



T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DENEYSEL BÖBREK İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINDA
KAFEİNİN OKSİDAN-ANTIOKSİDAN SİSTEM ÜZERİNE
ETKİLERİ

Dr. Oğuzhan ŞAYLAN

UZMANLIK TEZİ

TOKAT
2011



T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DENEYSEL BÖBREK İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINDA
KAFEİNİN OKSİDAN-ANTIOKSİDAN SİSTEM ÜZERİNE
ETKİLERİ

Dr. Oğuzhan ŞAYLAN

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Şemsettin ŞAHİN

TOKAT

2011

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim süresince ve tez çalışmalarım sırasında bilgilerini ve deneyimlerini paylaşarak her türlü desteği sağlayan tez danışmanım ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı sayın Doç.Dr. Şemsettin ŞAHİN'e, ihtisas süresince ve çalışmalarım esnasında yardımlarını gördüğüm anabilim dalımızın değerli öğretim üyeleri, sayın Doç. Dr. Hüseyin ÖZYURT'a, sayın Yard. Doç. Dr. Erkan SÖĞÜT'e, birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma ve çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı çalışanlarına, ayrıca tezime yardımlarından ve katkılarından dolayı Fizyoloji Anabilim Dalından Doç. Dr. Fatih EKİCİ'ye ve Üroloji Anabilim Dalından Dr. Fatih FIRAT'a

Tez hazırlık sürecinde tecrübelerinden faydalandığım ve her konuda bana destek olan Uzm. Dr. Ali AKBAŞ'a teşekkür ederim.

Dr. Oğuzhan ŞAYLAN

ÖZET

Kafein yiyecek ve içeceklerde yaygın olarak bulunan bir pürin alkoloitidir. Günümüzde her gün düzenli olarak tüketilen kahve, çay, kola, çikolata ve bazı gazlı içecekler kafein içerirler. Çalışmanın temel hedefi olarak, iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulan rat böbreklerinin, oksidan antioksidan sistemi üzerine kafeinin etkisinin araştırılması belirlendi. Çalışmaya alınan tüm sıçanların böbrek dokularından ve serumlarından lipid peroksidasyon ürünü olan MDA ve protein oksidasyon ürünü olan PC düzeyleri ölçüldü. Ayrıca, kafeinin antioksidan özelliğini incelemek için, enzimatik ve non-enzimatik antioksidan sistem üzerinde araştırmalar yapıldı. Böbrek dokularından ve serumlarından SOD, GSH-Px, katalaz aktiviteleri ve NO düzeyleri ölçüldü. Çalışmada 32 adet (300-350 gr ağırlığında) Wistar türü albino erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar dört eşit gruba ayrıldı. Grup I: Kontrol grubuydu. Grup II: İ-R+distile su, Grup III: İ-R+15 mg/kg kafein, Grup IV: İ-R+45 mg/kg kafein uygulanan gruplardı. Çalışmanın sonuçları, deney yapılan sıçanlarda, farklı dozlarda uygulanan kafeinin böbrek dokusu ve serumlarında MDA düzeylerini azalttığını, PC düzeylerini ise arttırdığını göstermektedir. Kafeinin sıçan böbrek dokusu ve serumlarının SOD enzim düzeyine etkisi görülmemiş, yüksek dozunda GSH-Px enzim düzeyinde düşme, katalaz enzim düzeyinde artış gibi antioksidan enzimler üzerine istatistiksel olarak anlamlı etkileri bulunmuştur. NO düzeyleri incelendiğinde, kafeinin artan dozuna paralel NO düzeyinde anlamlı artış olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlara göre kafeinin çalışma dozlarında, lipitler üzerine antioksidan, proteinler üzerine ise oksidan etkileri olduğunu söyleyebiliriz. Kafeinin oksidan ve antioksidan olarak farklı etki dozlarının belirlenmesinde, etki mekanizmalarının anlaşılmasında ileri hayvan ve insan çalışmalarının gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Böbrek, iskemi-reperfüzyon, oksidatif stres, kafein

ABSTRACT

Caffeine is a purine alkaloid widely found in foods and beverages. Several beverages such as coffee, tea, coke and also chocolate are widely consumed and contain caffeine. The main aim of the study was to investigate the effect of caffeine on the oxidant antioxidant system of rat kidneys in which ischemia reperfusion injury was induced. Levels of MDA, a lipid peroxidation product and PC, a protein oxidation product were measured from kidney tissue samples and serum of all the rats included in the study. Also investigations were carried out involving the enzymatic and non-enzymatic antioxidant system to study the antioxidant property of caffeine. SOD, GSH-Px, catalase activities and NO levels were measured from kidney tissues and serum. 32 (of 300-350 gr weight) Wistar albino male rats were used. The rats were separated into four equal groups. Group I: Control group, group II: I-R + distilled water, group III: I-R + 15 mg/kg caffeine, group IV: I-R + 45 mg/kg caffeine. The results of the study showed that caffeine given in different amounts reduced MDA levels and increased PC levels in kidney tissues and serum. Caffeine showed no effect on kidney tissue and serum SOD enzyme level, GSH-Px enzyme levels were decreased with high dosage and catalase enzyme levels were increased; these findings were statistically significant. A parallel increase to the caffeine dosage was seen in NO levels. According to the results of this study, caffeine showed antioxidant effects on lipids and oxidant levels on proteins in study doses. We believe that further animal and human studies are necessary to determine the different effect doses of caffeine as an oxidant and antioxidant agent.

Keyword: Kidney, ischemia-reperfusion, oxidative stress, caffeine

İÇİNDEKİLER

Sayfa		
TEŞEKKÜR		iii
ÖZET		iv
İNGİLİZCE ÖZET		v
KISALTMALAR		vii
ŞEKİLLER DİZİNİ		ix
TABLOLAR DİZİNİ		x
GRAFİKLER DİZİNİ		xi
RESİMLER DİZİNİ		xii
1. GİRİŞ		1
2. GENEL BİLGİLER		2
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER		29
4. BULGULAR		41
5. TARTIŞMA		53
6. SONUÇ		62
7. KAYNAKLAR		63

KISALTMALAR

ABY	: Akut böbrek yetmezliği
ADA	: Adenozin deaminaz
BSA	: Bovine serum albumin
cAMP	: Siklik adenozin mono fosfat
CAT	: Katalaz
CRP	: C-reaktif protein
CYP1A ₂	: Sitokrom P4501A ₂
GFH	: Glomerüler filtrasyon hızı
GH	: Growth hormon
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GSH-R	: Glutasyon redüktaz
GSSG	: Okside glutasyon
GST	: Glutasyon-S-Trasferaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
IL-1	: İnterlökin-1
IL-6	: İnterlökin-6
iNOS	: Aktif nitrik oksit sentaz
İ-R	: İskemi-reperfüzyon
LOOH [*]	: Lipit hidroperoksit
MDA	: Malondialdehit
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NAT	: N-asetiltransferazın
NBT	: Nitroblue tetrazoliumu
NNDA	: N-naftiletilen diamin
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
OD	: Optik dansite
ONOO [*]	: Peroksinitrit

PAF	: Platelet-aktive edici faktör
PARP	: Poli (ADP-Riboz) Polimeraz
PC	: Protein karbonil
PPAR	: Peroksizom Proliferator Aktive Edici Reseptör
ROR	: Reaktif oksijen radikalleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
TNF- α	: Tümör nekroz faktör alfa
TSH	: Tiroid uyarıcı hormon
T ₄	: Tiroksin

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
1. Böbrek pelvisinin anatomik yapısı	4
2. Nefron yapısı	5
3. Böbrek damar sistemi görülmektedir	7
4. Hücre mitokondrisindeki radikal oluşumu	14
5. Kafeinin moleküler yapısı	22
6. Kafeinin metabolitleri	24

TABLÖLAR

Tablo	Sayfa
1. Oksijen ve azot kaynaklı reaktif bileşikler	13
2. Organizmada bulunan antioksidan sistem elemanları	16
3. Serbest radikallerle ilişkili bazı patolojik durumlar	18
4. Doğal ve endüstriyel ürünlerde bulunan kafein miktarları	23
5. Adenozin analogları ve kafeinin farmakolojik etkileri	26
6. Doku SOD Aktivitesi (Ortalama±standart hata)	41
7. Doku GSH-Px Aktivitesi (Ortalama±standart hata)	42
8. Doku Katalaz Aktivitesi Düzeyleri (Ortalama±standart hata)	43
9. Doku NO Düzeyleri (Ortalama±standart hata)	44
10. Doku MDA Düzeyleri (Ortalama±standart hata)	45
11. Doku PC Düzeyleri (Ortalama±standart hata)	46
12. Serum SOD Aktivitesi (Ortalama±standart hata)	47
13. Serum GSH-Px Aktivitesi (Ortalama±standart hata)	48
14. Serum NO Düzeyleri (Ortalama±standart hata)	49
15. Serum MDA Düzeyi (Ortalama±standart hata)	50
16. Serum PC Düzeyi (Ortalama±standart hata)	51
17. Serum Kreatinin Düzeyleri (Ortalama±standart hata)	51

GRAFİKLER

Grafik	Sayfa
1. Doku Katalaz Enzim Düzeyleri	43
2. Doku MDA Düzeyleri	45
3. Doku PC Düzeyleri	46
4. Serum GSH-Px Aktivitesi	48
5. Serum NO Düzeyleri	49
6. Serum Kreatinin Düzeyleri	52

RESİMLER

Resim	Sayfa
1. Sıçanlara oral distile su ve kafein uygulaması	29
2. Sağ böbrek nefrektomi uygulaması	30
3. Sol böbreğin iskemi başlangıcında ve sonunda ki görüntüsü	30

1. GİRİŞ

Beslenmede oldukça sık tüketilen, önemli bir uyarıcı ve bilimsel adı 1, 3, 7 trimethylxanthine olan kafeinin sağlık üzerine olumlu ya da olumsuz etkileri, son yılların en çok araştırılan ve tartışılan konularından biridir. Kafein doğal olarak pek çok bitkinin tohumunda, meyvesinde ve yaprağında bulunur. Bununla beraber en bilinen kaynakları kahve, çay yaprakları ve kakao çekirdekleri ile kola tohumlarıdır (1,2). Kafein tüketimi; kafeinin kaynağı, kafeini tüketen kişinin cinsiyeti, yaşı, beslenme durumu, alışkanlıkları ve iklim gibi birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir (3). Kas ve sinirleri uyarıcı, metabolik hızı arttırıcı ve mide salgısını uyarıcı etki yaptığı, orta düzeyde alınan kafeinin iştah arttırıcı, uyuşukluk ve zihin yorgunluğunu giderici etkisi bilinmektedir (4,5). Diüretik (idrar söktürücü) etki, kafeinin en çok ve en uzun süre araştırılan etkilerinden biridir (6). Sağlıklı kişilerde, 300 mg/gün'den fazla alınan kafeinin, diürezi akut olarak arttırdığı, beraberinde kalsiyum, potasyum, magnezyum, sodyum ve klor atılımını da arttırdığı belirlenmiştir (7). Orta düzeyde alınan kafeinin, diüreze ve kronik dehidrasyona neden olmadığı bildirilmektedir (6).

İskemi (kan akımının kesilmesi) ve bunu takiben reperfüzyon (kan akımının yeniden sağlanması) organ ve dokularda karakteristik bir hasara neden olur. İskemi, doku ve organların normal fizyolojik işlevlerini devam ettirmesi ve yaşaması için gerekli olan oksijenin alınmasını engeller. Oksijenlenmiş kanın hızlı bir şekilde dönüşü (reperfüzyonu) iskemik hücre ölümünü engellemektedir ancak reperfüzyonun kendisi de hücre hasarı ve ölümüne katkıda bulunur (8,9). İskemi ve reperfüzyon birlikteliği majör organ ve dokularda fonksiyon bozukluğu ve bunlarla ilişkili pek çok hayatı tehdit eden durumlar ve hastalıklara yol açmaktadır (10).

Bu çalışmada kafeinin böbrek üzerine olan oksidan-antioksidan etkisi gösterilmeye çalışılacaktır. Literatürde kafeinin etkilerinin araştırıldığı çalışmalar olmakla birlikte böbrek üzerine olan çalışmalar oldukça azdır. Kafeinin, böbrek dokusunda meydana gelen oksidatif stres üzerine olan etkilerini inceleyen bir çalışmaya rastlayamadık. Çalışmamızda böbreklerinde iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulan sıçanların böbrek dokularındaki oksidan-antioksidan sistem üzerine kafeinin etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. BÖBREK

2.1.1. Anatomi

Böbrekler çift organlardan olup, karın boşluğunun üst-arka tarafında, retroperitoneal aralıkta yer alırlar. Böbreklerin etrafını yağ dokusu ve gevşek bağ dokusu sarar, ön yüzlerindeki peritoneum örter. Üst uçları onbirinci göğüs omurunun üst kenarı, alt uçları ise üçüncü bel omuru seviyesinde bulunur. Karın boşluğunun sağ üst kısmında karaciğerin bulunması sebebiyle, sağ böbrek sol böbreğe oranla biraz daha aşağıda bulunur. Böbreklerin uzun eksenini, omurgaya paraleldir. Böbreklerin boyutları her biri için geçerli olmak üzere yaklaşık 11,5 cm uzunluğunda, 5-7 cm genişliğinde ve 2,5 cm kalınlığındadır. Sol böbrek sağ böbreğe oranla biraz daha dar ve uzundur. Ağırlık erişkin kadınlarda 115-155 gr, erkeklerde 125-170 gr kadardır. Her iki böbreğin toplam ağırlığı vücut ağırlığının, yaklaşık 1/240'ı kadardır. Yenidoğan bebeklerde ise bu oran, üç kat daha fazladır. (11-13).

Her iki böbreğin medial yüzlerinde renal hilusları bulunur, burası üreterin ve vasküler yapıların böbreğe giriş yeridir. Bunların hilustaki dizilimleri ise önde renal ven, arkasında renal arter ve en arkada renal pelvis şeklindedir. Lenf damarları renal pelvisin, sınırları ise renal arterin çevresinde bulunmaktadır (14). Renal pelvisin dallanması ile major kaliksler, major kalikslerin dallanması ile minör kaliksler oluşur (15). Genel olarak her böbrekte 2-3 tane major kaliks, 8-18 tane minör kaliks bulunur (16).

Böbreğin kapsüle yakın olan dış bölümüne korteks, iç bölümüne ise medulla denir (15).

2.1.2. Böbreğin Embriyolojisi ve Histolojisi

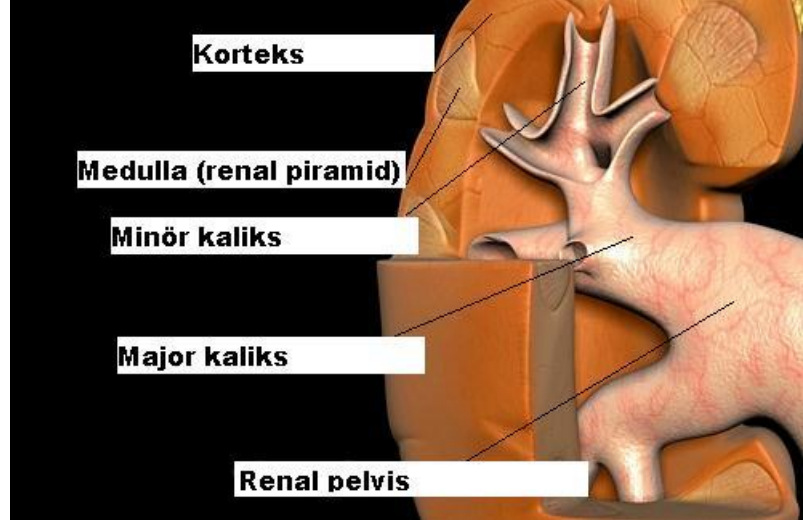
Böbrekler, üç sistemin birbiri ardına ortaya çıkması ile oluşur. Bu sistemler pronefroz, mezonefroz ve metanefroz olarak adlandırılırlar. Lümen gelişimi, nefrotom oluşumu ve aortadan çıkan dalların bu birimlerin içine girmesiyle eksternal ve internal glomerüllerin oluşumu bu sistemin gelişiminde izlenen aşamalardandır.

Fetal dönem süresince idrar oluşmakta, oluşan bu idrar amniyotik sıvıya katılmaktadır, fetüs amniyotik sıvıyı içince, barsaklarca emilen atıklar plasenta yoluyla anneye iletilmektedir. Yenidoğanda lobüle bir görünüme sahip olan böbrekler, süt çocukluğu dönemine kadar bu görünümlerini devam ettirirler. Ancak nadir de olsa yetişkin dönemde lobüle görünüm devam edebilir (17,18). Önemli bir noktada yenidoğanda böbreğin oluşumunun tamamlanmış olmasına rağmen işlevsel olgunluk kazanmasının doğumdan sonra gerçekleşmesidir.

İdrar yapımı olmayan pronefroz en erken böbrek sistemidir. Bir çift kanaldan oluşan bu sistem servikal bölgeden aşağıya doğru uzanıp kloakaya açılır. Bu sistem gestasyonun 4. haftasının sonunda tamamen kaybolur. Pronefrik sistemin kaybolmaya başladığı bu süreçte mezonefrik sistem gelişmeye başlar ve boşaltım sistemi olarak 4. ile 8. haftalar arasında görev yapar. Bowman kapsülü bu süreçte mezonefrik tübüllerin ucunda gelişir. 8. haftada mezonefrik böbrek azda olsa idrar yapımına başlar. Gelişmeye devam eden mezonefrik sistem 8. haftanın sonuna doğru en büyük boyutlarına ulaşır. Böbrek sistemlerinin son ve kalıcı evresi olan metanefroz böbrek, gestasyonun 5. haftasında oluşmaya başlar, bu metanefrik yapılar 9. haftada işlevsel olurlar. Toplayıcı sistem, mezonefrik kanalın kloakaya yakın yerinde bir çıkıntı biçiminde bulunan üreter tomurcuğundan gelişirken, bu sistemin metanefrik mezodermlle buluşması ile bu büyüme daha fazla hızlanır ve farklılaşma ilerler (19,20).

Sonuç olarak toplayıcı sistemin toplayıcı tübüller, minör kaliksler, majör kaliksler ve renal pelvis gibi elemanları gelişmiş olur. Diğer taraftan gelişimi süren glomerül 36. hafta dolayında farklılaşmasını tamamlar (19,20).

Böbrek dış tarafta korteks ve iç tarafta medulla olmak üzere iki kısma ayrılır. Üreterin genişlemiş üst kısmını oluşturan renal pelvis iki ya da üç majör kalikse ayrılmıştır ve bunlardanda minör kaliksler ayrılır (Şekil 1) (21,22). Kaliks boyunları infundibulum olarak isimlendirilir. Bazen pelvis tamamen böbrek sinüsünün içindeyken (intrarenal), kalikslerin uzun olması nedeniyle de bazen tamamen böbrek dışındadır (ekstrarenal) (17).



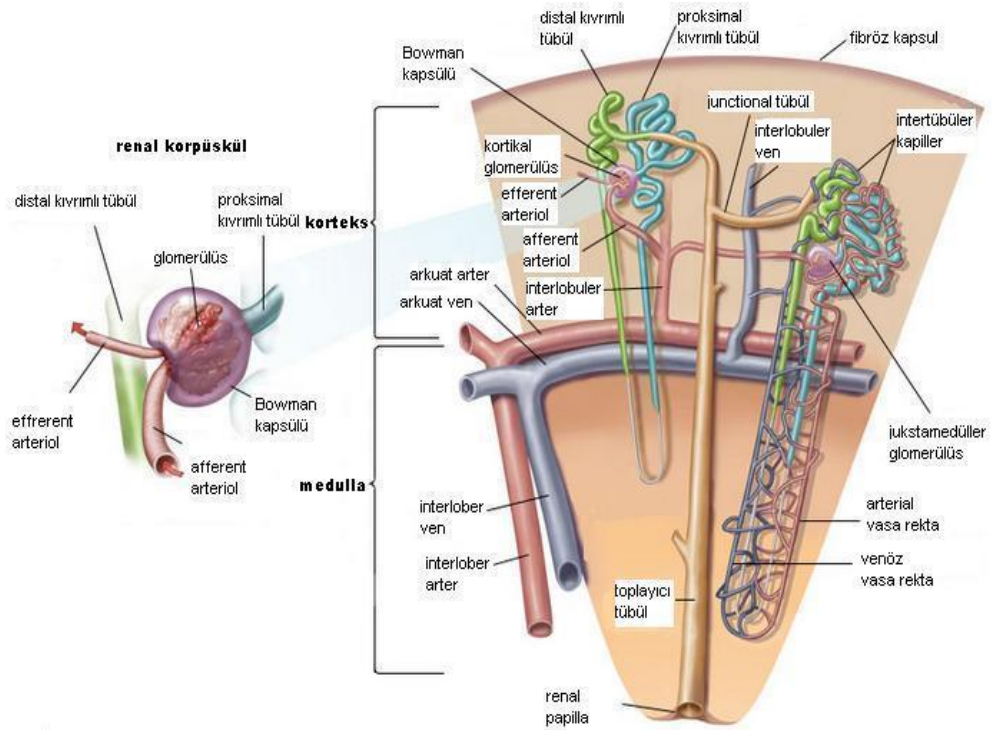
Şekil 1: Böbrek pelvisinin anatomik yapısı (22).

Böbreğin medulla bölümü 8-18 adet, çizgili görünümlü piramidden oluşur. Piramidlerin tabanı dış kısımda olan korteks tarafındadır, tepe kısımları papilla ismini alır ve minör kalikslere açılır. Papilla yüzeyine 7 ana kollektör kanal açılır (Bellini kanalları) ve oluşturdukları görünüm sebebiyle bu alana area kribrosa adı verilir. Renal piramidlerin kesit yüzeyleri, birbirine paralel seyreden vaza rektalar, kollektör kanallar ve henle kolları sebebiyle çizgili görünümde (17).

Her böbrek yaklaşık 1 ile 4 milyon arasında nefron içerir. Her bir nefronu oluşturan kısımlar renal cisimcik, proksimal kıvrımlı tübül, Henle kangalı ve distal kıvrımlı tübüdür (Şekil 2) (23). Bütün renal cisimcikler glomerülden oluşmuştur. Glomerülde iki tabakalı epitelyal bir kapsül olan Bowman kapsülü ile sarılmıştır. Kapsülün iç tabakası olan visseral tabaka glomerülün kapillerlerini kaplar. Dışta bulunan tabaka pariyetal tabakadır ve bu tabaka ince bir retiküler lif tabakası ve bazal lamina ile desteklenen tek katlı yassı epitelden oluşur (21).

