

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**BÖBREK İSKEMİ-REPERFÜZYONUNDA
ENDOTELİN-A RESEPTÖR ANTAGONİSTİ BQ-
123'ÜN NİTRİK OKSİT ÜRETİMİYLE İLİŞKİLİ
KORUYUCU ETKİSİ**

138684

UZMANLIK TEZİ

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMAN YÖNETİMİ

Dr. Hasan ERDOĞAN
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

138684

DANIŞMAN
Doç. Dr. M. Hanifi EMRE

MALATYA

2003

**Bu tez çalışması İnönü Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı
tarafından 2001/52 nolu proje olarak desteklenmiştir.**

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. BÖBREK.....	3
2.1.1. Böbreğin Anatomisi.....	3
2.1.2. Böbreğin Histolojisi.....	4
2.1.2.1. Nefron.....	5
2.1.2.2. Toplayıcı Kanallar.....	8
2.1.3. Böbreğin Fizyolojisi.....	9
2.1.3.1. Böbreğin İşlevleri.....	9
2.1.3.2. Böbrek Kan Akımı.....	10
2.1.3.3. Böbreğin Tübüler İşlevleri.....	11
2.1.4. Böbrekte İskemi-Reperfüzyon.....	11
2.1.4.1. Renal İskemi-Reperfüzyonda Lökositlerin Rolü.....	11
2.1.4.2. Renal İskemi-Reperfüzyonda Reaktif Oksijen Türlerinin (ROT) Rolü.....	14
2.1.4.3. Renal İskemi-Reperfüzyonda Nitrik Oksit (NO) Rolü... ..	16
2.1.4.4. Renal İskemi-Reperfüzyonda Hücre Adhezyon Moleküllerinin (HAM) Rolü.....	17
2.1.4.5. Renal İskemi-Reperfüzyonda Sitokinlerin ve Kompleman Sisteminin Rolü.....	18
2.1.4.6. Renal İskemi-Reperfüzyonda Apoptozis.....	18
2.1.4.7. Renal İskemi-Reperfüzyonda Endotelinin Rolü.....	19
2.2. ENDOTELİNLER.....	21
2.2.1. Endotel Kaynaklı Vasokonstriktörler ve Vasodilatatörler.....	21
2.2.2. Endotelinlerin Keşfi.....	22
2.2.3. Endotelin Biyosentezinin Düzenlenmesi.....	22
2.2.4. Endotelin Peptidinin Biyosentezi.....	24
2.2.5. Endotelin Türleri ve Yapısı.....	24
2.2.6. Endotelin Reseptörleri ve Hücre İçi Sinyal İletimi (Etki Mekanizması).....	24
2.2.7. Plazma ve Doku Endotelin Düzeyinin Ölçümü.....	26
2.2.8. Endotelinlerin Eliminasyonu.....	26
2.2.9. Endotelin Reseptör Antagonistleri.....	27
2.2.9.1. BQ-123:ET _A Reseptör Antagonisti.....	27
2.2.10. Endotelinin Böbrekte Etkileri.....	28
2.3. NİTRİK OKSİT.....	29
2.3.1. Nitrik Oksit Keşfi.....	29
2.3.2. Nitrik Oksit Sentez ve Sekresyonu.....	30
2.3.3. Nitrik Oksit Etki Mekanizması ve Nitrik Oksit Sentaz (NOS) İzoenzimleri.....	30
2.3.4. Nitrik Oksit Fizyolojik ve Biyokimyasal Fonksiyonları.....	32
2.3.5. Nitrik Oksit Fizyopatolojik Olaylardaki Rolü.....	33
2.3.5.1. Sinir Sisteminde Nitrik Oksit Rolü.....	34
2.3.5.1. Kardiyovasküler Sistemde Nitrik Oksit Rolü.....	35
2.3.5.1. Böbrekte Nitrik Oksit Rolü.....	36
2.3.5.1. Nitrik Oksit İmmun Sistemdeki Rolü.....	36
2.3.5.1. Nitrik Oksit Solunum ve Sindirim Sistemindeki Rolü....	37
3. MATERYAL VE METOD.....	38
3.1. Deney Grupları.....	38

3.2. Cerrahi Uygulama.....	39
3.3. Ortalama Kan Basıncı ve Kalp Hızı Tayinleri.....	40
3.4. Biyokimyasal Analizler.....	40
3.4.1. Katalaz (KAT) Enzim Aktivitesi.....	40
3.4.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi	40
3.4.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Enziminin Aktivitesi.....	41
3.4.4. Ksantin Oksidaz (XO) Enziminin Aktivitesi.....	41
3.4.5. Myeloperoksidaz (MPO) Enziminin Aktivitesi.....	41
3.4.6. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeleri (TBARS) Miktarının Tayini.....	42
3.4.7. Protein Karbonil (PC) Miktarı Tayini.....	42
3.4.8. Nitrik Oksit (NO) Miktarının Tayini.....	42
3.4.9. Protein Tayini.....	43
3.5. Diğer Biyokimyasal Analizler.....	43
3.6. İstatistiksel Analizler.....	43
4. SONUÇLAR.....	44
4.1. Ortalama Kan Basıncı Sonuçları.....	44
4.2. Biyokimyasal Parametreler.....	48
4.3. Diğer Biyokimyasal Parametreler.....	56
5. TARTIŞMA.....	58
6. ÖZET.....	72
7. SUMMARY.....	74
8. KAYNAKLAR.....	76
9. TEŞEKKÜR.....	81

KISALTMALAR

aa:	aminoasit
ABY:	Akut böbrek yetmezliği
ADE:	Anjiotensin dönüştürücü enzim
AI:	Anjiotensin-I
AII:	Anjiotensin-II
ANP:	Atrial natriüretikpeptid
cGMP:	Siklik guanozin monofosfat
BUN:	Kan üre azotu
DAG:	Diaçil gliserol
EDE:	Endotelin dönüştürücü enzim
EDRF:	Endotelyumdan salgılanan gevşetici faktör
EIA:	Enzim İmmuno Assay
ET-1:	Endotelin-1
ET-2:	Endotelin-2
ET-3:	Endotelin-3
ET _A :	Endotelin-A (reseptörü)
ET _B :	Endotelin-B (reseptörü)
FAD:	Flavin adenin dinükleotid
FMN:	Flavin mononükleotid
GFH:	Glomerül filtrasyon hızı
GSH:	Redükte glutatyon
GSH-Px:	Glutatyon peroksidaz
GSSG:	Okside glutatyon
HAM:	Hücre adezyon molekülleri
H ₂ O ₂ :	Hidrojen peroksit
I/R:	İskemi-reperfüzyon
ICAM-1:	Hücrelerarası adezyon molekülü-1
IL:	İnterlökin
INF:	İnterferon
IP ₃ :	İnositol 1,4,5-trifosfat
i.p.:	İntra peritoneal
JG:	Jukstaglomerüler
KAT:	Katalaz
KBY:	Kronik böbrek yetmezliği
L-Arg:	L-Arginin
L-NAME:	L ^ω -nitro-L-arginin-metil ester
L-NMMA :	N-monometil-L-arjinin
L-NNA:	N-nitro-L-arjinin
MAPK:	Mitojen aktive eden protein kinaz
MDA:	Malondialdehit
MPO:	Miyeloperoksidaz
NADPH:	Nikotinamid dinükleotid fosfat
NBT:	Nitroblue tetrazolium
NF-κB:	Nükleer faktör kappa B
NF-1:	Nükleer faktör-1
NO:	Nitrik oksit
NO ₂ :	Azot dioksit
NO ₂ :	Nitrit
NO ₃ :	Nitrat
NOS:	Nitrik oksit sentaz
O ₂ ^{•-} :	Süperoksit anyonu
•OH:	Hidroksil radikali
OKB:	Ortalama kan basıncı

