

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİMDALI**

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Nurettin AYDOĞDU

**DENEYSEL MİYOGLOBİNÜRİK AKUT BÖBREK
YETMEZLİĞİNDE NEBİVOLOLÜN ETKİLERİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Ayşegül İLHAN TARHAN

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİMDALI**

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Nurettin AYDOĞDU

**DENEYSEL MİYOGLOBİNÜRİK AKUT BÖBREK
YETMEZLİĞİNDE NEBİVOLOLÜN ETKİLERİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Ayşegül İLHAN TARHAN

Destekleyen Kurum: TÜBAP-2008/111

Tez No:

EDİRNE-2010

TEŞEKKÜR

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı'nda aldığım Yüksek Lisans eğitimim sırasında engin bilgi ve tecrübelerinden faydalanarak yetişmemi sağlayan başta tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Nurettin AYDOĞDU'ya öğrencileri olmaktan çok mutlu olduğum Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Kadir KAYMAK, Prof. Dr. Levent ÖZTÜRK, Yrd. Doç. Dr. Mevlüt YAPRAK ve Yrd. Doç. Dr. Selma Arzu VARDAR'a, çalışmalarım da yardımlarıyla yanımda olan Doç. Dr. Şemsi ALTANER ile Doç. Dr. Necdet SÜT'e, Sayın Recep Taşkıran'a, Deney Hayvanları Araştırma Birimi çalışanlarına, Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne, emeği geçen herkese sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
AKUT BÖBREK YETMEZLİĞİ	3
MİYOGLOBİNÜRİK AKUT BÖBREK YETMEZLİĞİ	4
NİTRİK OKSİT	8
BÖBREKTE NİTRİK OKSİTİN ETKİLERİ	9
SERBEST RADİKALLER	11
SERBEST RADİKALLERİN ETKİLERİ	14
ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ	18
NEBİVOLOL	21
GEREÇ VE YÖNTEMLER	24
BULGULAR	36
TARTIŞMA	61
SONUÇLAR	67
ÖZET	68
SUMMARY	70
KAYNAKLAR	72
RESİMLEMELER LİSTESİ	77
ÖZGEÇMİŞ	79
EKLER	80

SİMGE VE KISALTMALAR

ABY	:	Akut Böbrek Yetmezliği
ATN	:	Akut Tübüler Nekroz
ATP	:	Adenozin trifosfat
BH4	:	Tetrabiyopterin
CAT	:	Katalaz
cGMP	:	Siklik Guanozin Monofosfat
eNOS	:	Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
FAD	:	Flavin Adenin Dinükleotid
FMN	:	Flavin Mononükleotid
GPx	:	Glutatyon Peroksidaz
GSH	:	Okside Glutatyon
GSSG	:	Redükte Glutatyon
GST	:	Glutatyon S Transferaz
H₂O₂	:	Hidrojen peroksit
HO	:	Hem oksijenaz enzimi
iNOS	:	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
mABY	:	Miyoglobürik Akut Böbrek Yetmezliği
MDA	:	Malondialdehit
NADP	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (Okside)
NADPH	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (Redükte)
NO	:	Nitrik Oksit
NOS	:	Nitrik Oksit Sentaz

O₂⁻	:	Süperoksit Radikali
¹O₂	:	Singlet Oksijen
OH[·]	:	Hidroksil Radikali
ONOO[·]	:	Peroksinitrit Anyonu
RNA	:	Ribonükleik Asit
RO[·]	:	Alkoksil Radikali
ROO[·]	:	Peroksil Radikali
SOD	:	Süper Oksit Dismutaz

GİRİŞ VE AMAÇ

Akut böbrek yetmezliği (ABY), saatler veya günler içinde böbrek fonksiyonlarının hızla bozulması sonucunda plazma üre ve kreatinin düzeylerinin yükselmesiyle ortaya çıkan bir sendromdur (1).

Rabdomiyoliz iskelet kası hücrelerinin hasara uğramasıyla toksik hücre içi elemanların kan dolaşımına geçerek klinik ve laboratuvar bulgularına yol açan patolojik bir durumdur. Rabdomiyolizin en önemli sebepleri travma, iskemi, ilaçlar, toksinler, metabolik bozukluklar ve enfeksiyonlardır (2). Crush sendromu travmaya bağlı rabdomiyoliz sonucunda ortaya çıkan, medikal ve cerrahi komplikasyona zemin hazırlayan ve travmanın doğrudan etkisinden sonra depremlerde ikinci sırada ölüme yol açan sistemik bir hastalıktır (3). Crush sendromu sonucunda hipovolemik şok ve ABY gelişir (4). Rabdomiyolize bağlı akut böbrek yetmezliği gelişmesinde, hipovolemi ve miyoglobine bağlı nedenler (direkt hem toksisitesi, hem silendirleri nedeni ile tübüler tıkanma) önemli rol oynar (5). Hipovoleminin böbrek kanlanmasını bozması ve uyardığı vazokonstriktör hormon ve sitokinlerde perfüzyon bozukluğunu artırır. Kaslardan açığa çıkan miyoglobin hem doğrudan toksik etki ile hem de tübüler tıkaçlara yol açarak ABY patogenezine katkıda bulunur (3).

Miyoglobininürik ABY (mABY) travma ve travma dışı nedenlere bağlı olarak iskelet kası hücrelerinin hasara uğraması ve hücre içi elemanların dolaşıma geçmesi, yani rabdomiyoliz sonucu gelişen üremik sendromdur (3). Miyoglobininürik akut böbrek yetmezliği sadece miyoglobin varlığında, hipovolemi sonucu böbreğin hipoperfüzyonu durumunda ortaya çıkar. Dehidratasyon ve asidoz mABY'nin gelişmesinde önemli rol oynarlar (6).

Miyoglobürik akut böbrek yetmezliğinin en yaygın in vivo modeli hipertonic gliserölün intra müsküler (im) enjeksiyonu ile miyoliz, hemoliz ve intravasküler hacimde azalma ile böbreğin hem proteinlerinin (miyoglobin ve hemoglobin) ağır yüküne maruz kalmasına sebep olur. Hem proteinleri ya da onların yıkım ürünleri (hematin ve demir içeren) tübüler nefrotoksik özellikler sergilerler ve bu özellikler kısmen serbest oksijen radikalleri, vazokonstriksiyon ile ilişkilidir (7).

Nebivolol, üçüncü jenerasyon beta-1 (β_1) adreno reseptör antagonistidir (8). Antihipertansif bir ajan olan nebivolol; nitrik oksit (NO) sentezini arttırarak sistemik vazodilatatör etki gösterir. Ayrıca antioksidan aktivite göstererek, oksidatif stresin etkisini azalttığı, endotel disfonksiyonu engellemesinin yanında hedef organda koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (9,10).

Ülkemizin deprem kuşağında olması nedeniyle doğal felaketler, trafik ve iş kazaları çok sık görölmektedir. Çalışmamızda sıçanlara hipertonic gliserölün im verilmesiyle oluşturulan mABY'nin deneysel modelinde; Nebivolölün antioksidan enzimler, lipid peroksidasyonun bir parametresi olan malondialdehit (MDA) düzeyi, doku NO düzeyleri, böbrekteki histopatolojik değişiklikler ve böbrek fonksiyonları üzerindeki etkilerini, böbrek yetmezliği bulguları ortaya çıkmadan bu ajanın profilaktik olarak verilip verilmeyeceğini ve klinik bilimler tarafından tedavide kullanılabilirliğini araştırmayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

AKUT BÖBREK YETMEZLİĞİ

Akut böbrek yetmezliği saatler veya günler içinde renal fonksiyonların kaybı, buna bağlı olarak üre ve kreatinin gibi nitrojen artık ürünlerin birikmesi ve sıvı elektrolit dengesindeki anormalliklerle karakterize bir sendromdur (11).

Akut böbrek yetmezliğinin temel fizyolojik etkisi kanda ve ekstraselüler sıvıda su, metabolik ürünler ve elektrolitlerin birikimidir. Bu durum su ve tuz yüklenmesine dolayısıyla ödeme ve hipertansiyona yol açabilir. Ayrıca fazla potasyum tutulması akut böbrek yetmezliği olan hastalarda öldürücü olabilir. Yeterli hidrojen iyonu atılamadığı için metabolik asidoz gelişebilir ve bu durum ölüme neden olabilme ihtimalinin yanında hiperkalemiyi de ağırlaştırır (12). Rabdomiyolize bağlı akut böbrek yetmezliğinin gelişmesinde böbrek fonksiyonlarını bozan faktörleri; böbrek kan akımını bozan faktörler, hipoperfüzyona yol açan faktörler ve çizgili kas hasarı sonrasında miyoglobine bağlı olan faktörler olarak gruplandırabiliriz (5,13). ABY oluşma sıklığı klinik duruma göre farklılıklar gösterir. Hastaneye kabul edilen vakalarda kabulde %1, hastaneye yatırılarak izlenen hastalarda %2-5, kardiyopulmoner bypass sonrasında %4-15 sıklığında görüldüğü rapor edilmiştir (11).

Akut böbrek yetmezliğinin nedenleri üç başlık altında incelenebilir;

1) Prerenal ABY: Serum kreatinin ve kan üre düzeyinde geri dönüşümlü bir artıştan kaynaklanmaktadır. Glomerüler filtrasyon hızında azalmaya yol açan, böbreğe yetersiz kan akımı sonucu oluşan böbrek yetmezliğidir.

2) İntrarenal ABY: Böbreğin bizzat içindeki kan damarlarını, glomerülleri veya tübülleri etkileyen anormallikler nedeniyle oluşur.

3) Postrenal ABY: Ya iç ya da dış kütle tarafından üriner toplayıcı sistemin tıkanmasından kaynaklanmaktadır. Böbreğin dışında üriner sistemin tıkanmasına yol açan en önemli olaylar kalsiyum, urat veya sistin çökmesi sonucu oluşan böbrek taşlarıdır (12,14).

Akut böbrek yetmezliği sıklıkla akut tübüler nekroz (ATN) ile aynı anlamda kullanılmaktadır, ancak bu tanım prerenal ve postrenal ABY nedenlerini içermemektedir. En yaygın sebebi iskemik veya toksik hasardan kaynaklanan akut tübüler nekrozdur. ATN, tübüllerdeki epitel hücrelerin tahribatı ile oluşmaktadır (5,12,15).

MİYOGLOBİNÜRİK AKUT BÖBREK YETMEZLİĞİ

Miyoglobininürik ABY travma veya travma dışı nedenlere bağlı olarak iskelet kaslarının hasara uğraması ve hücre içi elemanlarının dolaşıma geçmesi sonucu gelişen üremik bir sendromdur (3).

Kaslar vücudun en büyük organıdır; toplam vücut ağırlığının yaklaşık olarak %40-50'sini oluştururlar ve tüm vücut potasyumunun yaklaşık %70'ini, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPaz}$ pompasının da en büyük kısmını içinde bulundurur. Kaslar, viseral organlar gibi kemiklerle korunmazlar ve bu nedenle travmaya çok açıktırlar (1,16).

Felaketler önemli bir mortalite ve morbidite sebebidir. Tüm doğal afetler içerisinde ölüme en fazla neden olanı depremlerdir. Depremlerdeki ilk sıradaki ölüm nedeni ise vital organlara gelen çoğu penetran olan travmalardır; ölümün en sık ikinci nedeni ise kaslara gelen ve çoğu kez künt travmaların yol açtığı crush sendromu ve komplikasyonlarıdır (17).

Crush kelime anlamı olarak ezilme, sıkışma veya travmaya uğrama demektir. Crush hasarı sadece travmayı anlattığı halde, crush sendromu terimi ile ezilmeye bağlı kas hasarı (rabdomyoliz) sonucunda ortaya çıkan tablo kastedilir (3).

Travmatik kas yıkımı açık bir şekilde ilk defa 1909 yılında Messina depremindeki kazazedelerde Alman Von Colmers tarafından tanımlandı. 1916 yılında Frankenthal tarafından ilk defa savaş yaralanmaları sonucu meydana gelen travmatik rabdomyoliz ile akut böbrek yetmezliği ilişkisi belirlendi. 1923 yılında Minami travmatik kas hasarına ilaveten

diğer kas hasarlarının da böbrek yetmezliğine sebep olacağını belirtti. Ayrıca, 1941 yılında Bywater ve Beall ikinci dünya savaşı sırasında Londra'nın bombalanmasıyla travmatik rabdomiyoliz sonucu oluşan ölümcül komplikasyonları açık bir şekilde tanımlayarak crush sendromu adını vermişlerdir (18).

Rabdomiyoliz, iskelet kaslarının erimesi veya parçalanması sonucu kas hücrelerindeki içeriğin hücre dışı sıvıya karışmasıdır (3). Başlıca rabdomiyoliz nedeni olarak aşırı alkol ve uyuşturucu kullanımı, travmalar, toksinler, enfeksiyonlar, sıcak çarpması, elektrik çarpması sayılabilir. Bir genelleme yapılacak olursa rabdomiyolizin en sık rastlanan nedenleri alkol, ilaçlar, aynı pozisyonda uzun süre kalınması sonucunda kasların baskıya uğramasıdır (3). Kasların baskıya uğraması sonucu hücre içinden salınan yapılardan biri olan miyogloblin, glomerüllerden filtre olarak tübüllere ulaşmakta tıkanıklık ve böbrek yetmezliğine sebep olmaktadır. Protonlar, fosfat, potasyum ve nükleotidlerde hasarlı kaslardan salınarak crush fizyopatolojisinde önemli rol oynamaktadır (19). Rabdomiyoliz seyrinde crush sendromu ve akut böbrek yetmezliği gelişmesinde çok sayıda faktör rol oynamasına rağmen en önemlisi kompartman sendromuna sekonder hipovoleminin böbrek kanlanmasını bozmasıdır (3).

Rabdomiyoliz vakalarının %81'inden uyuşturucu maddeler ve alkolün sorumlu olduğu bildirilmektedir. Tüm rabdomiyolizli hastalarda miyogloblinürik ABY gelişme oranı %17-33 arasındadır (20). Tüm ABY vakaları arasında miyogloblinürik ABY oranı %3-15'tir (21). Rabdomiyolizin birçok sebebi olmasına rağmen sonuç aynıdır. Oluşan hasara bağlı olarak kas hücresi içinde Na^+ - K^+ -ATPaz pompası bozulur Na^+ ve Ca^{++} hücre içinde birikir ve oluşan değişikliklere bağlı olarak hücre nekrozu meydana gelir (22). Bütün yaralanmaların yaklaşık olarak %2-5'inde crush sendromu görülür. Yapılan bir araştırmaya göre, herhangi bir sebebe bağlı olarak bir binanın yıkılması durumunda binada bulunanların %80'i hemen ölür; yaşayanların da %40'ında crush sendromu geliştiği bildirilmiştir (18).

Ülkemizde 17 Ağustos 1999 tarihinde meydana gelen merkezi Gölçük olan Marmara depremi Richter ölçeğine göre 7.4 şiddetinde olup, 45 saniye sürmüştür. Başbakanlık Kriz Yönetim Merkezi rakamlarına göre 17480 kişinin ölümüne 43953 kişinin ise yaralanmasına neden olmuştur. Marmara depreminin en çarpıcı sonuçlarından biri de crush sendromu olgularıdır. Bu depremin ardından 639 hastada crush sendromuna bağlı akut renal problemler gelişmiş bunların 477'sinin diyaliz gödüğü rapor edilmiştir (3,23). 2001 yılında Hindistan'da meydana gelen Gujarat depreminde 20000 ölü 200000 yaralı 35 hastada crush sendromu gelişmiş 33 kişinin ise diyaliz gördüğü bildirilmiştir. 2003 yılında Cezayir'de, Boumerdes depreminde ise 2266 ölü, 10261 yaralı, 27 kişide crush sendromu gelişmiş 25 kişi ise diyaliz

gördüğü bildirilmiştir. 2003 yılında İran'da meydana gelen Bam depreminde 25514 ölü 30000 yaralı vardır crush sendromlu kişi sayısı bilinmemektedir, ancak 160 kişinin diyaliz gördüğü rapor edilmiştir. 2005 yılında Pakistan'da Kashmir depreminde ise 73000 ölü, 100000 yaralı, 88 kişide crush sendromu görülmüş 55 kişinin de diyaliz gördüğü rapor edilmiştir (24).

Miyoglobinin koyu kırmızı bir protein olup kasların kızıl kahve olan karakteristik renginden sorumludur (25). İskelet kaslarının kuru ağırlığının %1-3'ünü kapsar. Moleküler ağırlığı 17800 Dalton'dur. Miyoglobinin merkezinde bir hem prostetik grup ile demir atomu bulunur ve bu kısım oksijen bağlayıcı bölge olarak görev yapar (3,26).

Hemoglobin gibi miyoglobinin de oksijen taşıyıcı bir moleküldür. Miyoglobinin ve hemoglobinin hem proteinleri olarak adlandırılırlar. Plazmada dolaşan miyoglobinin çoğu (%50-85) haptoglobin ve α_2 -globüline bağlıdır. Miyoglobinin plazma yarı ömrü yaklaşık 1-3 saattir. Haptoglobinlerin bağlama kapasitesi doyumluğa ulaştığı zaman plazmada serbest miyoglobinin seviyesi artar. Plazma miyoglobinin düzeyi 0,5-1,5 mg/dl'yi aşınca böbrekler tarafından filtre edilir. Böbreklerden miyoglobinin atım hızı, glomerüler filtrasyon hızına, idrar akış hızına ve plazmada serbest miyoglobinin yüzdesine bağlıdır (3,26). Yapılan birçok deneysel çalışma hipovolemi/dehidratasyon ve asidürinin miyoglobininürik akut böbrek yetmezliğine yatkınlık kazandırdığını ortaya koymuştur (27).

Hem proteinlerinin neden olduğu akut böbrek yetmezliğinde iki yaygın deneysel model kullanılmaktadır. Bunlardan biri dehidrate/volumü azalmış deney hayvanlarına hem proteinlerinin (miyoglobinin veya hemoglobinin) infüzyonu, diğeri ise intramüsküler hipertonic gliserol enjeksiyonudur (27,28). İnamüsküler hipertonic gliserol enjeksiyonu miyoliz, hemoliz ve intravasküler hacim azalmasına neden olur ve böylece böbrekler hem proteinlerinin ağır yüküne maruz kalır. Aynı zamanda gliserol aracılı ABY insanlarda rabdomiyolizinin bir modeli olarak bilinir. Bu model insanlardaki miyoglobininürik ABY'yle en fazla yönüyle özdeş olan ABY'nin gelişmesine sebep olduğu bildirilmektedir (7,27-29).

Miyoglobinin, bir yandan içerdiği hem proteini ile böbrek tübül hücrelerine doğrudan toksik etki gösterirken diğeri yandan da distal tübüllerde hem pigmenti çökmesine bağlı olarak tıkanmaya neden olur (5,27-29).

Miyoglobininürik akut böbrek yetmezliğinin fizyopatolojisine karışan temel mekanizmaları; renal konstriksiyon ve iskemi, distal kıvrımlı tübüllerde miyoglobinin kast oluşumu, proksimal tübüllerin epitel hücrelerinde miyoglobinin doğrudan sitotoksik etkisi, ve diğeri mekanizmalar olarak sınıflandırabiliriz (27,30).

Renal konstriksiyon ve iskemi

Böbrek perfüzyonu vazoaktif endotelial metabolitlerin etkileşimi tarafından düzenlenir. Çeşitli potansiyel mekanizmalar renal vazokonstriksiyona sebep olabilir. Birincisi, kas nekrozu büyük miktarda intravasküler sıvı birikimi olan ve hipovolemiye yol açan üçüncü bir boşluk oluşturur ve intravasküler hacmin azalmasına yol açar. Çeşitli crush yaralanmalarında 18 litreye kadar sıvının damar dışına çıkabileceği bildirilmiştir. İkincisi çeşitli kas hasarları belirsiz sebeplerden dolayı endotoksin-sitokin kaskadını aktive edebilir. Üçüncüsü ise ölü kas hücreleri tarafından salınan miyoglobin en potent endojen vazodilatatör faktör olan NO'yu indirger. Bir NO çöpçüsü olan miyoglobinin NO'yu tüketmesi de böbrek vazokonstriksiyonunu artırır (3,16,27).

Distal kıvrımlı tübüllerde miyoglobin kast oluşumu

Miyoglobinürik akut böbrek yetmezliğinde; iç kıvrımlı distal tübüllerde miyoglobin kastlarının yaygın olduğu bildirilmiştir. ATP tüketimi epiteliyal hücrelerde nekroza sebep olur. Tübüler lümende ölü hücrelerin birikimi ve sonrasında miyoglobinin çökmesi kast oluşumuna neden olur. Bu kastların oluşumu filtre edilen miyoglobin konsantasyonuna bağlıdır. Kas hasarı büyük bir alanda oluşmuşsa serumda miyoglobin konsantrasyonu daha yüksektir ve glomerülde filtre edilen miyoglobin miktarı da daha yüksek olur. Artan miyoglobin konsantrasyonu asidik pH ile birlikte miyoglobin kast oluşumuna yol açar. Miyoglobin kastları tarafından distal kıvrımlı tübüllerin tıkanması renal kan akımı ve glomerüler filtrasyon hızını azaltır. Ayrıca miyoglobinin sulu solüsyonlarda çökmesi ve silindir oluşturması ortamda Tamm-Horsfall proteinleri varsa mümkündür. İdrarın asidik olması miyoglobin ile Tamm-Horsfall proteinleri arasındaki karşılıklı etkileşimi uyardığı rapor edilmiştir (3,27,30,31).

Proksimal tübüllerin epitel hücrelerinde miyoglobinin doğrudan sitotoksik etkisi

Miyoglobin proksimal tübüllerin epitel hücrelerinde lokal oksidatif stresi artırarak doğrudan sitotoksik etki gösterir. Miyoglobin konsantrasyonları glomerüllerde filtre edilen normal seviyeyi aşar aşmaz, miyoglobinin atılımını sınırlandırmak ve nefrotoksik etkiden böbreği korumak için proksimal tübüllerin epitel hücreleri geri emilimi artırır. Endositoz

yoluyla hücreye alınan miyoglobinin hücre içi konsantrasyonu artar. İdrar pH'sı 5,6'dan daha düşük olduğunda miyoglobin globin ve hem'e parçalanır. Proksimal tübül hücrelerinde protoporfirin halkalarının parçalanması demirin serbest kalmasıyla sonuçlanır. Bu durumda hem demirin aracılık ederek oluşturduğu serbest radikaller hem de kendiliğinden oluşan serbest radikaller ABY patogeneziinde çok önemli rol oynarlar. Demir hem reaktif oksijen radikallerinin oluşumunu hem de tübül hücrelerin sitoplazmasında oluşan oksidatif stres lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın peroksidasyonunu artırır ve akut tübül nekroza yol açar. Ayrıca ATP azalması proksimal tübüllerin epitel hücrelerinde miyoglobinin toksik etkisini kolaylaştırır ve böylece hücrelerde fonksiyonel ve morfolojik değişikliklere neden olur (27,30).

Diğer mekanizmalar

Kanda ve idrarda asidik pH ortamında hiperürisemi distal kıvrılmış tübüllerin lümeninde ürik asit kristallerinin çökmesine neden olur. Ayrıca ölü kas hücrelerinden doku tromboplastininin salınımı yaygın intravasküler koagülopati basamaklarını tetikler ve renal parankimde çoklu mikrotrombi oluşmasıyla sonuçlanır ve renal iskeminin oluşmasına neden olur (27,30).

NİTRİK OKSİT

Renksiz ve son derece toksik bir gaz olan NO, serbest radikal yapısında olmasından dolayı yarı ömrü çok kısadır. Lipofilik özellikte olup oksijensiz ortamda oldukça karardır ve hücre membranından serbest bir şekilde diffüze olabilir. Önemli bir haberci molekül olan NO, düşük konsantrasyonlarda toksik etki göstermez. Suda az çözünmesine rağmen etki gösterdikten sonra oksijen ve su tarafından nitrat ve nitrite dönüştürülür (32-35).

Nitrik Oksit omurgalılarda, sitokrom P-450 redüktazın homoloğu olan nitrik oksit sentaz (NOS) yardımıyla L-argininin amino asidinin guanidin N terminalinden sentezlenir (35,36). L-arginin-NO dönüşümü kompleks bir reaksiyondur; NOS enzimlerine ek olarak; moleküler oksijen, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), tetrahidrobiopterin (BH_4^+), flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN) ve kalmoduline ihtiyaç duyulur (37). Nitrik oksit, NOS tarafından katalizlenen bir reaksiyon yoluyla iskelet ve

kalp kası hücreleri, epitel hücreleri, endotel hücreleri, makrofajlar, fibroblastlar ve hepatositler gibi çeşitli hücreler tarafından üretilmektedir (38).