Embriyonik gelişim esnasında dışta bulunan pariyetal tabakanın epiteli neredeyse değişmeksizin kalırken içte bulunan visseral tabaka büyük oranda değişim gösterir. İç tabakada bulunan hücreler podosit adını alır. Gövdelerinden primer uzantılar şekillenir ve her bir primer uzantıdan pedisel denen çok sayıda sekonder uzantılar oluşur. Sekonder uzantılar bazal lamina ile direkt olarak temas halindedir. Pediseller çok az organel içermelerine rağmen çok sayıda mikrotübül ve mikrofilament bulundururlar. Podositlerin sitoplazmasında belirgin bir golgi

kompleksi ve çok sayıda serbest ribozom bulunur ayrıca bunların kasılabilmesini sağlayan aktin mikrofilament demetleri vardır (21).



Şekil 2: Nefron yapısı (23)

Bazal membran, glomerül kapillerlerindeki endotel hücreleriyle, bunların dış yüzeyini örten podositler arasında bulunur. Bu membran kapillerin ve podositin oluşturduğu bazal laminaların kaynaşmasından oluşmuştur. Elektron mikroskopla ortada elektron yoğun bir tabaka (lamina densa) ve iki yanda daha fazla elektron geçirgen bir tabaka (lamina rara) görünür. Lamina rara içerisinde fibronektin bulunur. Lamina densa ise ağ şeklinde bir yapıdır ve bu yapıyı negatif yüklü bir proteoglikan olan, heparan sülfat içeren bir matriks içinde tip 4 kollajen ve laminin oluşturur.

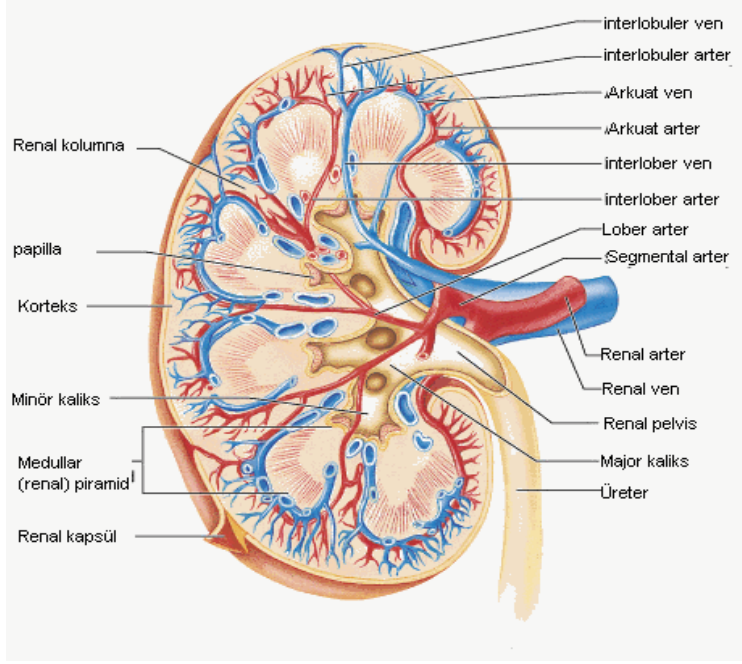
Glomerül kapillerlerinde podositler ve endotel hücrelerin yanı sıra, iki ya da daha fazla sayıdaki kapillerleri beraber olarak sarmalayan bazal laminanın kılıfının bulunduğu bölgelerde, kapiller duvarına tutunan mezangiyal hücreler bulunur. Mezangiyal hücrelerin sitoplazmik uzantıları endotel hücrelerinin arasına kapiller lümenine ulaşacak şekilde sokulurlar. Hücreler kapiller duvarını destekleyen ve kendilerini saran amorf matriksi sentezlerler (21).

Bowman kapsülünün pariyetal yaprağını oluşturan tek katlı yassı epitel, proksimal kıvrımlı tübüllerde prizmatik epitel şekline döner. Bu epiteldeki hücrelerde çok sayıda mitokondri bulunur. Hücre apeksinde fırçamsı kenarı oluşturan çok sayıda mikrovillusları vardır. Hücrelerin büyük olması nedeniyle, enine kesitlerde, hücrelerin merkezinde üç ile beş adet çekirdek bulunur.

Henle kangalı kalın inen kol devamında ince inen kol, ardından çıkan ince kol ve kalın çıkan koldan oluşan U şeklinde bir yapıdır. Tüm nefronların yaklaşık yedide biri kortikomedüller sınırın etrafında bulunurlar. Burada bulunan nefronlara jukstamedüller nefronlar diğerlerine ise kortikal nefronlar adı verilir.

Distal kıvrımlı tübül epiteli tek katlı kübik şeklindedir. Buradaki tübül hücrelerinde fırçamsı kenarlar yoktur. Nükleusların yakın yerleşimi yüzünden mikroskopik preparatlarda daha koyu renkli görünen distal tübül segmenti makula densa olarak adlandırılır. Renal cisimciğin bitişiğinde afferent arteriyolün tunika mediyası modifiye düz kas hücreleri içermektedir. Buradaki hücreler jukstaglomerüler hücreler olarak adlandırılırlar (21).

Böbrek vaskülarizasyonu, normal bir erişkin insanda her iki böbreğe giden kanın kalp debisinin %21'i olacak şekilde gelişmiştir. Böbreğe ulaşan kanın büyük çoğunluğunu renal korteks almaktadır. Renal arter böbreğin hilum bölgesinden böbrek veni ve üreterin yanında böbreğe girer ve interlober, arkuat ve interlobuler (radial arter) arterler ile afferent arteriyollere dallanır (Şekil 3) (24). Afferent arteriyoller, glomerüler kapillerleri oluşturan yapılardandır. Her glomerül kapillerinin distal ucu, böbrek tübüllerinin etrafını saran ve peritübüler kapiller denilen ikinci bir kapiller ağı oluşturan efferent arteriyolü oluşturmak için toplanırlar. Peritübüler kapillerler arteriyoler damarlarla birlikte paralel seyreden venöz sistemine boşalırlar ve bunlarda sırasıyla interlobüler ven, arkuat ven, interlober ven ve en sonundada böbreği renal artere komşu olarak terkeden böbrek venini meydana getirirler (17, 18).



Şekil 3: Böbrek damar sistemi (24)

2.1.3. Böbreğin Fizyolojisi ve Biyokimyasal Fonksiyonları

Böbrekte bulunan nefron sayısı hasar, hastalık veya yaşlanma ile giderek azalır. 40 yaşından sonra fonksiyonel nefron sayısı her 10 yıl için %10 azalır. Her nefronda kanı filtre eden glomerül ve filtre edilen sıvının idrara dönüşümünü gerçekleştiren toplayıcı tübül olmak üzere iki ana bölümü vardır (25).

Diğer kapiller ağlar ile karşılaştırıldığında daha yüksek hidrostatik basınca (60 mmHg) sahip olan glomerül, dallanan ve anastomoz yapan kapiller bir ağdan oluşmuştur. Glomerüler kapillerden filtre olan sıvı önce Bowman kapsülü içine ve sonrasında da böbrek korteksinde yer alan proksimal tübül içine akar. Sıvı buradan böbrek medullasının derinliklerine doğru inen Henle kangalına gider. Her Henle kangalının bir inen bir de çıkan kolu bulunur. Çıkan kolun distal bölümünde, duvarında bir plak bulunduran kısma makula densa adı verilir. Burası nefron işlevlerinin kontrolünde rol oynar. Sıvı makula densadan sonra distal tübüle ulaşır. Distal tübülü birleştirici tübül ve kortikal toplayıcı tübül takip eder. Sıvı buradan kortikal toplayıcı kanala gelir. 8-10 adet kortikal toplayıcı kanalın başlangıç kısımları birleşerek, medullada bulunan ve medüller toplayıcı kanal adı verilen daha geniş bir toplayıcı kanalı oluştururlar. Toplayıcı kanallarda papillanın tepesi aracılığı ile böbrek pelvisine boşalırlar (25).

Böbrekler süzme işlevini, glomerüler filtrasyon, tübüler reabsorbsiyon ve sekresyonla gerçekleştirirler. Proteinsiz fazla miktarda sıvının glomerüler kapillerden Bowman kapsülü içine filtrasyonu ile idrar oluşumu başlar. Proteinler dışında plazmada bulunan maddelerin çoğu serbest olarak Bowman kapsülü içine filtre olduğu için, Bowman kapsülü içindeki glomerüler filtratta, bu maddelerin konsantrasyonları plazmada bulunan konsantrasyonları ile aynıdır. Filtre olan sıvı Bowman kapsülünden ayrılıp tübüller boyunca ilerlerken içinde bulunan suyun ve spesifik solütlerin geri emilerek kana geçmesi veya başka maddelerin peritübüler kapillerden tübül içine salgılanması sebebiyle değişikliğe uğrar (25-27).

Kapiller membrana etki eden hidrostatik basınç ve kolloid osmotik basınç arasındaki denge ile kapillerin filtrasyon yapan yüzey ve geçirgenliğinin ölçütü olan kapiller filtrasyon sabiti tarafından, glomerüler filtrasyon hızı (GFH) tayin edilir. GFH, normal yetişkin bir insanda 125 ml/dakikadır (27,28).

Glomerüler kapiller membran; kapiller endoteli, bazal membran ve bazal membranın dış yüzeyini kaplayan epitelyal hücre (podosit) tabakasından oluşmaktadır. Bu tabakalar filtrasyon bariyerini oluşturur. Yüksek filtrasyon hızı kısmen membranın kendine has özelliklerine bağlıdır. Kapiller endotelyum çok sayıda por adı verilen, küçük oyuklar ile delinmiştir. Bu porlar, arasından küçük solütler ve suyun geçebileceği genişlikte aralık bulunan kollajen ve proteoglikan fibril ağından oluşmuştur. Bu özelliği sayesinde bol miktarda ve küçük maddeleri filtre edebilir. Bazal membranında plazma proteinlerinin geçişini etkin bir şekilde engellemesinin bir sebebi, proteoglikanların güçlü negatif elektrik yüküne sahip olmalarıdır. Glomerüler membranın son kısmı glomerülün dış yüzünü döşeyen epitelyal hücrelerdir ve bu hücreler kesintisiz değildirler ve kapillerin dış yüzünü kaplayan podositler vardır. Bu ayaksı çıkıntılar glomerüler filtratın geçtiği, por denen aralıklarla birbirinden ayrılmıştır. Epitelyal hücreler, her ne kadar filtrata engel teşkil etselerde plazma proteinlerine esas direnci bazal membran oluşturuyor gibi görünmektedir (27,28).

Böbreklerin başlıca iki büyük görevi vardır; idrar oluşturma ve endokrin fonksiyonlar. İdrar oluşturma fonksiyonu ile şu görevleri yerine getirirler (25,28,29):

1. Organizmada su ve elektrolit dengesinin düzenlenmesi
2. Asit-baz dengesinin sağlanması

3. Metabolizma: Özellikle protein metabolizması sonrası oluşan üre, kreatin, ürik asit, fosfatlar ve sülfatlar gibi artıkların ve toksik maddelerin vücuttan uzaklaştırılması
4. Organizma için gereksiz yabancı maddelerin (çeşitli ilaçlar ve boyalı maddeler gibi) atılması

Böbreklerin bilinen endokrin fonksiyonları ise şunlardır (25,28,29):

1. Renin salgılanması
2. Kallikrein-kinin sistemi
3. Eritropoietin salgılanması
4. Prostaglandinler

2.2. BÖBREK İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARI

İskemi (kan akımının kesilmesi) ve takibinde reperfüzyon (kan akımının yeniden sağlanması) organ ve dokularda hasara sebep olabilmektedir. İskemi, organ ve dokuların yaşaması ve normal fizyolojik işlevlerini devam ettirmesi için gerekli olan oksijenin alınmasını engeller. Oksijenlenmiş kanın hızlı bir şekilde geri dönüşü (reperfüzyonu) iskemik hücre ölümüne engel olmaktadır, ancak reperfüzyonun kendisinde hücre hasarı ve ölümüne katkıda bulunur (8,9). Bu durum reperfüzyon hasarı olarak bilinmektedir ve kanın dokuyu tekrar oksijenlendirmesiyle ilişkilidir. İskemik hasara oksijen yokluğu (hipoksi) sebep olurken reperfüzyon hasarına ise oksijenin geri dönmesi sebep olmaktadır. İskemi ve reperfüzyon birlikteliği majör doku ve organ disfonksiyonuna ve bunlarla ilişkili pek çok hayatı tehdit eden durumlar ve hastalıklara neden olmaktadır (10).

Böbrek iskemisi/reperfüzyon hasarını meydana getiren intrasellüler ve moleküler mekanizmalar karmaşıktır ve henüz tam olarak anlaşılamamıştır (30). Böbrek iskemisinin oluşmasındaki asıl etken böbrek kan akımındaki belirgin azalmadır. Bu durum pre-renal erken böbrek yetmezliğinde, böbrek arter embolizminde, trombozunda, aterosklerozise bağlı olarak gelişebilir (31,32). Bir veya her iki böbreğin iskemisi, böbrek transplantasyonu, aortik cerrahi veya kardiyovasküler anestezi sırasında sık görülen bir problemdir ve böbrek disfonksiyonu ve hasarına neden olabilir. Böbrek transplantasyonu, aort ve/veya böbrek arterlerinin klemplenmesi, supra ve juksta renal abdominal aortik anevrizmaların cerrahisi gibi cerrahi prosedürlerde böbrek iskemisi gelişmesine sebep olabilir. Bu da iskemik erken dönem böbrek yetmezliği oluşmasına neden olan postoperatif komplikasyonlara yol açabilmektedir (33,34).

2.2.1. Böbrek İskemi/Reperfüzyon Hasarının Biyokimyasal Mekanizması

Hücresel düzeyde incelendiğinde böbrek iskemisi proksimal tübüllerden su, iyon ve makromoleküllerin taşınmasında esas enerji kaynağı olan ATP'nin azalmasına ve Na⁺K⁺ATPaz pompasının işlevini yitirmesine yol açar. Bu durum hücre içinde sodyum iyonlarının artmasına ve hücre içi aşırı su birikimi ile hücrenin şişmesi ve ölümüne sebep olmaktadır (35,36). Aynı şekilde endotelial hücrelerdeki benzer bir disfonksiyonda intravasküler alandan sıvı kaybına ve hemokonsantrasyon

nedeniyle kan viskozitesinde artmaya neden olur. Bu durum kapiller obstrüksiyona sebep olarak reperfüzyon sırasında renal mikrosirkülasyonun sağlanmasını engelleyen bir etken olmaktadır (37). Böbreğin reperfüzyonu tamamlandıktan sonra dahi böbrek reperfüzyon hasarı oluşmaya devam eder. Bu durum süperoksit anyonlarının (O_2^-) meydana gelmesiyle oksidatif stres oluşumuna neden olmaktadır. Son zamanlarda süperoksit anyonları transplante edilmiş böbrekte iskemi reperfüzyon hasarının belirteci olarak ölçülebilmektedir (38). Böbreğin reperfüzyon hasarından sorumlu olan diğer hücrel mekanizmalar; postiskemik böbrek dokusuna inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu, kalsiyum homeostazisinde, fosfolipaz ve proteaz aktivasyonunda ve hücrel pH'da bozulmadır (39,40).

Süperoksit ve hidroksil (OH^*) benzeri reaktif oksijen radikallerinin (ROR) oluşması ve/veya antioksidan savunma mekanizmalarındaki yetersizlik oksidatif strese neden olmaktadır. Oksidatif stres böbrek iskemi reperfüzyon hasarının gerçekleşmesinde önemli bir yer tutmaktadır (41). Birçok çalışmada böbrek iskemi reperfüzyon hasarı sırasında fazla miktarda reaktif oksijen radikalinin ortamda bulunduğu biyokimyasal ve immunohistokimyasal yöntemlerle gösterilmiştir (42,43,44). ROR'a bağlı olarak böbrekte erken tübüler nekroz meydana gelmektedir. Erken tübüler nekroz, erken böbrek yetmezliğinin patogeneğinde önemli bir rol oynar (41,45). ROR, iskemi reperfüzyon hasarı esnasında hedef hücrelere direkt etkiyle hücre hasarına neden olmaktadır (46). Bununla beraber ROR'un sinyal transdüksiyon molekülü gibi davranarak gen transkripsiyonunu regüle edip transkripsiyon faktörlerini aktive edebildiği anlaşılmıştır (47,48,49). Nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından oluşturulmakta olan Nitrik oksit (NO) normal ve anormal böbrek işlevlerinde önemli rol almaktadır (49,50). Hipoksi veya inflamatuvar sitokinlere maruz kalan proksimal tübüllerde ya da iskemi-reperfüzyona (İ-R) maruz kalan böbrekte ortaya çıkmakta olan Aktif NOS (iNOS) böbrek disfonksiyonuna ve iskemik erken böbrek yetmezliğine neden olabilmektedir (51,52,53). NO'nun süperoksit ile ilişkisi sonucu oluşan peroksinitrit ($ONOO^*$) proteinlerdeki tirozin uçlarını nitratlayarak ve DNA zincirinde kırılmaya yol açarak ciddi hücrel hasara neden olmaktadır (54,55). Böylece peroksinitrit ($ONOO^*$) böbrek İ-R hasarında önemli bir rol oynamaktadır. Böbrekte meydana gelen inflamasyonda, İ-R hasarında ve ilişkili ABY (Akut böbrek yetmezliği) gelişiminde etkili olmaktadır (56,57,58).

İnflamatuvar süreç böbrek hücrelerinin hasarlanmasıyla sonuçlanan karmaşık ve birbiriyle ilişkili bir dizi olay sonucu gelişmektedir. Böbreklerdeki inflamasyon sonucunda histamin, bradikinin, platelet-aktive edici faktör (PAF) gibi biyolojik olarak aktif mediatörler üretilmekte ve salınmakta, bununla beraber polimorf nükleositlerden ya da pro-inflamatuvar hücre gibi davranan proksimal tübül ve glomerüler mezengial hücrelerden TNF- α , IL-1, IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinler salınmaktadır (59,60,61). Böbrek inflamasyonu sonuç olarak İ-R hasarına sebep olan oksidatif stres aşamasını içermektedir (62,63,64). Böbrek İ-R hasarının gelişiminde intrarenal inflamasyonun önemi artık anlaşılmış olup, iskemik erken böbrek yetmezliği tedavilerinde bu inflamasyonu engelleyecek yeni ilaçlar araştırılmaktadır (65).

2.3. SERBEST RADİKALLER, OKSİDAN-ANTIOKSİDAN DENGE

Serbest radikal oluşumundaki artışa ve/veya antioksidan sistemdeki yetersizliğe bağlı olarak organizmada oksidatif stres gelişmektedir. Bu yüzden organizmanın oksidan-antioksidan dengesi sağlıklı bir yaşam sürdürebilmemiz için çok önemlidir(66, 67).

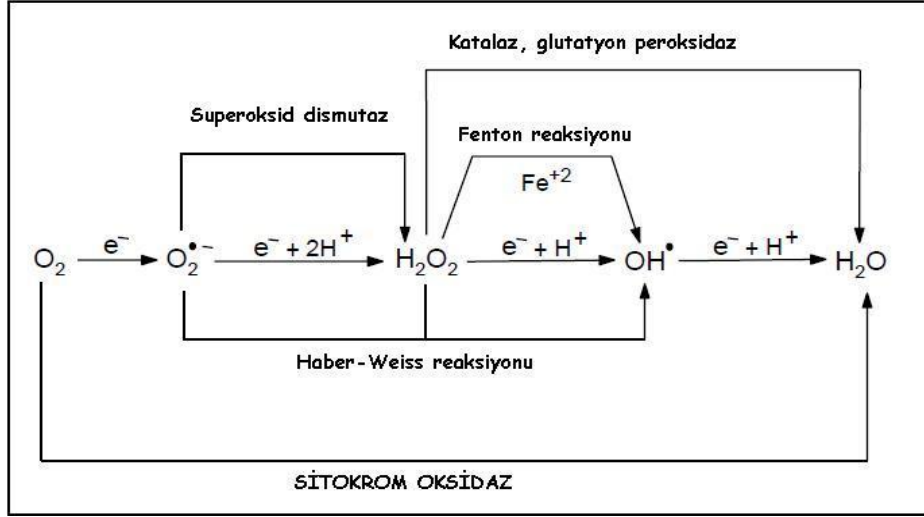
Serbest radikaller, dış orbitalinde paylaşılmamış bir elektron bulunduran ömürleri çok kısa ve kararsız bir yapı gösteren taneciklerdir. Organizmada metabolizma sırasında sürekli oluşurlar, ayrıca radyasyon, ilaçlar ve zararlı kimyasallar gibi çeşitli dış etkenlerin etkisi sonucundada oluşabilirler (66,67).

Serbest radikaller etrafındaki moleküllerle etkileşime girerek elektron almaya çalışırlar ve kararlı hale ulaşmak isterler. Oluşan radikallerin çok önemli bir bölümü oksijen kaynaklıdır. Oksijen dışında karbon, kükürt ve azot merkezli radikallerde oluşmaktadır (Tablo 1).

Tablo 1: Oksijen ve azot kaynaklı reaktif bileşikler (67-70).

Radikaller		Radikal olmayanlar	
Alkoksil	RO [•]	Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂
Azot dioksit	NO ₂ [•]	Hipoklorid asit	HOCl
Hidroksil	HO [•]	Lipit hidroperoksit	LOOH
Nitrik oksit	NO [•]	Ozon	O ₃
Peroksil	ROO [•]	Peroksinitrit	ONOO [•]
Süperoksit	O ₂ [•]	Singlet oksijen	

Aerobik organizmalar oksijene ihtiyaç duyarlar. Oksijen mitokondride bir dizi reaksiyondan geçerek suya dönüşmekte ve bu süreçte hücre kendisi için gerekli olan enerjiyi sağlamaktadır. Ancak bu süreçte oksijenin %2-3 kadarı suya dönüşmemekte ve oksijen kaynaklı radikaller meydana gelmektedir (Şekil 4). Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi ile *süperoksit radikali*, iki elektron alarak indirgenmesi ile *hidrojen peroksit* meydana gelir. Üçüncü elektron ilavesi ile yüksek derecede reaktif *hidroksil radikali* oluşur ve dördüncü elektron eklenmesiyle *su* oluşmaktadır (66-70).