ONOO ⁻ :	Peroksinitrit
PAF:	Trombosit aktive edici faktör
PGI ₂ :	Prostaglandin-I ₂
PIP ₂ :	Fosfatidilinositol difosfat
PKA:	Plazma kan akımı
PLC:	Fosfolipaz C
PMNL:	Polimorfonükleer lökositler
RIA:	Radioimmunoassay
RKA:	Renal kan akımı
ROT:	Reaktif oksijen türleri
SOD:	Süperoksit dismutaz
TBARS:	Tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri
TGF-β:	Transforme edici büyüme faktörü-β
TNF:	Tümör nekroz faktör
t-PA:	Doku plazminojen aktivatörü
VCAM-1:	Vasküler adezyon molekülü-1



ŞEKİL, TABLO ve GRAFİK SAYFALARI

Şekil 1; Hücresel antioksidan enzim sistemi.....	15
Şekil 2: Endotelin-1 (ET-1)'in biyosentezi.....	23
Şekil 3: Endotelin-1'(ET-1)'in X-Ray yapısı.....	25
Şekil 4: BQ-123'ün kimyasal yapısı.....	28
Şekil 5: Nitrik Oksidin (NO)'in oluşum ve etki mekanizması.....	30
Şekil 6: Deney prosedürü.....	39
Şekil 7: Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) enzimi döngüsü.....	41
Tablo 1: Gen transkripsiyonu yoluyla Endotelin-1 (ET-1) üretimini etkileyen faktörler.....	22
Tablo 2: Nitrik Oksit Sentaz (NOS) türlerinin genel özellikleri.....	32
Tablo 3: Deney Grupları.....	38
Tablo 4: Gruplara göre OKB değerleri.....	44
Tablo 5: Böbrek dokusu katalaz (KAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutasyon peroksidaz (GSH-PX) ve ksantin oksidaz (XO) enzim aktiviteleri ile bunlara ait <i>p</i> değerleri.....	48
Tablo 6: Doku tiobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS), protein karbonil (PC) ve nitrik oksit (NO) düzeyleri ile miyeloperoksidaz (MPO) aktiviteleri ve bunlara ait <i>p</i> değerleri.....	49
Grafik 1: Ortalama kan basıncı (OKB) değişikliklerinin her grupta, sütun olarak gösterimi.....	47
Grafik 2: Deney süresince izlenen ortalama kan basıncı (OKB) değişiklikleri.....	47
Grafik 3: Böbrek dokusu katalaz (KAT) enzim aktiviteleri.....	50
Grafik 4: Böbrek dokusu süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri.....	51
Grafik 5: Böbrek dokusu glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri.....	51
Grafik 6: Böbrek dokusu ksantin oksidaz (XO) enzim aktiviteleri.....	52
Grafik 7: Böbrek dokusu miyeloperoksidaz (MPO) aktiviteleri.....	53
Grafik 8: Böbrek dokusu tiobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS) düzeyi.....	53
Grafik 9: Böbrek dokusu protein karbonil (PC) miktarları.....	54
Grafik 10: Böbrek dokusu nitrik oksit (NO) düzeyleri.....	55
Grafik 11: Plazma kan üre azotu (BUN) seviyeleri.....	57
Grafik 12: Plazma kreatinin düzeyleri.....	57
Grafik 13: Plazma Na seviyeleri.....	57
Resim 1: Kan basıncı kayıt örnekleri.....	46

1 -GİRİŞ VE AMAÇ

Akut böbrek yetmezliği (ABY), etkin tedavi yöntemi olmadığı için ciddi bir klinik problemdir. Erişkinde ABY'nin başlıca nedeni iskemidir.¹ Böbrekte iskemik hücre hasarı kardiyovasküler cerrahi, transplantasyon, kanama, şok gibi ABY'ye yol açan bir çok durumda ortaya çıkar. İskemik hücre hasarına ve sonucunda oluşan organ hasarına, kompleks ve olasılıkla birbirleriyle ilintili bir çok faktör katılır. Üstelik böbreğin damarsal ve tübüler ağdan oluşan kompleks bir yapısı vardır.² Son yıllardaki çalışmalarda, iskemi-reperfüzyon (I/R) hasarında damar endotelyumunun rolü üzerine odaklanılmış³ ve lokal hormonal faktörlerin işlevleri araştırılmaktadır.

Damar endotelyumundan salgılanan lokal hormonal faktörler (otokoidler, parakrin faktörler) damar tonusunun düzenlenmesini sağlarlar. Bu faktörlerden nitrik oksit (NO), prostaglandin- I_2 (PGI_2) gibi bir kısmı damar gevşetici (vazodilatatör) olarak rol alırken, endotelin-1 (ET-1), anjiyotensin-II (AII) gibi diğer bir kısmı da damar büzücü (vazokonstriktör) olarak işlev görür.

Asetilkolinin endotelyuma bağlı etkilerinin, NO aracılığıyla gerçekleştiğinin anlaşılması,⁴ NO'nun hastalıkta ve sağlıkta rolünü araştıran oldukça fazla miktarda çalışma yapılmasına ve bu konudaki çalışmaların yoğun bir şekilde devam etmesine yol açmıştır. Bir endojen vazodilatatör olan NO'nun, böbrek I/R hasarında koruyucu rol oynadığı,^{5,6} NO prekürsörü olan L-Argininin (L-Arg) de bu hasar esnasında renal fonksiyonlarda önemli ölçüde iyileşme sağladığı⁷ bulunmuştur. Diğer yandan, süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) ile NO'nun reaksiyonundan oluşan peroksinitrit ($ONOO^{\cdot-}$)'in çeşitli dokuların I/R hasarında zararlı etkilerinin olduğuna⁸ ve L-argininin ise renal iskemik hasarı artırdığına dair çalışmalar da bulunmaktadır.⁶

Yanagisawa ve ark. tarafından 1988 yılında tanımlandığı üzere,⁹ damar endotelyumundan sentezlenen ET-1; NO'nun aksine, uzun etki süresi ve yavaş salınımı ile, bilinen en güçlü vazokonstriktör ajandır. Yirmibir amino asit (aa) rezidüsüne sahip olan ET-1, biyolojik etkilerini ET_A ve ET_B reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirir.¹⁰ ET-1; ET_A ve ET_{B2} reseptörleri aracılığıyla vazokonstriktör etkilerini gerçekleştirirken, ET_{B1} reseptörüne etkiyerek NO ve PGI_2 salınımını uyarır. Endotelinin etkilerinin en belirgin görüldüğü organlardan biri böbrektir. Özellikle akut ve kronik böbrek hastalıklarında önemli rolü vardır. Vasküler tonusa etkisinin yanı sıra, tübüler sodyum ve su reabsorbsiyonunda da rol alır.¹¹ İskemik ABY modellerinde, ET_A ve $ET_{A/B}$ reseptörlerinin blokajından sonra renal

fonksiyonlarda düzelme saptanmıştır.¹¹ NO'nun ET-1 salınımını baskıladığı ve bu etkisini preproendotelini inhibe ederek yaptığı ifade edilmiştir.^{4,12,13,14}

Bu çalışmadaki iskemik ABY deney protokolü ile;

1- I/R hasarında selektif ET_A reseptör antagonisti BQ-123'ün koruyucu etkisinin NO salınımına bağlı olup olmadığı, hemodinamik parametreler ve kan-böbrek fonksiyon testleri açısından irdelendi. Böylece ET-1 ve NO etkileşiminin böbrek I/R hasarındaki rolünün araştırılması hedeflendi. Hipotezimize göre, ET_A reseptör blokajı sadece ET-1'in vazokonstriktör etkilerini engelleyerek değil, aynı zamanda NO salınımını uyararak da iskemik ABY'de koruyucu rol oynadığı düşünülmektedir.

2- Selektif endotelin reseptör antagonisti (BQ-123), NO inhibitörü [L^w-nitro-L-arginin-metil ester (L-NAME)] ve NO prekürsörünün (L-Arg) I/R sonrası böbrek dokusunda oksidan/antioksidan sistem açısından etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

2 -GENEL BİLGİLER

2.1. BÖBREK

2.1.1. Böbreğin Anatomisi

İnsanda böbrekler, karın boşluğunun arka kısmında, üst lumbal vertebraların her iki yanında yerleşik, retroperitoneal bir çift organdır. Üst uçları, 12. torakal vertebranın üst kenarı seviyesindedir. Sağ böbrek alt ucu 3. lumbal vertebra seviyesinde, sol böbrek ise 2. lumbal vertebra seviyesinde olup, *crista iliaca*'dan yaklaşık 2.5-5 cm yukarıdadır. Karaciğer nedeniyle sağ böbrek soldakinden biraz daha aşağıdadır. Sol böbrek ise sağ böbreğe oranla biraz daha uzun ve dardır. Derin inspirasyon ile böbrekler 1-2 cm aşağı inebilirler. Yaklaşık 11,5x5-7x2,5 cm boyutlarında ve erkekte 125-170 g, kadında ise 115-155 g ağırlığındadır.

