

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ ANABİLİM DALI

132556

BÖBREK İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINDA ANTİOKSİDAN
(MELATONİN, PGE₁, E VİTAMİNİ) KULLANIMININ ETKİLERİ

1.0.1. T.C. FIRAT ÜNİVERSİTESİ
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

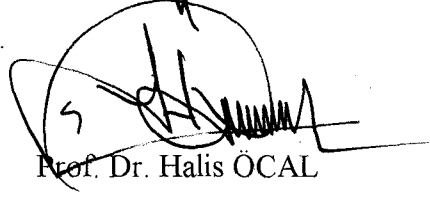
DOKTORA TEZİ

132556

Dr. Tansel YÜCEBİLGİÇ SAPMAZ

2003-ELAZIĞ

ONAY SAYFASI


Prof. Dr. Halis ÖCAL

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Enver OZAN

Tip Programı Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.
Prof. Dr. Enver OZAN

Danışman

Doç. Dr. Leyla KOYUTÜRK

II. Tez Danışmanı

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Enver OZAN

Prof. Dr. Ali OTLU

Prof. Dr. Mustafa SARSILMAZ

Doç. Dr. Leyla KOYUTÜRK

Y. Doç. Dr. Özlem DABAK

TEŞEKKÜR

Doktora eğitim ve öğrenimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen tez danışmanlarım Sayın Prof. Dr. Enver OZAN ve Doç. Dr. Leyla KOYUTÜRK başta olmak üzere, Prof. Dr. Aysel KÜKNER, Yrd. Doç. Dr. Neriman ÇOLAKOĞLU, Yrd. Doç. Dr. Özlem DABAK, Araş. Gör. Dr. Jale ÖNER, Yrd. Doç. Dr. Hakan ÖNER'e teşekkür ederim. Biokimyasal parametrelerin çalışılmasında emeği geçen Yrd. Doç. Dr. Nevin İLHAN'a teşekkür ederim. Elektron mikroskopik incelemelerimde yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL ve deneylerim sırasında bana yardım eden Doç. Dr. Ahmet AYAR, Yrd. Doç. Dr. Selim KUTLU ve Araş. Gör. Remzi ATILGAN'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

1. Özet	1
2. Abstract	3
3. Giriş	5
3.1. Böbreklerin gelişimi	5
3.2. Böbreklerin morfolojik yapısı	6
3.3. Proksimal kıvrımlı tübül:	11
3.4. Henle kulpu	13
3.5. Distal kıvrımlı tübül	14
3.6. Toplayıcı tübüller	15
3.7. Jukstaglomeruler apparatus (jga)	16
3.8. Böbrek medullası	17
3.9. İnterstisyum	17
3.10. Böbrek dokusunda kan dolaşımı	18
3.11. Böbreklerin histofizyolojisi	19
3.12. İskemi-reperfüzyon hasarı:	23
3.12.1. Geri dönüşlü zedelenme	25
3.12.2. Geri dönüşsüz zedelenme	25
3.13. Serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri:	29
3.13.1.a. Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet-}$)	30
3.13.1.b. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	31
3.13.1.c. Hidroksi Radikali ($OH^{\bullet}$)	32
3.13.1.d. Singlet Oksijen (1O_2)	32
3.13.2. Serbest Radikallerin Kaynakları:	33
3.13.2.a. Serbest radikallerin endojen kaynakları	33
3.13.2.b. Serbest radikallerin ekzojen kaynakları	33
3.13.3. Serbest radikallerin etkileri	33
3.13.3.a. Lipid peroksidasyonu	33
3.13.3.b. Proteinlere etkileri	35
3.13.3.c. Nükleik asitler ve DNA'ya etkileri	36
3.13.3.d. Karbonhidratlara etkileri	36
3.13.4. Antioksidan savunma sistemleri	36
3.13.4.a. Endojen antioksidanlar	37
3.13.4.b. Eksojen antioksidanlar	43
3.13.5. Deneylerimizde kullandığımız Antioksidanlar	44

3.13.5.1. Melatonin	
3.13.5.2. PGE1	
3.13.5.3. Vit.E	
3.13.5.1. Melatonin	44
3.13.5.1.a. Sentez ve ritmik salınım	44
3.13.5.1.b. Melatoninin metabolizması	45
3.13.5.1.c. Melatoninin fizyolojik fonksiyonları	46
3.13.5.1.c.1. Melatoninin antioksidan etkisi	48
3.13.5.2. Prostaglandin E ₁	50
3.13.5.2.a. Biyosentez	51
3.13.5.2.b. PGE ₁ 'in renal sistem üzerine farmakolojik ve fizyolojik etkileri	51
3.13.5.3. E vitamini	52
4. Gereç ve yöntem:	54
4.A. Gereç	54
4.A.1. Denek seçimi	54
4.A.2. Deneysel grupların oluşturulması	54
4.A.3. Operasyonun Yapılışı	54
4.A.4. Örneklerin Alınması	55
4.B. Örneklerin incelenmesi	56
4.B.1. Histolojik inceleme	56
4.B.2. Biyokimyasal inceleme	56
4.B.2.1. Doku MDA Düzeyleri	56
4.B.2.2. Plazma Lipid Peroksit (LPO) Ölçümü	56
4.B.2.3. Eritrosit Süperoksit Dismutaz (SOD) Tayini	57
4.B.2.4. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Enzim Aktivitesi	57
4.C. İstatistik analizler	57
5. Bulgular	59
5.A. Böbrek dokusundaki histolojik değişiklikler	59
5.A.1. Işık mikroskop bulguları	59
5.A.2. Elektron mikroskop bulguları	60
5.B. Lipid Peroksidasyon Ürünleri	62

5.C. Antioksidan savunma sistemine ait biyokimyasal parametreler	63
5.D. Doku histolojisi ile diğer parametreler arasındaki Spearman Bağlantı analizi	64
5.E. Işık ve elektron mikroskopik görüntümlere ait resimler	65
5.E.1. Işık mikroskopik görüntümlere ait resimler	66
5.E.2. Elektron mikroskopik görüntümlere ait resimler	76
6. Tartışma	87
7. Kaynaklar	94
8. Özgeçmiş	100



TABLO LİSTESİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Serbest Radikaller	30
Tablo II: Tüm grupların böbrek histolojisine ait ışık ve elektron mikroskopi sonuçları. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak belirtildi.	62
Tablo III: Tüm grupların doku ve plazma MDA düzeylerine ait sonuçlar. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak belirtildi.	63
Tablo IV: Tüm grupların eritrosit SOD ve GSH-Px düzeylerine ait sonuçlar. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak belirtildi.	63

ŞEKİL LİSTESİ

ŞEKİL	Sayfa
Şekil 1: Böbreğin genel yapısı (Temel Histoloji. A Lange medical book. 8. Baskı. L. Carlos Junqueira, Jose Carneiro, Robert O. Kelley (eds).1995; 359-377).	7
Şekil 2: Nefronun şematik görünümü (Temel Histoloji. A Lange medical book. 8. Baskı. L. Carlos Junqueira, Jose Carneiro, Robert O. Kelley (eds).1995; 359-377).	8
Şekil 3: Lipid peroksidasyonuna yol açan lipid radikallerinin oluşumu ve artışı.	35
Şekil 4: α - tokoferolün yapısı.	52
Şekil 5: Doku histolojisi ile diğer parametreler arasındaki Sperman bağıntı analizi.	64

KISALTMALAR LİSTESİ

AA	: Askorbik asit (C vitamini)
ADH	: Antidiüretik hormon
ADP	: Adenozin di fosfat
ANF	: Atrial natriüretik faktör
APUD	: Amin prekürsör uptake
ATP	: Adenozin tri fosfat
BUN	: Blood üre nitrojen
Ca ⁺²	: Kalsiyum
Dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DNES	: Diffüz nöroendokrin sistem
EC	: Enterokromaffin hücre
ELAM ₁	: Endotel lökosit adezyon molekülü
ER	: Endoplazmik retikulum
Fe ⁺²	: Ferro demir
Fe ⁺³	: Ferri demir
GER	: Granüler endoplazmik retikulum
H ⁺	: Hidrojen
H-E	: Hemotoksilen-Eosin
HOCL	: Hipoklorik asit
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
HO ₂	: Perhidroksi radikali
ICAM ₁	: İntersellüler adezyon molekülü
Ig G	: Immünglobulin G
IM	: İntramüsküler
IP	: İntraperitoneal
I-R	: İskemi-reperfüzyon
JGA	: Jukstaglomerüler aparat
K ⁺	: Potasyum
LOO [•]	: Lipid peroksi radikalleri
LOOH	: Lipid hidroperoksitleri
MDA	: Malondialdehit
Mg	: Magnezyum
µm	: Mikrometre
Mn	: Manganez
Mosm/lt	: Miliozmol/litre
Na ⁺	: Sodyum
NaCl	: Sodyum klorür
NADH	: Nikotin amid adenin dinükleotid
NH ₄	: Amonyum iyonu
Nm	: Nanometre
¹ O ₂	: Singlet oksijen

O ₂ ⁻	: Süperoksit anyonu
OH [·]	: Hidroksil radikali
PAF	: Platelet aktive edici faktör
PAS	: Periodik asid shift
PG	: Prostoglandin
PMNL	: Polimorfo nükleer lökosit
PO ₄	: Fosfat
PTH	: Paratiroid hormon
PUFA	: Poliansatüre yağ asiti
RO [·]	: Alkoksil radikalleri
ROO [·]	: Peroksi radikalleri
RNA	: Ribonükleik asit
ROP	: Reaktif oksijen radikali (=SOR)
RS [·]	: Thiyl radikalleri
SOD	: Süper oksit dismutaz
SOR	: Serbest oksijen radikali
Vit	: Vitamin
VCAM	: Vasküler hücre adezyon molekülü
Zn	: Zinc (çinko)

1. ÖZET:

Amaç: Deneysel olarak ratlarda, böbrekte iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturup, antioksidan olarak melatonin, PGE₁ ve Vitamin E kullanımının bu hasar üzerine olan etkilerini histolojik ve biokimyasal olarak incelemek.

Gereç ve Yöntem: 42 adet Wistar albino cinsi, estrus fazındaki dişi ratlar rastgele 6 gruba ayrıldı.

1. Grup (Sham Grubu, n=7): Kontrol grubu.
2. Grup (İskemi Grubu, n=7): 60 dk.böbrek iskemisi uygulandıktan sonra, reperfüzyon uygulanmayan grup.
3. Grup (İskemi-reperfüzyon Grubu, n=7): 60 dk.böbrek iskemisi uygulandıktan sonra, 60 dk.reperfüzyon uygulanan grup.
4. Grup (Melatonin Grubu, n=7): 60 dk.böbrek iskemisi uygulandıktan sonra reperfüzyondan 15 dakika önce 20 mcg/kg/IM melatonin verilen ve 60 dk reperfüze edilen grup.
5. Grup (PGE₁ Grubu, n=7): 60 dk.böbrek iskemisi uygulandıktan sonra reperfüzyondan 15 dk önce 20 mcg/kg/IM PGE₁ verilen ve 60 dk reperfüze edilen grup.
6. Grup (Vitamin E Grubu, n=7): 60 dk.böbrek iskemisi uygulandıktan sonra reperfüzyondan 15 dk önce 500 mg/kg/IM vitamin E verilen ve 60 dk reperfüze edilen grup.

Sol böbrekten doku MDA'i, ışık ve elektron mikroskopik inceleme için doku örnekleri alındı. %10'luk formaldehit ve gluteraldehit solusyonuna konuldu. Alınan kan örneklerinden biyokimyasal olarak SOD, GSH-Px, ve kan MDA düzeylerine bakıldı. Verilerin istatistiksel analizi için Kruskal Wallis varyans analizi kullanıldı.

Bulgular: Ratlarda deneysel olarak oluşturduğumuz böbrek iskemi ve reperfüzyon hasarında en fazla hasar iskemi-reperfüzyon grubunda saptanırken ($p<0.02$, Mann Whitney U testi). Doku MDA düzeyi artarken, kan SOD ve GSHPx düzeylerindeki azalma arasında korelasyon tespit edildi. En az hasar melatonin grubunda tespit edildi ($p<0.02$, Mann Whitney U testi).

Sonuç: Ratlarda deneysel olarak oluşturduğumuz böbrek iskemi ve reperfüzyon hasarında hasarlanmayı azaltmak için, (gerek histolojik, gerek

biyokimyasal inceleme sonuçlarında) antioksidan olarak melatoninin, PGE_1 ve E vitamininden daha etkili olduğu tespit edildi. Bu nedenle böbrek iskemi reperfüzyon olaylarında ilk tercih melatonin olabilir kanaatindeyiz.

Anahtar kelimeler: Böbrek, İskemi-Reperfüzyon, antioksidan, ışık mikroskobu, elektron mikroskobu.

2. ABSTRACT:

OBJECTIVE: To investigate the effects of melatonin, PGE₁ and E vitamine as antioxidants in experimental renal ischemia-reperfusion injury in rats histologically and biochemical.

MATERIAL AND METHODS: 42 adult female Wistar rats with regular estrous cycles were randomly divided into six groups. Group 1 (n=7) was the control group; Group 2 (n=7): Only ischemia was produced in rats by clamping one renal artery for 60 minutes.

Group 3 (n=7): Ischemia was produced in rats by clamping one renal artery for 60 minutes and reperfused for 60 minutes. Group 4 (n=7): Ischemia and reperfusion was produced for 60 minutes. Before fifteen minutes of reperfusion 20 mcg/kg/IM melatonin was performed.

Group 5 (n=7): Ischemia and reperfusion was produced for 60 minutes. Before fifteen minutes of reperfusion 20 mcg/kg/IM PGE₁ was performed.

Group 6 (n=7): Ischemia and reperfusion was produced for 60 minutes. Before fifteen minutes of reperfusion 500 mcg/kg/IM vitamin E was performed.

For light and electron microscopic investigations renal samples put into %10 formaldehyde and gluteraldehyde solutions. Renal tissue and blood malondialdehyde (MDA) levels, superoxid dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSHPx) levels were determined. Kruskall Wallis analysis of variance was used in the statistical analysis of data.

RESULTS: In experimental renal ischemia-reperfusion injury in rats, the histological analyses of kidneys revealed that, the most extensive damage occurred at ischemia-reperfusion group ($p < 0.02$, Mann Whitney U test), which correlated with decrease in blood SOD, GSHPx and significant increase renal tissue MDA concentrations. In spite of this, the histological and biochemical analyses of rats pretreated with melatonin showed the less damage ($p < 0.02$, Mann Whitney U test).

CONCLUSIONS: In our study, the histological and biochemical analyses revealed that; melatonin was more effective than PGE₁ and vitamin E as antioxidants, in experimental renal ischemia-reperfusion injury in rats to reduced the damage. Thus, melatonin may be the first preference in renal ischemia-reperfusion injury treatment.

KEY WORDS:Renal ischemia-reperfusion, antioxidants, light microscopy, electron microscopy.



3. GİRİŞ:

Genel Bilgiler:

3.1. Böbreklerin Gelişimi

Ara mezodermden köken alan ürogenital plaktan üç farklı böbrek sistemi gelişir: pronefroz, mezonefroz ve metanefroz. Dördüncü haftanın başında servikal bölgede segmental olarak gelişen pronefroz, dördüncü hafta sonunda dejenere olur ve geriye sadece pronefroz (Wolff) kanalı kalır. Pronefroz gerilerken 7. servikal ile 4. lomber somit arasında segmental olmayan mezonefrojenik blastem gelişir. Wolff kanalının indüksiyonu ile mezonefroz keseleri ve bu keselerden de geçici nefronlar oluşur. Ancak, 3. ayın başlangıcından itibaren mezonefrozun 1. lomber segmente kadar olan 5/6'lık bölümü körelir. Geriye kalan 1/6'lık bölümünden ise epigenitalisler ve paragenitalisler ortaya çıkar. Wolff kanalından ise üreter tomurcuğu gelişir. Metanefroz 5. hafta başında gelişmeye başlar ve iki yapıdan orijin alır: Metanefrojenik blastem ve üreter tomurcuğu. Metanefrojenik blastem üreter tomurcuğu ile indüklenir. Üreter tomurcuğunun sağ kısmı üreteri, genişlemiş kranial kısmı ise pelvis renalisi oluşturur. Her toplayıcı boru ardarda dallanır. İlk jenerasyon genişleyerek kaliks majörleri, daha sonraki jenerasyon kaliks minörleri, geri kalanlar ise toplayıcı boruları oluşturur. Üreter tomurcuğunun metanefrojen blasteme indüksiyonu ile her duktusun karşısına bir blastem kümesi yerleşir. Sağ ve solda yerleşen renal veziküllerle toplayıcı borular birleşerek proksimal ve distal tubuluslar oluşur. Yani üreter tomurcuğundan , üreter, renal pelvis, majör ve minör kaliksler ve sayısı 1-3 milyon arası değişen toplayıcı tübül gelişir (47). Dorsal aorta Bowman kapsülüne girerken epitel hücreleri dökülür ve geriye kalan hücreler episitleri yapar. Kalıcı böbrek 5. lumbal omur bölgesinde yerleşir. Özetlersek böbrek iki farklı kaynaktan a-) boşaltım birimlerinin olduğu metanefrik mezoderm ve b-) toplayıcı sistemin kaynaklandığı üreter tomurcuğundan oluşur. Metanefroz veya kalıcı böbrek, birinci trimesterin sonunda fonksiyonel hale gelir. İdrar amnion boşluğuna geçer ve amnion sıvısıyla karışır . Bu karışım, fetus tarafından yutulur ve bebeğin sindirim sistemine girer. Burada emilerek kan dolaşımına geçer ve tekrar böbrekler tarafından amnion sıvısına atılır. Fetal yaşam süresince, yıkım ürünlerinin atılımını plasenta üstlenmiş olduğundan, böbrekler sorumlu değildir (47).

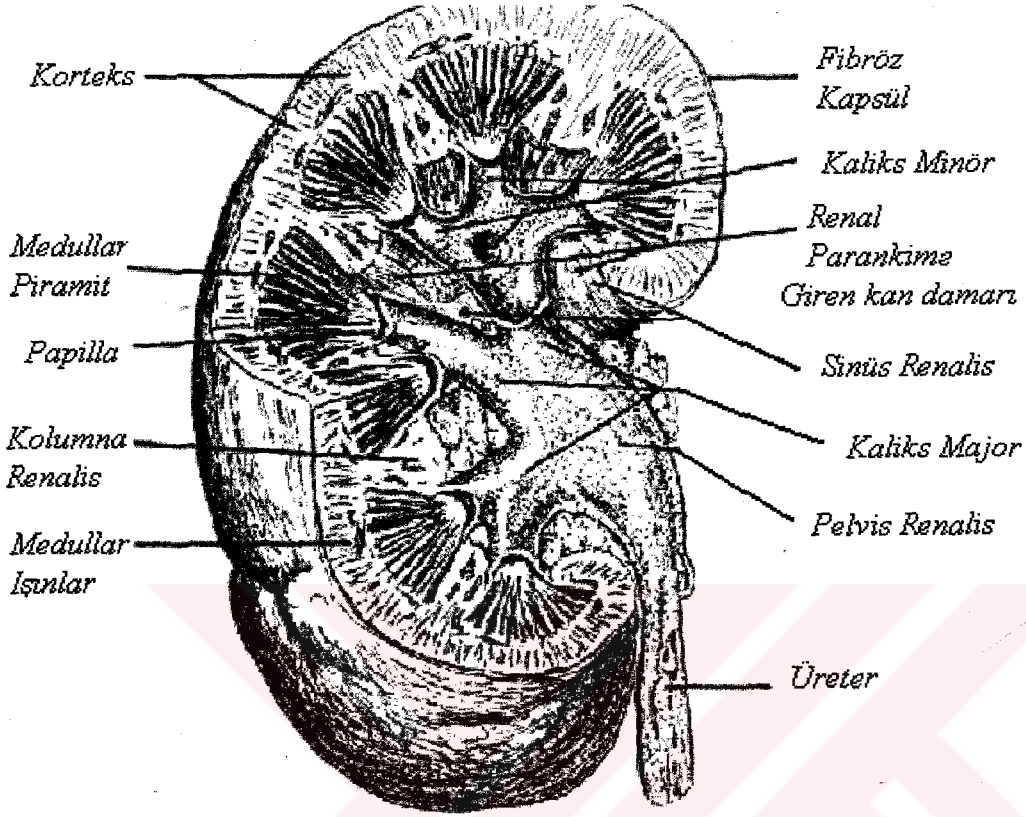
3. 2. Böbreklerin Morfolojik Yapısı:

Böbrekler, lumbal bölgede yerleşmiş bir çift retroperitoneal organdır. Her birinin iki yüzü (ön ve arka), iki ucu (üst ve alt) ve iki kenarı (dışta konveks, içte konkav) bulunur. Her böbrek yaklaşık olarak 10 cm uzunluğunda, 6.5 cm genişliğinde ve 3 cm kalınlığındadır. Erişkin insanda ağırlığı 120-170 gr arasındadır. Genellikle sol böbrek sağ böbrekten 1-2 cm daha yukarı yerleşimlidir (35).

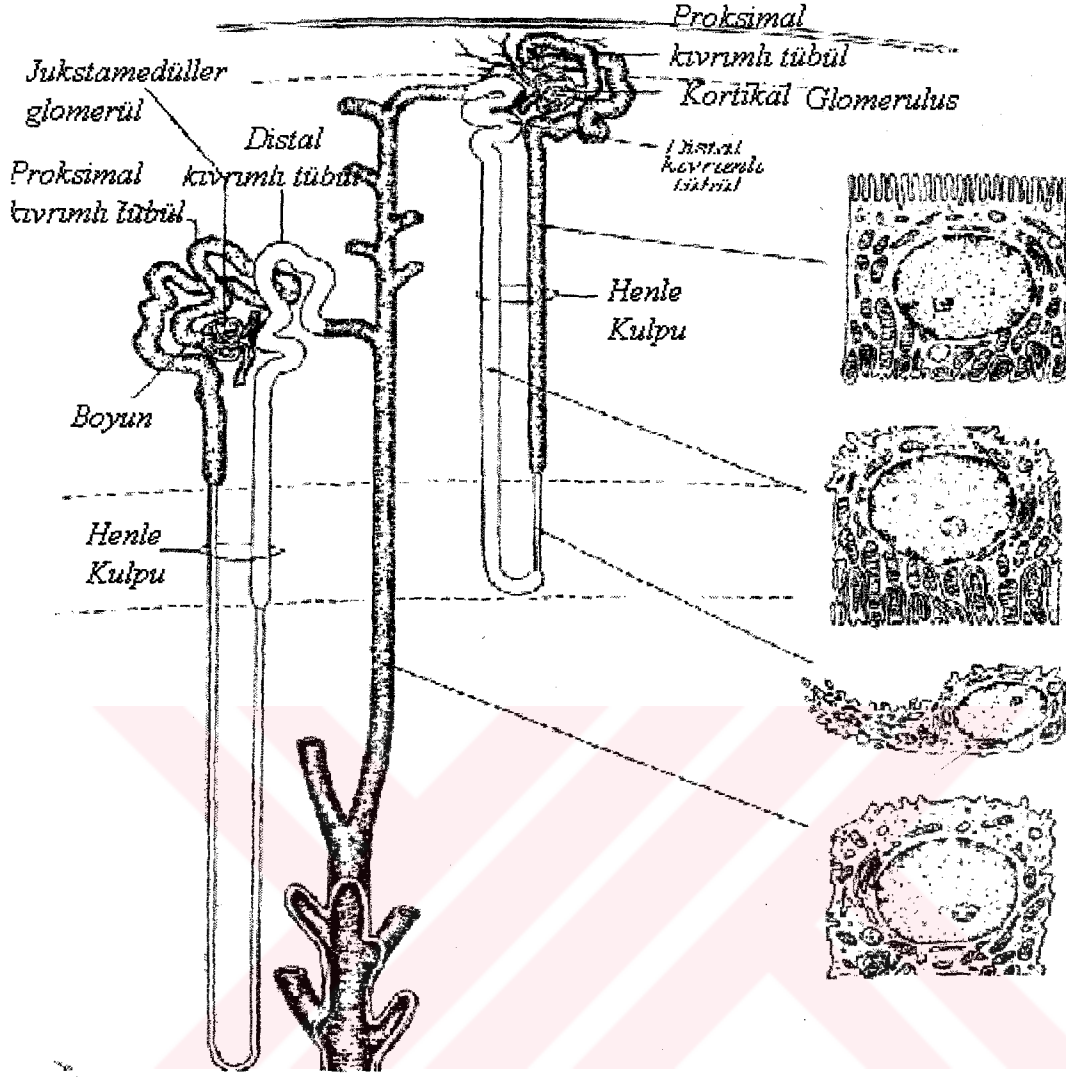
Sağ böbrek ön yüzde karaciğerin sağ lobu, duodenumun 2. kısmı ve flexura coli dextra ve sağ glandula suprarenalis ile komşudur. Sol böbrek ön yüzde sol glandula suprarenalis, mide, dalak, pankreas, flexura coli sinistra ve jejunum kıvrımları ile komşudur. Her iki böbrek arka yüzde ise üstte musculus diaphragma ile, altta içten dışa doğru musculus psoas majör, musculus quadratus lumborum ve musculus transversus abdominis ile komşudur (35,78).

Böbrek yüzeyi dıştan capsula fibrosa adı verilen bir kapsülle sarılıdır. Her böbreğin medial yüzü konkavdır ve fibröz kapsül burada kesintiye uğrar. Medial kenarın orta kısmında organın hilusu yer alır. Hilus kan ve lenf damarları ile sinirlerin girip çıktığı yerdir. Böbreğin dış kenarı ise konvektir. Üreterin üst ucu hilusu dolduran bir genişleme yaparak pelvis renalis (renal pelvisi) oluşturur. Pelvis renalis, böbrek dokusu içine kaliks major denilen 2-3 tane kese şeklinde uzantı gönderir. Her kaliks majörden ise sayıları toplam 8-12 tane olan kaliks minörler dallanır. Tüm böbrek parankimasi hilustan içeriye doğru uzanan ve sinüs renalis denilen bir boşluğu kuşatır (35,81).

Böbreğin iç yapısı dışta korteks, içte medulla olmak üzere iki farklı bölge gösterir. Medullada sayılan 8-18 kadar olan ve medullar piramitler ya da renal piramitler olarak bilinen konik şekilli yapılar bulunur. Medullar piramitlerin tabanı kortekse bakar ve buradan kortekse doğru birbirine paralel olarak uzanan tubulus demetleri veya striae medullarisler çıkar. Her striae medullaris, böbreğin fonksiyonel birimleri olan birkaç nefronun düz parçası ile birlikte bir ya da daha çok sayıda toplayıcı kanaldan oluşur. Medullar piramitlerin apikal yüzleri ise kaliks minörlerin lümenine sokularak papilla renalis oluşturur. Genellikle 2-3 piramit birleşerek bir papilla içinde sonlanır. Kortikal doku medullayı dıştan kuşatır ve medullar piramitlerin arasına uzanarak pelvis renalise kadar iner ve Kolumna Renalis Bertini olarak adlandırılan koyu renkli sütunları oluşturur (35,81).



Şekil 1: Böbreğin genel yapısı (Temel Histoloji. A Lange medical book. 8. Baskı. L. Carlos Junqueira, Jose Carneiro, Robert O. Kelley (eds).1995; 359-377).



Şekil 2: Nefronun şematik görünümü (Temel Histoloji. A Lange medical book. 8. Baskı. L. Carlos Junqueira, Jose Carneiro, Robert O. Kelley (eds).1995; 359-377).

Toplayıcı tubuluslar ve kanallar, nefronlarda üretilen idrarı toplayarak böbrek pelvisine iletirler (81). İdrar oluşumunda görev alan böbreğin fonksiyonel alt birimlerine nefron (böbrek cisimciği) ismi verilir. Her bir nefron tek başına idrar yapma yeteneğine sahiptir. Her iki böbrekte yaklaşık 2.000.000 nefron vardır. Her bir nefron temel olarak iki kısımdan oluşur: 1-Glomerulus 2-Bowman kapsülü (21). Bowman kapsülü iki tabakalı epitel yapısındadır. İç tabaka glomerulusu oluşturan kapiller yumağını çevreler ve visseral yaprak adını alır. Böbrek cisimciğinin dış tabakasını oluşturan paryetal yaprak ise yassı hücrelerden meydana gelir. Visseral ve paryetal yaprak arasında kapiller duvarından ve visseral yapraktan süzülen sıvının toplandığı üriner boşluk (Cavum Bowmani) bulunur. Her böbrek cisimciğinde, afferent arteriolün girdiği ve efferent arteriolün çıktığı bir damar

kutbu ile proksimal kıvrımlı tubulusun başladığı noktada bir idrar kutbu bulunur. Paryetal yaprağın yassı epitelî idrar kutbunda izoprizmatik epitele dönüşür (35,81).

Bowman kapsülü içerisinde yer alan glomerulus, 100-200 mikrometre (μm) çapında özel kapiller yumağıdır (81). İnsan ve sıçan böbreklerinde glomeruler kapillerler yuvarlaklaşarak üriner boşluğun çoğunu dolduracak şekilde yumak oluşturmaktadırlar (68).

Glomerulusun yapısını visseral yaprağın epitel hücreleri olan podositler, kapillerlerin endotel hücreleri ve mezengial hücreler oluşturur (81). Visseral yaprak damar kutbunda geriye dönerek paryetal yaprak ile devam eder. Visseral yaprağı oluşturan podositlerin hücre gövdesinden birkaç primer uzantı çıkar. Her bir primer uzantı ise pedisel denilen çok sayıda sekonder uzantı oluşturur. Pediseller tüm kapiller yüzeyine dağılmışlardır. Pediseller glomerülün kapillerlerine sarılmış durumdadır. Sekonder uzantılar, bazal lamina ile doğrudan temas halindedir. Ancak podositlerin hücre gövdeleri ve primer uzantıları bazal laminaya değmez. Tek bir podositte uzanan pediseller birden fazla sayıda kapillere kenetlenmiş durumdadır; tek bir kapiller üzerinde bazal laminaya tutunan iki farklı podosite ait pediseller birbiriyle değişimli olarak sıralanırlar. Nükleusları ile üriner boşluğa doğru çıkıntı yapan podositlerin hücre gövdesi organellerden zengindir, oysa ayakçıklar (pediseller) organel yönünden fakirdir. Pediseller çok az veya hiç organel içermemelerine karşın çok sayıda mikrofilament ve mikrotübül bulundurlar.

Podositlerin sekonder uzantıları birbirleriyle aralarında 25 nanometre (nm)'lik mesafe olacak şekilde kenetlenirler; bu aralıklara filtrasyon yarıkları denir. Komşu uzantıları bağlayan (bu şekilde filtrasyon yarıkları arasında köprü kurulur) bir diyafram bulunur. Bu diyafram pencereci endotel hücrelerinin diyaframıyla hemen hemen aynı kalınlıktadır. Podositlerin sitoplazması çok sayıda serbest ribozom, az sayıda kaba endoplazma retikulumu sisternası, seyrek mitokondriler ve belirgin bir Golgi kompleksi içerir. Podositlerin sitoplazmasında bunların kasılabilmesini sağlayan aktin mikrofilament demetleri vardır.