Şekil 4: Hücre mitokondrisindeki radikal oluşumu (70)

Serbest radikaller organizmada mitokondriyle beraber bunun dışında hücrelerin tüm yapılarında, zara bağlı veya bağımsız olarak bulunan pek çok enzimin katalizlediği reaksiyonlar sırasında oluşmaktadır. Bunlar arasında sitoplazmada ksantin oksidaz, hücre zarına bağlı NADPH (Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) oksidaz, mikrozomal karma fonksiyonlu oksidaz sistemi ve lipooksijenazlar gibi enzimlerin kataliz ettiği reaksiyonlar sayılabilir.

Kararsız yapıları sebebiyle aktif oksijen radikalleri öncelikle lipitler, proteinler ve nükleik asitler olmak üzere bütün hücre bileşenleri ile etkileşebilme ve onlara hasar verme özelliğindedir. Bu hasar bazı tamir sistemleri tarafından engellenmeye çalışılır. Eğer bu sistemler yetersiz kalırsa, oksidatif stresin zararlı etkileri meydana gelir(66-70).

Serbest radikallerin lipitlere etkisi: Lipit peroksidasyonu serbest radikallerin lipitler üzerindeki en önemli etkileridir. Serbest radikaller tarafından başlatılan lipit peroksidasyonu, hücre membranlarında bulunan doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan kimyasal bir olaydır. Süperoksit, hidroksil, alkoksil ve peroksil radikalleri, lipit peroksidasyonunu başlatan en önemli radikallerdir (66-70).

Doymamış yağ asidi zincirindeki α -metilen gruplarından hidrojen atomunun uzaklaşması ile lipit peroksidasyonu başlar ve bu sayede yağ asidi zinciri bir radikal özelliği kazanır. Dayanıksız bir bileşik olan lipit radikali bazı değişikliklere uğrar. Öncelikle, molekül içi çift bağ aktarılması (rezonans) ile dien konjugatı oluşur. Oksijen eklenmesiyle de bu yağ asidi radikali hızlı bir şekilde peroksil radikaline

dönüşür. Membran yapısındaki diğer doymamış yağ asitlerinden, lipit peroksil radikalleri hidrojen atomlarını çıkartarak yeni reaksiyonları başlatırlar. Açığa çıkan hidrojen atomlarının da kendileri alarak lipit hidroperoksitlerine (LOOH*) dönüşür. Lipit hidroperoksitlerin aldehit ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesi ile reaksiyonlar tamamlanır.

Lipit peroksidasyonu sonucu hücre membranlarının transport sistemi etkilenir, hücre içi ve dışı iyon dengeleri bozulur. Sonuçta hücre içi kalsiyum oranı artar ve buna bağlı proteazlar aktive olur. Bunlar hücre hasarında etkin bir rol alırlar. Ayrıca lipit peroksidasyonunun son ürünü olan aldehitlerde sitotoksik etkilere sahiptirler (66,67,71,72).

Serbest radikallerin proteinlere etkisi: Serbest radikallerin proteinler üzerine doğrudan veya dolaylı olarak etkileri vardır. Peptid bağları, prolin ve lizin gibi aminoasitler serbest radikallerden kolay etkilenirler. Özellikle histidin, fenilalanin, tirozin gibi aminoasitlerde karbonil gruplarının oluşması ile protein oksidasyonu gerçekleşir. Sisteinin sülfidril grupları ile ya da lizin ve histidinler ile kovalent bağlar oluşturan lipit peroksidasyonunun aldehit yapıdaki ürünleri proteinlerde fragmentasyon ve çapraz bağlanmalara neden olur. Bu olayların sonucundada proteinlerin yapı ve fonksiyonları bozulur (66,67,71,72).

Serbest radikallerin nükleik asitler ve DNA üzerine etkisi: DNA yapısında serbest radikallerin etkisi ile yapısal değişimler olur. Bu yapısal değişimleri zincir kırılmaları, pürin ve pirimidin bazlarında parçalanma, DNA denatürasyonu gibi çeşitli olaylar oluşturmaktadır (66,67,71,72).

Oksidatif stresin varlığı organizmada türlü yöntemlerle gösterilebilir. Protein hasarını göstermek için protein karbonil (PC) grupları ölçümü, lipitler üzerindeki hasarın göstergesi için lipit peroksidasyonu ürünü malondialdehit (MDA), DNA hasarını göstermek için 8-hidroksi-deoksiganosin seviyeleri ölçümü kullanılmaktadır (66,67,71,72).

Serbest radikaller organizmada sürekli biçimde oluşmaktadır. Fakat bu radikallerin organizmaya zarar vermesi güçlü bir savunma sisteminin varlığı sebebiyle engellenmektedir. Bu sebeple serbest radikallerin oluşum hızı ile etkisizleştirme hızının dengede tutulması son derece önemlidir. Denge bozulduğunda serbest radikallerin zararlı etkileri görülmekte ve çeşitli organ ve sistemler olumsuz

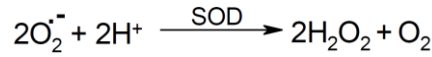
etkilenmektedir (66,73,74).

Antioksidanlar, radikal oluşumunu sınırlandırma, oluşan radikalleri ortadan kaldırma, tetiklenen biyokimyasal reaksiyonların kırılmasını sağlama ve hasarlı molekülleri tamir etme ve temizleme gibi çeşitli mekanizmalarla etkilerini göstermektedirler. Antioksidan sistem; enzimleri, metal iyonlarını bağlayan proteinleri ve su ve/veya yağda çözünen radikal tutucularını içermektedir (Tablo 2) (66,73,74).

Tablo 2: Organizmada bulunan antioksidan sistem elemanları (66,73,74).

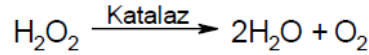
Enzimler	Metal iyonlarını bağlayan proteinler	Suda çözünen radikal tutucuları	Yağda çözünen radikal tutucuları
Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)	Albumin	C vitamini	Bilirubin
Glutasyon redüktaz (GSH-Red)	Ferritin	Glutasyon (GSH)	E vitamini
Glutasyon transferaz (GST)	Haptoglobin	Ürik asit	Flavonoidler
Katalaz	Seruloplazmin		β-Karoten
Süperoksit dismutaz (SOD)	Transferrin		Ubikinol

SOD: Süperoksit dismutaz enzimi (SOD) süperoksit radikalini dismutasyona uğratarak, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlar.



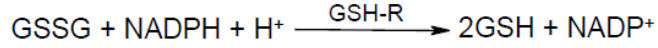
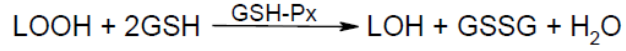
İnsanlarda SOD'un iki izoenzimi bulunmaktadır. Cu-Zn SOD sitozolde, Mn SOD mitokondride bulunur (66,73,74).

Katalaz: Tetramerik hemoprotein yapısı olan bir enzimdir. Yüksek konsantrasyonda oluşan hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalayan reaksiyonu katalizler. Enzim, peroksizomlarda bulunur (66,73,74).



GSH-Px: Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) gerek hidrojen peroksit ve gerekse lipit hidroperoksitleri metabolize etmektedir. GSH-Px'in selenyuma bağımlı ve bağımsız iki farklı türü vardır. Bağımlı olan formu hem hidrojen peroksidin hem de LOOH'ların metabolizmasında bulunurken, bağımlı olmayan türü sadece LOOH'ları metabolize etmektedir. GSH (Glutasyon), bu reaksiyonlarda hidrojen verici olarak görev yapmakta, hidrojen peroksit ve LOOH'lar indirgenirken, GSH

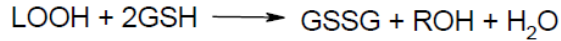
oksitlenmiş şekline (GSSG) dönüşmektedir. NADPH'a bağımlı glutatyon redüktaz (GSH-R) ise oksitlenmiş glutatyonu tekrar GSH'a indirgemektedir (66,73,74).



GST: Glutatyon-S-Trasferaz (GST) enzimi dimerik yapıda olup sitozolde bulunmaktadır. Fazla sayıda izoenzimi vardır. Çeşitli endojen ve eksojen bileşiklerin GSH ile konjugasyonunu kataliz eden GST'ler yabancı maddelerin biyotransformasyonunda önemli role sahiptirler.



GST'lerin bazı izoenzimleri GSH-Px aktivitesi gösterirler bu sayede LOOH'ların metabolizmasında sağlarlar (66,73,74).



GSH: Glutatyon hücre için en önemli antioksidan moleküldür. Serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücrelerde gelişebilecek oksidan hasarı engeller. GSH, bazı enzimlerin substratı veya kofaktörü olarak görev yaptığı gibi zehirsizleştirme reaksiyonlarında doğrudan katılır. Öncelikle karaciğerde olmak üzere pek çok dokuda yüksek oranda bulunur. Sistein, glutamat ve glisinden sentezlenen bir tripeptiddir ve oldukça fazla sülfidril grupları içerir. GSH-Px, GSH-R ve GST gibi enzimlerin işlevi için gereklidir. Ayrıca pek çok proteinin ve enzimin inaktivasyonunu, hücrenin protein yapısındaki sülfhidril (-SH) gruplarını indirgenmiş halde tutarak engeller (66,73,74).

C vitamini (Askorbik Asit) : Suda çözünen en güçlü antioksidan moleküldür. Sentez edilemediği için diyetle alınması zorunludur. Yapıca heksozlara benzeyen vitamin C organizmada kolayca dehidroaskorbik aside oksitlenir. Singlet oksijen, süperoksit radikali ve hidroksil radikali ile reaksiyona girerek onları etkisizleştirir. Sulu fazda bulunmasına karşın lipitleri ve zarları, lipit peroksidasyonunu başlatıcı radikalleri temizleyerek oksidan hasara karşı korur. E vitamininin rejenerasyonundada görev alır, tokoferoksil radikalının α -tokoferole indirgenmesini sağlar. Bu sayede LDL'yi E vitamini ile birlikte etkin bir şekilde oksidasyona karşı korur (66,73,74).

E vitamini (α -tokoferol): Yağda eriyen en kuvvetli antioksidan vitamindir ve yapısal olarak birbiri ile bağlantılı bir grup bileşikten oluşur (tokoferoller ve tokotrienoller). Bunlar izoprenoid takısı içeren bileşiklerdir. Aktif kısmını yapısında bulunan fenol halkasındaki hidroksil grubu oluşturur ve molekülün antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır (66,73,74).

Organizmada güçlü bir savunma sistemi olmasına rağmen serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı bazı durumlarda savunma sistemi yetersiz kalmakta ve oksidatif stres gelişmektedir. Hasarın yerine ve düzeyine bağlı olarak çeşitli organ ve sistemler etkilenmektedir. Serbest radikallerin günümüzde pek çok patolojik durumun ve hastalığın ortaya çıkışında önemli bir rol oynadığı kabul edilmektedir. Bu patolojik durumlar çok geniş bir dağılım göstermektedir (66,67,69-71,74,75) (Tablo 3). Serbest radikallerin iskemi-reperfüzyon hasarı, ateroskleroz, yaşlanma, kanser oluşumu, diabetes mellitus komplikasyonlarının gelişimi gibi pek çok hastalıkta etkin bir rol oynadığı saptanmıştır (66,67,69-71,74,75).

Tablo 3: Serbest radikallerle ilişkili bazı patolojik durumlar (69-71)

Ateroskleroz	Karaciğer bozuklukları
Akciğer hastalıkları	Kan hastalıkları
İskemi-reperfüzyon hasarı	Radyasyon hasarı
Yaşlanma	Merkez sinir sistemi hastalıkları
Diabetes mellitus	Böbrek bozuklukları
İnflamasyon	Göz bozuklukları
Kanser	Gastrointestinal bozukluklar
Otoimmün hastalıklar	Beslenme yetersizlikleri
Romatoid artrit	Cilt bozuklukları
Kas hastalıkları	

2.4. BÖBREK İ-R HASARININ TEDAVİSİNE YÖNELİK YAKLAŞIMLAR

Böbrekte İ-R hasarını azaltma amacına yönelik çok sayıda farmakolojik yaklaşım araştırma konusu olmuştur. Bunların çoğu İ-R hasarını klinik olarak azalttığı ve böbrek fonksiyonlarını ise arttırdığı gözlenmiş olsa dahi henüz hiçbirinin mortaliteyi anlamlı olarak azaltabildiği gösterilememiştir (10). Örnek olarak düşük doz dopamin, Atrial natriüretik peptid (ANP) ve furosemid gibi ajanlar ABY'nin hayvan modellerinde etkili gözükmeyle birlikte, klinik olarak mortalite düzeyini azaltamamışlardır (76-79). Günümüzde ABY'nin gelişmesine neden olan birden fazla etken göz önüne alındığında bir etkene yönelik tedavi yaklaşımının tam anlamıyla etkili olabileceği düşünülmemektedir. Bu sebeple İ-R hasarını azaltmaya yönelik farklı patofizyolojik mekanizmaları ya da koruyucu mekanizmaları etkileyen, çok yönlü ve gelişmiş farmakolojik yaklaşımların geliştirilmesi gerekmektedir (80,81). İ-R hasarının azaltılmasına yönelik kullanılan bazı farmakolojik ajanlar şunlardır:

2.4.1. Antioksidanlar ve Antioksidan Enzimler:

Böbrek İ-R hasarını reaktif oksijen radikallerini temizleyerek antioksidan etki gösteren Edoravone, Askorbik asit ve bir iNOS inhibitörü olan Aminoguanidin'in azaltabileceği gösterilmiştir (82-84). Ayrıca antioksidan etkinlik gösteren bir aminoasit olan N-asetilsistein'in de böbrek İ-R hasarında koruyucu olabileceği gösterilmiştir (85). Antioksidan ve antiinflamatuvar etkinliği bilinen bir hormon olan Oksitosin'in sıçanlarda oksidatif stresi azaltarak İ-R hasarını düşürdüğü gösterilmiştir (86). SOD ortamda bulunan süperoksidi hızlı bir şekilde temizleyen antioksidan bir enzimdir. Böbrek İ-R hasarında ATP azalmasıyla meydana gelen hücre ölümüne karşı SOD'un koruyucu etkinliği olduğu gösterilmiştir (87).

2.4.2. Nitrik Oksit (NO) ve Nitrik Oksit Sentaz (NOS) İnhibitörleri:

Nitrik oksitin iNOS tarafından yüksek miktarda sentezlendiği böbrek İ-R hasarı ya da böbrek inflamasyonu gibi durumlarda NO'nun proksimal tübül hücrelerinde hasara sebep olduğu bilinmektedir. Maymun böbreğinde renal

disfonksiyonu iNOS'un seçici bir inhibitörü olan FR260330'un anlamlı ölçüde azalttığı gösterilmiştir (88). Araştırmacıların bir kısmı sodyum nitroprusid, gliseril trinitrat ve molsidomin gibi NO donörlerinden ya da L-arjininden elde edilen düşük konsantrasyonlu NO'nun İ-R hasarı sırasında böbreği koruyabileceğini ve böbrek fonksiyonlarını iyileştirebileceğini bildirmiştir (89-92).

2.4.3. Poli (ADP-Riboz) Polimeraz (PARP):

Kromatine bağlı olarak çeşitli hücrelerin nükleuslarında bulunan bir enzimdir. DNA halkasında kırılmalara yol açan hidroksil radikali ve peroksinitrit, İ-R hasarı sırasında oluşur. Bu kırılma PARP'yi aktive eder ve hücre içinde NAD⁺ ve ATP kaybına ve neticede hücre disfonksiyonu ve ölümüne sebep olur (93). PARP inhibitörleri ile yapılan çalışmalarda, in vivo ve in vitro renal İ-R modellerinde renal hasarlanmayı azaltan bir etki gösterilmiştir (94,95).

2.4.4. Peroksizom Proliferator Aktive Edici Reseptör (PPAR) Agonistleri:

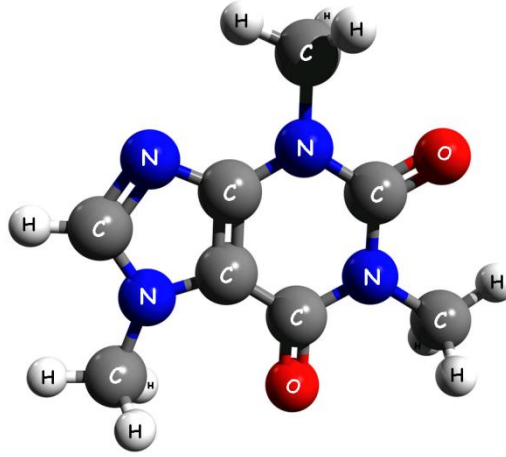
Çeşitli izomerleri ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) mevcut olan PPAR grubu reseptörler ligand-aktive edici transkripsiyon faktörleri gibi rol oynayan bir grup nükleer hormon reseptörleridirler. PPAR- α agonisti olan klofibrat ve WY14643'ün ratlarda İ-R hasarına karşı koruyucu rol oynadığı gösterilmiştir (96).

2.4.5. Böbrek İ-R hasarında araştırılan diğer ajanlar:

Oksidatif stres ve böbrek İ-R hasarına karşı karbon monoksit (CO) ve bilirubinin koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (97,98). Non-hematopoetik ve pleiotropik etkinliğiyle Eritropoietinde böbrek İ-R hasarını azaltmaktadır (99). HMG-CoA redüktaz inhibitörü olan statinler (pravastatin, serivastatin, simvastatin gibi) antioksidan, antiinflamatuvar ve anjiogenezisi arttırıcı etkilere sahiptir. Bu etkileriyle statinlerin böbrek İ-R hasarında koruyucu etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir (100,101). İ-R hasarı sırasında natural killer T hücrelerinin aktivasyonu böbrek dokusunda PMN lökositlerin infiltrasyonuna sebep olarak inflamasyon gelişmesine katkıda bulunmaktadır. Sfingozin 1-fosfat periferde bulunan T

hücrelerinin azalmasına sebep olmaktadır. Sfingozin 1-fosfat reseptör agonistlerinin (FTY720 ve SEW2871 gibi) farelerde İ-R hasarında koruyucu etkinlikleri olduğu gösterilmiştir (102,103).

2.5. KAFEİN



Şekil 5: Kafeinin moleküler yapısı (104)

Ksantin alkaloidlerinden olan Kafein, “caffè, coffee” sözcüklerinden köken alır. Sistematik adı “1,3,7-trimethyl-1H-purine-2,6(3H,7H)-dione”, diğer isimleri ise 1,3,7-trimetilksantin, trimetilksantin ve metilteobromindir. Kimyasal olarak 1819 yılında izole edilen kafein, 1895 yılında sentetik olarak üretilmiştir. Çok sayıda bitkinin tohumlarında, yapraklarında ve öz suyunda bulunur ve bu bitkilerle beslenen bazı böceklerin paralyze olmasına ve ölümüne yol açar (104,105,106).

Doğal halde bulunan (kahve, çay vb.) ve bazı endüstriyel ürünler (kola, çikolata vb.) kafein içerirler. İçerdikleri kafein miktarları (Tablo 4), bitki türüne ve elde edilme yöntemine göre farklılık gösterir (107). Kafein içeren birçok doğal ürün, aynı zamanda diğer ksantin alkaloidleri olan teobromin ve teofilin gibi kalp uyarıcı etkinliği olan maddeleri içerirler. Kafeinin ana kaynağı bulunduğu kahve tohumlarıdır. Kahve içeriğindeki kafein miktarı, kahve tohumunun türüne ve hazırlanma şekline göre değişiklik gösterir. Kahvede az miktarda teofilin bulunur, ancak teobromin bulunmaz. Kafein içeren diğer bir kaynak ise çaydır. Çay türüne göre de kafein miktarı farklılık gösterir. Çay, kahveye göre daha fazla miktarda teofilin ve az miktarda teobromin içerir. Kafein içeren bir diğer kaynak da endüstri ürünleri olan kola ve enerji içecekleridir. Bu içeceklerde bulunan kafein, içeriğindeki doğal kaynaklardan gelir ya da sonradan ilave edilir. Çikolata az miktarda kafein içerir ve uyarıcı etkisi teofilin, teobromin ve kafeinden kaynaklanır (104).

Tablo 4: Doğal ve endüstriyel ürünlerde bulunan kafein miktarları (107).

Kaynak	Kafein miktarı (mg)	Hacim veya ağırlık
Kahve	40-180	150 ml
Çay	25-50	150 ml
Kakao	5-10	150 ml
Çikolata barları	5-20	100 gr
Soft içecekler	20-40	250 ml
Enerji içecekleri	30-85	250 ml
Reçetesiz satılan ürünler (OTC)	30-200	1 tablet

1900'lü yılların başlarında kafeinin insan sağlığı üzerindeki etkileri incelenmeye başlanmıştır. Kafeinin; diüretik, metabolik hızı arttırıcı, kas ve sinirleri uyarıcı ve mide salgısını uyarıcı etki yaptığı, orta düzeyde alınan kafeinin (200-300mg) uyuşukluk ve zihin yorgunluğunu giderici, iştah arttırıcı etkisi olduğu gösterilmiştir. Kafeinin insanda tolerans ve fiziksel bağımlılık oluşturabildiği, pekiştirici olduğu, bu kişilerde kafeinin kesilmesinin, kendini başağrısı, zihinsel konsantrasyonun azalması, irritabilite, disfori ve anksiyete ile belli eden hafif bir yoksunluk sendromuna neden olduğu görülmüştür (4,5).

Kahvenin içeriğinde yüksek miktarlarda tanen (kateşin analogu) bulunduğu, tanenin anjiogenetik, antioksidan, anti-mutajenik, antibiyotik, antihipertansif, anti-hiperkolesterolemik ve anti-inflamatuvar etkisi olduğu bildirilmektedir (108).

Ayrıca kafeinin yıkım ürünleri olan teobromin ve ksantin, antioksidan ve prooksidan özellikte oldukları, antioksidan olan ürik asit ile yapısal benzerlik gösterdikleri bulunmuştur (109).