Sağ böbreğin ön yüzü; böbrek üstü bezi, karaciğerin sağ lobu, sağ kolon fleksuru, duodenumun ikinci parçası ve jejunum kıvrımları ile komşudur. Sol böbreğin ön yüzünün ise; böbrek üstü bezi, dalak, mide, pankreas, sol kolon fleksuru ve jejunum kıvrımları ile komşuluğu bulunur.

Her iki böbrek de, arka yüzleri ile; diyafragma, psoas major kası, quadratus lumborum kası ve abdominal transvers kas ile komşudur. Adı geçen kaslar ile böbrekler arasında subkostal ven, arter ve sinirden başka, iliohipogastrik sinir ve ilioinguinal sinir bulunur.

Böbreklerin medial kenarlarında görülen renal hilumdaki yapıların önden arkaya doğru sırası; renal ven, renal arter ve renal pelvis (ya da üreter) şeklindedir. Renal hilum, 1. lumbal vertebranın *prosesus spinosus*'u seviyesindedir.

Böbrekler dıştan içe doğru; önde periton, yanda transvers fascia, korpus adiposum pararenale, renal fascia, capsula adiposa (perirenal yağ tabakası) ve capsula fibrosa ile sarılmıştır.

Böbrekleri pozisyonunda tutan asıl faktör komşu organların pozisyonudur. *Gerato fasiyası* adı ile de bilinen renal fasiya ve damarları, böbrekleri pozisyonunda tutan en önemli iç yapılardır. Yukarıda diyafragmanın fasiyası, aşağıda ise iliak fasiya ile devam eder.

Arterleri; abdominal aorta dalları olan renal arterler, böbrek hilumuna gelince 5 tane segmental dala ayrılır. Segmental arterler denilen bu dallar, sinus renalisde interlober arter denilen dallara ayrılır. Bu arterler de, arkuat arter denilen arterleri oluşturur. Arkuat arterlerden interlobuler arterler çıkar. İnterlobuler arterlerden yanlara doğru çıkan afferent glomerüler arter, glomerül

yumağına girerek *rete capillare glomerulare*'yi oluşturur. Bu yumağın diğer ucundan çıkan efferent glomerüler arter nefron tübüllerinin etrafında oluşturduğu pleksustan sonra, interlobular venler başlar. Arterlerle aynı isimleri alarak sonuçta renal veni oluşturarak, vena cava inferiora açılır.

Lenfatik drenajı; lenf damarları renal veni takip ederek, nodi aortici laterales (lumbales)'e açılır.

Sinirleri; sempatik efferentleri T₁₀-L₁ düzeyinden, parasempatik efferentleri vagus sinirinden gelir.¹⁵ Renal sinirler damarlara koştur seyrederler. Sempatik sinirler, afferent ve efferent arteriollere, proksimal ve distal tübüllere ve jukstaglomerüler (JG) hücrelere dağılmıştır. Çıkan kalın henle kulpunda da yoğun bir noradrenerjik sonlanma vardır.¹⁶

2.1.2. Böbreğin Histolojisi

Böbrek ince, fakat kollajen fibrillerden zengin olduğu için sağlam fibröz bir kapsül ile örtülmüştür. Kapsülde az sayıda elastik fibril de bulunur. Yaşla birlikte kapsülün kalınlığı ve elastik fibrillerin sayısı artar.¹⁷

Her bir böbreğin konkav iç bükey medial bir kenarı vardır, burası hilum adını alır. Hilum sinirlerin, kan ve lenf damarlarının girip çıktığı yerdir. Sinus renalis; hilumun böbrek içinde devam ettiği boşluktur. Bu boşlukta; renal pelvisin üst kısmı, kaliks renalisler, böbrek damarları ve yağ dokusu bulunur. Üreterin genişlemiş olan üst kısmı olan renal pelvis iki ya da üç ana kalikse bölünmüştür. Her major kaliksten minor kaliksler dallanır.¹⁸ Her bir kaliks minor *renal papilla* adı verilen koni biçimli böbrek parankimasını çevrelemektedir.¹⁷

Böbrek dışta korteks içte medulla olarak iki bölüme ayrılabilir. İnsanlarda renal medulla, 10-18 adet koni veya piramidal şekilli yapılardan oluşur. Bunlara *medullar piramitler* denir. Her bir medullar piramidin tabanından kortekse uzanan birbirine paralel tübül demetleri, medullar ışınlar şeklinde çıkar. *Stria medullaris (Ferrein uzantıları)* denen bu ışınsal uzantıların her biri birkaç nefron grubu ile birlikte bir ya da daha çok sayıda toplayıcı kanaldan oluşur.

Medullar piramitlerin aralarında *collumna renalis* veya *Bertini Sütunları* denilen kortikal uzantılar vardır. Bir renal piramit ve etrafındaki *collumna renalis* *renal lob* denilir. Buna göre, bir böbrekte piramit sayısı kadar böbrek lobu bulunur.^{15,18}

Böbrek idrar sekresyonu yapan bileşik tübüler bir bezdir. Organın parankimasını oluşturan tübüller çok uzun olup, sıkı sıkıya yan yana bulunurlar.

Dışta ince, böbrek içine septum yollamayan bir kapsül bulunur. Böbreğin iç kısmı hemen tamamı parankimadan oluşur.

Stroma özellikle kortekste son derece azdır. Fibrillerin hemen hepsi retiküler tiptir. Bu fibriller hemotoksilen-eosin boyamalarında seçilemez. Kan damarı, glomerüler kapsül ve büyük papiller duktus çevresinde kollajen fibrillere rastlanır. Medullada özellikle iç kısmında stroma daha fazladır. Burada yer alan *medüller interstisyel hücre*'ler dikkati çeker. Düzensiz uzantıları, henle kulpu ve damarlar çevresindeki bazal lamina ile temas edebilir. Ayrıca birbirleriyle de uzantıları aracılığıyla değİ halindedirler. İntertisyel hücrelerin stoplazmasında iyi gelişmiş granüllü endoplazmik retikulum, golgi kompleksi ve pek çok lipid damlacığı bulunur. Fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte fagositik olduğu gösterilmiştir. Ayrıca ilginç olarak prostaglandinleri salgılaması olası görölmektedir. Ancak prostaglandinin kollektor tüböl epitelinde sentez edildiğine ilişkin kanıtlar interstisyel hücreye ait kanıtlardan daha çoktur.¹⁷

2.1.2.1. Nefron

Böbreğin İdrar oluşturabilme yeteneğine sahip temel fonksiyonel ünitesidir. Her böbrek 1 ile 4 milyon arasında nefron içerir: a-Renal korpuskül, b-Proksimal kıvrıntılı tüböl, c-Henle kulpu, d-Distal kıvrıntılı tüböl, e-Toplayıcı tüböl kısımlarından meydana gelir. Embriyolojik kökeni nefrondan farklı olan toplayıcı tübüller ve kanallar, nefronlarda üretilen idrarı toplayarak böbrek pelvisine iletirler.¹⁸

a) Renal Korpuskül (Malpighi Cisimciğı): Kortekste yer alır. İki bölümden oluşur: Glomeröl ve bowman kapsülü. Renal korpuskülün, glomerülü oluşturan afferent (giren) ve efferent (çıkan) arteriyollerin bulunduğu kısma damar kutbu, onun tam karşısında bulunan ve süzülen sıvıyı ileten tübüllerin başlangıç kısmına ise idrar kutbu denir.