Glomerul kapillerindeki endotel hücreleriyle, bunların dış yüzeyini örten podositler arasında kalın (yaklaşık 300-350 nm) bir bazal membran bulunur. Bu tabakanın kapillerlerdeki kanla idrar boşluğunu birbirinden ayıran bir filtrasyon engeli oluşturduğu düşünülmektedir. Bu bazal membran kapillerin ve podositin

oluşturduğu bazal laminaların kaynaşmasından meydana gelmiştir. Podosit ve kapiller endotel hücrelerinin ortak olarak oluşturduğu glomerüler bazal membranın üç tabakası vardır. Ortada lamina densa, içte lamina rara interna, dışta lamina rara eksterna. Her iki yandaki lamina rara tabakaları daha fazla elektron-geçirgendir. Her iki elektron-geçirgen lamina rara bunları hücrelere bağlamaya yarayabilecek olan fibronektin içerir. Lamina densa ise negatif yüklü bir proteoglikan olan heparan sülfat içeren bir matriks içinde tip IV kollajen ve lamininin oluşturduğu ağ şeklinde bir yapıdır. Yani glomerül bazal laminası, lamina densanın fiziksel bir filtre olarak iş gördüğü, lamina raradaki anyonik bölgelerin ise elektriksel bir engel oluşturduğu seçici bir makromoleküler filtredir. Lamina rara interna kapiller endotel hücreleri ile lamina rara eksterna ise podosit ayakçıkları ile ilişkidir. Komşu pediseller 6 nm kalınlığında diyaframla birbirlerine bağlanmışlardır. Glomeruler bazal membran, histolojik kesitlerde periodik asid-schiff (PAS) ile kuvvetli reaksiyon gösterir (68,81). Glomeruler kapillerlerin endotel hücreleri glomeruler filtratın süzüldüğü ilk bariyerdir. Endotel hücreleri ince bir sitoplazmaya sahiptir. Organellerin çoğu nükleus çevresinde yoğunlaşmıştır. Hem insan hem de sıçanda glomeruler endotel hücrelerinin gövdesinde mikrotübül ve ara (intermediate) filament ağlar gözlenirken, endotelyal fenestrasyonlar çevresinde mikrofilamentler dikkati çekmektedir. Endotel hücreleri 70-90 nm çapında çok sayıda ve düzensiz fenestralara sahiptir. Fenestralar sayıca pencereli kapillerin bulunduğu diğer organlardaki endotel hücrelerindekienden daha fazladır. Bu hücrelerde diğer pencereli kapillerlerde gözlenen kapiler açıklıklarını birbirine tutturan ince diyafram yapısı bulunmaz (81). Bu fenestralar, bazal membran ile kan arasındaki direkt ilişkiyi önlemekte, böylece büyük moleküller için bariyer görevi görmektedir (68,81). Glomerulus, Bowman kapsülü içinde yer alan, birbirine paralel yerleşen ve anastomozlar yapan kapiller bir yumaktır. Vucutta bulunan diğer kapillerlerden iki önemli farkı vardır. 1-İki arteriyal yatak arasında yer alır (Afferent arteriyol – glomerulus–efferent arteriyol). Bunun sonucu oluşan glomerulus içi yüksek basınç, sıvının Bowman kapsülü içine filtre olmasına sebep olur. 2-Glomerüler membran yapısına bağlı olarak geçirgenlik diğer kapillerden daha fazladır. Glomerüler membran özelleşmiş bir yapıdır ve başlıca üç kısımdan oluşur. Bunlar içten dışa; endotel– bazal membran– epitel tabakasıdır. Kapiller endotel hücreler arasındaki

fenestralar ve bazal membran epitelyal yüzdeki slit por adı verilen süzülme yarıkları (filtrasyon slits) sayesinde, glomerulus membranının bu seçici geçirgenlik özelliğinin iki nedeni vardır. 1-Slit porların büyüklüğü (size selectivity): İnsülin (molekül ağırlığı 5000 dalton) rahatlıkla geçerken, albumin (molekül ağırlığı 70.000 dalton) için geçirgenlik pratik olarak sıfırdır. 2-Elektriksel yük (charge selectivity): Glomerul bazal membranda bulunan negatif yüklü proteoglikanlar tarafından oluşturulur (21). Renal korpüskül, mezengial hücreler olarak adlandırılan bir hücre grubu daha içerir. Bu hücreler belirli yapısal özellikleri ile (örneğin; çentikli nükleusları ve hücrenin membranına dik olarak düzenlenmiş ince fibrillerin varlığı ile) podosit ve endotelyal hücrelerden ayrılır. Mezengial hücreler ve bu hücrelerin ekstrasellüler matriksi mezengiumunu oluşturur. Mezengial matriks, mezengial hücreler ile endotel hücrelerini birbirinden ayıran bir ağ oluşturur. Mezengial hücreler, glomeruler kapillerlerin bazal membranı ile sarılırlar ve sitoplazmik uzantıları ile endotel hücrelerinin arasına sokulurlar. Yapısal özellikleri perisit benzer. Fonksiyonlarının hepsi henüz yeterince anlaşılamamakla beraber fagositik oldukları bilinmektedir. Glomeruler bazal membranda birikmiş olan artıkları ve proteinleri tutarak uzaklaştırdıkları düşünülmektedir. Ferritin enjeksiyonu yapıldıktan sonra (elektron-dağıtıcı, demir içeren bu protein elektron mikroskopta kolaylıkla tanınır) mezengiyal hücrelerin sitoplazmasının bu proteinle dolduğu görülür. Bu hücreler makrofajlar gibi davranarak süzme işlemi sırasında bazal laminaya biriken partiküllü maddeleri temizleme ödevi görüyor olabilir (81). Ayrıca, mezengial hücre ve mezengial matriksin, epitelyal bazal membran devamsızlığı veya yokluğunda podositlere yapısal destek sağladıkları da ileri sürülmektedir. Klinik olarak, belirli böbrek hastalıklarında mezengial hücre proliferasyonu görülebilir, böyle durumlarda anormal miktarda protein ve protein komplekslerinin bazal membranda tutulduğu gözlenir (68,81).

3.3. Proksimal kıvrımlı tübül:

Böbrek cisimciğinin idrar kutbunda, yassı paryetal epitel tek katlı izoprizmatik epitele dönüşür ve proksimal tubulusların kıvrımlı parçası ile devam eder. Kıvrımlı proksimal tubulus ortalama 14 milimetre (mm) uzunluğunda, nefronun en uzun, en kıvrımlı, ve en geniş çaplı bölümüdür. Tubulus lümeni 5-6 hücre ile çevrelenmiştir. Hücrelerin apikal yüzeyleri üzerinde yaklaşık 1.0-1.3 μm

uzunluğunda, sıkıca paketlenmiş mikrovilluslar fırçası kenarı oluştururlar. Fırçası kenar, glukozun hücre yüzeyinden emilimini arttıran alkalın fosfataz enzimi içermelerinden dolayı kuvvetli alkalın fosfataz reaksiyonu gösterir. Aynı zamanda, kuvvetli PAS (+) reaksiyon da verir. Fırçası kenar altında, apikal sitoplazmada mikrovillusların tabanları arasında makromolekülleri emme kapasitesinde önemli rol oynayan çok sayıda kanalikül yer alır. Apikal membranların içeri doğru yaptığı girintiler ise pinositotik vezikülleri oluşturur. Bu veziküller içinde glomerül süzgecinden geçen makromoleküller (esas olarak moleküler ağırlığı 70.000 den düşük olan proteinler) bulunur. Makromoleküllerin parçalandığı yer olan lizozomlarla pinositotik veziküller kaynaşırlar ve oluşan monomerler dolaşıma geri döner. Bu hücrelerin bazal bölümlerinde yoğun membran katlanmaları ve komşu hücreler arasında lateral kenetlenmeler bulunmaktadır. Sodyum iyonlarının aktif olarak hücre dışına atılmasından sorumlu olan Na^+/K^+ -ATPaz (sodyum pompası) bu bazolateral membranlarda bulunur. Mitokondriler hücrenin tabanında yoğunlaşmıştır ve hücrenin uzun eksenine paralel dizilim gösterirler. Mitokondrilerin bu şekilde yerleşimi ve hücrenin tabanında membran yüzey alanını arttıran bu düzenlenme, aktif iyon taşınmasında rol üstlenen hücrelere özgüdür. Lateral membran kenetlenmesinin çok sıkı olması yüzünden ışık mikroskopunda incelenen proksimal tübül hücreleri arasındaki hücre sınırları belirgin olarak seçilemez (81). İntrasitoplazmik membran katlantıları ve bazal mitokondriler, hücre içine geri emilen sıvının önce ekstrasellüler ortama, oradan da peritübüler kan kapillerlerine geçmesini sağlarlar (35,68,81). Proksimal tübülde ultrafiltratın (su ve sodyum dahil) %50'si geri emilir, emilim izoozmotiktir. Glomerül filtrata geçen sodyumun yaklaşık %50'si proksimal tübülden geri emilir. Bu emilim aktif transport (bazolateral membranda bulunan Na-K ATP'az) ile gerçekleşir. Glomerülötübüler denge, sempatik sinir sistemi, renin-anjiyotensin sistemi, atrial natriüretik faktör (ANF), paratiroid hormon (PTH), ve insülin proksimal tübülde sodyum emiliminde etkili olan faktörlerin başında gelir. Katekolaminler, anjiyotensin 2, PTH ve insülin sodyum ve su geri emilimini artırırken ANF azaltır. Bu faktörler arasındaki dengeyi belirleyen en önemli parametre efektif plazma hacminin durumudur. Glikoz ,aminoasit ve diğer organik maddeler (tama yakın) sodyumun (Na^+) aktif transportuna (sekonder aktif

transport, Adenozin tri fosfata -ATP- bağımlı değil) eşlik ederek taşınırlar (kotransport). Böbreklerin asit-baz metabolizması düzenlenmesinde önemli rolleri vardır. Asit-baz metabolizması ile ilişkili olarak fizyolojik ve/veya fizyopatolojik koşullarda oluşan asitin nötralizasyonu ve glomerüler filtrata geçen bikarbonatın geri Emilimi böbreklerde gerçekleşir. Bikarbonat geri Emiliminin %85-90'ı proksimal tübülde gerçekleşir. Amonyum ve titre edilebilir asit üretiminin de çoğu nefronun bu bölümünde gerçekleşir. Proksimal tübülde glutaminden amonyak sentezlenir ve bu Hidrojen (H^+) ile birleşerek amonyum iyonu (NH_4) olarak sekrete edilir. Penisilin, simetidin, salisilatlar, furosemid, kinidin gibi ilaçlar, ve ürik asit, oksalat, safra tuzları, kreatinin proksimal tübülün ikinci kısmında sekrete edilirler. Glomerüler filtrata geçen kalsiyum (Ca^{+2}), fosfat (PO_4), ve magnezyum (Mg) gibi iyonların da önemli bir kısmı proksimal tübülden geri emilir (21). Proksimal tubulusun kıvrımlı parçasından sonra gelen düz parça medullanın dış zonunda seyrettiğinden, proksimal tubulusların dış segmenti olarak da isimlendirilir. Düz parçada lümen daha geniştir. Hücre özellikleri kıvrımlı parçanın özelliklerine benzemekle beraber mitokondrilerin yuvarlaklaştığı ve azaldığı, mikrovillusların seyrekleştiği ve boylarının kısaldığı, intrasitoplazmik membranların ve lateral interdijitasyonların hemen hemen ortadan kalktığı görülür. Ayrıca, çok az lizozomla birlikte yine çok az endositotik vesikül içerirler. Bu özelliklerinden de anlaşılacağı gibi, proksimal tubulusun düz parçası absorpsiyon için özelleşmemiştir.

3.4. Henle kulpu:

Henle kulpu, proksimal ve distal tubuluslar arasında yer alır Kısımları şöyledir; proksimal kıvrımlı tubuluslara yapıca benzeyen bir kalın inen kol, ince inen kısım, çıkan ince kısım, ve yapıca distal tübüle benzeyen kalın çıkan koldan oluşan U şeklinde yapıdır (68,81).

Medullanın dış kısmında, dış çapı 60 μm olan Henle kulpunun kalın inen kolu 12 μm 'ye kadar düşer ve inen kolun ince kısmı olarak devam eder. Lümen yassı epitel ile örtülü olduğundan, bu bölümde lümen geniştir. Epitelin yalnızca çekirdekleri lümene doğru hafif bir çıkıntı yapar. Henle kulpunun ince kısmında fırçamsı kenar ortadan kalkar (35,81). Henle kulpu, idrarın konsantrasyon-dilüsyon işleminin oluşumunda etkili olan nefron segmentidir. İdrar maksimum 1200 miliosmol / litreye (m.osm/lt) kadar konsantre edilebilirken 50-100 m.osm/lt'ye

kadar da dilüe edilebilir. Vücutta fizyolojik koşullarda sıvı ve solüt birikmemesi için çıkarılması gereken minimum idrar miktarı 0.5 lt'dir. İdrarın konsantre edilmesini sağlayan zıt akımlar, zıt akımlar arası permaabilite farkı ve enerji kaynağı henle kulpunda mevcuttur. Girişte izotonik olan filtrat henleyi terkederken hipotonik olur. Henle inen kolu suya geçirgen olup sodyuma geçirgen değildir. Bunun sonucu henlenin inen tarafında su interstisial aralığa emilir ve henlenin tepesine kadar lümen içindeki filtrat gittikçe hipertonic olur. Henle çıkan kolu ise inen kolun tersine sodyuma geçirgen olup suya geçirgen değildir. Çıkan ince kolda sodyum klorür (NaCL) interstisyel aralığa emilirken, üre lümene salgılanır. Bu bölüm suya geçirgen olmadığından lümendeki sıvı gittikçe dilüe olur. Aynı NaCL Emilimi henlenin kortikal çıkan kalın ayağında da Na/K/CI pompası ile devam eder. Henlenin çıkan kalın kısmı da ADH varlığında bile suya geçirgen değildir. Sonuç olarak lümendeki sıvı distal tübüle ulaştığında hipotoniktir (yaklaşık 150 mosm/lt). Glomerüler filtrata geçen sodyumun %40-45'i (henle çıkan kol), suyun %40'ı (henle inen kol) henle kulpundan geri emilir. Henlenin inen kolunda, K^+ ve üre salgısı olurken, henlenin çıkan kolunda K^+ geri Emilimi olur. Magnezyum en çok henle kulpunda geri emilir (21). Bütün nefronların yaklaşık yedide biri kortikomedüller sınırın yakınında bulunur, bunlara jukstamedüller nefronlar adı verilir. Diğer nefronlara ise kortikal nefronlar denir. Bütün nefronlar süzme, emilim, ve salgılama işlemlerinde rol alırlar. Ancak jukstamedüller nefronların medüller interstisyumda hipertonic gradyanı sağlama konusunda özel bir önemi vardır. Medüller interstisyumdaki hipertonic ortam böbreğin hipertonic idrar üretme yeteneğinin temelini oluşturur. Jugstamedüller nefronların henle kangalı çok uzundur ve bunlar medullanın derinliklerine dek inerler. Bu kangallar kısa bir inen kol, uzun ince inen ve çıkan kollar ile kalın çıkan koldan oluşmuştur. Öte yandan kortikal nefronlarda inen ince kollar çok kısadır ve çıkan ince kol bulunmaz (81).

3.5. Distal kıvrımlı tübül

Henle kangalının çıkan kalın kolu kortekse girdiğinde histolojik yapısını korur, ancak büklümlenerek nefronun son kısmı olan distal kıvrımlı tübülleri oluşturur. Bu tübül tek katlı kübik epitelle döşelidir. Histolojik kesitlerde her ikisi de kortekste bulunan proksimal ve distal tübüller arasındaki ayırım belli özelliklerine bakılarak yapılır. Proksimal tübüldeki hücreler distal tübülde bulunan hücrelerden

daha büyük ve fırçası kenarlıdır. Fırçası kenarlar distal tübül hücrelerinde bulunmaz. Proksimal tübüllerde bulunan hücreler daha asidofiliktir. Distal tübüllerin lümenleri daha geniştir ve buradaki hücreler proksimal tübüllerde bulunan hücrelerden daha yassı ve küçük olduğu için, aynı histolojik kesitte distal tübül duvarlarında daha çok sayıda nükleus ve hücre görülür. Proksimal tübüllere özgü olan apikal kanalikül ve veziküller distal tübül hücrelerinde görülmez. Distal kıvrımlı tübül hücrelerinin bazal membranlarındaki yoğun invajinasyonlar ve bunlarla ilişkili mitokondriler, bu hücrelerin iyon taşınmasında rol oynadıklarını göstermektedir. Distal kıvrımlı tübüller kortekste izledikleri yol boyunca kendi nefronlarına ait renal cisimciğin damar kutbuna değerkler. Bu değme noktasında afferent arteriyol ve distal tübül modifiye olur. Distal kıvrımlı tübül hücreleri bu jukstaglomerüler bölgede prizmatik hale dönüşürken çekirdekleri de biraraya toplanır. Çoğu hücrenin bazal bölümünde Golgi kompleksi bulunur. Mikroskopik preparatlarda nükleusların yakın yerleşimi yüzünden daha koyu renkli görünen bu distal tübül segmenti makula densa olarak adlandırılır. Deneysel bulgular, makula densa hücrelerinin tübüler sıvıdaki klorür iyon içeriğine duyarlı olduğunu ve glomerüldeki afferent arteriyolde kasılmaya yol açan moleküler sinyaller oluşturduğunu düşündürmektedir. Bu mekanizma ile makula densa glomerüler filtrasyon hızını düzenleyebilir (81). Distal kıvrımlı tübül idrarın dilüe edilmesinde (seyreltilmesinde) nefronun birinci derecede sorumlu kısmıdır. Bu bölgede NaCl ve suyun %3-5'i geri emilir. Distal tübül ilk kısımları suya geçirgen değilken - Antidiüretik hormona (ADH) cevapsız-, son kısım ve kortikal toplayıcı kanallarda ADH etkisi görülür ve ADH duyarlı su emilimi gerçekleşir. ADH yokluğunda bu kısım suya geçirgen değildir. Bu segmentte ayrıca bikarbonat, Ca ve Mg geri emilimi de gerçekleşir (21). Distal tubulusun kıvrımlı parçası, proksimal kıvrımlı tubulustan daha kısa olduğundan (5mm uzunluğunda) kesitlerde daha az görülür. Kıvrımlı parça daha sonra toplayıcı tubuluslarla birleşir.

3.6. Toplayıcı tübüller:

Toplayıcı tubuluslarda birbirlerine bağlanarak düz toplayıcı kanalları oluştururlar. Bu kanallar Bellini'nin papiller kanalları adını alır ve piramitlerin uçlarına doğru giderek genişler (35,81).

Toplayıcı tubulus ve kanalların her ikisi de basit bir epitele sahiptirler. Kortikal toplayıcı tubuluslar ve dalları yassı, bazen de kübik şekilli (çapı ortalama 40 μm) hücreler içerirler. Medullar toplayıcı kanallar kübikten prizmatığe doğru değişen hücrelere sahiptirler. Bu tübüller medullanın derinine doğru indikçe hücrelerin boyu uzar ve prizmatik olur. Piramidlerin ucuna yakın bölümlerde toplayıcı kanalın çapı 200 μm 'ye ulaşır. Toplayıcı sistemde, sitolojik olarak iki farklı hücre tipi bulunur. Sistemin esas hücreleri, toplayıcı duktus veya CD hücreleri olarak da bilinen açık hücrelerdir. Bunlar, soluk boyanan hücrelerdir. Açık hücreler tek bir silyuma ve birkaç kısa mikrovillusa sahiptir. Sitoplazmaları az sayıda organel içerir ve elektron geçirgen özellikler taşır. Hücrelerin bazaldaki membranında hemen hiç invajinasyon görülmez. Diğer hücre tipi toplayıcı tübüllerde ve kortekste toplayıcı kanallarda bulunan interkalar (IC) hücrelerdir. Koyu boyanırlar. Önemleri anlaşılamamıştır. Işık mikroskobu ile bakılınca toplayıcı tübül ve kanal hücrelerinin hücrelerarası sınırları net olarak seçilebilir, çünkü bitişik hücreler arasında lateral kenetlenmeler bulunmamaktadır. Kortekste bulunan toplayıcı kanallar, her medüller ışına boşalan birkaç küçük toplayıcı tübül aracılığı ile dik açılarla birbirine bağlanır. Medullada gerçekleştirilen idrar yoğunlaştırma işleminde en önemli rolü toplayıcı kanallar oynar (81).

3.7. Jukstaglomeruler apparatus (JGA)

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

Elektronmikroskopla incelenen jukstaglomerüler hücreler, başta bol miktarda Granüler endoplazma retikulumu (GER), iyi gelişmiş Golgi kompleksi ve çapları yaklaşık 10-40 nm olan salgı granülleri olmak üzere protein salgılayan hücrelere özgü özellikler sergilerler. Jukstaglomerüler hücreler, anjiyotensinojen denen plazma proteinini anjiyotensin I olarak adlandırılan inaktif dekaeptide dönüştürecek olan renin hormonunu üretirler. Anjiyotensin I, akciğer endotel hücrelerinde yüksek konsantrasyonda bulunan dönüştürücü bir enzimin etkisiyle iki aminoasitini (histidin ve lösin) kaybederek anjiyotensin II denen oktapeptide dönüşür. Önemli bir kanamadan sonra renin salgısı artar. Anjiyotensin II üretilerek hem arteriyoller daraltılır hem de adrenal kortekste üretilen aldosteron salgısı artar, bu şekilde kan basıncının düşmemesi sağlanır. Aldosteron renal tübüler hücrelerine (en çok distal tübüllere) etki ederek sodyum ve klorür iyonlarının emilimini artırır. Bu durum sıvı hacmini artırır ve kan basıncını yükseltir. Başka nedenlere bağlı olarak (örneğin sodyum kaybı, dehidratasyon) kan basıncının düşmesi de renin anjiyotensin II-aldosteron düzeneğini aktive eder (35,81).

3.8. Böbrek medullası:

Birkaç tane toplayıcı tübül medullada birleşerek papilla kanalları olarak adlandırılan geniş düz tübülleri oluştururlar. Bunların papilla yüzeyindeki çok sayıdaki açıklımları elek benzeri bir görünüm yaratır ki bu alan “area kribrosa” (kribros alan) dır. Bu görünümdeki papilla, çok katlı kübik epitel ile kaplıdır. Ancak kribros alanındaki epitel genellikle papiller kanalların epiteli ile süreklilik gösteren basit prizmatik tiptedir (35).

3. 9. İnterstisyum:

Nefronlar ile kan ve lenfatik damarların çevresinde bulunan bağ dokusudur. Bu doku miktarı papilla ve medullanan iç bölümüne doğru giderek artar. Böbreğin korteksinde iki tip interstisyel hücre saptanmıştır. En yaygın hücre tipi fibroblastlara benzemektedir ve komşu peritubuler kapillerler ile tubullerin bazal membranı arasında bulunmaktadır. Daha az sayıda ve daha küçük olan ikinci hücre tipi ise, lenfositlere veya mononüklear hücrelere benzemektedir. Bu hücreler, lizozom ve fagositik vakuoller ile birkaç lipid damlası içerirler. Fonksiyonları yeterince aydınlatılamamıştır, fibroblast benzeri hücreler gibi interstisyumun ekstrasellüler matriksinin glikozaminoglikanların ve kollajen fibrillerini ürettikleri ileri

sürülmektedir. Küçük hücreler, lenfositlerden veya monosit-fagosit serilerinden köken almış olabilirler ve immün cevapta da rol oynayabilirler. Medullanın iç kısmında bulunan esas interstisyel hücreler myofibroblastlara benzer. Bu hücreler, tübüler yapıların uzun eksenlerine dikey olarak düzenlenmişlerdir. Hücreler, göze çarpan aktin filament bantları, bol GER, iyi gelişmiş bir Golgi kompleksi ve lizozomlar içerir. Sitoplazmadaki belirgin lipid damlacıklarının diüretik durumla ilişkili olarak arttığı veya azaldığı gözlenmektedir. Bazı deneysel bulgular, bu hücrelerin, kan basıncını azaltan hormon benzeri bir materyal salgılayabildiklerini tespit etmiştir. Ayrıca, interstisyumda prostaglandinler ve prostasiklinlerin sentezlendiği de bildirilmiştir (68). Medullar interstisyumda sentezlenen prostaglandinlerin Henle kulpuna girdikleri ve distal tubuler sıvı yoluyla kortekse ulaşarak damar genişletici etkilerini kullandıkları bildirilmektedir (21).

3.10. Böbrek dokusunda kan dolaşımı:

Böbrekler kan damarından zengindir ve dolaşım kanı her beş dakikada bir böbreklerden geçer.

Böbreklere kan, Arteria renalis yoluyla gelir. Arteria renalis organa girmeden önce genellikle iki dala (81), bazen de üç dala (54) ayrılır. Bu dalların bir veya ikisi pelvis renalisin önünden, diğeri arkasından geçerek tekrar dallanırlar. Bu büyük arterler arasında anastomoz ya hiç yoktur ya da çok azdır. Herbiri 3-4 piramidi ve bunlarla ilgili korteksi kanlandırır. Bu beslenme alanına renül denir. Bu dallar hilusta tekrar dallanarak, renal piramitler arasındaki interlober arterleri oluştururlar. Kortikomedullar sınırdaki interlober arterler dallanarak paralel uzanan arkuat arterleri meydana getirirler. Arkuat arterlerden dallanan interlobüler arterler ise korteks içinde ışınsal olarak seyrederek. Bu arterler, komşu medullar ışınlar arasında yer alırlar. İnterlobüler arterlerden, glomerul kapillerlerine kan taşıyan çok küçük dallar ayrılır. Her bir dal bir glomerulusa girerek afferent arteriolü oluşturur. Afferent arteriol, glomerulus içinde dallanarak kapillerlere ayrılır. Bu kapillerler sonra tekrar birleşerek efferent arteriolü oluşturur ve glomerulustan çıkar. Efferent arteriol, proksimal ve distal tubulusları besleyecek ve düşük molekül ağırlıklı maddelerle iyonları dolaşım sistemine taşıyacak olan peritubüler kapiller ağı oluşturmak üzere bir dal verir. Bu kapillerler, medullada düz bir yol izledikten sonra yeniden kortikomedullar sınıra doğru kıvrılarak vasa rekta ya da düz damarlar adını

alırlar. İnen damar sürekli tip kapiller özelliği gösterirken, çıkan damarın endoteli pencerelidir. Glomerulden süzülen kanı taşıyan bu damarlar medullanın beslenmesini ve oksijen gereksinimini sağlarlar. Kangal biçimindeki yapıları yüzünden bu damarlar henle kangalının interstisyumda oluşturduğu yüksek ozmotik gradyanı uzağa taşımazlar. Dış kortekste ve böbrek kapsülündeki kapillerler, yıldızsı venlere dönüşürler. Venler de arterlerle aynı yolu izler ve aynı isimleri alırlar. Kan, intelobüler venlerden arkuat venlere, oradan da interlober venlere akar. İnterlober venler birleşerek renal veni oluştururlar. Renal ven ise Vena cava inferiora açılır (35,54,68,81).

3.11. Böbreklerin histofizyolojisi:

Böbrekler, iç ortamın kimyasal bileşiminin (homeostasisin) korunması için çok önemli organlardır. İç ortamın kimyasal yapısının böbreklerle ayarlanmasında 3 mekanizma rol oynar:

1. Filtrasyon: Kan plazma sıvısının bir kısmının glomeruler kapillerlerden filtrasyon yoluyla çıkarılmasıdır. Kandan ayrılan filtratın içeriği kan plazması ile aynıdır. Ancak, makromoleküller glomerulus duvarını geçemediği için filtratta hemen hiç protein bulunmaz.

2. Reabsorbsiyon (aktif pasif emilim): Filtrasyon ile kandan ayrılan, ancak homeostasis için gerekli olan maddelerin tubuluslardan geri emilmesidir.

3. Ekskresyon: Vücut için yararsız ya da zararlı olan yabancı ve atık maddelerin kandan alınıp, tubulus sıvısına verilmesidir.

Filtrasyon olayının meydana geldiği glomerulus kapillerleri bazı özelliklere sahiptir. Bu özelliklerden birisi, kapillerlerin iki arteriol arasında bulunmasıdır. Glomerulus kapillerlerinin iki arteriol arasında bulunmalarından ötürü, kan basıncı bütün kapiller boyunca aynıdır. İkinci özellik, bu kapillerler içindeki kan basıncı, diğer yerlerdeki kapillerlerin kan basıncının iki katı kadardır. Bu yüksek kan basıncı etkisiyle filtrasyon sağlanır. Üçüncü bir özellik, kapiller endoteli ile podositin birlikte oluşturdukları morfolojik yapı kan hücrelerinin ve proteinlerin dışarı çıkmasını önlerler. Son olarak, glomeruler kapillerlerde sadece filtrasyon vardır, reabsorbsiyon yoktur. Halbuki, sistemik kılcal damarlarda filtrasyonu daima bir geri emilim izler. Bütün bu özellikler glomerulusu ideal bir süzgeç yapar (21,35,81).

Kan glomeruler kapillerlerden geçerken, afferent taraftaki hidrostatik basınç diğer basınçlardan fazla olacağından, plazma sıvısı süzücü membranlardan süzülerek kandan ayrılır ve üriner boşluğa geçer. Kapillerlerin efferent ucuna doğru kan suyunun azalması, buna karşılık protein miktarının giderek artması ile protein onkotik basıncı da artar. Böylece, glomeruler kapillerlerin efferent ucunda filtrasyon basıncı iyice azalır veya sıfır değere ulaşır. Hidrostatik basınç artarsa, filtrasyon basıncı artar ve dolayısıyla, glomeruler filtrat miktarı da artar (21).

İnsanda, normal filtrasyon miktarı dakikada 120-125 mililitre (ml) kadardır. Bu miktar bir günde 180-190 litreye ulaşır. Ancak, günlük insan idrarın miktarı 1500 ml.dir ve içeriği ultrafiltrattan farklıdır. Bu da, glomerulustan süzülen ultrafiltratın içerdiği su ve çeşitli maddelerin tubuluslarda geri emildiğini göstermektedir (21,35,81). Glomeruler süzüntü ile idrar arasındaki fark, tübüler aktivitenin göstergesidir. Her tubulusun değişik görevleri vardır. Memelilerde, proksimal tubuluslar glukozun, elektrolitlerin (Na^+ , K^+ , PO_4 gibi) ve suyun tubulus sıvısından kana aktarılması ile görevlidir. Glukozun ve aminoasitlerin tamamı ile su ve sodyum klorid iyonlarının %75-85'i proksimal tubulusdan geri emilir. Glukozun tekrar kana alınması, proksimal tubulus hücrelerindeki özel bir taşıma sistemi ile olur. Glukozun emilimi sodyum eşliğinde olmaktadır. Glukoz ve sodyum, tubulus hücresi membranında bulunan taşıyıcı bir moleküle bağlanırlar ve hücre içine birlikte taşınırlar. Glukoz buradan difüzyon yoluyla hücrelerarası sıvıya, daha sonra da kana girer. Glukozun kandaki yoğunluğu arttıkça, filtrata daha çok glukoz geçer. Filtrata geçen miktar çok fazla ise, bu fazlalık idrarla atılır. İnsanda kan glukoz miktarı, 100 ml kanda 90-100 miligram (mg) kadardır. İdrarda glukoz bulunmasına glukozüri denir (21,35). Tubuluslarda sodyumun geri emilişi aktif transport ile olur. Sodyum, tubulus lümenindeki filtrattan tubulus hücresine pasif difüzyonla girerken, hücreden interstisyel boşluğa aktif olarak pompalanır. Vücuda gereğinden fazla sodyum girmiş ise fazlasını böbrek idrarla atar, yeteri kadar sodyum yoksa böbrek sodyum atılmasını en aza indirebilir. Bunu da glomeruler filtrasyon hızını ve tubulus hücrelerince geri emilimi ayarlayarak gerçekleştirir. Su ve klor pasif olarak sodyumu izler. Klor, elektrik yükü nedeniyle, su ise osmotik basınç nedeniyle sodyum geri emilimini izler. Proksimal tubulus sonunda, glomeruler filtrattaki suyun %75-85'i geri emilmiş olur. Böylece, proksimal tubulusdan geçen

ultrafiltratın hacmi azalır. Ancak, tuz ve su birlikte reabsorbe olduklarından idrar izoozmotik yapıdadır. Glomeruler filtratta bulunan fosfatın bir kısmı, potasyum iyonlarının ise tamamı proksimal tubuluslarda geri emilir. Filtratta az miktarda bulunan proteinin Emilimi pinositozla gerçekleştirilir (21,35,81). Proksimal tubuluslarda, glukoz ve elektrolitler filtrattan geri emilirken, bazı maddeler için bu olayın tamamen tersi olur. Yani, penisilin gibi bazı maddeler, proksimal tubulus hücrelerinin aktivitesiyle kandan alınır ve ultrafiltrata ilave edilir. Böylece, tübüler sekresyon yoluyla da idrarın içeriği değişir (21,35). Böbreğin korteksinden medullanın derinliklerine doğru gidildikçe sodyum konsantrasyonu artar, yani hipertonicleşir. Henle kulpunun inen ince kısmı suya çok geçirgendir, buna karşılık katı maddelere az geçirgendir. Bu özelliklerinden dolayı, inen ince kolda idrar hipertonic bir yapı gösterir. Henle kulpunun çıkan ince kolu ise suya geçirgen değildir, buna karşılık sodyuma çok, üreye az geçirgendir. Sodyum pasif olarak doku sıvısına geçer. Böylece, çıkan ince kolda idrar hipotonik özellik kazanır. Henle kulpunun çıkan kalın kolu ise suya ve katı maddelere az geçirgendir. Burada, klor tubulustan dışarı aktif olarak pompalanır, sodyum ise pasif olarak kloru izler. Sonuçta, distal tubulusa tuz yoğunluğu düşük yani, hipoosmotik bir sıvı girer (21,35,81).