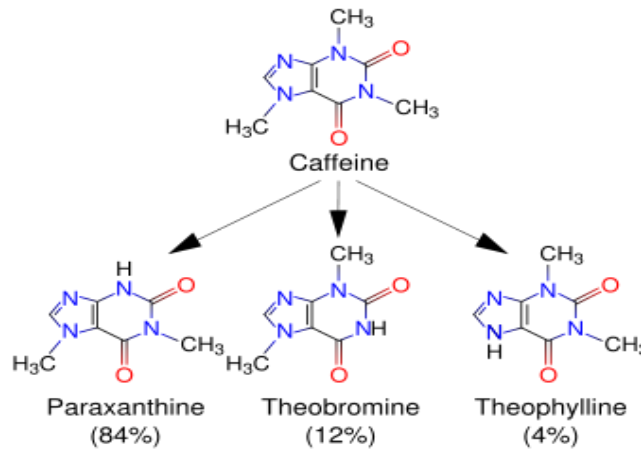
2.5.1. Kafein Metabolizması

Oral yolla alınımından sonra kafeinin %99'u gastrointestinal sistemden emilerek 30-120 dakika içinde plazmada en yüksek konsantrasyonuna ulaşır. Biyolojik membranlardan hidrofobik özelliği sayesinde kolayca geçebilme yeteneğine sahiptir. Kafeinin % 5'den daha az bir miktarı metabolize olmadan idrarla atılır. Kafein plazma konsantrasyonunun en yüksek düzeyine ulaştıktan sonra, konsantrasyonu değişmeden beyinde en az bir saat kadar kalır (110). Kafein için insan normal plazma seviyesi, 5-20 µM olarak belirtilmiştir (111,112,113).

Kafein kan-beyin bariyeri ve plasental bariyeri hidrofobik özelliğinden dolayı kolaylıkla geçebildiği için, fazla miktarda kafein alan hamilelerin yenidoğan bebeklerinde yüksek seviyelerde kafein görülmüştür. Kafeinin yarı ömrü insanlarda 2,5-6 saat arasında değişmekle birlikte, fare ve sıçanlarda bu sürenin 0,7-1,2 saat olduğu, fetus ve yenidoğan döneminde, kafeinin demetilasyonu için gerekli enzimlerin noksan olması sebebiyle kafeinin yarı ömrünün yaklaşık 32-149 saat kadar olduğu bildirilmektedir (111,112).

Kafein insanda, karaciğerde bulunan sitokrom P4501A₂ (CYP1A₂) enzimi ile demetilasyon sonucu paraksantine (1,7 dimetilksantin) dönüşür. Bu demetilasyon basamağı Kafein metabolizmasının %72-80'ini oluşturur. Daha az miktardada teobromine (3,7 dimetilksantin) ve teofiline (1,3 dimetilksantin) çevrilir. Ayrıca aynı enzim tarafından paraksantin demetilasyonu ile önce 1-metilksantin sonrada 1-metilürik asit oluşturulur (114).

Kafein, başlıca CYP1A₂ tarafından yıkıma uğrar, fakat ksantin oksidaz ve N-asetiltransferazın'da (NAT-2) substratıdır (115). Kafeinin biyolojik aktivitesi olan ürünlerinden teofilin, paraksantinden daha güçlü etki gösterir (111).



Şekil 6: Kafeinin metabolitleri (104)

2.5.2. Kafeinin Etkileri

Kafein önemli fizyolojik işlevleri olmayan ancak farklı organ ve dokularda etkileri bulunan, aktif bir maddedir (107). Kafein ve diğer metilksantinler, fosfodiesteraz enzimini ve adenosin reseptörlerini inhibe ederek ve hücre içi depolardan kalsiyumun salınımına neden olarak etkilerini gösterirler (105). Bununla

birlikte, kafein içeren besin ve içeceklerin tüketimini takiben oluşan serum düzeyi, enzim inhibisyonu ve kalsiyum mobilizasyonu ile oluşan etkileri ortaya çıkarmaz (106).

Kafeinin etkileri genellikle adenosin reseptörlerini yarışmalı olarak bloke etmesi ile ilgilidir. Normal hücre bileşenlerinden biri olan adenosin hücrelerde nükleik asit metabolizması ve birçok reaksiyonda görev alır. Molekülün pürin kısmı kimyasal olarak kafeine benzer. Kafeinin etkileri genel olarak adenosinin etkilerine ters yöndedir (106).

Adenosin dört farklı reseptör (A_1 , A_{2a} , A_{2b} ve A_3) ile etkileşir. Hücre içi cAMP (siklik adenosin mono fosfat) düzeyi bu reseptörlerin uyarılmasıyla aktiflenen adenilat siklaz yoluyla değişim gösterir. A_1 reseptörlerine daha yüksek ilgi duyan adenosin, bu reseptörleri uyararak G_i adı verilen guanil nükleozid bağlayıcı protein aracılığıyla adenilat siklazı inhibe eder. Daha düşük ilgi duyduğu A_{2a} reseptörlerini uyarmasıylada G_s adı verilen diğer bir guanil nükleozid bağlayıcı protein aracılığıyla adenilat siklazı aktive eder. Bu sebepten dolayı A_1 ve A_{2a} reseptörleri hücre seviyesinde ters etkilere sahiptir (Tablo 5) (106).

Kafein, etkisini A_1 ve A_{2a} reseptörleri üzerinden gösterir ve seçici olmayan bir şekilde her iki reseptörü antagonize eder (106). Adenosin reseptörlerinin kafein tarafından inhibe edilmesi; algılama ve davranışa yönelik etkilerin oluşumu ile ilişkili dopamin, asetilkolin, norepinefrin, serotonin, glutamat, gamma-aminobütirik asit (GABA) ve nöropeptidlerin salınımını etkiler (105).

Adenosin reseptörleri üzerindeki antogonistik etkisi için metilksantinlerin 10-100 μM 'lik plazma konsantrasyonu gereklidir. Ayrıca fosfodiesteraz enzim inhibisyonu için 20, GABA_a reseptörlerinin blokajı için 40 ve hücre içi kalsiyum depolarından kalsiyum mobilizasyonu için 100 kat daha fazla plazma konsantrasyonu gereklidir (106).

Tablo 5: Adenozin analogları ve kafeinin farmakolojik etkileri (106)

Etkilenen Fizyolojik Sistem (Fonksiyon)	Kafein	Adenozin
Merkezi sinir sistemi	Spontan elektriksel aktiviteyi artırır, Nörotransmitter madde salınımını artırır, Konvülsan aktivite, Lökomotor aktiviteyi uyarır	Spontan elektriksel aktiviteyi azaltır, Nörotransmitter madde salınımını azaltır, Antikonvülsan aktivite, Lökomotor aktiviteyi baskılar
Kalp	Pozitif inotropik/kronotropik etki	Negatif inotropik/kronotropik etki
Böbrek	Diürezis, Renin salınımını uyarır	Antidiürezis, Renin salınımını uyarır
Periferel damarlar	Dilatasyon	Konstrüksiyon
Merkezi damarlar	Konstrüksiyon	Dilatasyon
Gastrointestinal sistem	Mide salgısını arttırır	—
Solunum sistemi	Bronkodilatasyon	Bronkodilatasyon/ Bronkokonstrüksiyon
Yağ dokusu	Lipolizi uyarır	Lipolizi baskılar

Kafein, cAMP hücre içi konsantrasyonunu iskelet kaslarında ve yağ dokusunda fosfodiesteraz enzimini inhibe ederek arttırır. Bu etki lipaz aktivitesi ile lipolize neden olur. Enerji kullanımı iskelet kaslarında lipoliz yolağından sağlanır ve kas glikojen tüketimi azalır. cAMP düzeyindeki artış kan katekolamin düzeyinide arttırır. Kafein zayıf bir fosfodiesteraz enzim inhibitörüdür ve bundan dolayı davranışsal etki için gerekli dozlarda bu etkilerin görülmesi zordur (105). 0,1-1 mM düzeyindeki plazma konsantrasyonu dokularda bulunan fosfodiesteraz enziminin inhibe edilmesi için gerekli olan seviyedir (106). Kafein ve teofilinin bronşları ve soluk borusunu genişletici ve kalp uyarıcı etkilerinde fosfodiesteraz enzim inhibisyonu önemlidir (105).

Metilksantinler, adenin, guanin, ürik asit, hipoksantin gibi pürinlerin kimyasal yapısı ile benzerlik göstermektedirler. Bu kimyasal benzerlik, biyokimyasal düzenleyici olan cAMP ile etkileşime girmeleri bakımından önemlidir (116).

Kafeinin kronik tüketimi hamilelik esnasında fetal gelişimi etkilemesine rağmen, embriyogenesis üzerine etkisi tam olarak anlaşılamamıştır. Kafeinin yüksek dozlarda, gen ekspresyonunu değiştirebildiği, infertiliteye, düşük riskine, intrauterin gelişme geriliğine ve düşük doğum ağırlıklı bebeklere sebep olabildiği savunulmaktadır. İntrauterin gelişme geriliği ve düşük doğum ağırlığı ile doğanlarda

erişkin dönemde hipertansiyon ve kronik kalp yetmezliği riski bulunmaktadır. Fetoplazental dolaşımında güçlü bir vazokonstriktör olan Anjiyotensin II, AT₁ ve AT₂ reseptörleri ile etki gösterir. Hayvan modellerinde kafein ile birlikte AT₂ reseptör salgılanmasının arttığı görülmüştür (117).

Uzun süre kafein kullanımının katekolamin seviyelerini ve plazma renin aktivitesini yükseltip, böbrek fonksiyonlarının bozulmasına yol açarak renin konsantrasyonlarını arttırdığı söylenmektedir. Sonuç olarak kreatinin klirensi düşer, üriner protein atılımı artar. Kafein renal ven plazma noradrenalin konsantrasyonlarının yükselmesine neden olur (118,119). Kronik olarak yüksek konsantrasyonlarda tüketiminde miyokardı uyarıp, kalp hızını arttırarak, kardiyak performansı bozduğu, miyokard infarktı riskinide yükselttiği bildirilmiştir (108,120).

Kafein, teobromin ile teofilin su ve sodyumun böbreklerden atılımını artırır. Diüretik etkinliği en güçlü olan teofilindir. Diüretik etki, sodyum ile suyun tübüllerden geri emilimini inhibe etmesine ve glomerüler filtrasyon hızının artışına bağlıdır. Diüretik etkiye karşı, uzun süreli kullanımı takiben tolerans gelişir (106).

Kafeinin aşırı tüketimi, böbrekte kalsiyum oksalat taşı oluşumunu arttırabilir (121). Ayrıca kafein insanda, C-reaktif protein (CRP) artışınada sebep olabilir (122).

Kafein, tiroid uyarıcı hormon (TSH), tiroksin (T₄) ve growth hormon (GH) seviyelerini yükseltebilir. Kafein üzerine yapılan çalışmalarda tüketiminin tiroid neoplazisine karşı koruyucu rol oynayabileceği görüşü vardır. Bazı çalışmalarda uzun süre içme suyuna kafein eklenen ratlarda, neoplazi görülme oranının artmadığı görülmüştür. Kafeinin tek başına T₄ düzeyini azalttığı TSH seviyesini ise yükselttiği gösterilmiştir. Bununla birlikte 1500 ppm (yaklaşık 140 mg/kg/gün; yüksek doz) kafein ile karaciğer hipertrofisi ve tiroid foliküler hücre proliferasyonu tespit edilmiştir (123).

Kafein, histamin salınımını azaltır. Araştırmalarda kafeinin 520 mM dozlarda, ratların peritoneal mast hücrelerinden histaminin salınmasını önemli derecede baskıladığı gösterilmiştir. Kafeinin in vivo ve in vitro olarak allerjik reaksiyonları, mast hücrelerini etkileyerek baskıladığı belirtilmiştir (124).

Kafein, diabetik ratlarda oral glukoz toleransını iyileştirmiş ve glukozüriyi düşürmüştür (125). Kahve tüketimi ile Tip 2 diabet gelişme riskinin düştüğü gösterilmiştir (126).

Viral hepatitle, alkol tüketimiyle, kilo artışı ve glukoz metabolizmasının zayıflamasıyla oluşabilecek karaciğer hasarı riskinin, özellikle kafein (günde 2 kupa kahve) ile azaldığı gösterilmiştir (127).

Uzun süre kafein uygulaması (2-12 hafta) ratlarda karaciğer glikojen depolarını azaltmış, vücut yağ ağırlığını ve serum leptin düzeylerini düşürmüştür (128).

Kafeinin ratlarda, bazal lipolizi arttırdığı (129), nötrofil aktivitesini arttırarak, süperoksit üretimine etkisi olmadan miyeloperoksidaz (MPO) enziminin salınmasını stimüle ettiği düşünülmektedir (130).

Yüksek doz kafein alınımı insanlarda ve ratlarda kan basıncını yükseltmiş, adrenalin salınmasını arttırmıştır. Bu durum yetişkin popülasyonda koroner kalp hastalığı riskini arttırmaktadır (131-133).

Kafein 10-20 mg/kg dozda, ratlarda dalakta ve timusta adenozin deaminaz (ADA) aktivitesinde artmaya neden olmuştur. Aktivite artışı doz yükseldikçe devam etmiştir. Dalak ve timustaki ADA'nın yükselmesi kafeinin immünitede rol oynadığını düşündürmektedir (134).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda ağırlıkları 300 gr ile 350 gr arasında değişen toplam 32 adet, erkek Wistar türü albino sıçan kullanıldı. Tüm işlemler, 1986 Uluslararası Strazburg Hayvan Hakları Evrensel Beyannamesi şartlarına uygun olarak, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde, Etik Kurul onayı (2011 HADYEK 005) alınarak veteriner hekim kontrolünde gerçekleştirildi. Denekler; standart sıçan kafesleri içinde, kemirgenlere özel standart pellet yem ve su ile istedikleri kadar beslenen sıçanlardan seçildi.

Sıçanlar basit randomizasyon ile 8'erli 4 gruba ayrıldı.

Grup I, hasarsız kontrol grubu olarak değerlendirildi,

Grup II, 60 dk iskemi ve 2 saat reperfüzyona maruz bırakıldı deneyden 30 dk önce oral yolla 1 ml distile su verildi (Resim 1),

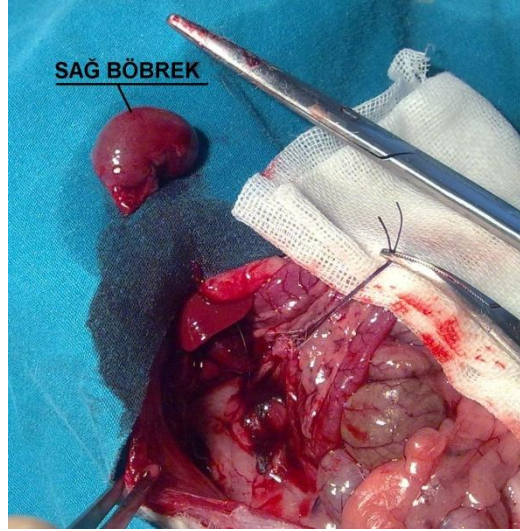
Grup III, 60 dk iskemi ve 2 saat reperfüzyona maruz bırakıldı ve bu gruptaki sıçanlara deneyden 30 dk önce oral yolla 15 mg/kg kafein 1 ml distile suya karıştırılıp verildi,

Grup IV, 60 dk iskemi ve 2 saat reperfüzyona maruz bırakıldı ve bu gruptaki sıçanlara deneyden 30 dk önce oral yolla 45 mg/kg kafein 1 ml distile suya karıştırılıp verildi.



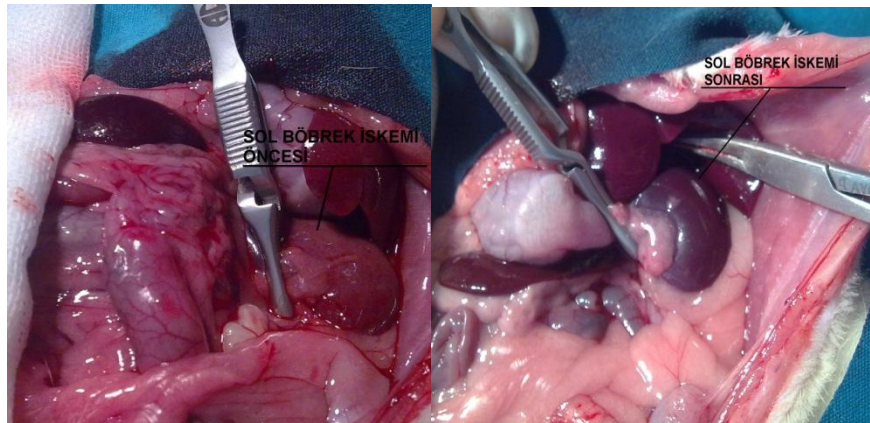
Resim 1: Sıçanlara oral distile su ve kafein uygulaması

Kafein deney günü hazırlanıp, 2 gruptaki sıçanlara 15 mg/kg ve 45 mg/kg dozdan uygulandı. Deney yapılan bütün hayvanlar 50 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg xylazin ile uyutulduktan sonra kan ve böbrek dokusu örnekleri alındı. Grup II-III ve IV'te böbreklere uygulanan iskemi-reperfüzyon hasarı; steril povidon iyodür ile sıçan supin pozisyonda operasyon sahası temizliği yapıldıktan sonra midabdominal (karın orta hattı) insizyon yapıp, sağ böbreğe ulaşılarak nefrektomi uygulandı (Resim 2).



Resim 2: Sağ böbrek nefrektomi uygulaması

Sağ böbrek nefrektomisi sonrası sol böbreğe ulaşılarak, hilus seviyesinde kleplendi. 60 dk boyunca klepli böbrek iskemiye maruz bırakıldı (iskemi; renk değişimi ve pulsasyon yokluğu ile izlendi). 60 dk sonra klempten çıkarılıp 2 saat reperfüzyon uygulandı (reperfüzyon; renk değişimi ve pulsasyon varlığı ile izlendi) (Resim 3).



Resim 3: Sol böbreğin iskemi başlangıcında ve sonunda ki görüntüsü

Deney sırasında meydana gelebilecek dehidratasyona bağlı sıvı kaybını önleme amacıyla 10 ml steril serum fizyolojik ile ıslatılmış spanla hayvanların operasyon sahası örtüldü. Kafein 45 mg/kg verilen gruptaki sıçanlardan biri deney sırasında anesteziye bağlı olarak kaybedildi. 2 saatlik reperfüzyon sonrasında hayvanlardan kan alınarak hayvanlar eksanguinasyon yöntemi ile feda edildi ve böbrek dokuları alındı. Alınan örnekler çalışma için en kısa sürede biyokimya laboratuvarına ulaştırıldı. Ulaştırılan örneklerden kanlar, serumları ayrılıp böbrek doku örnekleriyle beraber çalışma zamanına kadar –80 derecede muhafaza edildi. Serumlardan ve böbrek dokusu homojenizasyonu sonucu elde edilen homojenatlardan antioksidan parametreler malondialdehit (MDA), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (CAT), protein karbonil (PC) ve nitrik oksit (NO) düzeyleri çalışıldı.

Serumlardan ayrıca böbrek fonksiyon testlerinin (BUN, kreatinin ve sistatin C) düzeyleride çalışıldı.

3.1. Biyokimyasal İnceleme

Böbrek Doku Örneklerinin Homojenize Edilmesi

Böbrek doku örnekleri 1/10 oranında 50 mM Tris-HCl (pH=7.4) tamponda, buz içinde, soğukta homojenize edilmiştir (135). Hazırlanan homojenatların bir kısmından malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO) ve protein karbonil (PC) düzeyleri tayin edilmiştir. Homojenatların geri kalan kısmı, soğutmali santrifüjde + 4 °C’de 3.500 rpm’de 30 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi. Ayrılan süpernatantlardan katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-PX) ve doku protein düzeyi tayini yapılmıştır.

Süper oksit dismutaz (SOD) aktivitesini tayin etmek için kalan süpernatant, kloroform/etanol karışımı ile 1/1 (v/v) oranında muamele edilip, 3500 rpm’de +4°C’de 40 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte oluşan etanol fazından alınarak protein ve SOD enzim aktivite tayini yapıldı (136).

3.1.1. Doku Protein Düzeyi Ölçümü

Protein düzeylerinin ölçümü Lowry yöntemi ile yapıldı (137). Bakır-protein kompleksi alkali çözeltide oluşarak fosfomolibdat-fosfotungstat reaktifini (Folin-Ciocalteu-Phenol reaktifi) redükler ve koyu mavi bir renk oluşur. Oluşan rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Folin reaktifinin ilavesinde dikkat edilmesi gerekenler; Bu reaktif sadece asit ortamda dayanıklıdır, fakat bahsedilen bu redükleme ise pH 10'da oluşmaktadır. Bu sebeple folin reaktifi hızlı bir şekilde alkali bakır-protein çözeltisine ilave edilmeli ve karıştırılmalıdır. Bu uygulama ile Folin reaktifi parçalanmadan önce redüklenme olayı gerçekleşir

Kimyasallar

Na₂CO₃, NaOH, CuSO₄, Folin ciocalteu's fenol reaktifi, Bovine serum albumin

Ölçüm yöntemi

Standart grafiği elde etmek için konsantrasyonunu bildiğimiz Bovine serum albuminden hazırlanmış çözeltiler kullanıldı "Optik dansite (OD) mg/ml protein konsantrasyonu" grafiği çizilerek protein değerleri bu grafikten okundu. 0,01 mL numune örnek tüplerine alındı ve üzerlerine 0,49 mL distile su ilave edildi. Kör tüpüne ise 0,5 mL distile su konuldu. Kimyasallarla elde ettiğimiz ölçüm reaktifi 2,5 mL olarak deney tüplerine dağıtıldı. Alt üst edilerek karıştırılan tüpler 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrası deney tüplerine 0,25 mL hazırlanan Folin ciocalteu's fenol reaktifi ilave edilip 30 dakika oda ısısında inkübasyona alındı. Süre sonunda standart ve numuneler köre karşı 700 nm'de okundu.

Hesaplama

Protein (mg/ml) = grafikten okunan değer x faktör

F (faktör) = standart hacmi (0,5 ml)/ numune hacmi (0,010 ml) = 50

Not: Faktör, kullanılan numune miktarına göre değişir. Numunenin miktar değişikliği distile su hacmi ile ters orantılı olarak tüpe pipetlenir.