1°-Glomeröl: Böbrek lopçukları arasında uzanan interlobular arter (kortikalis radyata arter), korteks içinde sağlı sollu kollar verir. Kolların her biri afferent arteriyol olarak bu oluşumun başlangıcını yapar. Afferent arteriyol özel bir arteriyol kılcal dönüşür. Arteriyol kılcal birkaç kez kendi üzerine kıvrılarak ve anastomozlar da yaparak bir yumak (glomeröl) şekillendirir. Sonra kılcal yumak tekrar arteriyole dönüşür; bu, efferent arteriyoldür ve çapı afferent arteriyolden daha küçüktür. Kılcalın duvar yapısı, ince bir bazal membran üzerine oturan çok dar stoplazmalı endotel hücrelerinden ibarettir. Endotel hücrelerinin, özellikle çekirdeğin yan taraflarında kalan çok ince stoplazmalı

kısımları (pencereli kılcal) mevcuttur. Böylece kılcalın lümenindeki sıvı, yüksek hidrostatik basıncın etkisiyle kolaylıkla dışarı çıkar (filtrasyon).

2°-Bowman kapsülü: İki yapraktan oluşur. Her iki yaprak da epitel hücrelerinden ibarettir. İç (visseral) yaprak kılcal damarları (kılcal yumağı) sarar. Bu yaprağı oluşturan hücrelerin, kılcallar üzerine oturan uzunca stoplazma uzantıları vardır. Ayaksı biçimindeki uzantılarından ötürü bu hücrelere *podositler* denir. Podositlerin stoplazmalarında pek çok mikrotübül bulunur. Bowman kapsülünün dış (pariyetal) yaprağını ise yassı epitel hücreleri oluştururlar. İki yaprak arasında bir boşluk (*cavum glomeruli* ya da bowman aralığı) vardır. Kılcal yumaktan süzülen sıvı (ultrafiltrat) podositlerin arasındaki açıklıklardan ya da mikrotübüller yoluyla bowman aralığına geçer. Ancak, bu geçiş sırasında bazal membran engeli de aşılar.

b) Proksimal Tübül: İdrar kutbundan başlar. Bowman kapsülündeki pariyetal yaprağın devamı şeklindedir. Çok kıvrımlı biçimde başlar ve korteksten medullaya doğru düz parça halinde devam eder. Bowman aralığına geçen ultrafiltratın geri emilmesini (reabsorbsiyon) büyük ölçüde (yaklaşık 3/4'ü) sağlayan bölümdür. Bunun duvarını oluşturan ve asit boyalarla koyu boyanan kübik ya da basık prizmatik hücrelerin apikal yüzleri, ışık mikroskopu ile fırçamsı bir kenar görünümündedir. Tübülus lumenini daraltan, elektron mikroskopik görünümüleriyle mikrovilluslar olarak adlandırılan bu oluşumlar sayesinde emilim yüzeyi çok genişler.

c) Henle Kulpu (İntermedial Tübül): İnen ince, çıkan ince ve çıkan kalın henle kulpu olmak üzere üç parçası bulunur.

1°- İnen Henle: Proksimal tübülün düz parçasından sonraki bölümdür. Medulada bulunur. Çapı en dar olan tübüldür. Bu tübülün duvarını oluşturan hücreler yassıdır. Yassı olan bu hücrelerin çekirdekleri, lumene doğru şişkinlik yapar. Kesitlerde kılcal damarlar ile karıştırılabilir. Ancak, kılcalların çekirdekleri heterokromatiktir ve stoplazmaları çok daha azdır.

2°- Çıkan İnce Henle: Bu da inen henle gibi yassı epitele sahip olup medullada bulunur. Ancak çıkan ince henle, inen henleden daha geniş çaplıdır.

3°- Çıkan Kalın Henle: Duvarı tek katlı kübik epitel ile döşelidir. Kortekse girdiğinde histolojik yapısını koruyarak distal tübül ile devam eder. Bu hücrelerin stoplazmaları asit boyalarla koyu tonda boyanır.

d) Distal Tübül: Çıkan henlenin devamı şeklindeki düz parça ile ondan sonraki kıvrımlı parçadan ibarettir. Kortekste bulunurlar. Proksimal tübülden daha kısadır; buna bağlı olarak histolojik preparatlarda proksimal tübüle göre

daha seyrek görülür. Tübüldeki hücrelerin sınırları belirgin değildir, stoplazmaları da asit boyalarla soluk boyanır. Düzenli, belirgin bir fırçamsı kenar yoktur. Bu nedenle lümenleri, proksimal tübülden daha geniştir. Lümene bakan hücre yüzeyi kısa, düzensiz, seyrek mikrovilluslar taşır. Apikal yüzde madde alışverişi ile ilgili farklılıklar, bu bölümün proksimal tübülden daha az reabsorbsiyon yaptığını gösterir. Ancak, yine madde alışverişini sağlayan yapılar olarak, hücrenin derinlerine kadar uzanan çok belirgin bazal labirent (bazal invaginasyon) tablosu görülür. Bazal labirentlerle çevrili olan stoplazmada bol miktarda mitokondri bulunur. Buradaki mitokondriler karmaşık bir membran yapısı gösterirler ve çok sayıda matriks granülleri içerirler. Bu sitolojik özellikler de, damar sistemi yönünde aktif bir sıvı transportunun varlığını ortaya koyar. Afferent ve efferent arteriol arasında prizmatik ve tübül lumenine doğru uzanan bir plak (disk) şeklinde çıkan kalın henle kulpunun sonunda, distal tübülün başlangıcında bulunan tübül hücrelerine *makula densa* denir. Bu hücreler damar kutbunda, afferent arteriyolden geçen kan miktarının düzenlenmesinde rolü bulunan oluşumlardandır.

Jukstaglomerüler (JG) Aparey: Malpighi cisimciğinin hemen bitişiğinde, afferent arteriyolun tunika mediasında düz kas hücreleri bulunmaktadır. Bu hücrelere JG hücreler denir. Bu hücrelerin çekirdekleri elips biçimindedir ve stoplazmaları PAS tekniği ile boyanan granüllerle doludur. JG hücrelerin yer aldığı afferent arteriol kısmı, makula densa ile birlikte JG apareyi oluşturur. JG apareyin üçüncü sac ayağını da fonksiyonu henüz tam anlaşılmayan açık renk boyanan hücreler oluşturur. Bu hücrelere ekstraglomerüler mezengial hücreler, *Lacis hücreleri* ya da *polkisen (kutup yastığı)* şeklinde değişik isimler verilir.¹⁹ Bu hücrelere *Goormaghtigh hücreleri* de denir ve geçmişte eritropoetin hormonu salgıladıkları öne sürülmüştür.²⁰

e) Toplayıcı Tübül: Distal tübülden sonraki kısa bağlantı kollarıdır. Duvarlarını, sınırları çok belirgin, stoplazmaları iyi boya almayan kübik hücreler oluşturur. Korteks-medulla sınırında uzanan bu tübüller birleşerek medullaya geçerler ve böbreğin toplayıcı kanalcıklarını şekillendirirler.

2.1.2.2. Toplayıcı Kanallar

Böbrek parankiminin bu bölümünde; a) Kortikal toplayıcı kanal b) Papillar kanal oluşumları bulunmaktadır.

a) Kortikal Toplayıcı Kanal: Toplayıcı tübüllerden sonraki kanalcıklardır. Medullanın kortekse komşu olan kısmından, medullar radyuslardan başlarlar.

