangalının ince kolları (oklar) görülmektedir, x 880 (ŞL Wissig'den).

2.7.3. Henle Kangalı

Henle kangalı, proksimal kıvrımlı tübüllere yapıca çok benzeyen bir kalın inen kol; bir ince inen kol; bir çıkan ince kol ve yapıca distal kıvrımlı tübüllerle aynı olan bir kalın çıkan koldan oluşan U-şeklinde bir yapıdır. Medüllanın dış kısmında, dış çapı 60 μm olan kalın inen kol birden 12 μm 'ye dek daralarak inen kolun ince bölümü olarak devam eder. Nefronun bu bölümünün lümeni, duvar epitelinin yassı olması yüzünden geniştir. Epitelin yalnızca çekirdekleri lümene doğru hafif çıkıntı yapar. Bütün nefronların yaklaşık yedide biri kortikomedüller sınırın yakınında bulunur, bu yüzden jukstamedüller nefronlar adını alırlar. Diğer nefronlara ise kortikal nefronlar denir. Bütün nefronlar süzme, emilim ve salgılama işlemlerinde rol alırlar. Ancak jukstamedüller nefronların medüller interstisyumda hipertonic gradyanı sağlama konusunda özel bir önemi vardır, medüller interstisyumdaki hipertonic ortam böbreğin hipertonic idrar üretme yeteneğinin temelini oluşturur. Jukstamedüller nefronların Henle kangalı çok uzundur ve medüllanın derinliklerine ilerler. Bu kangallar kısa bir kalın inen kol, uzun ince inen ve çıkan kollar ile kalın çıkan koldan oluşmuştur. Öte yandan kortikal nefronlarda inen ince kollar çok kısadır ve çıkan ince kol bulunmaz (57).

2.7.4. Distal Kıvrımlı Tübüller

Henle kangalının çıkan kalın kolu kortekse girdiğinde histolojik yapısını korur ancak büklümlenerek nefronun son kısmı olan distal kıvrımlı tübüleri oluşturur. Bu tübül tek katlı kübik epitelle döşelidir.

Histolojik kesitlerde her ikisi de kortekste bulunan proksimal ve distal tübüller arasındaki ayırım belli özelliklerine bakılarak yapılır. Proksimal tübüldeki hücreler distal tübülde bulunan hücrelerden daha büyük ve fırçamsı kenarlıdır. Fırçamsı kenarlar distal tübül hücrelerinde bulunmaz. Proksimal tübüllerde bulunan hücreler daha asidofiliktir. Distal tübüllerin lümenleri daha geniştir ve buradaki hücreler proksimal tübüllerde bulunan hücrelerden daha yassı ve küçük olduğu için, aynı histolojik kesitte distal tübül duvarlarında daha çok sayıda nükleus ve hücre görülür. Proksimal tübüllere has olan apikal kanalikül ve veziküller distal tübül hücrelerinde görülmez. Distal kıvrımlı tübül hücrelerinin bazal membranlarındaki yoğun invajinasyonlar ve bunlarla ilişkili mitokondriyonlar, bu hücrelerin iyon taşınmasında rol oynadıklarını göstermektedir (57).

Distal kıvrımlı tübüller kortekste izledikleri yol boyunca kendi nefronlarına ait renal cisimciğin damar kutbuna değerkler. Bu değme noktasında afferent arteriyol ve distal tübül modifiye olur. Distal kıvrımlı tübül hücreleri bu jukstaglomerüler bölgede prizmatik hale dönüşürken çekirdekleri de bir araya toplanır. Çoğu hücrenin bazal bölümünde Golgi kompleksi bulunur. Mikroskopik preparatlarda nükleusların yakın yerleşimi yüzünden daha koyu renkli görünen bu distal tübül segmenti makula densa olarak adlandırılır. Deneysel bulgular, makula densa hücrelerinin tübüler sıvıdaki klorür iyon içeriğine duyarlı olduğunu ve glomerüldeki afferent arteriyolde kasılmaya yol açan moleküler sinyaller oluşturduğunu düşündürmektedir. Bu mekanizma ile makula densa glomerüler filtrasyon hızını düzenleyebilir (57).

2.7.5. Toplayıcı Tübüller ve Kanallar

Distal kıvrımlı tübüllerden geçen idrar birbirlerine bağlanarak daha büyük, düz toplayıcı kanalları oluşturan toplayıcı tübüllere boşalır. Bu kanallar Bellini papiller kanalları adını alır ve piramitlerin uçlarına doğru giderek genişler.

Küçük toplayıcı tübüller kübik epitelle döşelidir ve çapı ortalama 40 µm'dir. Bu tübüller medüllerinin derinliklerine doğru indikçe hücrelerin boyu uzar ve prizmatik olur. Piramitlerin ucuna yakın bölümlerde toplayıcı kanalın çapı 200 µm'ye ulaşır.

Toplayıcı tübüller ve kanallar rutin boyalarla zayıf boyanan hücrelerden oluşurlar. Sitoplazmalarında az sayıda organel bulunur ve elektron geçirgen özelliktedir. Hücre bazalindeki membranda invajinasyon görülmez. Toplayıcı tübüllerde ve korteks toplayıcı kanallarda interkalar hücreler koyu boyanan bir hücre tipidir. Bu hücrelerin işlevi tam anlaşılammıştır. Işık mikroskobunda bitişik hücreler arasında lateral kenetlenmeler bulunmadığından toplayıcı tübül ve kanal hücrelerinin hücrelerarası sınırları net olarak seçilebilir. Kortekse ait toplayıcı kanallar, her medüller ışına boşalan birkaç küçük toplayıcı tübül aracılığı ile dik açılarla birbirine bağlanır. Medüllada gerçekleştirilen idrar yoğunlaştırma işleminde en önemli rolü toplayıcı kanallar oynar (57).

2.7.6. Jukstaglomerüler Aparat

Renal cisimciğin hemen bitişiğinde afferent arteriyolün tunika mediyasında modifiye düz kas hücreleri bulunmaktadır. Bu hücelere Jukstaglomerüler hücreler adı verilir. Bu hücrelerin çekirdekleri elips biçimindedir ve sitoplazmaları PAS(+) boyanan granüllerle doludur. Jukstaglomerüler hücrelerin salgısı kan basıncının sağlanmasında rol oynamaktadır. Distal kıvrımlı tübüllerde bulunan maküla densa, Jukstaglomerüler hücrelerin yer aldığı afferent arteriyol kısmına çok yakındır; arteriyolün bu bölümü, maküla densa ile birlikte Jukstaglomerüler aparatı oluşturur. Jukstaglomerüler aparatının bir bölümünü de işlevleri iyi anlaşılammış açık renk boyanan hücreler oluşturur. Bu hücelere ekstraglomerüler mezangiyal hücreler, Lacis hücreleri ya da polkissen (kutup yastığı) şeklinde değişik isimler verilir. Afferent arteriyolün lamina elastika internası jukstaglomerüler hücrelerin bulunduğu bölgede kaybolur (57).

Elektron mikroskopta jukstaglomerüler hücrelerde, bol miktarda kaba endoplazma retikulumu, iyi gelişmiş Golgi kompleksi ve çapları yaklaşık 10-40 nm olan salgı granülleri gözlenir. Jukstaglomerüler hücreler anjiyotensinojen denem plazma proteinini, anjiyotensin I olarak adlandırılan inaktif dekaeptide dönüştürecek olan renin hormonunu üretirler. Anjiyotensin I, akciğer endotel hücrelerinde yüksek konsantrasyonda bulunan dönüştürücü bir enzimin etkisiyle iki aminoasitini kaybederek anjiyotensin II oktapeptide dönüşür.

Önemli bir kanamadan sonra renin salgısı artar. Anjiyotensin II üretilerek hem arteriyoller daraltılır hem de adrenal kortekste üretilen aldosteron salgısı artar, bu şekilde kan basıncının düşmemesi sağlanır. Aldosteron, renal tubul hücrelerine

(en çok distal tübüllere) etki ederek sodyum ve klorür iyonlarının emilimini artırır. Bu durumda sıvı hacmini artırır ve kan basıncını yükseltir. Başka nedenlere bağlı olarak (örn. Sodyum kaybı, dehidratasyon) kan basıncının düşmesi de renin-angiyotensin II-aldosteron düzeneğini aktif hale getirir (57).

2.7.8. Renal İnterstisyum

Hem kortekste, hem de medüllada ürinifer tübüller ile kan ve lenf damarları arasındaki boşluklarda, özelleşmiş hücreler bulunur. Bu interstisyel hücrelerin bir bölümü medüllada daha sık görülmekte ve prostaglandin ve ara (temel) maddenin üretildiği bölümü oluşturmaktadır.

2.8. Böbreklerin Gelişimi

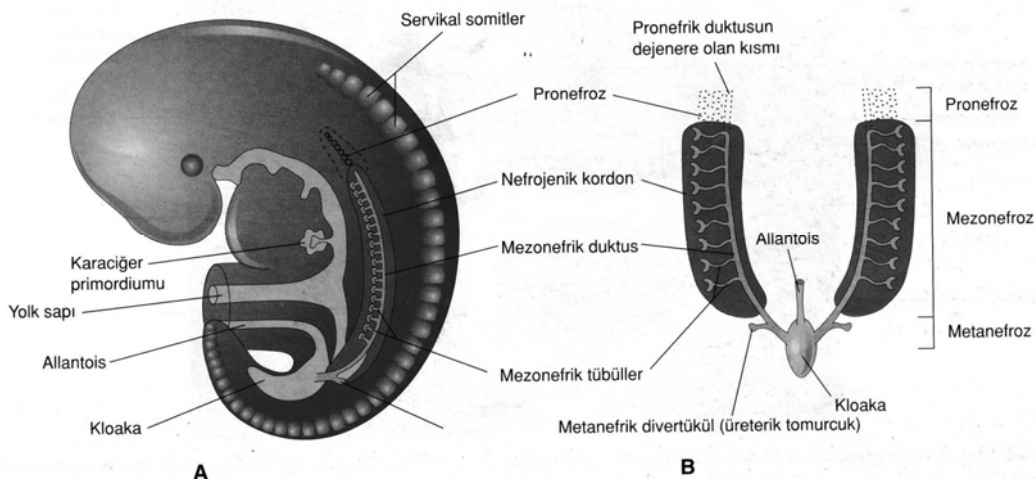
İnsan embriyosunda üç tip böbrek sistemi (boşaltım organı) gelişmektedir.

- Pronefrozlar
- Mezonefrozlar
- Metanefrozlar

İlk olarak oluşan böbrek sistemi, pronefrozlar (tekil; pronefroz) rudimenterdir ve fonksiyonel bir özelliğe sahip değildir. Bu böbrek sistemi primitif balıklardaki böbreklere eşittir. İkinci oluşan böbrek sistemi mezonefrozlar (tekil; mezonefroz) daha iyi gelişmiş haldedir, kısa bir süre fonksiyon da görür, bu böbrek sistemi kurbağagiller'deki böbreklere eşittir. Üçüncü olarak oluşan böbrek sistemi metanefrozlar (tekil; metanefroz), kalıcı, esas böbrekleri oluşturan sistemdir (58).

Pronefrozlar

Bu geçici, fonksiyonel olmayan yapılar insan embriyosunda ilk olarak dördüncü haftanın başlangıcında ortaya çıkarlar ve embriyonun boyun bölgesinde az sayıda hücre kümesi ve kıvrılmış tübüler yapılar ile temsil edilirler (Şekil 10). Pronefrik kanal, kaudal olarak uzanır ve kloaka'ya açılır. Rudimenter olan pronefrozlara ait yapılar, kısa bir süre içinde dejenerasyona uğrarlar ancak, pronefrik kanallardan çoğunluğu, belirli bir süre kalır ve bir sonraki böbrek sisteminde bunlardan yararlanır (58).



Şekil 10: Beşinci hafta sırasında üç boşaltım sisteminin şematik görünümü (Moore&Persaud'dan)

Mezonefrozlar

Oldukça genişlemiş ve uzamış boşaltıcı organlar olan mezonefrozlar, dördüncü haftanın sonuna doğru, rudimenter yapılar olan pronefrozların kaudalinde, ortaya çıkarlar (Şekil 10). Bu yapılar daha iyi gelişmiştir ve kalıcı böbrekler oluşuncaya kadar ara böbrekler olarak, embriyoda fonksiyon görürler. Mezonefrik böbrekler glomerüller ve mezonefrik tübüllerden oluşmuşlardır. Mezonefrik tübüller, pronefrik kanaldan köken alan, mezonefrik kanala açılırlar. Mezonefrik kanal da kloakaya açılır. Mezonefrozlar, birinci trimesterin sonuna doğru dejenere olurlar; ancak, mezonefrik tübüller, erkeklerde testisin efferent duktulilerine ve mezonefrik kanala dönüşürler. Mezonefrik kanal yetişkin erkek bireylerde önemli yapılara dönüşmektedir (58).

Metanefrozlar

Metanefrozlar veya kalıcı böbrekler, beşinci haftanın başında gelişimine başlarlar ve yaklaşık dört hafta sonra da fonksiyonel hale gelirler (59). İdrar oluşumu fetal yaşam boyunca devam eder. Oluşan idrar amniyon boşluğu içine verilir ve burada amniyon sıvısı ile karışır. Olgun bir fetus günde birkaç yüz mililitre amniyon sıvısı yutar ve bu sıvı barsaklardan emilir. Yıkım ürünleri, atılmak amacıyla, plasenta yoluyla anne kanına transfer edilir. Kalıcı böbrekler iki farklı kökene sahiptirler (58).

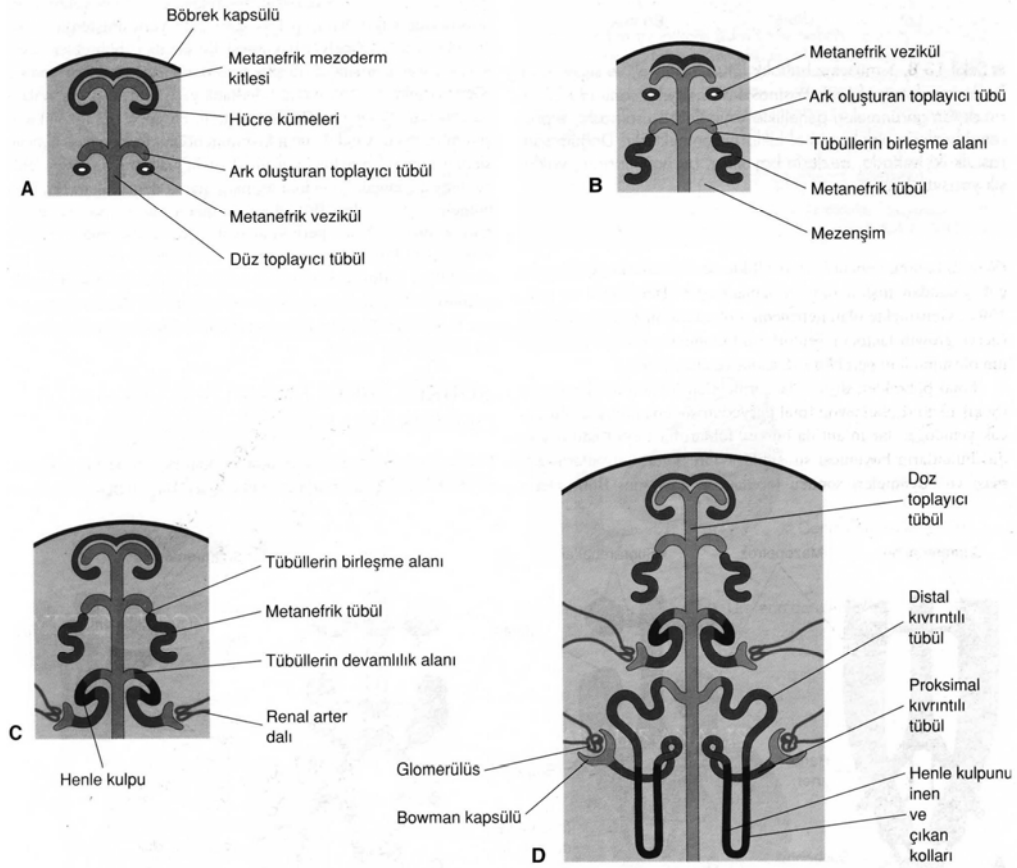
- Metanefrik divertikül (üreterik tomurcuk)
- İntermediyer mezodermin metanefrik kitlesi (metanefrojenik blastem)

Metanefrik divertikül (üreterik tomurcuk), mezonefrik kanalın, kloakaya giriş yerine yakın, dışa doğru yapmış olduğu bir divertiküldür. Metanefrik mezoderm ise,

nefrojenik kordonun kaudal kısmından köken almaktadır. Metanefrozun her iki primordial bölümü de, mezodermal kökenlidir. Böbreklerle ilgili en az 200 genin ilgili olduğu rapor edilmesine rağmen, bu genlerin fonksiyonları tam olarak aydınlatılmış değildir. WTI ve BF-2 adında iki genin ekspresyonunun fare böbreğinin erken dönem gelişimi ile çok yakından ilgili olduğu saptanmıştır. Farelerdeki genlerle ilgili çalışmaların insan böbrekleriyle doğrudan ilişkisi kesin değildir ancak elde edilen bulguların böbrek gelişimi ve anomalilerinin anlaşılmasında yardımcı olacağı açıktır (58).

Metanefrik divertikül veya ureterik tomurcuk, ureter, renal pelvis, kaliksler ve toplayıcı kanalların primordiumudur (ilkel şekilleridir). Metanefrik mezoderm'e doğru uzayarak içerisine ilerler, genişleyen uç kısmı, üzerindeki "İntermediyer mezodermin metanefrik kitlesinin" oluşumunu uyarır. Metanefrik mezoderm ve ureterik tomurcuk arasındaki uyarıcı ilişkide, hücre yüzeyindeki N-bağlı oligosakkaritlerin önemli olduğu düşünülmektedir (60). Metanefrik divertikülün sap kısmı ürelere farklanır ve genişleyen kranial uç kısmı renal pelvis'i oluşturur (58).