NO sentazın birkaç izoformu tanımlanmıştır. Bu enzimleri temel olarak Constitutive (yapısal) NOS ve Inducible (uyarılabılır) NOS olmak üzere iki ana gruba ayırabiliriz. Yapısal NOS enzimlerinin nöronal NOS (NOS1-nNOS) ve endotelial NOS (NOS3-eNOS) olmak üzere iki izoformu mevcuttur (36). Sıçan ve domuz serebellumundan saflaştırılan yapısal NOS dimerik yapıda bir sitozolik protein olup moleküler ağırlığı; 150000-160000 Dalton arasındadır. Uyarılabılır NOS ise membrana bağlı, dimerik yapıda olup 130000 Dalton ağırlığındadır. Yapısal NOS (cNOS)'un ayırıcı özelliği ikincil haberci olarak kalsiyuma bağımlı olmasıdır. Nöronal NOS (NOS1-nNOS) kromozom 12 tarafından, endotelial NOS (NOS3-eNOS) ise kromozom 7 tarafından kodlanmaktadır. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonu arttığı zaman Ca^{++} kalmodulinle birleşerek NOS enzimine aktive eder ve NO sentezi gerçekleşir (36,39,40).

Nöronal NOS ve eNOS düşük miktarda NO sentezlenmesine neden olurlar. Oysa iNOS'un en karakteristik özelliği sürekli ve fazla miktarda NO salınmasına neden olmasıdır. Yapısal NOS enzimleri hücre içi Ca^{++} konsantrasyonu azaldığı an enzim inaktif hale geçtiği için NO sentezi durmaktadır. Kromozom 17 tarafından kodlanan iNOS özellikle makrofaj ve damar endotel hücrelerinde sentezlenmektedir. Sitotoksik ve toksik etki oluşturabilir. iNOS sentezi, sitokinler ve endotoksinler tarafından aktive edilir ve kalsiyum ve kalmodiline bağlı değildir (35,36,41).

NO endotelde üretildikten sonra damar düz kasına difüze olur ve guanilat siklaz enziminin "hem" demirine bağlanır ve siklik guanozin monofosfat (cGMP) sentezini uyararak vazodilatasyon sağlar. Bu enzimin aktivasyonu guanozin trifosfattan (GTP) ikinci ulak olan guanozin monofosfat (GMP) oluşmasını sağlar. Yüksek konsantrasyonda cGMP interselüler kalsiyum düzeyini azaltır ve düz kas hücrelerinde gevşemeyi sağlar (36,42).

BÖBREKTE NİTRİK OKSİTİN ETKİLERİ

Böbrekte NO çok önemli fonksiyonlara sahiptir. NOS her üç izoformunun da böbrekte NO sentezine katıldıkları rapor edilmiştir. Böbrekten 3 tip NOS izole edilmiştir. Bunlardan; eNOS izoformu; renal arteriyoler endotelde, nNOS izoformu; makula densada ve iNOS izofomu ise afferent arteriyollerin preglomeruler kısmından salınmaktadır (35).

Böbrekte nitrik oksitin fonksiyonları;

- 1-Böbrekte makrovasküler ve mikrovasküler genişleme (afferent>efferent),
- 2-Mitokondriyal solunumu düzenlenmesi,
- 3-Böbrekte kan akımının modülasyonu,
- 4-Sıvı, sodyum ve bikarbonatın (HCO_3^-) proksimal tübülde geri emiliminin uyarılması,
- 5-Sodyum-hidrojen değiştiricisinin aktivasyonunun uyarılması yoluyla proksimal tübülde renal asidifikasyonun uyarılması,
- 6-Medullada henlenin kalın çıkan kolunda sodyum, bikarbonat ve klorun geri emiliminin inhibisyonu,
- 7-Kortikal toplayıcı kanalda sodyum geçirgenliğinin inhibisyonu,
- 8-Kortikal toplayıcı kanalda H-ATPaz'ın inhibisyonu gibi işlevlere sahiptir (37).

Böbrek NO düzeyi tübülo-glomerüler feedback yanıtta tübüler transport ve glomerüler hemodinamiğin majör bir düzenleyicisidir. NO her iki afferent ve efferent arteriollerde genişleme ve renal medullar kan akımını düzenleyici etki gösterebilir. Proksimal tübül de NO sıvı ve bikarbonat geri emilimini destekler bu işlevini $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPaz}$ aktivitesinin Na^+/H^+ değiştiricisinin etkisini inhibe ederek sağlar. Toplayıcı kanalda NO, Na^+ ve sıvı geri emilimini azaltırken medullada henlenin kalın çıkan kolu segmentinde NO, Cl^- ve HCO_3^- geri emilimini inhibe eder. NO, toplayıcı kanalın interkaleted hücrelerinde $\text{H}^+\text{-ATPaz}$ aktivitesini inhibe eder (37). Ayrıca kortikal toplayıcı kanalda ADH'a bağlı ozmotik su permeabilitesini inhibe eder (41).

Ayrıca renal sempatik sinir sisteminin aktivitesinin modülasyonunu sağlar. Nitrik oksitin böbrekte net etkisi natriürez, diürez desteklemesi ve renal ve glomerüler perfüzyonu arttırmasıdır (43). NO diyetle alınan tuz değişikliklerinde renal adaptasyonda önemli bir rol oynar. Yapılan çalışmalarda NOS inhibitörlerinin verilmesi, tuz tutulumunun artmasına ve renal medullar kan akımının azalmasına ve hipertansiyona neden olduğu bildirilmiştir. Özellikle diyetle alınan tuz miktarında artış olduğunda NO üretiminin azalması hipertansiyon patogeneziye katkıda bulunur. Angiotensin ve NO arasındaki denge normal böbrek fonksiyonları için kritik bir öneme sahiptir. NO'nun koruyucu etkisine zıt olarak Ang II renal kan akımı ve glomerüler filtrasyon hızını azaltır, afferent ve efferent arteriollerde ise doza bağımlı bir şekilde daralma görülür (44).

Ayrıca akut böbrek yetmezliğinde değişen NO ve NO biyoyararlılığının azalması endotel disfonksiyonuna neden olur (37). ABY'nin diğer formlarına benzer şekilde rabdomiyoliz sonucu oluşan ABY'de, endotelden üretilen NO'nun azalması sonucu oluşan

vazokonstriksiyonla ilişkilidir. Ayrıca, iNOS tarafından üretilen NO'nun artması endotoksin ve iskeminin zararlı etkilerini daha da şiddetlendirmektedir (27).

SERBEST RADİKALLER

Atomun yapısında bulunan elektronlar, orbital adı verilen bölgelerde birbirine zıt yönde hareket ederler ve her orbitalde en fazla iki elektron bulunabilir. Elektronlar, orbitallerinde çift halinde bulduklarında o bileşik daha kararlı ve sabit bir yapıya sahip olur (45). Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanır (46). Serbest radikaller; pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral olabilirler. Organik veya inorganik moleküller şeklinde de olabilirler (47). Serbest radikaller, radikal olmayan bir atom veya molekülden bir elektron eksilmesi veya elektron ilavesiyle oluşurlar. Bir moleküldeki kovalent bağın ayrışmasıyla elektronlardan birisi bir atomda diğerinde diğer atomda kalarak kolayca radikal oluşturabilir ki bu olay homolitik füzyon olarak bilinir. Bu kovalent bağların ayrışmasında ısı ya da elektromanyetik radyasyon gibi kuvvetler önemli rol oynar (48).

Yaşam için gerekli olan oksijenin dış yörüngesinde eşleşmemiş iki elektron taşıması ve bu molekülün organizmada pek çok reaksiyonda önemli rol oynaması, çok sayıda serbest radikalın oluşmasına neden olur. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşan radikallerdir. Solunan oksijenin %95'inden fazlası mitokondride ATP şeklinde enerji oluşumunda kullanılırken, yaklaşık %5'i son yörüngelerinde ortaklanmamış elektron içeren ve bu özellikleri nedeniyle de toksik serbest radikallere dönüşmektedir (49). Sağlıklı bir hücrede serbest radikallerin en sık meydana gelme şekli mitokondride elektron transport zincirinde elektron kaybı sonucundadır (50). Teorik olarak serbest radikaller sonsuz sayıda reaksiyona neden olabilir. Bu ajanlar redükte edici veya oksitleyici olabilirler (51).

Cu^{+2} , Fe^{+3} , Mn^{+2} ve Mo^{+5} gibi geçiş metallerinin de ortaklanmamış elektronları olduğu halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Fakat bu iyonlar reaksiyonları katalize ettiklerinden dolayı serbest radikal oluşumunda önemli rol oynar (47). Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest oksijen radikalleri süperoksit anyonu, hidroksil radikali, peroksil, alkoksil ve hidroperoksildir. Serbest radikal olmayan diğer reaktif oksijen türlerine ozon, hidrojen peroksit, singlet oksijen, hipokloröz asit örnek verilebilir. (52).

Süperoksit Radikali

Kuvvetli bir indirgeyici ajandır. Moleküler oksijenin, bir elektron alarak indirgenmesi sonucunda süperoksit radikali oluşur. Süperoksit bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direkt olarak fazla zarar vermez. Asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Oksijen molekülüne bir elektron ilavesi ile oluşur ve serbest radikal hasarına karşı koruyucu antioksidan bir enzim olan ve oksidan hasar oluşumu ile birlikte artan süperoksit dismutaz (SOD) aracılığı ile hidrojen peroksit (H₂O₂)'e indirgenir (53). Süperoksit fizyolojik bir serbest radikal olan NO ile birleşmesi sonucu reaktif bir oksijen türevi olan peroksinitrit meydana gelir. Böylece NO'nun normal etkisi inhibe edilir (47). Canlılarda, süperoksit radikallerinin oluşumuna neden olan olayları iki grupta toplayabiliriz:

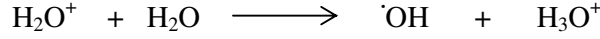
1. Çeşitli çevresel etkilerle (fiziksel ve kimyasal) süperoksit radikali oluşabilir. Örneğin, yüksek enerjili ışıklardan beta, gama ve X ışınları süperoksit radikalleri yanında diğer radikallerin oluşumunu da gerçekleştirirler.
2. Canlı sistemler radikal oluşumuna neden olan çevre koşullarından tümüyle izole edilseler bile; eğer moleküler oksijeni metabolize ediyorlarsa, canlı sistemdeki yükseltgenme-indirgenme tepkimeleri sırasında süperoksit radikali (O₂⁻) üretebilirler. Örneğin, hidrokinnonların, lökoflavinlerin, katekolaminlerin, tiyollerin, indirgenmiş boyaların, tetrahidropteridin, ferrodoksin ve hemoproteinlerin otooksidasyonu tepkimelerinde oksijen radikalleri üretilebildiği gibi, ksantin oksidaz, tiroorolat dehidrogenaz, bir grup flavoprotein dehidrogenaz, bazı oksidaz ve hidroksilaz enzimlerinin katıldığı tepkimelerde, ara ürün olarak oksijen radikalleri üretilebilirler (54).

Hidroksil Radikali

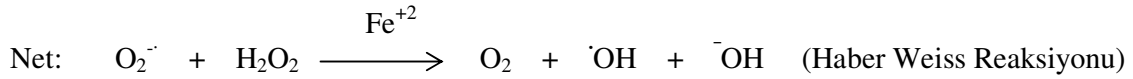
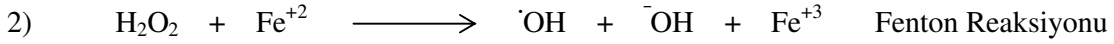
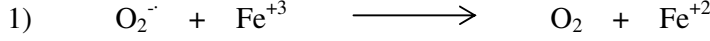
Hidroksil radikali oldukça reaktif ve toksik bir radikaldir. Hidroksil radikali biyolojik sistemlerdeki en potent serbest radikaldir. İlk karşılaştığı molekül ile 10⁻⁶ saniye içinde, 14 Å mesafesinde reaksiyona girer. Yarılanma ömrü çok kısa olup, oluştuğu yerde büyük hasara sebep olur. Hidroksil radikali büyük molekül yapısı ve elektronegativitesi nedeni ile DNA, protein, karbonhidrat ve lipitler gibi makromoleküllerle reaksiyona girerek bu yapılarda oksidatif hasara neden olur (49).

Biyolojik şartlarda hidroksil radikali oluşturabilen önemli reaksiyonlar şunlardır (53):

1) Su molekülünün iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalmasıyla hidroksil radikali oluşabilir.

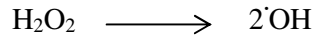


2) Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları sonucunda hidroksil radikali oluşur.

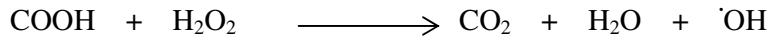


3) Ozona (O₃) elektron transferi ile hidroksil radikali oluşabilir. Bu nedenle ozon toksisitesinde hidroksil radikalının rolü vardır.

4) Hidrojen peroksidin fotolizi ile hidroksil radikali oluşabilir.



5) Radikal tepkimeleri ile oluşabilen bir organik radikal, H₂O₂ ile tepkimeye girerek OH üretebilir.



Ayrıca, $\cdot\text{OH}$ DNA'da bulunan deoksiriboz şekerini etkileyerek, çeşitli moleküllerin oluşmasına yol açar ve bu ürünlerin bazıları mutajenik etki gösterir. $\cdot\text{OH}$ aromatik halkaya katılma özelliğine sahiptir. Bu özelliğinden dolayı DNA ve RNA'da bulunan pürin ve pirimidin bazlarını etkileyerek radikal oluşumuna yol açar. $\cdot\text{OH}$ DNA'nın baz ve şeker yapılarına ciddi zararlara neden olur. DNA'da iplik kırılmaları oluşturur. Büyük hasarlar hücre koruyucu sistemler tarafından onarılmayabilir ve sonuç olarak mutasyon ve hücre ölümü görülür (55).

Hidrojen Peroksit

Moleküler oksijenin iki elektron alması veya süperoksite bir elektron katılmasıyla, peroksit (O₂⁻²) oluşur. Peroksit molekülü ise çevreden iki proton alarak hidrojen peroksiti oluşturur (53). Hidrojen peroksit membranlardan kolaylıkla geçip hücreler üzerinde bazı fizyolojik rollere sahip olabilir, fakat çiftlenmemiş elektrona sahip olmadığından radikal olarak adlandırılmaz. Ancak, reaktif oksijen türleri içerisine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli rol oynar (56). Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksitin asıl üretimi

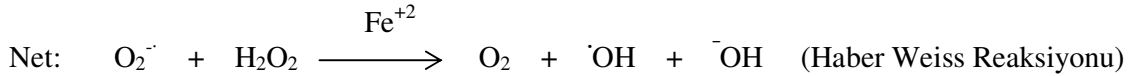
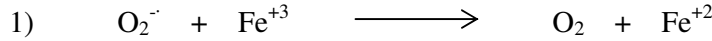
süperoksitin dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar. Reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden bu bir dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir (47).

Hidrojen peroksitin hücre içerisinde metabolizması birkaç şekilde olabilir.

1- H_2O_2 katalaz (CAT) veya glutatyon peroksidaz (GPx) tarafından toksik olmayan ürünlere dönüşür.

2- H_2O_2 geçiş metallerinin varlığında toksik OH radikaline dönüşür (49).

Hidrojen peroksit süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir. Bu olaya Haber-Weiss reaksiyonu adı verilir. Haber-Weiss reaksiyonu ya katalizör varlığında ya da katalizörsüz cereyan edebilir. Fakat katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaş ilerler. Demirle katalizlenen ikinci şekil ise çok hızlıdır. Bu reaksiyonda önce ferri demir (Fe^{+3}) süperoksit tarafından ferro demire (Fe^{+2}) indirgenir. Sonra bu ferro demir kullanılarak Fenton reaksiyonu ile hidrojen peroksitten $\cdot OH$ ve \bar{OH} üretilir (47).



Singlet Oksijen

Ortaklanmamış elektronu olmadığından radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına neden olur. Oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle olur. Delta ve Sigma olmak üzere iki şekli vardır. Singlet oksijenin üretimi ortamda süperoksit ve hidrojen peroksit bulunmasına bağlıdır (47).

SERBEST RADİKALLERİN ETKİLERİ

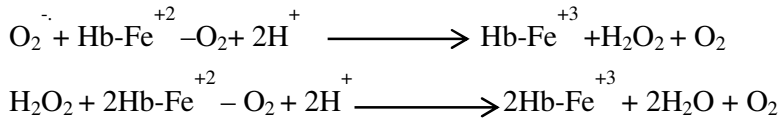
Serbest radikal kaynaklarının hücreye ve organel yüzeylerine yakınlığı dikkate alınırsa metabolik ürünlerin sitozolik, membran ve ekstrasellüler komponentleri etkileme şansı daha

fazla önem kazanır (57). Serbest radikaller organizmada radikal olmayan birçok hücre bileşeni ile de reaksiyona girebilir ve bu bileşenlerin yapı ve işlevlerini değiştirir. Böylece serbest radikaller organizmada moleküler düzeyde birçok biyolojik etkiye neden olur (54).

Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Etkileri

Doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğu için triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metionin, sistein gibi aminoasitleri içeren proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Proteinler serbest radikal harabiyetinden ne derece etkileneceği aminoasit kompozisyonlarına bağlıdır. Proteinin hücresel lokalizasyonuna ve radikalın toksisite gücüne göre protein harabiyetinin boyutları değişebilir (57). Protein molekülleri üzerindeki sülfhidril veya amino gruplarıyla serbest radikallerin etkileşmesi sonucu proteinlerde üç çeşit yapısal değişiklik görülür; 1) Aminoasitlerin modifikasyonu, 2) Proteinlerin fragmentasyonu, 3) Proteinlerin agregasyonu veya çapraz bağlanmaları (55). Serbest radikallerin etkisiyle IgG ve albumin gibi fazla sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapısı zarar görür ve normal fonksiyonlarını yerine getiremezler (47).

Enzimler protein yapısında olduklarından enzim aktivitelerinde değişiklikler meydana gelir. Hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar gören proteinlerden olup, özellikle oksihemoglobin O_2^- veya H_2O_2 'nin demir ile reaksiyonu sonucu methemoglobini oluşturur (54).



Serbest Radikallerin Karbonhidratlar Üzerine Etkileri

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Monosakkaritlerin ootoksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler, okzoaldehitler meydana gelir. Bunlar sigara içimi ve diyabetin neden olduğu patolojik durumlarda önemli rol oynarlar. Okzoaldehitler karbonhidratların DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliği kazanmasını sağlarlar (47).

Serbest Radikallerin Nükleik asitler ve DNA Üzerine Etkileri

Radyasyonla hücre içinde enerji depolanması sonucu iyonlar, serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Sitotoksisite, büyük oranda nükleik asit baz modifikasyonlarından doğan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer bozukluklara bağlıdır. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Bu yüzden DNA serbest radikallerden kolay zarar görebilir önemli bir hedeftir (47). Singlet oksijen ve özellikle hidroksil radikali, deoksiriboz ve özellikle bazlarla reaksiyona girerek; tek ve çift zincir kırılmalarına, baz dizilim değişikliklerine ve baz eksilmelerine sebep olabilir. Hidroksil radikali nükleik asitlerdeki doymuş karbon atomlarından hidrojen atomu çıkarılması veya çift bağlara katılma tepkimeleri ile sonuçlanan süreçlerde rol alır. Bu olayların sonucunda, mutagenез, karsinogenез ve hücre ölümü oluşabilir (53).

Serbest Radikallerin Lipidler Üzerine Etkileri

Serbest oksijen gruplarının biyolojik sistemdeki en önemli etkileri lipidler üzerine olanıdır. Bu olay lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve kısaca hücrelerdeki zar fosfolipidlerinin yükseltgenerek peroksit türevlerine dönüşmesi olayıdır (58). Lipid peroksidasyonu ile; fosfolipid, glukolipid, gliserid ve steroidlerin yapısında bulunan poliansatüre yağ asitlerinin, oksidan maddeler etkisiyle alkol, aldehit, hidroksi asit, etan, pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılmasını kapsayan reaksiyonlar dizisi kastedilir (59).

Lipid peroksidasyonu iki tiptir. Lipidlerden, araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine enzimatik lipid peroksidasyonu, diğer radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna ise non-enzimatik lipid peroksidasyonu adı verilir (47). Lipid peroksidasyonunu başlatan radikaller süperoksit radikali, hidroksil radikali, peroksil radikali ve alkoksil radikali. Demir iyonları özellikle lipid peroksidasyonunda önemli bir rol oynarlar. Lipid peroksitleri hücre zarlarının önemli bir bileşeni olup; Fe, Cu gibi geçiş metallerinin varlığında alkoksi ve peroksi radikallerini oluştururlar. Bu nedenle Fe veya Cu tuzları lipid peroksidasyonunu hızlandırır. Sonuçta hücre zarının akışkanlığını ve geçirgenliğini bozarak membran bütünlüğünün bozulmasına yol açarlar. Oksidatif hasarın derecesini membranın lipid/protein oranı, fosfolipidlerin miktarı, yağ asitlerinin bileşimi ve

doymamışlık derecesi ve membranın akışkanlığı etkiler (45). Hücre zarları gibi, mitokondriyal ve mikrozomal zarların fosfolipidlerinde doymamış yağ asitlerinin fazla miktarda bulunması sonucunda, lipid peroksidasyonuna daha duyarlı oldukları bilinmektedir. Lipid peroksidasyonu zarın yapı ve görevlerinde bozukluklara neden olur. Lizozomal zarlardaki hasar hidrolitik enzimlerin salınmasına yol açar. Diğer taraftan, kaslarda hasarla birlikte gelişen peroksidasyon olayları şu mekanizmayla ortaya çıkar; kaslardaki hasarla beraber hücre içi kalsiyum seviyesinde bir artış meydana gelir. Gerek bu artışın gerekse kaslardaki hasarın etkisi sonucunda hücre zarı fosfolipidlerinden fosfolipaz A₂ (FLA₂) salıverilir. Bu olay sonucunda özellikle prostaglandinler gibi eikasonoidlerin temel maddesi olan araşidonik asit miktarında artış şekillenir. Araşidonik asit miktarının artması lipooksijenaz yolu üzerinden hidroperoksi eikosatetraenoik asidin (HPETE) oluşmasına neden olur. Bu olay sonucunda HPETE'nin etkisi ile peroksidasyon ve sonuçta hücre canlılığının kaybolması gelişir (58).

Hemoglobin ve miyoglobin gibi hem içeren proteinler de hidrojen peroksit varlığında lipid peroksidasyonunu iki mekanizma ile uyarabilirler:

- Proteinler ve hidrojen peroksit reaksiyonu ile OXO–hem radikali oluşur (özellikle tirozin peroksi radikali). Bu ise lipid peroksidasyonunu uyarır.
- Aşırı hidrojen peroksit, miyoglobin ve hemoglobine etki ederek serbest demir iyonlarının açığa çıkmasına neden olur. Serbest demir iyonları ise lipid peroksidasyonunu uyarır.

Crush sendromu gibi kas hasarlarından sonra vücut sıvılarında miyoglobin ve hemoglobin artar. Hemoglobinin haptoglobine bağlanması veya hem molekülünün hemopeksine bağlanması lipid peroksidasyonunu azaltır. Plazmada bulunan seruloplazmin demir metabolizmasında da rol oynamaktadır. Ayrıca antioksidan özelliği de vardır. Seruloplazmin ferrooksidaz aktivitesine sahiptir. 2 değerlikli ferro demiri, 3 değerlikli ferri demire okside eder. Seruloplazminin ferro-oksidad aktivitesi demir iyonuna bağlı lipid peroksidasyonunu inhibe eder (56).

Peroksidasyon sonucu meydana gelen ürünlerden özellikle ikisi mutajenik etki göstermektedir; bunlar MDA ve Hidroksinonenal (HNE)'dir (58). Üç veya daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin peroksidasyonunda tiobarbütirik asit ile ölçülebilen MDA meydana gelir. Bu metod lipid peroksit seviyelerinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılır. MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir. Fakat lipid peroksidasyonunun derecesi ile iyi korelasyon gösterir. Peroksidasyon ile oluşan MDA

membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir (47).

ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

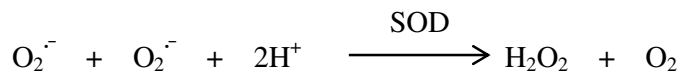
Hücrelerde serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu oksidan yıkıma karşı antioksidanlar olarak isimlendirilen birçok koruyucu mekanizma bulunmaktadır (51). Serbest oksijen radikallerinin oluşumunu ve meydana getirdikleri hasarı önlemek ve detoksifikasyonu sağlamak üzere organizmayı koruyan antioksidan savunma sistemi dört yolla etki göstermektedir.

1. Süpürücü Etki: Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma, yok etme şeklindedir. Antioksidan enzimler, küçük moleküller bu yolla etki gösterirler.
2. İnaktif Şekle Dönüştürücü Etki: Serbest oksijen radikalleri ile etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürücü etkidir. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.
3. Zincir Kırıcı Etki: Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki zincir kırıcı etkidir. Hemoglobinin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.
4. Onarıcı Etki: Serbest radikallerin oluşturdukların hasarın onarılması şeklindedir (49).

Araştırmamızda, vücudun enzimatik en önemli koruyucu sistemleri olan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), GSH ve GPx enzim aktiviteleri incelendiğinden dolayı bu dört enzim hakkında bilgi verilmesi uygun olacaktır.

Süperoksit Dismutaz

Serbest radikallere karşı organizmadaki ilk savunma SOD enzimiyle gerçekleşir (60). SOD enzimi ilk olarak 1968 yılında Mc Cord ve Fridovich tarafından tanımlanmıştır (47). SOD enzimi, süperoksit serbest radikalının, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir (61).

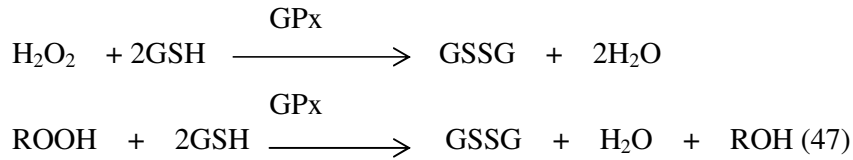


SOD, katalaz ve glutatyon peroksidazdan farklı olarak serbest radikali substrat olarak kullanır. Bütün aerobik organizmalarda mitokondri ve sitozolde bulunur ve tek bilinen substratı süperoksit radikalidir (51). Süperoksit radikallerinin dismutasyonu ile ya da direkt olarak oluşan hidrojen peroksit ise GPx ve CAT enzimleri tarafından suya dönüştürülerek detoksifiye edilir. İnsanda Cu-Zn SOD, Mn-SOD ve EC-SOD izomerleri bulunur (53). Cu-Zn SOD sitozolde bulunan ve dimerik yapıda olup 21 no'lu kromozomda lokalizedir. Mn-SOD mitokondrilerde bulunan, tetramerik yapıda ve 6 no'lu kromozomda lokalizedir. Her iki SOD'un katalizlediği reaksiyon aynıdır. Cu-Zn SOD siyanidle inhibe olurken Mn-SOD siyanidden etkilenmez (47). EC-SOD ise ekstraselüler sıvıda bulunan ve sitozolik Cu-Zn SOD ile benzerlik gösteren bir glikoproteindir (53). Oksijen kullanımı fazla olan dokularda SOD aktivitesi fazladır. Oysa ekstraselüler sıvıda SOD aktivitesi düşüktür (61).

Glutatyon Peroksidaz

GPx hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Sitozolik bir enzim olup, molekül ağırlığı yaklaşık olarak 85000 Daltondur. Tetramerik yapıda ve 4 selenyum atomu ihtiva etmektedir. GPx lipid peroksidasyonunun başlamasını ve gelişmesini engelleyici özellikte olan bir enzimdir (47).

Bu enzim aşağıdaki reaksiyonları katalizler:



H₂O₂ ve çeşitli organik hidroperoksitlerin GPx ile indirgenmesi reaksiyonunda indirgenmiş GSH kosubstrat olarak görev yapar. Katalitik reaksiyon sonucu H₂O ve oksitlenmiş glutatyon disülfid (GSSG) oluşur. Hücresel GSH'ın eksikliğine yol açan GSSG eflusu GPx aktivitesindeki artışın bir sonucudur (60). GPx'in, fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GPx, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu ile fagositik hücrelerde oluşabilecek zararı önler. GPx eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır. GPx aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksit artışı ve şiddetli hücre hasarı ile sonuçlanır. Eritrosit GPx aktivitesi yaşlılarda ve Down Sendromunda yüksek, prematürelere düşük, lökosit GPx aktivitesi yaşlılarda ve

hipertansiyonlu hastalarda yüksek bulunmuştur (47). İodoasetat, siyanür ve süperoksit radikali, GPx enziminin inhibitörleridir (60).

Glutasyon

GSH, yüksek konsantrasyonlarda hemen hemen tüm memeli hücrelerinde meydana gelen bir tripeptiddir. GSH, karaciğer başta olmak üzere pek çok dokuda glutamat, sistein ve glisin amino asitlerinden γ glutamil sistein sentetaz ve glutasyon sentetaz enzimleriyle oluşur. GSH oksidan hasara karşı koruyucu etkiye sahip hücre içindeki en önemli enzimatik yapıda olmayan antioksidandır.

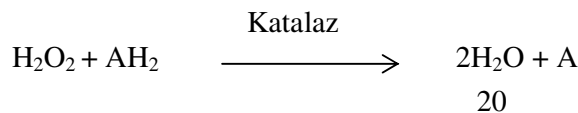
Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır. Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur. Böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. GSH yabancı bileşiklerin detoksifikasyonunu ve amino asitlerin membranlardan transportunu sağlar. GSH eritrositleri, lökositleri ve göz merceğini oksidatif strese karşı korumada hayati öneme sahiptir. Nükleofilik bir yapıya sahip olan indirgenmiş glutasyon elektrofilik karakterdeki karbon atomları ve Zn, Cd, Hg, Cu, Pb gibi atomlarla kompleks oluşturarak ağır metallerin vücuttan atılmasına yardımcı olur.

GSH; H_2O_2 'yi, lipid peroksitleri, disülfidleri, askorbatı ve serbest radikalleri indirgeyebilir. Yapılan araştırmalar GSH eksikliğinin oksidatif strese yol açtığını ve Alzheimer, Parkinson, epilepsi, karaciğer hastalıkları, kistik fibrozis, orak hücre anemisi, kanser, gibi pek çok hastalığın nedeni olabileceğini ortaya koymuştur (47,49,60).

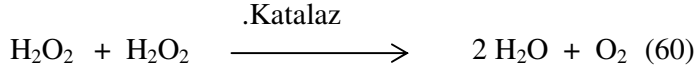
Katalaz

Katalaz 4 tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir (47). Tüm hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunup %20 oranında stoplazmada ve %80 oranında peroksizomlarda lokalizedir (60). Görevi hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalamaktır (47).

Katalaz H_2O_2 'nin oluşum hızının düşük olduğu veya elektron vericisinin yüksek olduğu konsantrasyonlarda peroksidatik reaksiyon gösterir;



H₂O₂' nin oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise katalitik reaksiyon gösterir.



Katalaz eritrositlerde yüksek oranda, kalp kası ve endotelde ise düşük oranda bulunur. Aktivitesi karaciğer, böbrek, miyokard, çizgili kaslar ve eritrositlerde yüksektir (53). Asit, siyanür, 3-amino-1,2,4 triazol, indirgenmiş glutatyon ve süperoksit radikallerinin katalazı inhibe ettiği bildirilmiştir (60).

NEBİVOLOL

Nebivolol, vazodilatatör etki gösteren üçüncü jenerasyon beta adrenerjik reseptör blokeridir (62). İlk kez 1995 yılında esansiyel hipertansiyon endikasyonu için ruhsat alınmış bir ajandır (63). Nebivolol D-nebivolol ile L-nebivololün 1:1 orandaki rasemik bir karışımıdır. Nebivololün D izomeri seçici β_1 bloker olarak ve hafif düzeyde vazodilatatör etki göstermesine rağmen, L izomeri eNOS aktivitesini artırarak endotel bağımlı vazodilatasyona neden olduğu ve yüksek dozlarda da beta bloker etki gösterdiği bildirilmektedir. Nebivololün endotel bağımlı vazodilatatör etkisi L izomerine benzer bir şekilde eNOS aktivitesini artırarak gösterdiği rapor edilmiştir (64).

Nebivolol %98 oranında plazma proteinlerine bağlanır ve bu bağlanmada esas olarak albümini tercih ettiği bildirilmiştir (63). Nebivolol; sistemik vasküler dirençte ve sistemik kan basıncında belirgin ve hızlı bir azalma sağlar. Diğer beta blokerlerden farklı olarak negatif inotropik etki oluşturmaz, kardiyak outputta ve atım hacminde artışa sebep olur, tüm bu etkiler ilacın arteriodilatatör özelliğinden kaynaklanmaktadır. İnsan ön kol damar sisteminde yapılan bir çalışmada nebivololün vazodilatatör cevabının L-arginin/NO yolu ile olduğunu; vazodilatatör cevabının N^G-metilargininin tarafından inhibe edildiğini ve aşırı L-arginin uygulaması ile bu bloke edici etkinin ortadan kalktığı rapor edilmiştir. Yapılan ek çalışmalar nebivololün vazorelaksasyon özelliğinin endotelial inositol trifosfat metabolizmasının aktivasyonu ile intraselüler kalsiyumu harekete geçirdiğini ve sonuçta endotelial nitrik oksit sentaz aktivasyonuna yol açmasıyla açıklanmaktadır. Nebivolol hücre içinde serbest kalsiyum konsantrasyonunu arttıran fosfolipaz C aktivitesini artırır. Konstitütif endotelial NO sentaz aktivitesi kalsiyum/kalmodulin bağımlıdır. İntraselüler serbest kalsiyum konsantrasyonunda artış bu enzimi aktive eder ve NO salınımında artış ile sonuçlanır (65).

Nebivolol hem NO salınımının modülasyonu yoluyla vazodilatör etki oluşturur, hem de β_1 adrenoseptör antagonist etkiye sahiptir. Nebivolol birçok mekanizma ile hemodinamik değişiklikler gösterir. Bunlar, negatif kronotropik etki, serebral vazomotor merkezden sempatik aktivite inhibisyonu, periferik α_1 reseptör inhibisyonu, renin aktivitesinin baskılanması ve en önemlisi de periferik vasküler direnci azaltmasıdır (64). Ayrıca nebivololün böbrek glomerüler kapillerinde endotelial adenozin trifosfat oluşumunu uyardığı, endotelial kalsiyum düzeyini arttırdığı ve kalsiyum bağımlı eNOS aktivitesini arttırdığı bildirilmektedir. Nebivololün yapılan birçok çalışmada böbrek NO salgısını arttırdığı renal plazma akımı ile glomerüler filtrasyon hızını arttırdığı bildirilmiştir. Ayrıca renin anjiyotensin aldosteron sistemini baskıladığı, anjiyotensin II inhibisyonu, endotelin-1 seviyesini azalttığı ve antioksidan etki gösterdiği rapor edilmiştir (9). Troost ve ark. nebivololün oral yolla standart antihipertansif dozda kullanımının önemli ölçüde izoprostane 8-iso PGF2 α 'nın üriner yolla atılımını önemli ölçüde azaltarak antioksidan etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu bulgu nebivololün antioksidatif etkisini güçlü bir şekilde desteklemektedir (66).

Nebivolol yüksek düzeyde lipofilik bir ajandır. Nebivolol fibrinojen plasma aktivatör inhibitör1 (PAI-1), homosistein ve endotelin-1 konsantrasyonlarını azaltır. Azaltılmış endotelin-1 konsantrasyonu, düz kas hücre proliferasyonu ve vazodilatasyonunda muhtemelen olumlu bir rol oynayabilir (67). Nebivolol vasküler düz kas hücrelerinin çoğalmasını inhibe etme yeteneğine sahiptir. Nebivololün bu özelliği doğal bir özelliği olan poliamin metabolizmasıyla etkileşime girebilmesiyle yakından ilişkilidir. Yapılan bir çalışmada nebivolol sıçan aortik düz kas hücre çoğalmasını ve poliamin üretimini inhibe ettiği rapor edilmiştir. Nebivolol trombosit agregasyonunu ve vasküler düz kas hücre proliferasyonunu inhibe ederek (kan basıncını kardiyak debiyi azaltmadan düşürerek) kalbi değil vasküler sistemi de NO aracılığıyla tromboz ve ateroskleroza karşı korur (68). Hücrel ve hayvansal modellerde nebivololün endotelial β_2 adrenerjik reseptör aracılı NO üretimi sağladığı veya ATP çıkışıyla P2Y-purinoseptörün stimülasyonu aracılı NO salınımı yoluyla vazodilatör etki gösterdiği kanıtlanmıştır. Aynı çalışmada nebivolol NO ayırıcılarını inhibe ederek sistemik antioksidan etki gösterdiği rapor edilmiştir. Farmakolojik konsantrasyonlarda nebivolol lipid hidroperoksit seviyelerinde doza bağımlı azalma sağlamıştır (69). Deneysel ve klinik bulgulara göre endotel disfonksiyonu oksidatif strese bağlı olarak azalmış NO biyoaktivitesinin doğrudan bir sonucudur. Ayrıca bazı kanıtlar nebivolol reaktif oksijen türleri (ROS) yapımıyla etkileşime girerek oksidatif stresi azaltabileceğine işaret etmektedir. Bu

nedenle nebivololün hipertansiyonda endotel disfonksiyonunu önlemede çok yararlı etkileri olduğu bildirilmiştir (68).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamızda; Trakya Üniversitesi Deneysel Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'nda yetiştirilen ve standart laboratuvar koşullarında ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda) tutulan, 240-300 g ağırlığında Wistar albino erkek sıçanlar kullanıldı. Çalışma için Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan (Ek-1) onay alındı. Sıçanlar deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, standart sıçan yemi ve musluk suyu verilerek beslendi.

Çalışmamızda 4 grupta 10'ar adet olmak üzere 40 adet sıçan kullanıldı. 1. ve 2. grup sıçanlar fizyolojik serum (FS), diğer gruplar im gliserol enjeksiyonundan 24 saat önce serbest diyetle susuz bırakıldı. İlk enjeksiyondan sonra serbest diyet ve su alımı sağlandı. 1. ve 2. grup sıçanlara FS, 3. ve 4. gruplardaki sıçanlara %50'lik gliserol solüsyonundan 10 ml/kg'a göre bulunan toplam hacim her iki arka bacak kaslarına eşit miktarda enjekte edildi. 2. ve 4. gruba 2 mg/kg dozunda nebivolol; 1. ve 3. gruba ise 2. ve 4. grup ile eşdeğer hacimde distile su oral yolla verilmiştir.

1. grup (kontrol) sıçanlara FS'nin im enjeksiyonundan 1 ve 24 saat sonra oral yolla distile su verildi.

2. grup (kontrol+nebivolol) sıçanlara FS'nin im enjeksiyonundan 1 ve 24 saat sonra oral yolla 2 mg/kg dozunda nebivolol verildi.

3. grup (ABY) sıçanlara gliserol enjeksiyonundan 1 ve 24 saat sonra oral yolla distile su verildi.

4. grup (ABY+nebivolol) sıçanlara gliserol enjeksiyonundan 1 ve 24 saat sonra oral yolla 2 mg/kg dozunda verildi.

1. ve 3. gruplara 24. saatteki oral yolla distile su verilmesinden hemen sonra, 2. ve 4. gruplardaki sıçanlara ise 24. saatteki oral yolla nebivolol verilmesinden hemen sonra, sıçanlar metabolik kafeslere alınarak 24 saatlik idrarları toplandı. Metabolik kafeslere alınan sıçanların 24 saatlik idrarları toplandıktan sonra yani gliserol enjeksiyonundan 48 saat sonra sıçanlar 10 mg/kg rompun ve 50 mg/kg ketamin anestezisi altında sakrifiye edildikten sonra kanları ve her iki böbreği alındı. Diyafragmadan kalbe ulaşarak ponksiyonla alınan kan örnekleri biyokimyasal incelemeler için tüplere alındı. Daha sonra her iki böbrek çıkarılarak buz kabı üzerine konuldu, böbrek kapsülü sıyrıldıktan sonra bistüri yardımıyla longitudinal kesiyle ikiye ayrıldı. Sağ böbreğin bir yarısı patoloji çalışmaları için %10'luk formalin solüsyonuna alındı. Diğer yarısı ve sol böbreğin her iki yarısı soğuk fizyolojik serumla yıkandıktan sonra alüminyum folyo ile paketlenildi ve laboratuvar çalışmaları yapıncaya kadar -80 °C'de koruma altına alındı. Metabolik kafeslerde toplanan idrar hacimleri ölçüldü. Kan ve idrar örnekleri soğutmalı santrifüjde +4 °C ve 3000xg devirde 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpermatantlar ependorf tüplere alınarak laboratuvar çalışmaları yapıncaya kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

Kullanılan Cihazlar

Spektrofotometre	: Spectronic Unicam Helios α , İngiltere
Hassas terazi	: Mettler Toledo, AB204-S, İsviçre
Soğutmalı santrifüj	: MPW 350R, Polonya
Su banyosu	: Nickel Clifton Elektro LTD, İngiltere
Otomatik pipetler	: Biohit Proline, Finlandiya, Mettler Toledo, İsviçre
Vorteks	: Heidolp, Almanya
Derin dondurucu	: Thermo Elektron Corporation, USA
pH metre	: InoLab, Level 1, Almanya
Manyetik karıştırıcı	: Remi equipments, Hindistan
Homojenizatör	: Polytron Kinematica AG, İsviçre
Otoanalizör	: Konelab Prime 60i, Finlandiya

Kullanılan Kimyasal Maddeler

Nebivolol	: Menarini, Almanya
-----------	---------------------

Gliserol	: Merck, Almanya
NaOH	: Merck, Almanya
Na-K tartarat	: Merck, Almanya
Folin fenol reaktifi	: Merck, Almanya
KH ₂ PO ₄	: Merck, Almanya
Na ₂ HPO ₄	: Merck, Almanya
EDTA	: Merck, Almanya
H ₂ O ₂	: Merck, Almanya
NaN ₃	: Merck, Almanya
Tiyobarbitürik asit	: Merck, Almanya
Piridin	: Merck, Almanya
Sodyum dodesil sülfat	: Merck, Almanya
Ksantin	: Sigma, Almanya
Ksantin oksidaz	: Sigma, Almanya
Glutasyon	: Sigma, Almanya
Glutasyon redüktaz	: Sigma, Almanya
NADPH	: Sigma, Almanya
Bovin serum albumin	: Sigma, Almanya
CuSO ₄	: Panreac, İspanya
Butanol	: Riedel de Haen, Almanya
Na ₂ CO ₃	: Riedel de Haen, Almanya
Etanol	: Riedel de Haen, Almanya
Asetik asit	: Riedel de Haen, Almanya

Biyokimyasal Çalışmalar

Serum ve idrar örneklerinde üre, kreatinin, Na⁺ ve K⁺ ölçümleri Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkez Laboratuvarı'nda bulunan otoanalizörde (Konelab Prime 60i, Thermo Scientific, Finlandiya) yapıldı.

Histolojik Çalışmalar

Sagittal olarak ikiye bölünen böbrek dokularının birer yarısı tamponlu %10'luk nötral formaldehit içinde 24 saat boyunca tespit edilmiştir. Alkol, ksilen ve erimiş parafin basamaklarını içeren doku takibine alınan dokuların parafine gömülmelerinin ardından 5 mikron kalınlığında kesitler alınmış ve tüm kesitler rutin hematoksil-eozin boyaları ile boyanarak aynı patolog tarafından kör bakışla ikişer defa ışık mikroskopunda değerlendirilmiştir. Değerlendirmede 10 büyük büyütme alanında proksimal tübül epitelindeki nekroz belirlenmiş ve tüm proksimal tübüllere olan oranı toplam değer yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Aynı şekilde distal tübüller içindeki proteinöz kastlar değerlendirilmiş ve kast içeren tübül lümenleri kast içermeyenlere oranlanarak toplam değer yüzdesi olarak ifade edilmiştir.

Böbrek Dokusu Homojenizasyonu

Böbrek dokusu -80°C 'den çıkarıldıktan sonra buzu çözülmeden kesilerek tartıldı. GSH ve MDA için 0.15 M KCl solüsyonu; SOD, CAT, GPx ve NO enzim aktiviteleri için 50 mM fosfat tamponu (pH 7.4) ile %10'luk (w:v) olacak şekilde hazırlandı. Bistüri ile kesilen dokular tartımları yapıldıktan sonra daha küçük parçalara ayrılarak tüplere konuldu ve doku ağırlıklarına göre sulandırılarak tüpler içerisindeki dokular buz üzerinde tutularak homojenizatör ile homojenize edildi. Hazırlanan homojenatlar 4000xg'de 10 dk $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edildi ve süpernatant ayrıldı. Ayrılan süpernatantlar spektrofotometrik MDA, GSH, NO düzeyleri ve SOD, CAT, GPx enzim aktiviteleri ile protein ölçümlerinde kullanıldı.

Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayini Lowry metoduna göre yapıldı. Bu metod, proteinin yapısında bulunan tirozin ve triptofan amino asitlerinin fosfotungstat kompleksini molibden mavisine indirgemesi prensibine dayanır. Reaksiyon bakır (Cu^{2+}) ile belirginleştirilir (70).

Çözeltiler:

A Çözeltisi: %2'lik Na_2CO_3 'ın 0.1 N NaOH'teki çözeltisi

B Çözeltisi: %1'lik CuSO_4 çözeltisi

C Çözeltisi: %2'lik Sodyum potasyum tartarat çözeltisi

D Çözeltisi: 98 hacim A çözeltisi + 1 hacim B çözeltisi + 1 hacim C çözeltisi karışımı
E Çözeltisi: 1 hacim Folin belirteci + 1 hacim distile su karışımı

Bovin Serum Albumin (BSA) Çözeltisi: Standart protein çözeltisi olarak kullanılan BSA 10 mg/ml konsantrasyondaki stok çözeltiden 1, 2, 3, 5, 7.5, 10 mg/ml'lik çözeltileri hazırlandı.

Deneyin yapılışı: Test ve standart tüplerine 490 µl, kör tüpüne 500 µl distile su kondu. Tüm tüplere 2.5 ml D çözeltisi ilave edildikten sonra, test tüplerine 10 kat dilüe edilmiş numuneden 10 µl; standart tüplerine de 10 µl her bir standarttan ilave edildi ve tüpler vorteks ile iyice karıştırıldı. Oda ısısında karanlıkta 10 dk bekletildikten sonra, tüm tüplere 250 µl E çözeltisi eklendi. 25 °C'de 30 dk bekletildikten sonra, spektrofotometrede 650 nm'de köre karşı sıfırlanarak okuma yapıldı.

Malondialdehit Miktar Tayini

Lipid peroksidasyon son ürünü olan MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile sıcak ve asit ortamda reaksiyona girmesi sonucu oluşan renk spektrofotometrik olarak ölçülür (71).

Çözeltiler

1. %8.1'lik sodyum dodesil sülfat (SDS)
2. %20'lik asetik asit (NaOH ile pH 3.5'e ayarlandı)
3. %0.8'lik tiyobarbitürik asit (TBA)
4. n-Butanol/piridin (15:1)

Deneyin yapılışı: 0.2 ml 10 kat dilüe edilmiş doku homojenatı; 0.2 ml %8.1'lik SDS, 1.5 ml %20'lik asetik asit, 1.5 ml %0.8'lik TBA ve 0.6 ml distile su ile karıştırıldı. Karışım 95 °C'deki sıcak su banyosunda 1 saat tutuldu. Musluk suyu ile soğutulduktan sonra üzerine 1 ml distile su ve 5 ml butanol/piridin (15:1) eklenerek vorteksle 1 dakika karıştırıldı. Organik faz 4000xg'de 10 dk santrifüj edilerek ayrıldı. Absorbanslar homojenat içermeyen ayıraç körüne karşı 532 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu.

Sonuçların hesaplanması:

$$C \text{ (nmol/ml)} = \frac{A \times V_t \times 10^9}{E \times V_s \times L \times 10^3}$$

A : Absorbans

E : Tüketim katsayısı ($1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

V_t : Total reaksiyon hacmi

Vs : Total reaksiyon içindeki numune hacmi

L : Küvet çapı

10^9 : Molün nanomole çevrilmesi

10^3 : Litrenin mililitreye çevrilmesi

Sonuçlar MDA nmol/g doku olarak ifade edildi.

Glutasyon Düzeyinin Ölçümü

Doku homojenatlarındaki serbest sülfidril gruplarının Ellman ayırıcı ile oluşturduğu rengin spektrofotometrik olarak saptanması, glutasyon içeriğinin belirtilmesi için kullanıldı (72).