Duvarlarını oluşturan epitel hücrelerinin sınırları çok belirgindir. Bu hücreler organelden fakir ve soluk stoplazmalıdır. Başlangıçta basık prizmatik olan hücreler, renal pelvise doğru yüksek prizmatik bir şekil alırlar; buralarda çapları da çok artar.

b) Papillar Kanal: Toplayıcı kanalların birleşmesiyle şekillenir. Duvarında genellikle tek katlı çok yüksek prizmatik, değişken epitel söz konusudur. İçinde son idrarı taşıyan bu kanal, renal pelvise açılır.^{19,18}

2.1.3. Böbreğin Fizyolojisi

Böbrekler su ve elektrolit fazlasının idrarla birlikte vücut dışına atılmasını sağlayarak plazma hacmi, dolayısıyla kan basıncının ve vücut sıvılarının içeriklerinin düzenlenmesinde rol alan hayati organlardır. Su ve elektrolit regülasyonunun yanı sıra, vücuttaki metabolik atıkların, yabancı maddelerin ve diğer birçok metabolik ürünün idrar yoluyla atılımında rol oynar. Tüm bu işlevleri glomerüler filtrasyon, tübüler absorpsiyon ve tübüler reabsorpsiyon işlemleri sonucu gerçekleştirir. Uzun süreli açlıkta glukoneogenez de yaparak kan glukoz düzeyine katkıda bulunur.²¹

2.1.3.1. Böbreğin İşlevleri

Vücudun sıvı osmolalitesi ve hacmini düzenler. Vücuttaki tüm dokuların hücre hacimlerinin devamı için önemlidir. Vücut sıvılarının hacminin kontrolü, kardiyovasküler sistemin normal fonksiyonu için gereklidir. Böbrekler; kardiyovasküler sistem, endokrin ve santral sinir sistemi birimleriyle işbirliği içinde çalışarak su ve sodyum atılımını düzenler.

Böbreklerin önemli bir fonksiyonu da elektrolit dengesini düzenlemeleridir. Vücuttaki sodyum, potasyum, klor, bikarbonat, hidrojen, kalsiyum, fosfat gibi bazı inorganik iyonların düzenlenmesinde temel rolü üstlenirler.

Asit baz dengesinin düzenlenmesinde böbrekler önemli görevler alırlar. Vücudun metabolik fonksiyonları için pH 'ın dar bir aralıkta bulunması (7,35-7,45) çok önemli ve gereklidir. Akciğer, karaciğer ve böbreğin koordineli çalışması ile vücut sıvılarındaki pH 'ın düzenlenmesi sağlanır.

Böbrekler metabolik ürünlerin ve yabancı maddelerin atılımını sağlarlar. Bu metabolik ürünlerden üre aa'lerden, ürik asit nükleik asitlerden, kreatinin kaslarda oluşan kreatinden kaynaklanırlar.

Bir takım hormonların üretimini ve sekresyonunu böbreklerde gerçekleştirir. Böbrekler renin, eritropoietin ve kalsitriol sentez ve salınımı yapan önemli endokrin organlardır.

Renin salgısıyla böbrekler renin-anjiyotensin-aldosteron sistemini aktive ederek kan basıncını ve sodyum, potasyum dengesini düzenlerler. Böbrekten salgılanan eritropoietin kemik iliğinde eritrosit yapımını uyarır. Kronik böbrek yetmezliğinde anemi meydana gelmesinin sebebi de eritropoietin yapımındaki azalmadır.

Kalsitriol (1,25-dihidroksikolekalsiferol de denen aktif D₃ vitamini) böbreklerin proksimal tübüllerinde, 25-hidroksikolekalsiferolden oluşur. Bu reaksiyonu mitokondrial P-450 sistemine ait 1 α -hidroksilaz enzimi katalize eder. Bu reaksiyon için NADPH, O₂ ve renoredoksin ya da ferrodoksin olarak bilinen bir flavoproteine ihtiyaç duyulur. Normal plazma düzeyi 0,03 ng/ml (yaklaşık 100 pmol/l)'dir. Daha az etkin olan metabolit 24,25-dihidroksikolekalsiferol de böbreklerde yapılmaktadır. Kalsitriol; kalsiyumun gastrointestinal sistemden emilimi ve kemiklerde depolanması için gereklidir. Böbrek yetmezliği durumlarında kalsitriol yapımı azalacağından kalsiyum emilimi böbrek ve ince bağırsaklarda azalır ve sonuçta bu hastalarda anormal kemik formasyonları oluşur.^{21,16}

2.1.3.2. Böbrek Kan Akımı

Kardiyak outputun % 20-25'i (1200 ml) renal arter yoluyla böbreklere gelir. Abdominal aortadan ayrılan renal arterler böbrek içinde interlobüler, arkuat ve radial arterleri ve en son olarak da afferent arteriollerini oluştururlar. Her bir nefron afferent arteriol tarafından kanlanır. Afferent arterioller glomerüler kapiller yatağı oluşturacak şekilde dallara ayrılır. Kapillerler de birleşerek efferent arteriollerini oluştururlar. Efferent arterioller böbreklerin geri kalan kısmının kanlanmasını sağlamak için peritübüler kapiller yatak adı verilen ikinci kapiller yatağı oluştururlar. Jukstamedüller nefronlarda efferent arterioller peritübüler kapiller yatak dışında *vasa rekta* adı verilen, medullanın derinliklerine kadar ulaşan ve henle kulplarına eşlik eden damarları da oluşturur. İnen vasa rektada; üre için kolaylaştırıcı bir taşıyıcı içeren penceresiz endotel, çıkan vasa rektada ise solütü koruma işlevi ile uyumlu pencereci endotel bulunur. Tüm bu arteriyel dolaşımdan sonra kan venlere, en son olarak da renal vene drene olur. Glomerüler kapiller yatak arteriollerden oluşması nedeni ile diğer kapillerlerden farklılık gösterir ve buna bağlı olarak da diğer kapillerlere

göre daha yüksek hidrostatik basınca sahiptir (60 mmHg) ve bu yüksek hidrostatik basınç sıvının çabuk filtrasyonuna neden olur. Peritübüler kapillerlerdeki çok daha düşük olan hidrostatik basınç (13 mmHg) sıvının çabuk geri emilimine olanak sağlar.¹⁶

2.1.3.3. Böbreğin Tübüler İşlevleri

Böbrekte çok fazla miktarda sıvı hareketi vardır. Bu işlev, özgün bir farklılaşma gösteren tübül sistemiyle gerçekleştirilir. Tübüllerin etrafındaki kılcallar çok ince duvarlı olup sıkı bir ağ örgüsü (peritübüler kapılar ağ) biçiminde kortekste yer alırlar.

Ultrafiltrasyondan sonra efferent arteriyol içerisinde kalan yüksek viskozitedeki kan, kortikal tübül hücrelerinin bazalinde onkotik basıncın artmasına neden olur; artan bu onkotik basınç da reabsorbsiyon sırasında etkili bir biçimde transselüler sıvı akımını destekler. Proksimal tübüllerde özellikle su, glikoz, küçük moleküllü proteinler ve kimi iyonlar geri emilirler. Na^+ , Cl^- iyonlarının büyük bir kısmının geri emilmesi, su ile birlikte gerçekleşir. Su ile birlikte absorbe edilmelerinden dolayı proksimal tübül içeriği, glomerüler filtrata göre osmolaritesini korur (İzotonik, 300 mmol/L).

Safra tuzları, oksalat, katekolaminler gibi organik asit ve bazlar da proksimal tübülden salgılanır. Ayrıca pek çok ilaç (pensilinler, salisilatlar) ve toksin de bu tübülden salgılanarak kandan temizlenir.

Henle kulpu, primer idrarın hipertonic durumdaki sekonder idrara dönüşmesinde görevli, yoğunlaştırıcı bölümdür. İnen ince henle kulpu suya çok fazla, üre, Na^+ ve diğer solütlere orta derece geçirgendir. Böylece böbrek medullası derinliklerine uzanan ince inen henle kulpu glomerüler filtrata göre hipertonicdir.

Çıkan ince henle kulpu ise suya geçirgen değildir. Orta derecede üre, NaCl ve diğer solütlerin geçişine pasif olarak izin verir.

Çıkan kalın henle kulpunun ise metabolik aktivitesi yüksek olup; burada filtre olan Na^+ , Cl^- ve K^+ 'un % 25'inin aktif transporla geri emilimi gerçekleşir. Ca^{+2} , Mg^{+2} ve HCO_3^- gibi iyonların emiliminin büyük bir kısmı da bu bölümde meydana gelir. Ayrıca sodyum emilimiyle birlikte zıt taşıma sonucu H^+ atımı da bu bölümde gerçekleşir. Suya karşı geçirgen olmamasından dolayı çıkan kalın henle kulpu kortekse doğru ilerledikçe içeriği hipotonik olur.²²

Distal tübülde çok yoğun ortama doğru aktif bir sodyum iyonları transportu bulunur. Hormonal kontrol yoluyla (adrenal korteksten salgılanan aldosteron ve

hipofiz arka lobundan gelen vazopressin) öncelikle elektrolitlerin (Na, K, Cl) ve suyun atılmasında duyarlı bir ayarlama yapılır. Bu yüzden distal tübül asit-baz dengesinin ve su metabolizmasının düzenlenmesinde, dolayısıyla tüm organizmada iç ortamın dengede tutulmasında (homeostazis) büyük önem taşır.