Distal tubulusa geçen ultrafiltrat dakikada 16 ml kadardır, idrar oluşumu ise dakikada 1 ml kadardır. Yani, dakikada ultrafiltratın 15 ml'si distal tubuluslardan ve toplayıcı kanallardan geri emilmektedir. Distal tubuluslarda ve toplayıcı kanallarda suyun geri emilişi, arka hipofizden salgılanan ADH (vazopressin) etkisi ile olur. Vücudun suya gereksinimi olunca, ADH salgılanır ve toplayıcı kanalların epitel hücreleri suya geçirgen hale gelir. Distal tubuluslarda suyun geri Emilimi vücudun ihtiyacı oranında olur ve distal tubulus sıvısı hipoosmotiklikten ancak izoosmotikliğe kadar yoğunlaştırılır. Distal tubulus sıvısı izoosmotik olduğuna göre, toplayıcı kanallara izoosmotik sıvı girer. Burada suyun geri emilişi yine ADH etkisi ile olmakla beraber, Henle kulpundan dokulararası sıvıya verilen sodyum yoğunluğunun giderek artması da toplayıcı tubuluslardan suyun geri emilmesine neden olur. Böylece, idrar hipertonic hale geçer (21,81). Glomeruluslardan süzülen sodyumun %75-80'i proksimal tubuluslarda geri emildikten sonra, geriye kalan kısmı Henle kulpunda pasif olarak, distal tubuluslarda ise aktif olarak emilir. Distal

tubuluslarda geri emilim, adrenal korteksin zona glomerulosa tabakasından salgılanan aldosteron hormonu etkisiyle olur. Aldosteron konsantrasyonu yeterince yüksek olduğunda, distal tubuluslarda sodyumun emildiği, potasyum ve hidrojen iyonlarının idrara verildiği bir iyon değişim bölgesi bulunur (21,35,81). Su dengesi kısmen hipofizin arka lobundan salgılanan ADH ile kontrol edilir. Yüksek miktarda su alınması ADH üretimini durdurur; toplayıcı kanalların duvarları suya karşı geçirgenliğini kaybeder ve su emilmez. Bunun sonucu olarak çok miktarda hipotonik idrar üretilir; ozmotik denge için gereken iyonlar tutulurken su atılır. Az miktarda su alındığında ya da çok büyük miktarda su kaybedildiğinde (aşırı terleme, ishal) toplayıcı kanalların duvarları suya karşı geçirgen hale geçer, bu şekilde su emilir ve idrar hipertonic olur. Adrenal korteksin steroid hormonları, esas olarak da aldosteron, filtrattaki sodyumun distal tübüllerden emilimini artırır, böylece idrarla sodyum kaybını azaltır. Aldosteron aynı zamanda potasyum ve hidrojen iyonlarının atılmasını da kolaylaştırır.(21,81).

Özetle, vücut su ve tuz dengeleri birbiri ile yakın ilişkidir. Vücutta yeteri kadar tuz olmaz ise, su da vücutta tutulamaz. Su ve tuz dengeleri hormonlarla düzenlenir. Hormonlar böbreği etkileyerek su ya da tuz emilimini ve idrarla su ve tuz çıkarılmasını ayarlarlar.

Sonuçta, organizmanın iç ortamı için gereksiz ve zararlı olan maddeleri taşıyan idrar, toplayıcı kanallar yoluyla pelvis renalise gelir, buradan üreter yoluyla idrar kesesine iletilir (21).

3.12. İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI:

Bir organa gelen kan akımının çeşitli nedenlerle (özellikle vasküler cerrahi işlemler ve organ transplantasyonu esnasında) yetersiz hale gelmesine veya durmasına iskemi denir. İskemi sonucunda doku hipokside kalır ve hipoksik doku hasarı ortaya çıkar. İskeminin uzun sürmesi sonucunda hücrelerin bütünlüğü kaybolur hatta hücrel ölüm meydana gelir. Reperfüzyon ise dokunun kanlanmasıyla yeniden başlamasıdır. İskemik bir dokuda kan akımının yeniden başlaması durumunda (reperfüzyon), özellikle dokuya gelip yerleşen polimorfonükleer lökositler (PMNL) tarafından salınan serbest oksijen radikalleri (SOR) dokudaki yıkımı artırıcı etki yapar. Bu olaya reperfüzyona bağlı doku hasarı denir (19). Böylece dokuda İskemi-Reperfüzyon hasarı ortaya çıkar. Üriner sistemin önemli bir bölümünü oluşturan böbrekler, belirli yabancı maddelerin ve metabolizma ürünlerinin vücuttan uzaklaştırılması, asit-baz ve su dengesinin korunması, elektrolit ve vücut ısısının kontrol edilmesi, yani homeostasis için özelleşmiş bir çift organdır. Böbrekler bu fonksiyonlarını filtrasyon, aktif ve pasif emilim ve ekskresyon gibi bir dizi işlem aracılığıyla gerçekleştirirler (21,81). Böbreklerde aynı zamanda eritropoetin, renin, vitamin D nin hidroksilasyonunu sağlamak, Prostaglandin E1, (PGE₁), PGE-2 ve PGI-2 gibi vazodilatör, tromboksanlar gibi vazokonstriktör maddeler sentezlenir. Parathormon, insülin ve glukagonun yıkımında rol alırlar (21). Yaşamsal önemi olan böbrekler, bu kompleks ve özel yapılarından ötürü pek çok bilim adamının araştırma konusu olmuştur.

Özellikle böbrek transplantasyonu, şok, kardiovasküler cerrahide ve Crush sendromunda böbreğe bir süre veya tamamen kan akımının kesilmesi durumlarında böbrekte de İskemi-Reperfüzyon hasarı ortaya çıkar (38). Böbrek transplantasyonunda, erken sıcak iskemi süresinde, renal fonksiyonların korunması önemlidir. Soğuk iskemiye maruz kalan kadavra böbreklerde bu durum daha da önem kazanır. Renal transplantasyonda reperfüzyon önemli bir basamaktır. İskemik bir organda reperfüzyon sonrasında SOR oluşumu organa zarar verir. İskemik renal hasar böbrek kan akımının bozulması sonucu ve perfüzyonun tekrar sağlanması sırasında olmak üzere iki evrede gelişir. İskemi sırasında gelişen ATP kaybı ve akımın tekrar sağlanması ile buraya gelip yerleşerek SOR açığa çıkaran polimorfonükleer lökosit (PMNL)'ler büyük hücre kayıplarına neden olabilecek bir

dizi reaksiyon başlatmaktadır. Böbrekler şokta gelişen vazokonstrüksiyondan etkilenmekte ve bu süreçte gelişen iskemik hasar transplantasyon sonrası böbrek fonksiyonlarının belirleyicisi olmaktadır. Hücreler oksidatif hasarı önleyen yok eden ya da kısmen azaltan mekanizmalara sahiptir. Amaç, doku hasarına yolaçan olayın etkisiyle tetiklenen biyokimyasal mekanizmaları external yolla verilen maddelerle bir yada birkaç basamakta engelleyerek organizmaya yardımcı olmaktır (4). İskemi-reperfüzyon hasarından korunmak için serbest oksijen radikallerinin etkisini ortadan kaldırmak için antioksidanlar kullanılabilir (40,42,74,80,82).

Amaç: Deneysel olarak ratlarda, böbrekte iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturup, antioksidan olarak melatonin, PGE1 ve Vitamin E kullanımının bu hasar üzerine olan etkilerini histolojik ve biokimyasal olarak incelemek.



3.12. İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI:

İskeminin süresine ve şiddetine bağlı olarak iki türlü hücresel zedelenme ortaya çıkar.

3.12.1. Geri dönüşlü zedelenme

3.12.2. Geri dönüşsüz zedelenme

3.12.1. GERİ DÖNÜŞLÜ ZEDELLENME:

Hipoksinin ilk zarar verdiği yer , hücrenin aerobik solunumudur. Mitokondriumdaki oksidatif fosforilasyonu engeller.ATP oluşumu yavaşlar ve durur. ATP kaybı hücre içinde çeşitli sistemleri yaygın olarak etkiler. Özellikle hücre zarının quabain duyarlı adenosin trifosfat aktivitesinin azalması zarda aktif sodyum pompasının yetersizliğine yol açarak hücre içi sodyum birikimi ve hücreden potasyumun dışarı atılımına yol açar. Solid materyalin birikimine izoozmotik su birikimi eşlik ederek akut hücresel şişme oluşur (19). İskeminin ilk dakikalarında aşırı stimüle olan glikolitik yol, ortamda sitrat, laktat, nikotin amid adenin dinükleotid (NADH) birikimi ve doku asidozunun gelişmesiyle inhibe olur. İskemik dokuda var olan oksijen ise oksidatif fosforilasyonu desteklemek için yetersiz kalır ve glikolizis sonucu oluşan piruvatın Krebs siklusuna değil de laktata dönüşü gerçekleşir. Böylece glikojenden ATP oluşumu ile hücre enerji kaynakları korunur. Glikojenin hızla azaldığı histolojik olarak PAS ile boyamada görülebilir. Glikoliz, laktik asit ve fosfat türevlerinden hidroliz sonucu oluşan inorganik fosfat birikimine neden olur. Sonuçta hücre içi pH'yı düşürür. Sonraki safha GER'lerden ribozomların ayrılması ve polizomların monozomlara parçalanmasıdır. Eğer hipoksi devam ederse, zar geçirgenliği artar ve mitokondriyon fonksiyonları azalır. Hücre yüzeyinde tomurcuklanmalar oluşur. Sitoplazmada ya da dışında organel zarları gibi plazmadan köken alan, konsantrik laminalı myelin figürler şekillenir. Bu sırada mitokondriyumlar normal, şişmiş ya da yoğunlaşmıştır, endoplazmik retikulum (ER) genişlemiş ve tüm hücre belirgin olarak şişmiştir. Tüm bu bozukluklar oksijen verilince geri dönüşlüdür. Buna rağmen eğer iskemi sürerse, geri dönüşsüz zedelenme oluşur (19).

3.12.2. GERİ DÖNÜŞSÜZ ZEDELLENME:

Geri dönüşsüz zedelenme yapısal olarak mitokondriyum ve kristalarında aşırı vakuolizasyon, plazma zarında aşırı zedelenme, lizozomlarda şişme; özellikle

iskemik alan yeniden beslenirse hücre içi yoğun kalsiyum tutulumu ile birliktedir. Amorf kalsiyumdan zengin yapılar mitokondriyum matriksinde gelişir. Mitokondriyumda geri dönüşsüz zedelenmelerin bu erken bulguları 30-40 dakika (dk) sonra görülebilir. Proteinler, temel koenzimler, ribonükleik asit (RNA)'ler aşırı geçirgen zarlardan sürekli kaybedilir. Hücreler, hücre içi yüksek enerjili fosfatın yapımında kullanılacak ATP'nin yeniden oluşumu için yaşamsal önemi olan metabolitlerini de kaybederler. pH'nın düşmesi lizozom zarlarının zedelenmesiyle enzimlerinin sitoplazmaya geçerek, asit hidrolazların aktifleşmesiyle sitoplazmik ve çekirdek yapıların sindirimine neden olur. Hücre ölümünü izleyerek, hücre organelleri devamlı parçalanır ve hücrel enzimler hücre dışı mesafeye sızarlar. Sonuçta ölü hücreler myelin oluşumlar ve fosfolipidden oluşan büyük kitlelere dönüşürler. Bunlar daha sonra diğer hücreler tarafından fagosite edilirler veya yağ asitlerine parçalanırlar. Bu yağ asitlerinin kalsifikasyonu kalsiyum sabunları oluşur (19).

Hücre içine kalsiyum girişiyle kalsiyumdaki net artış hücrenin iyonik dengesini bozar. Bundan sonra kalsiyum mitokondri içine sızmaya başlar. Mitokondrinin kalsiyumla yüklenmesi ATP üretimi için olmayıp, kalsiyumun varlığıyla proteazlar ve fosfolipazlar aktive olur. Fosfolipazların aktivasyonu, serbest yağ asidi ve lizofosfolipidlerin salınımına bağlı olarak hücre membranında toksik etkiler oluşur. Bu etkilerin yanında araşidonik asit metabolizması başlatılarak, reperfüzyon sırasında sitotoksik ürünler ve radikal türevleri üretilir. Proteazların aktivasyonu, hücre iskeletinin parçalanmasına neden olur. Enzim sisteminde değişimler meydana gelirken yine reperfüzyon esnasında SOR'nin oluşumu gerçekleşir ve hatta artar. Böylece iskemi sırasında oluşan birçok olay reperfüzyon sırasında oluşacak olan hasarlara zemin hazırlar. İskemi sırasında oluşan hasarların, reperfüzyon hasarları için başlangıç teşkil ettiği saptanmıştır (38).

Burke TJ. Ve ark.(13) renal iskemi veya sonrası uygulanan intrarenal kalsiyum kanal blokerlerinin etkilerini, fonksiyonel, morfolojik ve mitokondri yönünden incelemişler. Köpeklerde, iskemik renal yaralanmada, ışık ve elektronmikroskopik incelemede tübüler nekroz ve hücre zedelenmesi saptanmıştır.

Goujon JM ve ark. (28), soğuk iskemiye maruz bırakılan izole, perfüze domuz böbreklerinde, proksimal tübül hücre yaralanmasını histolojik olarak incelemişler. Proksimal tübül değişikliklerinin iskemi süresiyle arttığı, 48 saat soğuk bekleme sonunda, hücrelerin kısmen veya tümüyle nekrotik ve şişmiş olduğunu gözlemişler. Fırçamsı kenarda kaybolmalar ve bazal vakuolizasyonda artış izlemişler. 72 saat soğuk bekletilen grupta az miktar mitotik figürlerin nekrotik hücre çevresinde gözlendiği, hücrelerdeki mitokondrilerde önemli derecede şişme olduğu bildirilmiştir.

Deneysel çalışmalar, reperfüzyonun akut fazı sırasında önceki iskemik doku üzerine ek bir hasar yüklediğini göstermiştir. Reperfüzyon hasarı olarak bilinen bu ardışık olaylar; intrasellüler enzimlerin salınımını potansiyalize eder, Ca^{+2} un hücre içine girişi, sarkolemmal fosfolipidlerin bozulumu ve hücre membranlarının dağılması; bütün bunlar tek başına veya kombine olarak, sonunda, hücre ölümüyle sonuçlanır. Bu değişiklikler, iskemi sırasında değil de, daha çok reperfüzyon sırasında meydana geldiğinden “Reperfüzyon Hasarı” olarak bilinir (2,7,45).

Reperfüzyon hasarının bilinen en az üç bileşeni mevcuttur; mikrovasküler hasar, hücre nekrozu ve hemoraji. İskemiye maruz kalan her organda reperfüzyon hasarı oluşup, iskemi sırasında biyokimyasal olayların oluşumuyla kendini gösterir ve sonuçta süperoksit anyonu (O_2^-), hipoklorik asit (HOCL) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen metabolitleri yanında Ca^{+2} artar ve sarkolemmal fosfolipidlerin kaybı meydana gelir (2,91).

Reperfüzyon hasarında en önemli rolü PMNL’ler oynar. İskemik dokuya gelen ve yerleşen polimorfonükleer hücreler birçok yoldan etki ederek iskemik dokuyu yok ederler. Polimorfonükleer hücreler, endotel lökosit adezyon molekülü (ELAM-1), intersellüler adezyon molekülü (ICAM-1), vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM-1), L-selektin gibi adezyon moleküllerine tutunarak iskemik dokuya yerleşirler (33,34). Bu hücreler, iskemik dokuyu hem oksidatif (oksijen radikalleri ile) hem de nonoksidatif yolla tahrip ederler. Nötrofil granülleri, vasküler yaralanmaya neden olabilen bir çok hidrolitik enzim ve antimikrobiyal polipeptid içerirler (33) İskemik dokudaki polimorfonükleer hücre bağımlı yıkımda ayrıca fosfolipaz ürünleri (33,34) Tromboksan-A₂, prostoglandin E₂, lökotrien C₄, D₄, B₄ ve Platelet agrege edici faktör (PAF) üretilir. Bunlar da çeşitli yollardan doku

hasarını artırır (92). Üriner sistemin önemli bir bölümünü oluşturan böbrekler, belirli yabancı maddelerin ve metabolizma ürünlerinin vücuttan uzaklaştırılması, asit-baz ve su dengesinin korunması, elektrolit ve vücut ısısının kontrol edilmesi, yani homeostasis için özelleşmiş bir çift organdır. Böbrekler bu fonksiyonlarını filtrasyon, aktif ve pasif emilim ve ekskresyon gibi bir dizi işlem aracılığıyla gerçekleştirirler (21).

Böbrekler aynı zamanda eritropoetin ve renin sentezlemek, ayrıca vitamin D'nin hidroksilasyonunu sağlamak gibi endokrin fonksiyon da görürler (21). Tüm bu fonksiyonlarından ötürü yaşamsal önemi olan böbrekler pekçok bilimadammının araştırma konusu olmuştur. Şok, kardiyovasküler cerrahi, organ transplantasyonu gibi durumlar organda iskemi-reperfüzyon hasarına neden olur. Bu çalışmanın amacı; deneysel olarak oluşturulan, ratlarda böbrek iskemi- reperfüzyon hasarında antioksidan (melatonin, PGE1, Vitamin E) kullanımının etkilerinin biyokimyasal, ışık ve elektron mikroskopik incelenmesidir.

3.13. SERBEST RADİKALLER VE REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ:

İlk kez organik serbest radikal tanımı 1900 yılında Gomberg tarafından yapılmıştır. Serbest radikal, en az bir çiftleşmemiş elektron taşıyan atom veya molekül anlamına gelir. Yüklü veya yüksüz olabilen bu atom veya molekül çiftleşmemiş elektronunu başka bir moleküle vererek veya başka bir molekülden elektron alarak daha stabil hale gelme eğilimindedir. Böylece serbest radikaller son derece reaktif özellik taşırlar (5,6,67).

Serbest radikallerin zararlı etkileri uzun zamandır bilinmektedir; ancak organizmada fagositoz olayında ve hücre bütünlüğünün korunmasında, mitokondrial oksidasyon ve hemoglobinin oksijen taşıması gibi biyolojik işlevlerde yararlı oldukları gösterilmiştir (7,25). Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Aerobik metabolizması olan memelilerdeki başlıca serbest radikal kaynağı olan oksijenden türeyen partiküllere reaktif oksijen partikülleri (ROP), veya serbest oksijen radikalleri (SOR) denir. Oksijenin suya indirgenmesi sırasında yer alan tek elektron aktarmaları sonucunda oluşan partiküllerdir (2,20,70). İskemi-reperfüzyon, hiperoksijenasyon, inflamasyonlu hastalıklar, toksik doku yaralanmaları gibi durumlarda SOR'lerinin önemli rol oynadığı açıktır. Bununla birlikte SOR aracılığıyla nötrofiller; bakterileri öldürmekte, radyasyon; normal ve malign dokulara zarar vermekte, bir çok ilaç kanserojen, toksik ajan etkisi göstermektedir (12,25,58) Serbest radikallerin geniş bir hastalık grubunda etkin olduğu Bulkley tarafından basitleştirilmiş bir tablo ile şu şekilde özetlenmiştir (12).

1-Normal biyolojik işlemler: Oksijenli solunum, katabolik ve anabolik işlemler.

2-Oksidatif stres yapıcı durumlar:

a-) İskemi-reperfüzyon sendromları: Miyokard infarktüsü, mide mukozasında stres ülseri, nekrozitan enterokolit, organ prezervasyonu ve transplantasyon, şok sonrası karaciğer yetmezliği, serebral iskemi, kol ve bacak iskemisi: postreperfüzyon sendromu, akut renal tübüler nekroz

b-) Toksik doku yaralanmaları: Aspirasyon pnömonisi, pankreatit, özefajit

c-) İltihabi hastalıklar: Nötrofil fagositozu, artrit, iltihabi barsak hastalıkları, bağ dokusu hastalıkları, immün yetmezlikler.

d-)Eksojen toksik ajanlar: Radioaktivite, allokstan, karbon tetra klorür, kemoterapötik ajanlar, nitrofurantoin, paraquat.

e-) Ksenobiotiklerin etkisi: İn hale edilenler, alışkanlık yapan maddeler, ilaçlar.

f-)Stres ile artan katekolaminler.

g-) Fagositik inflamasyon hücrelerinde salgılanma.

h-) Genel: Yaşlanma, dolaşım şoku, periferik ödem.

Oksijen kaynaklı ve oksijen kaynaklı olmayan serbest radikaller tablo 1’de özetlenmiştir (5).

Tablo 1. Serbest Radikaller

Oksijen Kaynaklı Serbest Radikaller	
Radikaller	Reaktif olmayan Radikaller
Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$)	Singlet oksijen (1O_2)
Hidroksil radikali($OH^{\bullet}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Peroksil radikali ($ROO^{\bullet}$)	Peroksinitrit ($OCCO^-$)
Nitrik oksit radikali ($NO^{\bullet}$)	
Alkoksil radikali ($RO^{\bullet}$)	
Oksijen Kaynaklı Olmayan Serbest Radikaller	
1.Karbon kaynaklı serbest radikaller: Triklor metil (CCl_3)	
2.Sülfür kaynaklı serbest radikaller : Thiyl ($RS^{\bullet}$) radikali	
3.Nitrojen kaynaklı serbest radikaller: Fenildiazin ($C_6H_5N=N$)	
4.Geçiş metal kompleksleri: Fe^{+3}/Fe^{+2} , Cu^{+3}/Cu^{+2}	

Reaktif oksijen türlerinden en önemli 3 tanesi; süperoksit ($O_2^{\bullet -}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil iyonlarıdır ($OH^{\bullet}$) (16).

3.13.1. SERBEST RADİKALLER:

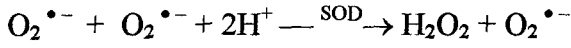
3.13.1.a. Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet -}$)

Hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu, serbest süperoksit radikal anyonu ($O_2^{\bullet -}$) meydana gelir. $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet -}$

Süperoksit radikali, oksidatif enzimler oluşumuyla mitokondri, kloroplast, nükleus, mikrozomlarda ve hatta fagositik tipteki bütün hücrelerde; monosit, makrofaj ve nötrofillerde daima oluşmaktadır (10,26). Süperoksit radikali solunum hücrelerinde çoğunlukla suya indirgenerek tüketilir. Bu reaksiyon, süperoksit radikali gibi ara

ürünler salınmaksızın siyanür tarafından inhibe edilen sitokrom oksidaz ve 'mavi' bakır oksidaz tarafından gerçekleştirilir (27). Süperoksit, bir serbest radikal olmakla beraber kendisi organizmaya direkt olarak fazla zarar vermez. Asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır (2).

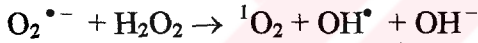
Süperoksit radikali bir kez oluşursa kendiliğinden yada hızlı olarak süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile inaktive edilir ve hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşur (25).



Süperoksit radikallerinin ortamdan temizlendiği bu tepkimeye dismutasyon tepkimesi denir (2,19). Ortamda biriken süperoksit radikallerinin girebileceği başlıca tepkimeler aşağıdaki gibi özetlenebilir.

1. Süperoksit radikali yukarıda verilen tepkimelerle kendiliğinden dismutasyona uğrayabilir.
2. Ortamdan bir proton alarak perhidroksi radikali (HO_2) meydana gelebilir.
3. SOD enziminin yetersiz kaldığı bir ortamda, süperoksit radikalleri kendi dismutasyon ürünü olan H_2O_2 ile tepkimeye girerek hidroksil radikali ($OH^\bullet$) ve singlet oksijenin (1O_2) üretimine neden olur (Haber-Weiss reaksiyonu) (25).

Hidrojen peroksit ile tepkimeye girerek $OH^\bullet$ ve 1O_2 meydana gelebilir.



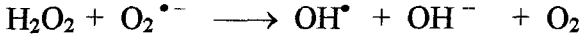
Bu radikaller süperoksidin kendisinden çok daha reaktif ve toksiktir. Bu nedenle süperoksit radikalleri ortaya çıktığı anda ortamdan uzaklaştırılmazsa diğer radikallerinde görülmesi kaçınılmazdır (44). SOD aktivitesi azalacak olursa ortamda süperoksit radikali birikir ve diğer radikaller de ortaya çıkar. Canlılarda süperoksit radikalının üretildiği bölgelerin başında mitokondri gelir. Önemli ölçüde süperoksit radikalleri fagositoz sırasında, fagositoz yapan hücreler tarafından (nötrofil, eozinofil ve makrofajlar) amaçlı ve enzimatik olarak üretilirler (77).

3.13.1.b. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

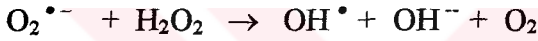
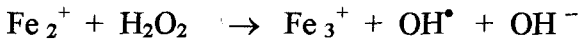
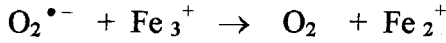
Hidrojen peroksit, süperoksit radikalının spontan veya SOD ile katalizlenen dismutasyon reaksiyonuyla veya moleküler oksijenden iki elektron alarak indirgenmesiyle meydana gelir (2,6).

Hidrojen peroksit çiftlenmemiş elektron içermez ve bu yüzden gerçekte serbest radikal değildir. Bununla birlikte demir, bakır gibi geçiş metalleri varlığında

süperoksit radikali ile reaksiyona girer ve bilinen en etkin oksidan ajan olan hidroksi radikalini ($\text{HO}^\bullet$) meydana getirir (2,6,65).



Bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu adı verilir. Haber-Weiss reaksiyonu ya katalizör varlığında ya da katalizörsüz cereyan edebilir. Fakat katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaş ilerler. Demir ile katalizlenen ikinci şekli ise çok hızlıdır. Bu reaksiyonda önce ferri demir (Fe^{+3}) süperoksit radikali tarafından ferro demire (Fe^{+2}) indirgenir. Sonra bu ferro demir kullanılarak “Fenton reaksiyonu” ile hidrojen peroksitten $\text{OH}^\bullet$ ve OH^- üretilir. Reaksiyon mekanizması aşağıdaki şekildedir (2,6,25).



3.13.1.c. Hidroksi Radikali ($\text{OH}^\bullet$)

Hidroksi radikali ($\text{OH}^\bullet$), hidrojen peroksidin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesi ile (Fenton reaksiyonu) meydana gelir. Son derece reaktif bir oksijen radikalidir. Yarılanma ömrü çok kısadır. Meydana geldiği ortamda büyük hasara sebep olur. Tioller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak yeni radikallerin ortaya çıkmasına sebep olur (2).

3.13.1.d. Singlet Oksijen ($^1\text{O}_2$)

Singlet oksijen ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da sebep olur. Oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle meydana gelir (2).

Serbest oksijen radikallerinin etkisi sonucu karbon merkezli radikaller ($\text{R}^\bullet$), peroksi radikalleri ($\text{ROO}^\bullet$), alkoksi radikalleri ($\text{RO}^\bullet$), tiyl radikalleri ($\text{RS}^\bullet$) gibi önemli serbest radikaller de meydana gelir. Bunlardan özellikle poliansatüre yağ asitlerinden (PUFA) meydana gelen peroksi radikali yarı ömrü uzun olan bir radikaldir (2).

Singlet oksijen radyasyon sonucu oluşabileceği gibi invivo olarak sitokrom P-450, prostaglandin endoperoksit sentetaz ve miyeloperoksidaz reaksiyonları ile de enzimatik olarak oluşabilmektedir (29).

3.13.2. Serbest Radikallerin Kaynakları:

Serbest radikaller sürekli olarak endojen ve ekzojen kaynaklar yoluyla üretilmektedir (2).

3.13.2.a. Serbest radikallerin endojen kaynakları:

- a. Fagositler
- b. Mitokondrial elektron transport sistemi
- c. Mikrozomal elektron transport sistemi
- d. Ksantin oksidaz
- e. Araşidonik asit metabolizması
- f. Endojen ve ekzojen substratların otooksidasyonu
- g. Solubl oksidaz enzimler
- h. Geçiş metalleri

3.13.2.b. Serbest radikallerin ekzojen kaynakları:

- a. Radyasyon
- b. Hava kirliliği
- c. Sigara dumanı
- d. Hiperoksit çevre
- e. Farmakolojik bazı ilaçlar

3.13.3. SERBEST RADİKALLERİN ETKİLERİ:

Serbest radikaller, hücrelerin lipid, protein, Deoksiribonükleik asit (DNA), karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerini etkilerler (39,76).

3.13.3.a. LİPİD PEROKSİDASYONU:

Membran yapısını oluşturan poliansatüre yağ asitlerinin (PUFA) SOR tarafından sekonder ürünlere (peroksitler, alkoller, aldehitler örneğin; malondialdehit, etan, pentan v.b.) yıkılma reaksiyonuna lipid peroksidasyonu denir (18).

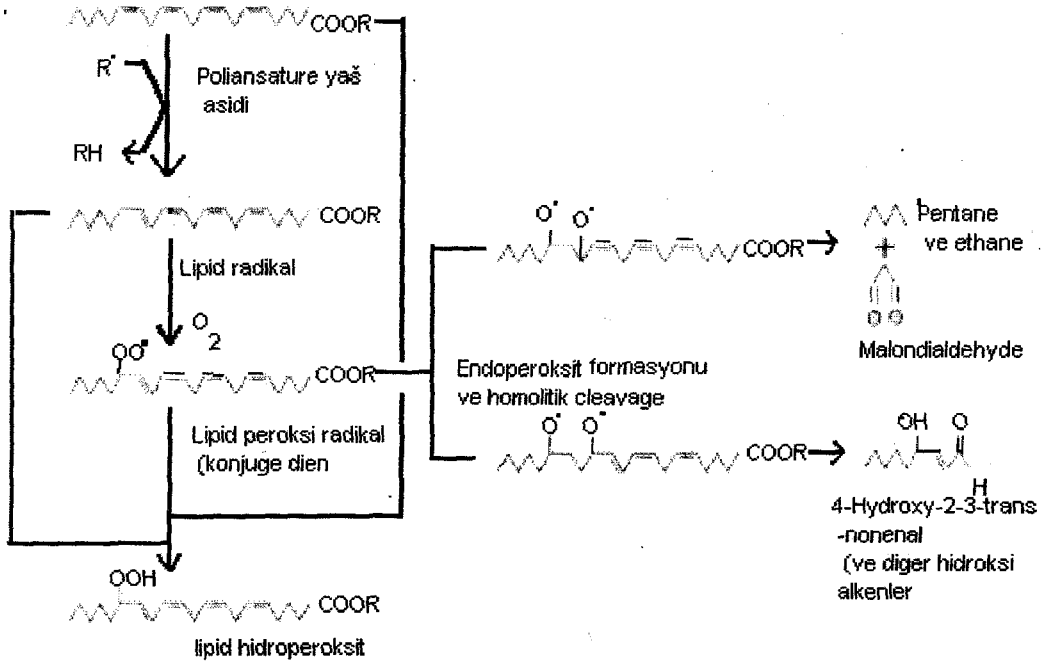
Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranlarda oluştukları zaman organizmada çeşitli bozukluklara yol açarlar. Biyomoleküllerin tüm büyük sınıfları serbest radikallerden etkilenir ama en hassas olanı lipidlerdir

(2,25). PUFA'nin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendini devam ettiren otokatalitik bir reaksiyondur ve oluşan hasar geri dönüşümsüzdür (2).

Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan bir serbest radikal etkisi sonucu membran yapısında bulunan PUFA zincirinden bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar (2,19). Bunun sonucu yağ asidi zinciri bir lipid radikali niteliğini kazanır. Oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Oluşan lipid peroksi radikalleri ($LOO^{\bullet}$), membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksidlerine ($LOOH$) dönüşürler (2). Peroksitlerin kendisi serbest radikal olarak görev yapar ve otokatalitik zincir reaksiyonunu başlatır. Bu da doymamış yağ asitlerinin daha fazla kaybına yol açarak aşırı membran hasarına yol açar (19).

Üç veya daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin peroksidasyonunda tiobarbütirik asitle ölçülebilen malondialdehit (MDA) meydana gelir. Bu metod lipid peroksit seviyelerin ölçülmesinde sıklıkla kullanılır. MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir, fakat lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir (2).

Sıklık peroksitler yeniden düzenleme ile endoperoksitlere daha ileri oksidasyon ile de MDA'ya dönüşebilirler . Lipid peroksidasyonuna yol açan lipid radikallerinin oluşumu ve artışı şekil 3'de özetlenmiştir (25).



Şekil 3: Lipid peroksidasyonuna yol açan lipid radikallerinin oluşumu ve artışı.