Çözeltiler:

1. Proteinsizleştirme çözeltisi: 120 g NaCl, 6.68 g metafosforik asit ve 0.8 g sodyum-EDTA tartıldı ve 400 ml distile suda çözüldü.

2. 0.3 M Disodyum fosfat (Na_2HPO_4)

3. 1 mM Ellman ayırıcı: 4 mg 5.5-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) (DNTB), 10 ml %1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözüldü.

4. Glutasyon standardı: 10 mg/dl GSH

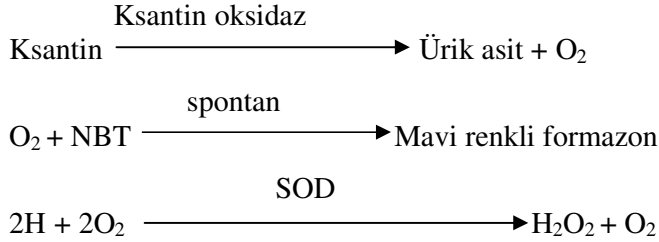
Deneyin yapılışı: 0.5 ml doku homojenatı üzerine 1.5 ml 0.15 M KCl ve 3 ml proteinsizleştirme çözeltisi eklendi. Bu karışım 3000xg'de 20 dk santrifüj edildikten sonra 0.5 ml süpernatant alınarak üzerine 0.3 M Na_2HPO_4 ve 0.5 ml Ellman ayırıcı eklendi. Absorbanslar homojenat içermeyen ayıraç körüne karşı 412 nm'de okundu. GSH düzeyleri ekstinksiyon katsayısı ($\Sigma=1.36 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar $\mu\text{mol GSH/g}$ doku olarak ifade edildi.

Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Bu araştırmada SOD enzim aktivitesinin tayini, ksantin \rightarrow ksantin oksidaz sistemiyle üretilen süperoksit radikallerinin, SOD tarafından hidrojen peroksite dönüştürülmesi ya da NBT'yi (nitroblue tetrazolium) indirgemesi esasına dayanır. İndirgenen NBT 560 nm'de maksimum absorbans veren mavi renkli formazona dönüşür. SOD ise, süperoksidin hidrojen perokside dönüşümünü sağlar. Öyleyse, belli bir miktar NBT'yi içeren deney ortamında,

oluşan süperoksidin miktarı standardize edildiği takdirde; bu ortamda bulunan SOD enziminin aktivitesiyle ters orantılı olarak mavi renkli formazon oluşacaktır (73).

Olayı şu şekilde formüle edebiliriz:



Kullanılan reaktifler:

1- Assay reaktifi:

a- 0.3 mmol/L ksantin: 9.13 mg alınıp son hacim 200 ml olacak şekilde bidistile suda çözüldü. Ksantin zor çözüldüğünde bu işlem ısıtılarak ya da ortama 1 M NaOH çözeltisinden 1-2 damla eklenerek yapılabilir.

b- 0.6 mmol/L Na₂EDTA: 23 mg alınıp son hacim 100 ml olacak şekilde bidistile suda çözüldü.

c- 150 µmol/L NBT: 12.3 mg alınıp son hacim 100 ml olacak şekilde bidistile suda çözüldü.

d- 400 mmol/L Na₂CO₃: 2.54 g alınıp son hacim 60 ml olacak şekilde bidistile suda çözüldü.

e- 1 g/L bovine serum albumin (BSA): 30 mg alınıp son hacim 30 ml olacak şekilde bidistile suda çözüldü.

Hazırlanan tüm çözeltiler karıştırılarak (toplam hacim 490 ml olacak) koyu renkli bir şişede 4 °C'de muhafaza edildi (Tablo 1).

2- Ksantin oksidaz: Ksantin oksidaz stok çözeltisi 4 °C'de soğutulmuş 2 M (NH₄)₂SO₄ çözeltisi ile 167 U/L olacak şekilde hazırlandı (Tablo 1).

3- CuCl₂ (0.8 mmol/L): 13.6 mg CuCl₂ alınıp bir miktar bidistile suda çözülerek toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı (Tablo 1).

4- 2 M (NH₄)₂SO₄: 2.64 g amonyum sülfat tartıldı. Bir miktar distile suda çözülerek toplam hacim 10 ml'ye tamamlandı. Bu çözelti ksantin oksidazın dilüsyonunda kullanıldı (Tablo 1).

Deneyin yapılışı: Deneye başlarken, 4 °C'de koruduğumuz hemolizat, fosfat tamponu ile 50 kez dilüe edildi. Ardından, karışım iyice vortekslendi ve 4 °C, 3000xg'de 10 dakika santrifüj edildi.

Tablo 1. SOD tayin yöntemi

	Kör tüpü	Test küveti
Assay reaktifi	2.850	2.850
Numune (hemolizat)		0.100
Bidistile su	0.100	
Ksantin oksidaz	0.050	0.050
25 °C'de 20 dk inkübasyon		yapıldı
CuCl ₂ (ml)	1.00	1.00

Karışımlar, spektrofotometrede 560 nm'de assay reaktifi ile sıfıra ayarlanarak, kör ve tüm numune tüplerinin absorpsanları kaydedildi.

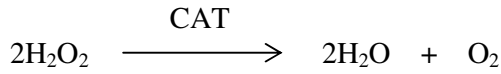
SOD aktivitesinin hesaplanması:

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{\text{Kör'ün absorpsansı (Ak)} - \text{Numunenin absorpsansı (An)}}{\text{Kör'ün absorpsansı}} \times 100$$

1 ünite SOD= NBT redüksiyonunu %50 inhibe eden enzim aktivitesidir. Sonuçlar U/mg protein olarak verildi.

CAT Enzim Aktivitesinin Hesaplanması

CAT katalitik aktivitesiyle hidrojen peroksiti dekompoze ederek su ve oksijene dönüştürmektedir (74).



Hidrojen peroksit ultraviyole spektrumunda absorpsiyon veren bir maddedir. Maksimal absorpsan 240 nm'de meydana gelmektedir. Deney ortamına ilave edilen hidrojen peroksitin CAT tarafından su ve oksijene parçalanması 240 nm'de absorpsan azalması ile kendini gösterir. Absorpsansta gözlenen bu azalma ortamdaki CAT enzim aktivitesi ile doğru orantılı bir eğilim göstermektedir (74).

Çözeltiler:

1. 50 mM pH 7.0 olan fosfat tamponu hazırlanır.
2. Hidrojen peroksitli ve absorpsansı 0.5 olan fosfat tamponu: Spektrofotometre 240 nm'ye ayarlandı ve fosfat tamponu ile aletin sıfır absorpsan okuması sağlandı. Hidrojen

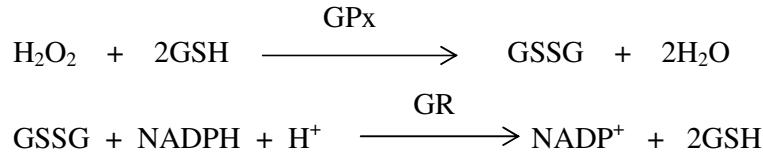
peroksitli fosfat tamponu, absorbans 0.5 oluncaya kadar damla damla hidrojen peroksit eklenerek ayarlandı.

Deneyin yapılışı: Spektrofotometre 240 nm'ye ayarlandı ve fosfat tamponu ile sıfır absorbansa getirildi. 3 ml'lik küvete 2.99 ml hidrojen peroksitli fosfat tamponu ve 50 kat dilüe edilmiş numunedan 0.01 ml ilave edilerek hızla karıştırıp absorbansı okundu, bu başlangıç absorbans değeridir. Daha sonra 60 saniye süreyle absorbans azalması takip edildi. Sürenin sonunda okunan absorbans değeri kaydedildi. Sonuçlar κ /mg protein şeklinde ifade edildi.

$$\kappa = \frac{2.3 \times \log \frac{\text{İlk absorbans}}{\text{Son absorbans}}}{\Delta t \text{ (ölçüm süresi, sn)}} \times \text{Sulandırma katsayısı}$$

Glutatyon Peroksidaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

GPx, GSH'ı kullanarak hidrojen peroksitin suya dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. Reaksiyon sonunda GSH okside forma dönüşürken, hidrojen peroksit ise suya katalizlenir. Oluşan GSSG'nin tekrar kullanılabilmesi için GSSG'nin GSH'a dönüşmesi gerekir. Bu dönüşüm, ortamda redükte NADP (NADPH) ve GR enzimi varlığında gerçekleşir. Bu durumda redükte NADP okside NADP'ye çevrilirken GSSG redükte forma dönüşür (75).



Redükte NADP 340 nm'de maksimal absorbans gösteren bir maddedir. GR katalizi devam ettikçe, ortamdaki NADPH miktarı giderek azalacak ve buna paralel olarak 340 nm'de absorbans azalması meydana gelecektir. Absorbanstaki bu azalma hızı ortamdaki GPx aktivitesi ile doğru orantılı olacaktır.

Çözeltiler:

1. 5 mM EDTA içeren 50 mM pH 7'lik fosfat tamponu.
2. 150 mM GSH EDTA'lı fosfat tamponunda çözüldü (kullanımdan hemen önce hazırlandı).
3. 1 M NaN_3 EDTA'lı fosfat tamponunda çözüldü (kullanımdan hemen önce hazırlandı).

4. 3 mM NADPH EDTA'lı fosfat tamponunda çözüldü (kullanımdan hemen önce hazırlandı).

5. 50 mM hidrojen peroksit EDTA'lı fosfat tamponunda çözüldü (kullanımdan hemen önce hazırlandı).

6. 1 U/10 µl GR olacak şekilde fosfat tamponunda dilüe edildi.

Deneyin yapılışı: Kör tüpüne 2.680 ml ve test tüplerine 2.670 ml EDTA'lı fosfat tamponu, 0.1 ml GSH, 0.1 ml NADPH, 0.01 ml GR, 0.01 ml NaN₃, ayrıca test tüplerine 0.01 ml 10 kat dilüe edilmiş numune ilave edildikten sonra 30 dk oda ısısında inkübe edildi. Spektrofotometre 340 nm'de fosfat tamponu ile sıfırlandı. Sürenin sonunda her tübe 100 µl hidrojen peroksit ilave edilip reaksiyon başlatıldı ve hemen küvetler spektrofotometreye konarak 3 dk süreyle absorbans azalması takip edildi. Absorbans azalmasının bu süre içerisinde tam olarak lineer olduğu görüldü.

Sonuçların hesaplanması:

1 Ünite GPx: 1 dakikada okside olan NADPH'ın µmol cinsinden miktarıdır.

$$U/L (\mu\text{mol/dk/L}) = \frac{\Delta A/t \times V_t \times 10^6}{E \times V_s \times L}$$

E : NADPH'in tüketim katsayısı ($6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

V_t : Total reaksiyon hacmi

V_s : Total reaksiyon içindeki numune hacmi

L : Küvet çapı

ΔA/t : Dakikadaki absorbans değişimi

10⁶ : Molün mikromole çevrilmesi

Spesifik aktivite için bulunan sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

Nitrat ve Nitrit Tayini

Nitrat ve Nitrit Tayini Cortes ve Wakid'in tarif ettiği yöntemle yapıldı (76).

Kullanılan reaktifler:

1. Kadmiyum granülleri: 0.1 mol/L H₂SO₄ içinde saklandığı sürece 9 ay stabildir.

2. Glisin-NaOH buffer: 7.5 g glisin bir miktar distile suda çözüldü. 2 mol/L NaOH çözeltisi ile pH'sı 9.7'ye ayarlandı. Bu çözelti 1 ay 0-8 °C'de stabildir.

3. Sülfanilamid: 2.5 g sülfanilamid 250 ml sıcak 3 mol/L HCl içinde çözüldü ve daha sonra soğumaya bırakıldı. 1 yıl oda sıcaklığında stabil kalabilir.

4. N-Naphtiletlen diamin (NNDA): 50 mg NNDA 250 ml distile su içinde çözüldü. 2 ay 0-8 °C de stabildir.

5. Çinko Sülfat ($ZnSO_4$): 75 mmol/L; 10.8 mg alınıp 500 ml'ye tamamlandı.

6. Bakır Sülfat ($CuSO_4$): 5 mmol/L; 250 mg alınıp 200 ml'ye tamamlandı.

7. Sodyum Hidroksit (NaOH): 55 mmol/L; 1.1 g alınıp 500 ml'ye tamamlandı.

8. Standartlar: $NaNO_2$ standardı 10 mmol/L'lik sodyum tetra borat çözeltisi içinde hazırlanır (69 mg $NaNO_2$, 380 mg borat ($Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$) 100 ml içinde çözülür). KNO_3 standardı; 102 mg potasyum nitrat alınıp 10 mmol'lik 100 ml sodyum tetra borat içinde çözülür.

Deneyin yapılışı:

Deproteinizasyon: Test tüpüne 0.5 ml numune, 0.5 ml distile su, 2 ml $ZnSO_4$, 2.5 ml NaOH ilave edilip vorteksle karıştırılır. 10 dk oda ısısında beklettikten sonra 4000xg'de 10 dk santrifüj edildi.

Kadmiyum granüllerinin aktivasyonu: Granüller 3 defa distile su ile yıkanır. 1-2 dk içinde $CuSO_4$ 'de çalkalanarak bekletilip, 3 defa da glisin-NaOH ile yıkanıp 10 dk içinde kullanılmak üzere kurutma kağıdı ile kurutulur.

Sonucun hesaplanması: KNO_3 standardından 1; 5; 10; 25; 50; 75; 100; 200 milimolarlık seri dilüsyonlar hazırlanır ve numunelere uygulanan tüm işlemler standartlara da uygulanır. 1 ml glisin-NaOH buffer tüm tüplere konulur. 1'er ml deproteinize numunelerden ve standartlardan alınır. 2.5 g tartılan ve aktivasyon işleminden geçirilen kadmiyumlardan tüm tüplerin üzerine konulur. 90 dk oda ısısında karıştırarak beklenir. Süre sonunda Nitrit ölçümü için bu tüplerden 2'şer ml alınarak üzerine 1 ml sülfanilamid ve 1 ml NNDA ilave edilir; karıştırılır ve 45 dk beklendikten sonra 545 nm'de okuma yapılır.

Doğrudan nitrit ölçümü: $NaNO_2$ standartlarından 1; 5; 10; 25; 50; 75; 100; 200 milimolarlık seri dilüsyonlar hazırlanır ve deproteinize numunelerden kadmiyum ile reaksiyona sokmadan direkt olarak 2'şer ml alınarak ayrı tüplere konulur. Üzerine 1 ml sülfanilamid ve 1 ml NNDA eklenir. 45 dk sonra 545 nm'de okuma yapılır.

Nitrat Ölçümü

Bulunan nitrat değerlerinden nitrit değerleri çıkarıldıktan sonra sulandırma faktörü olan 20 ile çarpılıp yine nitrat standardından elde edilen faktör ile çarptıktan sonra çıkan sonuç $\mu\text{mol/mg}$ protein olarak hesaplanmış olur.

İstatistik

Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Tek Örneklem Kolmogorov-Smirnov test ile incelendi. Normal dağılım varsayımı yerine geldiğinde gruplar arası farklılığı araştırmada Tek Yönlü Varyans analizi (ANOVA) kullanıldı, normal dağılım varsayımı yerine gelmediğinde gruplar arası farklılığı araştırmada Kruskal Wallis test kullanıldı. Gruplar arası fark bulunduğunda farklılığın hangi grup ya da gruplardan kaynaklandığını belirlemede Bonferroni düzeltmeli post hoc test kullanıldı. $P<0,05$ değeri istatistiksel anlamlılık sınır değeri olarak saptandı. İstatistiksel analizlerde Statistica 7.0 (Lisans kodu:31N6YUCV38) paket programı kullanıldı.

BULGULAR

Sıçanlarda hipertonic gliserolün im uygulanmasıyla oluşturulan deneysel mABY modeli, her grupta 10 adet sıçan olmak üzere 4 grupta toplam 40 adet sıçan üzerinde çalışıldı. Gliserol enjeksiyonunun 48. saatinde anestezi altında sıçanların kan ve doku örnekleri alındı. Ancak 2 sıçan 48 saat dolmadan gelişen komplikasyonlardan dolayı öldü. Ölen sıçanların her ikisi de 4. gruptandı. Ayrıca 3. grupta 2 adet, 4. gruptan ise 1 adet sıçandan idrar örneği alınamadı.

Tüm gruplardaki sıçanlara ait doku MDA düzeyi nmol/g doku, GSH düzeyi $\mu\text{mol/g}$ doku, NO düzeyi $\mu\text{mol/mg}$ protein, SOD aktivitesi U/mg protein, CAT aktivitesi κ/mg protein ve GPx aktivitesi U/mg protein, serum üre ($S_{\text{üre}}$) düzeyi mg/dl, serum kreatinin (S_{krea}) düzeyi mg/dl, serum sodyum (S_{Na}) düzeyi mmol/L, serum potasyum (S_{K}) düzeyi mmol/L, idrar NO (I_{NO}) düzeyi $\mu\text{mol/L}$, idrar kreatinin (I_{krea}) düzeyi mg/dl, idrar sodyum (I_{Na}) düzeyi mmol/L, kreatinin klirensi standart klirens formülüne göre hesaplanıp kg/vücut ağırlığına bölündü. Fraksiyonel sodyum atılımı (FeNa) % olarak hesaplandı. Fraksiyonel sodyum atılımı=idrar sodyumu/serum sodyumu x serum kreatinin/idrar kreatinin x 100 formülü kullanılarak hesaplandı. Gruplara ait veriler tablolarda gösterilmiştir (Tablo 2-5).

Çalışma gruplarının değişkenlere ait istatistik verileri ise Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 2. Grup 1'in biyokimyasal verileri

SN	MDA	GSH	NO	SOD	GPx	CAT	Süre	S _{krea}	S _{Na}	S _K	İ _{NO}	İ _{krea}	İ _{Na}
1	0,226	2,129		16,815	2,060	1,434	35	0,5	138	5,4	92,583	85	13
2	0,243	2,875		15,206	2,226	1,413	36	0,5	138	6	61,667	99	25
3	0,247	2,760	53,988	17,267	3,200	1,465	29	0,5	129	4,5	101,083	119	22
4	0,324	3,371	31,446	16,786	1,720	1,518	33	0,5	141	5,2	79,417	92	19
5	0,196	2,562	104,402	16,610	1,386	1,602	28	0,5	130	5	76,750	85	22
6	0,282	2,611		16,477	1,777	1,114	33	0,5	133	4,8	73,500	110	10
7	0,266	2,342	150,499	15,912	1,486	1,536	35	0,5	128	5,1	64,750	87	9
8	0,440	3,123	225,529	14,529	1,453	1,325	36	0,5	138	4,6	63,333	100	10
9	0,503	3,884	90,693	16,282	1,489	1,243	37	0,5	125	4,9	52,000	90	10
10	0,269	2,082	102,121	17,467	1,146	1,289	37	0,5	136	6	58,917	80	9

SN: Sıra numarası; MDA: Malondialdehit; GSH: Glutasyon; NO: Nitrik oksit; SOD: Süperoksit dismutaz; GPx: Glutasyon peroksidaz; CAT: Katalaz; S_{üre}: Serum üre; S_{krea}: Serum kreatinin; S_{Na}: Serum sodyum; S_K: Serum potasyum; İ_{NO}: İdrar nitrik oksit; İ_{krea}: İdrar kreatinin; İ_{Na}: İdrar sodyum.

Tablo 3. Grup 2'nin biyokimyasal verileri

SN	MDA	GSH	NO	SOD	GPx	CAT	S _{üre}	S _{krea}	S _{Na}	S _K	İ _{NO}	İ _{krea}	İ _{Na}
1	0,568	3,530	345,440	15,758	1,517	1,257	38	0,5	139	4,1	65,083	115	12
2	0,334	3,680	71,287	16,070	1,512	1,385	39	0,5	140	5,5	107,750	123	15
3	0,190	2,080	36,513	16,423	2,865	1,094	38	0,5	139	5,6	87,250	101	12
4	0,218	2,805	145,506	16,472	2,296	1,762	35	0,5	141	5,2	98,833	158	13
5	0,226	4,254	56,320	14,861	2,048	1,147	27	0,4	115	4,2	100,333	101	30
6	0,348	3,408	42,878	16,334	2,050	1,373	35	0,5	141	4,1	87,667	76	35
7	0,205	3,229	181,814	15,727	1,811	1,222	29	0,5	131	4,8	92,083	86	44
8	0,198	2,936	206,582	15,524	1,906	1,482	30	0,5	137	5,2	79,000	89	27
9	0,372	3,222	76,593	16,149	2,338	0,673	36	0,5	137	5,7	87,583	91	46
10	0,218	2,751	156,941	16,564	2,706	1,383	29	0,5	138	5	88,417	89	41

SN: Sıra numarası; MDA: Malondialdehit; GSH: Glutasyon; NO: Nitrik oksit; SOD: Süperoksit dismutaz; GPx: Glutasyon peroksidaz; CAT: Katalaz; S_{üre}: Serum üre; S_{krea}: Serum kreatinin; S_{Na}: Serum sodyum; S_K: Serum potasyum; İ_{NO}: İdrar nitrik oksit İ_{krea}: İdrar kreatinin; İ_{Na}: İdrar sodyum.

Tablo 4. Grup 3'ün biyokimyasal verileri

SN	MDA	GSH	NO	SOD	GPx	CAT	S _{üre}	S _{krea}	S _{Na}	S _K	İ _{NO}	İ _{krea}	İ _{Na}
1	0,600	1,969	92,371	16,674	2,603	0,522	618	5,6	114	7,6	13,583	10	104
2	0,544	1,686	92,873	19,531	3,004	0,429	557	5,8	113	8,1	4,000	10	92
3	0,158	2,027	173,873	16,996	1,733	0,515	645	6	116	7,7	24,583	12	103
4	0,390	1,925	84,642	16,427	2,258	0,371	566	5,7	106	7,7	18,667	9	85
5	0,509	1,943	208,461	17,841	1,501	0,307	623	6,3	106	8,1	4,250	10	94
6	0,469	2,199	116,941	18,719	1,308	0,403	590	5,9	118	7,1	12,750	10	80
7	0,496	1,619	114,894	16,079	1,383	0,550	623	5,5	117	8,9			
8	0,584	2,228	91,371	16,064	1,488	0,579	581	5,4	106	7,8	46,500	10	75
9	0,539	1,876	83,943	14,466	1,868	0,380	610	6,3	119	8,8			
10	0,282	1,735	89,398	15,535	1,133	0,409	627	5,5	110	8	20,917	10	70

SN: Sıra numarası; MDA: Malondialdehit; GSH: Glutasyon; NO: Nitrik oksit; SOD: Süperoksit dismutaz; GPx: Glutasyon peroksidaz; CAT: Katalaz; S_{üre}: Serum üre; S_{krea}: Serum kreatinin; S_{Na}: Serum sodyum; S_K: Serum potasyum; İ_{NO}: İdrar nitrik oksit; İ_{krea}: İdrar kreatinin; İ_{Na}: İdrar sodyum.

Tablo 5. Grup 4'ün biyokimyasal verileri

SN	MDA	GSH	NO	SOD	GPx	CAT	S _{üre}	S _{krea}	S _{Na}	S _K	İ _{NO}	İ _{krea}	İ _{Na}
1	0,548	2,381	49,334	15,944	1,903	0,428	565	6,3	116	7,5	25,167	11	73
2	0,669	2,642	16,301	15,429	1,909	0,545	608	6,5	125	8			
3	0,464	2,172		14,559	1,475	0,541	575	5,9	125	8,7	16,167	14	97
4	0,478	2,253	161,307	15,699	2,621	0,384	519	5,6	104	7,8	10,833	9	82
5	0,347	2,214	29,453	19,405	3,854	0,507	638	6,3	113	8,2	17,583	11	67
6	0,418	1,911	409,632	33,715	4,542	0,804	563	5,4	113	6,6	16,917	10	63
7	0,547	2,667	97,803	13,849	2,026	0,391	542	5,9	118	7,6	9,250	14	84
8													
9	0,602	2,648	91,066	13,1711	2,164	0,339593	554	6,8	119	8,9	19,250	16	76
10													

SN: Sıra numarası; MDA: Malondialdehit; GSH: Glutasyon; NO: Nitrik oksit; SOD: Süperoksit dismutaz; GPx: Glutasyon peroksidaz; CAT: Katalaz; S_{üre}: Serum üre;

S_{krea}: Serum kreatinin; S_{Na}: Serum sodyum; S_K: Serum potasyum; İ_{NO}: İdrar nitrik oksit İ_{krea}: İdrar kreatinin; İ_{Na}: İdrar sodyum.