Düz toplayıcı tübüller, tekrar tekrar dallanarak toplayıcı tübüllerin bütün tiplerini meydana getirirler. İlk dört toplayıcı tübül jenerasyonları, birleşerek majör kaliks'leri oluştururlar. İkinci oluşan dört jenerasyon birleşir ve minör kaliksleri oluşturur. Geri kalan tübül nesilleri de toplayıcı tübüllerini oluştururlar. Her bir toplayıcı tübülün yay oluşturan son kısmı metanefrik mezoderm içerisindeki mezenşimal hücre kümelerini uyararak, küçük metanefrik vesiküllerin oluşumuna neden olurlar (Şekil 11A). Bu vesiküller uzarlar ve metanefrik tübüllerini oluştururlar (Şekil 11B-C). Böbrek tübüllerini bu şekilde geliştirirken, onların proksimal uçlarında glomerüller gelişir. Renal cisimcik (Glomerulus + Bowman kapsülü) ve onun proksimal kıvrıntılı tübülü, Henle kulpu ve distal kıvrıntılı tübül hep beraber Nefron'u oluşturmaktadır (Şekil 11D). Her bir distal kıvrıntılı tübül, ark oluşturan bir toplayıcı tübül ile bağlantı kurar ve sonuçta tübüller birleşirler. Gebeliğin 10.-18. haftaları arasında glomerüllerin sayıları yavaş yavaş artar ve 32. haftada sayıca en yüksek değere ulaşırlar (61).



Şekil 11: Diagramatik çizimlerle nefron gelişim safhaları. A, Nefron gelişimi yaklaşık 8. haftada başlar. B ve C, nefronların primordiyumları olan metanefrik tübüllerin, toplayıcı tübüller ile birleşerek uriniferöz tübüllerini oluşturması. D, 20-30. haftalar arasında nefron sayıları ikiye katlanır.

Üriniferöz bir tübül (Nefron + Toplayıcı tübül), embriyolojik olarak iki farklı kökene sahiptir (Şekil 11).

- Nefron; metanefrik mezoderm'den
- Toplayıcı tübüller; metanefrik divertikül (üreterik tomurcuk)'den, köken almaktadır.

Doku kültürü çalışmaları üreterik tomurcuğun (metanefrik divertikül) dallanmasının, metanefrik mezoderm indüksiyonuna bağlı olduğunu, nefronların gelişiminin ise toplayıcı tübüllerin uyarısını gerektirdiğini göstermiştir. Wnt gen ailesinden bir genin (Wnt-2) böbrek gelişimi ile, özellikle de nefronların gelişimiyle, çok yakından ilişkili olduğu saptanmıştır (62). Fötal böbrekler, dıştan da görülebilen loblara ayrılmışlardır. Lobülasyon toplam periyodun sonuna doğru azalır ancak yenidoğan bir infant'ta böbrek lobları hala ayırt edilmektedir. Infantların büyümesi sırasında, böbreklerde nefronların artması ve büyümeleri sonucu lobülasyon

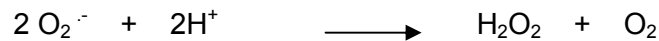
kaybolur. Böbreklerin loblu karakterleri yetişkinlerde görülmez, bununla birlikte, bazı hayvan türlerinde (ör. Sığırlar), yetişkin insanlarda da çok nadir olarak böbrek lobları dıştan seçilebilir. Gebeliğin sonunda, gelişmiş her bir böbrekte 800.000 ile 1.000.000 adet nefron bulunmaktadır. Doğumdan sonra böbreklerde özellikle interstisyel doku artışı ve proksimal kıvrıntılı tübüllerin uzaması sonucu, hacim oldukça artar. Doğum zamanında, prematur infantlar hariç, nefron oluşumunun tamamlandığına inanılmaktadır. Böbreklerin fonksiyonel olgunlaşması doğumdan sonra gerçekleşmektedir. Glomerüler filtrasyon, yaşamın 9.haftasında başlar ve doğumdan sonra filtrasyon oranında artış görülmektedir. (59).

2.9. Antioksidan Sistemler

Reaktif oksijen türlerinin düzeylerini ve bunların meydana getirdiği hasarı sınırlandırmak için vücutta birçok savunma mekanizması gelişmiştir. Bunlar, "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinirler. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve/veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu baskırlar. Antioksidanlar, doğal (endojen kaynaklı) ve dış kaynaklı antioksidanlar olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılabilirdiği gibi serbest radikalın meydana gelişini engelleyenler ve mevcut olanları etkisiz hale getirenler şeklinde de ikiye ayrılabilirler. Ayrıca, enzim ve enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılabilirler. Hücrelerin hem sıvı hem de membran kısımlarında bulunabilirler (63,64).

Süperoksit Dismutaz (SOD):

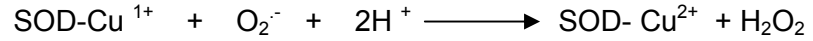
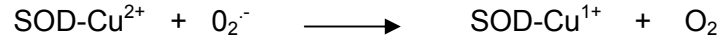
İlk olarak 1968 yılında Mc Cord ve Fridovich tarafından tanımlanan süperoksit dismutaz enzimi süperoksidin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler. Hücresel bölmelerdeki süperoksit düzeylerini kontrol etmede önemli bir rol oynar (65,66) (şekil 12). Aşağıdaki reaksiyonu katalizler.



Bu reaksiyon spontan olarak meydana gelebilir. Fakat SOD tarafından katalizlendiğinde reaksiyon hızı 4000 kat artar. İnsanda SOD'nin iki tipi bulunmaktadır. Bunlar sitozolde bulunan dimerik, Cu ve Zn içeren izomer (Cu-Zn-SOD) ile mitokondriyonda bulunan tetramerik, Mn ihtiva eden

izomerdir (Mn-SOD). Genel olarak, hücrede en bol bulunan izomer sitozolik Cu-Zn-SOD'dir. Cu-Zn-SOD 21 no'lu kromozomda, Mn-SOD 6 no'lu kromozomda yerleşiktir (67). Sitozolik Cu-Zn-SOD siyanidle baskılanırken, mitokondriyal Mn-SOD baskılanmaz. Her iki SOD'nin katalizlediği reaksiyon aynıdır (68). Enzimin fizyolojik işlevi, oksijeni katabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikalının zararlı etkilerine karşı korumaktır. Böylece, lipid peroksidasyonunu baskılar (69). SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır ve doku PO₂ artışı ile artar. Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda süperoksit üretimi olmasına rağmen, hücre içi süperoksit düzeyleri düşük tutulur. SOD'nin hücre dışı aktivitesi ise çok düşüktür (25).

Süperoksit dismutazın, süperoksit anyonuna etkisi şu şekildedir. Süperoksit anyonu, Cu²⁺ ve bir arginin rezidüsü'nün guanido grubuna bağlanır. Bu bağlanma sonucunda süperoksitten bir elektron Cu²⁺ 'a transfer olurken Cu¹⁺ ve moleküler oksijen meydana gelir. İkinci bir süperoksit anyonu Cu¹⁺'dan bir elektron, bağlanma ortağından ise iki proton alarak hidrojen peroksiti oluştururken, enzim tekrar Cu²⁺ formuna dönmüş olur (70).

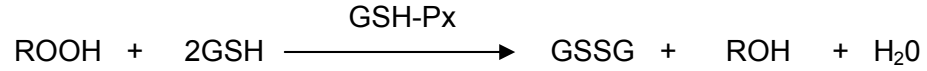
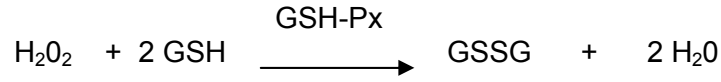


SOD, fagosite edilmiş bakterilerin hücre içi öldürülmesinde de rol oynar. Bu nedenle, SOD granülosit işlevi için çok önemlidir. Lenfositlerde granülositlerden daha fazla miktarda SOD bulunmaktadır (71). SOD aktivitesindeki genetik ya da sonradan meydana gelmiş değişiklikler ile hastalığa karşı hassasiyet ya da direncin birbiriyle ilişkili olabileceği bazı araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (69).

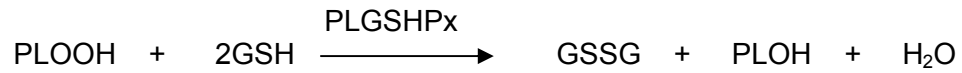
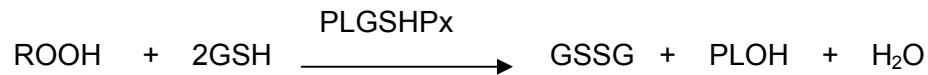
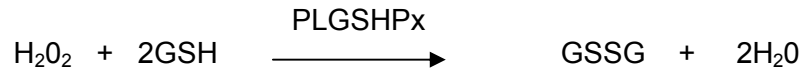
Glutasyon Peroksidaz (GSH-PX):

Glutasyon peroksidaz, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. GSH-Px 'in molekül ağırlığı yaklaşık olarak 85.000 D.'dur. Tetramerik, 4 selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. Birçok dokuda bulunan majör sitozolik selenyumlu enzimdir (25,72).

GSH-Px aşağıdaki reaksiyonu katalizler;



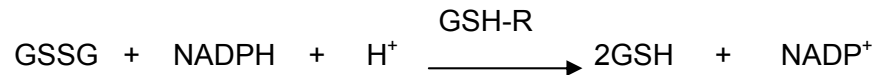
Fosfolipit hidroperoksit glutatyon peroksidaz (PLGSHPx) molekül ağırlığı 20.000 dalton olan, monomerik, selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. Membran fosfolipit hidroperoksitlerini alkollere indirger (72)(şekil 12).



En önemli membrana bağlı antioksidan olan E vitamini sınırlı olduğu zaman, PLGSHPx membranın peroksidasyona karşı korunmasını sağlar (72).

GSH-Px'in selenolat formu (E-Se⁻) peroksit substratını alkole indirgerken kendisi okside selenik aside dönüşür (E-Se-OH). Glutatyon, bu evrede reaksiyona katılarak selenosülfite (E-Se-S-G) oluşturur. İkinci bir glutatyonun selenosülfite bağlanması ile enzim aktif formu olan selenolat formuna dönerken, glutatyon okside hale dönüşür.

Hidroperoksitlerin redükte olması ile meydana gelen GSSG, glutatyon redüktazın katalizlediği reaksiyon ile tekrar GSH'a dönüşür.



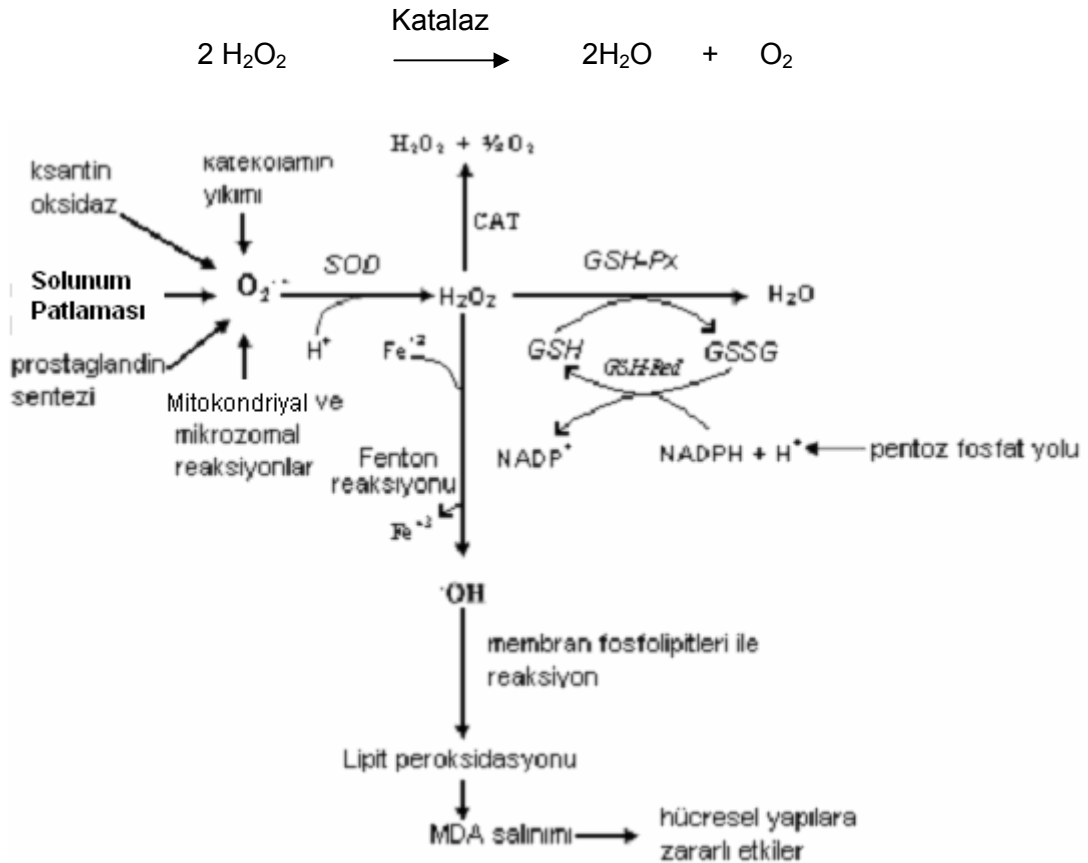
GSH-Px'in, fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmelerini engeller. GSH-Px aktivitesi düşük olan makrofajlarda başlatılan solunum patlamasını takiben, hidrojen peroksit salınımının arttığı gösterilmiştir (72). Eritrositlerde de

GSH-Px oksidan strese karşı en etkili antioksidandır (73). GSH-Px aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksidin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar (74).

GSH-Px aktivitesi yaşlıların lökositlerinde düşük, eritrositlerinde yüksek, esansiyel hipertansiyonlu hastaların lökositlerinde düşük bulunmuştur. Ayrıca, eritrositlerde GSH-Px aktivitesi prematürelde düşük, Down sendromunda yüksek bulunmuştur (75,76).

Katalaz :

Katalaz 4 tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Görevi, hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalamaktır. Peroksidaz aktivitesine sahip oluşuna ek olarak, bu enzim bir molekül hidrojen peroksidi elektron verici bir substrat olarak, diğerini de oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir. Bu enzim peroksizomlarda yerleşiktir (77,78)(şekil 12).



Şekil 12: Hücresel antioksidan enzim sistemi ve lipid peroksidasyon zincirini gösteren şema.

3.MATERYAL ve METOD

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı ve Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.1. Deney Hayvanları :

Çalışmada ağırlıkları 220-340 gram arasında değişen, ortalama 6-8 aylık, toplam 25 adet Wistar albino cinsi erkek sıçan kullanıldı (n = 25). Deney süresince hayvanlara yeteri kadar (ad libitum) su ve yem (Yem Kurumu Standart Sıçan Yemi) verildi.

3.2. Kullanılan İlaçlar

Siklosporin A (Sandimmün Neoral^{*}): 1ml'sinde 100 mg CsA bulunan toplam 50 ml'lik oral solüsyon kullanıldı.

E Vitamini (Evigen^{*}) (dl- α -tokoferol asetat): 2 ml'lik ampulde 300 mg E vitamini bulunan preparat kullanıldı.

C Vitamini (Redoxon^{*}) : 5 ml'lik ampulde 500 mg C vitamini bulunan preparat kullanıldı.

Verapamil (isoptin^{*}) : 2 ml'lik ampulde 5 mg verapamil hidroklorit bulunan preparat kullanıldı.

(*: Müstahzar isimleri)

3.3. Deney Planı

Bu çalışmada, dört ayrı deney grubu ve bir kontrol grubu oluşturuldu. Her deney grubunda 5 sıçan olmak üzere toplam 25 sıçan kullanıldı. Kaynaklarda erkek sıçanların dişilere göre CsA nefrotoksitesine daha duyarlı oldukları belirtildiği için hayvanların tümü erkek sıçanlardan seçildi (79,80).

Grup I (CsA verilen grup): 10 gün boyunca nazogastrik sonda ile oral olarak 50 mg/kg dozunda CsA verildi.

Grup II (CsA + Vit E + Vit C verilen grup): 10 gün boyunca CsA nazogastrik sonda ile 50 mg/kg dozunda oral olarak; E vitamini 150 mg/kg dozunda intramüsküler olarak; C vitamini 200 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak verildi.

Grup III (CsA + verapamil verilen grup): 10 gün boyunca CsA nazogastrik sonda ile 50 mg/kg dozunda oral olarak; verapamil 0.5 mg/kg dozunda intramüsküler olarak verildi.

Grup IV (CsA + Vit E + Vit C + verapamil verilen grup): 10 gün boyunca CsA nazogastrik sonda ile 50 mg/kg dozunda oral olarak; E vitamini 150 mg/kg dozunda intramüsküler olarak; C vitamini 200 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak; verapamil 0.5 mg/kg dozunda intramüsküler olarak verildi.

Grup V (kontrol grubu): 10 gün boyunca nazogastrik sonda ile 1 ml distile su; intramüsküler ve intraperitoneal olarak 1 ml serum fizyolojik verildi.

Deneyin başlangıcında ve onuncu günde sıçanların ağırlıkları ölçüldü. Deney süresinin sonunda, sıçanlardan eter anestezisi altında biyokimyasal analiz için kan örnekleri alındı. Sağ böbreklerin yarısı, dokuda antioksidan enzim ölçümü için alındı ve fosfat tamponuna konuldu. Histolojik çalışma için de kalan böbrek dokuları %10'luk formalinde tespit edildi.

Tablo 1: Deney Planı

<i>Deney Grupları</i>	<i>Hayvan Sayısı</i>	<i>Tedavi</i>	<i>Doz</i>	<i>Süre</i>
I	5	CsA	50 mg/kg i.g.	10 gün
II	5	CsA + Vit E + Vit C	50 mg/kg i.g. 150 mg/kg i.m. 200 mg/kg i.p.	10 gün
III	5	CsA + verapamil	50 mg/kg i.g. 0.5 mg/kg i.m.	10 gün
IV	5	CsA + Vit E + Vit C + verapamil	50 mg/kg i.g. 150 mg/kg i.m. 200 mg/kg i.p. 0.5 mg/kg i.m.	10 gün
V	5	Kontrol	-	10 gün

3.4. Histolojik Çalışmalar

%10'luk nötral formalin solüsyonunda, immersiyon fiksasyon yöntemi uygulanan doku örnekleri yıkama işleminden sonra aşağıda gösterilen işlemlerden geçirildi.

A- Dehidrasyon

<u>Alkol derecesi</u>	<u>Süre</u>
%70	1 gece
%80	1 saat
%90	1 saat
%96	1 saat
% 100	1 saat
% 100	1 saat

B- Şeffaflandırma

Ksilol	1/2 saat
Ksilol	1/2 saat

C- İnfiltrasyon

Ksilol+parafin (60°C etüvde)	15 dk
Yumuşak Parafin (60°C etüvde)	1 saat
Sert Parafin (60° C etüvde)	4 saat

D- Gömme

Sert parafin

Hazırlanan parafin bloklardan Leica tipi kızaklı mikrotom ile 5 mikrometre kalınlığında kesitler alındı ve Hematoksilen - Eozin ile boyandı. Olympus BX50 tipi binoküler mikroskopta incelenen kesitlerden mikrofotograflar elde edilerek değerlendirildi.