3.1.2. Doku ve Serum Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Ölçülmesi

Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi düzeyi, Sun ve arkadaşlarının yöntemi ile Durak ve arkadaşlarının yapmış olduğu modifikasyona göre tespit edildi (136,138). Bu yöntemde SOD aktivitesi, ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksitin nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgemesi esasına dayanır. Meydana gelen süperoksit radikalleri NBT'yi indirgeyerek renkli formazon oluşturur. Oluşan kompleks 560 nm'de maksimum absorban verir. Enzimin bulunmadığı ortamda bu indirgenme meydana gelip mavi-mor renk oluşmaktadır. Ortamda SOD bulunduğunda ise NBT indirgenmesi gerçekleşmeyip mavi-mor renk meydana gelmemekte ve enzim miktar ve aktivitesine bağlı olarak açık renk oluşmaktadır.

$$\text{Enzimin \% inhibisyonu} = (\text{Abs}_{\text{kör}} - \text{Abs}_{\text{num}}) / \text{Abs}_{\text{kör}} \times 100$$

Bir SOD ünitesi; NBT redüksiyonunu % 50 oranında inhibe eden enzim aktivitesidir. Sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

Kimyasallar

150 µmol/L NBT, 0,3 mmol/L xanthine, 0,6 mmol/L EDTA (2 Na tuzu), 400 mmol/L Na₂CO₃, 1 g/L bovine serum albumin, xanthine oxidase (XO), 2 M (NH₄)₂SO₄, 0,8 mmol/L CuCl₂

Ölçüm yöntemi

Kimyasallar kullanılarak hazırlanan ölçüm reaktifinden 2,85 mL deney tüplerine alındı. Üzerlerine 0,1 mL numunelerin ekstraktlarından ilave edildi. Kör tüpüne ekstrakt yerine 0,1 mL distile su konuldu. Elde edilen tüm karışımların üzerine 0,05 mL ksantin oksidaz ilave edilip, hızlı bir şekilde alt üst edilerek karıştırıldı ve oda ısısında 20 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası tüplere stop solüsyonu olarak 0,1 mL bakır klorür eklendi ve numunelerin köre karşı 560 nm'de absorbanları okundu.

Hesaplama

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(\text{Absorbans kör } \{K\} - \text{Absorbans Örnek } \{Ö\})] / K \times 100$$

% 50'lik inhibisyona 1 U denildiği için

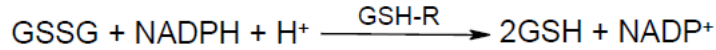
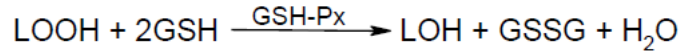
$$\text{Aktivite (U/ml)} = [(\% \text{ inhibisyon}/50) \times (1 /0,1)] \quad \text{ml.}$$

$U/ml = [(K-Ö) / K] \times 20 \times 5$ (sulandırma faktörü)

Spesifik aktivite (U/ mg protein) = [U/mL / mg/ml protein]

3.1.3. Doku ve Serum Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesinin Ölçümü

Glutasyon Peroksidaz aktivitesi Paglia ve arkadaşlarının yöntemine göre ölçüldü (139). GSH-Px ortamda hidrojen peroksit bulunduğunda redükte glutasyonun (GSH) okside glutatyonu (GSSG) yükseltgenmesini katalizler. GSH-Px'in hidrojen peroksidin bulunduğu ortamda oluşturduğu GSSG, glutasyon redüktaz ve NADPH yardımı ile GSH'a indirgenir. GSH-Px aktivitesi NADPH'ın NADP'ye yükseltgenmesi sırasındaki absorbans seviyesinde meydana gelen azalmanın 340 nm'de okunmasıyla hesaplanır.



Enzim Ünitesi: NADPH'ın birim zamanda okside olan mikromol miktarıdır.

Kimyasallar

150 mM redükte GSH, GSH-Redüktaz, 8 mM NADPH, 1 M NaN₃ (Sodyum azid), 50 mM H₂O₂, fosfat tamponu (pH = 7,50 mM), 3,2 M (NH₄)₂S₀₄

Ölçüm yöntemi

Hazırlanan deney tüplerine; 2,650 mL EDTA'lı fosfat tamponu,
0,1 mL redükte GSH,
0,1 mL NADPH,
0,01 mL GSH-Redüktaz,
0,01 mL NaN₃,
0,02 mL numune

Karışımları hazırlanarak 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası deney tüplerine 0,1 mL hidrojen peroksit ilave edilip 5 dakika boyunca dalga boyu 340 nm'ye ayarlanmış spektrofotometrede numunelerin absorbans değerleri kaydedildi. Aktivite

azalışının lineer olduğu absorbans aralığının 1 dakikalık süresi esas alınarak hesap yapıldı.

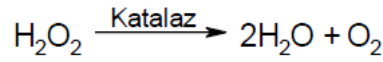
Hesaplama

$$\text{IU/L} = [(\Delta A/t)/6,22 \times 10^{-6}] \times (1 / 0,02)$$

$$\text{Spesifik aktivite IU/mg protein} = (\text{IU/L}) / (1000 \times W)$$

3.1.4. Doku Katalaz (CAT) Aktivitesinin Ölçümü

Katalaz aktivitesi Aebi yöntemine göre çalışıldı (140). 240 nm’de hidrojen peroksit maksimum absorbans verir. Deney ortamına eklenen H₂O₂ katalaz aracılığıyla su ve oksijene parçalanmakta, bu ise kendini ultraviyole spektrumda absorbans azalması olarak göstermektedir. CAT enziminin aktivitesi ile absorbanstaki bu azalma doğru orantılıdır. Reaksiyon şu şekildedir.



Kimyasallar

Fosfat tamponu (pH 7,50 mM) ve absorbansı 0.500 nm’ye tampon ile ayarlanmış olan H₂O₂’li fosfat tamponu

Ölçüm yöntemi

240 nm dalga boyunda, fosfat tamponuna göre sıfırlanan köre karşı H₂O₂ çözeltisi 0,500’e ayarlandı. Kör tüpüne alınan 2,99 ml fosfat tamponu üzerine 0,01 mL H₂O₂ çözeltisi eklenerek kör oluşturuldu. Okutulacak numune tüplerinede 2,99 mL H₂O₂ çözeltisi ve üzerine 0,01 mL numune eklenmesi ile absorbans azalması her 15 sn’de bir defa olmak üzere 2 dakika süre ile kaydedildi. 1 dakikalık lineer absorbans azalmasının değerleri hesaplamada esas alındı.

Hesaplama

$$k = \{[2,3 \times \log (\text{OD}_1/ \text{OD}_2)] / \Delta t (\text{sn})\} \text{ k/mg protein} = k / [(\text{mg/ml protein}) \times 1000]$$

3.1.5. Doku ve Serum Nitrik Oksit (NO) Düzeylerinin Ölçümü

Endojen olarak, vücutta üretilen nitrik oksitin doku ve vücut sıvılarındaki miktarı, pek çok çalışmada nitrit ve nitrat olarak ifade edilmiştir (141). Bunun sebebi nitrik oksitin, üretildiği bölgede saniyeler içinde okside olarak önce nitrite (NO_2^-) daha sonrada nitrata (NO_3^-) dönüşmesidir. Bununla birlikte proteinden zengin homojenat, serum ve plazma gibi sıvılarda spesifik olmayan reaksiyonlar gerçekleşebileceğinden, Griess reaksiyonu ile ölçümlerde belli bazı sıkıntılar yaşanmaktadır. Bu nedenle biz nonspesifik reaksiyonları engelleyebilmek için numuneleri önce deproteinize edip daha sonra nitrit ve nitrat düzeylerini tayin ettik (142). Numunelerin nitrit ve nitrat miktarları deproteinizasyondan sonra Griess reaksiyonu ile belirlendi (143). Total nitrit (nitrit+nitrat) düzeyi modifiye kadmiyum redüksiyon metodu ile tespit edildi. Bakır (Cu) kaplı kadmiyum granülleri pH 9,7 glisin tamponunda deproteinize numune süpernatantı ile 90 dakikalık inkübasyona bırakılarak nitratin redüksiyonu sağlandı. Üretilen nitrit düzeyi; sülfanilamid ve buna bağlı N-naftiletülen diamin (NNDA) diazotizasyonu ile reaksiyon sonu oluşan pembe bir rengin 545 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunması ile belirlendi

Nitrit Standartlarının hazırlanması

0,1 mol/L NaNO_2 (sodyum nitrit) stok solüsyon olup oda ısısında 9 ay boyunca kararlıdır. Standart solüsyonundan değişik oranlarda dilüsyon yapılarak standart eğri çizildi.

Kimyasallar

Çalışma reaktifi; pH 9,7 Glisin-NaOH tamponu, Kadmiyum granülleri (Cd), N-naftiletülen diamine (NNDA), sülfanilamid, 5 mmol/L CuSO_4 , 0,1 mol/L H_2SO_4 standart solüsyonu (0,1 mol/L NaNO_2 , 10 mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ içinde çözülür.)

Kadmiyumların aktifleştirilmesi

Kadmiyumlar, 20 mililitrelik plastik tüplere (ağız kapatılan) 2,5-3 gr olarak dağıtılır. Kadmiyum granülleri 3 kez deiyonize su ile yıkanır. CuSO_4 solüsyonu içinde 1-2 dakika bekletilir ve solüsyon tekrar süzülerek dökülür. 3 kez glisin

tamponu ile yıkanır. Bu işlemler sonrası aktifleşen granüller 10 dk içinde kullanılır. Granüller kullanım sonrası hemen distile su ile yıkanır ve sülfirik asit (H₂SO₄) solüsyonu içinde en az bir gün saklanır.

Ölçüm Yöntemi

Deproteinizasyon işlem uygulaması: 250 µL numune + 1 mL ZnSO₄ (75 mmol/L) karışımı vortekslenir. Üzerine 1,250 mL NaOH (55 mmol/L) ilave edilip tekrar vortekslenir ve 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Elde edilen süpernatant numune olarak kullanılır.

Glisin tamponu ile yıkanmış aktif granül tüplerinin üzerine 1 mL glisin tamponu ilave edilir. Üzerine 1 mL deproteinize numune konur ve 2 mL distile su eklenir. Oda ısısında 90 dakika inkübe edilir. İnkübasyon sonunda ayrı bir tüpe, 2 mL alınıp üzerine 2,5 ml distile su ve 1 mL sülfanilamid, 1 mL NNDA ilave edilerek 1 saat inkübe edilir. İkinci inkübasyon periyodu sonrasında 545 nm'de köre karşı okunur. Elde edilen veriler NO metabolitlerinin toplam konsantrasyonunu göstermektedir ve µmol/L ile µmol/g yaş doku olarak ifade edilir.

3.1.6. Doku ve Serum Lipid Peroksit (LPO) Düzeylerinin Ölçümü

Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA), tiyobarbitürik asit (TBA) ile 90 °C'de reaksiyona girer ve pembe renkli kromojen oluşturur. MDA düzeyinin tayini oluşan pembe renkli bileşiğin 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü esasına dayanır (144).

Kimyasallar

%10'luk Trisiklik asetik asit (TCA), % 0,675'lik Tiyobarbitürik asit (TBA), Stok standart solüsyonu (1,1,3,3 tetra metoksipropan)

Ölçüm Yöntemi

Kapaklı cam deney tüplerine 2,5 ml %10'luk TCA konuldu, üzerlerine 0,5 ml numune eklenerek vorteksle karıştırıldı. Elde edilen karışımların ağızları kapatılarak 90 °C'de 15 dakika inkübe edildiler. İnkübasyon sonrası soğuk su altında soğutulan numuneler 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifügasyon sonrası elde edilen

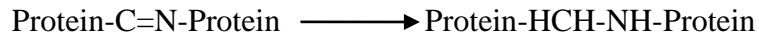
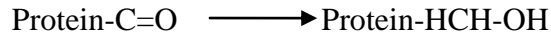
süpernatantlardan 2 ml ayrı tüplere aktarıldı, bunların üzerlerine % 0,675'lik TBA ilave edildi ve tekrar 90 °C'de 15 dakika inkübe edildiler. İnkübasyon sonrası tekrar soğuk su altında soğutulan numuneler, 532 nm'de köre karşı absorbanları okutuldu. Kõr tũpũne de numune yerine 0,5 ml distile su konularak aynı işlemler yapıldı.

Hesaplama

MDA (nmol/ g.yaş doku) = (Örnek OD/Standart OD) x Standart Konsantrasyonu

3.1.7. Doku ve Serum Protein Karbonil (PC) Düzeylerinin Ölçümü

Protein karbonil grubu düzeyleri, protein karbonil gruplarının 2,4-dinitrofenilhidrazin ile reaksiyonu sonucu 2,4-dinitrofenilhidrazon oluşması prensibine dayanarak spektrofotometrik olarak (370 nm) analiz edilerek ölçülmüştür (145).



Kimyasallar

%20 TCA, 2M HCl, 10mM 2,4 DNPH (2M HCl'de hazırlandı), Etanol/Etil asetat (1/1), 100 mM NaOH

Ölçüm Yöntemi

1,5 mL'lik eppendorf tüplerine alınan 0,5 mL numunelerin üzerine 0,5 mL %20'lik TCA eklendi ve vorteksle karıştırıldı. Elde edilen karışım 11000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan süpernatantlar dikkatlice dökülerek pelletlerinden ayrıldı. Kalan pelletlerin her birinin üzerine 10mM 2,4 dinitrofenilhidrazin (2M HCl'de hazırlandı) ilave edildi ve oda ısısında 1 saat bekletildi. Bu süre içerisinde, her 10-15 dk'da bir numuneler vorteksle karıştırıldı. Süre sonunda numunelerin üzerine 0,5 mL %20'lik TCA ilave edildi ve vorteksle

karıştırıldı. Karıştırma işlemi sonrası 11000 rpm’de 3 dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar pelletlerinden dikkatli bir şekilde ayrıldı. Kalan pelletlerin üzerine 1 mL etanol-etil asetat eklenip vorteks cihazı ile karıştırıldı ve 10 dk. beklendi, süre sonrası 11000 rpm 3 dk santrifüj edildi. Etanol-etil asetat basamağı numunelere 3 kere tekrar edildi. Bu basamak sonrası elde edilen süpernatant pelletinden ayrıldı ve üzerine 0,9 mL 100 mM NaOH ilave edilip 15 dk 37 °C’de çalkalayıcıda çözdürüldü. Çözünme işlemi sonrası, çözünmeyenleri çöktürmek için 11000 rpm’de 5 dk santrifüj uygulanıp, 370 nm’de numuneler köre karşı okundu.

Hesaplama

Protein karbonil düzeyleri nmol/ml olarak hesaplandı. Hesaplamalar sırasında 2,4-dinitrofenilhidrazin için 370 nm’de molar absorpsiyon katsayısı $s = 22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ alındı. Doku örnekleri için bu sonuçlar Lowry metoduyla ölçülen protein miktarları kullanılarak nmol/mg protein olarak ifade edildi.

$$\text{Karbonil (M)} = [(AbsN - AbsC) / 22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}] \times (16 \times 10^6)$$

Protein karbonil (nmol/mg protein) = Karbonil (nmol/ml) / Protein (mg/ml)
(Doku örneklerinin hesabı için)

3.1.8. Serum BUN, Kreatinin, Sistatin-C Düzeyi Ölçümü

Numunelerden ölçülen BUN (Üre), kreatinin ve sistatin-C parametreleri Roche cobas e6000 otoanalizör cihazında çalışılmıştır. Ölçülen parametrelerin çalışma prensipleri ise;

BUN: Üreaz ve glutamat dehidrogenaz ile kinetik test (146-149).

Kreatinin: Kinetik kolorimetrik test Jaffe yöntemine dayanmaktadır (150-152).

Sistatin-C: Partikül yüzeyi genişletilmiş immünotürbidimetrik test yöntemi (153).

İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Windows 15 programı ile yapıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirme One-way ANOVA testi ve sonrasında Post-hoc LSD testi kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel analizlerde $p < 0.05$ değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Doku (Böbrek) SOD Düzeyleri

Böbrek dokusu SOD aktivitesi, iskemi-reperfüzyon grubu ve kafeinli gruplarda kontrole göre artmış olarak bulunmuş, artışın kafeinli gruplarda dozla ilgisi görülmemiştir.

Böbrek dokusu SOD aktivitesi için kontrol grubu ile diğer 3 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$).

İskemi-reperfüzyon grubunu kafein grupları ile karşılaştırdığımızda aralarında önemli istatistiksel olarak fark bulunmamıştır.

Kafein 15 mg ile Kafein 45 mg grupları arasında da anlamlı istatistiksel fark tespit edilmemiştir (Tablo 6).

Tablo 6: Doku SOD Aktivitesi (Ortalama±standart hata)

SOD (U/mg protein)	MEAN± Standart hata	Numune sayısı
KONTROL	0,006±0,001	8
İSKEMİ-REPERFÜZYON	0,021±0,004	8
KAFEİN 15 mg	0,023±0,004	8
KAFEİN 45 mg	0,020±0,007	7

4.2. Doku (Böbrek) GSH-Px Düzeyleri:

Böbrek dokusu GSH-Px aktivitesi, iskemi-reperfüzyon grubu ve kafeinli gruplarda kontrole göre artmış olarak bulunmuş, artışın kafeinli gruplarda dozla ilgisi görülmemiştir.

Böbrek dokusu GSH-Px aktivitesi için kontrol grubu ile diğer 3 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$).

Böbrek dokusu GSH-Px aktivitesi için iskemi-reperfüzyon grubu ile kafeinli gruplar karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Kafein 15mg grubunu Kafein 45mg grubu ile karşılaştırdığımızda aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 7).

Tablo 7: Doku GSH-Px Aktivitesi (Ortalama±standart hata)

GSH-Px (U/g protein)	MEAN± Standart hata	Numune sayısı
KONTROL	1,927±0,474	8
İSKEMİ-REPERFÜZYON	4,091±0,766	8
KAFEİN 15 mg	4,295±0,518	8
KAFEİN 45 mg	3,901±0,738	7

4.3. Doku (Böbrek) Katalaz Düzeyleri:

Böbrek dokusu katalaz aktivitesi iskemi-reperfüzyon ve kafeinli gruplarda kontrole göre artmış olarak bulundu, ancak sadece yüksek doz kafeinli gruptaki aktivite artışının anlamlı olduğu görülmüştür (Grafik 1).

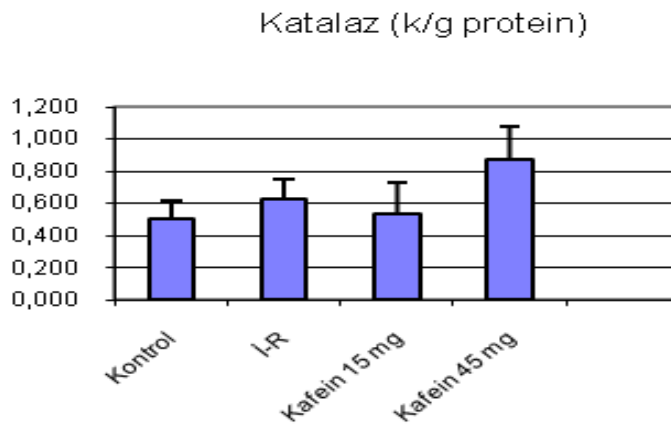
Böbrek dokusu katalaz aktivitesi için kontrol grubu ile iskemi-reperfüzyon ve Kafein 15 mg grupları karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol grubunun Kafein 45 mg grubu ile karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$).

İskemi-reperfüzyon grubunun kafeinli gruplarla karşılaştırılmasında Kafein 15 mg grubu ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Kafein 45 mg grubu ile karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$).

Kafein 15 mg grubu ile Kafein 45 mg grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 8).

Tablo 8: Doku Katalaz Aktivitesi Düzeyleri (Ortalama±standart hata)

Katalaz (k/g protein)	MEAN± Standart hata	Numune sayısı
KONTROL	0,501±0,111	7
İSKEMİ-REPERFÜZYON	0,625±0,120	8
KAFEİN 15 mg	0,540±0,190	8
KAFEİN 45 mg	0,877±0,203	7



Grafik 1: Doku Katalaz Enzim Düzeyleri

4.4. Doku (Böbrek) NO Düzeyleri:

Böbrek dokusu NO düzeyleri iskemi-reperfüzyon ve kafeinli gruplarda kontrole göre artmış olarak bulundu, ancak sadece iskemi-reperfüzyon grubundaki aktivite artışının anlamlı olduğu görülmüştür.

Böbrek dokusu NO düzeyleri için kontrol grubu ile kafeinli gruplar karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol grubunun iskemi-reperfüzyon grubu ile karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$).

İskemi-reperfüzyon grubunun kafeinli gruplarla karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Kafein 15 mg grubu ile Kafein 45 mg grubu karşılaştırılmasında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 9).

Tablo 9: Doku NO Düzeyleri (Ortalama±standart hata)

NO ($\mu\text{mol/g}$ yaş doku)	MEAN± Standart hata	Numune sayısı
KONTROL	2,309±0,373	8
İSKEMİ-REPERFÜZYON	2,887±0,660	8
KAFEİN 15 mg	2,455±0,511	8
KAFEİN 45 mg	2,656±0,537	7

4.5. Doku (Böbrek) MDA Düzeyleri:

Böbrek dokusu MDA düzeyleri iskemi-reperfüzyon ve kafeinli gruplarda kontrole göre artmış olarak bulundu, ancak sadece iskemi-reperfüzyon grubundaki aktivite artışının anlamlı olduğu görülmüştür (Grafik 2).

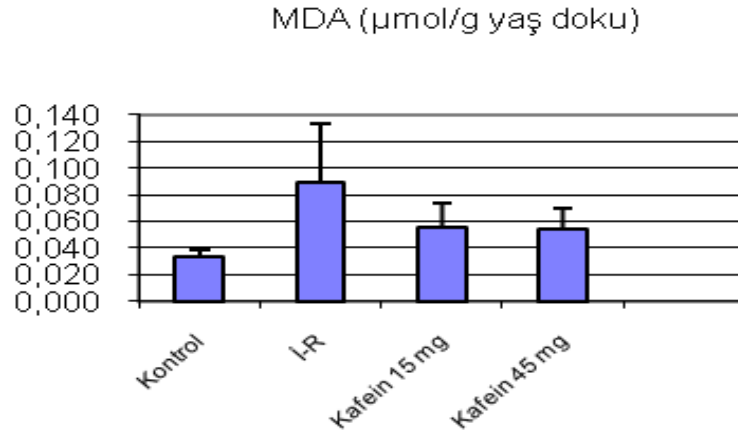
Böbrek dokusu MDA düzeyleri için kontrol grubu ile kafeinli gruplar karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol grubunun iskemi-reperfüzyon grubu ile karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,005$).

İskemi-reperfüzyon grubunun kafeinli gruplarla karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,005$).