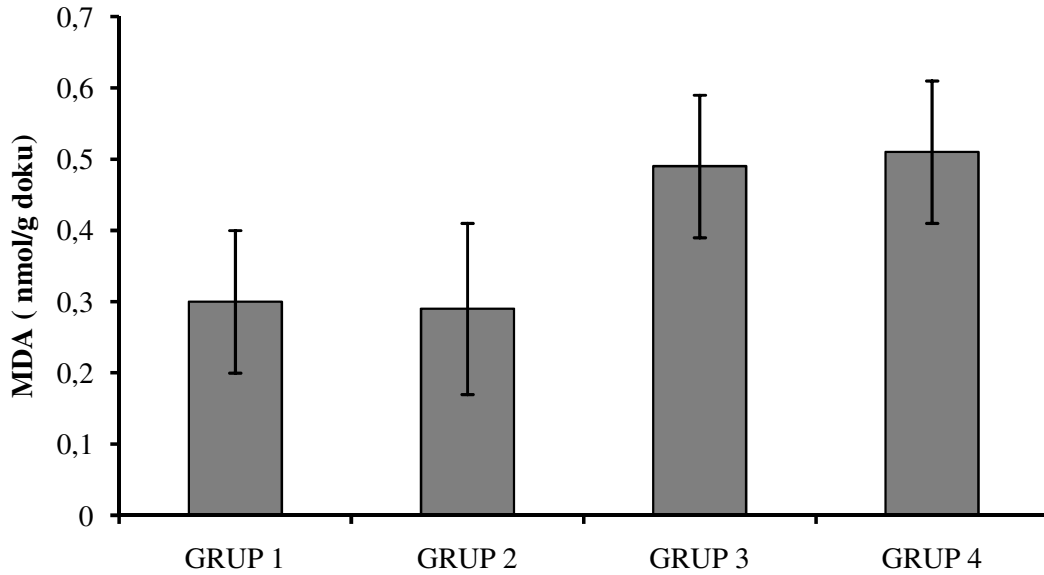
Tablo 6. Çalışma gruplarının değişkenlerine ait istatistiksel verileri

	GRUP 1	GRUP 2	GRUP 3	GRUP 4	p*
Parametreler	Ort±SD	Ort±SD	Ort±SD	Ort±SD	
MDA nmol/g doku	0,30±0,10	0,29±0,12	0,49±0,10	0,51±0,10	<0,001
GSH µmol/g doku	2,77±0,57	3,19±0,59	1,91±0,21	2,36±0,27	<0,001
NO µmol/mg protein	108,38±64,22	131,99±96,58	108,32±39,43	122,13±135,92	0,914
SOD U/mg protein	16,34±0,91	15,99±0,53	16,81±1,60	17,72±6,73	0,322
CAT κ/mg protein	1,39±0,15	1,28±0,28	0,44±0,09	0,49±0,15	<0,001
GPx U/mg protein	1,79±0,59	2,10±0,45	1,84±0,65	2,56±1,07	0,110
S_{üre} mg/dl	33,90±3,18	33,60±4,43	599,44±26,63	570,50±37,43	<0,001
S_{krea} mg/dl	0,50±0,00	0,49±0,03	5,78±0,33	6,09±0,47	<0,001
S_{Na} mmol/L	133,60±5,36	135,80±7,86	112,11±5,33	116,63±6,91	<0,001
S_K mmol/L	5,15±0,52	4,94±0,62	8,01±0,57	7,91±0,73	<0,001
İ_{NO} µmol/L	72,40±15,47	89,40±11,85	17,24±14,43	16,45±5,30	<0,001
İ_{krea} mg/dl	94,70±12,31	102,90±23,88	9,86±0,38	12,14±2,54	<0,001
İ_{Na} mmol/L	14,90±6,37	27,50±13,77	85,71±11,81	77,43±11,44	<0,001
Kreatin klirensi	0,50±0,04	0,50±0,04	0,00±0,00	0,00±0,00	<0,001
FeNa %	0,06±0,02	0,11±0,07	45,45±7,78	34,14±7,20	<0,001

Gruplar arası MDA düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p<0,001$). Gruplar arası MDA düzeyinde grup 1 ile grup 3 arasında $p=0,003$, grup 1 ile grup 4 arasında $p=0,001$, grup 2 ile grup 3 arasında $p=0,001$, grup 2 ile grup 4 arasında $p<0,001$ düzeyinde anlamlı artma gözlemlendi. Grup 1 ile grup 2 ve grup 3 ile grup 4 arasında anlamlı fark gözlemlenmedi ($p>0,05$). MDA düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi sonuçları Tablo 7’de ve gruplara göre MDA düzeyinin dağılımı Şekil 1’de gösterildi.

Tablo 7. Malondialdehit düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi sonuçları

	1. grup	2. grup	3. grup
2. grup	$p>0,05$		
3. grup	$p=0,003$	$p=0,001$	
4. grup	$p=0,001$	$p<0,001$	$p>0,05$

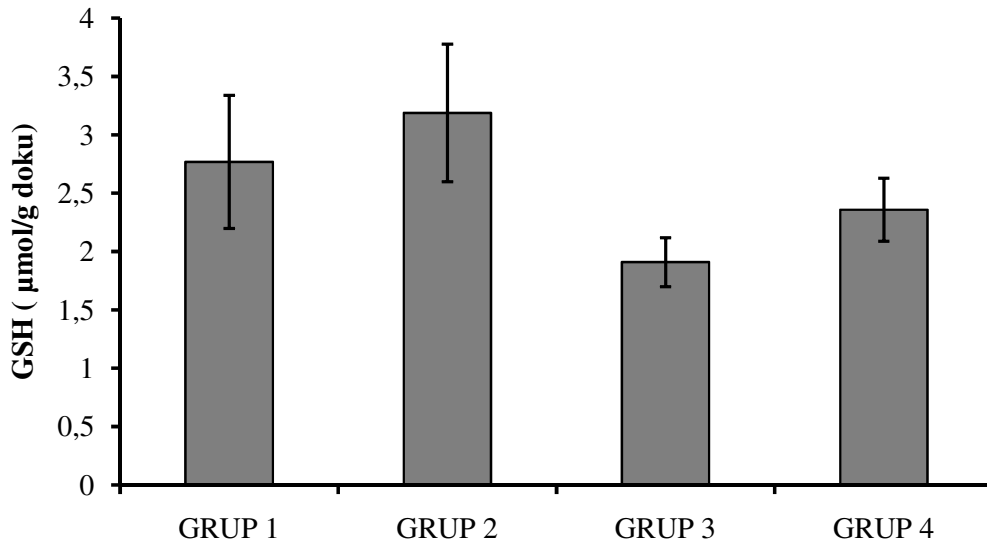


Şekil 1. Gruplara göre malondialdehit düzeylerinin dağılımı

Gruplar arası GSH düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p < 0,001$). Gruplar arası GSH düzeyinde grup 1 ile grup 3 arasında $p = 0,001$, grup 2 ile grup 3 arasında $p < 0,001$, grup 2 ile grup 4 arasında $p = 0,003$ düzeyinde anlamlı azalma gözlemlendi. Diğer gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi ($p > 0,05$). GSH düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi sonuçları Tablo 8’de ve gruplara göre GSH dağılımı Şekil 2’de gösterildi.

Tablo 8. Glutatyon düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi sonuçları

	1. grup	2. grup	3. grup
2. grup	$p > 0,05$		
3. grup	$p = 0,001$	$p < 0,001$	
4. grup	$p > 0,05$	$p = 0,003$	$p > 0,05$

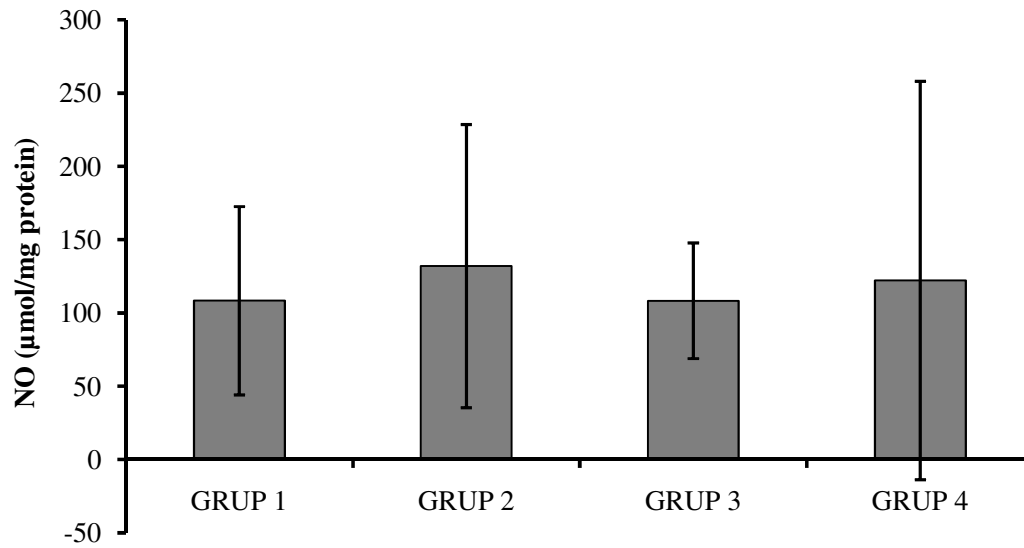


Şekil 2. Gruplara göre glutatyon düzeylerinin dağılımı

Gruplar arası NO düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p=0,914$). NO düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi sonuçları Tablo 9'da ve gruplara göre NO düzeylerinin dağılımı Şekil 3'te gösterildi.

Tablo 9. NO düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi sonuçları

	1. grup	2. grup	3. grup
2. grup	$p>0,05$		
3. grup	$p>0,05$	$p>0,05$	
4. grup	$p>0,05$	$p>0,05$	$p>0,05$

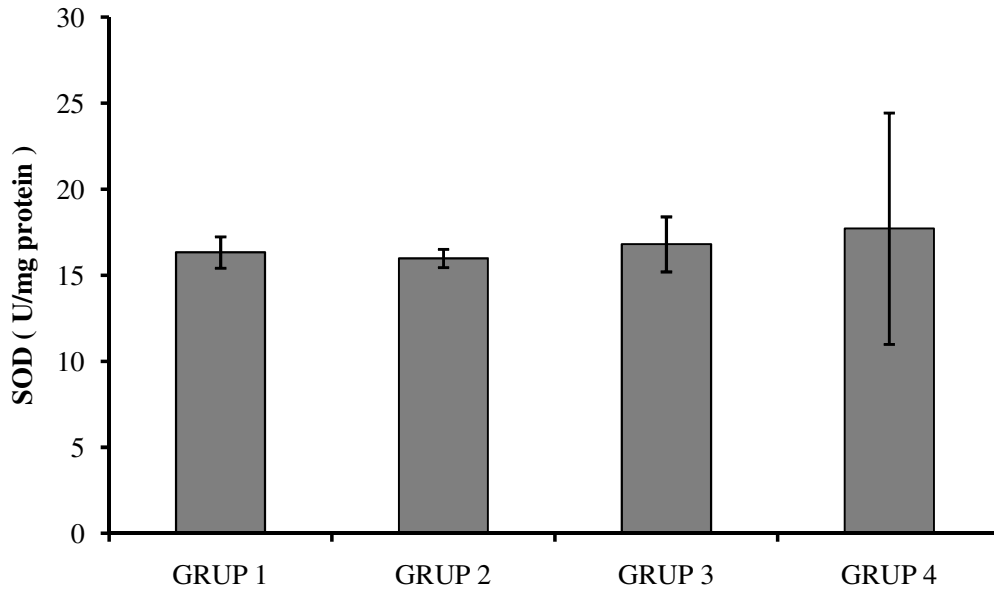


Şekil 3. Gruplara göre NO düzeylerinin dağılımı

Gruplar arası SOD düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p=0,322$). SOD düzeylerinin Bonferroni düzeltmeli post hoc testi sonuçları Tablo 10'da ve gruplara göre SOD düzeylerinin dağılımı Şekil 4'te gösterildi.

Tablo 10. Süperoksit dismutaz düzeylerinin Bonferroni düzeltmeli post hoc testi sonuçları

	1. grup	2. grup	3. grup
2. grup	$p>0,05$		
3. grup	$p>0,05$	$p>0,05$	
4. grup	$p>0,05$	$p>0,05$	$p>0,05$

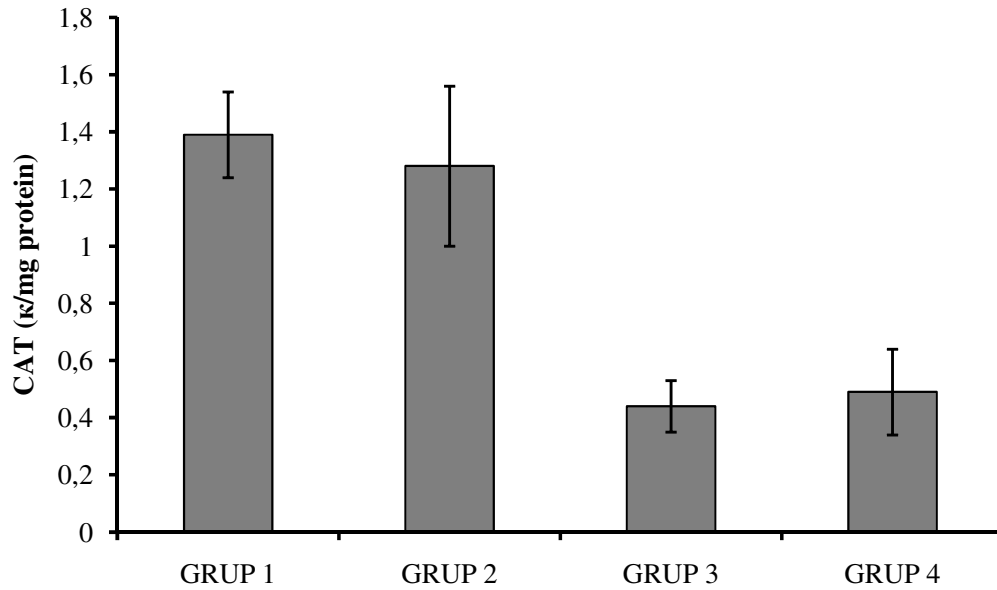


Şekil 4. Gruplara göre süperoksit dismutaz düzeylerinin dağılımı

Gruplar arası CAT düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p<0,001$). Gruplar arası CAT düzeyinde grup 1 ile grup 3 ve grup 4 arasında, grup 2 ile grup 3 ve grup 4 arasında $p<0,001$ düzeyinde anlamlı azalma gözlemlendi. Diğer gruplar arasında anlamlı fark gözlemlenmedi ($p>0,05$). CAT düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi sonuçları Tablo 11’de ve gruplara göre CAT dağılımı Şekil 5’te gösterilmiştir.

Tablo 11. Katalaz düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi sonuçları

	1. grup	2. grup	3. grup
2. grup	$p>0,05$		
3. grup	$p<0,001$	$p<0,001$	
4. grup	$p<0,001$	$p<0,001$	$p>0,05$

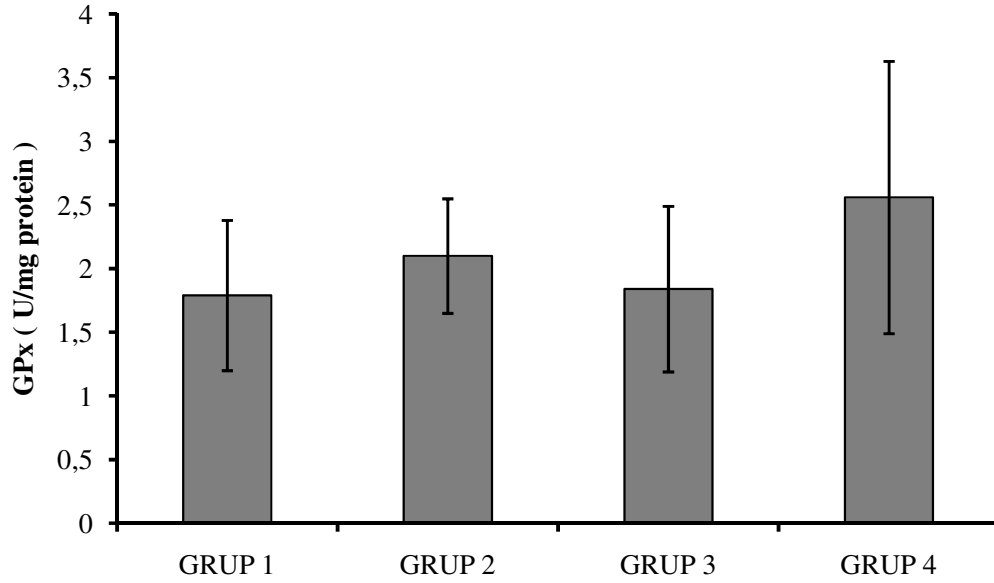


Şekil 5. Gruplara göre katalaz düzeylerinin dağılımı

Gruplar arası GPx düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p=0,110$). GP_x düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi sonuçları Tablo 12’de ve gruplara göre GP_x düzeylerinin dağılımı Şekil 6’da gösterildi.

Tablo 12. Glutasyon peroksidaz düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi sonuçları

	1. grup	2. grup	3. grup
2. grup	$p>0,05$		
3. grup	$p>0,05$	$p>0,05$	
4. grup	$p>0,05$	$p>0,05$	$p>0,05$

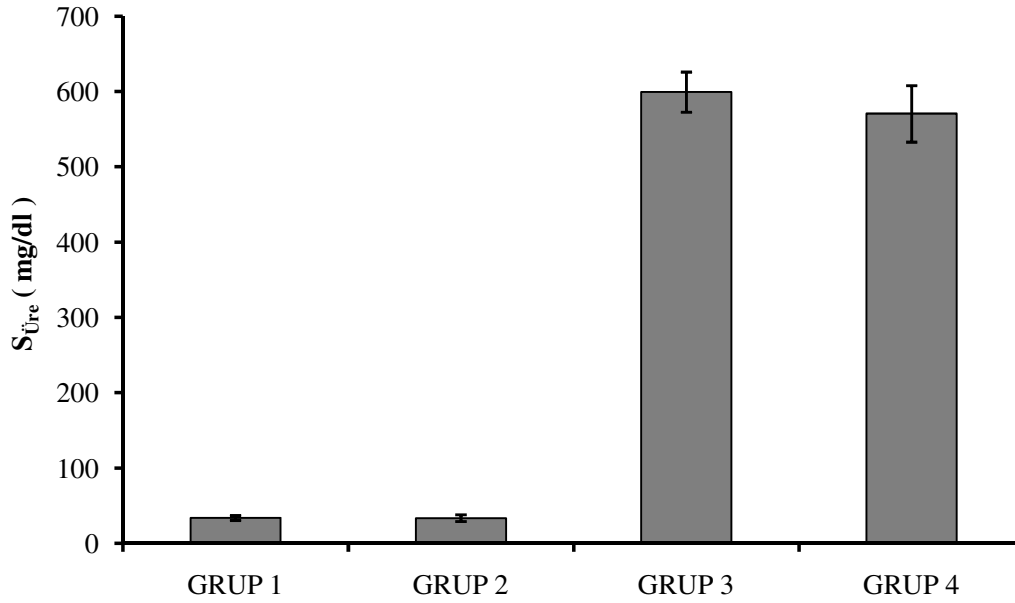


Şekil 6. Gruplara göre glutasyon peroksidaz düzeylerinin dağılımı

Gruplar arası $S_{\text{üre}}$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p < 0,001$). Gruplar arası $S_{\text{üre}}$ düzeyinde grup 1 ile grup 3 ve grup 4, grup 2 ile grup 3 ve grup 4 arasında $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı artma gözlemlendi. Diğer gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi ($p > 0,05$). $S_{\text{üre}}$ düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi (Dunn's metodu) sonuçları Tablo 13'te ve gruplara göre serum üre düzeylerinin dağılımı Şekil 7'de gösterildi.

Tablo 13. Serum üre düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi (Dunn's metodu) sonuçları

	1. grup	2. grup	3. grup
2. grup	$p > 0,05$		
3. grup	$p < 0,001$	$p < 0,001$	
4. grup	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p > 0,05$

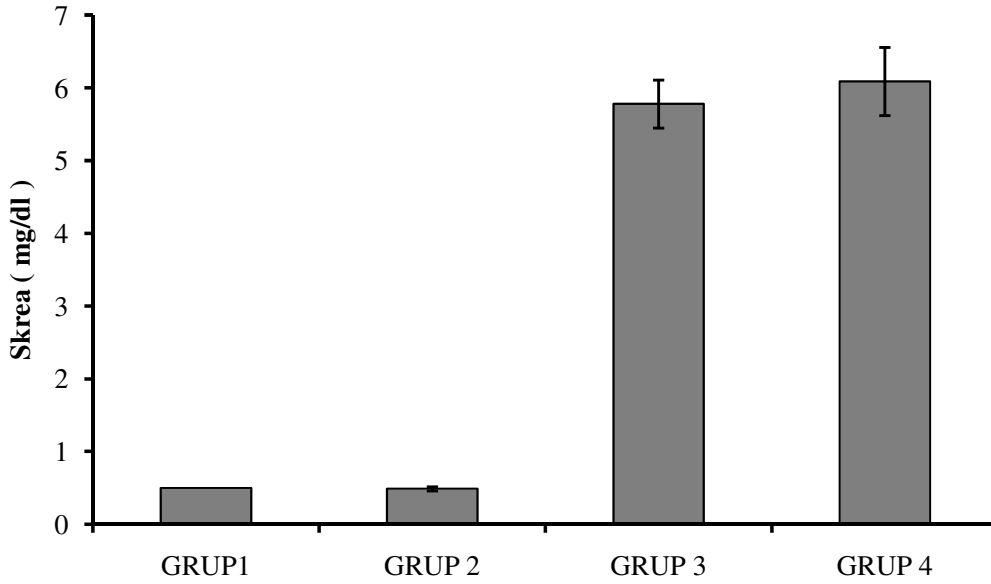


Şekil 7. Gruplara göre serum üre düzeylerinin dağılımı

Gruplar arası S_{krea} düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p < 0,001$). Gruplar arası S_{krea} düzeyinde grup 1 ile grup 3 ve grup 4, grup 2 ile grup 3 ve grup 4 arasında $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı artma gözlemlendi. Diğer gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi ($p > 0,05$). S_{krea} düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi (Dunn's metodu) sonuçları Tablo 14'te ve gruplara göre serum üre düzeyinin dağılımı Şekil 8'de gösterildi.

Tablo 14. Serum kreatinin düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi (Dunn's metodu) sonuçları

	1. grup	2. grup	3. grup
2. grup	$p > 0,05$		
3. grup	$p < 0,001$	$p < 0,001$	
4. grup	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p > 0,05$

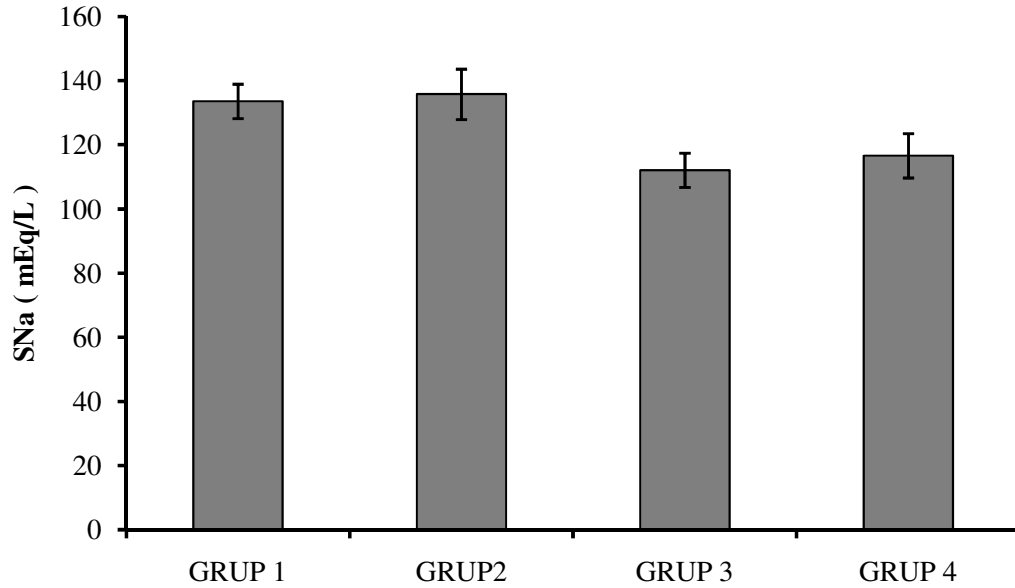


Şekil 8. Gruplara göre serum kreatinin düzeylerinin dağılımı

Gruplar arası S_{Na} düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p<0,001$). Gruplar arası S_{Na} düzeyinde grup 1 ile grup 3 ve grup 4, grup 2 ile grup 3 ve grup 4 arasında $p<0,001$ düzeyinde anlamlı azalma gözlemlendi. Diğer gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi ($p>0,05$). S_{Na} düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi (Dunn's metodu) sonuçları Tablo 15'te ve gruplara göre serum sodyum düzeylerinin dağılımı Şekil 9'da gösterildi.