3.5. Biyokimyasal Çalışmalar**3.5.1. Serumda BUN ve Kreatinin Ölçümü**

Alınan kan 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek serum ayrıldı. Roche-Hitachi modüler P-8000 cihazında ölçümler yapıldı.

3.5.2. Dokuların Biyokimyasal Ölçümlere Hazırlanması:

Böbrek doku örnekleri önce, kanı uzaklaştırmak için soğuk distile suyla yıkandı. Daha sonra 150 ml soğuk potasyum fosfat tamponu içinde homojenizatörle (Ultra-Turrax T25 model) 1000 U'da 5 dakika süreyle homojenize edildi. Bu süre sonunda elde edilen %10'luk homojenatlar +4°C'de 10 dakika süreyle 6000 g'de santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi. Bu homojenatlarda (veya materyallerde) GSH-Px ve CAT aktiviteleri çalışıldı.

3.5.3. Katalaz Ölçümü:

Katalaz (Catalase; CAT) aktivitesi Aebi'nin yöntemine göre çalışıldı (81). Bu yöntemin prensibi, hidrojen peroksidin (H_2O_2) parçalanma hızının hız sabitinin ($5^{-1}k$) belirlenmesi esasına dayanır. Hız sabiti şu formül ile hesaplandı:

$$k = (2.3 / \Delta t) (a/b) \log (A_1/A_2)$$

$A_1 = t_1$ (0. saniye) deki H_2O_2 'nin absorbansı

$A_2 = t_2$ (15 saniye) deki H_2O_2 'nin absorbansı

a = dilüsyon faktörü

b = homojenatın protein miktarı

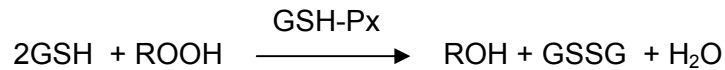
Protein Ölçümü :

Homojenatın protein miktarı Lowry (82) yöntemine göre belirlendi.

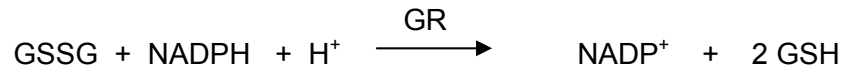
3.5.4. GSH-Px Ölçümü :

GSH-Px aktiviteleri Paplia ve Valentina'nın yöntemine göre ölçüldü (83).

Yöntemin prensibi : GSH-Px aşağıdaki reaksiyonu katalizler.



Glutasyon redüktaz (GR), NADPH varlığında okside glutasyon redükte glutatyona indirgenir.



NADPH'daki azalma 340nm de spektrofotometrik olarak takip edilir. Azalma hızı GSH-Px aktivitesi ile doğru orantılıdır.

3.6. İstatistiksel Çalışmalar:

İstatistiksel değerlendirmeler, "SPSS® 7.0 for Windows" istatistik paket programı kullanılarak yapıldı. Bağımsız farklı iki grubun karşılaştırılması Mann-Whitney U testi ile yapıldı. Bağımlı iki grubun değerlendirilmesi Wilcoxon anlamlılık testi ile yapıldı ve $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

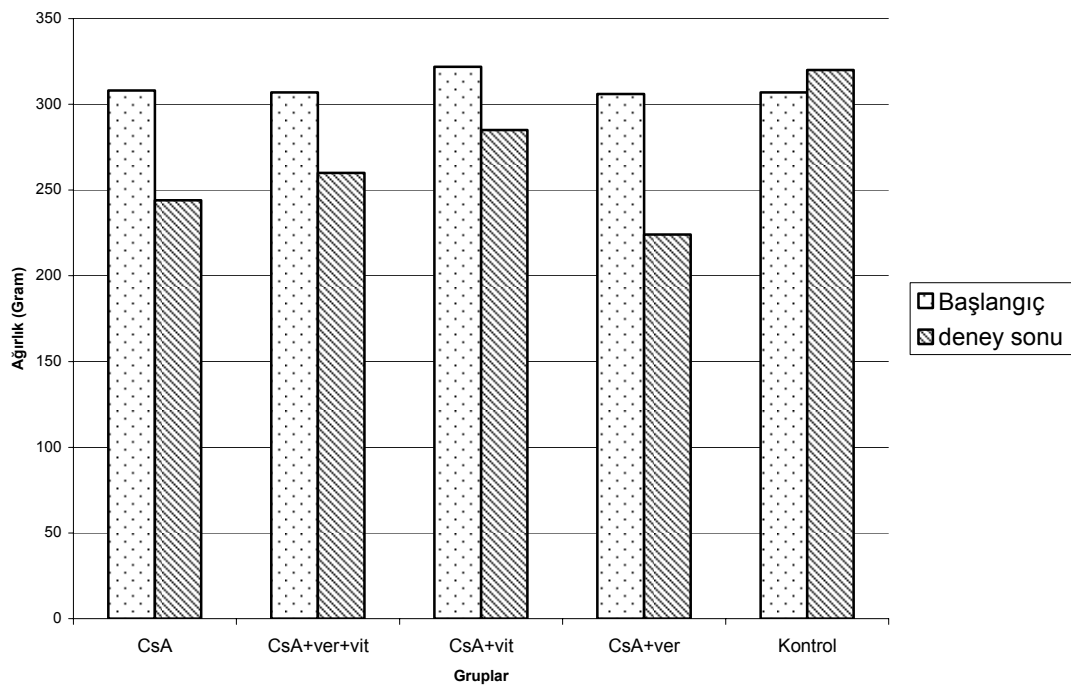
4. BULGULAR

4.1. Vücut Ağırlıkları

Kontrol ve deney grubuna ait sıçanların deneyin başlangıcındaki ve sonundaki ağırlıklarının karşılaştırılması şekil 13'de verilmiştir. Kontrol grubu dışında tüm deney gruplarında belirgin kilo kaybı olduğu bulundu ($p < 0.05$) (tablo 2).

Tablo 2: Vücut ağırlığının deneyin başında ve sonundaki değerleri. Değerler: ortalama \pm standart sapma, * $P < 0,05$, (CsA: Siklosporin A, Vit: vitamin E ve C, Ver: verapamil) (İstatistiksel analiz için Wilcoxon bağımlı iki değişken anlamlılık testi kullanıldı)

Değişken	CsA	CsA+Vit+Ver	CsA+Ver	CsA+Vit	Kontrol
Vücut Ağırlığı, g					
Başlangıç	308 \pm 15	308 \pm 19	282 \pm 15	322 \pm 22	307 \pm 33
Deney Sonu	244 \pm 16*	260 \pm 18*	224 \pm 20*	285 \pm 25*	321 \pm 32



Şekil 13: Kontrol ve deney grubundaki hayvanların, deney başlangıcı ve sonunda vücut ağırlıkları (CsA: Siklosporin A, Vit: vitamin E ve C, Ver: verapamil)

4.2. Histolojik Bulgular

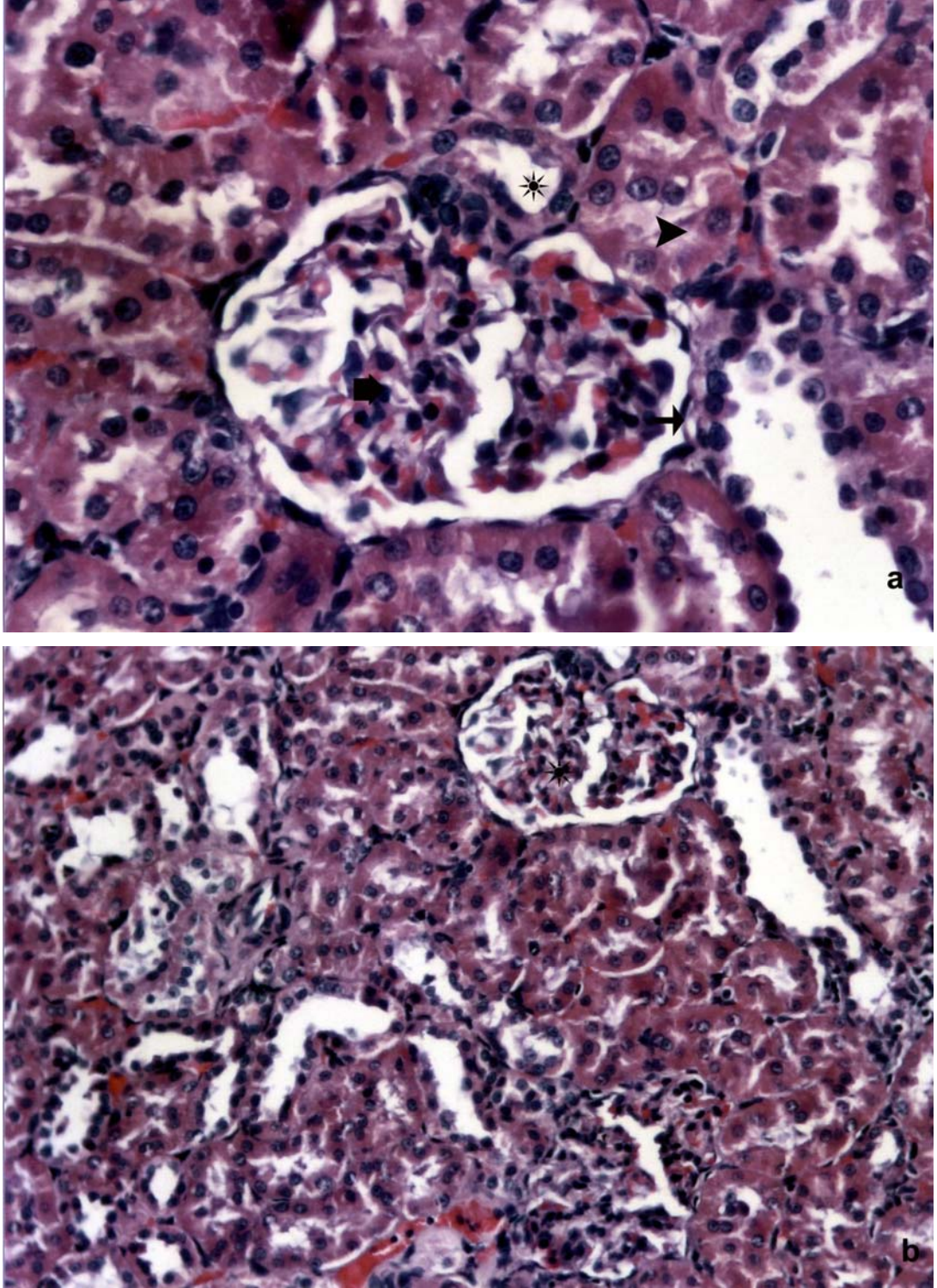
Kontrol grubu olarak alınan sıçanlara ait böbrek doku kesitlerinin histolojik incelenmesinde, bu organa has histolojik yapılar dışında herhangi bir bulguya rastlanmamıştır. Malpighi cisimcikleri normal çap ve sayıda bulundu (Resim 2 a,b). Bowman kapsülünün pariyetal yaprağını oluşturan yassı epitel hücreleri düzenli bir yerleşim gösteriyordu (Resim 2 a). Glomerülde yer alan endotel ve mezengial hücreler normal görünümdeydi (Resim 2). Jukstaglomerüler aygıtta; sıklaşmış, yüksek prizmatik, koyu renkli hücrelerden oluşan makula densa normal görünümde izlendi. Proksimal ve distal tübül hücreleri ve tübül lümenleri normal olarak görüldü (Resim 2,3). Bütün damarlar normal görünümde olup, etraflarında herhangi bir infiltrasyona rastlanmadı (Resim 2,3). Medullada yer alan toplayıcı kanallar normal histolojik görünüme sahipti (Resim 3 a,b).

CsA verilen gruptaki sıçanların böbrek doku kesitleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, yapısal olarak belirgin değişiklikler gözlemlendi. Bu değişiklikler glomerül ve tübüllerde yapısal düzensizliklerin yanı sıra perivasküler ve peritübüler alanlarda mononükleer hücre infiltrasyonlarını içeriyordu (Resim 4). Mononükleer hücre infiltrasyonları, daha çok korteksin orta bölgelerinde ve medulla - korteks bileşkesinde yerleşti. Çoğu alanda peritübüler kapiler konjesyon ve kanama odakları vardı (resim 4,5). Glomerul ve tübüllerin hemen hemen tamamının CsA'dan etkilenmiş olduğu görüldü. Distal ve özellikle proksimal tübüllerin parankim hücre sitoplazmasında, artmış vakuoler dejenerasyonlar nedeniyle köpüğümsü görünüm belirlendi (Resim 4,5). Tübül parankim hücrelerinde piknotik çekirdeklere ve hidropik değişikliklere oldukça sık rastlanıldı. Malpighi cisimciğinin Bowman boşluğunda genişleme ve kapiler yumakta daralma gözlemlendi (Resim 4b,5b).

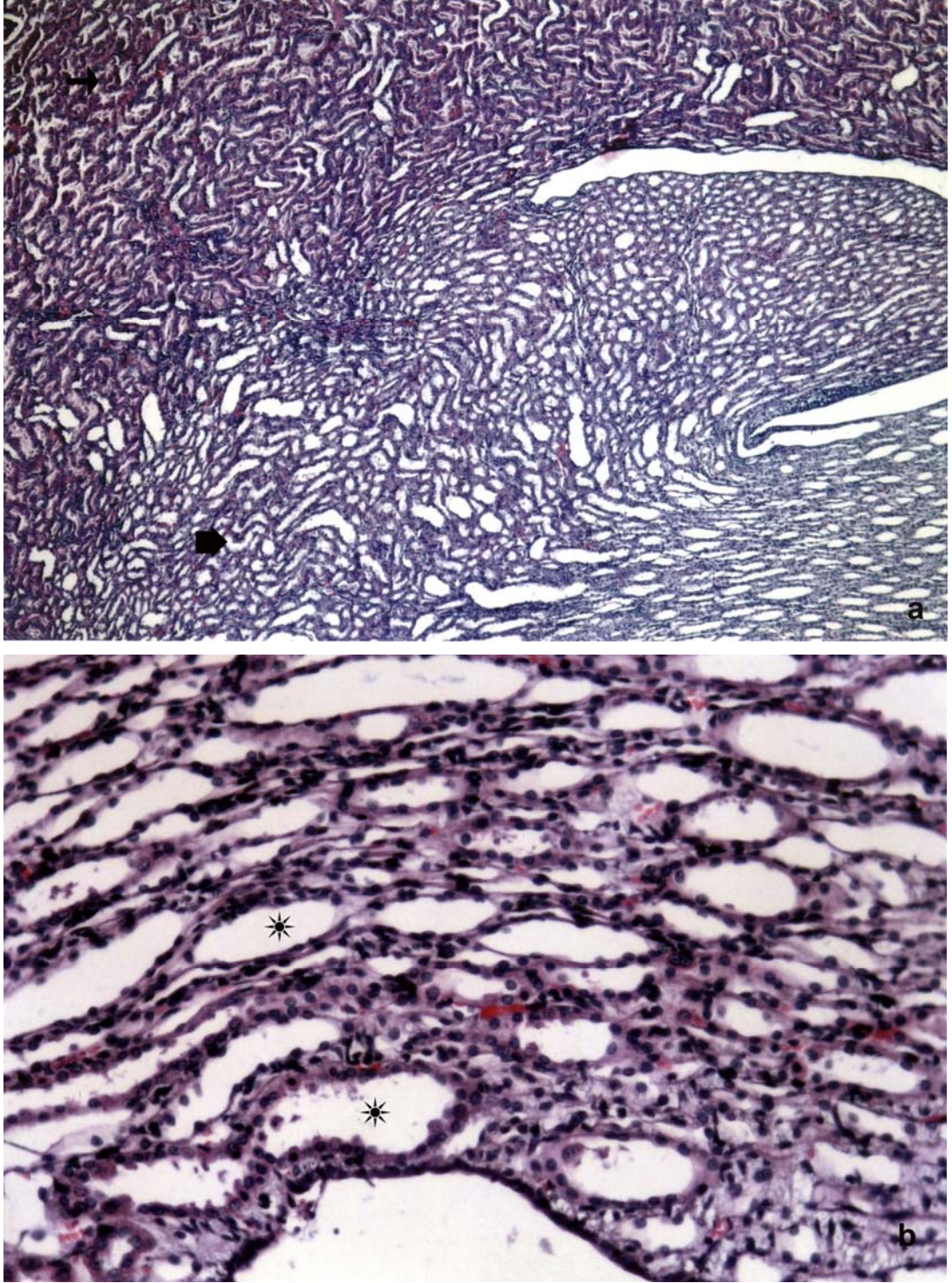
CsA ile birlikte Vitamin E+C uyguladığımız sıçan grubunun böbrek dokusu histolojik olarak incelendiğinde; CsA uygulaması sonucunda oluşan perivasküler ve peritübüler alanlarda mononükleer hücre infiltrasyonları, peritübüler kapiler konjesyon ve kanama odakları ve tübüllerde köpüğümsü görünüm gibi yapısal değişikliklerin büyük oranda devam ettiği fakat tek başına CsA uygulanan gruptaki kadar yaygın olmadığı gözlemlendi. Malpighi cisimciklerinde kapiler yumak, Bowman boşluğu, izlenen mezenseyal ve ekstramezenseyal hücreler normal histolojik yapıya yakın bir görünümde izlendi. Buna karşın proksimal ve distal tübül parankim hücrelerindeki vakuolizasyon piknotik çekirdekler gibi yapısal değişikliklerin devam etmekte olduğu gözlemlendi. (Resim 6,7).

CsA ile birlikte verapamil verdiğimiz sıçan grubunun böbrek dokusu histolojik olarak incelendiğinde; CsA uygulaması sonucunda oluşan yapısal değişikliklerin azaldığı görüldü. Korteksin derin bölgelerinde özellikle proksimal tübül yapılarında vakuolizasyon devam etmekteydi. İnfiltrasyon alanları azalmış olup, peritübüler kapiler konjesyon sınırlıydı. Malpighi cisimciklerinde kapiler yumak, Bowman boşluğu, mezenşiyal ve ekstramezenşiyal hücreler normal histolojik yapıya yakın bir görünümdeydi. (Resim 8,9).