Toplayıcı kanallarda iki tip hücre vardır. Bunlardan principal (P) hücreleri, az sayıda mitokondri ve diğer organellere sahip, parlak görünümlü uzun hücrelerdir. Na^+ ve vazopressine bağımlı su geri emiliminde rol oynarlar. İnterkale (I) hücreler ise daha az sayıda olmalarına ve koyu gri görünümüne karşın daha fazla mitokondri, stoplazmik vezikül ve mikrovillusları bulunmaktadır. Bu hücreler asit salgılanmasında ve HCO_3^- salgılanmasında görev alır.¹⁶

2.1.4. Böbrek İskemi Reperfüzyonu

2.1.4.1. Renal İskemi-Reperfüzyonda Lökositlerin Rolü:

I/R sonrasında gelişen böbrek hasarı ve yetmezliklerinde lökositlerin özellikle de nötrofillerin önemli rollerinin olduğuna dair oldukça fazla miktarda kanıt vardır.^{23,24} Bu kanıtlar uzun yıllar boyunca yapılan araştırmalar sonucunda ortaya çıkmıştır: İskemik ABY sırasında nötrofillerin böbrek dokusunda aşırı miktarda birikmesi, nötrofillerin yokluğunda iskemi oluşturulduğunda doku hasarının önemli derecede azalması, deneysel böbrek yetmezliğinin seyrinde anti-adezyon tedavisinin oldukça etkin şekilde seyri değiştirdiğinin bulunması iskemik ABY’de nötrofillerin rolünü ortaya koyar. Bununla birlikte bazı araştırmacılar, savunulan konuların tam tersine bazı bulgular elde etmişler ve lökosit baskılanmasının veya doku invazyonunun önlenmesinin herhangi bir koruyucu etkisinin olmadığını göstermişlerdir. Örneğin Paller, antinötrofil serumu kullanarak nötrofilleri devre dışı bırakıp iskemi yaptığında böbrek fonksiyonların kontrol grubundan herhangi bir farklılığı olmadığını görmüştür. Burada kontrol grubu olarak nötrofil baskısı yapılmadan oluşturulan iskemik hasar kullanılmıştır.²⁵ Thornton ve ark. ise antiserum kullanarak yaptıkları nötrofil baskılanmasının ardından 50 dakika içerisinde böbrekte iskemi geliştiğini tespit etmişlerdir.²⁶ Bu negatif bulgulara rağmen daha fazla kabul gören ve üzerinde çalışılarak daha fazla kanıt bulunan konu, lökositlerin hasarı artırıcı ve böbrek yetmezliği yapıcı etkisi olduğu yönündedir.

Polimorfonükleer lökositlerin (PMNL) aktivasyonu, sonuçta organ hasarına sebep olan birçok sürecin önemli bir aşaması konumundadır. Böbrek I/R’unda,

PMNL'nin olay yerinde toplanıp aktive oldukları kesin olarak gösterilmiş olup ABY başta olmak üzere birçok diğer akut böbrek hastalıklarında da fonksiyon gördüğü gösterilmiştir. Akut glomerüler nefritte adezyon molekülleri, granül enzimleri, reaktif oksijen türleri (ROT), lipid metabolitleri ve nötrofiller ile monositlerden salgılanan sitokinler glomerül kapillerinin konstriksiyonuna ve oklüzyonuna sebep olarak tübül hasarı ve ABY gelişmesine sebep olurlar.²⁴ Bütün bu patolojilerin gelişmesinde PMNL'nin rolünün ne olduğu ve mutlaka bu süreçler için gerekli olup olmadığı konusu ise henüz kesinlik kazanmamıştır.

Renal I/R'da PMNL aktivasyonuna yol açan kesin mekanizmalar tam olarak bilinmemekle birlikte kısmen gösterilmiştir. Doku reperfüzyonu esnasında lokal olarak üretilen ROT, otokrin, parakrin, endokrin mediatörler ve sitokinler salgılanarak endotel hücrelerinin adezif özelliklerini değiştirir ve kan hücrelerinin dokuya geçişini kolaylaştıracak şekilde geçirgenliği artırır. Lökosit adezyon moleküllerinin, PMNL göçünü arttırdığı bilinmektedir. Monoklonal antikorlar, antisens oligonükleotidler, *gen knock-out teknikleri*, CD11/CD18 integrinlerin ve hücrelerarası adezyon molekülü-1 (ICAM-1) blokajının böbrek iskemisinde ABY'yi engellediğini gösterilmiştir.^{27,28} Araştırmacılar ayrıca PMNL'lerin önceden uyarılmasının I/R'dan sonra renal lökosit yoğunlaşmasında çok etkili olduğunu savunmaktadırlar. Bu fenomen özellikle sepsisli hastalarda büyük önem kazanmaktadır, çünkü sepsis sürecinin sonunda renal hipoperfüzyon ve PMNL aktivasyonu görülmektedir.²⁴ İskemik böbrekten elde edilen PMNL'ler izole edilmiş başka böbreklere perfüzyon yolu ile verildiğinde, bunlarda ABY'yi uyarmaktadır. Bu da göstermektedir ki önceden bir şekilde uyarılmış ve aktive edilmiş PMNL'ler böbreklere önemli derecede hasar verebilmektedir.

Nötrofillerin böbrekte doku hasarı oluşturmalarının bugüne kadar tespit edilebilmiş birkaç tane ana mekanizması vardır:

1-Oksidatif mekanizmalar: Bir hedefe doğru yönelmiş nötrofillerin plazma membranında NADPH oksidaz enzimi bulunmaktadır. Bu enzim normal moleküler oksijenden ROT üretmektedir. Üretilen bu ürünler O_2^- , hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalidir ($\cdot OH$). İlk başta stimüle olmamış eritrositlerde NADPH oksidaz enzimi inaktiftir, daha sonra solunumsal patlama ile aktive olarak elektronları moleküler oksijene aktarır ve radikalleri oluşturmaya başlar. Bu reaksiyonlar zincirinde en son aşama, miyeloperoksidaz enziminin peroksidatif etkisi ile hidrojen peroksit halid elementlerini (Cl^- , Br^- , I^-) ekleyerek aşırı oksidan ürünler olan $HOCl$, $HOBr$ ve HOI oluşmasıdır. Nötrofillerden üretilen bu ROT ile glomerüler hasar arasında direkt bir ilişki

bulunmuştur. Granulomatöz hastalığa sahip bireylerin nötrofilleri izole iskemik böbreklere perfüzyon yoluyla verildiğinde böbrek hasarı meydana gelmemektedir. Granulomatöz hastalıkta nötrofillerin tek kusuru O_2^- üretememesidir. Diğer birçok deneysel çalışmada nötrofillerin olmadığı ortamda H_2O_2 katalaz (KAT) enzimi ile yok edilmesi hasarı azaltmamış, fakat nötrofillerin varlığında reperfüzyon hasarını azaltmıştır. Bu göstermektedir ki; diğer bölgesel kaynaklardan değil de nötrofilden kaynaklanan ROT böbrek dokusunda ilerleyici bir hasara sebep olmaktadır.²³