MDA ve 4 hidroksinonenal gibi bazı ürünler membranlardaki deformite ve permeabiliteyi artırır. Membran komponentlerinin polimerizasyonu ve çapraz bağlanmalarına neden olan MDA iç membranın özelliklerini değiştirir. Ayrıca diffüze olabildiğinden DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girmektedir. MDA bu özelliklerinden dolayı, mutajenik, genotoksik ve karsinojenik bir bileşiktir (2).

Lipidlerden, araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine "enzimatik lipid peroksidasyonu" diğer radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna ise "non-enzimatik lipid peroksidasyonu" adı verilir (2).

Demir ve bakır iyonları ya da bu iyonların fosfat esterleriyle oluşturduğu basit kumatları -Fe⁺²- Adenozin difosfat (ADP)-, hem, hemoglobin ve myoglobulini de içeren bazı demir proteinleri, lipid hidroksiperoksitlerini bozarak peroksidasyonu sonlandırmaktadır (2).

3.13.3.b. Proteinlere etkileri:

Proteinler serbest radikal etkisine karşı, PUFA'dan daha az hassastırlar ve başlayan zarar verici zincir reaksiyonlarının hızla ilerleme ihtimali daha azdır. Doymamış bağ ve sülfür ihtiva eden moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler (2,5).

Hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin, superoksit radikali veya hidrojen peroksit ile reaksiyonu methemoglobin oluşumuna sebep olur (2). Prolin ve lizin; süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali üreten reaksiyonlara maruz kaldıklarında nonenzimatik hidroksilasyona uğrayabilirler (2).

Fazla miktarda disülfid bağı içeren ekstrasellüler proteinler, -İmmunglobulin G (IgG), albumin gibi- hidroksil ve peroksi radikal saldırısına daha hassastırlar (2,25).

3.13.3.c. Nükleik asitler ve DNA'ya etkileri:

Nükleik asitler ve deoksiribonükleikasit (DNA) üzerine serbest radikal etkisiyle; DNA zincirinde kopmalar, bazlarda ve deoksiribozlarda kırılmalar ve hasar oluşur (5,25). Reaktif oksijen tek iplikçikli DNA hasarı yapar ve iplikçiklerin kırılmasına neden olur. Sonuçta mutajenez, karsinogenaz, kromozomal değişimler, hücre büyümesi ve farklılaşmasında değişiklikler görülür (2,5,25).

3.13.3.d. Karbonhidratlara etkileri:

Karbonhidratların proteinlere bağlanması, proteinleri serbest radikal hasarına daha duyarlı kılar. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve ökoaldehytler meydana gelirler (2,5,25).

3.13.4. Antioksidan savunma sistemleri:

Serbest oksijen radikallerinin potansiyel zararlarına karşılık çok sayıda hücre koruyucu enzimleri ile karşı koyulur ve antioksidan maddeler ile radikal hasarı sınırlandırılmaya çalışılır. Vücuttaki hücrel antioksidan enzimler, antioksidan maddeler ve serbest radikallerin birbirleri arasındaki ilişki bir denge oluşturmaktadır (22,97).

Lloberas N ve ark. (50), antioksidan tedavinin postiskemik renal oksidatif stresi, PAF ve PAF benzeri lipidleri azaltarak ve renal dokuya lökosit infiltrasyonunu azaltarak yaralanmayı azalttığını saptamışlar.

Antioksidan defans sistemi şu yollarla radikal hasarını engellerler:

- 1-Oksijenin uzaklaştırılması veya lokal oksijen konsantrasyonlarının azaltılması,
- 2-Katalitik metal iyonlarının uzaklaştırılması,
- 3-Anahtar rolündeki serbest oksijen radikallerinin (O_2^- ve H_2O_2) uzaklaştırılması,
- 4-Hasarı başlatıcı serbest radikallerin ($OH^\cdot$, $LO^\cdot$ Ve $LOO^\cdot$) temizlenmesi,

5-Zincirleme devam eden reaksiyonların kırılması,

6-Singlet oksijenin temizlenmesi

Belirli bir düzeye kadar olabilen okside molekül artışı yine vücutta daima belirli bir düzeyde bulunan doğal antioksidan moleküller tarafından etkisiz hale getirilmektedirler. Sağlıklı bir organizmada oksidan düzeyi ve antioksidanların bunları etkisizleştirme gücü bir denge içindedir (20).

Antioksidanlar genel olarak endojen ve eksojen antioksidanlar olmak üzere iki grupta incelenir.

3.13.4.a. Endojen antioksidanlar

3.13.4.a.1. Enzimatik Antioksidanlar (sitokrom oksidaz, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon S transferaz, glutatyon redüktaz).

3.13.4.a.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar : Vitamin (Vit) E, Beta karoten, Vit C, Glutatyon.

3.13.4.a.3. Diğer Enzimatik Olmayan Endojen Ajanlar (ürik asit, sistin, albumin, melatonin, bilüribin vb.).

3.13.4.b. Eksojen antioksidanlar: (propil galate, desferroksamin, kalsiyum antagonistleri vb.).

Vücutta enzimatik ve nonenzimatik çok çeşitli antioksidan savunma sistemleri vardır (2,5,6).

3.13.4.a.1. Enzimatik Antioksidanlar:

Hücre içinde oksijenin metabolize edildiği her yerde, antioksidanlar, oksijen ara metabolitlerini azaltmak için hızlı ve spesifik (enzimatik) olarak çalışırlar. Antioksidan savunmada öncelikle etkili olanlar enzim sistemleri; enzimatik antioksidanlardır. Bunlar süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz gibi enzimlerdir (2).

Hücre içi antioksidanlar:

Sitokrom oksidaz sistemi, hücre içi oksijenin %95-99'unun detoksifikasyonunu sağlar.

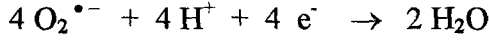
Süperoksit dismutaz Cu, Zn, Mn, Fe), süperoksit radikalinin (O_2^-) katalitik olarak uzaklaştırılmasını sağlar.

Katalaz, H_2O_2 'in (yüksek konsantrasyonda bulunduğu) uzaklaştırılmasını sağlar.

Glutasyon peroksidaz, H_2O_2 'in ve lipid hidroperoksitlerinin uzaklaştırılmasını sağlar (22).

3.13.4.a.1.1. Sitokrom Oksidaz Sistemi:

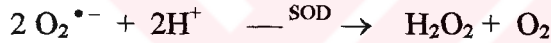
Solunum zincirinin son enzimi olan sitokrom oksidaz aşağıdaki reaksiyonla süperoksidi detoksifiye eder.



Hücredeki oksijenin % 95-99 kadarını etkisiz hale getirir (5). Ancak süperoksit üretimi çoğu zaman bu enzimin kapasitesini aşar ve diğer antioksidan enzimler devreye girer (2).

3.13.4.a.1.2. Süperoksit Dismutaz (Superoxide oxido reductase, EC 1.15.1.1)

Süperoksit dismutaz (SOD) süperoksit anyon serbest radikalının ($O_2^{\bullet-}$) hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize eden hücre içi bir enzimdir. Oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunur (10). Serbest radikallere karşı organizmada ilk savunma SOD enzimiyle gerçekleşir. SOD, katalaz ve Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)'dan farklı olarak serbest radikali substrat olarak kullanır (95).



Süperoksit dismutazın kofaktör olarak içerdiği metal iyonuna göre 3 major formu vardır. En sık bulunanı bakır-çinko içerir (Cu-Zn SOD), sitosolde bulunur. Ökaryotların karakteristik bir enzimidir. Mangan içeren ise mitokondride bulunur (Mn SOD). Üçüncü tip ise demir içerir (Fe SOD) ve bakterilerde bulunur (2,5,25). Cu-Zn SOD 21 nolu kromozomda, Mn SOD ise 6 nolu kromozomda lokalizedir (2). Sitozolik Cu-Zn SOD siyanidle inhibe edilirken, mitokondrial Mn SOD inhibe olmaz (2). Her iki SOD'un katalizlediği reaksiyon aynıdır. Enzimin fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder. Bu enzim sayesinde intrasellüler süperoksit düzeyleri düşük tutulur. SOD'un ekstrasellüler aktivitesi çok düşüktür (2).

SOD enziminin katalizlediği reaksiyonun son ürünü olan H_2O_2 ; Cu-Zn SOD ve Fe SOD izoenzimlerini inaktive etmektedir, ancak H_2O_2 'nin Mn SOD üzerine etkisi yoktur (98).

SOD enziminin aerobik hücrelerin tümünde bulunduğu ancak anaerobik hücrelerin çoğunda bulunmadığı bilinmektedir (98).

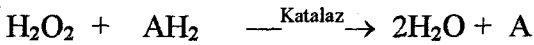
Süperoksit radikalleri spontan olarak dismutasyona uğrayabilirler. SOD enzimi dismutasyon hızını 10 kez artırır. Böylece süper oksitin başka substratlarla reaksiyonlaşması ve daha toksik etkili $\text{OH}^\bullet$ radikallerinin oluşumu SOD tarafından engellenir (25). SOD fagosite edilmiş bakterilerin intrasellüler öldürülmesinde de rol oynar (2).

Bugün aerobik canlıların her hücre ve organelinin sürekli olarak süperoksit radikali ürettiği ve bu radikaller ile meydana gelen toksik etkilere karşı tek enzimatik koruyucu mekanizmanın SOD olduğu bilinmektedir (2,25).

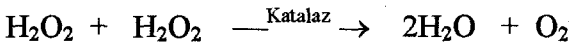
3.13.4.a.1.3. Katalaz ($\text{H}_2\text{O}_2 : \text{H}_2\text{O}_2$ oxido reductase, EC 1.11.1.6):

Katalaz glikoprotein yapısında olup karbonik anhidraz enzimi ile beraber bilinen en hızlı enzimdir. Katalaz tüm hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan bir hem enzimdir. Yüzde 20 oranında sitoplazmada ve %80 oranında peroksizomlarda lokalizedir. Aktif merkeze bağlı bir hem grubu içeren 4 alt birimden oluşmaktadır. Molekülün alt birimlerinin ayrılması enzim aktivitesinin kaybına yol açar. Görevi hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalamaktır. Kanda, kemik iliğinde, muköz membranlarda, böbrekte ve karaciğerde bulunur (2,5). Ancak katalaz, hidrojen peroksidin üretildiği tüm hücresel komponentlerde bulunmaz, bu nedenle radikallere karşı korumada ikincil derecede önemli olduğu kabul edilir (5,25).

Katalaz, H_2O_2 'in oluşum hızının düşük olduğu veya elektron vericisinin yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu durumlarda peroksidatif reaksiyonla;



H_2O_2 'in oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise katalitik reaksiyonla;



Hidrojen peroksidi suya dönüştürerek temizler (70). Bu reaksiyon daha çok H_2O_2 konsantrasyonunun arttığı durumlarda çok önemlidir. Düşük H_2O_2 konsantrasyonlarında diğer peroksidazlar (örneğin; glutatyon peroksidaz) devreye girer (22).

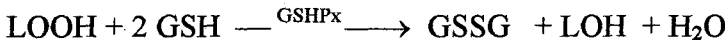
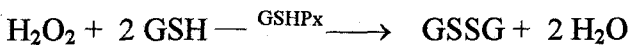
Katalazın indirgeyici aktivitesi hidrojen peroksit, metil hidroperoksitleri, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine ise etki etmez (2).

3.13.4.a.1.4. Glutasyon Peroksidaz (Glutathione: H₂O₂ Oxido reductase, EC 1.11.1.9)

Hücre içi bir enzimdir. Normal koşullarda hücrede bulunan H₂O₂'nin detoksifikasyonundan esas olarak glutasyon peroksidaz (GSH-Px) sorumludur. GSH-Px, lipid peroksidasyonunun başlamasını ve gelişmesini engelleyici özellikte olan bir enzimdir (52). Selenyuma bağımlı ve bağımsız olmak üzere 2 farklı tipi vardır. Selenyuma bağımlı olan GSH-Px hem H₂O₂'yi hem de lipid hidroperoksitlerini (LOOH) metabolize ettiği halde; hücrenin mitokondri (%30) ve sitozol (%70) fraksiyonlarında lokalize olan selenyumdan bağımsız GSH-Px ise yalnızca lipid hidroperoksitlerini metabolize edebilmektedir (70). Karaciğer, böbrek korteksi, iskelet kasında bulunur. Böbrek medullasında selenyum bağımlı ve bağımsız GSH-Px eşit miktardadır (98). Hidrojen peroksitin bu enzim tarafından yıkılmasının önemi KEŞHAN HASTALIĞI adı verilen bir kardiyomiyopati türünden tanımlanmıştır. Bu hastalık selenyumdan fakir topraklarda yaygın olarak görülür. Diyetle selenyum verilmesi ile engellenebilmektedir (22).

Glutasyon peroksidaz enziminin katalize ettiği reaksiyon ile, membran lipidlerinin ve hemoglobinin, peroksitler tarafından oksidasyonu önlenir. Bu reaksiyon hemoglobinin methemoglobine oksidasyon oranını azaltarak eritrositin ömrünü uzatır (22).

GSH-Px aşağıdaki reaksiyonları katalizler (2,70).



Fosfolipid Hidroperoksit Glutasyon Peroksidaz (PHGSH-Px): Selenyum atomu ihtiva eden membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkole indirgeyen sitosolik bir enzimdir (2,5).

Membranlara bağlı en önemli antioksidan olan E vitamini yetersiz olduğu zaman PHGSH-Px membranın peroksidasyona karşı korunmasını sağlar (2,70).

GSH-Px'in fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Eritrositlerde de oksidan sisteme karşı en etkili antioksidandır (2). GSH-Px ve katalaz enzimleri

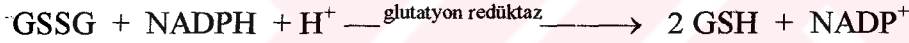
hücresinin farklı bölümlerinde lokalize olmalarından dolayı karaciğerde endojen olarak oluşan H_2O_2 seviyesini düzenlemede birlikte etkinlik gösterir (70).

3.13.4.a.1.5. Glutasyon S transferazlar (E.C.2.5.1.18)

Glutasyon S transferaz (GST) herbiri iki alt birimden oluşmuş (dimerik) bir enzimdir. Başta araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı GST'ler selenyum bağımsız GSHPx aktivitesi göstererek bir defans mekanizması oluştururlar. GST'ler geleneksel olarak 3 sitozolik bir de mikrozomal olmak üzere dört ana gruba ayrılırlar (2).

3.13.4.a.1.6. Glutasyon Redüktaz (NADPH: Oxidized glutathione oxido reductase EC 1.6.4.2)

Antioksidan savunmanın etkinliğini sürdürebilmesi için oksitlenmiş glutasyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş glutatyona (GSH) dönüşmesi gerekir. Glutasyon redüktaz, NADPH (Redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) varlığında oksitlenmiş glutasyonun indirgenme reaksiyonunu katalizler. Bu oksidoreduksiyon enziminin koenzimi NADPH, prostetik grubu ise FAD (Flavin adenin dinükleotid fosfat)'dır. Glutasyon redüktaz sitosol ve mitokondride lokalizedir (70).



NADPH/NADP⁺ ve GSH/GSSG oranlarındaki değişiklikler akut prooksidan stres ile antioksidan savunma arasındaki dengesizliğin belirtisidir. Oluşan NADP⁺(Okside nikotinamid adenin dinükleotid fosfat)'nın tekrar NADPH'a dönüşebilmesi için G.6.P.D (Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz) enzimine gerek duyulur (70).

3.13.4.a.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar.

3.13.4.a.2.1. E Vitamini

E vitamini peroksit ve hidroperoksitleri hidrojen iyonları ile doyurup, peroksit radikallerinin aktivitesini azaltarak otooksidasyonun başlatıcısı olan bu reaksiyonları inhibe eder (56). GSH-Px'a benzer etki göstererek hücrel zar oksidasyonunu önleyerek dokuların yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünü sağlar (56). E vitamini biyolojik sistemler için önemli bir antioksidandır. α -tokoferol biyolojik membranların lipid tabakalarında mevcuttur ve önemli bir yapısal rol oynar (62). E vitamini askorbik asit (AA) tarafından rejenere edilebilir (23).

3.13.4.a.2.2. Beta Karoten

A vitamininin öncü maddesi olup, plazmada alfa-tokoferolden elli kat daha az bulunmasına rağmen benzer şekilde serbest radikal tutucu olarak görev yapar ve doku hasarlarını önler. Yağda eriyen bir vitamin olan beta-karoten, alkoksil ve peroksil radikallerinin etkin temizleyicisidir (60).

3.13.4.a.2.3. C Vitamini (Ascorbik Asit)

Non membranöz serbest radikal toplayıcısı olarak görev yapar. İnsanlar, diğer primatlar, kobaylar ve meyve yiyen yarasaların, L-glukonolakton oksidaz enzimini içermedikleri için sentezleyemedikleri esansiyel bir diyet vitaminidir. AA, kollagen biyosentezinde kullanılan prolin hidrosilaz ve dopamini noradrenaline dönüştüren dopamin-betahidrosilaz için önemli bir kofaktördür. AA, güçlü bir redükleyici ajan ve antioksidan olup süperoksit, peroksit ve hidrosil radikalleriyle reaksiyona girerek bir ara ürün olan semidehidroaskorbat yoluyla metaboliti dehidroaskorbik asiti (DHA) oluşturur (25) Biyolojik ortamların çoğunda askorbat olarak bulunan C vitamini hücre dışı sıvıların en önemli antioksidanıdır. Kornea, lens, adrenal ve hipofiz bezlerinde yüksek konsantrasyonda bulunur. Ayrıca beyin, kalp, karaciğer, dalak, böbrek ve pankreas dokuları yüksek miktarda C vitamini içerirler (70,77).

3.13.4.a.2.4. Glutasyon

Glutasyon; glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan, intrasellüler konsantrasyonu daha fazla olan bir tripeptiddir (70,77).

Canlıların yaşayabilmesi için yüksek miktarda redükte glutasyon (GSH) ve düşük miktarda okside glutasyon (GSSG) gereklidir (5,25). Glutasyon organizmanın tüm hücrelerinde bulunan, hücrenin protein yapısı dışındaki sülfidril grubu içeriğinin % 90 kadarını oluşturan bir tripeptiddir. Serbest bir sülfidril grubuna sahip olan redükte glutasyon hücre içi sülfidril tamponu olarak etkilidir ve hücreleri oksidatif hasara karşı korur (5,70). Eritrositlerde bulunan GSH, hemoglobinin sistein gruplarını ve diğer hücre proteinlerinin tiol gruplarını indirgen şekilde tutar. Böylece hemoglobini oksidasyondan koruyarak hücrenin bütünlüğünü sağlar. Ayrıca nükleofilik bir yapıya sahip olan GSH elektrofilik karakterdeki karbon atomları ve Zn, Cd, Hg, Cu, Pb gibi atomlarla kompleks oluşturarak ağır metallerin vücuttan atılmasına yardımcı olur (70).

Glutasyon, bazı aminoasitlerin hücre içine taşınmasında, biyotransformasyon ile oluşan maddelerin detoksifikasyonunda da görev alır (70). Glutasyonun peroksitlerle ve disülfidlerle reaksiyonu sonucu GSSG oluşur. GSSG konsantrasyonundaki artış, oksidan stresin bir göstergesidir (70). GSH serbest radikallere karşı savunma sisteminin anahtar bileşenidir. Gerekli GSH/GSSG oranları glutasyon redüktaz ve G.6.P.D enzimleri tarafından sağlanır (2,25).

3.13.4.a.3. Diğer Enzimatik Olmayan Endojen Ajanlar

Bazı durumlarda ürik asit, sistin, albumin, bilirubin, seruloplazmin, transferrin, laktoferrin, ferritin, kreatinin ve östrojenler de serbest radikallere karşı koruyucu rol oynarlar (2,5).

Ayrıca son zamanlarda üzerinde çok durulan melatonin en zararlı radikal olan $OH^{\bullet}$ radikalini ortadan kaldıran çok güçlü bir antioksidandır. Bu yüzden günümüze kadar bilinen antioksidanların en güçlüsü olarak kabul edilmektedir (2).

3.13.4.b. Eksojen Antioksidanlar

1. Besinlerdeki doğal antioksidanlar. A, C, E vitamini ve Beta karoten.
2. Besinlere eklenen antioksidanlar. Bütülat hidroksitoluen, bütülat hidroksianizol, sodyum benzoat, etoksikuin, propil galate, Fe-süperoksit dismutaz.
3. Diğer antioksidanlar (farmakolojik). Beta blokerler, kalsiyum antagonistleri, sülfidril içeren anjiyotensin converting enzim (ACE) inhibitörleri ve desferroksamin gibi (2,5).

3.13.5. Deneylerimizde kullandığımız Antioksidanlar:

3.13.5.1. Melatonin

3.13.5.2. PGE1

3.13.5.3. Vit.E

3.13.5.1. MELATONİN

Pineal bez beyin içerisinde lokalize endokrin bir organ olup, yıllardır bu küçük organ üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. 1958 yılında Lerner tarafından yapılan çalışma sırasında pinealden salgılanan ve kurbağalardaki melanofor hücreleri agregre ettiği için melatonin adı verilen hormonun keşfi ile pineal bez daha da önemli bir organ haline gelmiştir (87).

Melatonin (N-asetil 5-Metoksitriptamine) bir indolamin türevidir ve vücutta primer olarak pineal bezden salgılanan, bütün vertebralılarda gece en üst seviyelere ulaşan artış ve gündüz azalma şeklinde sirkadiyen salınım ritmi gösteren bir hormondur (64). Tüm canlılarda gece daha fazla miktarda salgılanan melatoninin sirkadiyen ritimde salgılandığı kabul edilir. İnsanda normal şartlarda gece serum melatonin düzeyi gündüz değerinden 5 ile 10 kat fazladır (65).

3.13.5.1.a. Sentez ve ritmik salınım:

Melatonin biyosentezi için ilk önce kan dolaşımından triptofan'ın pinealositlere alınması gerekir, daha sonra hidroksilaz enzimi tarafından 5-OH triptofan'a dönüştürülür. 5-OH triptofan ise L-Aromatik amino asit dekarboksilaz tarafından serotonine dönüştürülür. Serotonin pineal bezde vücudun diğer organlarından daha fazla oranda bulunur (64,87). Serotoninin melatonine dönüşümünde etkili olan N-Asetil transferaz (NAT) ve Hidroksi indol-O-metil transferaz (HIOMT) aktivitelerinin pineal bezde gece daha yüksek olduğu belirlenmiştir. HIOMT enzimi pineal bez dışında melatonin sentezleyen retina, kalp gibi dokularda da bulunmaktadır. Melatoninin pineal bezde belirgin bir metabolik ritmik aktivite göstermesinin ilk bulgusu, melatonin sentezi ve salınımının karanlık (gece) ile başlayıp aydınlık (gündüz) ile sonlanmasıdır. Bu siklik salınım hemen daima hipotalamustaki suprakiazmatik çekirdeğin fotik stimulusla nöronal aktivasyonu sonucu oluşur. Bu nöronal aktivasyon ve pinealin bir fotonöroendokrin iletici gibi işlev görmesinde pinealdeki serotonin düzeyinde meydana gelen

varyasyonlar da önemli bir yer tutmaktadır. Canlılarda melatonin sentezi periferik sempatik sinir sistemi yolu ile ışık karanlık döngüsünün kontrolü altındadır (96).

Melatonin dolaşıma geçtikten sonra plazma albüminine gevşek olarak bağlanır. Bu indole yapı hepatik mikrozomlarda hızlı bir şekilde %70-80'i hidroksile olarak sülfat ile, %5'i glukuronit ile konjuge edilir. Melatoninin yarılanma ömrü 20-40 dakika arasında olup karaciğerden ilk geçişte %90'ı metabolize olur. Başlıca karaciğerde metabolize edilmekle birlikte böbrekte de metabolize edilir ve 6-OH melatonine dönüştürülerek metaboliti idrar yolu ile atılır (16).

Pineal bezdeki hüneral sentez gece suprakıyazmatik çekirdekten gelen adrenerjik uyarımla (norepinefrin) pinealosıt membranındaki α ve β reseptörleri aracılığı ile olur. Reseptör uyarımı ile hücre içi adenilat siklaz enzimi aktive olarak cAMP düzeyini artırır, cAMP ise hücre içi melatonin üretiminde etkili bir enzim olan NAT artışına yol açarak melatonin sentezini artırır (16). Pineal bezin melatonin üretiminden sorumlu başlıca organ olduğu görüşü, diffüz nöroendokrin sistem (DNES)' in bir bölümü olarak kabul edilen APUD (Amine prekursor uptake and decarboxilation) hücrelerinde melatoninin dikkat çekici oranda belirlenmesiyle tartışılmaya başlanmıştır. Enterokromaffin hücreler (EC) GİS' in temel serotonin üreten ve depolayan hücreleridir. Melatonin barsak mukozasında üretilir ve EC hücrelerine lokalize olur (15).

Melatonin pineal bezin yanı sıra retina, tükruk bezleri ve barsakta sentezlenip salgılanır. Ayrıca karaciğer, böbrek, adrenal bezler, tiroid, timus, hava yolları, plasenta ve endometriumda, DNES hücrelerinde, mast hücreleri, naturel killer, eozinofilik lökositlerde de belirlenmiştir. Bu bölgelerde sentezlenen melatonin gün boyunca etkili olan kan düzeyini oluştururken, sirkadiyan ritmi ise pineal bezden sentezlenip salınan melatonine bağılıdır (15,64). Melatoninin reseptörlerinin otoradyografi ve/veya radyoreseptör çalışması ile barsaklarda, böbrek, akciğer, kalp, vas deferens ve kan damarlarında olduğu tespit edilmiştir (15).

3.13.5.1.b. Melatoninin metabolizması:

Pineal bezden dolaşıma verilen melatonin, kanda serbest veya albumine bağılı (%70) olarak taşınabilir. Serbest veya albumine bağılı melatonin, rahatça

BOS'a geçebilir. Melatonin primer olarak karaciğerde ve sekonder olarak böbreklerde metabolize olur. Karaciğerden ilk geçişte yaklaşık %90'ı metabolize olur ve mikrozomal enzimler tarafından, 6. konumda hidroksilasyona uğrayarak 6-Hidroksimelatonine dönüşür. Bu madde daha sonra klasik olarak mikrozomal faz 1 ve faz 2 gibi ardışık reaksiyonlar olan deaktivasyon ve detoksifikasyona uğratarak büyük oranda sülfat veya daha az olarak glukronid konjugatı halinde itrah edilerek idrarla atılır (96). Melatoninin beyindeki metabolizması ise periferden farklıdır. Beyinde melatoninin büyük bir kısmı (%12) N-asetil-5-Metoksikinürenamine ve daha sonra N-Gamma asetil-5-Metoksikinürenamine dönüşür. Bu metabolitler fizyolojik olarak aktiftirler ve özellikle melatoninin sirkadiyen ritmiyle ilgilidirler. Ayrıca prostaglandin sentez inhibitörü oldukları da daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir. Eksojen melatonin demetilasyon ile N-asetil serotonine de dönüşerek hidroksilasyon ve neticesinde konjugasyon ile melatonin haline dönüşür. Burada melatoninin kendi prekürsörüne dönüşmesi melatonin sentezinin kompleks bir feedback mekanizmayla kontrol edildiğini düşündürmektedir (16,96).

3.13.5.1.c. Melatoninin fizyolojik fonksiyonları:

Melatoninin etkileri yalnızca deney hayvanlarında değil, insanda da yaklaşık kırk yıldır yoğun şekilde araştırılmaktadır. Melatoninin en iyi bilinen etkisi üreme fizyolojisi üzerinedir. Bunun yanında pineal bez ve melatoninin çeşitli olay ve süreçlerle ilgili olabileceğini belirten yayınlar mevcuttur (43). İnsanda melatoninin kısmen de olsa ilgili olabileceği olay ve süreçler şöyle sıralanabilir:

A- Üreme

- Menstrüel siklus
- Spermatogenez
- Hipotalamik amenore
- Premenstrüel sendrom
- Puberta prekoks
- Puberta tarda

B- Nöropsikiyatri:

- Uyku bozuklukları
- Anoreksiya nervosa
- Epilepsi

-Mevsimsel affektif bozukluklar

-Şizofreni

-Depresyon

C- Diğer

-Bağışıklık

-Kanser

-Yaşlanma

-Termoregülasyon

-Antioksidan etki

Tiroid ve adrenal bez üzerine olan etkiler

Melatoninin en iyi bilinen etkileri üreme fizyolojisi ile ilgili olanıdır. Ovulasyon esnasında LH (luteinizan hormon) artışı ile birlikte plazma melatonin düzeyinde azalma meydana gelmesi ve pubertal gelişim sürecinde gece melatonin salgılanmasının giderek azalması, pineal bezin insanda hipotalamus-hipofiz-gonadlar sistemi üzerinde inhibitör bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir (41). Ayrıca, hipotalamik amenoreli kadınlarda, hipogonadotropik hipogonadizmde, oligoazospermili ve azospermili erkeklerde premenstrüel depresyonlu kadınlarda, serum melatonin düzeyinin anormal bulunması bu düşüncüyü desteklemektedir (41). Melatonin, immüitenin nöroendokrin kontrolünde önemli bir hormondur. Pineal bezin baskılanması veya çıkarılması immüniteyi olumsuz etkiler. Maestroni; T helper tip 2 lenfositler üzerinde melatonin bağlanma bölgelerini tespit etmiştir. Giordano ve Palermo; intravenöz verilen eksojen melatoninin, antikorların eşlik ettiği hücrel sitotoksisteyi artırdığını saptamıştır (59).

Meme kanserinin etyolojisinde uzamış östrojen fazlalığı olması ve melatoninin overlerde östrojen üretimini olumsuz etkilemesi; meme kanseri gelişimi ile pinealden melatonin salınımının azalması arasında bir ilişki olabileceği görüşünü doğurmuştur (79). Özellikle hormon bağımlı tümör türleri ile gerçekleştirilen çalışmalar; malign hastalıklarla melatonin arasında bir ilişki olduğunu düşündürmektedir. Ratlarda meme kanseri oluşumunu eksojen melatonin olumsuz; pinealektomi olumlu yönde etkilemektedir. Bu etkinin, prolaktin salınımının veya kanser hücrelerindeki östrojen reseptörlerinin sayısının veya kanser hücrelerindeki östrojen reseptörlerinin sayısının azalmasının bir sonucu olduğu düşünülmektedir.

Melatoninin östrojene duyarlı insan meme kanseri hücreleri üzerine antiproliferatif etkisi vardır; ancak östrojen reseptörü taşımayan meme kanseri hücrelerini etkilememektedir (43).

Klasik antitümör tedavinin etkisiz kaldığı ilerlemiş renal hücreli kanser, malign solid tümör, malign melanoma ve benzeri hastalıkların tedavilerine eklenen melatoninin potansiyel bir ajan olduğu belirtilmiştir (43). Malign hastalıkların tedavisine eklenen melatoninin belirli ajanların antimitotik etkilerini artırmakta; kemik iliğine toksik etkilerini azaltmaktadır (43).

Antistres etkileri olan melatoninin serum düzeylerinin çeşitli psikiyatrik hastalıklar sırasında tipik değişiklikler gösterdiği ileri sürülmektedir (64)

3.13.5.1.c.1. Melatoninin antioksidan etkisi:

Melatoninin prekürsörleri olan triptofan ve 5-OH triptaminin antioksidan aktivitesi gösterilmiş bir gerçektir. Bu aktivite oksijen serbest radikallerini yakalayan moleküldeki indol yapısına dayanır (16,64,65). Melatonin hidrofilik olduğu kadar büyük miktarlarda lipofilik olup organizmanın bütün subsellüler kompartmanlarına ve hücre çekirdeğine ulaşabilir ve kan-beyin bariyeri gibi engelleri de kolayca geçerek geniş bir dağılımda oksidatif koruma sağlayabilir (59). Melatoninin hücre nükleusuna girerek DNA'yı oksidatif hasardan koruyucu etkisi diğer antioksidanlara üstünlüğü bakımından önemlidir. Antioksidan özelliği, güçlü bir hidroksil ve peroksil radikallerini tutucu aktivitesine dayanır. İndol çekirdeğindeki 5 pozisyonunda metil grubunun OH⁻ soğutma yeteneği için gerekli olduğu ve yan zincirdeki asetil grubunun bir toplayıcı olmamasına rağmen sinerjistik aktivite gösterdiği bir çok araştırmada saptanmıştır (16).