Kafein 15 mg grubu ile Kafein 45 mg grubu karşılaştırılmasında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 10).

Tablo 10: Doku MDA Düzeyleri (Ortalama±standart hata)

MDA ($\mu\text{mol/g}$ yaş doku)	MEAN± Standart hata	Numune sayısı
KONTROL	0,033±0,006	8
İSKEMİ-REPERFÜZYON	0,089±0,044	8
KAFEİN 15 mg	0,056±0,017	8
KAFEİN 45 mg	0,054±0,016	7



Grafik 2: Doku MDA Düzeyleri

4.6. Doku (Böbrek) PC Düzeyleri:

Böbrek dokusu PC düzeyleri, iskemi-reperfüzyon grubu ve kafeinli gruplarda kontrole göre yüksek olarak bulunmuştur (Grafik 3).

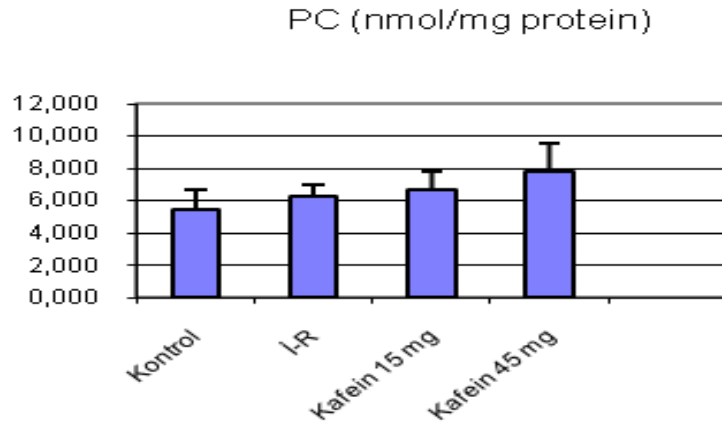
Böbrek dokusu PC düzeyleri için kontrol grubu ile iskemi-reperfüzyon ve Kafein 15 mg grupları karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol grubunun Kafein 45 mg grubu ile karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$).

İskemi-reperfüzyon grubunu kafein grupları ile karşılaştırdığımızda, Kafein 15 mg grubu ile aralarında anlamlı istatistiksel fark bulunmamıştır. Kafein 45 mg grubu ile karşılaştırmasında anlamlı istatistiksel fark bulunmuştur ($p<0,05$).

Kafein 15 mg ile Kafein 45 mg grupları arasındada anlamlı istatistiksel fark tespit edilmemiştir (Tablo 11).

Tablo 11: Doku PC Düzeyleri (Ortalama±standart hata)

PC (nmol/mg protein)	MEAN± Standart hata	Numune sayısı
KONTROL	5,509±1,205	8
İSKEMİ-REPERFÜZYON	6,249±0,707	8
KAFEİN 15 mg	6,703±1,150	8
KAFEİN 45 mg	7,814±1,752	7



Grafik 3: Doku PC Düzeyleri

4.7. Serum SOD Düzeyleri:

Serum SOD aktivitesi, iskemi-reperfüzyon grubu ve kafeinli gruplarda kontrole göre artmış olarak bulunmuş, artışın kafeinli gruplarda dozla ilgisi görülmemiştir.

Serum SOD aktivitesi için kontrol grubu ile diğer 3 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$).

İskemi-reperfüzyon grubunu kafein grupları ile karşılaştırdığımızda aralarında önemli istatistiksel olarak fark bulunmamıştır.

Kafein 15 mg ile Kafein 45 mg grupları arasındada anlamlı istatistiksel fark tespit edilmemiştir (Tablo 12).

Tablo 12: Serum SOD Aktivitesi (Ortalama±standart hata)

SOD (U/mL)	MEAN± Standart hata	Numune sayısı
KONTROL	1,516±0,426	8
İSKEMİ-REPERFÜZYON	3,461±0,145	8
KAFEİN 15 mg	3,605±0,198	8
KAFEİN 45 mg	3,379±0,151	7

4.8. Serum GSH-Px Düzeyleri:

Serum GSH-Px aktivitesi, iskemi-reperfüzyon grubu ve kafeinli gruplarda kontrole göre artmış olarak bulunmuş, artışın kafeinli gruplarda dozla ilgisi görülmüştür (Grafik 4).

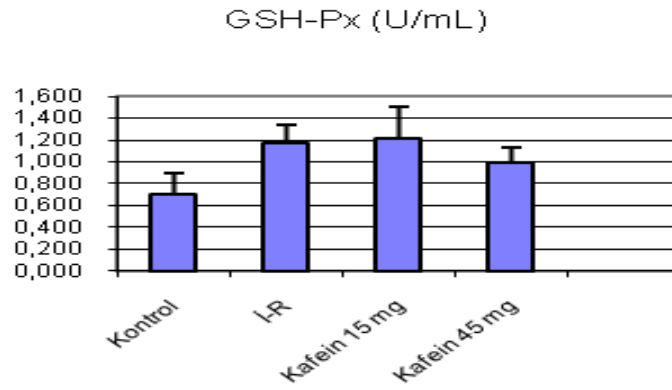
Serum GSH-Px aktivitesi için kontrol grubu ile diğer 3 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$).

Serum GSH-Px aktivitesi için iskemi-reperfüzyon grubu ile kafeinli gruplar karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Kafein 15mg grubunu Kafein 45mg grubu ile karşılaştırdığımızda aralarında ($p<0,05$) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (Tablo 13).

Tablo 13: Serum GSH-Px Aktivitesi (Ortalama±standart hata)

GSH-Px (U/mL)	MEAN± Standart hata	Numune sayısı
KONTROL	0,701±0,198	8
İSKEMİ-REPERFÜZYON	1,171±0,161	8
KAFEİN 15 mg	1,220±0,286	8
KAFEİN 45 mg	0,998±0,129	7



Grafik 4: Serum GSH-Px Aktivitesi

4.9. Serum NO Düzeyleri:

Serum NO düzeyleri iskemi-reperfüzyon ve kafeinli gruplarda kontrole göre yüksek olarak bulunmuş, artışın kafeinli gruplarda dozla ilgisi görülmüştür (Grafik 5).

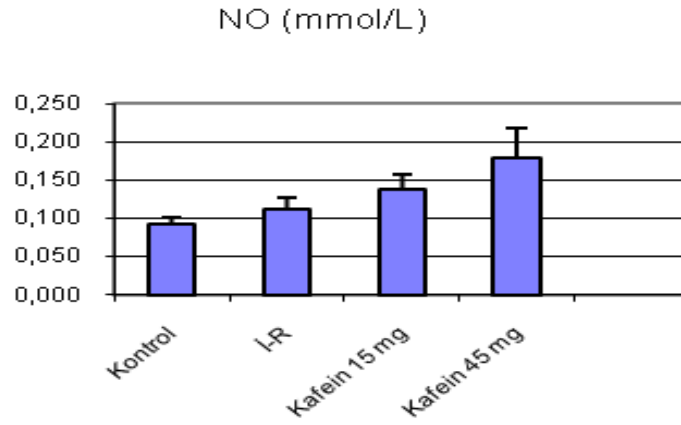
Serum NO düzeyleri için kontrol grubu ile diğer 3 grubun karşılaştırılmasında, iskemi reperfüzyon grubu ile aralarında anlamlı istatistiksel fark bulunmamıştır. Kafeinli grupların karşılaştırılmasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$).

İskemi-reperfüzyon grubunun kafeinli gruplarla karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$).

Kafein 15 mg grubu ile Kafein 45 mg grubu karşılaştırılmasında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 14).

Tablo 14: Serum NO Düzeyleri (Ortalama±standart hata)

NO (mmol/L)	MEAN± Standart hata	Numune sayısı
KONTROL	0,093±0,009	8
İSKEMİ-REPERFÜZYON	0,112±0,015	8
KAFEİN 15 mg	0,138±0,019	8
KAFEİN 45 mg	0,179±0,038	7



Grafik 5: Serum NO Düzeyleri

4.10. Serum MDA Düzeyleri:

Serum MDA düzeyleri, iskemi-reperfüzyon grubu ve kafeinli gruplarda kontrole göre artmış olarak bulunmuş, artışın kafeinli gruplarda dozla ilgisi görülmemiştir.

Serum MDA düzeyleri için kontrol grubu ile diğer 3 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$).

İskemi-reperfüzyon grubunu kafein grupları ile karşılaştırdığımızda aralarında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır.

Kafein 15 mg ile Kafein 45 mg grupları arasındada anlamlı istatistiksel fark tespit edilmemiştir (Tablo 15).

Tablo 15: Serum MDA Düzeyi (Ortalama±standart hata)

MDA ($\mu\text{mol/L}$)	MEAN± Standart hata	Numune sayısı
KONTROL	2,391±0,591	8
İSKEMİ-REPERFÜZYON	3,727±0,217	8
KAFEİN 15 mg	3,874±0,355	8
KAFEİN 45 mg	3,683±0,156	7

4.11. Serum PC Düzeyleri:

Serum PC düzeyleri, iskemi-reperfüzyon grubu ve kafeinli gruplarda kontrole göre yüksek olarak bulunmuş, artışın kafeinli gruplarda dozla ilgisi görülmemiştir.

Serum PC düzeyleri için kontrol grubu ile diğer 3 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

İskemi-reperfüzyon grubunu kafein grupları ile karşılaştırdığımızda aralarında istatistiksel olarak önemli fark bulunmamıştır.

Kafein 15 mg ile Kafein 45 mg grupları arasındada anlamlı istatistiksel fark tespit edilmemiştir (Tablo 16).

Tablo 16: Serum PC Düzeyi (Ortalama±standart hata)

PC ($\mu\text{mol/mL}$)	MEAN± Standart hata	Numune sayısı
KONTROL	0,752±0,137	8
İSKEMİ-REPERFÜZYON	0,840±0,329	8
KAFEİN 15 mg	0,832±0,252	8
KAFEİN 45 mg	0,775±0,333	7

4.12. Serum BUN, Kreatinin, Sistatin C Düzeyleri:

Serum BUN ve sistatin C düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunmadı.

Serum kreatinin düzeyleri, iskemi-reperfüzyon grubu ve kafeinli gruplarda kontrole göre yüksek olarak bulunmuş, artışın kafeinli gruplarda dozla ilgisi görülmüştür (Grafik 6).

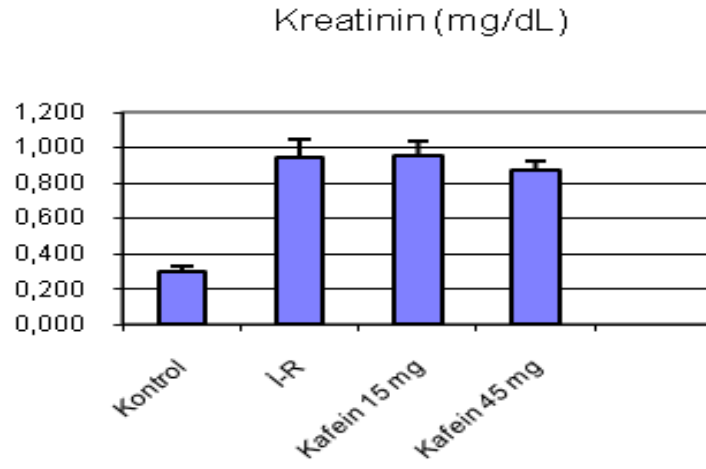
Serum kreatinin düzeyi için kontrol grubu ile diğer 3 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$).

İskemi-reperfüzyon grubunu kafein grupları ile karşılaştırdığımızda aralarında istatistiksel olarak önemli fark bulunmamıştır.

Kafein 15 mg grubu ile Kafein 45 mg grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 17).

Tablo 17: Serum Kreatinin Düzeyleri (Ortalama±standart hata)

Kreatinin (mg/dL)	MEAN± Standart hata	Numune sayısı
KONTROL	0,305±0,030	8
İSKEMİ-REPERFÜZYON	0,950±0,103	8
KAFEİN 15 mg	0,967±0,086	8
KAFEİN 45 mg	0,871±0,056	7



Grafik 6: Serum Kreatinin Düzeyleri

5. TARTIŞMA

İskemi ve reperfüzyon, organ ve dokularda hasara sebep olur. İskemi, organ ve dokuların yaşaması ve normal fizyolojik işlevlerini devam ettirmesi için gerekli olan oksijenin alınmasını engeller. Oksijenlenmiş kanın hızlı bir şekilde iskemik dokulara geri dönüşü (reperfüzyonu) iskemik hücre ölümüne engel olmaktadır, ancak reperfüzyonun kendisi de hücre hasarı ve ölümüne katkıda bulunur (8,9). İskemik hasara oksijen yokluğu (hipoksi) sebep olurken reperfüzyon hasarına ise oksijenin geri dönmesi sebep olmaktadır (10).

Böbrek iskemisinin oluşmasındaki asıl etken böbrek kan akımındaki belirgin azalmadır. Bu durum pre-renal erken böbrek yetmezliğinde, böbrek arter embolizminde, trombozunda, aterosklerozise bağlı olarak gelişebilir (31,32). Böbrek cerrahisi ve vasküler cerrahi gibi prosedürlerde böbrek iskemisi gelişmesine sebep olabilirler (33,34).

Hücresele düzeyde incelendiğinde böbrek iskemisi proksimal tübüllerden su, iyon ve makromoleküllerin taşınmasında esas enerji kaynağı olan ATP'nin azalmasına ve Na⁺K⁺ATPaz pompasının işlevini yitirmesine yol açar. Bu durum hücre içinde sodyum iyonlarının artmasına ve hücre içi aşırı su birikimi ile hücrenin şişmesi ve ölümüne sebep olmaktadır (35,36). Süperoksit ve hidroksil benzeri reaktif oksijen radikallerinin oluşması ve/veya antioksidan savunma mekanizmalarındaki yetersizlik oksidatif strese neden olmaktadır. Oksidatif stres böbrek iskemisi reperfüzyon hasarının gerçekleşmesinde önemli bir yer tutmaktadır (41). Birçok çalışmada böbrek iskemisi reperfüzyon hasarı sırasında fazla miktarda reaktif oksijen radikalinin ortamda bulunduğu, biyokimyasal ve immunohistokimyasal yöntemlerle gösterilmiştir (42,43,44). ROR'a bağlı olarak böbrekte erken tübüler nekroz meydana gelmektedir. İskemi reperfüzyon hasarı esnasında oluşan ROR hedef hücrelerde direkt etkiyle hasara neden olmaktadır (46). Ayrıca ROR'un sinyal transdüksiyon molekülü gibi davranarak gen transkripsiyonunu regüle edip, transkripsiyon faktörlerini aktive edebildiğinde anlaşılmıştır (47,48,49).

Böbrek İ-R deneyi yapılan bazı çalışmalarda, CAPE (Caffeic acid phenethyl ester), PGE₁ (Prostoglandin E₁), N-asetilsistein gibi maddelerin oksidan-antioksidan sistem üzerine etkileri araştırılmıştır (154,155,156,157). Biz de çalışmamızda, kafeinin böbrekteki bu sistem üzerine etkilerini araştırmayı amaçladık.

İnsan sağlığı üzerindeki etkileri incelenen kafeinin; diüretik, metabolik hızı arttırıcı, kas ve sinirleri uyarıcı ve mide salgısını uyarıcı etki yaptığı, orta düzeyde alınan kafeinin (200-300mg) uyuşukluk ve zihin yorgunluğunu giderici, iştah arttırıcı etkisi olduğu gösterilmiştir. Kafeinin insanda tolerans ve fiziksel bağımlılık oluşturabildiği, pekiştirici olduğu, bu kişilerde kafeinin kesilmesinin, kendini başağrısı, zihinsel konsantrasyonun azalması, irritabilite, disfori ve anksiyete ile belli eden hafif bir yoksunluk sendromuna neden olduğu görülmüştür (4,5).

Ayrıca kafeinin yıkım ürünleri olan teobromin ve ksantin, antioksidan ve prooksidan özellikte oldukları, antioksidan olan ürik asit ile yapısal benzerlik gösterdikleri bulunmuştur (109). Oral yolla alımından sonra kafeinin %99'u gastrointestinal sistemden emilerek 30-120 dakika içinde plazmada en yüksek konsantrasyonuna ulaşır (110). Kafeinin yarı ömrü insanlarda 2,5-6 saat arasında değişmekle birlikte, fare ve sıçanlarda bu sürenin 0,7-1,2 saat olduğu, fetus ve yenidoğan döneminde, kafeinin demetilasyonu için gerekli enzimlerin noksan olması sebebiyle kafeinin yarı ömrünün yaklaşık 32-149 saat kadar olduğu bildirilmektedir (111,112).

Kafein, başlıca CYP1A₂ tarafından yıkıma uğrar, fakat ksantin oksidaz ve N-asetiltransferazın'da (NAT-2) substratıdır (115). Kafein, etkisini A₁ ve A_{2a} reseptörleri üzerinden gösterir ve seçici olmayan bir şekilde her iki reseptörü antagonize eder (106). Adenozin reseptörlerinin kafein tarafından inhibe edilmesi; algılama ve davranışa yönelik etkilerin oluşumu ile ilişkili dopamin, asetilkolin, norepinefrin, serotonin, glutamat, gamma-aminobütirik asit ve nöropeptidlerin salınımını etkiler (105).

Metilksantinler, adenin, guanin, ürik asit, hipoksantin gibi pürinlerin kimyasal yapısı ile benzerlik göstermektedirler. Bu kimyasal benzerlik, biyokimyasal düzenleyici olan cAMP ile etkileşime girmeleri bakımından önemlidir (116).

Kafeinin, uzun süre kullanımının katekolamin seviyelerini ve plazma renin aktivitesini yükseltip, böbrek fonksiyonlarının bozulmasına yol açarak renin konsantrasyonlarını arttırdığı söylenmektedir. Sonuç olarak kreatinin klirensi düşer, üriner protein atılımı artar (118,119). Kafein, teobromin ile teofilin su ve sodyumun böbreklerden atılımını artırır. Diüretik etkinliği en güçlü olan teofilindir. Diüretik etki, sodyum ile suyun tübüllerden geri emilimini inhibe etmesine ve glomerüler

filtrasyon hızının artışına bağlıdır. Diüretik etkiye karşı, uzun süreli kullanımı takiben tolerans gelişir (106). Kafeinin aşırı tüketimi, böbrekte kalsiyum oksalat taşı oluşumunu arttırabilir (121).

Yapılan araştırmalarda kafeinin, radyasyon ve diğer ajanlar tarafından arttırılmış hasara karşı önemli derecede koruma sağladığı, 2 mM kafeinin radyasyon öncesi ya da sonrası neredeyse tamamen hücrelerde radyasyonla indüklenen apoptosisi engellediği belirtilmiştir. Çok düşük konsantrasyonlarda dahi kafeinin rat karaciğer mikrozomlarında lipid peroksidasyonunu azalttığı ve antioksidan olarak reaktif oksijen radikalleri tarafından oluşturulmuş hasara karşı membranları koruduğu belirtilmiştir (158,159).

Oral yolla alınan kafeinin, farelerde tümör baskılayıcı genleri (p53 dahil) düzenlediği gösterilmiştir. Bununla birlikte kafeinin, mutasyonu hem baskılayıcı hem de arttırıcı etkisi belirtilmiştir. Kafeinin antioksidan olarak, DNA kırıklarını ve hidroksil radikallerini inhibe ettiği bildirilmiştir. Ayrıca kafein ve yıkım ürünleri olan ksantin ve teobrominin yüksek bakır konsantrasyonlarında, bakır iyonlarına bağlanıp, Cu(II)'nin Cu(I)'e dönüşmesini azaltarak, prooksidan özellik gösterip, oksijen radikallerine öncülük ettiği düşünülmektedir (160).

İçme sularına akut dozlarda (5-15 mg/kg) kafein eklenen farelerin, kemik iliğinde gama ışınlarıyla indüklenen kromozomal hasarın önemli derecede ve hızlı bir şekilde düştüğü bulunmuştur. Bazı kanserli vakalarda 2 kupa/gün kahve içmenin ciddi gecikmiş radyasyonla indüklenen toksisiteyi azalttığı belirtilmiştir. Bununla birlikte kafeinin biyokimyasal etkilerinden olan, kimyasal ve UVB ile indüklenen karsinogenezden koruması önemle vurgulanmıştır (161).

Serbest radikallere bağlı hücre hasarındaki en önemli mekanizmalardan biri lipid peroksidasyonudur. MDA lipid peroksidasyonu son ürünlerinden olup oldukça zararlı bir maddedir, hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek, iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin bozulması ve DNA bazlarıyla reaksiyona girerek mutajenik karakter kazanması gibi pek çok olumsuz etkiye sebep olur (162). Protein oksidasyonunda, lipid peroksidasyonuna benzer şekilde serbest radikal zincir reaksiyonları şeklinde gelişmektedir. Protein oksidasyonu, reaktif oksijen radikalleri ile direkt olarak veya oksidatif stresin sekonder ürünleri ile reaksiyonu sonucu

indirek olarak indüklenen, proteinlerin kovalent modifikasyonu olarak tanımlanmaktadır (163). Protein oksidasyonu için genel bir belirteç yoktur. Ancak, protein karbonil grupları oksidatif indüklü hücre hasarının en genel belirteci olarak kabul edilmekte ve yaygın olarak kullanılmaktadır (163,164).

Lipid peroksidasyonu ve kafein arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmaların bir kısmında, kafein uygulamasıyla serum, böbrek, kalp, karaciğer, beyin, gibi değişik dokularda MDA'nın önemli derecede düştüğü (158,161,165,166) belirtilmiş, ancak yapılan araştırmaların bir kısmında ise özellikle beyin dokusu ve karaciğerde MDA'nın yükseldiği gösterilmiştir (167,168).

Intraperitoneal yüksek doz (100-150 mg/kg) kafein verilen, deneysel kafa travması oluşturulmuş ratlarda, kafeinin kortekste doza bağımlı olarak, lipid peroksidasyonunu arttırdığı ve oksidatif strese neden olduğu gösterilmiştir (167).

Yapılan bir çalışmada kafeinin beyinde L-arginin metabolizmasını etkilediği açıklanmıştır. Çalışmada içme suyuna (2mg/ml, 3 gün) kafein eklenmiş ve sonrasında ise doz artırılarak (4mg/ml, 7 gün) devam edilen ratlarda, kafeinin beyinde arginaz aktivitesini ve MDA seviyelerini düşürdüğü belirtilmiştir (116). Ayrıca bir çalışmada da, allil-alkol ile düşük seviyede hepatotoksisite oluşturulan ratlara, kafein (150 mg/kg, oral) verilmesinin karaciğerde MDA düzeylerini yükselttiği bildirilmiştir (168).