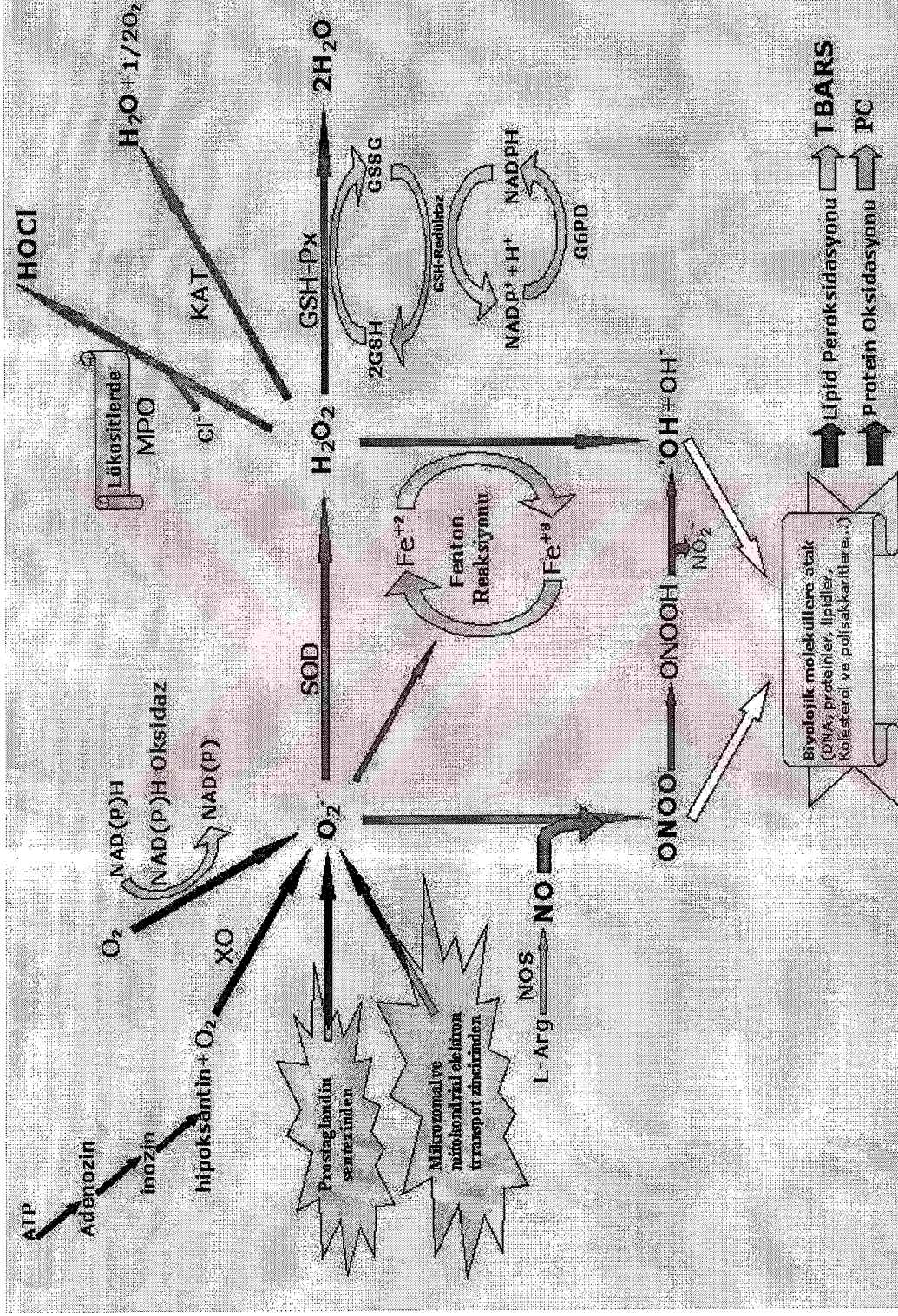
2-Oksidatif olmayan mekanizmalar: Nötrofillerde bulunan bazı granüller; mikrobisidal peptidler, proteinler ve hidrolitik enzimler içermektedir. Örneğin lizozomal granüllerden elde edilen katyonik proteinler vasküler geçirgenliği *in vivo* şartlarda arttırmaktadır. Proteazlar hem *in vitro*, hem de *in vivo* şartlarda vasküler bazal membranda yıkım oluştururken nötrofil kaynaklı bir protein olan heparinaz subendotelial matriksteki heparan sülfatı hızlı bir şekilde parçalar.²³ Bu granüllerin içinde bulunması muhtemel olan lizozim ve kollajenaz enzimleri hücre zar bileşenlerini parçalar. Diğer taraftan hidrolazlar, antimikrobial defensinler, birçok proteolitik ve sakkarolitik enzimler ise mikrobial yapısal proteinleri ve mukopolisakkaritleri sindirirler. Dikkatle incelendiğinde nötrofil granüllerinin yirmiden daha fazla enzim içerdiği görülecektir. Bunların içinde en etkin şekilde doku hasarı oluşturanlar; serin proteazlar, elastaz, metalloproteinazlar (kollajenaz ve jelatinaz)'dır. Herhangi bir inflamasyon veya uyarıcı faktörler sonucunda ağıza çıkan bu yıkıcı enzimler sadece hedef ajan patojenlere etki etmekle kalmaz, aynı zamanda o ortamda bulunan sağlam hücrelere de zarar verir.²³

3- Oksidatif ve oksidatif olmayan mekanizmaların sinerjistik etkisi: Nötrofiller proinflamatuvar stimuluslarla uyarıldıklarında oksidazlar ROT üretilip salgılamaya başlarlar. Eş zamanlı olarak plazma membranı ile kaynaşan granüller içeriklerini ekstrasellüler kompartmana ve fagositik vakuollere boşaltırlar. Her ikisinin aynı anda ortama salınması birbirlerinin etkisini kuvvetlendirecek şekilde olaylar zincirini başlatır. Proteinazların etkisi antiproteinazlarca kontrol edilmeye çalışılır. Fakat ortama salgılanan ROT'un antiproteinazları inhibe etme gibi bir etkisi olduğundan proteazlar daha efektif olarak doku hasarı oluşturabilme imkanına kavuşur. Tüm bu olaylar I/R sırasında nötrofillerin böbrek dokusundaki hasar yapıcı etkinliğini artırır.²³

2.1.4.2. Renal İskemi-Reperfüzyonda Reaktif Oksijen Türlerinin (ROT) Rolü

Serbest radikaller ortaklanmamış bir elektron taşıyan kimyasal olarak hayli reaktif türler olarak bilinmektedir. İnsan vücudunda moleküler oksijenin kullanılma oranı ve dağılımı çok yüksek olduğundan serbest radikal denince ilk akla gelen bileşikler serbest oksijen radikalleridir. Daha genel bir anlamda bunlara ROT adı da verilmektedir. Bunlar yukarıda da bahsedildiği gibi $O_2^{\cdot-}$, singlet oksijen, $\cdot OH$ ve H_2O_2 'dir. Bunların endojen ve eksojen kaynakları mevcuttur. I/R esnasında bol miktarda ROT üretilmektedir. Bunların en baş kaynağı yukarıda da bahsedildiği gibi aktive olmuş nötrofillerdir. İkinci olarak; iskemik esnasında ATP'nin aşırı bir şekilde azalması şu olaylarla sonuçlanır: 1) ATP'nin yıkım ürünü olan hipoksantin artar. 2) ATP-bağımlı membran iyon pompalarının görevini tam yapamaması sonucu hem mitokondrial hem de sitozolik kalsiyum seviyeleri artar. Hipoksantin normalde ksantin dehidrogenaz halinde bulunan bir enzim tarafından ürik aside kadar yıkılır. Ancak iskemik durumlarda kalsiyumun indüklediği proteolitik bir parçalanma ile bu enzim ksantin oksidaz haline gelir ki, ilk enzim ile katalizlenen reaksiyonda herhangi zararlı bir yan ürün oluşmazken ikinci enzim ile katalizlenen reaksiyonda $O_2^{\cdot-}$ 'ları oluşur.²⁹ Fenton reaksiyonu olarak bilinen ve geçiş elementlerinden Fe^{+2} etkisi ile H_2O_2 'den en potent serbest radikal olan $\cdot OH$ oluşturan reaksiyon, böbrek iskemisi ile hızlanmaktadır. Yapılan bir çalışmada *in vivo* şartlarda postiskemik böbrek dokusunda serbest demir ve hemoglobin miktarının artarak bu tür Fenton reaksiyonlarının görülebileceğini ve bol miktarda radikal oluşabileceği bildirilmiştir.²⁹ Son olarak intrasellüler Ca^{+2} konsantrasyonunun postiskemik dönemde artması nedeniyle membranda bulunan fosfolipaz enzimi aktive olmakta, bu da araşidonik asit kaskadını harekete geçirerek prostanoid sentezinde artmaya ve yan ürün olarak ROT üretiminde artmaya sebep olmaktadır.²⁹