Serbest oksijen radikallerinin yüksek seviyeleri kardiyomiyositlerde kalsiyum pompasının aktivitesini baskılar, melatonin ise bu pompanın aktivitesinde artışa neden olur. Melatonin subsellüler kompartmanlara kolayca girmesine rağmen bilinen bir toksik etkiye sahip değildir. Canlılarda endojen olarak üretilen melatoninin aşırı miktarlarını vücuttan uzaklaştıracak mekanizmalar mevcuttur. İnsanlara çok yüksek dozlarda (300 mg/gün) ve uzun periyotlarda (5 yıldan fazla) verildiği zaman dahi yan etki oluşturmadığı, bazı antioksidanların kısmen

prooksidan etkisi mevcut iken melatoninin böyle bir etkisinin olmadığı bildirilmektedir (16).

Melatoninin antioksidan etkisine en az iki mekanizma aracılık eder. Birinci etkisi reseptörlerden bağımsızdır ve melatoninin toksik radikaller üzerine gösterdiği etkisidir. Direkt olarak hidroksi ve peroksi radikalini önleyici etkisi, melatoninin hidroksi radikaline elektron ilave edince indolil katyon radikal çıkarak süperoksit anyon radikalini önlemektedir (98). İkinci etkisi ise genomdaki reseptörler üzerinedir ve reseptör aracılığı ile radikali detoksifiye eden enzimi ortaya çıkarır. Melatoninin oksidatif hasara karşı koruyucu olan başka bir mekanizması ise nitrik oksit sentaz'ı inhibisyonudur. Nitrik oksit sentaz, nitrik asit üretir ve süperoksit anyon varlığında yüksek toksik etkili hidroksi radikaline indirgenmektedir (16).

Hidrojen peroksit'in melatonine bağlı NADPH_2 ile enzimatik nötralizasyonu (pentoz yoluyla aktivasyonu) bu hormonun çeşitlendirilmiş metabolik yolunu tanımlar. Genel olarak melatonin hücreye NADPH_2 vererek eşdeğerlerini azaltıcı etki gösterir. Bu özelliği ile OH gibi radikal türleri için bir tuzak oluşturur. Melatonin membranlar ve sitosol üzerine gösterdiği etki için ayrıca membran reseptörüne ihtiyaç duymamaktadır. Bu durum muhtemel hücre içi reseptörün varlığını dışlamamaktadır. Oksidatif stres, radikal atak, hücre proliferasyonu, yaşlanma gibi durumlarda melatoninin faaliyeti nükleer düzeylere ulaşmaktadır. Melatonin direkt olarak Glutasyon peroksidaz'ı ve G_6PD 'yi (pentoz yolunda) aktive ederek H_2O_2 'nin OH^- a dönüşümünü önler (16,64,65).

Melatonin farmakolojik dozlarda GİS'de serotonin antagonisti olarak etki gösterir ve mukozal kan akımını artırır. Kan akımındaki etkiyi norepinefrinin etkisini potansiyelize ederek indirekt olarak gösterir. Düşük dozlarda melatonin, intestinal hücre proliferasyonunu azaltırken, yüksek dozlarda artırır (64). Lipit peroksidasyonu esnasında üretilen ve hücre membranında geniş çaplı lipit yıkılmasına öncülük eden peroksi radikalini engellemede vitamin E'den daha etkili olduğu gösterilmiştir (65). İyonize radyasyon ve karsinogen etkili safrole maruz kalan hayvanlarda DNA hasarını büyük ölçüde azaltan melatonin ayrıca bakteriyel endotoksinlerle muhtelif organlarda ortaya çıkan serbest radikallerin hasarını da azaltır (65). Fizyolojik melatonin konsantrasyonlarında nitrik oksit sentaz'ı inhibe

ederek peroksinitrit ve OH radikallerinin üretimini azaltır. Veya üretilen radikalleri nötralize ederek etkisini azaltır. Melatonin prekürsörleri olan triptofan ve 5-OH triptaminin SOR tutucu etkileri vardır. Antioksidatif etkinin bir kısmı invivo olarak melatoninin karaciğerde metabolize edilmiş formu 6-hidroksi melatoninini takip edebilir (64,65).

Kunduzova OR ve ark.(46) iskemi-reperfüzyon sonrası melatonin ile renal disfonksiyonun, apopitotik ve nekrotik hücre ölümünün ve kaspaz-3 aktivasyonunun önlenmesi için bir çalışma yapmışlar.Sonuçta, en yaygın tübüler nekrozun reperfüzyondan 24–48 saat sonra, kan üre, nitrojen ve kreatininin hafif yükselmesiyle koordine olarak meydana geldiği, melatonin verilen grupta lipid peroksidasyonun korunduğu, doku yaralanmasından renal fonksiyonun korunmasının göstergesi olarak kan üre nitrojeninin ve kreatininin düşük olmasıyla melatoninin koruduğu gözlenmiş. Yani, melatonin iskemi-reperfüzyon hasarında koruyucu etki göstermiştir.

3.13.5.2. PROSTAGLANDİN E₁:

Prostaglandinler (PG'ler), karbon zincirinin ortasında bir siklopentan halkası bulunan eikozanoidlerdir. Halka üzerinde ve ona bağlı iki yan zincir üzerinde keto (okso) ve/veya hidroksil grubu içerirler; ayrıca alifatik zincir üzerinde bir, iki veya üç çift bağ bulunur. Hepsinde bulunan ortak bir çift bağ C-13 ve C-14 arasındaki trans çift bağıdır (30).

Siklopentan halkasındaki substituentlerin durumuna göre E,F,D,A,B ve C diye ayrılırlar. Prostaglandin E'ler, F'ler ve D'ler doğrudan doğruya siklik endoperoksid ara ürünlerinden oluşurlar ve bunlara primer (veya stabil) prostaglandinler adı verilir. Primer prostaglandinlerin çeşitli hücre tiplerinde yaygın şekilde dağılmış ve biyolojik yönden önemli olanları E ve F grubu prostaglandinlerdir. PGD'ler insanda sadece trombositlerde ve mast hücrelerinde bulunur. PGA'lar, B'ler ve C'ler, E grubu prostaglandinlerden türerler ve biyolojik önemleri yoktur. Her bir grup içindeki üyeler, alifatik yan zincirler içindeki doymamış bağ sayısını gösteren ve grubu belirleyen harfin alt kısmına konulan 1,2 ve 3 sayıları ile simgelenirler. Halka üzerinde 2 hidroksil grubu içeren prostaglandin F'lerin α ve β izomerleri vardır. Vücutta sadece α izomerler oluşur, β izomerler oluşmaz. PGE'lerde halka üzerinde bir keto ve bir de hidroksil grubu bulunur (30).

3.13.5.2.a.Biyosentez:

Belirli yağ asitlerinden prostanoid sentezini yapan enzim sistemi vücutta hücre çeşitlerinin tümünde bulunur. Bu nedenle vücutta PGE'ler ve PGF'ler gibi primer prostaglandinlerin sentez edilmediği doku yok gibidir (30).

Prostaglandinlerin biyosentezi üç basamaklıdır:

- 1-Membran fosfolipidlerinden serbest yağ asitlerinin oluşması.
- 2-Serbest yağ asitlerinin siklooksijenazlarla siklik endoperoksidlere oksidlenmesi.
- 3-Siklikendoperoksitlerden prostaglandinlerin oluşması (30).

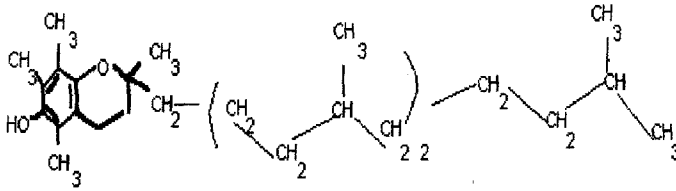
Prostaglandin biyosentezinde polienoik yağ asidi prekürsörlerinden ilk iki reaksiyon, prostaglandin endoperoksid sentaz ile katalize edilir. Birçok hayvanda mevcut olan bu membrana bağlı hemoprotein (eritrositlerde ve lenfositlerde olmamakla birlikte), tüm vücuda dağılmıştır. Araşidonik asitten prostaglandinlerin sentezi, stabil olmayan bir C 15-hidroperoksi-C9, C11-endoperoksit (PGG₂) yol açarak, bir pentan halkasının (siklooksijenaz aşaması) oksijenasyonu ve siklizasyonu ile başlar. Daha sonra aynı enzim tarafından kataliz edilmiş peroksidaz, C 15-hidro peroksi grubunu, endoperoksid PGH₂ oluşturarak, bir hidroksil grubuna indirger. Siklooksijenaz reaksiyonu, aspirin ve indometazin gibi steroidal olmayan antienflamatuar ilaçlarla inhibe edilir (11).

3.13.5.2.b. PGE₁'in renal sistem üzerine farmakolojik ve fizyolojik etkileri:

Hem renal medulla hem de renal korteks prostaglandinleri sentez eder. Fakat medullanın sentez kapasitesi korteksinkinden çok daha büyüktür. PGE₁, PGE₂ ve PGI₂ vazodilatör etkileri yoluyla glomerüler filtrasyonu artırır. Bu prostaglandinler aynı zamanda su ve sodyum atılımını da artırır. Su klirensindeki artış muhtemelen, ADH'nın adenil siklaz üzerindeki etkisini hafifletme sebebiyle olur. Natriüretik etkinin, distal tübülde sodyum rezorpsiyonunun doğrudan inhibisyonu ile ya da artmış medüller kan akımı ile olup olmadığı kesin değildir. Kıvrım diüretiği furasemid, etkisinin bir kısmını siklooksijenaz aktivitesini uyarak oluşturur. Normal böbrekte bu, vazodilatör prostaglandinlerin sentezini artırır. Bu yüzden kıvrım diüretiğine hastanın cevabı, eğer aynı zamanda bir siklooksijenaz inhibitörü verilirse, azalacaktır (11).

3.13.5.3. E VİTAMİNİ:

E vitamini biyolojik sistemler için önemli bir antioksidandır. α -tokoferol biyolojik membranların lipid tabakalarında mevcuttur ve önemli bir yapısal rol oynar (32). E vitamini terimi yapısal olarak birbiri ile bağlantılı bir grup bileşiği kapsar. Bunlar temelde 2 metil 6 kroman halkası içerirler ve 2.karbona bağlı 16 karbonlu fitil yan zinciri kapsarlar (2,70) (Şekil 3).



Şekil 4. α -tokoferolün yapısı.

D α -tokoferol en geniş doğal dağılımı ve en büyük biyolojik aktiviteyi gösterir. Antioksidan aktivitesi en yüksek olan tokoferol D α -tokoferoldür. α -tokoferol dokularda değişik konsantrasyonlarda bulunur. En yüksek E vitamini konsantrasyonları mitokondri ve mikrozomlar gibi membrandan zengin hücre fraksiyonlarında bulunur (2,30).

Bitkisel yağlar ve tohumlar, E vitamininden zengin kaynaklardır. E vitamini hububatların yağ fraksiyonu, mısır yağı, pamuk yağı, soya yağı, et, hayvansal yağ, karaciğer, balık eti, tavuk eti ve yumurtada bulunur (2,30). Diyetle yağda çözülmüş olarak alınır. Yağ sindirimi sırasında açığa çıkar ve emilir. Emilimi için yağ emilimi ve safra asitleri normal olmalıdır (2,31). Önemli bir endojen ve eksojen antioksidan olarak hücrel ve hücrealtı membranların bütünlüğünün korunması α - tokoferolün başlıca fonksiyonlarından biridir (5,30).

Lipid peroksidasyonunu önleyen ve oluştuğunda nötralize eden en güçlü antioksidan faktör E vitaminidir; vücudun diğer antioksidan sistemleri (C vitamini, glutatyon peroksidaz ve beta karoten gibi) söz konusu olay üzerinde E vitamini kadar etkili değildir (2,30). Bir molekül α -tokoferol 100 molekül PUFA'nın peroksidasyonunu engelleyebilir (2). Lipidde çözünürlüğünün yüksek olması nedeniyle kolayca membran fosfolipidlerine diffüze olabilmekte ve 20 karbonlu

doymamış yağ asitlerini indirgeyerek serbest oksijen radikallerinin biyomembranlarda oluşturabileceği lipid peroksidasyonunu önlemektedir (2,5,73).

E vitamini zincir kırıcı bir antioksidan olarak bilinir. Çünkü fonksiyonları lipid peroksi radikallerini ($\text{LOO}^\bullet$) parçalamak ve böylece lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırmaktır (2).



Sonuçta oluşan tokoferoksil radikali nisbeten stabildir ve lipid peroksidasyonunu kendi kendine başlatmak için yeterince reaktif değildir (2,25,73).

E vitamini radikali parçalanmadan önce askorbik asit ve glutatyon tarafından yeniden indirgenebilmektedir. Glutatyon peroksidaz ile E vitamini serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. Enzim oluşan peroksitleri ortadan kaldırırken, E vitamini peroksitlerin sentezini engeller (2). E vitaminini destekleyen glutatyon peroksidaz molekülünde fonksiyonel önemi olan selenyum iyonudur. Selenyum vücutta E vitamininin gereksinimini azaltır (30). E vitamininin immun sistem fonksiyonlarını düzenlediği bilinmektedir. Hem humoral hem de hücrel immun sistemi güçlendirir (51). E Vitamini, spesifik olarak T helper hücre üretimini stimüle eder (51).

Eritrosit membran stabilitesi için esansiyel olan E vitamininin hemolizi engellediği ve eritrositlerdeki oksidatif hasarı önlediği bilinmektedir (69). Ayrıca iskemi ve reperfüzyon ile ilişkili peroksidatif hasarı engellemede de etkilidir (5).

İmmunolojik fonksiyonların bozulduğu ve lökosit membran permeabilitesinin arttığı yanıklı hastalarda, E vitamininin lökosit membran permeabilitesini stabilize ettiği gösterilmiştir. E vitamininin bu etkisi membran lipidlerinde bulunan PUFA'nın oksidasyonunun inhibisyonuna bağlıdır (93). Bununla beraber E vitamininin insan granülositlerinde NADPH oksidoredüktaz enzim sisteminin selektif bir inhibitörü olarak görev yapabileceği bildirilmiştir. Bu bulgu yoğun E vitamini alımını takiben enfeksiyonların arttığını gösteren çalışmalarla uyumludur (2,32). Topik veya sistemik olarak verilen E vitamininin yara iyileşme zamanını önemli oranda azalttığı tespit edilmiştir (61).

4-GEREÇ VE YÖNTEM

4.A. Gereç:

4.A.1. Denek seçimi:

Bu deneysel çalışma Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında 1 Mayıs- 1 Haziran 2002 tarihleri arasında, 200-250 gr ağırlığındaki erişkin dişi Wistar Albino cinsi 42 rat üzerinde yapıldı. Ratlar 6 gruba bölünerek, deney sonuna kadar yedişerli kafeslerde tutuldu. Hayvanların beslenmesinde standart pellet yemi ve şehir içme suyu kullanıldı. Estrus fazındaki ratlarda, 30 mg/kg/intraperitoneal pentobarbital uygulandıktan sonra orta hat insizyonu yapılarak her iki ren bulundu. Ratlarda sol böbrek iskemisi oluşturmak için, hilustaki damarlar klemplenerek iskemi sağlandı. Altmış dakikalık iskemiye takiben 60 dakikalık reperfüzyon uygulandı.

4.A.2. Deneysel grupların oluşturulması:

- 1.Grup (Sham Grubu, n=7): Batın açıldı. Sol böbrek çıkarıldı. Böbrek doku ve kan örnekleri alındı.
- 2.Grup (İskemi Grubu, n=7): 60 dk. böbrek iskemisi uygulandıktan sonra, reperfüzyon uygulanmayan grup.
- 3.Grup (İskemi-reperfüzyon Grubu, n=7): 60 dk.böbrek iskemisi uygulandıktan sonra, 60 dk.reperfüzyon uygulanan grup.
- 4.Grup (Melatonin Grubu, n=7): 60 dk.böbrek iskemisi uygulandıktan sonra reperfüzyondan 15 dakika önce 20 mcg/kg/intramüsküler (IM) melatonin verilen ve 60 dk reperfüze edilen grup.
- 5.Grup (PGE₁ Grubu, n=7): 60 dk.böbrek iskemisi uygulandıktan sonra reperfüzyondan 15 dk önce 20 mcg/kg/IM PGE₁ verilen ve 60 dk reperfüze edilen grup.
- 6.Grup (Vitamin E Grubu, n=7): 60 dk.böbrek iskemisi uygulandıktan sonra reperfüzyondan 15 dk önce 500 mg/kg/IM vitamin E verilen ve 60 dk reperfüze edilen grup.

4.A.3. Operasyonun Yapılışı:

Ratlara operasyondan 18 saat önce sadece su içmelerine izin verildi. Vajinal smear takiplerinde estrus fazında olduğu saptanan ratlara genel anestezi oluşturmak

amacı ile, 30 mg/kg/intraperitoneal pentobarbital (IP) uygulandı. Operasyondan yaklaşık 2 dakika kadar önce karın traşı yapılan hayvanlarda operasyon sahası %10 Povidon İodine ile temizlendi. Yalnızca insizyon uygulanacak saha açık kalacak şekilde steril olarak örtüldü. Steril aletler kullanılarak orta hat karın insizyonu ile laparotomi yapıldı. Sol böbrek, hilus seviyesinde vasküler klemp kullanılarak 60 dk. iskemi edildi. 60 dk. iskemiye takiben 60 dk. reperfüzyon uygulandı. Sham grubunda, sadece batına girilerek böbrek doku ve kan örnekleri alındı. 2. Grupta, böbrek iskemisi uygulandıktan sonra reperfüzyon ve tedavi uygulaması yapılmadı. 3. Grupta, 60 dk.lık böbrek iskemisini takiben 60 dk. reperfüzyon uygulandı ve herhangi bir tedavi verilmedi. 4. Grupta, böbrek iskemisi uygulandıktan sonra reperfüzyondan 15 dk önce 20 mcg/kg dozda melatonin (N-asetil 5-Metoksitriptamine, 1 gr flakon, Sigma Chemical Co St. Louis USA) intramüsküler olarak uygulandı, 60 dk. reperfüze edildi. 5. Grupta, böbrek iskemisi uygulandıktan sonra reperfüzyondan 15 dakika önce 20 mcg/kg dozda PGE₁ (prostavasin 20 µgr/ml, Schwarz-Pharma Mainheim, Almanya) intramuskuler olarak uygulandı, 60 dk. reperfüze edildi. 6. Grupta, böbrek iskemisi uygulandıktan sonra reperfüzyondan 15 dk önce 500 mg/kg vitamin E (Evigen Ampul, Aksu ilaç, İstanbul, Türkiye) intramuskuler olarak uygulandı, 60 dk. reperfüze edildi.

4.A.4. Örneklerin Alınması:

Histolojik inceleme ve doku MDA ölçümü için sol böbrek örnekleri alındı. Sol böbrek dokusunun bir kısmı, ışık mikroskop takibi için %10'luk formaldehit içinde, bir kısmı elektron mikroskop takibi için, gluteraldahit solusyonu içinde tespit edilerek histolojik inceleme için ayrıldı. Böbrek dokusunun kalan kısmı, soğuk serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra, doku MDA tayini için alüminyum folyo kağıda sarılarak çalışma yapılncaya kadar -70 °C'de derin dondurucuda saklandı.

Biyokimyasal olarak, plazma malonildialdehid (MDA), eritrosit Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve Eritrosit süperoksit dismutaz (SOD) ölçümü için kan örnekleri alındı. Kan örnekleri her grupta deney sonunda, vena cava inferiordan alındı. Elde edilen kan, plazma ve hemolizat hazırlanması için hemoliz olmadan EDTA'lı vakumlu tüplere aktarıldı.

4.B. ÖRNEKLERİN İNCELENMESİ:

4.B.1. HİSTOLOJİK İNCELEME:

Tüm gruplardan alınan ve %10'luk formaldehit içine alınan örnekler tesbit edilerek rutin takip işlemlerinden geçirildi. Parafin bloklara gömülen dokulardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler deparafinize edilerek Hematoksilen-Eozin (H-E), PAS boyası ve Masson trikrom boyaları ile boyanarak ışık mikroskopunda değerlendirildi.

Işık mikroskopik inceleme glomerül yapısında ve tübüler yapıdaki bozuklukların varlığı açısından oluşturduğumuz histolojik grade skalasına göre (yok=0 puan, var=1 puan, çok var=2 puan) değerlendirildi.

Elektron mikroskopik incelemede bazal membran bozukluğu, tübül ve mitokondrial yapı değişikliklerinde artış, miyelin figürlerin varlığı açısından oluşturduğumuz histolojik grade skalasına göre (yok=0 puan, var=1 puan, çok var=2 puan) değerlendirildi.

4.B.2. ÖRNEKLERİN BİYOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ:

4.B.2.1. Doku MDA Düzeyleri:

Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malonildialdehid (MDA) tayini, dokuda Ohkawa (51) tarafından belirlenen yöntemle spektrofotometrik olarak yapıldı.

Prensip: Dokuda da lipid peroksidasyonunun ölçümü; pH:3.5 ve aerobik şartlar altında, tiyobarbitürik asit (TBA) ile doku homojenatının kaynar su banyosunda 1 saat inkübasyonu sonucu lipid peroksidasyonunun sekonder ürünü olan MDA ile TBA'nın oluşturduğu pembe renkli kompleksin spektrofotometrik olarak ölçümü prensibine dayanır.

4.B.2.2. Plazma Lipid Peroksit (LPO) Ölçümü:

Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malonildialdehid (MDA) tayini, plazmada Satoh (69) ve Yagi'den (93) modifiye edilen bir yöntemle spektrofotometrik olarak Shimadzu UV-1201 spektrofotometresi kullanılarak yapıldı.

Prensip: Plazmada bulunan lipid peroksidasyonunun sekonder ürünü olan MDA, aerobik şartlarda, pH:3.4 olduğu bir ortamda tiyobarbutirik asit (TBA) ile 95 °C de

inkübasyonu sonucu pembe renkli kompleks oluşturur. Bu pembe rengin 532 nm’de spektrofotometrik olarak ölçümü ile MDA miktarı saptanır.

4.B.2.3. Eritrosit Süperoksit Dismutaz (SOD) Tayini:

Eritrosit SOD enzim aktivitesi, Randox firmasının enzimatik metodla çalışan RANSOD adlı ticari kiti kullanılarak ölçüldü (61).

Prensip: SOD, oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan toksik süperoksit radikallerinin (O_2^-) hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandırır. Bu yöntem, ksantin ve ksantin oksidaz kullanılarak oluşturulan süperoksit radikallerinin, 2-[4-iyodofenil]-3-[4-nitrofenol]-5-feniltetrazoliyum klorid (p-iyodonitrotetrazoliyum viyole:INT) ile meydana getirdiği kırmızı renkli formozan boyasının 505 nm dalga boyunda verdiği optik dansitenin okunması esasına dayanır. Örnekte bulunan SOD, süperoksidi ortamdan uzaklaştırarak formazon reaksiyonunu inhibe eder. Sonuçta kırmızı renkteki azalmanın belirlenmesiyle SOD aktivitesi ölçülür. Kırmızı rengin şiddeti SOD aktivitesinin büyüklüğü ile ters orantılıdır.

4.B.2.4. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Enzim Aktivitesi:

Eritrosit GSH-Px aktiviteleri, Randox Laboratories Ltd. United Kingdom ticari firmasının enzimatik-UV metotla çalışan RANSEL adlı ticari kiti (Katalog No: RS 504) ile Olympus AU-600 otoanalizöründe ölçüldü. Bu kit Paglia ve Valentine metodu (53) esas alınarak hazırlanmıştır.

Prensip: GSH-Px, kümen hidroperoksit (ROOH) varlığında redükte glutatyonun (GSH) okside glutatyona (GSSG) yükseltgenmesini katalize eder. Oluşan GSSG, glutatyon redüktaz ve NADPH yardımı ile GSH’ı indirgenir. GPx aktivitesi, NADPH’ın NADP’e yükseltgenmesi ile oluşan absorbans farkının okunması ile ölçülür.

4.C. İstatistik Analizler:

Deneysel çalışmalar sonucu bulunan verilere grup sayısı 6, birbirinden bağımsız ve $n < 30$ olduğu için Kruskal wallis varyans analizi yapıldı. $p < 0.05$ bulunması üzerine Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi yapıldı. $p < 0.02$ anlamlı kabul edildi. Doku histopatolojisi ile diğer parametreler arasında Spearman bağıntı analizi yapıldı (r_s , p , n).

Verilerin istatistiksel analizi ve grafik çizimi için SPSS 9.0 for windows paket programı kullanıldı (1).



5. BULGULAR:

İskemi, iskemi reperfüzyon ve ilaç uygulanan gruplarda sol böbrekte renk değişimi (açık kırmızı=normal böbrek, Kiremit kahverengisi=diğer gruplar) tespit edildi. Ancak bu renk değişimi arasında gruplarda gözle görülür bir fark yoktu.

5.A. Böbrek dokusundaki histolojik değişiklikler:

Sol böbreğin gerek ışık gerekse elektron mikroskopik incelemesinde, en şiddetli hasarın iskemi reperfüzyon uygulanan grupta (G3) olduğu tespit edildi. Uygulanan ilaçlar içinde en etkilisi sırayla melatonin, PGE1 ve Vit E olarak tespit edildi.

5.A.1. Işık mikroskop bulguları:

H-E ve PAS boyası uygulanmış kontrol gruplarında, böbrek dokusunun glomerül yapısı, bowman kapsülü ve aralığı, proksimal ve distal tübüller normal yapı gösteriyordu (Resim 1, 2).

İskemi grubunda, H-E ile boyamada, böbrek korteksinde bağ doku içerisinde ve glomerüllerde yaygın kanama alanları ve tübüller arasındaki yapıda genişlemeler görülmektedir (Resim 3). PAS ile boyamada ise, glomerül bazal membranının, yer yer bozulduğu gözlenmektedir (Resim 4).

İskemi-reperfüzyon (İ-R) grubunda, glomerül ve bağ dokusunda meydana gelen değişiklikler, daha da şiddetliydi. İskemik glomerül yapısı, bowman kapsül aralığında genişleme, PMNL hücre göçü, yaygın kanama alanları izlenmektedir. Tübüler yapılarda parçalanmalar izlenmektedir (Resim 5, 6). Aynı grupta PAS ile boyanmış böbrek dokusunda, glomerül bazal membran yapısında bozulmalar izlenmektedir (Resim 7). İ-R grubunda böbrek medullasında tübül yapılarındaki lümene düşen tübül hücreleri ve yapısal bozulmalar izlenmektedir. Tübül yapı aralarında da kanama alanları izlenmektedir (Resim 8, 9). 3'lü boyamada ise yine artmış kanama alanları izlenmektedir (Resim 10).

İskemi-reperfüzyon uygulanıp melatonin verilen grupta, glomerül ve tübül yapılarının İ-R grubuna göre oldukça iyi korunduğu gözlenmektedir (Resim 11). Aynı grupta PAS ile boyamada glomerül bazal membran ve proksimal ve distal tübül bazal membran yapılarının oldukça iyi korunduğu gözlenmektedir (Resim 12, 13). İ-R uygulanıp melatonin verilen grupta, 3'lü boyamada, tübüller yapıların

korunduğu, túbüller arası bağ dokuda az kanama alanları, bowman aralığında nisbeten az genişleme gözlenmektedir (Resim 14).

İ-R uygulanıp prostoglandin E₁ verilen grupta, glomerül ve túbüler yapıların düzensiz görünümlü olduğu, túbüler hücrelerin túbül lümenine döküldüğu seçilmektedir. Bağ dokuda yer yer genişlemeler mevcuttur (Resim 15). Aynı grupta, PAS boyası ile boyamada, glomerül bazal membranının yer yer koptuğu, túbüler hücrelerde bozukluklar ve ara bağ dokuda kanamalar izlenmektedir (Resim 16). Yine aynı grubun Masson Trikrom ile boyanmasında glomerül yapıları normal görünüme sahipken, túbüler yapılarda ara ara bozulmalar ve ara bağ dokuda kanama alanları gözlenmektedir (Resim 17).

İ-R uygulanıp E vitamini verilen grupta, glomerül yapısında ve túbüler yapılarda bozulmalar izlenmektedir. Yaygın kanama alanları mevcuttur. Túbül lümeninde yaygın vakuolize yapılar gözlenmektedir (Resim 18). Aynı grubun PAS ile boyamasında, glomerül bazal membranında yer yer kopmalar, túbül lümeninde yaygın vakuolize yapılar gözlenmektedir (Resim 19).

5.A.2. Elektronmikroskop bulguları:

Kontrol grubunda özelleşmiş filtrasyon rolü olan renal glomerül kapiller endotel hücreleri ve podosit uzantıları olan pedisellerin bazal lamina üzerine belirli aralıklarla yerleştiği görölmektedir. Pediseller arasında ve endotel hücreleri arasındaki açıklıklar normal yapıda izlenmektedir. Glomerül bazal laminası, ortada lamina densa her iki yanında lamina rara yer almaktadır (Resim 20, 21, 22).

İskemi grubunda glomerül kapillerlerin endotel hücreleri arasındaki porlar da herhangi bir değişiklik gözlenmedi. Yer yer glomerül bazal membranda incelmeler mevcut idi, podosit ve pedisellerde herhangi bir değişiklik yok idi (Resim 23). Kapiller endotel hücre çekirdeğinde kromatin yoğunlaşması izlenmekte idi (Resim 24). Glomerül kapillere yakın idrar kutbunda yer alan proksimal túbül hücrelerinin stoplazmasında mitokondri yoğunlaşması söz konusu idi. Mitokondrilerin düzensizleştiği daha yuvarlak gözlendiği ve kristalarının yer yer kaybolduğu izlenmekte idi. Proksimal túbül hücrelerinin bazal yüzeyindeki membran katlantılarında düzensizlikler izlenmekteydi. Mitokondri yoğunluğundan dolayı, normalde gözlenen diğer hücre organelleri ve sitoplazması net izlenemiyordu (Resim 25, 26).

İ-R grubunda glomerül kapiller yumakta mezenjiumda artış, glomerül bazal membran yapısında bozulmalar vardı. Pedisellerde yer yer düzensizleşmeler görölüyordu (Resim 27). Özellikle Lamina densa ve rara'nın yoğunluğunda farklılıklar vardı (Resim 28, 29). Proksimal tübül hücrelerinde mitokondrilerin oldukça yoğun olup sitoplazmada paketleniği gözlendi. Fırçamsı kenarda azalma ve boyunda kısalma gibi düzensizlikler izlendi. Proksimal tübül hücrelerinin hem apikal hem bazal yarısı düzensizlikler gösteriyordu. Özellikle bazal yarımında invajinasyonlarındaki düzensizlikler yapıya hakimdi. Bazal lamina yapısı da düzensizleşmişti ve hücrenin bazali gibi oldukça kalın olan bazal lamina yapısı invajinasyonlar gösteriyordu. Proksimal hücre çekirdeği heterokromatikti. Yer yerde hücrelerin bazal laminadan ayrıldığı gözlendi (Resim 30). Distal tübül hücresinde ise yine bazal membranda kalınlaşma mitokondrilerde yer yer krista kaybı ve şekillerinde yuvarlaklaşma izlenmekteydi. Hücrenin apikal yarımında sitoplazmada ve organellerde düzensizleşmeler ve miyelin figürler izlenmekteydi (Resim 31).

İ-R uygulanıp melatonin verilen grupta glomerül bazal membranın ara ara kalınlaşma göstermesine rağmen nisbeten kontrole yakın bir görünümde olduğu sadece aradaki mezenjial bağ dokuda az bir artış olduğu gözlendi. Pedisel yapıları oldukça düzgün izlendi. Kanlanmanın artmış olmasına bağlı olarak kapiller lümeninin eritrositlerle tamamen dolu olduğu gözlendi (Resim 32). Proksimal tübülde bazal laminanın nisbeten kalın olduğu hücre içinde kalan mitokondrilerin yuvarlak ve paketlenmiş olduğu gözlendi. Lizozomlarda artış izlendi. Hücre içindeki diğer organeller seçilemedi. Bazal ve apikal yüzeydeki düzensizlikler fazla değildi. Aynı şekilde fırçamsı kenarda normale yakın görünüm sergiledi. Mitokondrilerin nispeten krista yapılarını koruduğu gözlendi (Resim 33, 34).

İ-R uygulanıp PGE1 verilen grupta glomerül bazal membran yapısının bozuk olduğu gözlendi. Bazal membran üzerine oturmuş pedisel yapılarında düzensizlikler izlendi. Mezenjiumda bağ doku artışı var idi (Resim 35). Kapiller endotel yapısında bozukluklar ve pedisellerde düzensizlikler var idi (Resim 36). Proksimal tübülde yapısal değişikliklerin devam ettiği görüldü. Hücre içinde myelin figürler şekillenmişti. Özellikle hücrenin apikal yarımında artmış sayıda vakuoller gözlendi. Bazal membran yapısında kalınlaşma ve düzensizlik gözlendi (Resim 37).