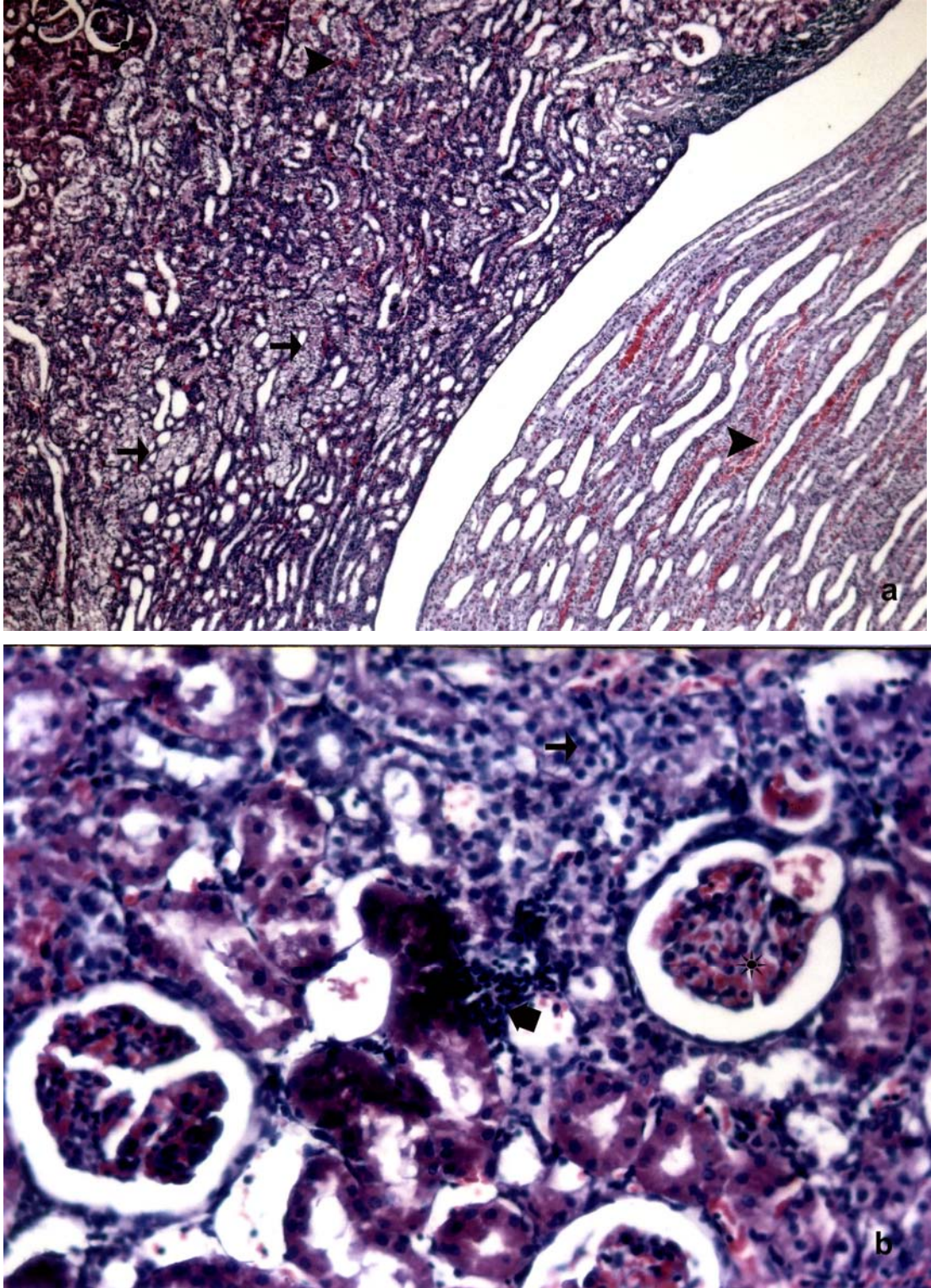
CsA ile birlikte verapamil ve vitamin E+C uyguladığımız sıçan grubunun böbrek dokusunun ışık mikroskobunda incelenmesinde; CsA uygulaması sonucunda oluşan yapısal değişikliklerin önemli ölçüde azaldığı saptandı. Bununla birlikte özellikle kortikomedüller bölgedeki tübüllerde vakuolizasyon ve piknotik çekirdeklerin sebat ettiği gözlemlendi (resim 10a). Böbrek dokusunun birkaç alanında da peritübüler kapiler konjesyon ve mononükleer hücre infiltrasyonuna rastlandı (resim 11b). Malpighi cisimciğinde Bowman boşluğu ve kapiler yumak normale yakın olarak izlendi (resim 10b,11a). Çoğu kesitte proksimal ve distal tübüllerin ve damar yapılarının normale yakın bir histolojik yapıda oldukları belirlendi.



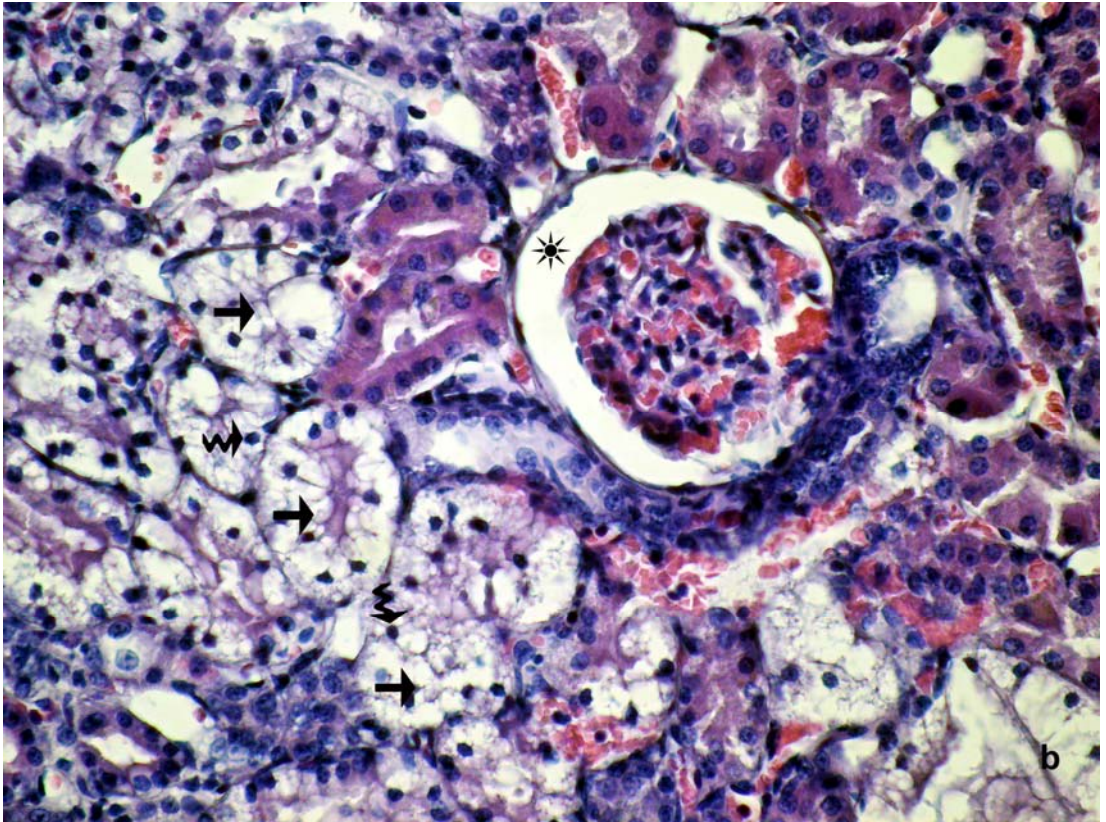
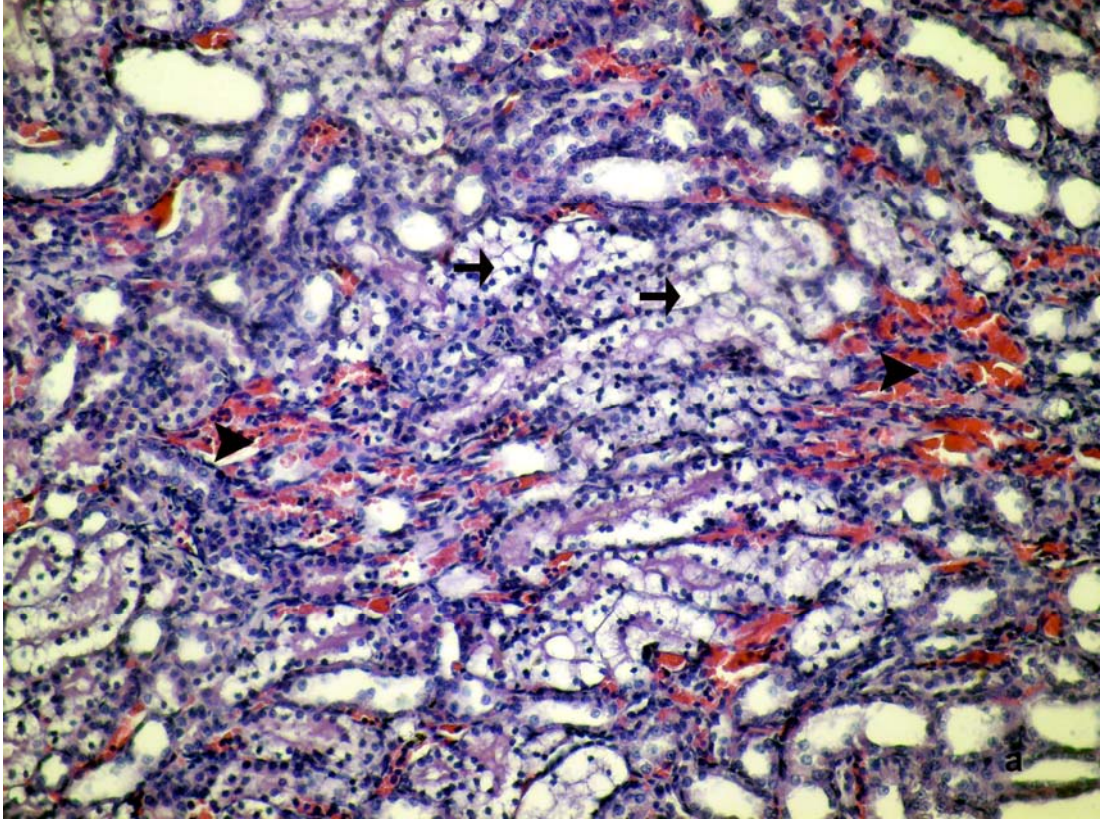
Resim 2. Kontrol grubuna ait sıçan böbrek dokusunun korteks bölgesinde (**a**: x400 ; **b** : x200) normal glomerul ve tubuler yapılar görülmekte a: distal tübül (yıldız), proksimal tübül (ok başı), glomerül (kalın ok) ve Bowman kapsülü pariyetal yaprağı (ince ok) b: Glomerül (yıldız)(Hematoksilen-Eozin).



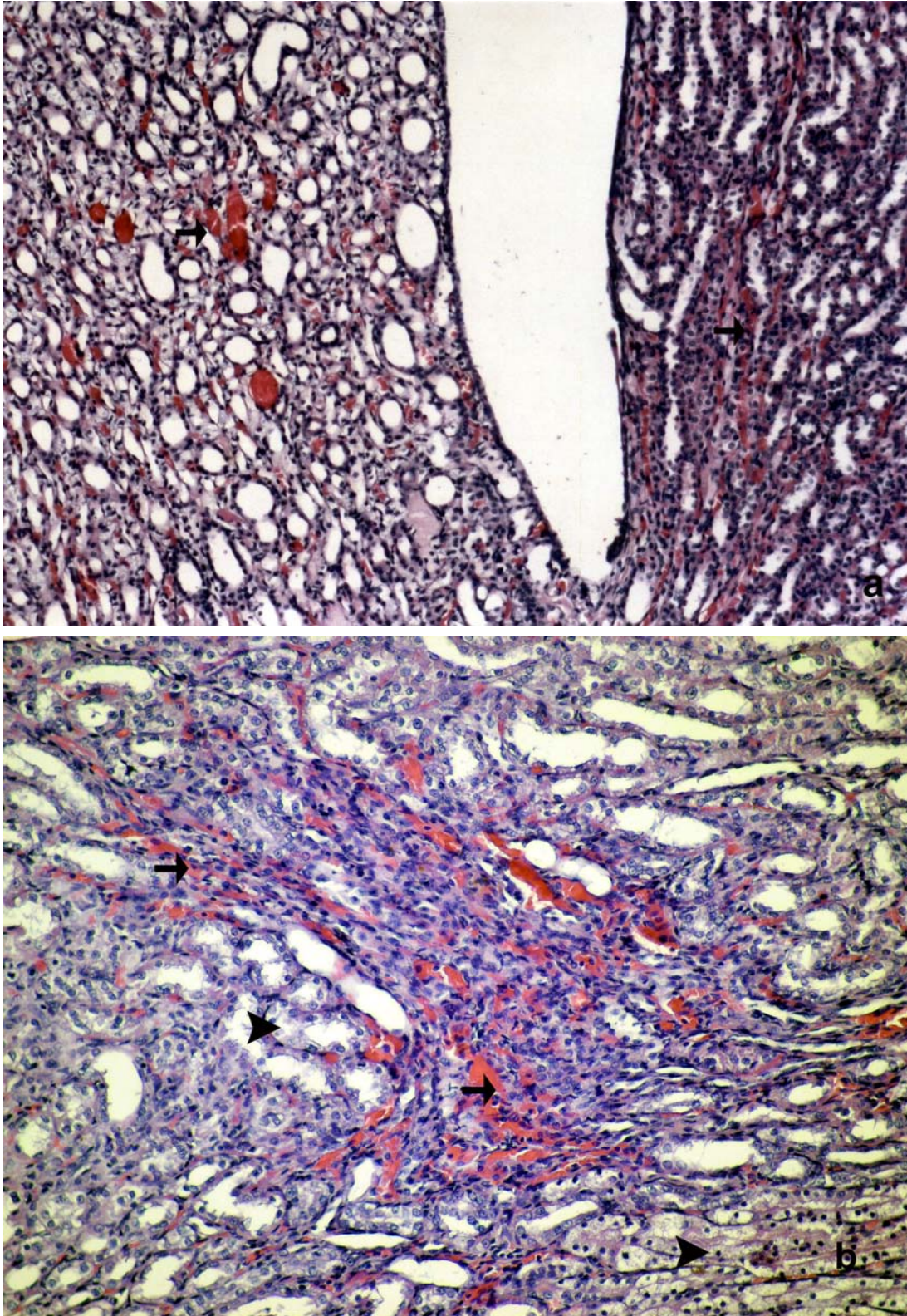
Resim 3: Kontrol grubuna ait sıçan böbrek dokusunun medulla bölgesinde (a: x40 ; b : x200) normal histolojik yapıdaki korteks (ince ok) ve medulla (kalın ok) bölgeleri ile toplayıcı kanallar (yıldız) gözlenmekte (Hematoksilen-Eozin)



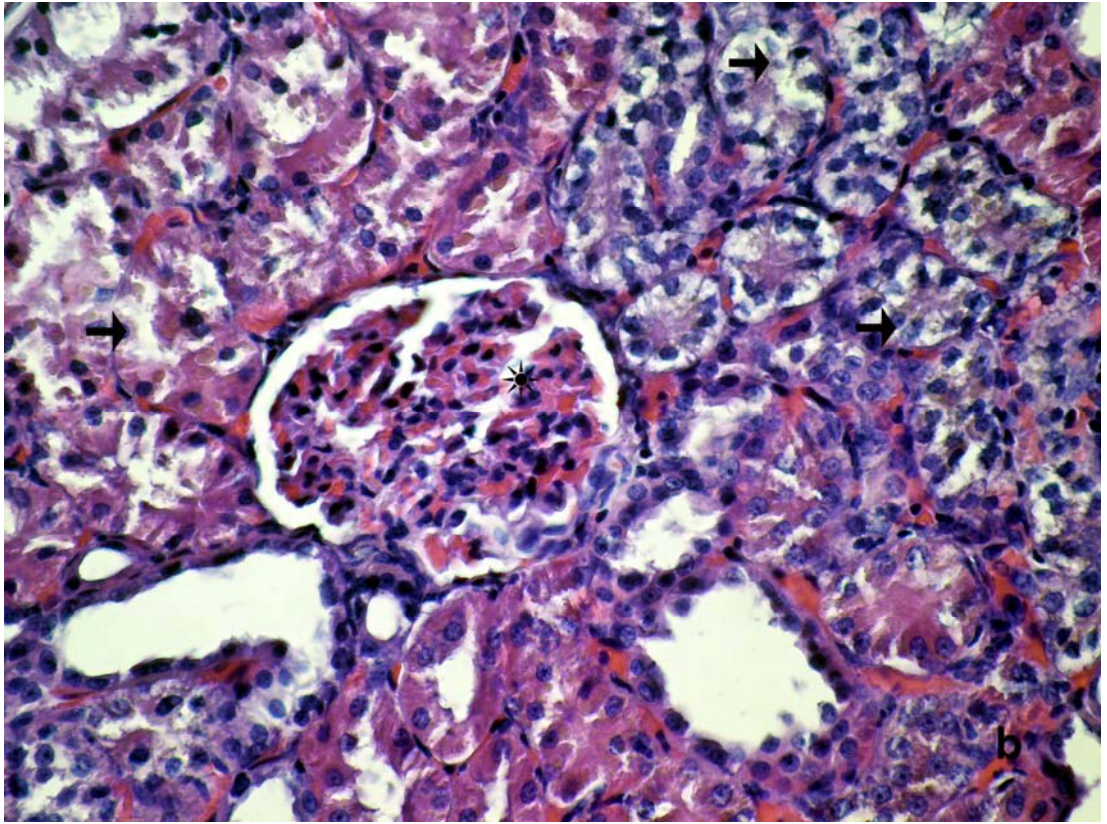
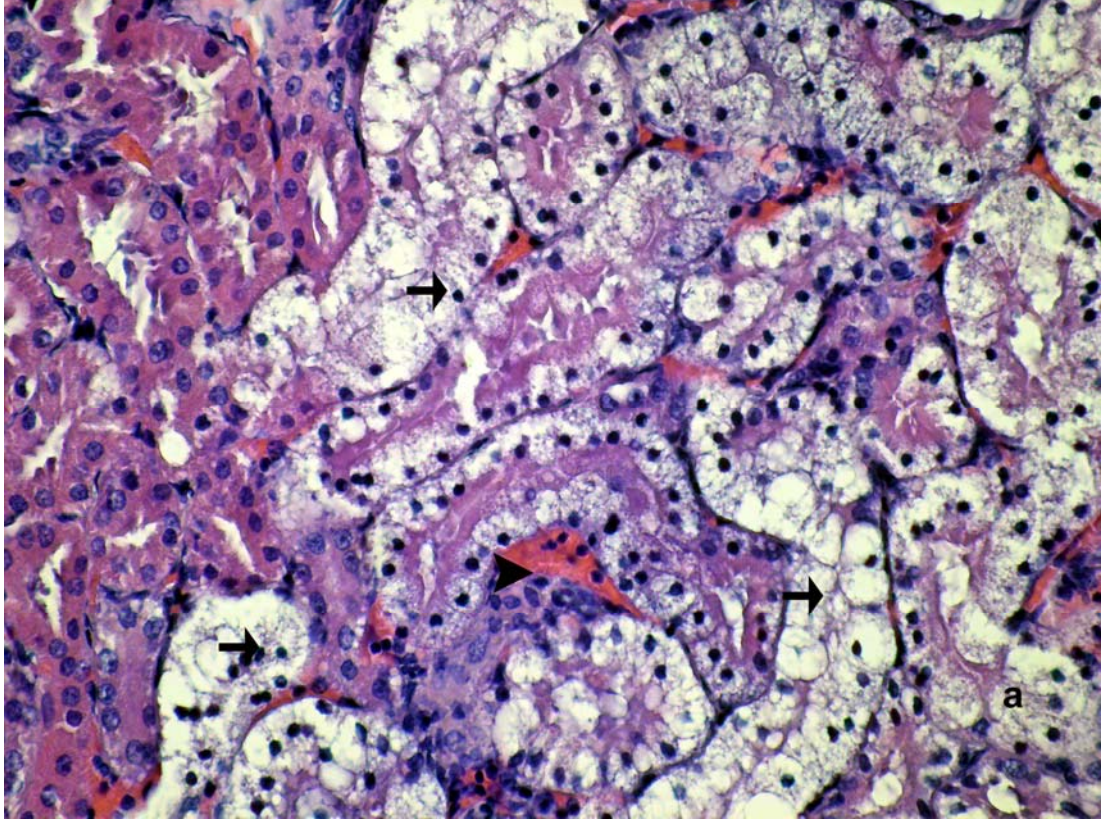
Resim 4: CsA verilen grubun böbrek medulla ve korteks görünümü (a: x40, b: x200) Tübüllerde ileri derece vakuolizasyon (ince ok), mononükleer hücre infiltrasyonu (kalın ok), Malpighi cisimciğinde küçülme ve Bowman boşluğunda artış (yıldız), konjesyon ve kanama alanları gözlenmekte (ok başı) (Hematoksilen-eozin)