Tablo 15. Serum sodyum düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi (Dunn's metodu) sonuçları

	1. grup	2. grup	3. grup
2. grup	$p>0,05$		
3. grup	$p<0,001$	$p<0,001$	
4. grup	$p<0,001$	$p<0,001$	$p>0,05$

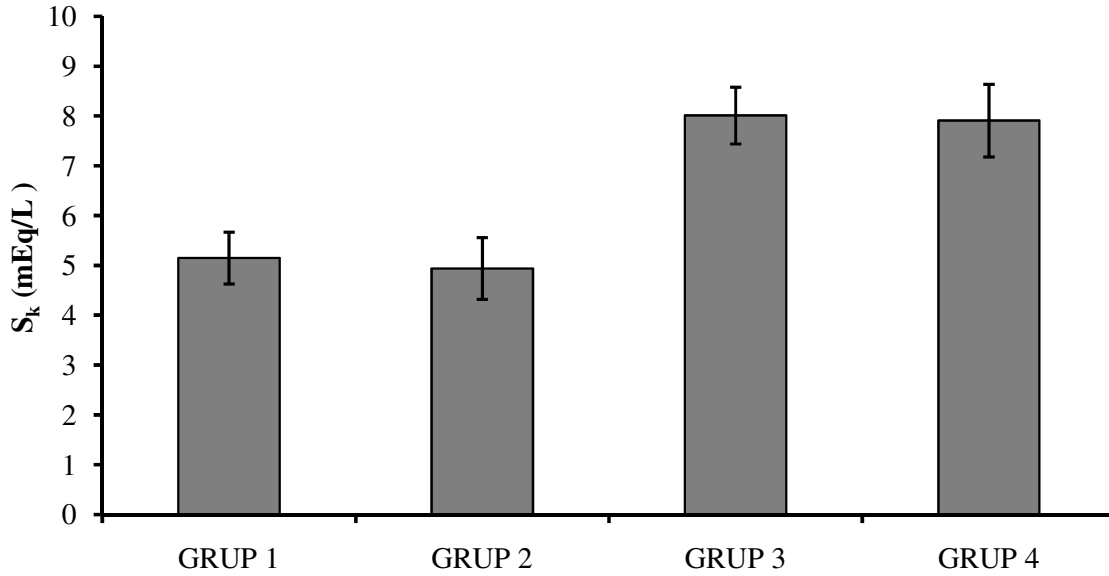


Şekil 9. Gruplara göre serum sodyum düzeylerinin dağılımı

Gruplar arası S_K düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p<0,001$). Gruplar arası S_K düzeyinde grup 1 ile grup 3 ve grup 4, grup 2 ile grup 3 ve grup 4 arasında $p<0,001$ düzeyinde anlamlı artma gözlemlendi. Diğer gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi ($p>0,05$). S_K düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi sonuçları Tablo 16’da ve gruplara göre serum potasyum dağılımı Şekil 10’da gösterildi.

Tablo 16. Serum potasyum düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi sonuçları

	1. grup	2. grup	3. grup
2. grup	$p>0,05$		
3. grup	$p<0,001$	$p<0,001$	
4. grup	$p<0,001$	$p<0,001$	$p>0,05$

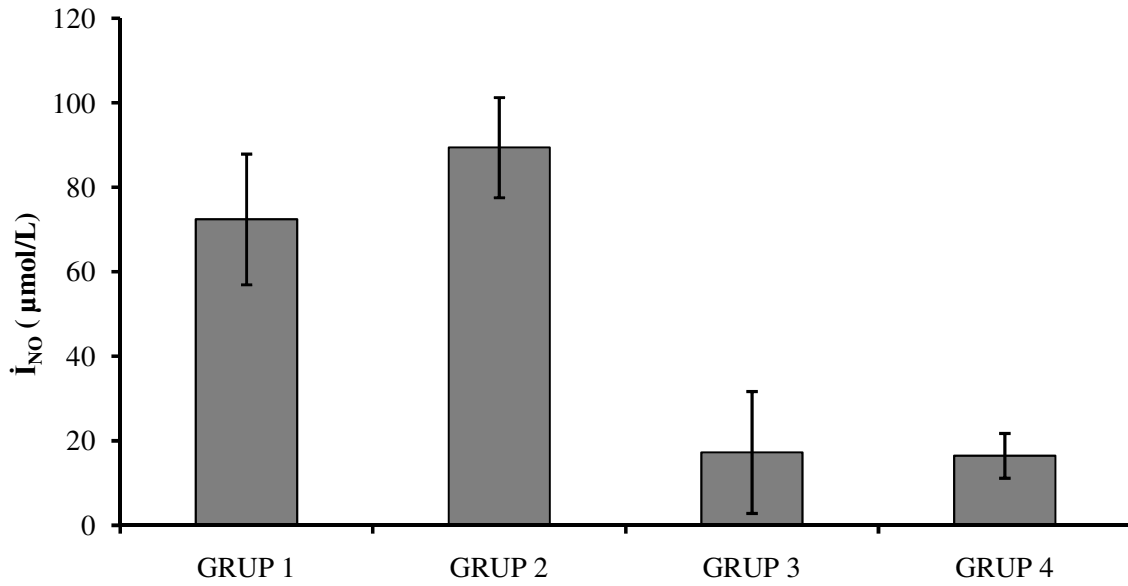


Şekil 10. Gruplara göre serum potasyum düzeylerinin dağılımı

Gruplar arası idrar NO düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p<0,001$). Gruplar arası idrar NO düzeyinde grup 1 ile grup 3 ve grup 4 arasında, grup 2 ile grup 3 ve grup 4 arasında $p<0,001$ düzeyinde anlamlı azalma gözlemlendi. Diğer gruplar arasında anlamlı fark gözlemlenmedi ($p>0,05$). İdrar NO düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi sonuçları Tablo 17’de ve gruplara göre idrar NO dağılımı Şekil 11’de gösterildi.

Tablo 17. İdrar NO düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi sonuçları

	1. grup	2. grup	3. grup
2. grup	$p>0,05$		
3. grup	$p<0,001$	$p<0,001$	
4. grup	$p<0,001$	$p<0,001$	$p>0,05$

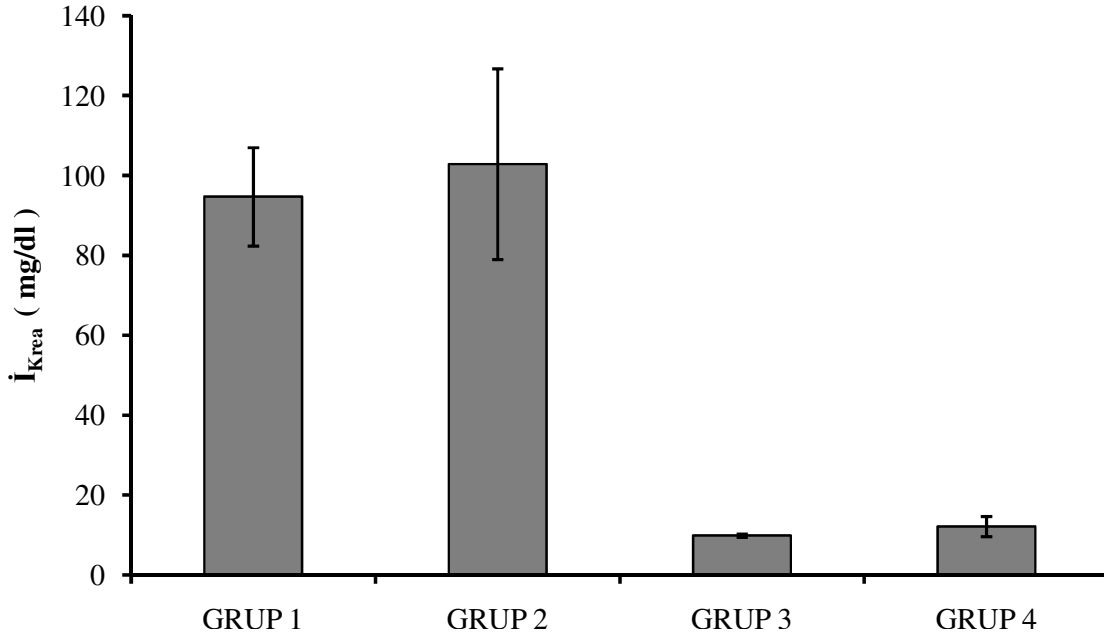


Şekil 11. Gruplara göre idrar NO düzeylerinin dağılımı

Gruplar arası \dot{I}_{krea} düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p<0,001$). Gruplar arası \dot{I}_{krea} düzeyinde grup 1 ile grup 3 ve grup 4, grup 2 ile grup 3 ve grup 4 arasında $p<0,001$ düzeyinde anlamlı azalma gözlemlendi. Diğer gruplar arasında anlamlı fark gözlemlenmedi ($p>0,05$). \dot{I}_{krea} düzeylerinin Bonferroni düzeltilmiş post hoc testi (Dunn's metodu) sonuçları Tablo 18'de ve gruplara göre idrar kreatinin düzeylerinin dağılımı Şekil 12'de gösterildi.

Tablo 18. İdrar kreatinin düzeylerinin Bonferroni düzeltilmiş post hoc testi (Dunn's metodu) sonuçları

	1. grup	2. grup	3. grup
2. grup	$p>0,05$		
3. grup	$p<0,001$	$p<0,001$	
4. grup	$p<0,001$	$p<0,001$	$p>0,05$

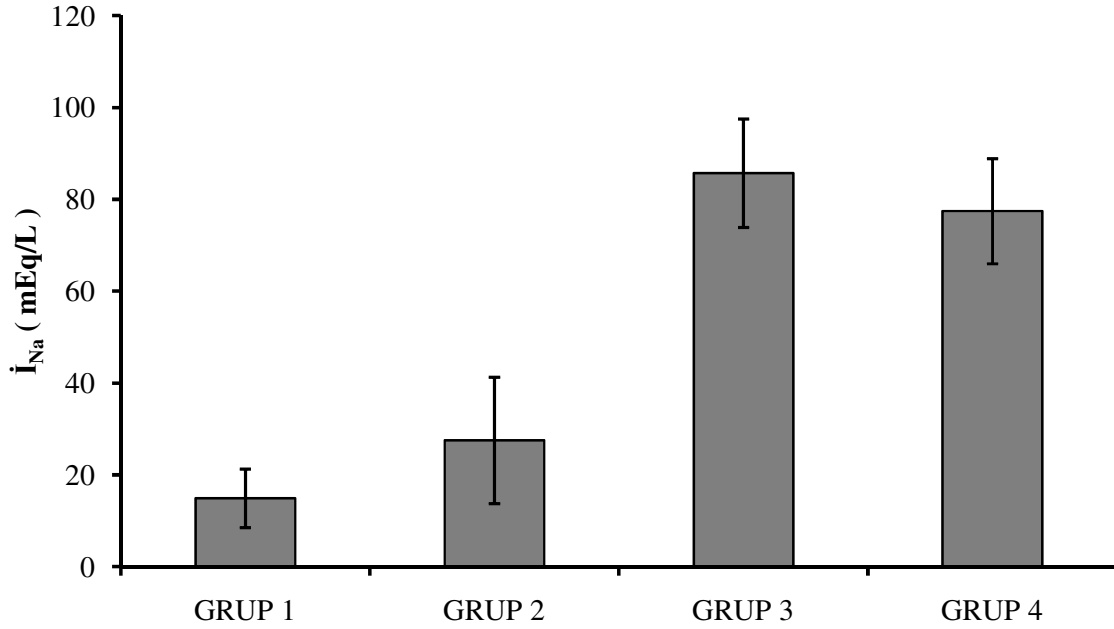


Şekil 12. Gruplara göre idrar kreatinin düzeylerinin dağılımı

Gruplar arası \dot{I}_{Na} düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p<0,001$). Gruplar arası \dot{I}_{Na} düzeyinde grup 1 ile grup 3 ve grup 4 düzeyinde anlamlı artma gözlemlendi. Diğer gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi ($p>0,05$). \dot{I}_{Na} düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi sonuçları Tablo 19’da ve gruplara göre idrar sodyum düzeylerinin dağılımı Şekil 13’te gösterildi.

Tablo 19. İdrar sodyum düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi sonuçları

	1. grup	2. grup	3. grup
2. grup	$p>0,05$		
3. grup	$p<0,001$	$p>0,05$	
4. grup	$p<0,001$	$p>0,05$	$p>0,05$

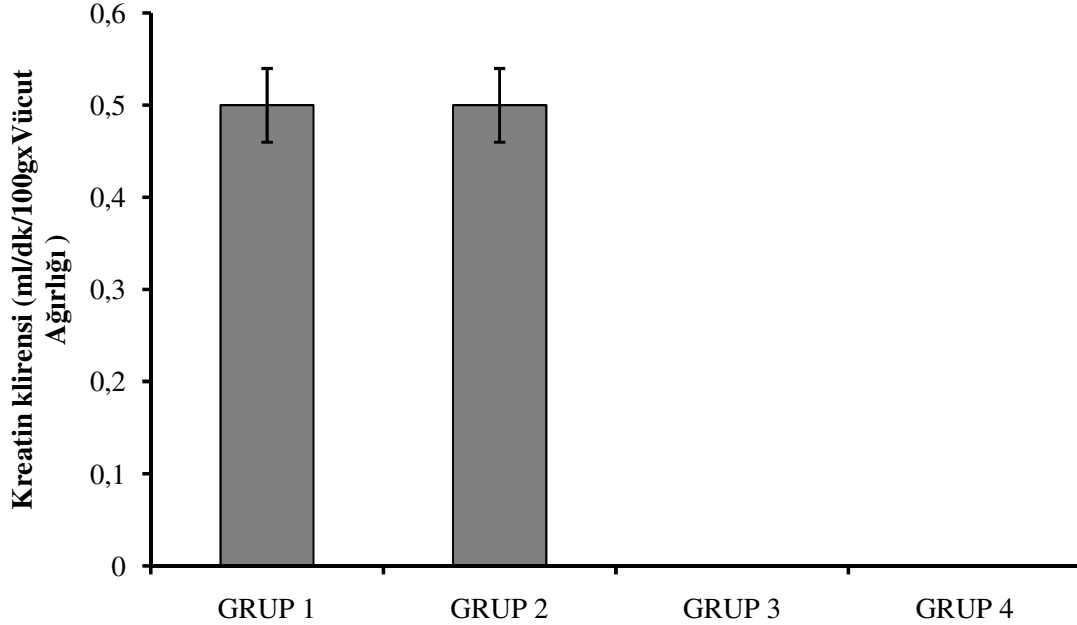


Şekil 13. Gruplara göre idrar sodyum düzeylerinin dağılımı

Gruplar arası kreatin klirensi düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p<0,001$). Gruplar arası kreatin klirensi düzeyinde grup 1 ile grup 3 ve grup 4, grup 2 ile grup 3 ve grup 4 arasında $p<0,001$ düzeyinde anlamlı azalma gözlemlendi. Diğer gruplar arasında anlamlı fark gözlemlenmedi ($p>0,05$). Kreatin klirensi düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi (Dunn's metodu) sonuçları Tablo 20'de ve gruplara göre kreatin klirensi düzeylerinin dağılımını Şekil 14'te gösterildi.

Tablo 20. Kreatin klirensi düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi (Dunn's metodu) sonuçları

	1. grup	2. grup	3. grup
2. grup	$p>0,05$		
3. grup	$p<0,001$	$p<0,001$	
4. grup	$p<0,001$	$p<0,001$	$p>0,05$

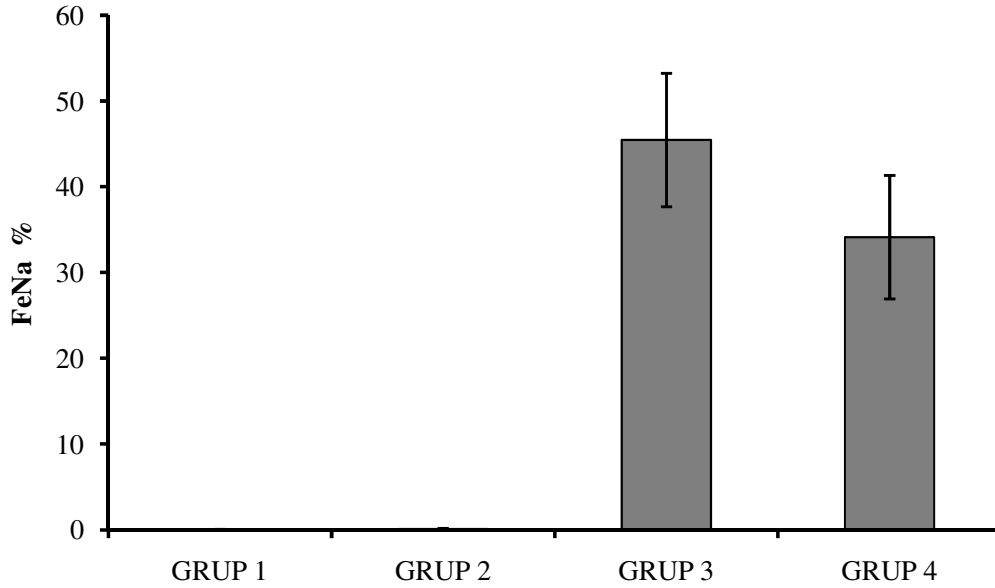


Şekil 14. Gruplara göre kreatin klirensi düzeylerinin dağılımı

Gruplar arası FeNa düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p < 0,001$). Gruplar arası FeNa düzeyinde grup 1 ile grup 3 ve grup 4, grup 2 ile grup 3 arasında $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı artma gözlemlendi. Diğer gruplar arasında anlamlı fark gözlemlenmedi ($p > 0,05$). FeNa düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi (Dunn's metodu) sonuçları Tablo 21'de ve gruplara göre FeNa dağılımı Şekil 15'te gösterildi.

Tablo 21. FeNa düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi (Dunn's metodu) sonuçları

	1. grup	2. grup	3. grup
2. grup	$p > 0,05$		
3. grup	$p < 0,001$	$p < 0,001$	
4. grup	$p < 0,001$	$p > 0,05$	$p > 0,05$



Şekil 15. Gruplara göre FeNa düzeylerinin dağılımı

Histopatolojik Sonuçlar

Çalışmamızda böbrek dokularının histopatolojik incelenmesinde; 100 alanda nekroz ve kast miktarı her bir sıçan için hesaplandı ve % nekroz ve % kast değerleri için her bir grubun ortalamaları hesaplanarak Tablo 22’de verildi.

Grup 1’deki sıçanların Hematoksilen-Eosin (HE) boyalı böbrek kesitleri ışık mikroskobunda incelendiğinde; hiçbirinde tübül içerinde hücre kastları (debris) görülmedi. Tübüllerde nekroz yoktu. Rejenerasyon yok denecek kadar azdı. Glomerüllerde herhangi bir değişiklik izlenmedi. Peritübüler stromada dem yanısıra kan damarlarında konjesyon mevcuttu. Tübül epitelinde minimal derecede hidropik şişme ve sitoplazmada vakuolizasyon dikkati çekti (şekil 16) .

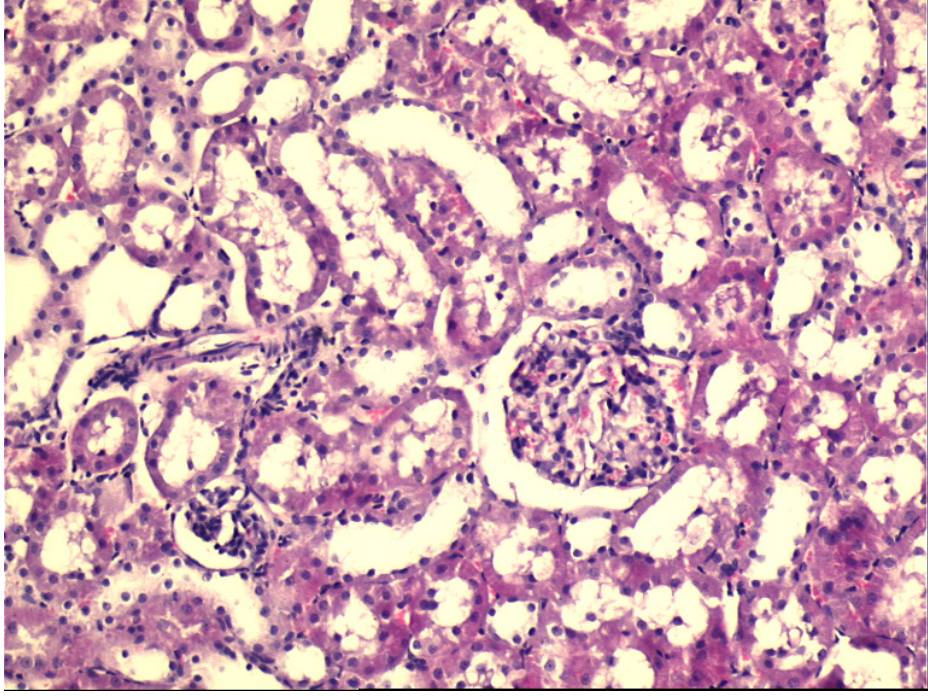
Grup 2’deki sıçanların HE boyalı böbrek kesitleri ışık mikroskobunda incelendiğinde; tübül içi hücre kast birikimine rastlanmadı. Glomerüllerde bir değişiklik göze çarpmadı. Tübüler hücre rejenerasyonu sağlıklı kontrole göre biraz daha belirgindi. Peritübüler stromada dem ve vasküler yapılarda konjesyon izlendi (şekil 17).

Grup 3’teki sıçanların HE boyalı böbrek kesitleri ışık mikroskobisinde incelendiğinde; tübül içi kast birikimi %12,4-21,6 arasında, ortalama %17,75 ve tübüler hücrelerde nekroz %30-50 arasında, ortalama %34,44 oranındaydı. Tübüllerde belirgin bir dilatasyon vardı. Tübül epitel hücrelerinde hidropik sitoplazmik şişme ve vakuolizasyon dikkati çekti. Glomerüllerde değişiklik görülmedi. Peritübüler stromada dem ve vasküler yapılarda konjesyon mevcuttu. Tübül epitel hücrelerinde rejenerasyon izlenmekteydi (şekil 18).

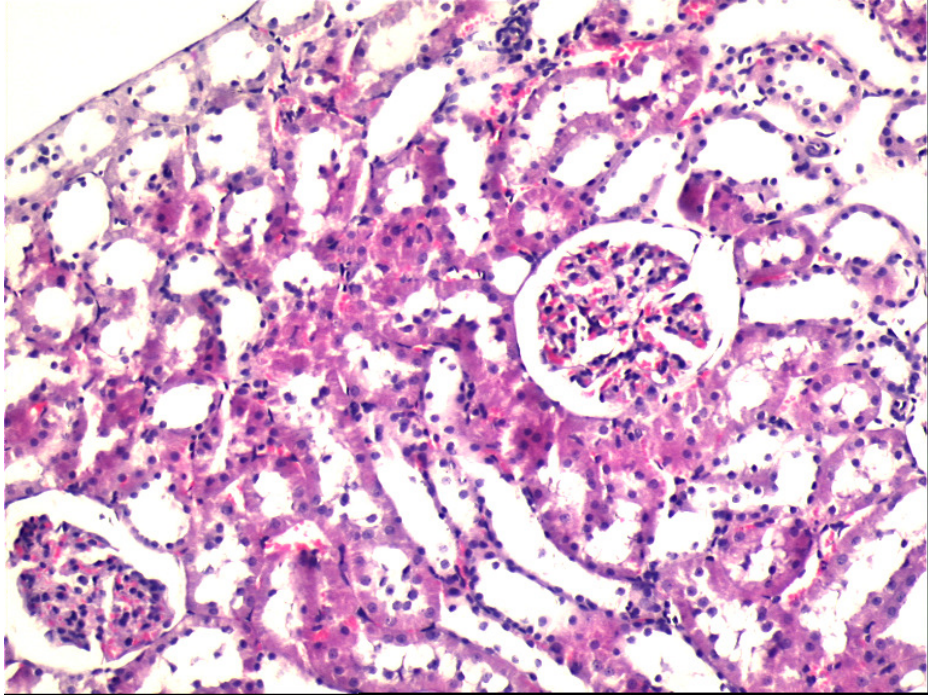
Grup 4’teki sıçanların HE boyalı böbrek kesitleri ışık mikroskobisinde incelendiğinde; tübül içi kast birikimi %8,4-21 arasında, ortalama %12,48 ve tübüler hücrelerde nekroz %10-30 arasında, ortalama %20 oranındaydı. Tübüllerde belirgin bir dilatasyon vardı. Tübül epitel hücrelerinde hidropik sitoplazmik şişme ve vakuolizasyon görüldü. Glomerüllerde değişiklik görülmedi. Peritübüler stromada dem ve vasküler yapılarda konjesyon mevcuttu. Tübül epitelinde rejenerasyon izlenmekteydi (şekil 19).