İ-R uygulanıp E vitamini verilen grupta glomerül bazal membran yapısının oldukça kalınlaştığı, yapısında bozulmalar olduğu ve elektron yoğunluklarının değiştiği gözlemlendi. Glomerüller kapillerler eritrositlerle tamamen dolu idi. Mezenjial bağ doku artımı mevcut idi (Resim 38). Bazal membran yapısının oldukça bozuk olduğu gözlemlendi (Resim 39). Proksimal tübül hücresinin genel görünümü dejeneratif değişiklikler sergilemekteydi. Sitoplazmada çok sayıda vakuolize yapılar şekillenmişti. Çok sayıda irili ufaklı lizozomlar gözlemlendi. Miyelin figürleri izlendi. Bazal membran yapısı bozulmuştu. Paketlenmiş mitokondri yapılarının seyrekleştiği gözlemlendi (Resim 40).

Tablo II’de böbrekteki histolojik değişikliklerin ışık ve elektron mikroskopik görünümünün gruplar arasındaki karşılaştırması gösterildi.

Tablo II: Tüm grupların böbrek histolojisine ait ışık ve elektron mikroskopi sonuçları. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak belirtildi.

Parametre	G1(S)	G2(İ)	G3(İ-R)	P
Böbrek H+E (puan)	0.3 ± 0.5^3	1.4 ± 0.5^2	2.3 ± 0.5^1	*
Böbrek e'm (puan)	0.4 ± 0.5^5	7.4 ± 1.5^2	11.3 ± 0.8^1	*
	G4	G5	G6	P
Böbrek H+E (puan)	0.4 ± 0.5^3	1 ± 0.5^3	1.5 ± 0.5^2	*
Böbrek e'm (puan)	1.8 ± 0.7^4	4.4 ± 1.1^3	7 ± 1.4^2	*

*= $p < 0.05$, Kruskal Wallis Varyans Analizi.

Not: Aynı satırdaki farklı rakamlar, ikili karşılaştırmalarda ortalamalar arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir ($p < 0.02$, Mann Whitney U Testi). Rakamlandırmada ortalamalar küçükten büyüğe doğru sıralandı.

Tabloda görüldüğü gibi iskemi böbrekte olumsuz yönde etki ederken, iskemi-reperfüzyon bu hasarı daha da artırmaktadır (Resim1-10). Antioksidan kullanımı, özellikle melatonin en etkili bulunurken, PGE1 ikinci sırada etkili bulundu. Vit. E en az etkili bulundu (Resim11-19).

5.B. Lipid Peroksidasyon Ürünleri:

Lipid peroksidasyonunun doku ve plazmadaki son ürünü malondialdehitdir. Doku ve plazma MDA düzeyi dokudaki hipoksik hasara bağlı olarak artar. İ-R

grubunda gerek doku gerekse plazma MDA düzeyleri en yüksek iken, melatonin grubunda, ilginç olarak bu değerler Sham grubundan dahi az bulunmuştur.

Tablo III'de doku ve plazma MDA düzeylerinin tüm gruplar arasındaki karşılaştırmaları gösterildi.

Tablo III: Tüm grupların doku ve plazma MDA düzeylerine ait sonuçlar. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak belirtildi.

Parametre	G1(S)	G2(İ)	G3(İ-R)	P
Doku MDA (nmol/g.yaş doku)	22 $\pm$ 4 ⁵	33 $\pm$ 2 ³	98 $\pm$ 10 ¹	*
Plazma MDA (nmol/L)	1.8 $\pm$ 0.3 ⁴	2.7 $\pm$ 0.4 ²	3.6 $\pm$ 0.5 ¹	*
	G4 (M)	G5 (PG)	G6 (VE)	P
Doku MDA (nmol/g.yaş doku)	21 $\pm$ 1.4 ⁵	25 $\pm$ 1.6 ⁴	48 $\pm$ 8.9 ²	*
Plazma MDA (nmol/L)	1.7 $\pm$ 0.2 ⁴	2 $\pm$ 0.14 ³	2.3 $\pm$ 0.1 ²	*

*= $p < 0.05$, Kruskall Wallis Varyans Analizi.

Not: Aynı satırdaki farklı rakamlar, ikili karşılaştırmalarda ortalamalar arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir ($p < 0.02$, Mann Whitney U Testi). Rakamlandırmada ortalamalar küçükten büyüğe doğru sıralandı.

5.C. Antioksidan savunma sistemine ait biyokimyasal parametreler:

Antioksidan savunma sistemine ait olan eritrosit SOD ve GSH-Px düzeyleri yine İskemi-Reperfüzyon grubunda anlamlı olarak düşük bulundu. İlginç olarak Vit E grubunda GSH-Px değerlerinin Sham grubuna çok yakın olduğu tespit edildi. Ancak SOD üzerine en etkili ilaç yine melatonin olarak tespit edildi. Tablo III'de eritrosit SOD ve GSH-Px düzeylerinin tüm gruplar arasındaki karşılaştırmaları gösterildi.

Tablo IV: Tüm grupların eritrosit SOD ve GSH-Px düzeylerine ait sonuçlar. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak belirtildi.

Parametre	G1	G2	G3	P
SOD (IU/gHb)	2542 $\pm$ 109 ¹	2001 $\pm$ 108 ²	1357 $\pm$ 117 ⁴	*
GSH-Px (IU/gHb)	7.3 $\pm$ 0.5 ¹	6.1 $\pm$ 0.7 ²	3.7 $\pm$ 0.4 ³	*
	G4	G5	G6	P

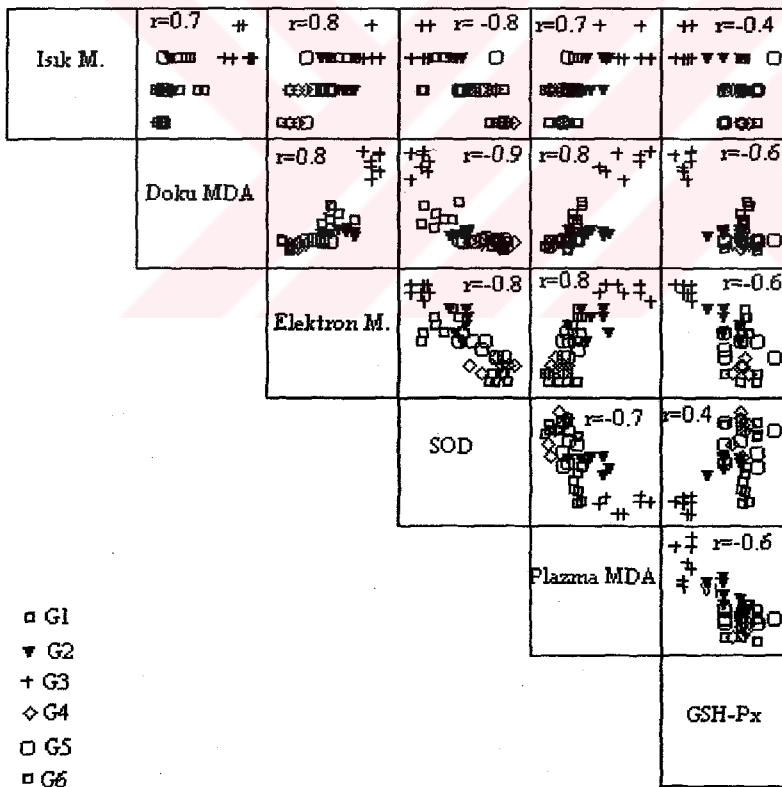
SOD (IU/gHb)	2514±241 ¹	2271±256 ¹	1625±216 ³	*
GSH-Px (IU/gHb)	7±0.3 ¹	7.1±1.2 ¹	7.3±0.2 ¹	*

*= $p<0.05$, Kruskal Wallis Varyans Analizi.

Not: Aynı satırdaki farklı rakamlar, ikili karşılaştırmalarda ortalamalar arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir ($p<0.02$, Mann Whitney U Testi). Rakamlandırmada ortalamalar küçükten büyüğe doğru sıralandı.

5.D. Doku histolojisi ile diğer parametreler arasındaki Spearman Bağntı analizi:

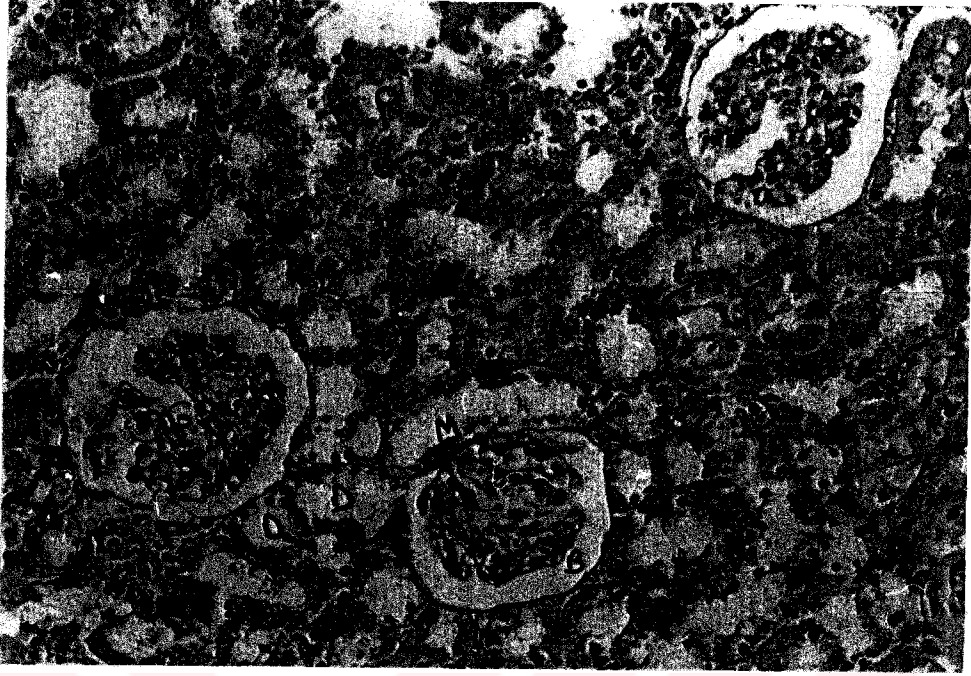
Sperman bağıntı analizinde böbrek histolojisi (ışık M) ile Süperoksit dismutaz arasında (-) bağıntı ($r=-0.8$, $p=0.000$, $n=42$), doku/plazma Malondialdehit düzeyi arasında (+) bağıntı ($r=+0.7$, $p=0.000$, $n=42$), glutasyon peroksidaz arasında (-) bağıntı ($r=-0.4$, $p=0.000$, $n=42$) saptandı. Tüm bu parametreler arasındaki bağıntılar ise Matriks bağıntı grafiği ile Şekil 5’de gösterildi.



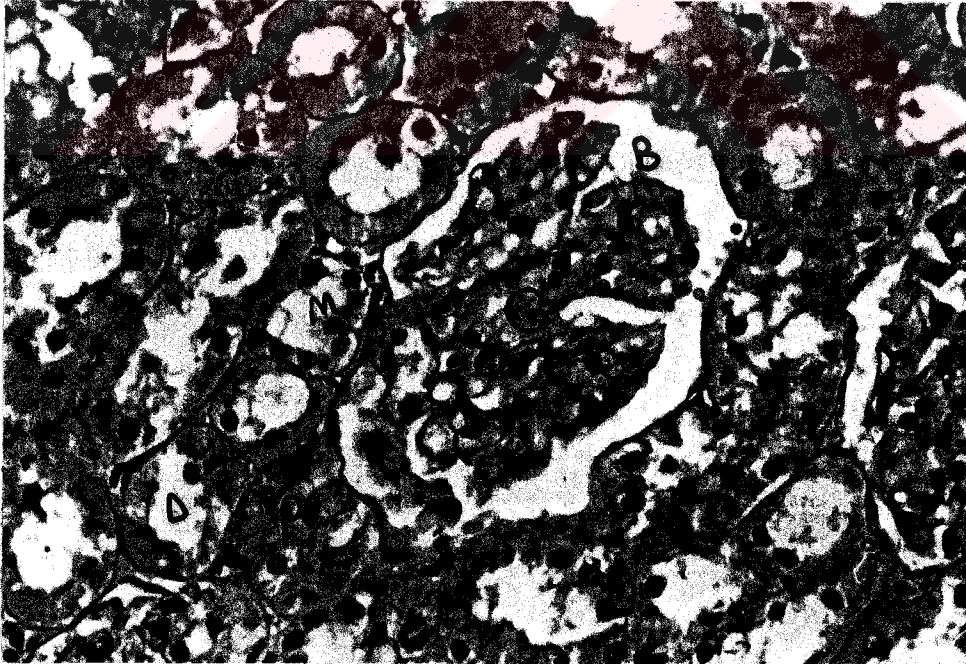
Şekil 5. Doku histolojisi ile diğer parametreler arasındaki Sperman bağıntı analizi.

5.E. IŞIK ve ELEKTRON MİKROSKOBİK GÖRÜNÜMLERE AİT RESİMLER:**5.E.1. Işık mikroskopik görüntümlere ait resimler:****5.E.2. Elektron mikroskopik görüntümlere ait resimler:**

Işık mikroskopik görünümlere ait resimler



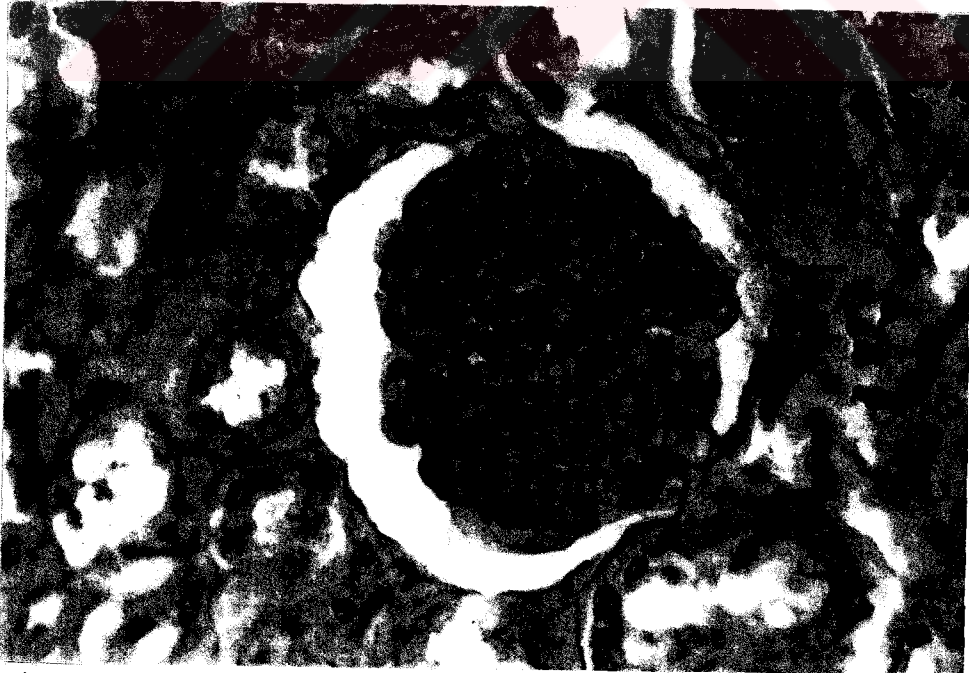
Resim 1: Kontrol (sham) grubuna ait böbrek dokusu. G: Glomerül. B: Bowman aralığı. M: Makula densa. P: Proksimal tübül. D:Distal tübül. H.E. X 20.



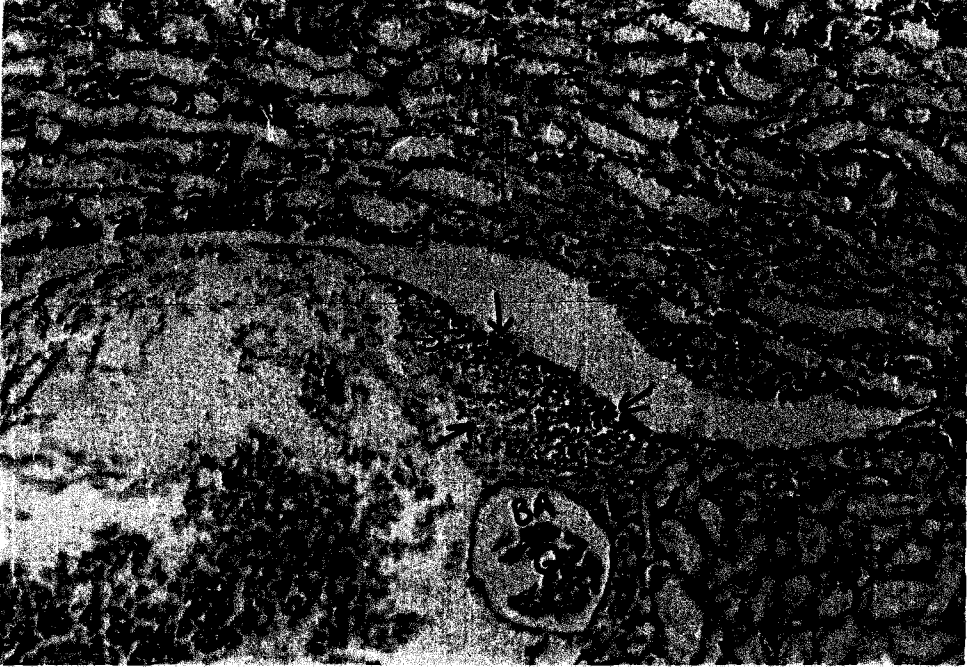
Resim 2: Kontrol (sham) grubuna ait böbrek dokusu. G: Glomerül. B: Bowman aralığı. M: Makula densa. P: Proksimal tübül. D:Distal tübül. PAS. X 40.



Resim 3: İskemi grubunda böbrek korteksi bağ dokusu içerisinde ve glomerül yapısında yaygın kanama alanları izlenmektedir. GK: Glomerül kanama alanları. BK: Bağ dokudaki kanama alanları. D: Distal tübül. T: Tübül arasında genişlemeler (Ok). H.E. X 40.



Resim 4: İskemi grubunda PAS'la boyamada Bowman kapsülü Bazal membranının bazı alanlarda bütünlüğünün bozulmaya başladığı gözlenmektedir (Ok). PAS. X 40.



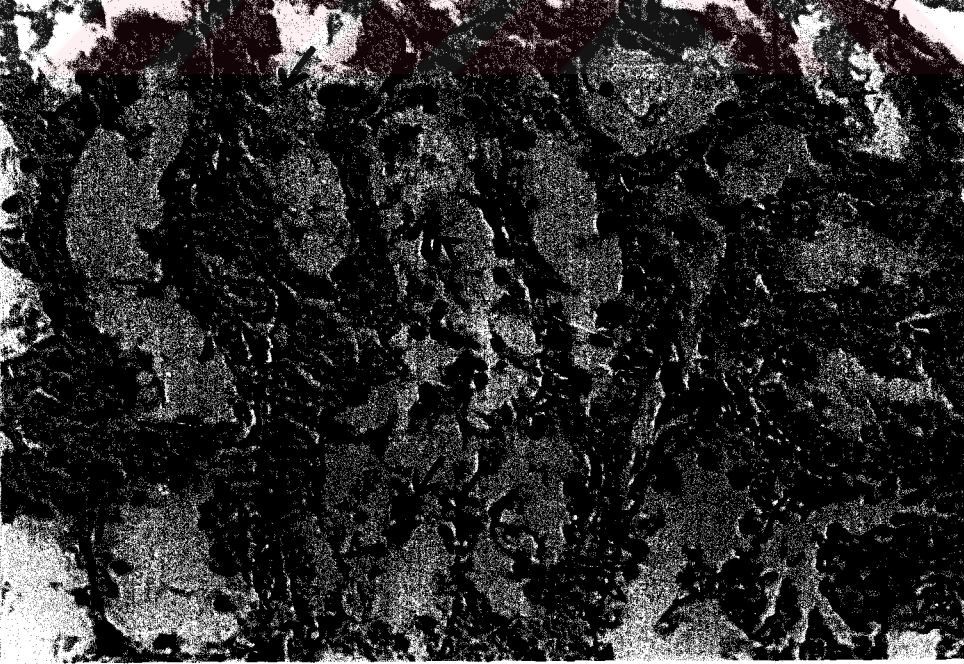
Resim 5: İskemi- Reperfüzyon grubunda, glomerül (G) yapısının iskemik olduğu Bowman aralığının (BA) genişlediği ve ara bağ dokuya polimorfonükleer hücrelerin infiltrate olduğu gözlenmektedir (oklar). T: Tübüller arası artmış kanama alanları. H.E. X 10.



Resim 6: İskemi-Reperfüzyon grubunda, tübüler yapıda bozulmalar (çift ok) polimorfonükleer hücre göçü (ok) izlenmektedir. H.E. X 40.



Resim 7: İskemi-Reperfüzyon grubunda, glomerül bazal membran yapısında bozulmalar izlenmektedir (Oklar). PAS. X 40.



Resim 8: İskemi-Reperfüzyon grubunda, böbrek medullasında tübül yapılarındaki lümene düşen tübül hücreleri ve yapısal bozulmalar izlenmektedir. (Oklar). H.E. X 40.



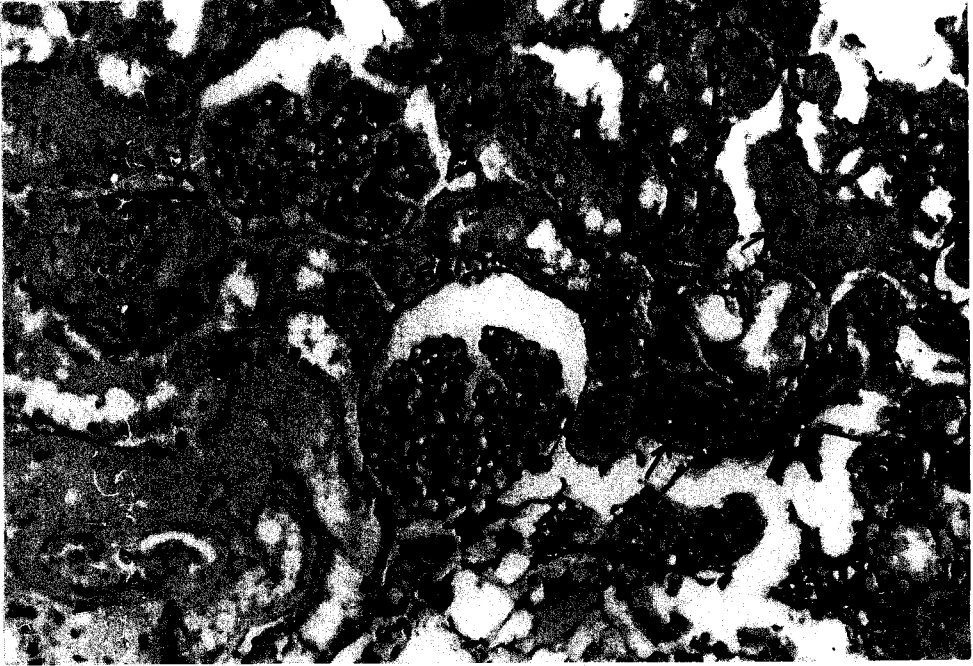
Resim 9: İskemi-Reperfüzyon grubunda, tübül yapı aralarında da kanama alanları izlenmektedir (Oklar). H.E. X 40.



Resim 10: İskemi-Reperfüzyon grubunda, üçlü boyama ile ara bağ dokudaki artmış kanama alanları izlenmektedir (Oklar). Masson Trikrom X 40.



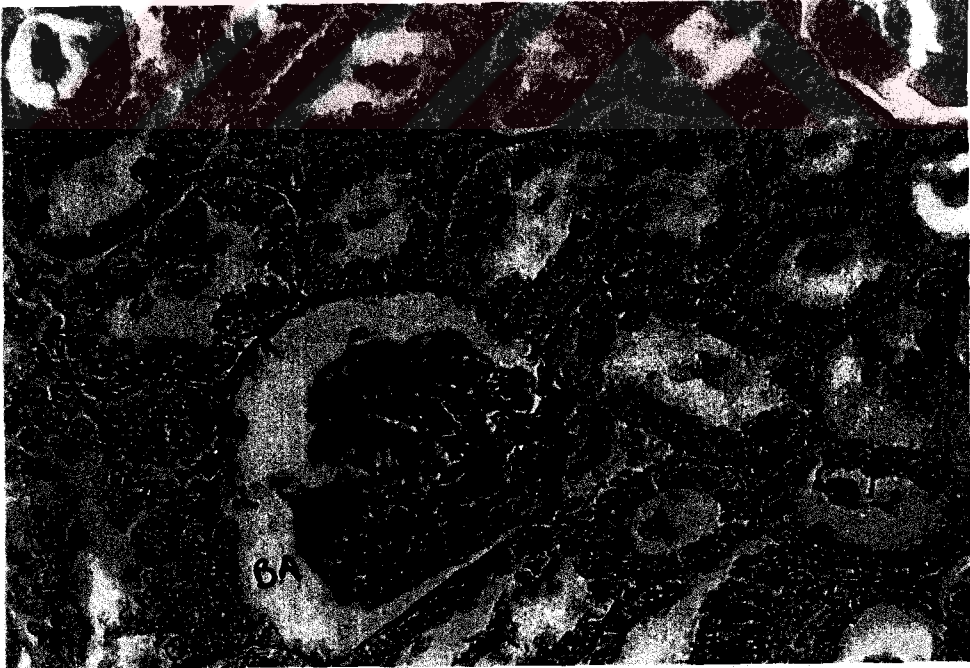
Resim 11: İskemi-Reperfüzyon uygulanıp melatonin verilen grupta, glomerül (G) ve tübül yapılarının iskemi-reperfüzyon grubuna göre oldukça iyi korunduğu gözlenmektedir (Oklar). H.E. X 40.



Resim 12: İskemi-reperfüzyon uygulanıp melatonin verilen grupta, glomerül bazal membran (GBM) ve tübül bazal membran yapılarının oldukça iyi korunduğu gözlenmektedir (Oklar). PAS. X 20.



Resim 13: İskemi-reperfüzyon uygulanıp melatonin verilen grupta, glomerül bazal membran (GBM) ve tübül bazal membran yapılarının oldukça iyi korunduğu gözlenmektedir. (Oklar). PAS. X 40.



Resim 14: İskemi-Reperfüzyon uygulanıp melatonin verilen grupta, Masson Trikrom boyamada, tübüller yapıların korunduğu (T), tübüller arası bağ dokuda az kanama alanları (oklar), Bowman aralığında (BA) nisbeten az genişleme gözlenmektedir. Masson Trikrom. X 40.



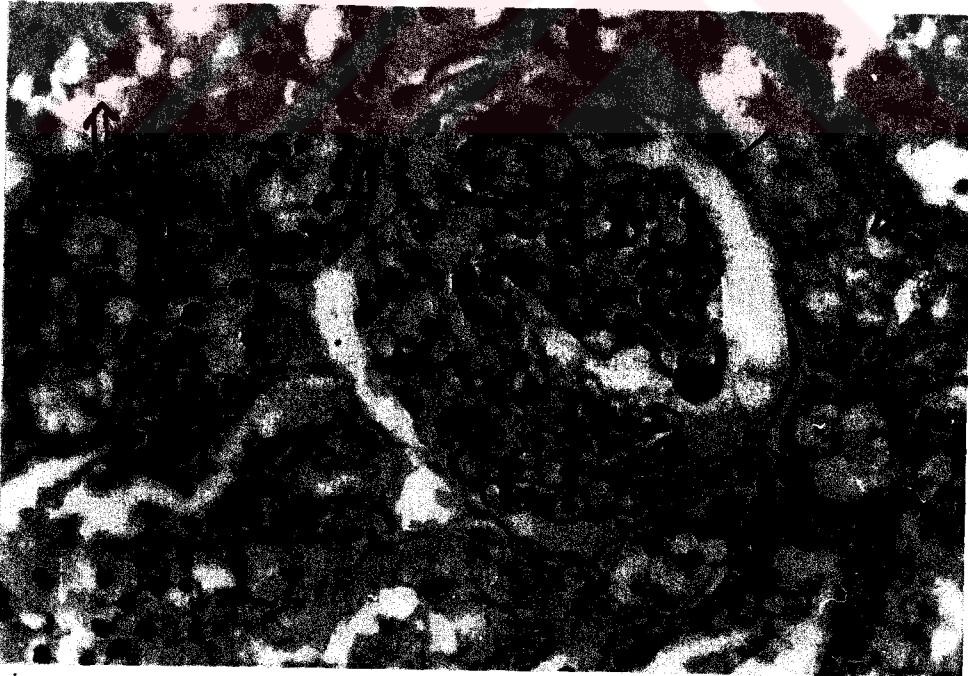
Resim 15: İskemi-Reperfüzyon uygulanıp PGE_1 verilen grupta, glomerül (G) ve tübüler yapıların (T) düzensiz görünümlü olduğu, tübüler hücrelerin tübül lümenine (TL) döküldüğü seçilmektedir. H.E. X 40.



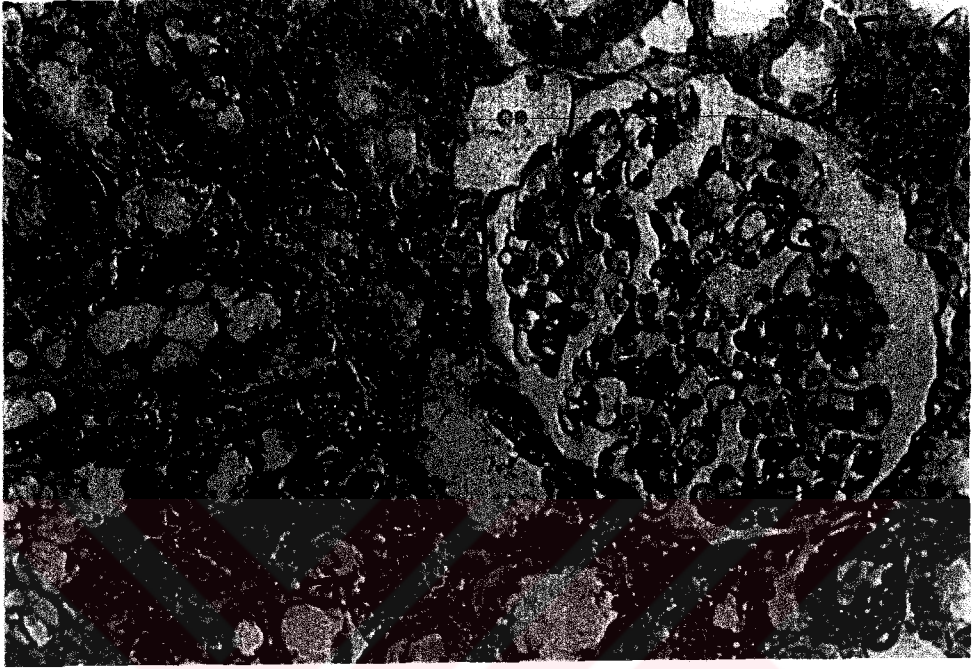
Resim 16: İskemi-Reperfüzyon uygulanıp PGE_1 verilen grupta, PAS boyası ile boyamada, glomerül bazal membranının (BM) yer yer koptuğu, tübüler hücrelerde bozukluklar (T) ve ara bağ dokuda kanamalar izlenmektedir (Oklar). PAS. X 40.



Resim 17: İskemi-Reperfüzyon uygulanıp E vitamini verilen grupta, glomerül yapısında (G) ve tübüler yapılarda (T) bozulmalar izlenmektedir. Yaygın kanama alanları (Ok) mevcuttur. Tübül lümeninde yaygın vakuolize yapılar (çift oklar) gözlenmektedir. H.E. X 40.



Resim 18: İskemi-Reperfüzyon uygulanıp E vitamini verilen grubun, glomerül bazal membranında kalınlaşmalar (oklar), tübül lümeninde yaygın vakuolize yapılar (çift oklar) gözlenmektedir. PAS. X 40.



Resim 19: İskemi-Reperfüzyon uygulanıp E vitamini verilen grupta glomerül yapısı (G) normal, tübüler yapılarda (T) değişiklikler ve ara bağ dokuda kanama alanları gözlenmektedir (Oklar). Masson Trikróm. X 40.