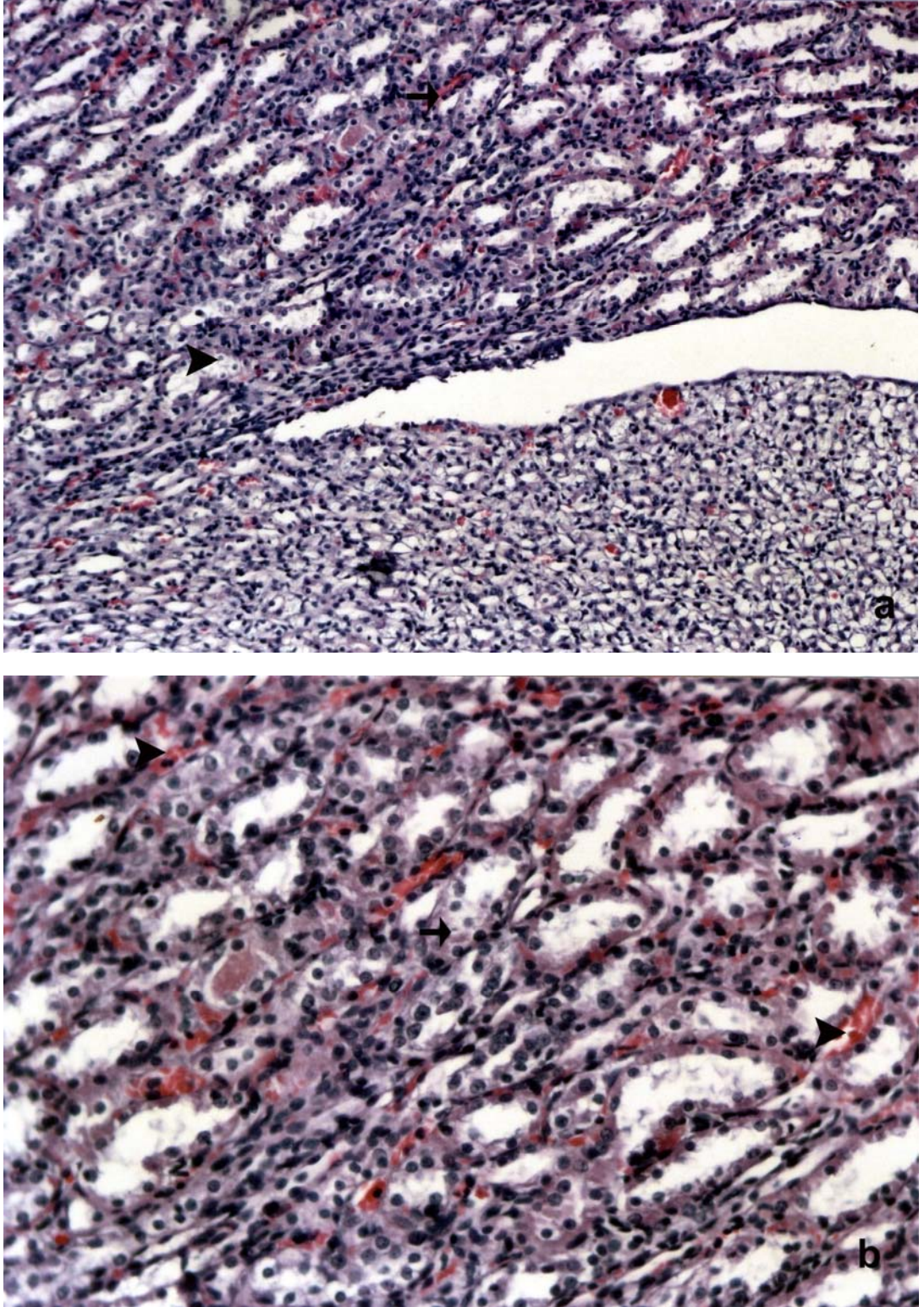
Resim 5: CsA verilen grubun böbrek dokusunun korteks bölgesinde iki (a: x200, b: x400) tübüllerdeki ileri derece vakuolizasyon (ince ok) ve piknotik çekirdekler (dalgalı ok), Bowman boşluğunda genişleme (yıldız) ve konjesyon ve kanama alanları gözlenmekte (ok başı) (Hematoksilen-eozin)



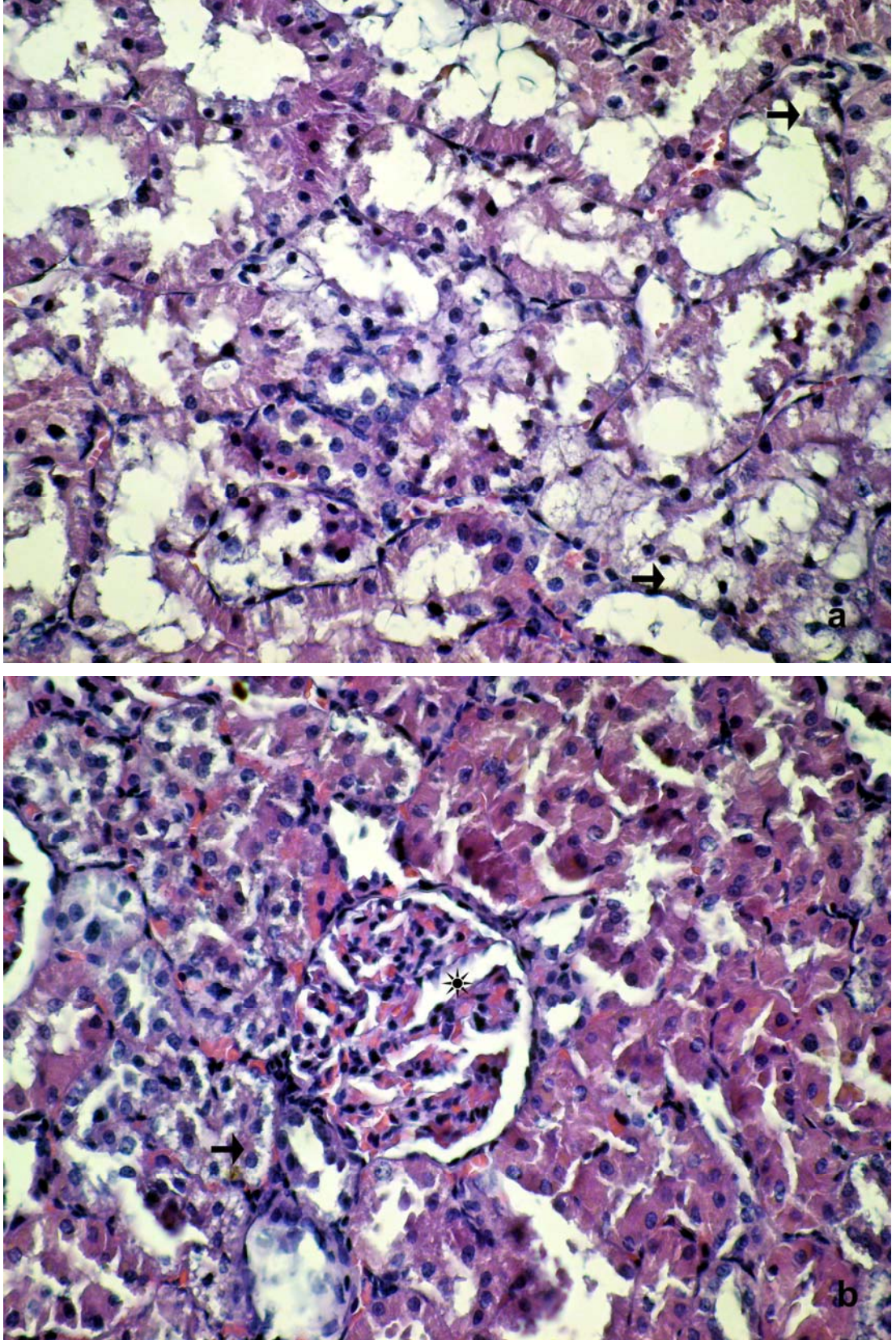
Resim 6: CsA+ vitamin E+C verilen grubun böbrek dokusu (a: x100, b: x200). Peritübüler kapiler konjesyon ve kanama alanları (ince ok), vakuollü tübüller (ok başı) gözlenmekte (Hematoksilen-Eozin)



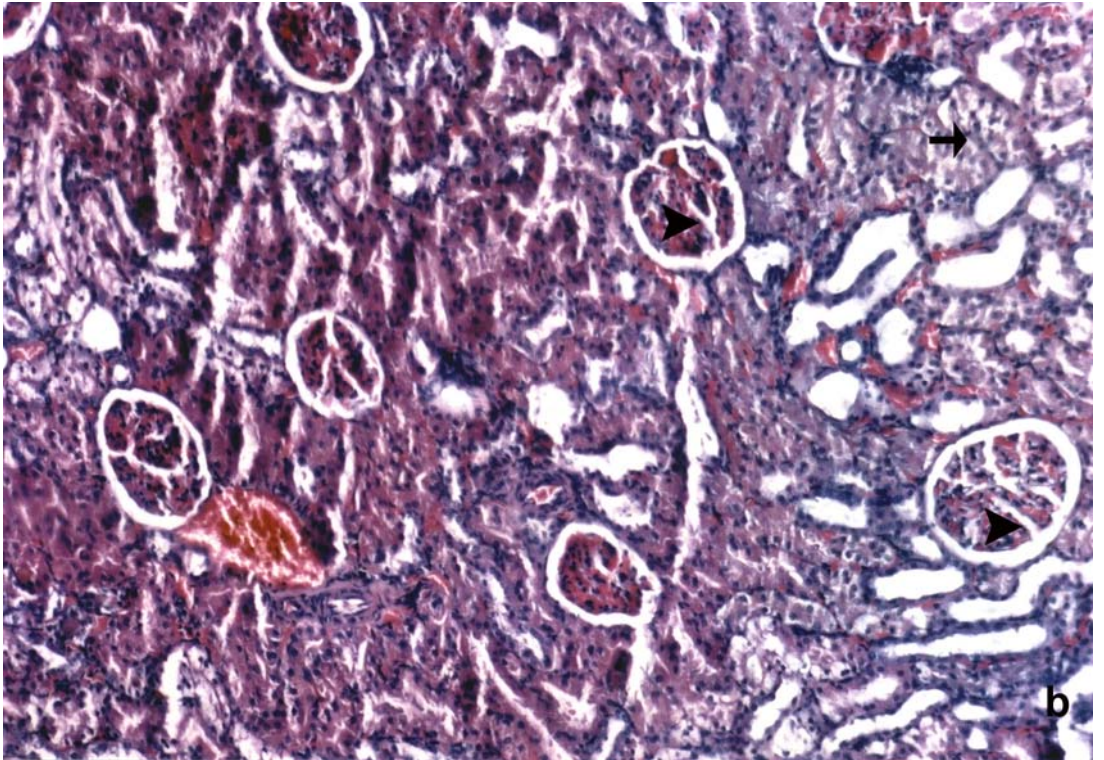
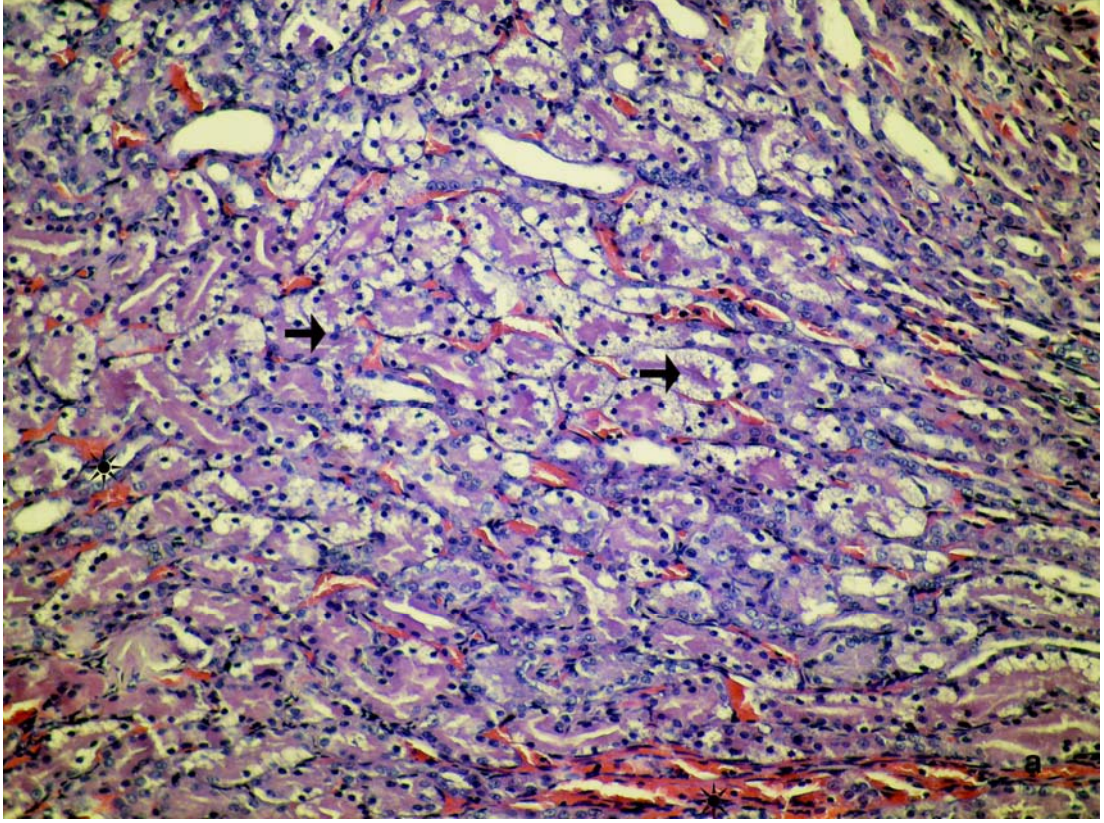
Resim 7: CsA+ vitamin E+C verilen grubun böbrek korteksi (a,b: x400). Piknotik çekirdekli ve hücre sitoplazması vakuollü tübül yapıları (ince ok) ve normale yakın görünümlü glomerül yapısı (yıldız) gözlenmekte (Hematoksilen-Eozin).