Tablo 22. Grupların histopatolojik nekroz ve kast miktarlarının % olarak değerleri

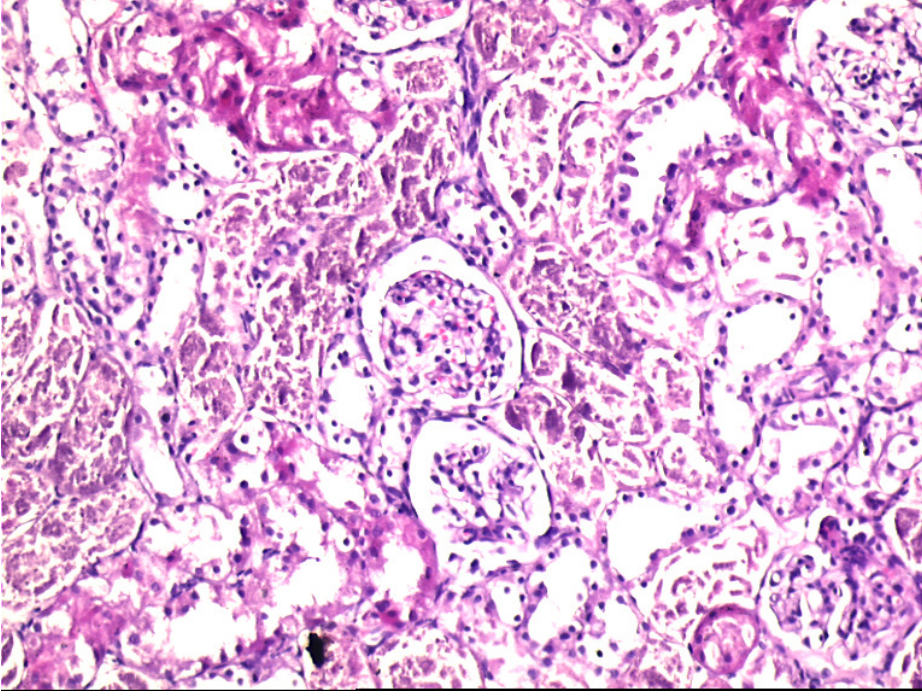
SN	1. grup		2. grup		3. grup		4. grup	
	Nekroz %	Kast %	Nekroz %	Kast %	Nekroz %	Kast %	Nekroz %	Kast %
1	0	0	0	0	30	12,4	20	13
2	0	0	0	0	50	21,1	30	21
3	0	0	0	0			30	15,1
4	0	0	0	0	40	19,4	20	11,7
5	0	0	0	0	30	21,6	10	8,4
6	0	0	0	0	30	21	15	10,8
7	0	0	0	0	30	15,27	20	10
8	0	0	0	0	30	20,1		
9	0	0	0	0	40	13,8	15	9,8
10	0	0	0	0	30	15,1		
Ort±SD	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	34,44±7,27	17,75±3,58	20,00±7,07	12,48±4,02



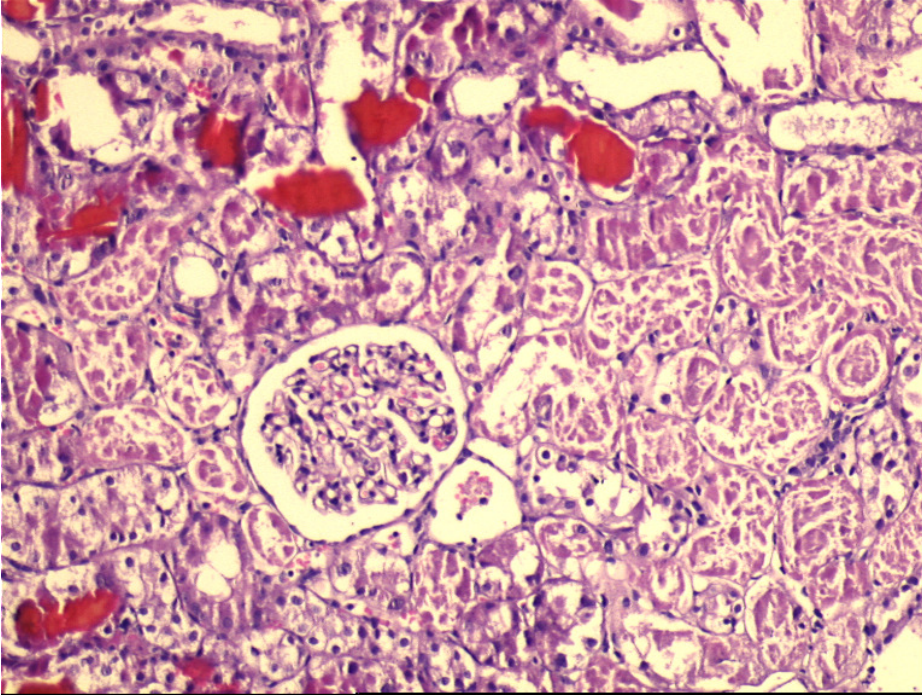
Şekil 16. 1.Grubun böbrek kesiti (HE x 100)



Şekil 17. 2. Grubun böbrek kesiti (HE x 100)



Şekil 18. 3. Gurubun böbrek kesiti (HEx100)



Şekil 19. 4. Grubun böbrek kesiti (HE x 100)

TARTIŞMA

Rabdomiyoliz kelime anlamı olarak çizgili kasın erimesi anlamına gelmektedir. Günlük kullanımda ise travmatik ve travma dışı nedenlere bağlı olarak iskelet kası hücrelerinin hasara uğraması ve daha sonra hücre içi elemanlarının sistemik dolaşıma geçerek klinik ve laboratuvar bulgularına yol açması anlaşılır. Travmanın yol açtığı rabdomiyoliz ve buna bağlı olarak gelişen cerrahi/medikal belirti ve bulguları içeren sistemik ve komplike tablo crush sendromu olarak adlandırılır (3).

Depremler sırasında ölümlerin en sık nedeni travmanın doğrudan etkisidir, ikinci sırada en sık görülen ölüm nedeni ise crush sendromu ve yol açtığı komplikasyonlardır. Bunların en önemlisi ise akut böbrek yetmezliği vakalarıdır. Miyoglobürik akut böbrek yetmezliği özellikle deprem felaketi sonrasında enkaz altından çıkarılan hastalarda sıklıkla görülmektedir (3,77,78). Felaketlerde crush sendromu insidansı %2-5 arasına kadar yükselebileceği bildirilmiştir. 1976 yılındaki Tangshan-Çin depreminde 3000, 1988 Ermenistan depreminde 600, 1999 Marmara depreminde 639 hastada gelişen crush sendromu nedeniyle mABY geliştiği rapor edilmiştir (18,24). Marmara depreminde böbrek problemi görülen 639 hastanın 477'si diyaliz tedavisi görmüştür ve 462 hasta diyaliz tedavisine muhtaç olmuştur (79).

Depremler sırasında travmaya bağlı ölümlere karşı yapılabilecek bir şey yoktur. Bu nedenle felaketler sonrasında can kaybını azaltmanın en etkin çaresi crush sendromu ve tedavisini iyi bilmektir. Ayrıca mevcut tedavi olanaklarının yanında yeni tedavi seçeneklerinin araştırmalarla desteklenmesi gerekir.

Rabdomiyoliz sonrası böbrek fonksiyonlarını bozan faktörleri ikiye ayırmak mümkündür. Bunlardan ilki böbrek kan akımını bozan ve hipoperfüzyona yol açan faktörler, ikincisi ise iskelet kaslarının hasarı sonrası ortaya çıkan miyoglobine bağlı olan etkilere (5). Deneysel mABY oluşturmak için en çok kullanılan ve kabul gören model sıçanlara hipertonic gliserolün im verilmesiyle oluşturulur. Bu model insanlarda gelişen mABY'nin deneysel modeli olarak kullanılmaktadır (16,27).

Rabdomiyolizde meydana gelen hem proteinlerinin oluşturduğu ATN hem proteinlerinin vazokonstriktif etkileri sonucu oluşan iskemiyle birlikte görülür. İskemik dokudaki oksidatif hasar mekanizmalarından birisi oksidanlara bağlı olarak iskemi süresince glutatyon miktarının tükenmesi ile ilişkilidir. İskemi sonucu glutatyonun tükenmesi nefrotoksinlerin vazokonstriktör etkilerini artırır (80). Ayrıca iskemik dokuda SOD, CAT ve GPx gibi enzimlerin inaktivasyonu da hızlanır. Bu durumda hücre reperfüzyon sırasında hızla oluşan oksijen radikallerinin etkisine daha duyarlı hale gelir (80).

Nebivolol anti-hipertansif bir ajan olmanın yanı sıra vazodilatör ve antioksidan etki gösteren β_1 adrenerjik reseptör antagonistidir. Nebivolol iki enantiyomerinin eşit miktarının rasemik bir karışımıdır. Bunlar, D-nebivolol (SRRR konfigürasyonu) ve L-nebivolol (RSSS konfigürasyonu)'dur. D izomeri β_1 reseptör blokaj özelliğinde L izomerine göre daha potenttir. Oysa L-nebivolol öncelikle endotel bağımlı vazodilatasyon özelliğinden sorumludur (8). Nebivolol vasküler düz kas hücrelerinin çoğalmasını inhibe etme yeteneğine sahiptir. Nebivololün bu özelliği doğal bir özelliği olan poliamin metabolizmasıyla etkileşime girebilmesiyle yakından ilişkilidir. Nebivololün sıçan aortik düz kas hücre çoğalmasını ve poliamin üretimini inhibe ettiği, trombosit agregasyonunu ve vasküler düz kas hücre proliferasyonunu inhibe ederek vasküler sistemi de NO aracılığıyla tromboz ve ateroskleroza karşı koruduğu rapor edilmiştir (63). Deneysel çalışmalarda nebivololün endotelial β_2 adrenerjik reseptör aracılı NO üretimi sağladığı veya ATP çıkışıyla P2Y-purinoseptörün stimülasyonu aracılı NO salınımı yoluyla vazodilatör etki ve sistemik antioksidan etki gösterdiği rapor edilmiştir. Farmakolojik konsantrasyonlarda nebivolol lipid hidroperoksit seviyelerinde doza bağımlı azalma sağlamıştır (66).

Reaktif oksijen türlerinde NADPH-oksidadz aracılı artışlar renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminin neden olduğu kardiyovasküler ve böbrek hastalıkları için önemli bir mediyatördür. Artan reaktif oksijen türleri NO biyoaktivitesini azaltabilir bu durum böbrekte renin-anjiyotensin-aldostren sisteminin aktivasyonunda kritik bir rol oynar. ROS yüksek düzeyde reaktif bir moleküldür ve eNOS'un aktivasyonunu azaltır. ROS'un artan doku

seviyeleri lokal olarak salınan NO'yu peroksinitrite dönüştürerek doku hasarına ve NO biyoyararlanımında azalmaya neden olur (69,81).

Nebivololün sağlıklı hayvanlarda etkisinin incelendiği; kas içi FS ve oral olarak nebivolol verilen 2. grup ile 1. grup parametreleri karşılaştırıldığında böbrek fonksiyon belirteçleri, oksidatif stres ve antioksidan parametreleri, doku ve idrar NO düzeylerinde ve histopatolojik bulgular arasında anlamlı farklılık olmadığı görüldü. Toprak ve ark. (9) kontrast madde vererek oluşturmuş oldukları nefropati çalışmalarında sağlıklı sıçanlara 2 mg/kg dozunda nebivolol verilmesinin kontrol grubuna göre böbrek fonksiyon parametreleri, NO ve oksidatif stres markerları arasında anlamlı fark olmadığı bildirilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları ile bizim çalışma sonuçlarımız benzerlik göstermektedir.

Kas içi gliserol uygulanarak miyoglobininürik ABY geliştirilen ve oral FS verilen 3. grup sıçanlarda, 1. grup ile karşılaştırıldığında MDA, $S_{üre}$, S_{krea} , düzeylerinde artma; CAT enzim aktivitesinde ve GSH düzeyinde arasında istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlemlendi. GPx ve SOD enzim aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı görüldü. 3. gruptaki sıçanların HE boyalı böbrek kesitleri ışık mikroskopisinde incelendiğinde; korteksteki proksimal tübül epitelinde yoğun nekroz görüldü (tübüler nekroz ortalama %34,44±7,27). Distal tübülde kast şeklinde dens proteinöz madde birikimi (tübüler kast ortalama %17,75±3,58) yoğun bir şekilde izlendi. Tübüllerde belirgin bir dilatasyon vardı. Distal tübül hücrelerinde hidropik sitoplazmik şişme ve vakuolizasyon dikkati çekti. Daha önce laboratuvarımızda yaptığımız çalışmalarda üre ve kreatinin düzeylerinin arttığı CAT, SOD, GPx enzim aktivitelerinin azaldığı; MDA düzeyinin arttığı görüldü. Ayrıca böbrek kesitlerinin ışık mikroskopundaki görüntülerinde yoğun şekilde tübüler nekroz ve kast görüldü. Çalışmamızın bu grubundaki bulgularımız daha önce laboratuvarımızda yapmış olduğumuz çalışmalar ile benzerlik göstermektedir (7,53,82,83). Chander ve ark. (42) gliserol enjeksiyonundan sonra böbrek glomerular fonksiyonlarının bir göstergesi olan üre ve kreatinin düzeylerinin arttığı CAT, SOD, GR enzim aktivitelerinin ve glutasyon düzeylerinde azalma olduğu, MDA düzeyinde anlamlı artma olduğu bildirilmiştir. Histolojik kesitlerde ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tübüler nekroz, hemorojik kast, hiyalin kast oluşumları olduğu gösterilmiştir. Singh ve ark. (84) gliserol enjeksiyonu ile oluşturulan ABY modelinde birçok çalışmada böbrek fonksiyonlarının bozulduğu lipid peroksidasyonun arttığı ve antioksidan kapasitenin azaldığı rapor edilmiştir. Huang ve ark. (85) tarafından gliserol vererek oluşturulmuş olan miyoglobininürik akut böbrek yetmezliğinde glomerüler filtrasyon hızının belirlenmesinde kullanılan inülin klirensinin anlamlı düzeyde azaldığı gösterilmiştir.

Kim ve ark. (86) bu modelde yapmış oldukları çalışmada glomerüler filtrasyon hızının belirlenmesinde kullanılan kreatinin klirensinin anlamlı düzeyde azaldığını bildirmişlerdir. Bu çalışmalarda elde edilen sonuçlar bizim çalışmamızda bu grupta elde ettiğimiz sonuçlar ile benzerlik göstermektedir. S_{Na} miktarında $p<0,001$ düzeyinde azalma, I_{Na} miktarında ve FeNa atılımında $p<0,001$ düzeyinde anlamlı artma görüldü. Çalışmamızda tübüler fonksiyonun bir belirteci olan FeNa'daki artış, önceki çalışmalarda olduğu gibi tübüler fonksiyonların bozulduğunu göstermektedir (87).

Çalışmamızda kas içi gliserol uygulanarak miyoglobürik ABY geliştirilen ve gliserol enjeksiyonundan 1 ve 24 saat sonra nebirolol verilen 4. grupta 48 saat dolmadan 2 sıçan gelişen komplikasyonlarla öldü. Bu grupta kalan 8 denekten elde edilen bulgularımız gruplar arasında istatistiksel olarak farklılığın olup olmadığını tespit etmek için Bonferroni düzeltmeli post hoc testi kullanıldı. Bu grupta antioksidan enzimlerin aktivitelerinde; MDA, NO, GSH, $S_{üre}$, S_{krea} düzeylerinde, idrar NO, ile kreatinin klirensi ve fraksiyonel sodyum atılımı 3. grup ile karşılaştırdığımızda anlamlı düzeyde fark olmadığı görüldü. 4. gruptaki sıçanların HE boyalı böbrek kesitleri ışık mikroskopisinde incelendiğinde; 3. gruba oranla proksimal tübül epitelinde nekroz ve distal tübülde proteinöz birikimlerde azalma görüldü (tübüler nekroz ortalama $\%20,00\pm7,07$, distal tübül proteinöz birikimleri ortalama $\%12,48\pm4,02$). Tübüllerde belirgin bir dilatasyon vardı. Tübüler hücrelerde hidropik sitoplazmik şişme ve vakuolizasyon görüldü. Glomerüllerde bir değişiklik görülmedi. Peritübüler stromada ödem ve vasküler yapılarda konjesyon mevcuttu.

Toprak ve ark. (9) sıçanlarda kontrast madde nefropatisinde nebirololün etkilerini araştırmışlardır. Kontrast madde nefropatisi; hastanede gelişen akut böbrek yetmezliğinin en sık görülen üçüncü nedenidir. Nebirololün renal nitrik oksit salgısını arttırması, renal plazma akımı ve glomerüler filtrasyon hızında artış sağlaması, renin anjiyotensin aldosteron sistemini baskılaması, anjiyotensin 2'nin inhibisyonu, endotelin-1 seviyesini azaltması ve antioksidan özelliğe sahip olması gibi özelliklerinden dolayı tercih edildiği rapor etmişlerdir. Toprak ve ark. (9) kontrast madde vererek oluşturmuş oldukları nefropati çalışmalarında; 2 mg/kg dozunda nebirolol verilmesinin nefropati oluşturulan grubun sonuçlarına göre medullar tıkanıklık, protein atılımı ve tübüler nekrozu azalttığı, sistemik ve renal oksidatif strese azalmaya yol açtığı, mikroproteinüride azalma ve böbrek nitrit seviyelerinde artışa neden olduğu rapor edilmiştir.

Sağ böbrek nefrektomisi yapılarak hipertansiyon oluşturulan sıçanlarda böbrek arterlerinde nebirolol tedavisinin vazodilatör etki gösterdiği, serum kreatinin ve üre

düzelelerinde anlamlı farklılığın olmadığı, idrar albumin atılımını anlamlı düzeyde azalttığı gösterilmiştir (88). Serum üre ve kreatinin düzeyinde anlamlı farklılık olmaması bizim sonuçlarımızla benzerlik göstermektedir. Kakoki ve ark.(89) nebivololün izole sıçan böbreğinde ve tuza duyarlı hipertansif sıçanların böbrek damarlarında NO düzeyini arttırarak vazodilatasyon oluşturduğu bildirilmiştir. Gandhi ve ark. (10) sağ nefrektomi yapılan sıçanlara 15 gün 10 mg/kg L-NAME ve 2 mg/kg dozunda nebivolol verildikten sonra sol böbrekte 45 dk iskemi 24 saat reperfüzyonu yapılmıştır. Bu çalışmada nebivolol verilen grupta serum üre ve kreatinin düzeylerinin anlamlı düzeyde azaldığı, TNF- α düzeyini ve miyeloperoksidaz enzim aktivitesini azalttığı, SOD enzim aktivitesini ve NO düzeyini arttırdığı rapor edilmiştir. Nebivolol, daha önceki böbrek hasarı oluşturulan modellerdeki çalışmaların çoğunda bu hasardan önce verilmiştir. Bizim çalışmamızda nebivololün gliserol enjeksiyonundan önce verilmesi klinik duruma uygun olmayacağı için, biz nebivololu gliserol enjeksiyonundan 1 saat sonra vermeyi uygun gördük.

Yukarıda özetlenen daha önce yapılmış çalışmalarda nebivololün birçok deneysel modelde koruyucu rol oynadığı bildirilmektedir. Ancak çalışmamızda elde edilen biyokimyasal ve histolojik bulgular ile nebivololün tedavisi verilen ABY grubu sıçanlarda yüksek oranda ölüm görülmesi nebivololonun miyoglobinürik ABY'inde iyileşme sağlamadığını ve hatta patogenezi daha da kötüleştirdiğini göstermektedir.

Hipertonik gliserolün im verilmesiyle oluşturulan miyoglobinürik ABY modelinde nebivololün etkisi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bizim çalışma sonuçlarımızın daha önce yapılan çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu olmaması; nebivololün dozu, verilmiş yolu, verilme zamanı, verilme sürelerindeki farklılıklar ve deneysel miyoglobinürik ABY oluşum mekanizmasında etkili faktörlerin diğer deneysel modellerden farklı olmasına bağlı olabilir. Ayrıca nebivololün etkileri uzun süreli verilmesinden sonra görülebilir.

Nebivololün farklı deneysel ABY modellerinde koruyucu rol oynadığı literatürde görülmektedir. Bizim çalışmamızda nebivololün deneysel miyoglobinürik ABY'nde iyileştirici etkisinin olmadığı ve hatta patogenezi daha da ağırlaştırdığı görülmüştür. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulguları literatür bilgileri ile birlikte değerlendirdiğimizde; nebivololün bu modeldeki olumsuz etkisinin görülmesinde birkaç faktör rol oynayabilir. Nebivololün kaslarda oluşan ödemi daha da arttırarak, hipovolemiyi şiddetlendirebileceğini düşünmekteyiz. Şiddetli hipovolemininde renal vazokonstriksiyonu arttırarak mABY

patogenezini daha da ağırlaştırdığını ve buna bağlı olarak nebivololün yararlı etkilerinin görölmediğini düşünmekteyiz.

Bütün bu bulgular ve gözlemler, deneysel miyoglobinürik ABY modelinde nebivololün tedavisi ile görölmeyen iyileşmenin hatta patogenezi kötüleştirmesinin mekanizmasını kesin olarak göstermede yetersiz kalmaktadır. Bu konuda nebivololün dozu, verilif yolu, verilme zamanı ve verilme sürelerinde yapılacak düzenlemeler ile renal kan akımı böbrek su ve sodyum tutulumunun periferik ödem oluşumunda etkisini araştıran daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğu düşüncesindeyiz.

SONUÇLAR

Çalışmamızda hipertonic gliserolün im verilmesiyle oluşturduğumuz miyoglobinürik ABY'de nebivololün antioksidan enzimler; MDA, NO, GSH düzeylerine, böbrek fonksiyonları ile histopatolojik değişiklikler üzerindeki etkilerini inceledik.

Sonuçlar incelendiğinde;

1. ve 2. grup arasında incelenen parametreler yönünden herhangi bir istatistiksel bir fark olmadığı görüldü.

1. ve 3. grup arasında MDA, S_{üre}, S_{krea} düzeylerinde artma; CAT enzim aktivitesinde ve GSH düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlemlendi. GPx ve SOD enzim aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü.

Çalışmamızda kas içi gliserol uygulanarak miyoglobinürik ABY geliştirilen ve gliserol enjeksiyonundan 1 ve 24 saat sonra nebivolol verilen 4. grupta 48 saat dolmadan 2 sıçan gelişen komplikasyonlarla öldü. Bu grupta antioksidan enzimlerin aktivitelerinde; MDA, NO, GSH, S_{üre}, S_{krea} düzeylerinde, idrar NO, ile kreatinin klirensi ve fraksiyonel sodyum atılımı 3. grup ile karşılaştırdığımızda anlamlı düzeyde fark olmadığı görüldü.