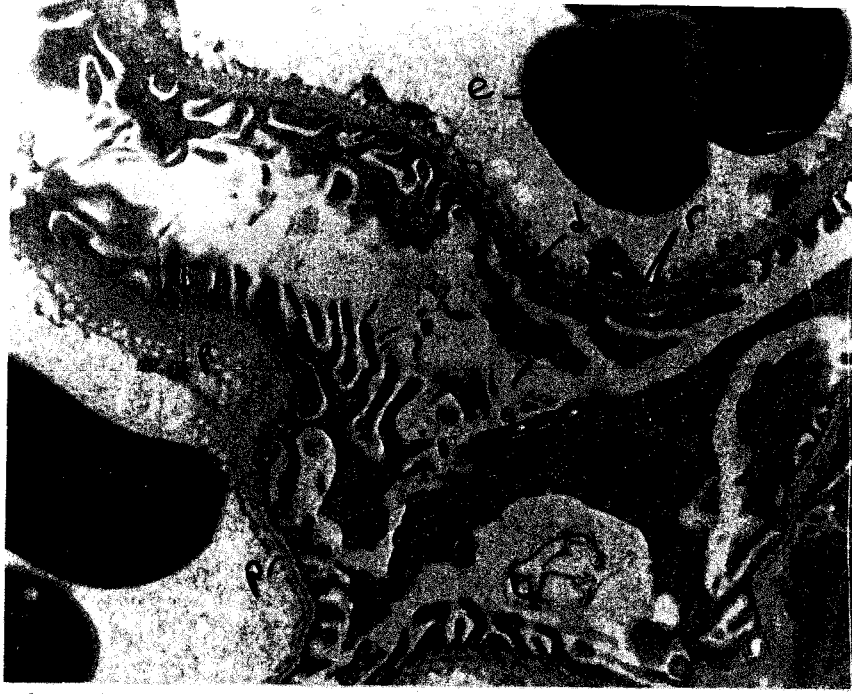
Elektron mikroskopik görünümlere ait resimler



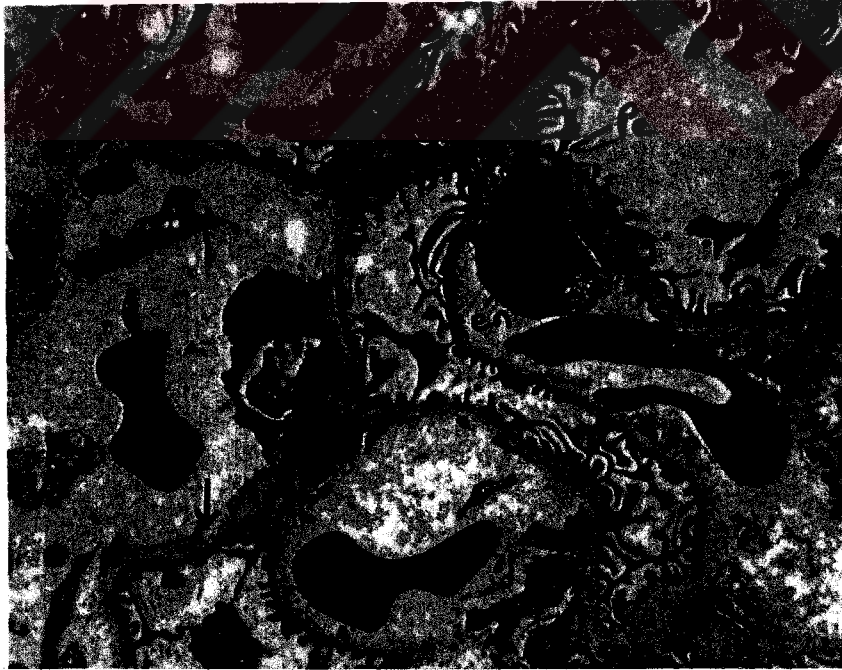
Resim 20: Sham (kontrol) grubuna ait böbrek glomerül yapısının elektron mikroskopik görünümü. Glomerüler kapillerler (k) ,podosit (po) ve kapiller endotelini çevreleyen bazal lamina üzerine oturan pediseller izlenmektedir (pe). Kapiller endotelium (ke), eritrosit (e), endotel hücresi (eh), bazal lamina (BL), filtrasyon yarıkları (oklar). Kurşun sitrat- Uranil astetat boyası. X 3000.



Resim 21: Sham (kontrol) grubuna ait böbrek glomerül yapısının elektron mikroskopik görünümü. Glomerüler bazal laminası ortada lamina densa (d) her iki tarafında lamina raralar (r) seçilmekte. Pediseller arasındaki filtrasyon yarıkları (oklar), eritrosit (e). Kurşun sitrat- Uranil astetat boyası. X 7000.



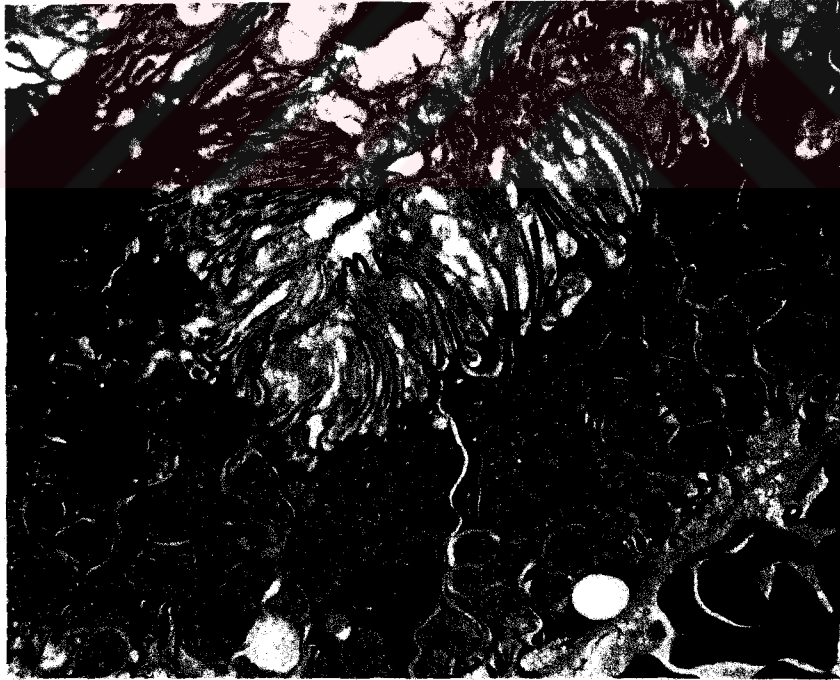
Resim 22: Sham (kontrol) grubuna ait böbrek glomerül yapısının elektron mikroskopik görünümü. Glomerüler bazal lamina, ortada lamina densa (d) her iki tarafında lamina raralar (r) seçilmekte. Pediseller arasındaki filtrasyon yarıkları, (oklar) ve endotele ait porlar (p) görülmektedir. Kurşun sitrat- Uranil astetat boyası. X 12000.



Resim 23: İskemi grubu: Glomerül bazal membranında yer yer bozulmalar mevcuttu (Ok). Pedisellerde (pe) herhangi bir değişiklik yoktu. Endotel (en). Kurşun sitrat- Uranil astetat boyası. X 3000.



Resim 24: İskemi grubundaki böbrek dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Kapiller endotel hücre çekirdeğinde (ç) kromatin yoğunlaşması (kr) izlenmekte. Kurşun sitrat- Uranil astetat boyası. X 7000.



Resim 25: İskemi grubundaki böbrek dokusunun elektron mikroskopik görünümü.: Proksimal tübül hücrelerinin sitoplazmasında belirgin mitokondri yoğunlaşması izlenmektedir. Mitokondrilerin (mi) düzensizleştiği yuvarlak gözlendiği ve kristallerinin yer yer kaybolduğu izlendi.(Oklar), mikrovillüs (mv), lizozom (L), eritrosit (e). Kurşun sitrat- Uranil astetat boyası. X 3000.



Resim 26: İskemi grubundaki böbrek dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Proksimal tübül hücresinin bazal yüzeyindeki membran katlantıları düzensiz gözlenmektedir. (oklar). Kurşun sitrat-Uranil astetat boyası. X 7000.



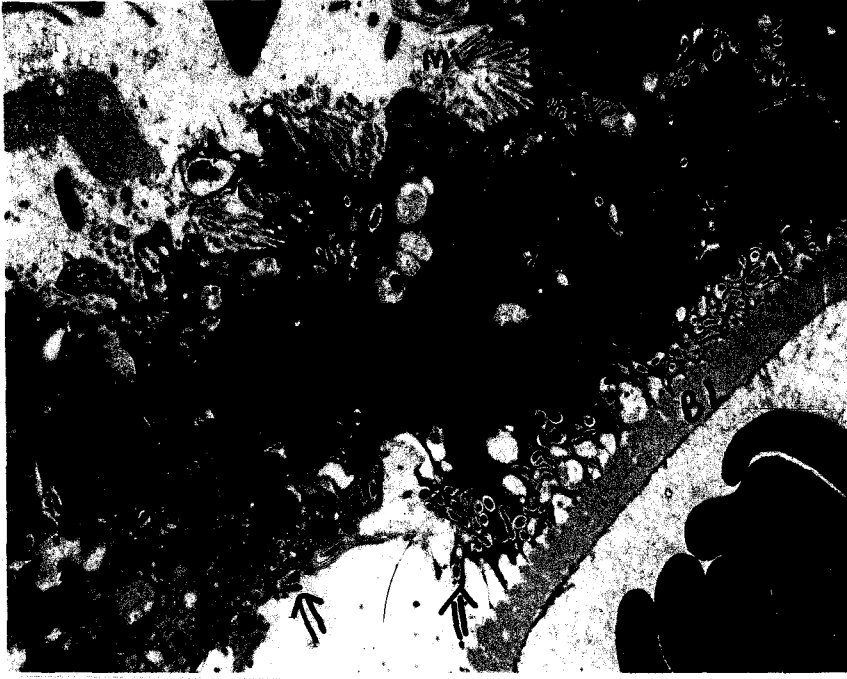
Resim 27: İskemi reperfüzyon grubundaki böbrek dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Mezengiumda (m) artış (oklar), glomerüler bazal membran yapısında bozulmalar izlenmektedir. (çift ok). Mezengial hücre (mh), endotel (en). Kurşun sitrat-Uranil astetat boyası. X 3000.



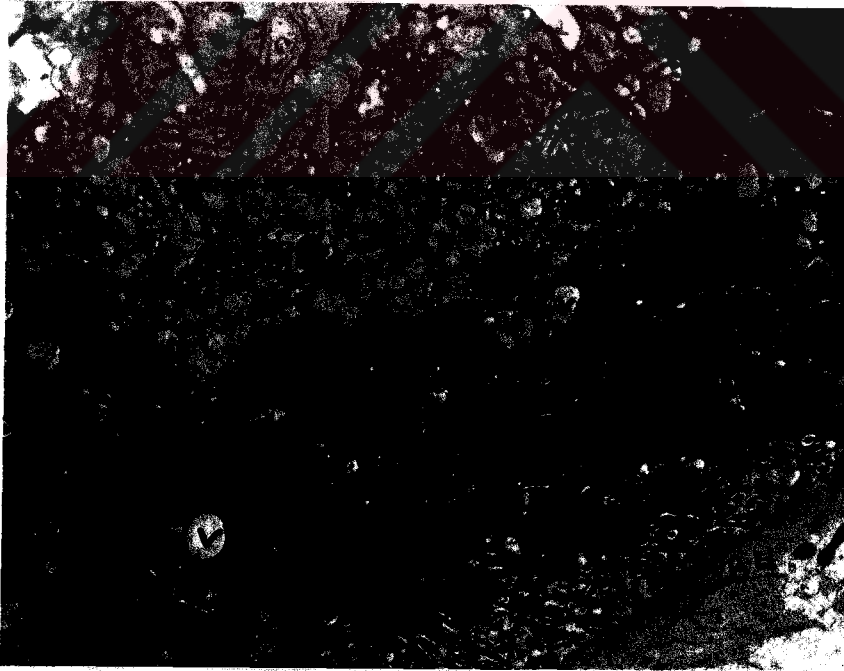
Resim 28: İskemi reperfüzyon grubundaki böbrek dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Özellikle lamina densa ve raranın yoğunluğunda farklılıklar belirgin olarak seçilmektedir (oklar). Pedisellerde (pe) yer yer düzensizleşmeler dikkati çekmektedir. Kurşun sitrat- Uranil astetat boyası. X 7000.



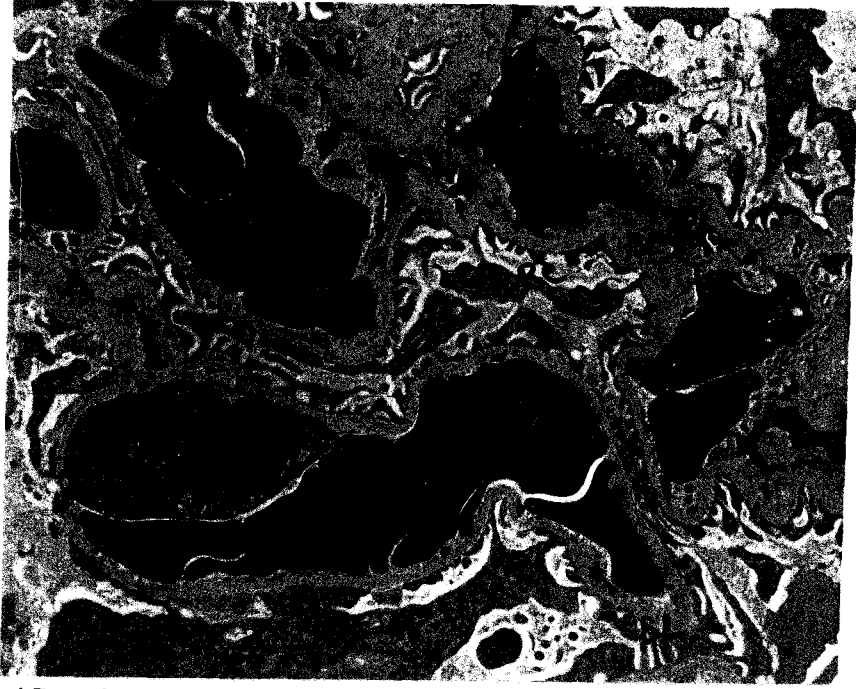
Resim 29: İskemi reperfüzyon grubundaki böbrek dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Özellikle lamina densa ve raranın yoğunluğunda farklılıklar vardı.(oklar). Kurşun sitrat- Uranil astetat boyası. X 12000.



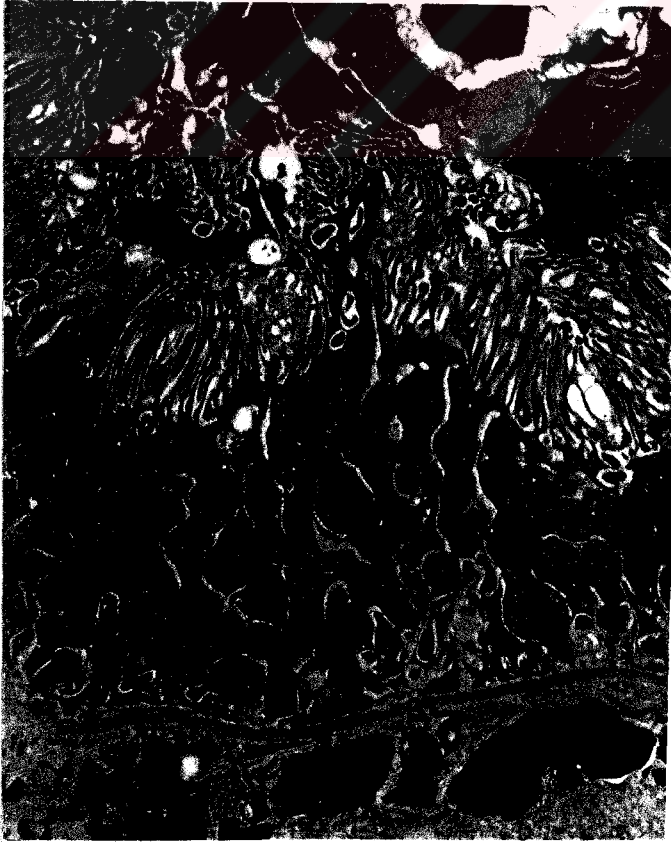
Resim30: İskemi reperfüzyon grubundaki böbrek dokusunun elektron mikroskopik görünümü . Mikrovillus yapısında azalma (mv) ve boyunda kısalma gibi düzensizlikler izlenmektedir. Bazal lamina (BL) düzensizliği dikkati çekmektedir. Hücre çekirdeği (ç) heterokromatiktir, yer yer hücrenin bazal laminadan ayrıldığı izlenmektedir. (çift ok), lizozom (l). Kurşun sitrat- Uranil asetat boyası. X 3000.



Resim 31: İskemi reperfüzyon grubundaki böbrek dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Proksimal tübül hücresinde bazal laminada (BL) kalınlaşma, sitoplazmada mitokondrilerde yer yer krista kaybı ve şekillerinde yuvarlaklaşmalar (oklar), miyelin figürler (çift ok), lizozom (L) ve vakuolize (v) yapılar gözlenmektedir. Kurşun sitrat- Uranil asetat boyası. X 4400.



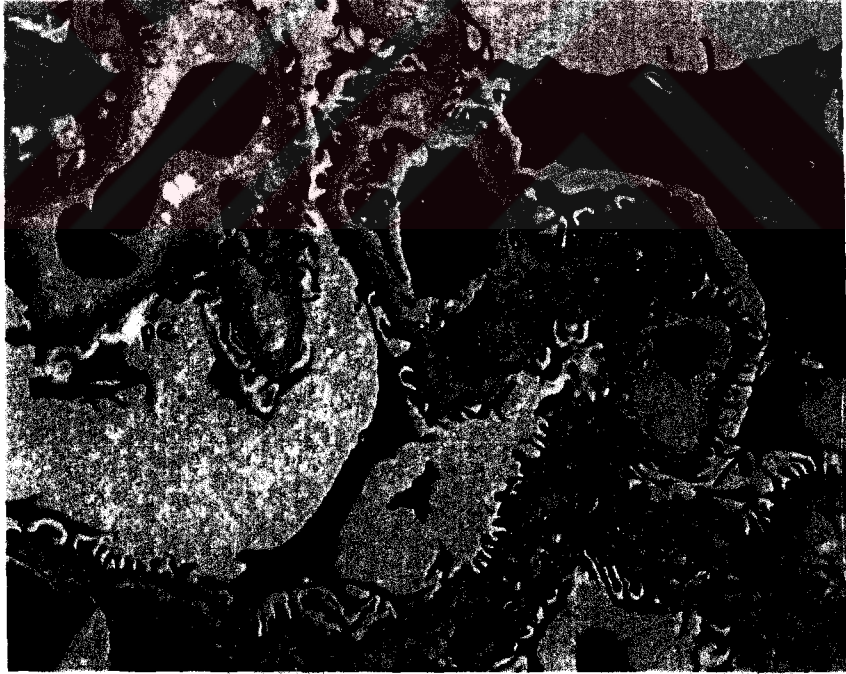
Resim 32: İskemi-Reperfüzyon uygulanıp melatonin verilen böbrek dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Glomerüler Bazal Lamina (BL) ara ara kalınlaşma göstermesine rağmen kontrole yakın bir görünüm sergilemektedir. Pedisel (pe) yapıları oldukça düzgündü. Kanlanmanın artması nedeniyle kapiller lümenin tamamen eritrositlerle (e) dolu olduğu gözlenmektedir. Endotel hücresi (en). Kurşun sitrat- Uranil astetat boyası. X 3000.



Resim 33:
İskemi-Reperfüzyon uygulanıp melatonin verilen böbrek dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Bazal laminada (BL) orta şiddette kalınlaşma mevcuttur. Proksimal tübülde sitoplazmadaki mitokondri-lerin (mi) yuvarlak şekilli ve oldukça yoğun olduğu izlenmektedir. Mikrovilluslar (mv) normale yakın görülmektedir. Lizozomlarda (L) artış izlenmektedir Kurşun sitrat- Uranil astetat boyası. X 3000.



Resim 34: İskemi-Reperfüzyon uygulanıp melatonin verilen böbrek dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Bazal laminada (BL) orta şiddette kalınlaşma mevcuttu. Proksimal tübülde mitokondrilerin (mi) yuvarlak ve paketlenmiş olduğu izlenmektedir. Mitokondrilerin nispeten krista yapılarına sahip olduğu gözlenmektedir. Mikrovilluslar (mv) normale yakın görülmekteydi. Lizozom (L). Kurşun sitrat- Uranil astetat boyası. X 7000.



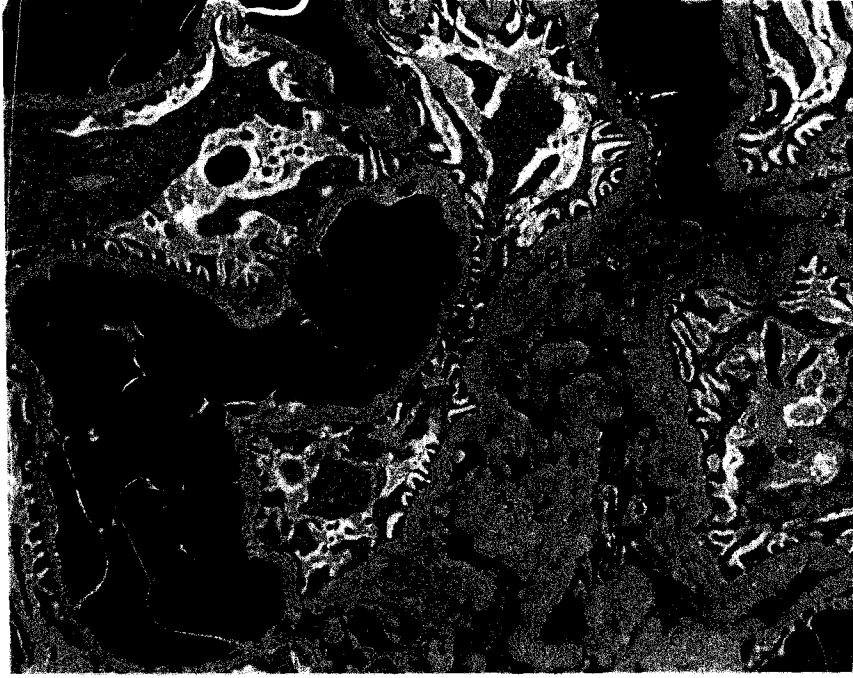
Resim 35: İskemi-Reperfüzyon uygulanıp PGE₁ verilen böbrek dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Bazal lamina (BL) yapısının bozuk olduğu gözlenmektedir. Pedisellerde (pe) düzensizlikler izlenmektedir. Mezengiumda artış mevcuttur. Oklar). Eritrosit (e). Kurşun sitrat-Uranil astetat boyası. X 3000.



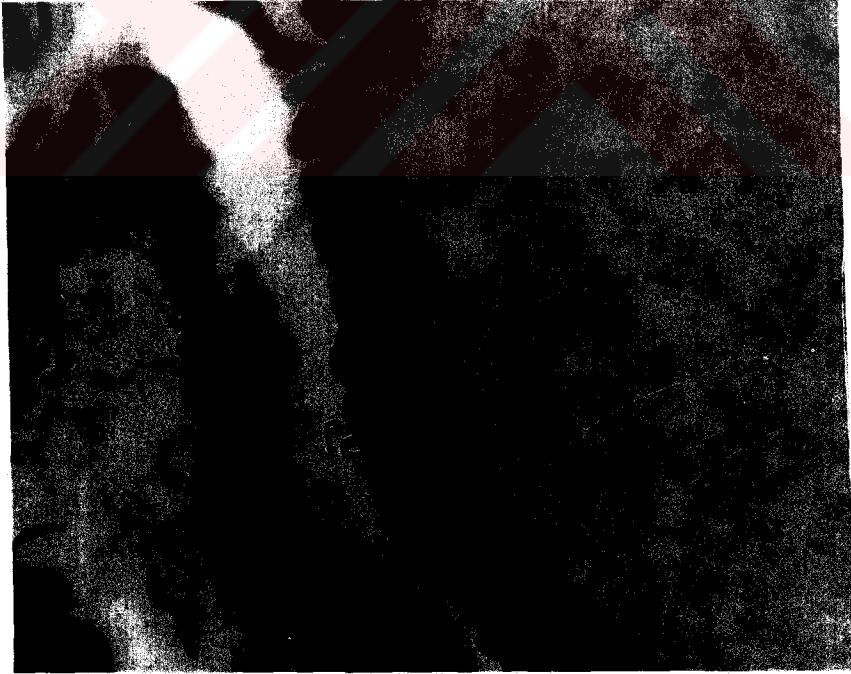
Resim 36: İskemi-Reperfüzyon uygulanıp PGE_1 verilen böbrek dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Kapiller endotelde (en) ve pedisellerde (pe) düzensizlikler mevcuttur. Kurşun sitrat-Uranil astetat boyası. X 4400.



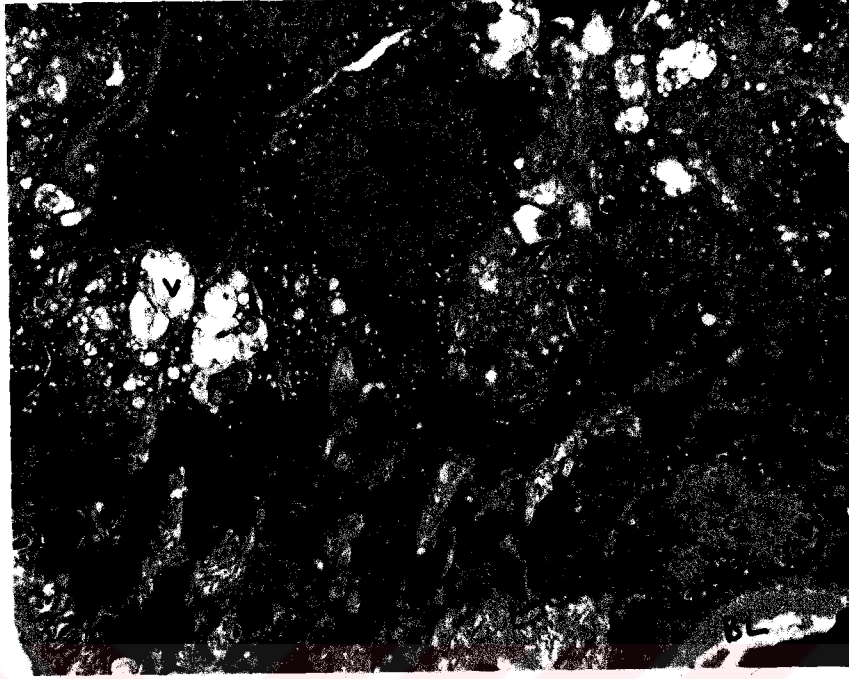
Resim 37: İskemi-Reperfüzyon uygulanıp PGE_1 verilen böbrek dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Bazal lamina (BL) yapısında kalınlaşma ve düzensizlik mevcuttur. Özellikle hücrenin apikal yarımında artmış sayıda vakuoller (v) gözlenmektedir. Proksimal tübülde hücre içinde miyelin figür (çift ok) izlenmektedir. Hücre sitoplazması içine doğru yer değiştiren mikrovillus yapıları dikkat çekmektedir. Kurşun sitrat- Uranil astetat boyası. X 7000.



Resim 38: İskemi-Reperfüzyon uygulanıp E vitamini verilen böbrek dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Glomerüler bazal lamina (BL) yapısı yer yer düzensiz görülmektedir. Glomerüler kapiller yapısı eritrositlerle (e) tamamen dolu görünmektedir. Mezengial bağ doku artışı mevcuttur (Okklar). Kurşun sitrat- Uranil astetat boyası. X 3000.



Resim 39: İskemi-Reperfüzyon uygulanıp E vitamini verilen böbrek dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Bazal lamina (BL) ve pedisel (pe) yapılarının oldukça düzensiz olduğu gözlenmektedir. Kurşun sitrat- Uranil astetat boyası. X 12000.



Resim 40: İskemi-Reperfüzyon uygulandı E vitamini verilen böbrek dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Bazal lamina (BL) yapısı düzensiz ve kalın görünmektedir. Proksimal tübül sitoplazmasında çok sayıda vakuoller (v), irili ufaklı lizozomlar (L) mitokondrial (mi) yapılar izlenmektedir. Proksimal tübül çekirdeği (ç), miyelin figür (çift ok). Kurşun sitrat- Uranil astetat boyası. X 3000.

6. TARTIŞMA:

Ratlarda deneysel olarak oluşturduğumuz böbrek iskemi ve reperfüzyon hasarında hasarlanmayı azaltmak için, (gerek histolojik, gerek biyokimyasal inceleme sonuçlarında) sırasıyla antioksidan olarak melatonin, PGE₁ ve E vitamininin etkili olduğu tespit edildi. Bu nedenle böbrek iskemi reperfüzyon olaylarında ilk tercih melatonin olabilir kanaatindeyiz.

Çalışmamızda, oksidan sistemin belirteçleri olarak doku ve plazma MDA düzeyleri, antioksidan savunma sistemin belirteçleri olarak eritrosit SOD ve GSH-Px düzeyleri incelenmiştir. Çalışmamız bu yönüyle orjinaldir

Alvarez A. Ve ark.(3) , tavşanlarda deneysel iskemik akut renal yetmezlik oluşturup verapamilin koruyucu etkisi olup olmadığını, fonksiyonel, histolojik ve ultrastrüktürel olarak incelemişler ve renal iskemi uyguladıkları grupta, proksimal tübül hücrelerinde deskuamasyon, fırçamsı kenarda bozulma saptamışlardır. Biz de iskemi uyguladığımız grupta, fırçamsı kenarda bozulma saptadık. Bulgularımız uyumludur.

İskemik böbrekteki glomerül epitel hücrelerinin ektronmikroskop yapısı üzerine incelemeler bir saatlik iskemi sonrasında, glomerül epitel hücre yüzeyinde orta dereceli şişme ve düzgün olan hücre yüzeyinde bozulmaların mevcut olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (94). Biz de glomerül yapılarının bozuk olduğunu izledik Mel'man EP ve ark. (48) yaptıkları deneysel çalışmada ratlarda akut iskemide, glomerül, parankim ve kapillerlerdeki ultrastrüktürel değişiklikleri incelemişler, kapiller de bazal laminanın genişlediğini, düzensizleştirdiğini, podosit yapılarının deforme olduğunu, fırçamsı kenarın bazı alanlarda kaybolduğunu, mitokondrinin şiştiğini ve kristallarının paralelliklerini kaybederek azaldığını saptamışlardır. Biz de iskemi grubunda, kapiller bazal laminada genişlemeler, mitokondrilerde şişme, yuvarlak görünüm alma ve kristalarında düzensizlik (Resim 6) saptadık. Bulgularımız uyumludur.

Povalii TM ve ark.(58) yaptıkları deneysel çalışmada, iskemi-reperfüzyon sırasında nefrondaki değişiklikleri ve ayrıca kadavradaki durumunu incelemişler, kadavrada organ otolizi sırasında, tübüler epitel hücreindeki mitokondrinin yapısındaki karakteristik değişiklikler ve intrasellüler ödem gözlenmiş iken, deneysel iskemi sırasında intrasellüler ödem, lizozomlarda belirgin değişiklikler ve

mitokondrilerde şişme tespit etmişlerdir. Biz de iskemi sırasında mitokondrilerde şişme ve lizozomlarda yoğunlaşmalar gözledik.

Yine yapılan bir çalışmada, 30, 60 ve 180 dakikalık iskemi ile 3 ve 30 günlük reperfüzyon uygulaması sonucu ultrastrüktürel olarak arteriyol duvarında yıkıcı değişiklikler gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda da damar duvarında değişiklikler, endotel hücre çekirdeğinde kromatin yoğunlaşması mevcuttu (72).

Venkatachalam MA ve ark. (90) yaptıkları çalışmada, ratların sol böbreklerine 25 dakika iskemi uygulamış ve elektronmikroskopta, proksimal tübül fırçamsı kenarda, mikrovilluslarda düzensizlik, birbirine yapışma ve iskemi sonrası reperfüzyonda, proksimal tübül hücre sitoplazması içine doğru yerdeğiştirmeler gözlemişlerdir. Biz de çalışmamızda, iskemi sonrasında proksimal tübülde, mikrovilluslarda düzensizlikler, birbirine yapışma, proksimal tübül hücre sitoplazması içerisine doğru yer değiştirmeler gözledik.