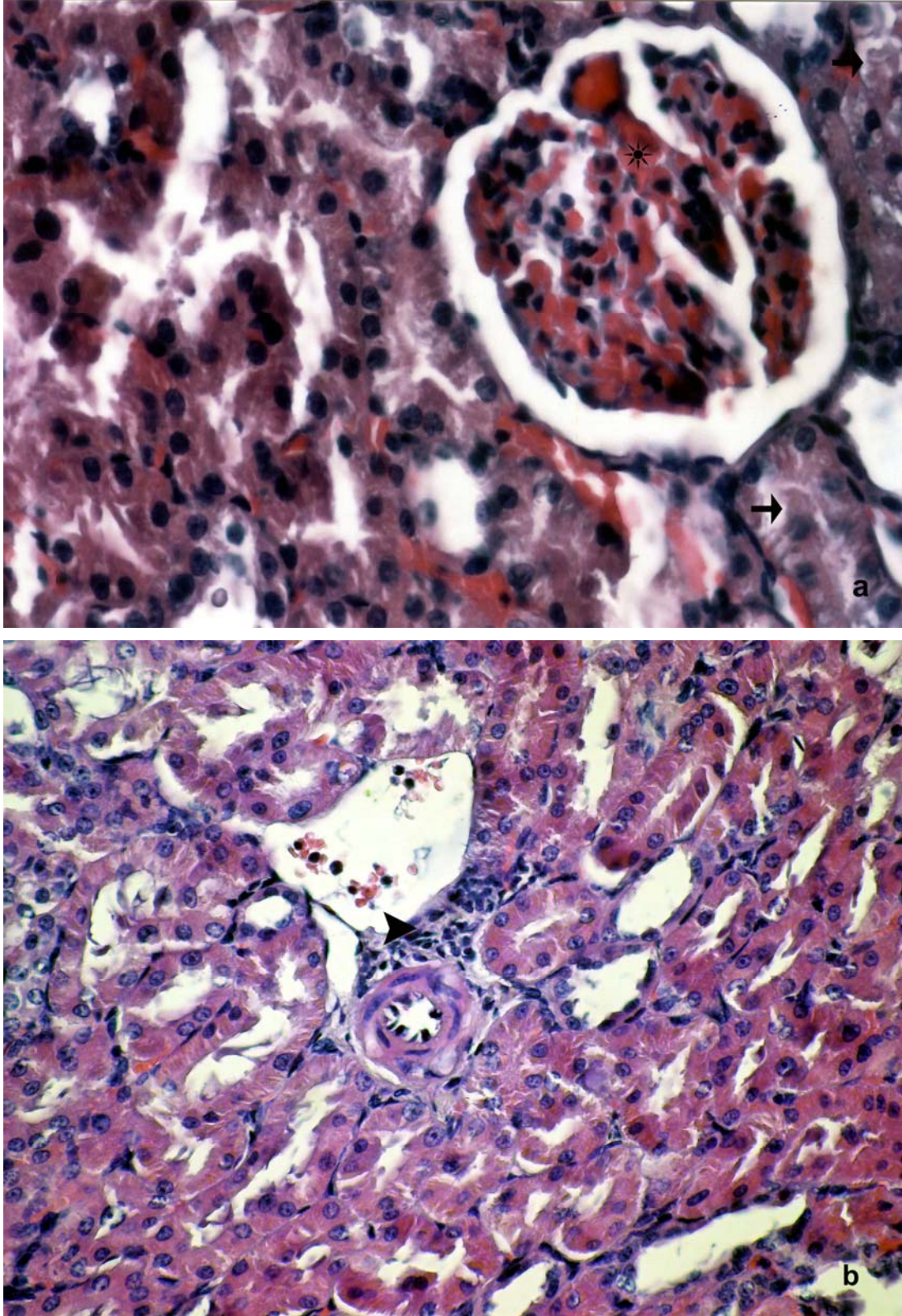
Resim 8: CsA+ verapamil verilen grubun böbrek dokusu (a: x100, b: x200). a: Çok yaygın olmayan tübüler vakuolizasyon (ok başı); b: Peritübüler kapiler konjesyon alanları (ok başı) ve tübüler vakuolizasyon (ince ok) görülmekte (Hematoksilen-Eozin).



Resim 9: CsA + verapamil verilen grubun böbrek korteksi (a, b: x400). Tübüler vakuolizasyon (ince ok) ve normal histolojik yapıdaki Malpighi cisimciği (yıldız) görülmekte (Hematoksilen-Eozin).



Resim 10: CsA+verapamil+vitamin E+C verilen grubun böbrek dokusu (a: x200, b: x100). Piknotik çekirdekler içeren vakuolize tübüller (ince ok) ve normal histolojik yapıya yakın görünümlü Malpighi cisimcikleri (ok başı) görülmekte. (Hematüksilen-Eozin)



Resim 11: CsA+verapamil+vitamin E+C verilen grubun böbrek korteksi (a,b: x400). Normal histolojik yapıya yakın görünümlü kapiler yumak (yıldız) ve tübül yapıları (ince ok) ile mononükleer hücre infiltrasyonu görülmekte (Hematoksilen-Eozin)

4.3. Biyokimyasal Bulgular

Kontrol ve deney grubu sıçanlara ait böbrek dokusu katalaz ve GSH-PX aktiviteleri ve serum BUN ve kreatinin düzeyleri aritmetik ortalama±standart sapma, median değer, minimum ve maksimum değer olarak tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3 : Deney gruplarının böbrek dokusu GSH-Px , CAT aktiviteleri ve serum BUN ve kreatinin düzeyleri , (CsA:Siklosporin A, Vit: vitamin E ve C, Ver: verapamil, BUN: Kan üre azotu, cat: katalaz, GSH-PX: glutasyon peroksidaz, ort: ortalama, ss: standart sapma, min:minimum, max: maksimum) (böbrek dokusu GSH-PX ve CAT değerleri: ünite/mg protein)

		ÖLÇÜMLER				
			BUN	Kreatinin	Cat	GSH-PX
GRUPLAR	CsA	Ort ± ss	98±51	1.20±0.2	5.67±0.7	0.23±0.0 2
		Median	79	1.10	5.6	0.23
		Min. değer	60	1.01	5	0.20
		Max.değer	188	1.50	6.71	0.27
	CsA+vit+ver	Ort ± ss	47±3	0.68	5.6	0.30±0.0 1
		Median	46	0.65	6	0.30
		Min. değer	44	0.63	4	0.28
		Max.değer	52	0.76	7	0.31
	CsA+ver	Ort ± ss	49±2	0.69±0.0 4	5.6±0.5	0.24±0.0 1
		Median	50	0.68	6	0.24
		Min. değer	47	0.65	5	0.22
		Max.değer	51	0.76	6	0.25
	CsA+vit	Ort ± ss	58±2	0.81±0.0 4	7.64±2	0.25±0.0 1
		Median	58	0.82	7	0.25
		Min. değer	55	0.76	6	0.24
		Max.değer	60	0.86	11	0.27
	Kontrol	Ort ± ss	19±2	0.63±0.0 8	9.2±2	0.32±0.0 2
		Median	20	0.63	9.5	0.31
		Min. değer	17	0.54	5.9	0.30
		Max.değer	21	0.71	11	0.35

Serum BUN ve kreatinin seviyeleri CsA verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.05$). CsA+vitamin verilen grupta, CsA+verapamil verilen grupta ve CsA+verapamil+vitamin verilen grupta BUN değeri kontrol grubuna

göre yüksek olarak bulundu ($p<0.05$). Bu gruplarda serum kreatinin düzeyi de yüksek olarak bulundu fakat bu yükseklik sadece CsA+vitamin grubunda istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0.05$) (Tablo 4) (Şekil 14).

CsA verilen grupla CsA+vitamin, CsA+verapamil ve CsA+vitamin +verapamil verilen gruplar karşılaştırıldığında ise BUN ve kreatinin değerlerinin anlamlı olarak düştüğü bulundu ($p<0.05$) (Tablo 4) (Şekil 14).

CsA+vitamin verilen grupla CsA+verapamil ve CsA+verapamil+vitamin verilen grupların serum BUN ve kreatinin değerleri karşılaştırıldığında ise anlamlı olarak düşüş saptandı ($p<0.05$) (Tablo 4) (Şekil 14).

CsA+verapamil verilen grup ile CsA+verapamil+vitamin verilen grup karşılaştırıldığında ise serum BUN ve kreatinin değerlerinde anlamlı olmayan bir düşüş olduğu belirlendi (Tablo 4) (Şekil 14).

Böbrek dokusu katalaz aktivitesi CsA, CsA+vitamin, CsA+verapamil, CsA+verapamil+vitamin alan gruplarda kontrol grubuna göre azalmış olarak bulundu. Fakat bu düşüşlerden sadece CsA verilen gruptaki istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). CsA alan grupla CsA+verapamil ve CsA+verapamil+vitamin alan gruplar arasında katalaz aktivitelerinde bir fark yoktu. CsA+vitamin alan gruba göre CsA+verapamil alan grubun katalaz aktivitesinde azalma görülmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildi. (Tablo 4) (Şekil 14).

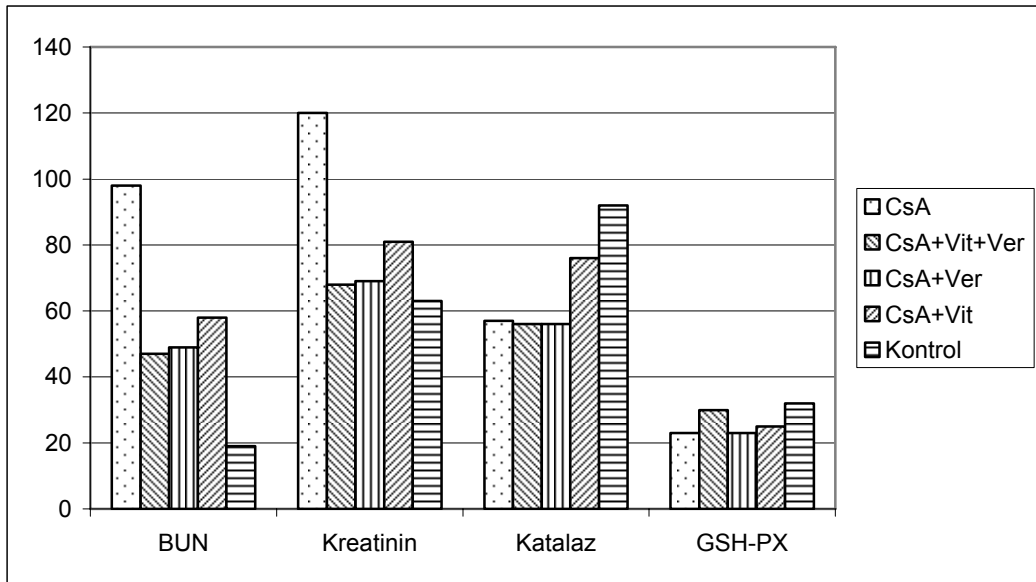
Böbrek dokusu GSH-PX aktivitelerine bakıldığında CsA, CsA+vitamin ve CsA+verapamil alan gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı azalma bulundu ($p<0.05$). Kontrol grubuna göre CsA+vitamin+verapamil alan grupta GSH-PX aktivitesinde azalma olmakla birlikte bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 4) (Şekil 14).

CsA alan gruba göre CsA+vitamin ve CsA+vitamin+verapamil alan gruplarda GSH-PX aktivitelerinde artış bulundu. Bunlardan CsA+vitamin+verapamil grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0.05$). CsA alan grup ile CsA+verapamil alan grupların GSH-PX aktiviteleri aynı bulundu (Tablo 4) (Şekil 14).

CsA grubuna göre CsA+vitamin+verapamil grubunda, CsA+vitamin grubuna göre CsA+verapamil+vitamin grubunda, CsA+verapamil grubuna göre CsA+verapamil+vitamin grubunda GSH-PX aktivitelerinde anlamlı yükselme bulundu ($p<0.05$). CsA+vitamin grubuna göre CsA+verapamil grubundaki GSH-PX aktivitesindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 4) (Şekil 14).

Tablo 4: Biyokimyasal değerlerin gruplar arasında karşılaştırılması ,"-":değişiklik yok, *:p<0.05, **: Grupların karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi kullanılmıştır.

Grupların Karşılaştırılması**	BUN	Kreatinin	Katalaz	GSH-PX
Kontrol/ CsA	↑*	↑*	↓*	↓*
Kontrol/ CsA+Vitamin	↑*	↑*	↓	↓*
Kontrol/ CsA+verapamil	↑*	↑	↓	↓*
Kontrol/ CsA+vitamin+ver	↑*	↑	↓	↓
CsA/ CsA+Vitamin	↓*	↓*	↑	↑
CsA/ CsA+Verapamil	↓*	↓*	-	-
CsA/ CsA+vitamin+ver	↓*	↓*	-	↑*
CsA+Vitamin/ CsA+Verapamil	↓*	↓*	↓	↓
CsA+Vitamin/ CsA+vitamin+ver	↓*	↓*	↓	↑*
CsA+Verapamil/ CsA+vitamin+ver	↓	↓	↓	↑*



Şekil 14: Serum BUN ve kreatinin değerlerinin ve böbrek dokusu katalaz ve GSH-PX aktivitelerinin kontrol ve deney gruplarında karşılaştırılması (Kreatinin ve GSH-PX değerleri 100 ile, Katalaz değeri 10 ile çarpılmıştır)

5. TARTIŞMA

CsA 1976 yılında bulunduğundan bu yana organ nakillerinde reddi önlemede önemli kullanım alanına sahip bağışıklık sistemini baskılayıcı bir ajandır (1). CsA'nın kullanımı, transplantasyon hastalarının yaşam kalitesini ve süresini arttırmıştır. CsA bu hastalarda hayatta kalabilirliğin, rejeksiyon epizotlarının ve hastanede kalma süresinin azalmasında çok etkili olmuştur. (4,5). Bu bağışıklık sistemini baskılayıcı ajanın en önemli yan etkisi nefrotoksisitedir (2,3).

CsA nefrotoksisitesi zaman ve klinik görünüme göre Mihatsch ve ark. tarafından 3 tipte sınıflandırılmıştır (83):

- 1- Diffüz interstisyel toksisite ile karakterize toksisite (hastalarda uzamış oligo-anüri ile giden)
- 2- Normal böbrek dokusu veya peritübüler kapiler konjesyon veya CsA tübülopatisi ile giden akut toksisite
- 3- CsA arteriyopatisi veya tübüler atrofi ile birlikte olan interstisyel fibrozis veya her ikisinin birlikte olduğu kronik toksisite

CsA nefrotoksisitesi için en çok kabul edilen hipoteze göre, CsA'nın ilk etki yeri glomerüler arteriolün başlangıç kısmıdır. Burada vasküler tonüsü artırır. Glomerüler hipoperfüzyon sonucunda, otoregülasyon mekanizmaları ile glomerüler prostoglandin üretimi ve renin-anjiyotensin sistemi aktivitesinde artış ile kompanse edilmeye çalışılır. CsA'ya maruz kalınan sürenin uzaması ile birlikte bilinmeyen nedenlerle glomerüler prostoglandin sentezi bozulur. Azalan PG sentezi ve dengelenmemiş anjiyotensin II sentezi otoregülatör sistemi engeller ve filtrasyon oranında düşmeye neden olur (84).

CsA nefrotoksisitesinde suçlanan diğer bir mekanizma da, CsA'nın hücre membranında yaptığı lipit peroksidasyonu sonucunda serbest oksijen radikallerini arttırarak yaptığı oksidatif hasar mekanizmasıdır (85,86)

Her iki böbreğin tüm nefronlarında birim zamanda üretilen glomerüler filtrat miktarı glomerüler filtrasyon değeri (GFD) olarak bilinir. Glomerüler filtrasyonun azalması sonucu BUN ve kreatinin serum seviyeleri artmaya başlar (87).

Akut böbrek yetmezliği glomerüler filtrasyonun saatler veya günler içinde azalarak başta kreatinin ve üre olmak üzere nitrojen artık ürünlerin birikmesi ile karakterize bir sendromdur. CsA akut tübüler nekroz yaparak akut böbrek yetmezliği (ABY)'ne neden olur (87).

İnsanlarda görülen sitoplazmik granüler vakuolizasyon ve inklüzyon cisimciklerini içeren akut tübüler toksisite sıçanlarda da çok rahat oluşturulabilmektedir (79,88).

Bu çalışmada deney grubundaki sıçanlara, insanlara uygulanan CsA dozuna göre oldukça yüksek dozda CsA (50 mg/kg/gün) uygulayarak nefrotoksisite oluşturmaya çalıştık. Sıçanların insanlara göre CsA'nın toksik etkilerine daha dayanıklı olması nedeniyle ve çalışmamızda daha kısa sürede toksisite oluşturabilmek amacı ile yüksek doz CsA uyguladık (89).

10 gün boyunca CsA verdiğimiz grupta böbrek dokusunun histolojik olarak incelenmesinde belirgin yapısal değişiklikleri gözledik. Böbrek korteksinde yapısal değişikliklerin en çok görüldüğü yapılar proksimal tübüllerdi. Deney grubunun özellikle korteks medulla bileşkesindeki proksimal tübüllerin hemen hemen tamamının hücre sitoplazmasında artmış vakuoler dejenerasyona rastladık.

Proksimal tübüllerin özellikle medulla korteks bölgesinde yoğunlaşmış olan son kısmı, CsA metabolizmasında görevli P-450 oksidazları içeren peroksizomlardan çok zengin olup (90,91), bu bölgede CsA'nın metabolitlerine ayrılması esnasında oksidazların inhibe olması nedeniyle hücre içerisinde daha çok madde birikimi meydana gelmektedir. Ayrıca Venkatachalam ve ark., hayvan modellerinde bu bölgenin iskemik hasara en hassas bölge olduğunu bildirmişlerdir (92).

CsA'nın proksimal tübülde, elektron taşıma sistemi üzerine doğrudan etki yoluyla, sitokrom oksidaz aktivitesini azaltarak, mitokondriyal solunumu engellediği, bu yüzden mitokondriyonda yeterli enerjinin üretilmediği ileri sürülmüştür (93).

Sitoplazmaya giren CsA'nın detoksifikasyonu amacı ile endoplazmik retikulumun genişlediğini ve bir süre sonrada sitoplazmada vakuolleşmeye gittiğini düşünmekteyiz. Mitokondriyonun enerji üretememesi ve düz endoplazmik retikulumun sürekli kayba uğraması sonucunda hücrede fonksiyon kaybı, hidropik şişme ve atrofi meydana gelecektir.

Kim AY ve ark., yaptıkları çalışmada bazı vakuollerin nötral yağ damlaları, bazılarının ER'un dilatasyonu sonucunda oluşmuş membranla ilişkili yapılar olduğunu; sitoplazmik inklüzyon cisimciklerinde genişlemiş otolizozomlar olduğunu göstermişlerdir (94).

Çalışmamızda CsA verilen grupta, Malpighi cisimciğinde gözlediğimiz Bowman boşluğundaki genişleme ve kapiler yumaktaki daralmanın afferent arterioldeki daralma sonucu ortaya çıkan iskemi nedeniyle ortaya oluştuğunu düşünmekteyiz.

Özellikle kortikomedüller bölgede gözlediğimiz mononükleer hücre infiltrasyon odaklarının, bu bölgede yer alan proksimal tübüllerin karma fonksiyonlu düz kısımlarının CsA'dan etkilenecek, hasara uğraması ve hasara yanıt olarak organizmanın savunma mekanizmasının devreye girmesi, hasarlanmış proksimal tübüllerin yerine, kemotaktik etkiyle mononükleer hücrelerden oluşan infiltrasyon hücrelerinin toplanıp, kronik yanıt oluşturmamasından dolayı olduğu düşünüldü.

CsA uyguladığımız sıçanların böbrek dokusunda yaygın olarak gözlemlendiğimiz peritübüler kapiler konjesyon ve kanama odaklarının; damar duvarındaki kontraksiyon (95), kapiler bozulma (96) ve endotel hasarından dolayı ortaya çıkmış olduğu kanaatine varıldı.

CsA verdiğimiz deney grubundaki biyokimyasal bulgularımız histolojik görünümle paralellik göstermekteydi. GFD'nin azalmasının göstergesi olan serum BUN ve kreatinin değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yükselmiş olarak gözlemlendi.