Kafeinin singlet oksijeni ve hidroksil radikallerini temizlediği, lipid peroksidasyonunu düşürdüğü, LDL oksidasyonunu inhibe ettiği, ayrıca protein oksidasyonu ile oluşan protein karbonillerinin seviyelerinide azaltabildiği belirtilir (165,169).

Araştırmamızda böbrek dokusu MDA düzeyleri için İ-R grubu ile diğer 3 grup (Kontrol, Kafein 15mg ve Kafein 45mg) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). Doku MDA düzeyleri için diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Serum MDA düzeyleri için ise Kontrol grubu ile diğer 3 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuş ($p<0,05$) ve diğer grupların arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Protein karbonil düzeyleri doku için Kafein 45 mg grubu ile Kontrol ve İ-R grubu arasında

istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuş ($p<0,05$), Kafein 15 mg grubu ile ve diğer grupların aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Serum Protein karbonil düzeyleri için ise grupların arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Anlamlı bulduğumuz sonuçlar değersel olarak MDA için, doku İ-R grubunda diğer gruplardan yüksekti ve serum İ-R grubu ile Kafeinli gruplarda MDA değerleri Kontrol grubundan yüksek olarak bulundu. Anlamlı olan doku PC değerleri ise Kafein 45 mg grubunda, Kontrol ve İ-R grubundan daha yüksek olarak bulundu.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre kafeinin lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu olduğu doku MDA düzeylerinin İ-R grubunda kafein alanlara göre daha yüksek çıkmasından anlaşılmıştır. Bununla birlikte doza bağlı bir şekilde, yüksek doz kafein verdiğimiz Kafein 45 mg grubunda doku PC düzeylerinin diğer gruplardan yüksek olması, kafeinin protein oksidasyonunu arttırdığı yönde bulgu olarak değerlendirildi.

30gün süreyle 20 mg/kg kafein uygulanan farelerde, hepatik katalaz ve SOD aktivitelerinin yükseldiği, MDA düzeyinin ise düştüğü gösterilmiştir (166).

İçme suyuna NaF ile birlikte kafein (3mg/kg/gün, 50 gün) eklenen ratların böbrek dokusunda, kontrol grubuna ve içme sularına sadece NaF eklenen ratlara göre total SOD aktivitesinde istatistiksel fark bulunmadığı, katalaz aktivitesinin düştüğü, GSH-Px aktivitesinin ise yükseldiği belirtilmiştir (170).

Yapılan bir çalışmada diyetlerine kafein (20mg/kg) ilave edilen iki grup ratın (22 gün ve 30 gün), kalp ve karaciğer dokularında total SOD, GSH-Px ve katalaz aktivitelerinde kontrol grubuna göre istatistiksel fark bulunmadığı belirtilmiştir (171).

Araştırmamızda böbrek dokusu ile serumlarında, SOD ve GSH-Px aktivitesi düzeyleri için Kontrol grubu ile diğer 3 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). Ayrıca serum GSH-Px düzeyleri için, Kafein 15 mg grubu ile Kafein 45 mg grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Doku Katalaz aktivitesi düzeyleri için Kafein 45 mg grubu ile diğer 3 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). Diğer grupların katalaz aktivitesi için aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Anlamlı bulduğumuz

sonuçlar değersel olarak SOD ve GSH-Px için, doku ve serum İ-R ve Kafeinli guplarda, Kontrol grubundan yüksekti ve serum Kafein 15 mg grubu GSH-Px değerleride Kafein 45 mg grubundan yüksek olarak bulundu. Anlamli olan doku Katalaz aktivitesi değerleri ise Kafein 45 mg grubunda, diğer gruplardan daha yüksek olarak bulundu.

Süperoksit radikalini, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlayan SOD, süperoksit radikallerinin en önemli temizleyicisidir. Hidrojen peroksit bir radikal olarak kabul edilmese de hidrosil radikalinin organizmadaki en önemli kaynağıdır. GSH-Px ve katalaz hidrojen peroksitin katalizinde önemli olan enzimlerdir.

Çalışmamızda İ-R ve Kafeinli grupların, doku ve serum SOD enzim düzeyinin Kontrol grubunun değerlerinden yüksek çıkması ancak İ-R ve Kafeinli grupların aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamasına rağmen, yüksek doz kafeinin SOD enzim düzeyinin üzerine etkisinin, düşük doz kafeinden azaltma yönünde daha belirgin olması, gruplar arası karşılaştırmada GSH-Px enzimi üzerinede benzer şekilde etkidiği, yalnız serum GSH-Px enzim düzeyinin Kafein 15 mg grubunda Kafein 45 mg grubundan yüksek olmasının doza bağlı olarak artan kafein dozlarının GSH-Px enzim düzeyini düşürdüğü yönde yorumlanmıştır. Ayrıca Kafein 45 mg grubunda katalaz enzim düzeyinin diğer gruplardan yüksek çıkması, bize kafeinin katalaz enzim düzeyi üzerine arttırıcı etkisi olduğunu göstermiştir.

Kafein ve NO arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalarda ise, kafein uygulamasıyla NO'nun önemli derecede yükseldiği belirtilmektedir (172-175).

İçme sularına kafein (0,6 mg/ml, 1-3 hafta) eklenen farelerle yapılan bir çalışmada, kafeinin beyinde NO üretimini etkilediği ve seviyelerinde yükselmeye neden olduğu belirtilmiştir (172).

Ratların içme suyuna kafein eklenmesinin (40mg/kg, 1gn), böbrekte α -1 ve β -1 Na+K+ATPaz aktivitelerini düşürdüğü, endotelyal NOS ekspresyonunu arttırarak böbrekte NO_x (nitrit + nitrat) seviyelerinin yükselmesine neden olduğu belirtilmiştir. Kafeinli içecekler, natrire ve dire ile ilişkili olarak, proksimal tübülden sodyum geri emilimini azaltırlar. Na+K+ATPaz, sodyum geri emiliminin

tübüler epitelyal hücrelerdeki esas komponentidir. Na⁺K⁺ATPaz, sodyum iyonlarını transport eder. Kafein; Na⁺K⁺ATPaz regulasyonunu değiştirerek natriürenin artmasına sebep olur, atrial natriüretik peptid (ANP) mRNA ekspresyonunu arttırarak, böbrekte ANP aktivitesini yükseltir. ANP, otokrin ve parakrin olarak böbrekten sodyum ve su çıkışında önemli rol oynar. Kafein, üriner olarak sodyum, potasyum, magnezyum, kalsiyum ve inorganik fosfat atılımını arttırır. Natriüreye ve diüreye neden olur. Tübüler sodyum geri emilimi iki basamakta meydana gelmektedir: bazolateral membrandaki Na⁺K⁺ATPaz aktivitesiyle ve luminal membrandaki Na⁺/H⁺ değişimiyle. Kafein ile birlikte hem Na⁺ K⁺ATPaz aktivitesi düşer hem de Na⁺/H⁺ değişimi azalır (173).

Bir çalışmada santral sinir sisteminde haberci molekül olarak sentezlenen NO'nun, kafeinin lökomotor aktiviteyi arttırıcı etkisine katkıda bulunuyor olabileceği savunulmuştur. Araştırmada farelere kafein enjeksiyonundan sonra (0,5-16mg/kg) artan lökomotor aktivitenin, L-NAME (N-nitro L-arginin metil ester) (30mg/kg) ile engellendiği belirtilmiştir (174).

Hamile ratlarla yapılan bir çalışmada, intraperitoneal kafein verilmesinin (25-50-100 mg/kg, 21 gün), artan dozlara uyumlu olarak plasentada NO üretiminde korele bir artış olduğu gösterilmiştir (175).

NO'nun vazodilatör ve antioksidan etkilerinin olduğu ayrıca beyin fonksiyonu üzerinde önemli modülatör olarak etki ettiği belirtilen bir çalışmada. Arginin, adenosin ve NO'nun, antioksidan yapıda olmalarının yanı sıra lipid peroksidasyon seviyelerinin, kafeininin kendisindende etkilenebildiği açıklanmıştır (176).

Kafein ve flor verilen ratlardaki oksidatif stresi araştıran bir çalışmada, 4,7 mg / kg dozunda kafeinin antioksidan gibi etkideği, beyin dokusu NO düzeyi üzerine, serum ve beyindeki TAS'a (Total antioxidant status) ve dokulardaki lipit peroksidasyonuna florun ters etkisini yatıştırdığı gösterilmiş. Ayrıca kafeinin, flor maruziyetinde aşırı NO üretimine karşı beyni koruyabilir olduğu görülmüş. Kafein ve florun birlikte verildiği grup ile kontrol grubu karşılaştırılınca kafein, beyin ve serumda NO üretimi üzerine florun etkisini baskılar ama karaciğer ve böbrekte bu etkiyi önleyemez olduğu görülmüştür (177).

Araştırmamızda böbrek dokusu NO düzeyleri için İ-R grubu ile Kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). Kafein verilen gruplarla yapılan karşılaştırmada ve diğer grupların aralarında yapılan değerlendirmede istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Serum NO düzeyleri için Kafein verilen gruplar (Kafein 15 mg, Kafein 45 mg) kendi aralarında ve diğer gruplar ile aralarındaki karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). Bunların dışında yapılan karşılaştırmalarda anlamlı sonuç bulunmamıştır. Anlamlı bulduğumuz sonuçlar değersel olarak NO için, doku İ-R grubunda Kontrol grubundan yüksekti ve serum Kafein 45 mg grubu NO değerleride diğer gruplardan yüksek olarak bulundu. Ayrıca serum Kafein 15 mg grubunun NO değerleride anlamlı olarak İ-R ve Kontrol grubundan yüksek, Kafein 45 mg grubundan düşük olarak bulundu.

Diğer bir parametre olarak çalıştığımız NO düzeylerinin, araştırmamızda kafein verilen gruplarda diğer gruplardan yüksek çıkması ve Kafein 45 mg grubunun değerlerinin Kafein 15 mg grubunun değerlerinden yüksek olması kafeinin doza bağlı olarak, artan dozlarda NO düzeyini arttırdığını göstermiştir.

Oluşturduğumuz iskeminin böbrekte yapmış olduğu hasarlanmayı değerlendirmek için glomerüler fonksiyonu tahmin etmede kolay ve basit bir yöntem olan BUN, kreatinin ve sistatin-C serum konsantrasyonlarını ölçtük. Ancak bu maddelerin üretim oranına ve glomerülden filtre edilme oranlarına göre konsantrasyonları değişim göstermektedir. Serum BUN ve kreatinin düzeyleri birçok böbrek kaynaklı olmayan değişkenlerden etkilenmektedir. BUN, protein katabolizmasının ana çöküntüsüdür. Malnutrisyon, şiddetli açlık gibi durumlar BUN konsantrasyonunu düşürürken buna karşın yüksek proteinli diyet, dehidratasyon ve ilaçlar (kortikosteroidler, tetrasiklinler) gibi etkenler BUN konsantrasyonu artırır. Karaciğer hastalıkları hem BUN hem de kreatinin üretimini azaltır. Serum kreatinin düzeyi; kas kitlesinden, diyetteki protein alımından, yaştan ve cinsiyetten etkilenir. Yüksek protein diyeti, geniş kas hacmi, rabdomiyoliz ve ilaçlar (trimetoprim, simetidin, spironolakton) kreatinin düzeyini arttırırken, küçük kas hacmi, hamilelik ve antidiüretik hormonun artışı kreatinin seviyelerini düşürür (178). Böbrek fonksiyonlarının değerlendirilmesinde, son yıllarda GFH ölçümünde hassas olduğu

belirtilen bir yöntem olan sistatin-C değerleride kullanıldı. Sistatin-C; yaşı, cinsiyet ve kas kitlesinden etkilenmeyen düşük moleköl ağırlıklı endojen bir proteindir. Sistatin-C sabit üretim hızı, glomerüllerden tama yakın filtre olması, tübüllerde metabolize edilmesi ve böbrek dışı faktörlerden etkilenmemesi ve yapılan çoğu çalışmada altın standart kabul edilen eksojen markırlar ile yapılan GFH ölçümleriyle uyum göstermesi nedeniyle gündemdedir. (179)

Böbreklerde iskemi ve reperfüzyonun farklı sürelerinde yapıldığı çalışmalarda; glutasyon düzeyinin azaldığı, lipit peroksidasyon ile plazma üre ve kreatinin düzeylerinin arttığı bildirilmiştir. (157,180)

Serumlardan çalışılan BUN, kreatinin ve sistatin-C parametrelerinin yapılan istatistiksel karşılaştırmasında BUN ve sistatin-C sonuçlarında anlamlı bir fark bulunmadı. Serum kreatinin değerleri için ise Kontrol grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edildi. Ayrıca Kafein 15mg grubu ile Kafein 45 mg grubu arasındaki karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edildi. Bunların dışındaki karşılaştırmalardan anlamlı sonuç elde edilmemiştir. Anlamlı bulduğumuz sonuçlar değersel olarak serum kreatinin için, İ-R ve Kafeinli gruplarda Kontrol grubundan yüksekti ve serum Kafein 15 mg grubu değerleride Kafein 45 mg grubunun değerlerinden yüksek olarak tespit edildi.

Böbrek yetmezliği parametresi olarak çalıştığımız serum kreatinin düzeylerinin değerleri İ-R ve kafein verilen gruplarda Kontrol grubundan yüksek çıkması, ayrıca Kafein 15 mg grubunda Kafein 45 mg grubundan anlamlı olarak yüksek çıkmasıda kafeinin doza bağlı bir şekilde artan dozlarının böbrek fonksiyonlarını düzeltebileceği şeklinde yorumlanmıştır.

6. SONUÇ

Çalışmamızın sonuçları kafein uygulamasının, lipid peroksidasyon göstergesi olan MDA düzeylerini azalttığı ve protein oksidasyon göstergesi olan PC düzeylerini ise arttırdığını göstermektedir. Kafein alımıyla sıçan böbrek dokusu ve serumlarının SOD enzim düzeyinde değişiklik görülmemiş, kafeinin artan dozunda GSH-Px enzim düzeyinde düşme, katalaz enzim düzeyinde ise artış saptanmıştır. NO düzeylerini incelediğimizde, İ-R ve kafein alan grupların değerlerinin Kontrol grubunun değerlerinden yüksek olduğu, kafeinin artan dozuna paralel NO düzeyindeki artışın daha fazla olduğu görülmüştür.

Bu sonuçlara göre kafeinin çalışma dozlarımızda, lipidler üzerine antioksidan etkileri olduğu, proteinler üzerine ise oksidan etkileri olduğunu söyleyebiliriz. Kafeinin oksidan ve antioksidan olarak farklı etki dozlarının belirlenmesinde, etki mekanizmalarının anlaşılmasında ileri hayvan ve insan çalışmalarının gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Aksoy M. Ansiklopedik Beslenme, Diyet ve Gıda Sözlüğü. Hatipoğlu Yayınları, Ankara, 2007: 300-1
2. Barone JJ, Roberst H. Caffeine consumption. Food Chem Toxicol 1996; 34:119-29.
3. International Food Information Council Foundation Caffeine & Health: Clarifying The Controversies. Washington DC. March 2008.
4. Nehlig A, Boyet S. Dose-response study of caffeine effects on cerebral functional activity with a specific focus on dependence. Brain Res 2000; 858: 71-7.
5. Concas A, Porcu P, Sogliano C, Serra M, Purdy PH, Biggio G. Caffeine-Induced Increases in the Brain and Plasma Concentrations of Neuroactive Steroids in the Rat. Pharmacol Biochem Behavior 2000; 66: No. 1, 39-45.
6. La Vecchia C. Coffee, liver enzymes, cirrhosis and liver cancer, J Hepatol 2005; 42:444-6.
7. Roehrs T, Roth T. Caffeine: Sleep and daytime sleepiness. Sleep Med Rev 2008; 12:153-62.
8. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in post-ischemic tissue injury. N Engl J Med. 1985; 312:159-163.
9. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. Surg Clin North Am. 1992;72:65-83.
10. Chatterjee PK. Novel pharmacological approaches to the treatment of renal ischemia-reperfusion injury: A comprehensive review. Naunyn-schmiedeberg's Arch Pharmacol. 2007; 376:1-43.
11. Gökmen FG, Ertürk M, Bilge O (2003) editor: Gövsa FG Üriner sistem Sistematik Anatomi. pp.531-37 İzmir=Güven Kitapevi.
12. Arıncı K, Elhan A. (2001) Üriner sistem. Anatomi cilt1 Güneş Kitapevi. pp.311-14
13. Dere F (1999) Genitoüriner Sistem. Anatomi Atlası ve Ders Kitabı Cilt 2 pp.957-976 Adana= Nobel tıp Kitapevi
14. Hezlinger D. Inductive interactions during kidney development. Semin Nephrol 1995; 15: 255-262.

15. Eşrefoğlu M. Genel ve özel histoloji.s.251-260, Pelikan Tıp ve Teknik Kitapçılık, Malatya, 2004.
16. Caralo R, Harley JP, Nobock CR. Human Anatomy and Physiology. pp. 848-878, Mc Graw-Hill, 1992
17. Tanagho EA. Anatomy of the genitourinary tract. In Smith's General Urology (13th Edition) Tanagho EA, Mc Aninch J.W.(Ed). Prentice-Hall International Inc. New Jersey 1992: 1-7.
18. Hezlinger D. Inductive interactions during kidney development. Semin Nephrol 1995; 15: 255-262.
19. Sadler TW. Urogenital system: Langman's Medical Embryology. Sixth edition. WilliamsWilkins, Baltimore 1990: 260-296.
20. Moore KL, Persaud TVN. The Urogenital system: Before We Are Born: Essentials of Embryology and Birth Defect. Fourth edition. WB Saunders Company, Philadelphia 1993: 204-226.
21. Jungueira LC, Carneiro J, Kelley RO (Çeviri: Y. Aytakin). Temel histoloji. İstanbul: Barış Kitabevi; 1998:359-77.
22. www.zenkovicdesign.com
23. www.britannica.com
24. www.legacy.owensboro.kctcs.edu
25. Guyton AC. The kidneys and body fluids. In: Guyton AC (Ed). Textbook of Medical Physiology. WB Saunders Company, Philadelphia 1991: 273-353.
26. Madox DA, Brenner BM. Glomerular ultrafiltration in: Brenner BM (Ed). The Kidney. WB Saunders Company, Philadelphia 1996: 286-334.
27. Kon VI. Glomerular filtration. in: Massry SG, Glassock RJ (Ed). Text book of nephrology. Williams and Wilkins, Baltimore 1995: 54-60.
28. Navar LG. Renal autoregulation: Perspectives from whole kidney and single nephron studies. Am J Physiol 1978; 234: 357.
29. Lance DD, Brenner BM. The renal circulation in: Brenner BM (Ed). The Kidney. WB Saunders Company, Philadelphia 1996: 247-286.
30. Bonventre JV. Mechanisms of ischemic early renal failure. Kidney Int. 1993;43.1160-1178.

31. Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Early renal failure N Engl J Med. 1996;334:1448-1460.
32. Gilbert RE, Kelly DJ, Atkins RC. Novel approaches to the treatment of progressive renal disease. Curr Opin Pharmacol. 2001;1:183-189.
33. McCombs PR, Roberts B. Early renal failure following resection of abdominal aortic aneurysm. Surg Gynecol Obstet. 1979;148:175-178.
34. Zanardo G, Michielon P, Paccagnella A, et al. Early renal failure in the patient undergoing cardiac operation. J Thorac Cardiovasc Surg. 1994;107:1489-1495.
35. Lieberthal W, Levine JS. Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. Am J Physiol. 1996; 271:477-488.
36. Sheridan AM, Boventre JV. Cell biology and molecular mechanisms of injury in ischemic early renal failure. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2000;9:427-434.
37. Frega NS, Di Bona DR, Guertler B, et al. Ischemic renal injury. Kidney Int. 1976;10:17-25.
38. Masztalerz M, Wlodarczyk Z, Czuczejko J, et al. Superoxide anion as a marker of ischemia-reperfusion injury of the transplanted kidney. Transplant Proc. 2005;38:46-48.
39. Paller MS. The cell biology of reperfusion injury in the kidney. J Invest Med. 1994;42:632-639.
40. Weight SC, Bell PR, Nicholson ML. Renal ischemia-reperfusion injury. Br J Surg. 1996;85:162-170.
41. Nath KA, Norbi SM. Reactive oxygen species and early renal failure. Am J Med. 2000;109:655-678.
42. Paller MS, Hoidal JR, Ferris TF. Oxygen free radicals in ischemic early renal failure in the rat. J Clin Invest. 1984;74:1156-1164.
43. Greene EL, Paller MS. Oxygen free radicals in early renal failure. Miner Electrolyte Metab. 1991;17:124-132.
44. Chatterjee PK, Cuzzocrea S, Brown PAJ, Zacharowski K, Stewart KN, Mota-Filipe H, Thiernemann C. Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces oxidant stress-mediated renal dysfunction and injury in the rat. Kidney Int. 2000;58:658-673.

45. Venkatachalam MA, Bernard DB, Donohue JF, et al. Ischemic damage and repair in the rat proximal tubule. Differences among the S1, S2 and S3 segments. *Kidney Int.* 1978;14:31-49.
46. Kloner RA, Przyklenk K, Whittaker P. Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia/reperfusion. Resolved and unresolved issues. *Circulation.* 1989;80:1115-1127.
47. Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.* 1996;10:709-720.
48. Bowie A, O'Neill LA. Oxidative stress and NF- κ B activation: a assessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem Pharmacol.* 2000;59:13-23.
49. Araujo M, Welch WJ. Oxidative stress and nitric oxide in kidney function. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2006;15:72-77.
50. Kone BC, Baylis C. Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney. *Am J Physiol.* 1997;272:561-578.
51. McLay JS, Chatterjee PK, Nicolson AG, et al. Nitric oxide production by human proximal tubular cells: a novel immunomodulatory mechanism? *Kidney Int.* 1994;46:1043- 1049.
52. Weight SC, Nicholson ML. Nitric oxide and renal reperfusion injury: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1998;16:98-103.
53. Chatterjee PK, Patel NSA, Kvale EO, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces renal ischemia reperfusion injury. *Kidney Int.* 2002;61: 862-871.
54. Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, et al. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalysed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys.* 1992; 298:431-437.
55. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys.* 1991;288:481-487.
56. Eckardt KU. Early renal failure more than kidney ischemia? *Wien Klin Wochenschr.* 2000;112:145-148.
57. Bonventre JV, Zuk A. Ischemic early renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int.* 2004; 66:480-485.
58. Kelly KJ. Early renal failure: much more than a kidney disease. *Semin Nephrol.* 2006;26:105-113.