Benitez-Bribiesca L.(9) ve ark. kısa süreli renal iskemiyi takiben uygulanan reperfüzyon fazında mitokondrideki değişiklikleri moleküler, biyokimyasal ve morfolojik olarak incelemişlerdir. Tek taraflı olarak 60 dakika süreyle bağladıkları sıçan renal arterini, sonra belirli sürelerle reperfüze etmişler, 120 dakikalık reperfüzyon sonrası, mitokondride şişme, iç ve dış zarında yırtılma ve mitokondrial matriksin sitoplazmaya dağılmasını saptamışlar. Böylece çalışmalarında, erken iskemi-reperfüzyonda ve apoptozise neden olan kimyasal hipokside en erken ultrastrüktürel değişimin mitokondride meydana geldiğini tespit etmişlerdir. BcL₂ süksinik dehidrogenaz aktivitesinin yok olmasıyla, mitokondri şişmekte ve zarları patlamaktadır. Biz de çalışmamızda, bir saat iskemi sonrası uygulanan 1 saat reperfüzyon sonucunda, mitokondrilerde şişme kaydettik. Fakat, biz mitokondri zarlarında yırtılmalar izlemedik. Bunu da reperfüzyon süresinin daha kısa olmasına bağladık. Çalışmamız bu yönüyle benzerdir. BcL₂ süksinik dehidrogenaz aktivitesi ölçmediğimiz için bu konuda yorum yapamıyoruz.

Qi W ve ark.'nın (60) yaptığı çalışmada, rat böbreğinde ferric nitrilotriasetat (Fe-NTA) 'a bağlı gelişen lipid peroksidasyonu ve oksidatif DNA yaralanmasında melatonin kullanılmış ve melatonin kullanılan grupta, doku MDA'sının düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da doku MDA düzeyi melatonin kullanılan grupta anlamlı olarak düşük bulunmuş olup bulgularımız uyumludur.

De La Lastra CA ve ark. (23) akut gastrik mukozanın IR yaralanmasında, patogeneze lipid peroksidasyonu ve SOR nin rolü olduğunu tespit etmişlerdir. Sıçanlarda IR'a bağlı gastrik mukoza yaralanmasında melatoninin koruyuculuğunu araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada ip. uygulanan melatoninin postiskemik mukozal yaralanmayı önlediği, lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği ve antioksidan sistemin belirteci olan glutatyon peroksidazdaki azalmayı da sınırladığını gözlemişlerdir. Bizim çalışmamızda da, gerek iskemi, gerek iskemi- reperfüzyonda, hasara uğrayan böbrek dokusu ve glutatyon peroksidaz düzeyi üzerine melatoninin olumlu yönde etki ettiğini gördük. Çalışmamız bu yönüyle benzerdir.

Sener G ve ark. (71) ratlarda renal iskemi reperfüzyonda melatonin kullanmışlar ve melatoninin oksidatif yaralanmaya karşı koruduğunu gözlemişlerdir. Çalışmalarında, doku MDA 'sı, glutatyon (GSH), myeloperoksidaz aktivitesi (MPO), protein oksidasyonu (PO), ve kan üre azotu (BUN) değerleri ölçülmüş, melatoninle tedavi edilmeyen grupta BUN doku MDA'sı ve kreatinin artmıştır. Melatonin kullanılan grupta, doku MDA'sının azalması, bizim bulgularımızla benzerdir.

Petrozza V ve ark. (55) deneysel olarak akut renal iskemi yapmışlar ve defibrotid vererek bunun koruyuculuğunu incelemişler. Defibrotid, vasküler endotelden prostosiklinlerin (PGI_2) salınımına neden olarak profibrinolitik, antitrombotik ve trombolitik aktivitelerinden dolayı iskemide sitoprotektif özellik göstermiştir. Biz de iskemi-reperfüzyon uygulayıp, prostoglandin grubundan olan PGE_1 'i verdiğimiz grupta, ilaç vermeden iskemi-reperfüzyon yaptığımız gruba göre hücrelerin korunmuş olduğunu gördük. Bulgularımız uyumludur.

Vargas AV ve ark. nın yaptığı çalışmada (89) ratlarda renal IR yaralanmasında PGE_1 uygulanmasının hasarı hafıflettiğini tespit etmişlerdir. Bu çalışmada total renal iskemide, reperfüzyon sırasında, PGE_1 uygulanması beklenen zedelenmeyi azaltmaktadır. Oysa 30 dakika veya 60 dakika gibi gecikmiş bir uygulama (serum kreatinin değeri ve histolojik incelemeye göre) etkisizdir. Biz yaptığımız çalışmada, reperfüzyon olayından 15 dakika önce antioksidanları kullanarak gecikmiş uygulama riskini ortadan kaldırdık. Tüm kullandığımız ilaçların etkili olma nedeni uygulamamızdaki zamanlamanın yerinde olması olabilir.

Natori S ve ark. (49) hepatik iskemi-reperfüzyonda PGE₁'in, lökositlerin endotelyuma yapışmasını önleyerek IR hasarını azalttıklarını tespit etmişlerdir. PGE₁'in lökosit adezyonunu önleme mekanizmasının ise ICAM-1 üzerinden olduğunu saptamışlardır. Ayrıca Hong JP ve ark (36) musküler fleplerde IR hasarına karşı PGE₁ in etkisini incelemişler. İskemik flep derisi içine 1 mikrogram PGE₁ enjekte edilip 4 saat sonra reperfüze edilmiş grupta, reperfüzyondan sonra 24 saat ve 5 gün geçince, endotel yüzeyinde ICAM-1 ekspresyonunda azalma, reperfüzyondan 2 gün sonra lökosit adezyonunda anlamlı bir azalma saptamışlardır. Sonuçta PGE₁ in flep iyileşme oranını arttırdığı ve IR hasarını, lökosit endotel hücre adezyonunu azaltarak hafiflettiğini saptamışlardır. Bizim çalışmamızda da, PGE₁in IR yaptığımız sıçanlarda etkili bulunmuştur. Etki nedeni lökosit adezyonunu azaltması olabilir. Nitekim, iskemi-reperfüzyon grubunda karşılaştığımız hücre infiltrasyonunu, PGE₁ grubunda gözlemleyemedik.

Totsuka E ve ark. (83), köpeklerdeki hepatik iskemide, intraportal PGE₁ uygulanmasının intravenöz uygulanmasından daha koruyucu olduğunu tespit etmişlerdir. Kullandığımız antioksidanların renal artere verilmesi yolu ile etkilerinin güçlenebileceği kanaatindeyiz.

Irmak ve ark. (37) yaptığı çalışmada, iskemi-reperfüzyon yaralanmasında kafeikasit fenilester ile E vitaminin etkilerini karşılaştırmışlar. Balda bulunan kafeikasit fenilesterin E vitamininden çok daha iyi koruyucu olduğunu gözlemişler. Çalışmalarında, değişiklikleri medüller tübüllerden çok, kortikal tübüllerde izlemişler. Biz de yaralanmanın kortikal bölümde daha fazla olduğunu saptadık. Morfolojik değişiklikler olarak iskemi-reperfüzyon grubunda ve E vitamini grubunda, tübüler dilatasyon, interstisyel ödem ve vakuol formasyonunu izlemişlerdir. En belirgin göstergelerin kortikal yaralanma ve kortikal tübül dilatasyonu olduğunu belirtmişlerdir. Glomerülü tüm gruplarda normal olarak izlerken, sham grubu hariç, tümünde vakuol formasyonu izlemişler. E vitamininin renal yaralanmayı tümüyle azaltmadığını gözlemişlerdir. Histolojik bulguların lipid peroksidasyonu ile paralellik gösterdiğini, proksimal tübül hücre sitoplazmasında gözlenen vakuollerin tübüler sıvıdaki ozmotik değişikliklerden kaynaklanabileceğini belirtmişler. Bizim çalışmamızda da, gerek ışık, gerekse elektronmikroskopik olarak tübül yapılarında yaygın vakuolize yapılar gözledik.

Ayrıca doku histolojisi ile diğer parametreler arasında yaptığımız Spearman Bağlantı analizinde böbrek histolojisi (ışık M) ile Süperoksit dismutaz arasında (-) bağlantı ($r=-0.8$, $p=0.000$, $n=42$), doku/plazma Malondialdehit düzeyi arasında (+) bağlantı ($r=+0.7$, $p=0.000$, $n=42$), glutasyon peroksidaz arasında (-) bağlantı ($r=-0.4$, $p=0.000$, $n=42$) saptandı. Bulgularımız uyumludur.

Rhoden EL ve ark.(66), ratlarda renal iskemi-reperfüzyonda E vitamininin yararlı etkilerini araştırmak amacıyla bir çalışma yapmışlar. 50 dakika iskemi uygulayıp, 50 dakika reperfüze etmişler ve iskemiden 72, 48, 24, 6, ve 1 saat önce 30 mg/kg ip. E vitamini vermişler. E vitamini ile tedavi edilen grupta MDA seviyesinin anlamlı derecede azaldığını, dolayısıyla dokunun daha az zarar gördüğünü gözlemişler. Biz de 1 saat iskemi ve 1 saat reperfüzyon uygulayıp, reperfüzyondan 15 dakika önce E vitamini verdiğimiz grupta doku ve kan MDA düzeylerinin anlamlı derecede azaldığını saptadık. Bulgularımız uyumludur.

Uysal F ve ark. (86) rat böbreğinde, IR hasarında, E vitamininin lipid peroksidasyonu ve nitrit düzeyleri üzerine etkisini incelemişlerdir. 60 dakika iskemi sonunda 24 saat ve 72 saat reperfüzyon uygulanan deneklerden katalaz, SOD, doku MDA ve nitrit seviyelerine bakmışlar ve 24 saatlik reperfüzyon grubunda E vitamininin etkisinin olmadığını ancak 72 saat reperfüzyon uygulanan grupta ise, doku MDA düzeyinde azalma saptamışlardır. Bu etkisinin lipid peroksidasyonundaki zincir kırıcı işlevine ve iskemik dokudaki nitrik oksit rezervini korumasına bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Biz doku nitrik oksit düzeyine bakmadığımız için bu konuda yorum yapamıyoruz. Ancak doku MDA düzeyindeki azalma bulgularımızla uyumludur.

Durak ve ark. (24) yaptığı çalışmada tavşanlarda siklosporin kullanmışlar ve bunun zararlı etkisini önlemek için oral olarak 10 gün E vitamini ve C vitamini birlikte kullanmışlardır. Deney sonunda bu iki antioksidan enzimin aynı anda uygulandığı sıçanlarda doku MDA, GSH-Px, SOD ve Katalaz düzeylerinde olumlu yönde değişiklik tespit etmişlerdir. Siklosporinin böbrek üzerine olan zararlı etkisi, bu vitaminlerin birlikte sinerjistik etkisi sayesinde azaltılmıştır. Biz sadece E vitamini uyguladığımız için bu konuda yorum yapamıyoruz. Ancak E vitamini ve C vitamininin aynı anda uygulanması bu vitaminlerin tek tek uygulanmasından daha etkili olacaktır. Çünkü bunlar birlikte sinerjistik etki yapan iki vitamindir.

Hanai ve ark (31) yaptıkları çalışmada ratlardaki ince barsak IR hasarında, E vitamini kullandıkları deneklerde, gerek histolojik gerekse doku MDA ve SOD düzeylerinin olumlu yönde etkilendiğini ve E vitamini kullanımının ince barsak IR hasarını azaltmada etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Bulgularımız uyumludur.

Van den Branden C ve ark. (88) glomerulosklerozisli ve diyetlerine E vitamini kattıkları ratların GSH-Px ve SOD düzeylerinde anlamlı artış (16 haftanın sonunda %140 ve %180 artış), doku MDA düzeylerinde ise azalma tespit etmişlerdir. E vitamininin diyetle alınmasının böbrekler üzerine koruyucu olduğunu tespit etmişlerdir. Bulgularımız uyumludur.

Celebi S ve ark. (17) kobay retinasında IR hasarında melatonin, E vitamini, ve octreotid kullanmışlardır. IR grubuyla karşılaştırıldığında doku MDA sıni sırasıyla en fazla melatonin, vitamin E ve octreotid azaltmıştır. Böylece melatoninin vitamin E den ve octreotidden daha güçlü bir antioksidan olduğunu tesbit etmişlerdir. Bulgularımız uyumludur.

Siu AW ve ark. (75), rat retina homojenatında yaptıkları çalışmada melatonin ve E vitamini kullanımının lipid peroksidasyonu ürünleri üzerine anlamlı olarak olumlu yönde etki ettiklerini tespit etmişlerdir. Ancak melatoninin benzer dozlarda vitamin E'den 7.2 kat daha etkili olduğunu tespit etmiştir. Bu çalışma bulgularımızı desteklemektedir.

Baydas G ve ark. nın yaptığı çalışmada (8) streptozosin nedenli diabetes mellitusta, melatonin ve E vitamininin karşılaştırmalı koruyucu etkilerini çalışmışlar, Melatoninin vitamin E den daha güçlü bir koruyucu etkiye sahip olduğunu gözlemişlerdir. Melatonin grubunda, kontrol grubuna göre beyin ve böbrekte GSH-Px seviyesinde artış izlenmiş, ancak E vitamini karaciğerde daha etkili bulunmuştur. Melatoninin özellikle beyin ve böbrekte Vitamin E'den daha iyi bir antioksidan ajan olduğu gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda böbrek dokusu üzerine melatoninin daha etkili olduğunu tespit ettik. Bulgularımız uyumludur.

SONUÇ:

Ratlarda deneysel olarak oluşturduğumuz 60 dakikalık böbrek iskemi ve reperfüzyon hasarında hasarlanmayı azaltmak için, (gerek histolojik gerek biyokimyasal inceleme sonuçlarında) sırasıyla antioksidan olarak melatonin, PGE₁ ve E vitamininin etkili olduğu tespit edildi. Bu nedenle böbrek iskemi reperfüzyon olaylarında bu antioksidanlar içinde ilk tercih melatonin olabilir kanaatindeyiz.



7. KAYNAKLAR:

- 1- Akgül A (1997). Tıbbi araştırmalarda istatistiksel analiz teknikleri "SPSS" uygulamaları. 10:320.
- 2- Akkuş İ. (1995) Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik etkileri. Mimoza yayınları. 3-95.
- 3- Alvarez A, Martul E, Veiga F, Forteza J (1994). Functional, histologic, and ultrastructural study of the protective effects of verapamil in experimental ischemic acute renal failure in the rabbit. *Ren Fail.* 16(2):193-207.
- 4- Arima S, Ren Y, Juncos A, Carretero A. Glomerular prostoglandins modulate vascular reactivity of downstream efferent arterioles. *Kidn. Int.* 1994; 45: 650-658.
- 5- Aybey B, Tufan H, Ergenekon G. (1996) Sebest radikaller . *Türkderm.* 30: 116-122.
- 6- Aydın A, Sayal A, Işimer A. (1997). Oksijen radikalleri ve biyolojik sistemdeki rolü. *GATA bülteni.* 39: 270-274.
- 7-Babbs CF (1998). Reperfusion injury of postischemic tissues. *Ann Emerg Med.* 17(11):1148-57. Review.
- 8-Baydas G, Canatan H, Turkoglu A. Comparative analysis of the protective effects of melatonin and vitamin E on streptozocin-induced diabetes mellitus. *J Pineal Res.* 2002;32(4):225-30.
- 9- Benitez-Bribiesca L, Gomez-Camarillo M, Castellanos-Juarez E, Mravko E, Sanchez-Suarez P (2000). Morphologic, biochemical and molecular mitochondrial changes during reperfusion phase following brief renal ischemia. *Ann N Y Acad Sci.* 926:165-79.
- 10- Brawn K, Fridrovich I (1980). Superoxide radical and superoxide dismutases: Threat and defense. *Acta Physiol scand.* 492:9-18.
- 11- Brown JH, Pollock H. (1972). Stabilization of hepatic lysosomes of rats by vitamin E and selenium in vivo as indicated by thermal labilization of isolated lysosomes. *J Nutr.* 102: 1413-20.
- 12- Bulkley GB. (1983). The role of oxygen free radicals in human disease process. *Surgery.* 94 (3):407-11.
- 13- Burke TJ, Arnold PE, Gordon JA, Bulger RE, Dobyan DC, Schrier RW (1984). Protective effect of intrarenal calcium membrane blockers before or after renal ischemia. Functional, morphological, and mitochondrial studies. *J Clin Invest.* 74(5):1830-41.
- 14- Burton GW and Inguld KU (1984). beta-carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science.* 224 (4649):569-73.
- 15- Bülbüller N. (1998). Melatonin kesi yaraları ve anastomotik yara iyileşmesi üzerine etkisi. Elazığ, Fırat Üniversitesi Genel Cerrahi AbD.
- 16- Cavallo A. (1993). Melatonin and human puberty: Current perspectives. *J. Pineal Res.* 15(3):115-21.
- 17- Celebi S, Dilsiz N, Yilmaz T, Kukner AS (2002). Effects of melatonin, vitamin E and octreotide on lipid peroxidation during ischemia-reperfusion in the guinea pig retina. *Eur J Ophthalmol.* 12(2):77-83.
- 18- Cheeseman KH (1993). An introduction to free radical biochemistry.P.481-493. Ed. KH Cheeseman and TF Slater. In: "Free radicals in medicine". British medical bulletien. London.

- 19- Cotran RS, Kumar V, Robbins SL (1995). Robbins pathologic basis of disease. 4 th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 3-12.
- 20- Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T (1997). Hastalıkların patogenezi ve tedavisinde reaktif oksijen partikülleri ve antioksidanlar. Türk nefroloji ve transplantasyon dergisi. 3-4: 96-101.
- 21- Dahiliye . Abdurrahman Kadayıfçı (ed). 1. Baskı. Atlas kitapçılık. 2001; Bölüm 4: Nefroloji: 199-299.
- 22- Delabar JM, Nicole A, D'auriol L, Jacob Y, Meunier-Rotival M, Galibert F, and et al. (1987). Cloning and sequencing of a rat CuZn Superoxide dismutase cDNA. Eur. J. Biochem. 166:181-187.
- 23-De La Lastra CA, Cabeza J, Motilva V, Martin MJ (1997). Melatonin protects against gastric ischemia-reperfusion injury in rats. J Pineal Res. 23(2):47-52.
- 24-Durak I, Karabacak HI, Buyukkocak S, Cimen MY, Kacmaz M, Omeroglu E, Ozturk HS (1998). Impaired antioxidant defense system in the kidney tissues from rabbits treated with cyclosporine. Protective effects of vitamins E and C. Nephron. 78(2):207-11.
- 25- Erenel G, Erbaş D, Arıcıoğlu A. (1992). Serbest radikaller ve antioksidan sistemler. Gazi medical journal. 3: 243-250.
- 26-Fridovich I (1978). The biology of oxygen radicals. Science. 201: 875-80.
- 27- Fridovich I (1984). Overview: Biological sources of O_2^- . Meth. Enzymol. 105(5):59-61.
- 28-Goujon JM, Hauet T, Menet E, Levillain P, Babin P, Carretier M (1999). Histological evaluation of proximal tubule cell injury in isolated perfused pig kidneys exposed to cold ischemia. J Surg Res. 82(2):228-33.
- 29- Gündüz K (1997). Dermatolojide E vitamini. Türkderm. 31:151-154.
- 30- Haberal M, Mavi V, Oner G. (1987). The stabilizing effect of vitamin E, selenium and zinc on leucocyte membrane permeability: A study in vitro. Burns. 13(2): 118-22.
- 31-Hanai G, Kimura T, Shiraishi T, Sano M, Matsumoto S, Funabiki T, Yoshizaki S (1992). Experimental studies on the effects of alpha-tocopherol in small intestinal ischemia and reperfusion injury Nippon Geka Gakkai Zasshi. :93(6):589-98.
- 32- Harlan JM. (1987). Neutrophil-mediated vascular injury. Acta Med Scan Suppl. 715: 123-29.
- 33-Heinzelmann M, Mercer-Jones MA, Passmore JC (1999). Neutrophils and renal failure. Am J Kidney Dis. 34(2):384-99. Review.
- 34- Hellberg PO, Kallskog TO (1989). Neutrophil-mediated post-ischemic tubular leakage in the rat kidney. Kidney Int. 36(4):555-61.
- 35- Histoloji atlası fonksiyonel ilişkileriyle. Di Fiore. 9. Baskı. Victor P. Eroschenko (ed). Lippincott Williams and Wilkins 2001; Bölüm 15: 251-266.
- 36-Hong JP, Chung YK, Chung SH. The effect of prostaglandin E1 versus ischemia-reperfusion injury of musculocutaneous flaps. Ann Plast Surg. 2001;47(3):316-21.
- 37- Irmak MK, Koltuksuz U, Kutlu NO, Yagmurca M, Ozyurt H, Karaman A, Akyol O (2001). The effect of caffeic acid phenethyl ester on ischemia-reperfusion injury in comparison with alpha-tocopherol in rat kidneys. Urol Res. 29(3):190-3.
- 38- Ischaemia-reperfusion injury (1994). Br J Surg. 81(5):637-47. Review.

- 39- Jacob RA, Burr BJ (1996). Oxidative damage and defense. *Am J Clin Nutr.* 63: 985-90.
- 40-Karbownik M, Lewinski A, Reiter RJ (2001). Anticarcinogenic actions of melatonin which involve antioxidative processes: comparison with other antioxidants. *Int J Biochem Cell Biol.* 33(8):735-53. Review.
- 41- Katzung BG. (1995). *Temel ve Klinik farmakoloji.* Özünler Z (çev. Editörü). I. Cilt. Barış kitapevi: 387-407.
- 42-Kaufman RP Jr, Anner H, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB (1987). Vasodilator prostaglandins (PG) prevent renal damage after ischemia. *Ann Surg.* 205(2):195-8.
- 43- Kayaalp SO. (1998). Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji ; 8. Baskı, II. Cilt. Hacettepe-TAŞ. 1502-1525.
- 44- Kılınç K (1986). Oksijen radikalleri: Üretilmeleri, fonksiyonları ve toksik etkileri. *Biokimya dergisi.* 10(2):59-89.
- 45- Köksel O. (1998) İskemi reperfüzyona bağlı akciğer hasarı üzerine Alfa lipoik asitin etkisi. Uzmanlık tezi. Elazığ.
- 46- Kunduzova OR, Escourrou G, Seguelas MH, Delagrange P, De La Farge F, Cambon C, Parini A (2003). Prevention of apoptotic and necrotic cell death, caspase-3 activation, and renal dysfunction by melatonin after ischemia/reperfusion. *FASEB J.* 17(8):872-4.
- 47- Medikal embriyoloji. Langman's. 7. Baskı. T.W.Sadler (ed). Williams and Wilkins. 1995: Bölüm 15. 260-297.
- 48- Mel'man EP, Shutka BV (1975). Ultrastructural changes in the capillaries of the renal glomeruli and parenchyma following acute ischemia] *Arkh Anat Gistol Embriol.* 68(2):62-8.
- 49-Natori S, Fujii Y, Kurosawa H, Nakano A, Shimada H (1997). Prostaglandin E1 protects against ischemia-reperfusion injury of the liver by inhibition of neutrophil adherence to endothelial cells. *Transplantation.* 64(11):1514-20.
- 50- Lloberas N, Torras J, Herrero-Fresneda I, Cruzado JM, Riera M, Hurtado I, Grinyo JM (2002). Postischemic renal oxidative stress induces inflammatory response through PAF and oxidized phospholipids. Prevention by antioxidant treatment. *FASEB J.* 16(8):908-10.
- 51- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351-58.
- 52- Ontell SJ, Makowka L, Trager J, Mazzaferro V, Ove P, Starzl TE. (1989). Pharmacologic modulation of experimental postischemic hepatic function. *Ann. Surg.* 209(2): 200-210.
- 53- Paglia DE, Valentine WN. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 70(1):158-69.
- 54- Paker Ş. *Histoloji.* Uludağ Üniversitesi Basımevi. Bursa, 1990; 448-460.
- 55- Petrozza V, Porta R, Franchitto A, Leuzzi G, Correr S, Carpino F (1994). Renal ischemia and pharmacological prevention: experimental structural and ultrastructural observations. *Ital J Anat Embryol.* 99(4):189-99
- 56- Pierpaoli W, Lesnikov V. (1997). Therotical considerations on the nature of the pineal aging clock. *Gerontology;* 43:20-25.

- 57- Pompella A, Maellaro E, Casini AF, Ferrali M, Ciccoli L, Comporti M. (1987). Measurement of lipid peroxidation In vivo: A comparison of different procedures. *Lipids*. 22(3):206-11.
- 58- Povalii TM (1975). Ultrastructural changes in the nephron during ischemia and organ "survival"] *Biull Eksp Biol Med*. 79(3):118-21.
- 59- Prasad JS. (1980). Effect of vitamin E supplementation on leukocyte function. *The Am J Clin Nutr*. 33:606-608.
- 60-Qi W, Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Kim SJ, Garcia JJ (1999). Inhibitory effects of melatonin on ferric nitrilotriacetate-induced lipid peroxidation and oxidative DNA damage in the rat kidney. *Toxicology*. 139(1-2):81-91.
- 61- RANSOD SOD Tayin kiti. (1997). Randox laboratories Ltd. Diamond Road, Crumlin, Co. Antrim, UK, BT29+QY.56.
- 62-Reiter RJ. (1991). Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and its physiological interactions. *Endocr Rev*. 12(2):151-180.
- 63- Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, et al. (1995). A review of the evidence supporting melatonin's role as antioxidant. *J. Pineal Res*. 18 (1): 1-11.
- 64- Reiter RJ, Tang L, Garcia JJ, Munoz-Hoyos A (1997). Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci*. 60(25): 2255-71.
- 65- Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. (1997). Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res*. 29(8):363-72.
- 66-Rhoden EL, Pereira-Lima L, Teloken C, Lucas ML, Bello-Klein A, Rhoden CR (2001). Beneficial effect of alpha-tocopherol in renal ischemia-reperfusion in rats. *Jpn J Pharmacol*. 87(2):164-6.
- 67- Riley P. (1993). Dedication: Professor TF Slater. P.479-480. Ed. KH Cheeseman and TF Slater. *Free Radical in Medicine*. British medical bulletin. London. 26. 27.
- 68- Ross MH, Romrell LJ, Kaye GI. *Histology A text and atlas*. 3 th ed. Williams-Wilkins int ed. Baltimore, Hong Kong, London, Sydney, Tokyo 1995; Chapt 19.
- 69- Satoh K. (1978). Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta*. 90:37-43.
- 70- Saygılı Eİ. (1997). Kolorektal kanserli hastalarda lipid peroksidasyonu ve antioksidan sistemler. Uzmanlık tezi.: İstanbul. İÜ. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya AbD.
- 71-Sener G, Sehirli AO, Keyer-Uysal M, Arbak S, Ersoy Y, Yegen BC (2002). The protective effect of melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in the rat. *J Pineal Res*. 32(2):120-6.
- 72- Shutka BV, Mel'man EP (1986). Morphological evaluation of the state of the structural elements of arterial and arteriolar walls in experimental kidney ischemia. *Biull Eksp Biol Med*. 101(1):94-8.
- 73- Simon GA, Schmid P, Reifenrath WG, Rawenswaay TV, Stuck BE. (1994). Wound healing after laser injury to skin. The effect of occlusion and vitamin E. *J. Pharm Sci*. 83(8): 1101-6.
- 74-Sinha K, Degaonkar MN, Jagannathan NR, Gupta YK (2001). Effect of melatonin on ischemia reperfusion injury induced by middle cerebral artery occlusion in rats. *Eur J Pharmacol*. 428(2):185-92.

- 75-Siu AW, Reiter RJ, To CH (1998). The efficacy of vitamin E and melatonin as antioxidants against lipid peroxidation in rat retinal homogenates. *J Pineal Res.* 24(4):239-44.
- 76- Slater TF (1982). Lipid peroxidation. *Biochem. Soc. Trans.* 10:70-71.
- 77-Slater TF (1984). Free radical mechanisms in tissue injury. *J. Biochem* 222;1-15.
- 78- Sobotta atlas of human anatomy II. 10. Baskı. H. Ferner and J. Staubesand (ed). Urban and Schwarzenberg. 1982: Ürogenital sistem. 175-223.
- 79-Tappel AL, Dillard CJ. (1981). In vivo lipid peroxidation: Measurement via exhaled pentane and protection by vitamin E. *Fed-Proc.* 40: 174-78.
- 80-Tarin JJ, Perez-Albala S, Pertusa JF, Cano A (2002). Oral administration of pharmacological doses of vitamins C and E reduces reproductive fitness and impairs the ovarian and uterine functions of female mice. *Theriogenology.* 57(5):1539-50.
- 81-Temel Histoloji. A Lange medical book. 8. Baskı. L. Carlos Junqueira, Jose Carneiro, Robert O. Kelley (eds).1995; Üriner sistem. 359-377.
- 82-Tobimatsu M, Konomi K, Saito S, Tsumagari T (1985). Protective effect of prostaglandin E1 on ischemia-induced acute renal failure in dogs. *Surgery.* 98(1):45-53
- 83-Totsuka E, Sasaki M, Takahashi K, Toyoki Y, Seino K, Chiba S, Narumi S, Hakamada K, Morita T, Konn M (1995). The effects of intraportal prostaglandin E1 administration on hepatic warm ischemia and reperfusion injury in dogs. *Surg Today.* 25(5):421-8.
- 84-Tuncer M. (1997). Deneysel ön beyin iskemi-reperfüzyon hasarında melatoninin antioksidan etkisi. Uzmanlık tezi Ankara. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AbD.
- 85-Turnage RH, Bagnasco J, Berger J, Guice KS, Oldham KT, Hinshaw DB (1991). Hepatocellular oxidant stress following intestinal ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res.* 51(6):467-71.
- 86-Uysal F, Girgin FK, Tuzun S, Aldemir S, Sozmen EY (1998). Effect of vitamin E on antioxidant enzymes and nitric oxide in ischemia-reperfused kidney injury. *Biochem Mol Biol Int.* 44(6):1255-63.
- 87-Üstündağ B, Canatan H. (1999). Melatonin. Güçlü bir antioksidan ve serbest radikal giderici. *Fırat Tıp Dergisi.* 1; 502-512.
- 88-Van den Branden C, Verelst R, Vamecq J, Vanden Houte K, Verbeelen D (1997). Effect of vitamin E on antioxidant enzymes, lipid peroxidation products and glomerulosclerosis in the rat remnant kidney. *Nephron.* 76(1):77-81.
- 89-Vargas AV, Krishnamurthi V, Masih R, Robinson AV, Schulak JA (1995). Prostaglandin E1 attenuation of ischemic renal reperfusion injury in the rat. *J Am Coll Surg.* 180(6):713-7.
- 90- Venkatachalam MA, Jones DB, Rennke HG, Sandstrom D, Patel Y (1981). Mechanism of proximal tubule brush border loss and regeneration following mild renal ischemia. *Lab Invest.* 45(4):355-65
- 91- Virchows, Molecular pathology. (1992). Tissue distrustin of neutrophils in postischemic acute renal failure. 62:237-43.
- 92-Wang J, Dunn MJ (1987). Platelet-activating factor mediates endotoxin-induced acute renal insufficiency in rats. *Am J Physiol.* 253(6 Pt 2):F1283-9.
- 93- Yagi K. (1984). Assay of blood plasma or serum methods in enzymology. 105:328-31.

- 94- Yamada T, Talbot A, Kobayashi N, Shiwaoku Y, Hirakawa M, Kosaka F, Kimoto T (1978). Scanning electron microscopy of the ischaemic kidney—changes in the surface microstructure of glomerular epithelial cells. *Acta Pathol Jpn.* .28(3):369-77
- 95- Yamamoto H, Tang H. (1996). Melatonin attenuates L-cysteine induced seizures and lipid peroxidation in the brain of mice. *J Pineal Res.* 21: 108-113.
- 96- Yaprak M. (1996). Melatonin: Fizyolojik etkileri. *Haseki Tıp Bülteni.* 34(2): 113-57.
- 97- Yaprak M. (1998). Akut miyokard enfarktüsünde biyokimyasal parametreler ve antioksidan sistemle ilişkisi (Doktora tezi). Çukurova üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AbD. Adana.
- 98-Zingzen H (1978). A summary of the vitamin E/Selenium problem in ruminants. *News and reviews.* Roche.1-18.

8. ÖZGEÇMİŞ:

1965 yılında Adana'da doğdum. İlk öğrenimimi Ahmet Karabucak ilkokulunda, orta ve lise öğrenimimi Adana Anadolu Lisesinde tamamladım. 1984 yılında üniversite seçme ve yerleştirme sınavını kazanarak Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesine girdim. 1990 yılında Tıp Fakültesini bitirdim. 1991 yılında Rize Devlet Hastanesi'ne pratisyen doktor olarak atandım. Daha sonra sırasıyla, Mersin, Erzurum, Kilis, Osmaniye-Düziçi'nde görev yaptım. 1998 yılında, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji AbD'nin açtığı doktora sınavını kazanarak doktora başladım. Evli ve üç çocuk annesiyim.