CsA çok lipofilik bir bileşik olup hücre zar yapılarına kolaylıkla bağlanabilir (97). Zarlar ve özellikle ER zarları fazla miktarda doymamış yağ asitleri içermeleri nedeniyle peroksidatif hasara karşı çok duyarlıdır (98,99). Bunun yanısıra zarlar geniş yüzey alanına sahip olduğu için oksidatif atağa maruz kalma olasılığı da sıktır (19). İlaçların etkisiyle oluşan serbest radikaller ve lipit peroksidasyonu, nefrotoksisite ve hücre hasarından sorumlu olası patolojik mekanizmalardan biridir (98). Daha önce yapılan çalışmalarda, CsA'nın nefrotoksik etkilerine katkıda bulunabilecek peroksidatif özellikleri olduğunu göstermiştir (100).

Antioksidan enzimler SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktazdır. İlk üç enzim peroksidlerin ve süperoksitin toksik olmayan türlerini katalizleyerek serbest oksijen radikali hasarını azaltırlar (101).

Çalışmamızda CsA verdiğimiz sıçan grubunun böbrek dokusunda katalaz ve GSH-PX aktivitelerini değerlendirdiğimizde kontrol grubuna göre her iki enzimin aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı düşüş olduğunu gördük. Bu CsA'nın yaptığı nefrotoksisitedeki oksidatif hasar hipotezini destekleyen bir bulgudur.

Mun KC ve ark., yaptıkları bir çalışmada CsA'nın serum BUN kreatinin ve böbrek dokusu lipit peroksidasyon ürünü olan MDA seviyelerinde anlamlı artışlar yaptığını ve antioksidan bir ajan olan melatonin tedavisinin bu değerlerde önemli düşüşler yaparak serbest radikal hasarını ve CsA nefrotoksisitesini azalttığını göstermişlerdir (102).

Mun KC ve ark., başka bir çalışmada da kandaki SOD ve katalaz aktivitesinin CsA verilen grupta, kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğunu göstermişlerdir (103).

Durak I ve ark., tavşanlarda CsA verilen grupta böbrek dokusunda GSH-PX ve katalaz aktivitelerini düşük olarak bulmuşlardır (104).

Özdemir M ve ark., yaptıkları çalışmada CsA verilen grupta yükselen serum ürik asit ve BUN değerlerinin, vitamin E tarafından düşürüldüğünü, ayrıca CsA'nın neden olduğu tübüler nekrozun vitamin E tarafından azaltıldığını göstermişlerdir (105).

Çalışmamızda CsA'nın doğrudan etkisi sonucu oluşan lipid peroksidasyonu ve afferent arteriyoldeki vazokonstriksiyon sonucu oluşan iskemi neticesinde ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin etkisini azaltabileceğini düşünerek CsA ile birlikte E ve C vitaminini kullandık.

Suda çözünen bir vitamin olan C vitaminini, ekstraselüler sıvıda bulunan en önemli antioksidan madde (25,26) ve hücre içinde de antioksidan etkinliği olması nedeniyle; yağda çözünen bir vitamin olan E vitaminini de, hücre membran fosfolipitlerinin oksitlenerek peroksit türevlerine dönüşmelerini hücre membranında önleyebilen en güçlü antioksidan olması sebebiyle kullandık (46). Antioksidan etkinin en üst düzeyde olması için çalışmamızda E ve C vitaminini birlikte kullandık.

Çalışmamızda CsA ve vitamin E+C verdiğimiz sıçan grubunun böbrek dokusunu incelediğimizde tek başına CsA verdiğimiz gruptaki yapısal değişikliklerin büyük oranda devam ettiğini, ancak tek başına CsA verilen gruptaki kadar yoğun olmadığını gördük. Tübüllerdeki patolojik görünümün sürmesine, peritübüler kapiler konjesyon ve kanama alanlarının izlenmesine rağmen Malpighi cisimciği normal histolojik yapıya yakın bir görünümde izlendi.

Malpighi cisimlerindeki düzelmelerin, E ve C vitaminlerinin iskemik hasarda etkili olan serbest oksijen radikalleri oluşumunu azaltmasına bağlı olduğunu ve proksimal tübüldeki hasarın devam etmesini ise bu bölgenin CsA'ya ilk maruz kalan ve en hassas bölge olması nedeniyle olduğu düşünüldü.

CsA ve vitamin E+C verdiğimiz sıçan grubunun biyokimyasal bulgularının literatür bilgileri ile uyumlu olduğu gözlemlendi. CsA ile birlikte vitamin E+C verdiğimiz sıçanların böbrek fonksiyon testlerinde düzelmeye olduğu saptandı. Serum BUN ve kreatinin değerleri kontrol grubuna göre hala anlamlı olarak yüksek olmakla birlikte, CsA verilen gruba göre anlamlı bir düşüş olması Vitamin E+C'nin koruyucu etkisini gösterdiğini düşündürdü. Böbrek dokusundaki katalaz ve GSH-PX değerlerinin CsA

grubuna göre yükselmiş olması da (istatistiksel olarak anlamlı değil) bunu destekleyen bir bulgu olarak değerlendirildi.

Yapılan deneysel çalışmalarda, CsA kullanımı ile güçlü bir vazokonstrüktör olan tromboksan B2'nin idrarla atılımının arttığı, bir vazodilatatör olan PGE2'nin üretiminin azaldığı gösterilmiştir (40,106). Yine sıçanlarda yapılan bir çalışmada, CsA verilen sıçanlardan alınan böbrek biyopsilerinde SEM ile afferent arteriyollerde daralma gösterilmiştir (107).

CsA aracılıklı vazokonstrüktör etkiye vasküler düz kas hücrelerindeki artmış kalsiyum hareketi aracılık edebilir. CsA'nın transmembranal kalsiyum iç akımını uyardığı gösterilmiştir. CsA vasküler düz kas hücrelerinde anjiyotensin II'nin neden olduğu kalsiyum akışını; anjiyotensin II'ye duyarlı hücre içi kalsiyum depolarını arttırmaktadır (108).

Mansour ve ark., yaptıkları çalışmada sıçan böbreğinde NO üzerinden vazodilatasyon yapan bir ajan olan L-arjininin, CsA'nın neden olduğu böbrek fonksiyonlarındaki ve histolojik yapıdaki bozulmayı azalttığını göstermişlerdir (109). CsA'yı 15 mg/kg/gün/ip olarak 10 gün verilmesi ile oluşan böbrek hasarında MDA'da anlamlı artış ve GSH-PX enzim aktivitesinde anlamlı düşüş olduğunu ve L-arjinin tedavisi sonucunda MDA'daki artışın azaldığını, ayrıca GSH-PX enzim aktivitesinde düzelme olduğunu göstermişlerdir.

Darlametsos ve ark., CsA ile birlikte Ca^{++} kanal blokeri olan nifedipin verdikleri çalışmalarında nifedipinin, CsA'nın böbrekteki fonksiyonel toksisitesini azaltıcı etkileri olduğunu göstermişlerdir (110).

Aller Rejero ve ark., yavaş etkili bir Ca^{++} kanal blokeri olan verapamilin CsA'nın oluşturduğu nefrotoksositeyi azalttığını ve bunuda CsA'nın plazma klirensini arttırarak yaptığını söylemektedirler (111).

L'Azou ve Ark., izole sıçan glomerülünde, alan değişiklikleri ile ilgili yaptıkları çalışmada, CsA bulunan ortamda glomerül çapının küçüldüğünü ve verapamil ile bu çaptaki değişimin azaldığını göstermişlerdir (112).

Çalışmamızda CsA ile birlikte verapamil verdiğimiz sıçan grubunun böbrek dokularını histolojik olarak incelediğimizde CsA uygulaması ile oluşan yapısal değişikliklerin azalmış olduğunu gözlemledik. CsA grubunda çok yaygın olan tübüler vakuolizasyonun görüldüğü alanlar bu deney grubunda sadece korteksin derin bölgelerinde izlendi. Verapamilin yaptığı preglomerüler vazodilatasyonun (113), CsA tarafından afferent arteriyolde oluşturulan vazokonstrüksiyon sonucunda gelişen

yapısal değişiklikleri azalttığı düşünöldü. Ancak CsA'dan en fazla etkilenen yapı olan proksimal tüböldeki değişiklikleri önlemede yetersiz kaldığı gözlemlendi.

CsA ve verapamil uygulanan grupta biyokimyasal bulgulardan BUN ve kreatinin değerlerindeki, CsA uygulanan gruba göre anlamlı düşüş, histolojik bulgular ile uyuşmaktadır ve verapamilin koruyucu etkisini göstermektedir. Katalaz ve GSH-PX değerlerinin ise CsA grubuna göre değişiklik göstermediği saptandı. Bu verilerin sonucunda tek başına verapamilin antioksidan sistem enzimleri üzerine olumlu bir etkisinin olmadığı düşünöldü.

CsA + verapamil verilen grupta, CsA+ vitamin verilen gruba göre BUN ve kreatinin değerlerinde anlamlı düşüşün gözlenmesi, verapamilin CsA nefrotoksitesine karşı vitamin E+C'den daha koruyucu olduğunu göstermektedir. Bu bulgu histolojik görünüm ile de uyumludur.

Çalışmamızda CsA + verapamil + Vitamin E ve C'yi birlikte kullandığımız grubun böbrek dokusunu incelediğimizde, CsA uygulaması sonucunda oluşan yapısal değişikliklerin önemli ölçüde azaldığını saptadık. CsA + verapamil + Vitamin E ve C verdiğimiz grubun böbrek dokusunun, CsA+verapamil ve CsA+vitamin E ve C verdiğimiz gruplara göre daha az yapısal değişiklik içerdiğini gözledik. Bununla birlikte hala kortikomedüller bölgedeki tübüllerde vakuolizasyon ve piknotik cisimlere rastlamamız, bu bölgedeki güçlü CsA etkisinin önlenmesinde bu ilaç birlikteliğinin yetersiz kaldığını göstermektedir.

Biyokimyasal olarakta böbrek fonksiyon testlerinden BUN ve kreatinin değerlerinin CsA, CsA+ vitamin E ve C verilen gruplardan anlamlı derecede düşük çıkması, bu birlikteliğin koruyuculuğunu gösterse de, özellikle BUN değerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek kalması CsA toksitesinin yeterince önleyemediğini göstermektedir.

Antioksidan enzimlerden GSH-PX'in, CsA+verapamil+Vitamin E ve C grubunda diğer deney gruplarından anlamlı derecede yüksek çıkması da histolojik bulgularımızı desteklemektedir. Katalaz seviyelerinde deney grupları arasında anlamlı farkın olmaması, katalazın oksidatif hasara GSH_PX'den daha yavaş reaksiyon vermesinden kaynaklanmaktadır.

CsA uygulaması sonucunda sıçanlarda anlamlı kilo kayıpları ortaya çıkmıştı. Bu kilo kayıplarının diğer deney gruplarında da devam etmesi yüksek doz CsA uygulaması sonucu gelişen ATN ve ABY'nin bu ilaç beraberliği ile tamamen ortadan kaldırılamadığını gösterdi. Bu bulgu, böylece biyokimyasal ve histolojik bulgularımızı desteklemiş oldu.

SONUÇ

Böbrek nakillerinde bağışıklık sistemini baskılayıcı olarak kullanılan CsA'nın oluşturduğu nefrotoksisitenin önlenmesinde, hasarı oluşturan mekanizmaları düzeltmek en etkili yöntemdir. Ancak CsA nefrotoksisitesinin oluşumunda birden fazla mekanizma rol oynamaktadır. Mekanizmalardan biri olan, antioksidan sistem baskılanmasını önlemeye yönelik verilen vitamin E+C ile, oluşan nefrotoksisitenin, klinik ve yapısal açıdan çok az düzeltilebildiği saptandı. Aynı şekilde afferent arteriyolde meydana gelen vazokonstrüksiyon mekanizmasının sonucu oluşan iskemik böbrek hasarını önlemek amacıyla verilen bir kalsiyum kanal blokeri olan verapamilin de klinik ve yapısal bulguları çok az düzelttiği ortaya kondu.

Bununla birlikte çalışmamızın esas amacını oluşturan ve literatürde hiç rastlamadığımız vitamin + kalsiyum kanal blokeri birlikteliğinin, nefrotoksisiteyi önlemedeki etkisinin bu ajanların tek tek kullanıldığındaki etkilerinden daha yüksek olduğunu saptadık.

CsA kullanımındaki nefrotoksisitenin önlenmesi için yapılacak diğer çalışmalarda ve klinik uygulamalardaki ilaç seçimlerinde, bu bulgularımızın faydalı olacağı kanatindeyiz.

ÖZET

Siklosporin A'nın Sıçanlarda Oluşturduğu Nefrotoksisiteye Vitamin C ile Vitamin E'nin ve Verapamilin Etkilerinin İşik Mikoskobunda Değerlendirilmesi

Siklosporin A (CsA) organ nakillerinde atılımı önlemede önemli bir kullanım alanına sahiptir. Bu güçlü bağışıklık sistemini baskılayıcı ajanın en önemli yan etkisi nefrotoksisitedir. Bu yan etkinin oluşumunda suçlanan en önemli iki mekanizma; i) böbrekte afferent arteriyolde yaptığı vazokonstrüksiyon ii) antioksidan sistem enzimleri üzerine yaptığı etki serbest oksijen radikallerini arttırması. CsA uygulanan deneklere antioksidan özelliği olan Vit E ve Vitamin C ile birlikte kalsiyum kanallarını bloke ederek vazodilatatör etkinlik gösteren verapamili vererek, farklı deney gruplarında böbrek korteksindeki histopatolojik değişiklikleri değerlendirmek ve bu değişikliklere antioksidan ve vazodilatatör ajanların tek tek ve birlikte verdiklerindeki etkilerini araştırmak amacıyla bu çalışmayı yaptık.

25 sıçan; kontrol grubu, siklosporin A verilen grup, CsA+ vitamin E ve C verilen grup, CsA+verapamil verilen grup ve CsA+vitamin+verapamil verilen grup olmak üzere beş gruba ayrıldı. 10 gün boyunca CsA nazogastrik sonda ile oral olarak 50 mg/kg dozunda, E vitamini 150 mg/kg dozunda intramüsküler olarak; C vitamini 200 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak, verapamil 0.5 mg/kg dozunda intramüsküler olarak verildi. Çalışmanın sonunda sıçanların kanları ve böbrek dokuları eter anestezisi altında alındı. Böbrek dokusu %10'luk formolde tespit edildi. Rutin histolojik takip ile bloklanan dokulardan 5µm 'lik kesitler alındı ve hematoksilen-eozin ile boyanarak değerlendirildi.

Çalışmamızın sonunda CsA verilen grupta histolojik olarak belirgin yapısal değişiklikler ortaya çıktı. Bu değişiklikler CsA + vitamin E ve C verilen grup ve CsA + verapamil verilen gruplarda kısmen düzelmekle birlikte; normal histolojik yapıya en yakın görünüm CsA + vitamin + verapamil alan grupta görüldü. Ayrıca böbrek dokusunda antioksidan enzimlerden glutatyon proksidaz ve katalazda en belirgin yükselme de bu grupta izlendi.

Sonuç olarak CsA'nın yaptığı nefrotoksisitenin önlenmesi için; verapamil, vitamin E ve C'nin birlikte kullanılmasının daha faydalı olacağı kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Siklosporin A, Nefrotoksisite, Verapamil, Vitamin E, Vitamin C

SUMMARY

Effects of Vitamin C, Vitamin E and Verapamil on Cyclosporin Induced Nephrotoxicity in Rats: A Light Microscopic Study

Cyclosporin A (CsA) is an important agent used in organ transplantation to prevent rejection. This immunosuppressive drug's most important secondary effect is nephrotoxicity. There are two hypotheses for the nephrotoxicity mechanism i) vasoconstriction in afferent arteriole ii) the role of reactive oxygen species. In this study we planned to see the individual or combined effects of antioxidant vitamins E and C with a calcium channel blocker verapamil.

25 rats divided into five groups equally; a vehicle group, CsA treated group, CsA + vitamin E and C treated group, CsA + verapamil treated group and CsA + vitamin E and C + verapamil treated group. CsA administered 50 mg/kg/day (per oral by catheter), vitamin E administered 150 mg/kg/day (intramuscular), vitamin C administered 200 mg/kg/day (intraperitoneal), verapamil administered 0.5 mg/kg/day (intramuscular) for 10 days. At the end of study rats' blood samples and kidney tissues were taken under ether anesthesia. Tissue sections of kidney were fixed in %10 formalin. Paraffin sections were cut at 5 μ m, then examined after staining with hematoxylin-eosin

In CsA treated rats, significant morphological changes were observed in kidney sections. Although in CsA + vitamin E,C and CsA + verapamil treated rats, these changes were reduced but the most significant improvement observed in the CsA + vitamin C and E + verapamil treated group. Also most significant rise of antioxidant enzymes, catalaz and glutathion peroxidase in renal tissue was seen in this group.

In conclusion, we suggest that using the combination of verapamil, vitamin E and C will be more useful to prevent the nephrotoxicity caused by CsA.