Bu sonuçlar ışığında, nebivololün hipertonic gliserolün im verilmesiyle oluşturulan miyoglobinürik ABY üzerindeki etkilerinin olumsuz olduğu görülmüştür. Nebivololün bu modelde oluşturduğu etkinin mekanizmasının açığa çıkarılması amacıyla daha kapsamlı ve ayrıntılı araştırmaların yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

ÖZET

DENEYSEL MİYOGLOBİNÜRİK AKUT BÖBREK YETMEZLİĞİNDE NEBİVOLOLÜN ETKİLERİ

Ayşegül İLHAN TARHAN

Miyoglobinürük akut böbrek yetmezliği iskelet kaslarının travmatik ya da travma dışı nedenlerle hasarlanması sonucu ortaya çıkan üremik bir sendromdur. Miyoglobinürük akut böbrek yetmezliği patogenezinde serbest radikallerin ve nitrik oksidin önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Nebivololün antihipertansif, antioksidan etki gösterdiği ve nitrik oksit düzeyini arttırdığı rapor edilmektedir. Bu çalışmada, nebivololün deneysel miyoglobinürük akut böbrek yetmezliğinde etkilerini araştırmayı amaçladık.

Çalışmamızda; Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'nda yetiştirilen, 240-300 gram ağırlığında 40 adet Wistar albino erkek sıçan kullanıldı. 1. ve 2. grup sıçanlar fizyolojik serum, diğer gruplar intramüsküler gliserol enjeksiyonundan 24 saat önce susuz bırakıldı. 1. ve 2. grup sıçanlara fizyolojik serum, 3. ve 4. gruptaki sıçanlara %50'lik gliserol solüsyonundan 10 ml/kg'a göre bulunan toplam hacim eşit miktarlarda her iki arka bacak kaslarına enjekte edildi. 1. ve 3. grup sıçanlara 1 ve 24 saat sonra distile su, 2. ve 4. grup sıçanlara 2 mg/kg dozunda nebivolol oral yolla verildi. Gliserol enjeksiyonundan 48 saat sonra sıçanların rompun-ketamin anestezisi altında kan ve böbrekleri alındı.

Böbrek dokusunda nitrik oksit, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz enzim aktiviteleri ile glutatyon, malondialdehit düzeyi; serumda üre, kreatinin, sodyum ve potasyum düzeyleri; idrarda nitrik oksit, kreatinin, sodyum düzeyleri ile böbrekte histopatolojik değişiklikler incelendi. Çalışmamızın bulguları sonucunda 3. ve 4. grup arasında süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz enzim aktivitelerinde; malondialdehit, nitrik oksit, glutatyon serum üre ve kreatinin düzeylerinde, idrar nitrik oksit ile kreatinin klirensi ve fraksiyonel sodyum atılımında anlamlı düzeyde fark olmadığı görüldü. Ayrıca 4. grupta 2 sıçan öldü. Bu sonuçlar göz önüne alındığında nebivololün mABY patogenezi üzerinde olumsuz etkilerinin olduğunu düşünüyoruz.

Anahtar Kelimeler: Nebivolol, Miyoglobinürik Akut Böbrek Yetmezliği, Serbest Radikaller, Nitrik oksit, Antioksidan Enzimler

SUMMARY

EFFECTS OF NEBIVOLOL ON EXPERIMENTAL MYOGLOBINURIC ACUTE RENAL FAILURE

Ayşegül İLHAN TARHAN

Myoglobinuric acute renal failure is an uremic syndrome which develops due to traumatic or non-traumatic causes to skeletal muscle. Free oxygen radicals and nitric oxide play a crucial role in the pathogenesis of myoglobinuric acute renal failure. Nebivolol has been reported to have some antihypertensive and antioxidant effects and increases nitric oxide levels. In this study, we aimed to investigate the effects of nebivolol on the experimental myoglobinuric acute renal failure.

In our study, 40 male Wistar Albino rats, 240-300 grams in weight, were used. The rats were randomly divided into 4 groups. After 24 hours water restriction in the diet, the rats in 1. groups and 2 received saline and those in 3. groups and 4, glycerol solution (50 %) were injected with at a ratio of 10 ml/kg in equal amounts in their hind limbs. One and 24 of

hours later, 1 and 3 groups received distilled water orally and 2. and 4 groups have taken 2 mg/kg nebivolol. 48 hours after the glycerol injection, the blood samples and kidneys of the rats were taken under the anesthesia with xylazine-ketamin. The enzyme activities of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase and the level of nitric oxide, glutathione and malondialdehit were determined in the kidney tissue. The levels of urea, creatinine, sodium and potassium were measured in the serum samples and the levels of urea, creatinine, sodium and nitric oxide were examined in the urine specimens. Histopathological changes were also studied.

As a result of our findings, there was no significant difference between 3rd and 4th group in the activities of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase; the level of nitric oxide, glutathione and malondialdehit, plasma urea and creatinine levels Beside, two not died in the 4th group When these results are taken into consideration, we think that the nebivolol may have some negative effects over myoglobinuric acute renal failure.

Key words: Nebivolol, Miyoglobinuric Acute Renal Failure, Free Radicals, Nitric oxide, Antioxidant Enzymes

KAYNAKLAR

1. Sever L. Akut Renal Yetersizlik ve Hipertansiyon. Sever L, Taştan Y (Editörler). Pediatrik Aciller. İstanbul: İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitim Etkinlikleri Sempozyum Dizisi Yayın No.26; 2001:177-85.
2. Giannoglou GD, Chatzizisis YS, Misirli G. The syndrome of rhabdomyolysis: pathophysiology and diagnosis. Eur J Intern Med 2007; 18:90-100.
3. Sever MŞ. Crush (ezilme) sendromu ve Marmara depreminden çıkarılan dersler. İstanbul: Türk Nefroloji Derneği Yayınları, 2002; 13-74.
4. Balcı V, Özgüç H, Akköse Ş, Kahveci N, Serdar Z, Tokyay R. Deneysel crush yaralanmada ringer laktat resusitasyonunun doku kan akımı ve oksidan hasara etkisi. Ulus Travma Derg 2003; 9(4):239-45.
5. Akpolat T, Ulaş C, Süleymanlar G. Nefroloji el kitabı. Nobel tıp kitabevleri 2000:249-71.
6. Onur Ö, Güneysel Ö, Eroğlu S, Denizbaşı A, Ünlüer E. Rabdomiyolize bağlı gelişen akut tübüler nekrozda kas kitlesinin önemi: olgu sunumu. Marmara Med J 2006; 19(1):30-2.
7. Aydogdu N, Atmaca G, Yalcin O, Taskiran R, Tastekin E, Kaymak K. Protective effects of L-Carnitine on myoglobinuric acute renal failure in rats. Clin Exp Pharmacol 2006; 33:119-24.
8. Evangelista S, Garbin U, Pasini AF, Stranieri C, Boccioletti V, Cominacini L. Effect of DL-nebivolol, its enantiomers and metabolites on the intracellular production of superoxide and nitric oxide in human endothelial cells. Pharmacol Res 2007; 55:303-9.
9. Toprak O, Cirit M, Tanrisev M, Yazici C, Canoz O, Sipahioglu M et al. Preventive effect of nebivolol on contrast-induced nephropathy in rats. Nephrol Dial Transplant 2008; 23:853-9.
10. Gandhi C, Zalawadia R, Balaraman R. Nebivolol reduces experimentally induced warm renal ischemia reperfusion injury in rats. Ren Fail 2008; 30:921-30.
11. Arık N. Akut böbrek yetmezliğinde tanımlamalar ve klinik değerlendirme. Arık N (Editör). Nefroloji. İstanbul: Deniz Yayıncılık, 2001; 155.

12. Guyton AC, Hall JE. Tıbbi fizyoloji. Ankara: Nobel tıp kitabevleri; 1996: 404-5.
13. Sever MS. Rhabdomyolysis. Acta Clin Belg 2007; 62 Suppl 2:375-9.
14. Lameire N. The pathophysiology of acute renal failure. Crit Care Clin 2005; 21:197-210.
15. Russell TA. Acute renal failure related to rhabdomyolysis: pathophysiology, diagnosis and collaborative management. Nephrol Nurs J 2000; 6(27):567-75.
16. Abbasi ZA, Hoffman A, Better OS. Acute renal failure complicating muscle crush injury. Semin Nephrol 1998; 18:558-65.
17. Sever MS. Doğal afetler sonucu oluşan Crush (ezilme) yaralanmaları: Marmara depremi deneyimi. Hamurhudan V, Öztürk R (Editörler). Türkiyede Sık Karşılaşılan Hastalıklar I. İstanbul: İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitim Etkinlikleri Sempozyum Dizisi Yayın No.55; 2007; 29-42.
18. Better OS. History of the crush syndrome: from the earthquakes of messina, sicily 1909 to spitak, Armenia 1988: Am J Nephrol 1997; 17:392-4.
19. Altintepe L, Güney İ, Tonbul HZ, Türk S, Mazı M, Ağca E ve ark. Konya'da Zümrüt apartmanı çökmesi sonucu oluşan "crush" sendromu olguları. Türk Nefrol Diyal Transplant Derg 2005; 14(1):18-22.
20. Richards JR. Rhabdomyolysis and drugs of abuse. J Emerg Med 2000; 19(1):51-6.
21. Beetham R. Biochemical investigation of suspected rhabdomyolysis. Ann Clin Biochem 2000; 37:581-7.
22. Keskin Ö, Kalemoglu M, Top C. Rabdomiyoliz. Sendrom 2002: 81-8.
23. Sever MŞ, Erek E, Vanholder R, Özener Ç, Yavuz M, Ergin H et al. The Marmara earthquake: admission laboratory features of patients with nephrological problems. Nephrol Dial Transplant 2002; 17:1025-31.
24. Sever MS, Lameire N, Vanholder R. Renal disaster relief: from theory to practice. Nephrol Dial Transplant 2009; 24:1730-5.
25. Criddle LM. Rhabdomyolysis: pathophysiology, recognition, and management. Crit Care Nurse 2003; 23:14-30.
26. Bywaters EGL, Beall D. Crush injuries with impairment of renal function. BMJ 1941; 1: 427-32.
27. Zager RA. Rhabdomyolysis and myohemoglobinuric acute renal failure. Kidney Int 1996; 49:314-26.
28. Visweswaran P, Guntupalli J. Rhabdomyolysis. Crit Care Clin 1999 April; 15(2):415-28.
29. İshuzuka S, Yano T, Hagiwara K, Sone M, Nihei H, Ozasa H et al. Extracellular signal-regulated kinase mediates renal regeneration in rats with myoglobinuric acute renal injury. Bioch Bioph Res Com 1999; 254:88-92.
30. Chatzizisis YS, Misirli G, Hatzitolios AI, Giannoglou GD. The syndrome of rhabdomyolysis: complications and treatment. Intern Med 2008; 19:568-74.
31. Malinoski DJ, Slater MS, Mullins RJ. Crush injury and rhabdomyolysis. Crit Care Clin 2004; 20:1-14.
32. Erbaş D. Nitrik oksit: fizyolojik önemi ve çeşitli hastalıklardaki rolü. Klin Geliş 1998; 11:376-80.

33. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43(2):109-42.
34. Boucher JL, Moali C, Tenu JP. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *CMLS* 1999; 55:1015-28.
35. Çekmen MB, Turgut M, Türköz Y, Aygün D, Gözükara E. Nitrik Oksit (NO) ve Nitrik Oksit Sentaz (NOS)'ın Fizyolojik ve Patolojik Özellikleri. *T Klin Pediatri* 2001; 10:226-36.
36. Karataş Y. Endotel ve Nitrik oksit (NO). Şan M (Editör). 5000. İstanbul: Printaş Basım; 2005. P.33-50.
37. Sharma SP. Nitric oxide and the kidney. *Indian J Nephrol* 2004; 14:77-84.
38. Filippin LI, Moreira AJ, Marroni NP, Xavier RM. Nitric oxide and repair of skeletal muscle injury. *Nitric oxide* 2009; 21:157-63.
39. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*.2001; 357:593-615.
40. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 1993; 268:12231-4.
41. Çıtak EÇ, İleri T. Nitrik oksitin böbrek fonksiyonları ve hastalıklarından yeri. *T Klin Pediatri* 1999; 8:98-105.
42. Chander V, Chopra K. Molsidomine, a nitric oxide donor and L-arginine protects against rhabdomyolysis-induced myoglobinuric acute renal failure. *Biochim Biophys Acta* 2005; 25:1723(1-3):208-14.
43. Mount PF, Power DA. Nitric oxide in the kidney: functions and regulation of synthesis. *Acta physiol* 2006; 187:433-46.
44. Raij L. Nitric oxide and cardiovascular and renal effects. *Osteoarthr Cartil* 2008; 16:21-6.
45. Konukoğlu D. Serbest radikaller ve önemi. *Aile Hekimliği Dergi* 1997; 1(4):197-200.
46. Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Y.Y.Ü. Vet Fak Derg* 2004; 15(1-2):91-6.
47. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. *Konya: Mimoza yayınları*, 1995: 1-73.
48. Baykal Y, Gök F, Erikçi S. Demir, serbest radikaller ve oksidatif hasar. *Sendrom* 2002:94-100.
49. Şener G, Yeğen BÇ. İskemi ve reperfüzyon Hasarı. *Klinik Geliş* 2009; 22(3):5-13.
50. Bilezikçi B, Haberal N. Serbest radikal teorisi ve yaşlanma. *Sendrom* 2000; 12:59-62.
51. Şimşek F. Serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar ve lipid peroksidasyonu. *T Klin Pediatri* 1999; 8:42-7.
52. Pourova J, Kottova M, Voprsalova M, Pour M. Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes. *Acta Physiol* 2010; 198:15-35.
53. Aydoğdu A. Deneysel Miyoglobürik Akut Böbrek Yetmezliğinde eksojen melatoninin böbrek fonksiyonuna etkisi (tez). *Edirne: TÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü*; 2003.
54. Tekkes Y. Streptozotosin ile diabet oluşturulmuş farelerde aspirin ve E vitamininin dokularda lipid peroksidasyonu ve antioksidan sisteme etkisinin araştırılması (tez). *Kahramanmaraş: Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*; 2006.

55. Kayabaşı H. Son dönem böbrek yetersizliği hastalarında Losartan ve Nebivolol'ün Oksidatif Stres üzerine olan etkilerinin karşılaştırılması (tez). Diyarbakır: Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2007.
56. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. Türk Nefrol Diyal Transplant Derg 1997; 3-4:92-5.
57. Erden M. Serbest radikaller. T Klin Tıp Bilim Derg 1992; 12:201-7.
58. Yarsan E. Lipid peroksidasyon olayı ve önlenmesine yönelik uygulamalar. Y.Y.Ü. Vet Fak Derg 1998; 9(1-2):89-95.
59. Yerer MB, Aydoğan S. Oksidatif stres ve antioksidanlar. Erciyes Üniv Sağlık Bilim Derg 2000; 9(1):49-53.
60. Seven A, Candan G. Antioksidan savunma sistemleri. Cerrahpaşa Tıp Derg. 1996; 27:41-50.
61. Yalçın AS. Antioksidanlar: Klin Geliş 1998; 11: 342-6.
62. Veverka A, Nuzum DS, Jolly JL. Nebivolol: a third-generation β -adrenergic blocker. Ann Pharmacother 2006; 40:1353-60.
63. Kavak SB. İzole sıçan miyometriyumunda spontan, oksitosin, ve prostaglandin F2 Alfa ile indüklenmiş kasılmalar üzerine nebivololün etkileri (tez). Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fak; 2005.
64. Münzel T, Gori T. Nebivolol the Somewhat-Different β -Adrenergic Reseptor Blocker. J Am Coll Cardiol 2009; 54:1491-9.
65. Ignarro LJ, Byrns RE, Trinh K, Sisodia M, Buga GM. Nebivolol: a selective β_1 -adrenerjik receptor antagonist that relaxes vascular smooth muscle by nitric oxide- and cyclic GMP-dependent mechanisms. Nitric oxide 2002; 7:75-82.
66. Troost R, Schwedhelm E, Rojczyk S, Tsikas D, Frölich JC. Nebivolol decreases systemic oxidative stress in healthy volunteers. Br J Clin Pharmacol 2000; 50:377-9.
67. Sule SS, Frishman W. Nebivolol: new therapy update. Cardiol Rev 2006; 14:259-64.
68. Ignarro LJ, Sisodia M, Trinh K, Bedrood S, Wu G, Wei LH, Buga GM. Nebivolol inhibits vascular smooth muscle cell proliferation by mechanisms involving nitric oxide but not cyclic GMP. Nitric oxide 2002; 7:83-90.
69. Mason RP, Kubant R, Jacob RF, Walter MF, Boychuk B, Malinski T. Effect of nebivolol on endothelial nitric oxide and peroxynitrite release in hypertensive animals: role of antioxidant activity. J Cardiovasc Pharmacol 2006; 48:862-9.
70. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RI. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193:265-75.
71. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979; 95:351-8.
72. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. Arch Biochem Biophys 1959; 82:70-7.
73. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Chem 1988; 34:497-550.
74. Aebi H. Catalase invitro assay methods. Methods Enzymol 1984; 105:121-6.
75. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative charecterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med 1967; 70:158-69.

76. Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990; 36:1440-3.
77. Vanholder R, Sever MS, Smet MD, Ereğ E, Lameire N. Intervention of the renal disaster relief task force in the 1999 Marmara, Turkey earthquake. *Kidney Int* 2001; 59:783-91.
78. Sever MS, Ereğ E, Vanholder R, Akoglu E, Yavuz M, Ergin H et al. The Marmara earthquake: epidemiological analysis of the victims with nephrological problems. *Kidney Int* 2001; 60(3):1114-23.
79. Vanholder R, Sever MŞ, Ereğ E, Lameire N. Rhabdomyolysis. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 1553-61.
80. Nath KA, Norby SM. Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am J Med* 2000; 109:655-78.
81. Connel AW, Habibi J, Johnson M, Tilmon R, Rehmer N, Rehmer J et al. Nebivolol Reduces Proteinuria and Renal NADPH Oxidase- Generated Reactive oxygen Species in the transgenic Ren2 Rat. *Am J Nephrol* 2009; 30:354-60.
82. Gürel EE. Sıçanlarda deneysel miyoglobininürük akut böbrek yetmezliğinde sarımsağın etkileri (tez). Edirne: TÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2008.
83. Aydogdu N, Atmaca G, Yalcin O, Batçioğlu K, Kaymak K. Effects of caffeic acid phenethyl ester on glycerol-induced acute renal failure in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004; 31(9):575-9.
84. Singh D, Chander V, Chobra K. Carvedilol, an Antihypertensive Drug with Antioxidant Properties, Protects against Gliserol- İnduced Acute Renal Failure. *Am j Nephrol* 2003; 23:415-421.
85. Huang Z, Murakami T, Okochi A, Yumoto R, Nagai J, Takano M. Expression and function of P-glycoprotein in rats with glycerol-induced acute renal failure. *Eur J Pharmacol* 2000; 406:453-60.
86. Kim HY, Yokozawa T, Nakagawa T, Sasaki S. Protective effect of γ -aminobutyric acid against glycerol-induced acute renal failure in rats. *Food Chem Toxicol* 2004; 42:2009-14.
87. Rodrigo R, Bosco C, Herrera P, Rivera G. Amelioration of myoglobinuric renal damage in rats by chronic exposure to flavonol-rich red wine. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 1-8.
88. Gschwend S, Haug MB, Nierhaus M, Schulz A, Vetter R, Kossmehl P et al. Short-term treatment with a beta-blocker with vasodilative capacities improves intrarenal endothelial function in experimental renal failure. *Life Sci* 2009 9; 85(11-12):431-7.
89. Kakoki M, Hirata Y, Hayakawa H, Nishimatsu H, Suzuki Y, Nagata D et al. Effect of vasodilatory β -adrenoceptor antagonists on endothelium-derived nitric oxide release in rat kidney. *Hypertension* 1999; 467-71.

RESİMLEMELER LİSTESİ

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Gruplara göre malondialdehit düzeyleri dağılımı	42
Şekil 2: Gruplara göre glutatyon düzeyleri dağılımı	43
Şekil 3: Gruplara göre NO düzeylerinin dağılımı	44
Şekil 4: Gruplara göre süperoksit dismutaz düzeylerinin dağılımı	45
Şekil 5: Gruplara göre katalaz düzeylerinin dağılımı	46
Şekil 6: Gruplara göre glutatyon peroksidaz düzeyleri dağılımı	47
Şekil 7: Gruplara göre serum üre düzeyleri dağılımı	48
Şekil 8: Gruplara göre serum kreatinin düzeyleri dağılımı	49
Şekil 9: Gruplara göre serum sodyum düzeylerinin dağılımı	50
Şekil 10: Gruplara göre serum potasyum düzeylerinin dağılımı	51
Şekil 11: Gruplara göre idrar NO düzeylerinin dağılımı	52
Şekil 12: Gruplara göre idrar kreatinin düzeylerinin dağılımı	53
Şekil 13: Gruplara göre idrar sodyum düzeylerinin dağılımı	54
Şekil 14: Gruplara göre kreatin klirensi düzeylerinin dağılımı	55
Şekil 15: Gruplara göre FeNa düzeylerinin dağılımı	56
Şekil 16: 1. Grubun böbrek kesiti (HEX100)	59
Şekil 17: 2. Grubun böbrek kesiti (HEX100)	59
Şekil 18: 3. Grubun böbrek kesiti (HEX100)	60
Şekil 19: 4. Grubun böbrek kesiti (HEX100)	60

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: SOD tayin yöntemi	31
Tablo 2: Grup 1'in biyokimyasal verileri	37
Tablo 3: Grup 2'nin biyokimyasal verileri	38
Tablo 4: Grup 3'ün biyokimyasal verileri	39
Tablo 5: Grup 4'ün biyokimyasal verileri	40
Tablo 6: Çalışma gruplarının değişkenlerine ait istatistiksel verileri	41
Tablo 7: Malondialdehit düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi sonuçları	42
Tablo 8: Glutasyon düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi sonuçları	43
Tablo 9: NO düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi sonuçları	44
Tablo 10: Süperoksit dismutaz düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi sonuçları	45
Tablo 11: Katalaz düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi sonuçları	46
Tablo 12: Glutasyon peroksidaz düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi sonuçları	47
Tablo 13: Serum üre düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi (Dunn's metodu) sonuçları	48
Tablo 14: Serum kreatinin düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi (Dunn's metodu) sonuçları	49
Tablo 15: Serum sodyum düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi (Dunn's metodu) sonuçları	50
Tablo 16: Serum potasyum düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi sonuçları	51
Tablo 17: İdrar NO düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi sonuçları	52
Tablo 18: İdrar kreatinin düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi (Dunn's metodu) sonuçları	53
Tablo 19: İdrar sodyum düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi sonuçları	54
Tablo 20: Kreatin Klirensi Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi (Dunn's metodu) sonuçları	55
Tablo 21: FeNa düzeylerinin Bonferroni düzeltilmeli post hoc testi (Dunn's metodu) Sonuçları	56
Tablo 22: Grupların histopatolojik nekroz ve kast miktarlarının % olarak değerleri	58

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Elazığ'ın Baskil ilçesinde doğdum. İlk öğrenimime İstanbul'da Yahya Kemal Beyatlı ilkokulunda başladım, orta öğrenimimi Edirne Yüksel Yeşil İlköğretim okulunda, lise öğrenimimi Edirne İlhami Ertem Süper Lisesi'nde, Yüksek öğrenimimi ise İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde tamamladım.

2007 Güz yarıyılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım.

EKLER

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Oturum Sayısı: 6

Karar Tarihi: 09.06.2008

KARAR NO: 2008/06.02

Yürütücülüğünü Tıp Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Nurettin AYDOĞDU'nun yatığı ve Yüksek Lisans Öğr. Bio. Ayşegül İLHAN'nın tezi olarak planlanan TÜHDYEK-2008/024 protokol nolu "Deneysel Miyoglobülin Akut Böbrek Yetmezliğinde Nebivolol'ün Etkileri" başlıklı çalışma hakkında görüşüldü, araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemler dikkate alınarak incelenmesi sonucunda: Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına ve çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Ünvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlişki	Toplantı Katılımı	İmza
Doç. Dr. Gülay DURMUŞ-ALTUN Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi -Başkan	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç. Dr. Hayati ARDA Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input checked="" type="checkbox"/> hayır	Katılmadı
Vet.Hek. Ziya ÇUKUR Veteriner Hekim	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Hüseyin KOÇ Sivil Toplum Örgütü Üyesi Sivi Üye	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
İlyas ÖZMEN Sivil Üye	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. Beytullah ÖZKAN Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. Burhan AKSU Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input checked="" type="checkbox"/> hayır	Katılmadı
Yrd.Doç.Dr. S. Arzu VARDAR Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input checked="" type="checkbox"/> hayır	İzmitli
Doç. Dr. Nilda TURGUT Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. Ruşen COŞAR-ALAŞ Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input checked="" type="checkbox"/> hayır	Katılmadı