59. Couser WG. Pathogenesis of glomerular damage in glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 1998;13:10-15.
60. Van Kooten C, Langers AM, Bruijn JA, et al. Role of tubular cells in progressive renal disease. *Kidney Blood Press Res*. 1999;22:53-61.
61. Thurman JM. Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion. *Clin Immunol*. 2007;123:7-13.
62. Kaysen GA. Inflammation and oxidative stress in end-stage renal disease. *Adv Nephrol Necker Hosp*. 2000;30:201-214.
63. Lieberthal W. Biology of ischemic and toxic renal tubular injury: role of nitric oxide and the inflammatory response. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1998;7:289-295.
64. Albrecht EW, van Goor H, Tiebosch AT, et al. Nitric oxide production and nitric oxide synthase expression in early human renal allograft rejection. *Transplantation*. 2000;70:1610-1616.
65. Bonventre JV. Pathophysiology of early kidney injury: roles of potential inhibitors of inflammation. *Contrib Nephrol*. 2007;156:39-46.
66. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Oxford, 1999.
67. Uysal M. Serbest radikaller ve oksidatif stres. *Biyokimya*, Editörler F. Gürdöl ve E. Ademoğlu. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2006, s. 829-835.
68. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996; 271: C1424-1437.
69. Palmieri B, Sblendorio V. Oxidative stress detection: what for? Part I. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2006; 10: 1-27.
70. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidant in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
71. Spiteller G. Are lipid peroxidation processes induced by changes in the cell wall structure and how are these processes connected with diseases? *Med Hypotheses* 2003; 60: 69-83.
72. Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Jpn J Physiol* 1996; 46: 15-32.

73. Yalçın AS. Antioksidanlar. Klinik Gelişim 1998; 11: 342-346.
74. Benzie IFF. Evolution of dietary antioxidants. Comp Biochem Physiol Part A 2003;136: 113-126.
75. Knight JA. Diseases related to oxygen-derived free radicals. Ann Clin Lab Sci 1995; 25: 111-121.
76. Conger JD. Interventions in clinical early renal failure: what are the data? Am J Kidney Dis. 1995;26:565-576.
77. Edelstein CL, Ling H, Wansiripaisan A, et al. Emerging therapies for early renal failure. Am J Kidney Dis. 1997;30:89-95.
78. Dishart MK, Kellum JA. An evaluation of pharmacological strategies for the prevention and treatment of early renal failure. Drugs. 2000;59:79-91.
79. Venkataraman R, Kellum JA. Novel approaches to the treatment of early renal failure. Expert Opin Invest Drugs. 2000;9:2579-2592.
80. Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic early renal failure. J Am Soc Nephrol.2003;14:2199-2210
81. Siegel NJ, Shah SV. Early renal failure: directions for the next decade. J Am Soc Nephrol. 2003;14:2176-2177.
82. Doi K, Suzuki Y, Nakao A, et al. Radical scavenger edaravone developed for clinical use ameliorates ischemia/reperfusion injury in rat kidney. Kidney Int. 2004;65:1714-1723.
83. Lee JI, Son HY, Kim MC. Attenuation of ischemia-reperfusion injury by ascorbic acid in the canine transplantation. J Vet Sci. 2006;7:375-379.
84. Sahna E, Parlakpınar H, Cihan OF, et al. Effects of aminoguanidine against renal ischaemia-reperfusion injury in rats. Cell Biochem Funct. 2006;24:137-141.
85. Di Giorno C, Pinheiro HS, Heinke T, et al. Beneficial effect of N-acetylcysteine on renal injury triggered by ischemia and reperfusion. Transplant Proc. 2006;38:2774-2776.
86. Tugtepe H, Sener G, Biyikli NK, et al. The protective effect of oxytocin on renal ischemia/reperfusion injury in rats. Regul Pept. 2007;140:101-8.
87. Cruthirds DL, Saba H, MacMillan-Crow LA. Overexpression of manganese superoxide dismutase protects against ATP depletion-mediated cell death of proximal tubule cells. Arch Biochem Biophys. 2005;437:96-105.

88. Qi S, Xu D, Ma A, et al. Effect of a novel inducible nitric oxide synthase inhibitor, FR260330, in prevention of renal ischemia/reperfusion injury in vervet monkeys. *Transplantation*. 2006;81:627-631.
89. Jeong GY, Chung KY, Lee WJ, et al. The effect of a nitric oxide donor on endogenous endothelin-1 expression in renal ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc*. 2004;36:1943-1945.
90. Rodriguez-Pena A, Garcia-Criado FJ, Eleno N, et al. Intrarenal administration of molsidomine, a molecule releasing nitric oxide, reduces renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Transplant*. 2004;4:1605-1613.
91. Chander V, Chopra K. Renal protective effect of molsidomine and L-arginine in ischemia-reperfusion induced injury in rats. *J Surg Res* 2005;128:132-139.
92. Kucuk HF, Kaptanoglu L, Ozalp F, et al. Role of glyceryl trinitrate, a nitric oxide donor, in the renal ischemia- reperfusion injury of rats. *Eur Surg Res* 2006;38:431- 437.
93. Szabö C, Dawson VL. Role of poly (ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia-reperfusion. *Trends Pharmacol Sci*. 1998;19:287-298.
94. Chatterjee PK, Thiemermann C. Inhibitors of poly (ADP- ribose) synthetase protect rat renal proximal tubular cells against oxidant stress. *Biochem Soc Trans*. 1998;26:318.
95. Mangino MJ, Ametani M, Szabö C, et al. Poly (ADP-ribose) polymerase and renal hypothermic preservation injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;286:838-847.
96. Sivarajah A, Chatterjee PK, Hattori Y, et al. Agonists of peroxisome-proliferator activated receptor- α (clofibrate and WY14643) reduce renal ischemia/reperfusion injury in the rat. *Med Sci Monit*. 2002;8:532-539.
97. Clark JE, Foresti R, Green CJ, et al. Dynamics of haem oxygenase-1 expression and bilirubin production in cellular protection against oxidative stress. *Biochem J* 2000; 348:615-619.
98. Li Volti G, Rodella LF, Di Giacomo C, et al. Role of carbon monoxide and biliverdin in renal ischemia/reperfusion injury. *Nephron Exp Nephrol*. 2006;104:135-139.

99. Forman CJ, Johnson DW, Nicol DL. Erythropoietin administration protects against functional impairment and cell death after ischaemic renal injury in pigs. *BJU Int.* 2007;99:162-165.
100. Gueler F, Rong S, Park JK, et al. Postischemic early renal failure is reduced by short-term statin treatment in a rat model. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13:2288-2298.
101. Joyce M, Kelly C, Winter D, et al. Pravastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, attenuates renal injury in an experimental model of ischemia-reperfusion. *J Surg Res.* 2001;10:79-84.
102. Awad AS, Ye H, Huang L, et al. Selective sphingosine 1-phosphate 1 receptor activation reduces ischemia-reperfusion injury in Mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006;290:1516-1524.
103. Kaudel CP, Schmiedem U, Frink M, et al. FTY720 for treatment of ischemia-reperfusion injury following complete renal ischemia in C57/BL6 mice. *Transplant Proc.* 2006;38:679-681.
104. <http://en.wikipedia.org/wiki/Caffeine>
105. Institute of Medicine Staff (2001) Caffeine for the sustainment of mental task performance: formulations for military operations. National Academic Press, Washington, 25-32, USA.
106. Andersson HC, Hallström H and Kihlman BA (2005) Intake of caffeine and other methylxanthines during pregnancy and risk for adverse effects in pregnant women and their foetuses. Nordic Council of Ministers, Copenhagen, 113-141, Denmark.
107. Magkos F and Kavouras SA (2005) Caffeine use in sports, pharmacokinetics in man, and cellular mechanisms of action. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 535-562.
108. Sakamoto W, Nishihira J, Fujie K, Iizuka T, Handa H, Ozaki M, Yukawa S. Effect of Coffee Consumption on Bone Metabolism. *Bone* 2001; 28: No. 3, 332-6.
109. Azam S, Hadi N, Khan NU, Hadi SM. Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. *Med Sci Monit* 2003; 9(9). 330-5.
110. Dager SR, Layton ME, Strauss W, Richards TL, Heide A, Friedman SD, Artru AA, Hayes CE, Posse S. Human Brain Metabolic Response to Caffeine and the Effects of Tolerance. *Am J Psychiatry* 1999; 156: 22937.

111. Fredholm BB, Battig K, Holmen J, Nehling A, Zvartau EE. Actions of Caffeine in the Brain with Special Reference to Factors That Contribute to Its Widespread Use. *Pharmacological Rev* 1999; 51: No. 1, 84-125.
112. Tanda G, Goldberg SR. Alteration of the Behavioral Effects of Nicotine by Chronic Caffeine Exposure. *Pharmacol Biochem Behavior* 2000; 66: No. 1, 47-64.
113. Lorist MM, Tops M. Caffeine, fatigue, and cognition. *Brain and Cognition* 2003; 53: 82-94.
114. Lee C. Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. *Clin Chim Acta* 2000; 295:141-54.
115. Benowitz NL, Peng M, Jacob P. Effects of cigarette smoking and carbon monoxide on chlorzoxazone and caffeine metabolism. *Clin Pharmacol & Therapeutics* 2003; 74: No:5,468-74.
116. Nikolic J, Bjelakovic G, Stojanovic I. Effect of caffeine on metabolism of L-arginine in the brain. *Mol Cell Biochem* 2003; 244: 125-8.
117. Tanuma A, Saito S, Ide I, Sasahara H, Yazdani M, Gottschalk S, Nakamoto T, Abiko Y. Caffeine Enhances the Expression of the Angiotensin II Type 2 Receptor mRNA in BeWo Cell Culture and in the Rat Placenta. *Placenta* 2003; 24: 638-47.
118. Tofovic SP, Kusaka H, Rominski B, Jackson EK. Caffeine increases renal renin secretion in a rat model of genetic heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 33 (3): 440-50.
119. Tofovic SP, Kusaka H, Jackson EK, Bastacky SI. Renal and metabolic effects of caffeine in obese, diabetic, hypertensive ZSF1 rats. *Ren Fail* 2001; 23(2): 159-73.
120. Berry NM, Rickards CA, Newman DG. The effect of caffeine on the cardiovascular responses to head-up tilt. *Aviat Space Environ Med* 2003; 74(7): 725-30
121. Massey LK, Sutton RA. Acute caffeine effects on urine composition and calcium kidney stone risk in calcium stone formers. *J Urol* 2004; 172(2):555-8.
122. Ganapathi MK, Mackiewicz A, Samols D, Brabenec A, Kushner I, Schultz D, Hu SI. Induction of C-reactive protein by cytokines in human hepatoma cell lines is potentiated by caffeine. *Biochem J* 1990; 269(1): 41-6.

123. Son HY, Nishikawa A, Kanki K, Okazaki K, Kitamura Y, Lee KY, Umemura T, Hirose M. Synergistic interaction between excess caffeine and deficient iodine on the promotion of thyroid carcinogenesis in rats pretreated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *Cancer Sci* 2003; 94: No. 4 , 334-7
124. Shin HY, Lee CS, Chae HJ, Kim HR, Baek SH, An NH, Kim MH. Inhibitory effect of anaphylactic shock by caffeine in rats. *Int J Immunopharmacol* 2000; 22(6): 411-8.
125. Tofovic SP, Kost CK, Jackson EK, Bastacky SI. Long-term caffeine consumption exacerbates renal failure in obese, diabetic, ZSF1 (fa-fa^{CP}) rats. *Kidney Int* 2000; 61(4): 1433-44.
126. Van Dam RM, Feskens EJM. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 2002; 360:1477-78.
127. Ruhl CE, Everhart JE. Coffee and caffeine consumption reduce the risk of elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States. *Gastroenterology* 2005; 128(1): 24-32.
128. Martin JV, Nolan B, Wagner GC, Fisher H. Effects of dietary caffeine and alcohol on liver carbohydrate and fat metabolism in rats. *Med Sci Monit* 2004; 10(12): 455-61.
129. Han LK, Kai F, Okuda H. Effects of long-term administration of caffeine on fat storage in ovariectomized rats. *Yakugaku Zasshi* 2004; 124(11): 841-6.
130. Sullivan GW, Luong LS, Carper HT, Barnes RC, Mandell GL. Methylxanthines with adenosine alter TNF alpha-primed PMN activation. *Immunopharmacology* 1995; 31(1): 19-29.
131. Khalil RH, Soliman MRI. Diazepam Alters caffeine-induced effects on P-endorphin levels in specific rat brain regions. *Life Sci* 1997; 61: 2485-90.
132. Lane JD, Pieper CF, Phillips-Bute BG, Bryant JE, Kuhn CM. Caffeine affects cardiovascular and neuroendocrine activation at work and home. *Psychosom Med* 2002; 64(4): 595-603.
133. Sondermeijer HP, Van Marle AGJ, Kamen P, Krum H. Acute Effects of Caffeine on Heart Rate Variability. *Am J Cardiol* 2002; 90: 906-7.

134. Bandyopadhyay BC, Poddar MK. Caffeine-induced increase of adenosine deaminase activity in mammalian lymphoid organs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1994; 16(10): 731-3
135. Akkuş İ.(1995). Klinik biyokimya laboratuvariel kitabı. Akkuş Öz Eğitim Bas. Yay. Dağ. Konya 1-354.
136. Sun Y, Oberley L W, Ying L, (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*: 34:497-500
137. Lowry O H, Rosenbrough N J, Farr A L, Randall R J. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem*; 193:265-275
138. Durak I, Yurtarslani Z, Canbolat O, Akyol O. (1993). A methodological approach to superoxide dismutase (SOD) activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction. *Clin Chim Acta*; 214:103-104
139. Paglia D E, Valentine W N, (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab & Clin Med*; 70:158169
140. Scaccini C, Chinesa G J. (1994). A critical assessment of the effects of aminoguanidine and ascarbate on the oxidative modification of LDL: evidence for interference with some assays of lipoprotein oxidation by aminoguanidine, *J Lipid. Res.* 35
141. Mueller A R, Platz K P, Langrehr J M, Hoffman R A, Nussler A K, Nalesnik M, Billiar T R, Schraut W H. (1994). The effect of administration of nitric oxide inhibitors during small bowel preservation and reperfusion. *Transplantation*: 58:1309-16
142. Malinski T, Bailey F, Zhang Z G, Chopp M. (1993). Nitric oxide measured by porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb Blood Flow Metab.* 13(3):355:358
143. Cortas N K, Wakid N. (1990). Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem*: 36:1440-3
144. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. In *Methods in Enzymology*, V 186, Oxygen radicals in biological systems edited by Packer L, Glazer AN. Academic Press, California, 1990, pp 407-421.

145. Packer L, Glazer NA. Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins, *Methods in Enzymology*. California. 1990;186:464-479.
146. Richterich R, Colombo JP. *Klinische Chemie*. 4th ed. Basel: Karger S 1978:319-324.
147. Talke H, Schubert GA. Enzymatische Harnstoffbestimmung in Blut und Serum im optischen Test nach VVarburg. *Klin Wochenschr* 1965;43:174.
148. Titfany TO, Jansen JM, Burtis CA, Overton JB, Scott CD. Enzymatic kinetic rate and end-point analyses of substrate, by use of a GeMSAEC Fast Analyzer. *Clin Chem* 1972;18:829-840.
149. Sampson EJ, Baired MA, Burtis CA, Smith EM, Witte DL, Bayse DD. A coupled-enzyme equilibrium method for measuring urea in serum: Optimization and evaluation of the AACC study group on urea candidate reference method. *Clin Chem* 1980;26:816-826.
150. Jaffe M. Ueber den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt und über eine neue Reaktion des Kreatinins. *Z Physiol Chem* 1886;10:391-400
151. Fabiny DL, Ertinghausen G. Automated reaction-rate method for determination of serum creatinine with the CentrifChem. *Clin Chem* 1971;17:696-700.
152. Bartels H, Böhmer M. Micro-determination of creatinine. *Clin Chim Acta* 1971;32:81-85.
153. Kyhse-Andersen J, Schmidt C, Nordin G, Andersson B, Nilsson-Ehle P, Lindström V. Serum Cystatin C, determined by a rapid, automated particle enhanced turbidimetric method, is a better marker than serum creatinine for glomerular filtration rate. *Clin Chem* 1994;40:1921-6.
154. Gurel A, Armutcu F, Sahin S, Sogut S, Ozyurt H, Gulec M, Kutlu NO, Akyol O. Protective role of alpha-tocopherol and caffeic acid phenethyl ester on ischemia-reperfusion injury via nitric oxide and myeloperoxidase in rat kidneys. *Clin Chim Acta*. 2004 Jan;339(1-2):33-41.
155. Irmak MK, Koltuksuz U, Kutlu NO, Yağmurca M, Ozyurt H, Karaman A, Akyol O. The effect of caffeic acid phenethyl ester on ischemia-reperfusion injury in comparison with alpha-tocopherol in rat kidneys. *Urol Res*. 2001 Jun;29(3):190-3.

156. Ozan E, Koyutürk L, Sapmaz T. Böbrek İskemi-Reperfüzyon Hasarında Antioksidan Olarak Prostaglandin E1 (PGE1) Kullanımının İncelenmesi: Deneysel Çalışma. *Fırat Tıp Dergisi* 2004;9(3): 67-71
157. Aydoğdu N, Kaymak K, Yalçın Ö. Sıçanlarda Böbrek İskemi/Reperfüzyon Hasarında N-Asetilsisteinin Etkileri. *Fırat Tıp Dergisi* 2005;10(4): 151-155
158. Devasagayam TP, Kamat JP, Mohan H, Kesavan PC. Caffeine as an antioxidant; inhibition of lipid peroxidation induced by ROS. *Biochim et Biophys Acta* 1996; 1282 (1): 63-70.
159. George KC, Hebbar SA, Kale SP, Kesavan PC. Caffeine protects mice against whole-body lethal dose of γ –irradiation. *J Radiol Prot* 1999; 19: No: 2, 171–6.
160. Azam S, Hadi N, Khan NU, Hadi SM. Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. *Med Sci Monit* 2003; 9(9). 330-5.
161. Lee C. Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. *Clin Chim Acta* 2000; 295:141–54.
162. Moslen MT. Reactive Oxygen Species in Normal Physiology: Cell Injury and Phagocytosis, Free Radicals in "Diagnostic Medicine" , (Armstrong D., ed), 1-15, Plenum Press 1994; New York.
163. Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab. Rev.* 2000; 32:307-326.
164. Beal M.F.. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol. Med.* 2002; 32:797-803.
165. Yukawa GS, Mune M, Otani H, Tone Y, Liang M, Iwahashi H, Sakamoto W. Effects of Coffee Consumption on Oxidative Susceptibility of Low-Density Lipoproteins and Serum Lipid Levels in Humans. *Biochemistry (Moscow)* 2004; 69: No:1, 70-4.
166. Mukhopadhyay S, Mondal A, Poddar MK. Chronic administration of caffeine: effect on the activities of hepatic antioxidant enzymes of Ehrlich ascites tumor-bearing mice. *Indian J Exp Biol* 2003; 41(4):283-9.
167. Al Moutaery K., Al Deeb S., Ahmad Khan H., Tariq M.:Caffeine impairs short-term neurological outcome after concussive head injury in rats. *Neurosurgery*, 53(3), 704-11.

168. Karas M , Chakrabarti SK. Influence of caffeine on allyl alcohol-induced hepatotoxicity in rats. In vivo study. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2001; 20(2): 141-54.
169. Kamat JP, Bolor KK, Devasagayam TPA, Jayashree B, Kesavan PC. Differential modification by caffeine of oxygen-dependent and independent effects of γ -irradiation on rat liver mitochondria. *Int J Radiat Biol* 2000; 76: No: 9, 1281-8.
170. Birkner E, Grucka-Mamczar E, Zwirska-Korczala K, Zalejska-Fiolka J, Stawiarska-Pieta B, Kasperczyk S, Kasperczyk A. Influence of sodium fluoride and caffeine on the kidney function and free-radical processes in that organ in adult rats. *Biol Trace Elem Res* 2006; 109(1): 35-48.
171. Rossowska MJ, Nakamoto T. Effects of chronic caffeine feeding on the activities of oxygen free radical defense enzymes in the growing rat heart and liver. *Experientia* 1994; 50(5), 465-8.
172. Hashiguchi W., Nagatomo I., Akasaki Y., Uchida M., Tominaga M., Takigawa M.:Influences of caffeine to nitric oxide production and zonisamide concentration in the brain of seizuresusceptible EL mice. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 55 (4), 319-324 (2001).
173. Lee J., Ha JH., Kim S., Oh YW. , Kim SW.: Caffeine decreases the expression of Na⁺/K⁺-ATPase and the type 3 Na⁺/H⁺ exchanger in rat kidney. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 29 (7), 559-563 (2002).
174. Kayir H., Uzbay IT. Evidence for the role of nitric oxide in caffeine-induced locomotor activity in mice. *Psychopharmacology*,172(1), 11-15 (2004).
175. Alasehirli B., Cekrnen M.,Nacak M., Balat A.: Effects of Caffeine on Placental Total Nitrite Concentration: A 21-Day, Vehicle-Controlled Study in Rats. *Current Therapeutic Research*, 66, No:2, 130-7 (2005).
176. Nikolic J., Bjelakovic G., Stojanovic I.: Effect of caffeine on metabolism of L-arginine in the brain. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 244, 125-128 (2003).
177. Inkielewicz-Stepniak I., Czarnowski W. Oxidative stress parameters in rats exposed to fluoride and caffeine. *Food and Chemical Toxicology* 48 (2010) 1607–1611
178. Mouton R, Holder K.Laboratory tests of renal function *Anaesthesia And Intensive Care Medicine* 2006; 7:240-243

179. Newman DJ : More on cystatin C. Clin Chem 1999;45:718-9
180. Dobashi K, Ghosh B, Orak JK, Singh I, Singh AK. Kidney ischemia-reperfusion: Modulation of antioksidant defenses. Mol Cell Biochem 2000;205:1-11