Keywords: Cyclosporin A, Nephrotoxicity, Verapamil, Vitamin E, Vitamin C

KAYNAKLAR

1. Dieperink H. Cyclosporin A nephrotoxicity. *Dan.Med.Bull.* 36:235-248, 1989
2. Bennet WM. The nephrotoxicity of immunosuppressant drugs. *Clin Nephrol*, 43:s3-7, 1995
3. Dieperink H, Frandsen NE, Kemp E. Cyclosporin A. Bright prospects for organ transplantation?. *Ugeskr Laeger.* 145:36:2749-52,1983
4. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent, *Agents Actions*, 43:179-186,1976
5. Calne RY, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC, Craddock GN, Pentlow BD, Rolles K. Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet*, 2:1323-1327,1978
6. Durkan am, Hodson EM, Willis NS, Craig JC. Immunosuppressive agents in childhood nephrotic syndrome: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Kidney int.* 59,1919-1927, 2001
7. High KP. The antimicrobial activities of cyclosporin, FK506 and rapamycin. *Transplantation.* 57,1689-1700, 1994
8. Bennet WM, Porter GA. Cyclosporin associated hypertension. *Am J Med.* 85,131-133, 1988
9. Mason j. The pathophysiology of cyclosporin in man and animals. *Pediatr. Nephrol.* 4,686-704, 1990
10. Thiel G, Landmann J, Mihatsch MJ: Cyclosporin: acute or chronic toxicity, or rejection? AM Hassaballah (ed), *Excerpta medica*, Amsterdam, 122-133, 1987
11. Murray BM, Paller MS, Ferris TF: Effects of CsA administration on renal hemodynamic in conscious rats. *Kidney Int* , 28:767-74,1985
12. Strzelecki T, Kumar S, Khaulı R, et al: Impairment by cyclosporine of membrane-mediated functions in kidney mitochondria. *Kidney Int* , 34:234-240,1988
13. Orugun EO, Smart LM, Whiting PH: The effect of calcium blockade with verapamil on experimental cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant Proc* 1991, 23:1:354-5.
14. Dawidson I, Rooth P, Fry WR, et al: Prevention of acute cyclosporine induced renal blood inhibition and improved immunosuppression with verapamil. *Transplantation* , 48:4:575-80,1989
15. Dieperink H, Leyssac PP, Starklint H, et al: Nephrotoxicity of cyclosporine A: a lithium clearance and micropuncture study in rats. *Eur J Clin Invest* 1986, 16:69.
16. Salducci MD, Chauvet-Monges AM, Berland Y, et al: The restoration of ATP synthesis may explain in protective effect of calcium antagonists against Cyclosporine A nephrotoxicity. *Life Sciences* , 50:2053-58,1992
17. Duriebe VA, Okanmah A, Blyden GD. Effect of CsA on rat liver and kidney glutathione content. *Pharmacology*, 39:205-212,1989
18. Inselmann G, Hannemann J, Baumann K. Cyclosporin A induced lipid peroxidation and influence on glucose 6 phosphatase in rat hepatic and renal microzomes. *Res Common Chem Pathol Pharmacol*, 68:189-203,1990
19. Wang CH, Salahudeen AK. Cyclosporin nephrotoxicity: attenuation by an antioxidant inhibitor of lipid peroxidation in vitro and in vivo. *Transplantation* 58:940-946, 1994
20. Inselmann G, Baumann K. Effect of cyclosporin A on accumulation of tetraethylammonium and p-aminohippurat and on lipid peroxidation in rat renal microzomes and cortical slices. *Ren Fail.*12:165-169, 1990
21. MaCay PB, King MM: Vitamin E: Its role as a biological free radical scavenger and its relationship to the microsomal mixed-function oxidase system. *Vitamin E*, New York, 1980, Marcel Dekker Inc, pp:289-317.

22. Pascoe GA, Reed DJ: Cell calcium, vitamin E and the thiol redox system in cytotoxicity. *Free Radical Biology and Medicine* , 6:209-24,1989
23. Marubayashi S, Dohi K, Ochi K, et al: Role of the free radicals in ischemic rat liver cell injury: prevention of damage by a -tocopherol administration. *Surgery* , 99:2:184-191,1986
24. Kunisaki M, Umeda F, Inoguchi T, et al: Vitamin E binds to specific binding sites and enhances prostacyclin production by cultured aortic endothelial cells. *Thromb Haemost* , 68:774,1992
25. Lunec J, Blake D, Oxygen Free Radicals. Their relevance to disease processes . In : Cohen RD, Lewis B, Albert KGMM. *The Metabolic and Molecular Basis of Acquired Disease*. Balliere Tindall, London. 189-212, 1990.
26. Jialal I, Fuller CJ. Oxidized LDL and antioxidants . *Clin Cardiol* . 16: 1-9, 1993.
27. Kayaalp O. Tıbbi Farmakoloji. İmmün sistem bozuklukları ve immünomodülatör ilaçlar. Cilt 2, 9. Baskı, Hacettepe Taş Kitabevi, 372-416, 2000
28. Wenger RM. Cyclosporin: conformation and analogues as tools for studying its mechanism of action. *Transplant. Proc.*20,313-318,1988
29. Borel JF. Cyclosporin. In: Ishizaka K, Lachmann PJ, Waksman BH, eds. *Progress in allergy*, vol:38,1986
30. Diasio RB, Lobuglio AF. Immunomodulators. In; Gilman AG (ed). *Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics*. 9th ed. New York:McGraw-Hill Companies, 1297-99, 1996
31. Bennett WM, Porter GA. Nephrotoxicity of common drugs used by urologists. *Urologic Clinics of North America*, 17(1):145-156,1990
32. Schrier RW, Gottschalk CW. Outcome and complications of renal transplantation. *Diseases of the kidney*,3:2926-29,1993
33. Wang CH, Salahudeen AK, McClain M, Whitehead J. Lipid peroxidation accompanies cyclosporin nephrotoxicity: Effects of vitamin E. *Kidney International*,47:927-34, 1995
34. Mihatsch Mj, Thiel G, Ryffel B. Morphologic diagnosis of cyclosporine nephrotoxicity. *Seminars in Diagnostic Pathology*,5:1,104-121, 1988
35. Vickers AEM, Fischer V,Connors S, et all. Cyclosporin A metabolism in human liver, kidney, and intestine slices. *Drug Methabolism and Disposition*,20:6:802-809, 1992
36. Wenger RM. Structures of cyclosporine and its meabolites. *Transplant*. 22:3:1104-08,1990
37. Bennett WM. Comparison of cyclosporin nephrotoxicity with aminoglycoside nephrotoxicity. *Clin Nephrol*, 25 suppl 1:126-29,1986
38. Katzung BG. *Immunopharmacology. Basis and clinical pharmacology*. 7th ed. Connecticut:Appleton/Lange,925-926,1998
39. Maurer G. Metabolism of cyclosporin. *Transplantation Proceedings*,XVII(4 suppl):19-26, 1985
40. Faustman DL, Hauptfeld V, Davie JM, Lacy PE. Increase in urinary thromboxane B2 in rats caused by cyclosporine. *Transplant*,40:2:214-17, 1985
41. Esposito V, Sabbatini M, De Nicola L, Chieffi G, Mezzogiorno A, Papaccio G. Chronic Cyclosporin A nephrotoxicity: A morphological and functional study in rats. *Europ Arch Biol*, 101:237-48, 1990
42. Mydlik M, Derzsiova K, Racz O, Sipulova A, Lovasova E, Molcanyiova A, Petrovicova J. Vitamin E-coated dialyzer and antioxidant defense parameters: Three-month study. *Semin Nephrol*, Sep;24(5):525-531,2004
43. Marcus R, Coulston AM. Vitamins in; Gilman AG(ed). *Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics*. 9th ed. New York: McGrawhill Companies,1585-1590,1996
44. Dökmeci İ. Vitaminler. *Farmakoloji Temel kavramlar*. 1. basım. İstanbul,Nobel Tıp Kitabevi,815-817,2000
45. Kazanç MB. Antioksidan vitaminler. *Sendrom. Temmuz* , 14-23,1997.
46. Kayaalp O. Tıbbi Farmakoloji. Vitaminler. Cilt 2, 9. Baskı, Hacettepe Taş Kitabevi, 1541-1575, 2000

47. Mayes PA. Structure and Function of the Water-soluble Vitamins. In : Murray RK, Granner DK, Mayes PA - Rodwell VW. Harper's Biochemistry. 23. ed. Lange medical publication, London. 573-87,1993.
48. Packer L, Landvik S. Vitamin E in biological systems. Therapy and Preventive Medicine. 262 : 93- 103, 1990.
49. Winrow VR, Winyard PG, Morris CJ, Blake DR. Free radicals in inflammation : Second messengers and mediators of tissue destruction. Br Med Bull. 49 (3) : 506-22,1993
50. Niki E. Vitamin C as an antioxidant selected vitamins, minerals and functional consequences of maternal malnutrition . World Rev Nutr Diet. 64 : 1-30, 1991
51. Özden H, Çelik C. Vitamin C'nin metabolik ve klinik önemi, yeni yaklaşımlar. T Klin Tıp Bilimleri Dergisi. 13 : 200-9, 1993
52. Mooradian AD, Failla M, Hoogwerf B, Maryniuk M, Wylierosett J. Selected vitamins and minerals in diabetes. Diabetes Care. 17 : 464-79, 1994
53. Büyüköztürk K,Türk Kardiyoloji Derneği Ulusal Hipertansiyon Tedavi ve Takip Kılavuzu, http://www.tkd.org.tr/kilavuz/k03/4_2.htm?wbnum=1107, 21/10/2004
54. http://www.knoll.com.tr/isoptinsr_genel.htm, 21/10/2004)
55. Kayaalp O. Tıbbi Farmakoloji. Antianjinal İlaçlar. Cilt 1, 9. Baskı, Hacettepe Taş Kitabevi, 468-492, 2000
56. Ozan H. Ozan Anatomi. 1. baskı, Ankara, Nobel Tıp Kitabev.,293-297, 2004
57. Janquera LC, Carneiro J, Kelley OR. Basic Histology. 8. Edition, çeviri,Aytekin Y (ed), Solakoğlu S (ed), Ahışhalı B (ed), Barış Kitapçılık,359-375,1998
58. Moore KL, Persaud TVN. Klinik yönleri ile insan embriyolojisi. İng. 6. Baskı çeviri, Yıldırım M (ed), Okar İ (ed), Dalçık H (ed), Nobel Tıp Kitabevi, 305-313, 2002
59. Behrman RE, Kliegman Rm, Arwin AM (ed). *Nelson Textbook of pediatrics*. 15th edition,Philadelphia, WB Saunders, 1996
60. Fleming S. N-linked oligosaccharides during human renal organogenesis. J Anat,170:151, 1990
61. Gasser B, Mauss Y, Ghnassia JP,et al. A quantitative study of normal nephrogenesis in the human fetus:its implication in the natural history of kidney changes due to low obstructive uropathies. Fetal Diagn, Ther -371, 1993
62. Herzlinger D, Oiao J, Cohen D, et al: Wnt1 and Wnt2 are potent inducers of nephrogenesis. FASEB J, -A822,1994
63. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry . Br. Med. Bull. 49(3) 479-80, 1993.
64. Isbir T. Antioksidan Sistemler . Endotel . İzmir Tabip Odası Tıpta Temel Bilimler Kolu Sonbahar Okulu. 92-98, 1994.
65. Marklund SL. Analysis of extracellular süperoxide dismutase in tissue homogenates and extracellular fluids .Methods Enzymol. 186 : 260-5,1990.
66. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease : curiosity, cause, consequence? The Lancet. 344: 721-4, 1994.
67. Flohe L, Otting F. Superoxide dismutase assays. Methods Enzymol. 105 : 93-104, 1984.
68. Salin ML, Mccord JM. Superoxide dismutases in polymorphonuclear leukocytes. J. Clin . Invest. 54: 1005-9, 1974.
69. Niwa Y, Ishimoto K, Kanoh T. Induction of superoxide dismutase in leukocytes by paraquat : Correlation with age and possible predictor of longevity. Blood. 76 : 835-41, 1990.
70. Stryer L, Biosynthesis of Amino Acids and Heme . In : Biochemistry 3. ed. W H Freeman and company , New York. 422-3,1988.
71. Kobayashi Y, Ishigame K, Ishigame Y, Usui T. Superoxide dismutase activity of human granulocytes and lymphocytes . The Lancet . 16: 865-6, 1977.
72. Spallholz JE. Selenium and glutathione peroxidase : Essential nutrient and antioxidant component of the immun system . Adv. Exp. Med. Biol. 262 : 145 - 58, 1990.
73. Forslid J, Björkstén B, Hagersten K, Hed J. Erythrocyte-mediated scavenging of reactive oxygen metabolites generated by human polymorphonuclear leukocytes during phagocytosis. Inflammation . 13 : 543-51, 1989.

74. Kashiwagi A, Asahina T, Ikebuchi M, Tanaka Y, Tagagi Y, Nishio Y, Kikawa R, Shigeta Y. Abnormal glutathione metabolism and increased cytotoxicity caused by H₂O₂ in human umbilical vein endothelial cells cultured in high glucose medium. *Diabetologia*. 37: 264-9,1994.
75. Ceballos-Picot I, Trivier JM, Nicole A. Age correlated modifications of copper -zinc superoxide dismutase and glutathione -related enzyme activities in human erythrocytes. *Clin Chem*. 38 (1) : 66-70, 1992.
76. Niwa Y, Lizawa O, Ishimato K, Akamatsu H, Kanoh T. Age-dependent basal level an induction capacity of copper-zinc and manganese superoxide dismutase and other scavenging enzyme activities in leukocytes from young and elderly adults. *Am. J. Pathol*. 143 : 312-20, 1993.
77. Gaetani GF, Galiano S, Canepa L, Ferraris AM. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood*. 73: 334-9,1989.
78. Deby C, Pincemail J. Oxygen Toxicity, Free Radicals and Defense Mechanisms. In : Fünfgeld EW. *Rökan (Ginkgo Biloba)*. Recent result in pharmacology and clinic. Springer - Verlac, Berlin Heidelberg, Newyork. 56-70,1998.
79. Duncan JI, Thomson AW, Aldridge RD, Simpson JG, Whiting PH. Cyclosporin induced renal structurel damage: Influence of dosage, strain,age and sex with referance to the rat guinea pig. *Clinical Nephrology*, 25 suppl, 1:2-8, 1986
80. Aebi H, Catalase in vitro. *Methods Enzymol*.105:121-126,1984.
81. Lawry OH, Rosebrough NJ,Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 182:265,1951.
82. Paglia DE, Walentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*. 70(1):158-169,1967.
83. Mihatsch Mj, Thiel G, Basler V, Ryffel B, et all. Morphological patterns in cyclosporin-treated renal transplant recipients. *Transplant Proc*,4(suppl 1):101-16,1985
84. Thiel G. Experimental cyclosporin nephrotoxicity. *Clin Nephrol*, 25(suppl 1):205-10,1986
85. Zhong Z,Arteel GE, Connor HD, et all. *Am J Physiol*, 275:F595,1998
86. Yang JJ, Finn WF. *Ren Fail*, 20:85,1998
87. Kadayıfçı A. *Dahiliye*. 1.baskı, Atlas Kitapçılık, Ankara, 199-297, 2001
88. Gillum DM, Truong L, Tasby J, et all. Chronic cylosporin nepratoxicity:A rodent model. *Transplant*,285-92,1988
89. Jackson NM, Hsu CH, Visscher GE, et all.Alteration in renal structure and function in a rat model of CsA nephrotoxicity. *J Pharm and Exp Thera*, 242:2:749-242,1987
90. Hebert SC,Kriz W. *Diseases of kidney*. Schrier RW, Gottschalk CW (ed), vol1:3-37,1997
91. Tisher CC, Madsen KM. *Anatomy of the kidney*. Brenner BM (ed), *The Kidney*,3:62,1996
92. Venkatachalam MA, Bernard DB, Donohoe JF. Ischemic damage and repair in the rat proximal tubule. *Kidney int*, 14:31-49,1978
93. Lee HS, Jeong JY, Kim BC, et all.Dietary antioxidant inhibits lipoprotein oxidation in renal injury. *Kidnet int*, 51:1151-59,1997
94. Kim JY, Suh KS. Light microscobic and electron microscobic features of CyA nephrotoxicity in rats. *J Kor MED Sci*,10:5:352-59,1995
95. Verpooten GA, Wybo İ, Pattyn WM, et all. Cyclosporin nephrotoxicity. *Clin Nephrol*, 25 suppl 1:18-22,1986
96. Sund S, Forre O, Berg KJ, et all. Morphological and functional renal effects of low dose CyA treatment. *Clin Neph*, 41:1:33-40,1994
97. Massicot F, Thevenin M, Martin C, et all, Effect of cyclosporin on kidney glutathion mrtabolizm ang ccytocrom p450 in the rabbit. *Drug chem toxicol*,17:449-62,1994
98. İnselmann G, Blank M, Baumann K. Cyclosporin induced lipit peroxidation in microsomes of rat kidney. *Res. Commun. Chem Pathol Pharmacol*,62:207-20,1988
99. Walker PD, Das C, Shah SV. Cyclosporin A induced lipid peroxidation in renal cortical mitochondria. *Kidney int*, 29:311,1986

100. Inselmann G, Barth A, Engemann R, Heidemann H. Cyclosporin A induced lipid peroxidation in human liver microsomes. *Eur J Clin Invest*,21:461-65,1991
101. Ketterer B, Beale D, Meyer D,. The structure of multiple functions of glutathion transferases. *Biochem Soc Trans*, 10:82-84, 1982
102. Mun Kc, Suh SI. Effect of melatonin on renal function in cyclosporin nephrotoxicity. *Transplantation proc*, 32:1919-20,2000
103. Mun KC. Total antioxidant status and antioxidant enzymes in cyclosporin treated rats. *Transplantation proc*,32:2007-08,2000
104. Durak I, Karabacak HI, Buyukkocak S, Cimen MY, Kacmaz M ve ark. Impaired antioxidant defens system in the kidney tissues from rabbits treated with cyclosporin: Protective effects of vitamins E and C. *Nephron*,78(2):207-11,1998
105. Özdemir M, Aktan Y, DüNDAR E, Çolak Ö, Cingi İM, Tel N. Siklosporin A nefrotoksisitesine karşı vitamin E'nin etkisi. *Çukurova üniv Tıp Fak Derg*, 23:2:67-71,1998
106. Petric R, Freeman D, Wallace C, et all. Amelioration of experimental cyclosporin A nephrotoxicity by calcium channel inhibition. *Brief communications*, 1103-1105,1992
107. English J, Evan A, Houghton DC, Bennet WM. Cyclosporin induced acute dysfunction in the rat. *Transplant*,44:1:14-17,1986
108. Bokemeyer D, Friedrichs U, Backer A, et all. Cyclosporin A Enhances total cell calcium independent of NA-K-ATPaz in vasculer smooth muscle cells. *Clin Investig*, 72:12:992-5,1994
109. Bhardwaj R, Moore PK. The effect of arginin and NO on resistance blood vessels of the perfused rat kidney. *Br J Pharmacol*, 97:739-44,1989
110. Darlametsos IE, Papanikalaou N, Varanos DD. Effect of nifedipine in CyA induced nephrotoxicity in rats. *Prostaglandins leukotriens and essential Fatty acids*,63:5:263-69,2000
111. Aller MAR, Perez JA, Ruigomez LL, et all. Effect of verapamil on hepatorenal toxicity. *Arch Esp Urol*,42:9:847-50,1989
112. L'Azou B, Lagroye I, Plande J,et all. Protective effect of verapamil and dopamine against CyA induced vazoconstruction in isolated glomeruli in rats. *Presse Med*, 21:41:2021-3,1992
113. Abraham JS, Bentley FR, Garrison RN. Calcium channel blockade in rats with cyclosporin induced vasoconstriction. *Invest Surg*, 6:5:401-12,1993