Direkt iskemik hasardan ayrı olarak yeniden oksijenlenme ile daha geniş çapta hasar oluşmakta ve böbrek yetmezliği ihtimali artmaktadır. Diğer organlarda olduğu gibi yeniden oksijenlenme yukarıda anlatılan mekanizmalarla ROT üretiminde artmaya sebep olmaktadır. Aşırı miktarda üretilen bu ROT, birçok farklı molekülle direkt veya indirekt olarak reaksiyona girerek hücresel hasar oluşturur. Bunlardan en önemli olanı ilk elden hücre ve organel membranlarında olan hasarlardır. Lipid peroksidasyonu olarak adlandırılan ve hücrenin ölümüne neden olabilecek olaylar zincirini başlatan kimyasal



Şekil 1: Başlıca süperoksit radikali (O₂•⁻) oluşum ve hasar oluşturma mekanizmaları ile hücrel antioksidan enzim sisteminin bu hasar yolağından koruması (Şekil; kaynak 69, 111'den yararlanılarak yapılmıştır).

reaksiyonlar tamamen ROT atağı sonucunda meydana gelmektedir. ROT ayrıca nükleer faktör kappa B (NF- κ B) gibi bazı redoks-sensitif transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu yoluyla bazı genlerin ekspresyon hızlarını değiştirebilir. Bunlardan en çok bilineni, endotel adezyon molekülleri olarak bilinen ICAM-1 ve VCAM-1 moleküllerinin upregülasyona uğraması ve bunların da lökositlerin endotel hücrelerine ve damar duvarına geçişini hızlandırmasıdır.^{30,31}

2.1.4.3. Renal İskemi-Reperfüzyonda Nitrik Oksidin (NO) Rolü

NO üretiminin artması renal hasarın oluşmasında önemli bir basamaktır. NO güçlü bir vazodilatör olmasına rağmen proinflamatuvar aktivitesi bunun önüne geçerek I/R'da faydalı hemodinamik etki yapmasını engellemektedir. İndüklenebilir NO sentaz (iNOS) enzim geni bulunmayan farelerin kullanıldığı bir çalışmada renal I/R hasarının azaldığı gösterilmiştir.³² Diğer bir çalışmada; hipoksinin iNOS genini aktive ederek NO üretimini arttırdığı, böylece inflamasyonu arttırıcı etki yaparak zararlı etkilerin açığa çıktığı ileri sürülmüştür.³³

Postiskemik dokulardaki endotel genellikle NO'nun vazodilatör etkisine cevap verir, bu etki yaklaşık olarak oniki hafta devam eder. Böbrekte iskemiye bağlı olarak renal kan akımı (RKA)'nın ve glomerül filtrasyon hızı (GFH)'nin azalmasının bir sonucu olarak bozulmuş NO etkisi ile birlikte endotelin üretiminde de bir artış söz konusudur.²⁹

NOS inhibisyonunun RKA'nı, idrar akım hızını ve üriner Na⁺ atılım hızını azalttığı deneysel çalışmada gösterilmiştir.⁶ Son yapılan bazı çalışmalarda I/R hasarı ile NO arasında sıkı bir ilişkinin varlığı gösterilmiştir. Schramm ve ark. ABY oluşturulan sıçanlarda L-Arginin verilmesi ile GFH'nda düzelme tesbit etmişler.⁷ NO ile O₂⁻ reaksiyonu sonrası meydana gelen ONOO⁻ doku hasarına yol açan bir başka radikaldir. İskemi sonrası ONOO⁻'in böbrek hasarında yeraldığına ilişkin çalışmalar mevcuttur. L-NAME verilerek ve verilmeyerek yapılan böbrek I/R'sinde NO'nun, direkt olarak elektrotla monitorize edilmesi sonucunda sitoprotektif bir ajan olduğu sonucuna varılmıştır.⁶ Araştırmacılar NO'nun bu etkisini nötrofillerin böbrek dokusuna girişini bloke ederek bu hücrelerin dokuda oluşturacağı hasarı engellediğini, böylece tübüler fonksiyonların korunduğunu iddia etmişlerdir.⁶

2.1.4.4. Renal İskemi-Reperfüzyonda Hücre Adezyon Moleküllerinin (HAM) Rolü

İskemik hasarda en çok etkilenen ve patofizyolojiden primer olarak sorumlu olan anatomik böbrek kısmı proksimal tübüllerdir. İskemik hasar esnasında proksimal tübül hücreleri ekstrasellüler matriksten ayrılır ve tübül lümenine dökülür. Bunun klinik olarak ortaya konması idrarda bu hücrelerin tesbit edilmesi ile olmaktadır. Bu hücrelerin herbiri diğerinden ayrı olarak idrarda tesbit edilmektedir çünkü hücreleri birleştiren moleküller parçalanmıştır.³⁰ Bu arada apikal membran materyallerinin ve diğer hücresel bileşenlerin lümen içine geçtiği tesbit edilmiştir. Zuk ve ark. iskemiye takiben integrinlerin apikal kısma doğru yeniden dağılıma uğradığını göstermişlerdir. Bununla beraber bu çalışmada iskemi ve apikal integrinlerin görünümü arasında bir gecikme vardı.³⁴ Ayrıca apikal membranın marker enzimi olan lösin aminopeptidaz ve bazolateral membranın markeri $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPaz}$ enziminin poliarize dağılımı kayba uğramıştır. Renal iskemi sırasında aktin iskelet sisteminin dağılmasıyla adezyon birleştirme kompleks bütünlüğü de bozulur. Sıkı bağlantıların bozulmasıyla epitel hücrelerinin parasellüler bariyeri kaybolur ve luminal sıvının interstisyel boşluğa geçişi ile sonuçlanır ki, bu da birçok patolojiyi beraberinde getirir.³⁰ Şu ana kadar lökositlerde 3 tip adezyon molekülü tariflenmiştir: selektinler, integrinler ve Ig süperailisi. L-selektinler lökositlerde konstitutif olarak ifade edilirken E-selektin ve P-selektin stimüle edilmiş endotel hücrelerinden ve trombositlerden lokal sitokin üretimi üzerine cevap olarak eksprese edilmektedir. Reperfüzyon hasarı sırasında önemli olan bir gelişme, endotel üzerindeki E-selektinlerin lökosit üzerinde bulunan karbohidrat içeren eşlerine bağlanmalarıdır. İskemik hasarı takiben integrinler lökositlerle ilgili hasara katkıda bulunmaktadırlar. İki major integrin sınıfı olan VLA-4 ve CD11/CD18 selektinlerin yardımıyla aktive olmuş lökositlerden eksprese edilip salgılanmakta ve lökositlerin endotele bağlanmasını sağlamak üzere ICAM-1'e bağlanmaktadır.^{30,35} Böylece iskemiye takiben salgılanan enflamatuvar araçlar endotel hücrelerinde ve lökositler üzerinde bulunan adezyon proteinlerinin upregüle olmasını sağlarlar. Bu olay üzerine lökositler hasarlı bölgeye doğru yönelmekte, ilgili bölgeye yapışmakta ve damar dışına çıkmaktadır. Aktive olmuş lökositler daha sonra ek olarak enflamatuvar araçları, proteazları ve oksidan ajanları salarak iskemik hasarın derinleşmesini sağlamaktadır. Bu konuda elde edilen son bilgiler, hem soğuk hem de sıcak iskemiye takiben lökositlerin selektinlerle module edilen mekanizmalarla olaya katkısının klinik

açından önemli olduğu ileri sürülmektedir. Araştırmacılar p-selektin glikoprotein ligandlarının suda eriyen formlarını kullanarak I/R'ı takiben lökositlerin infiltrasyonunu inhibe edilebildiğini ve I/R hasarındaki renal disfonksiyonun engellenebildiğini ifade etmişlerdir.³⁰

2.1.4.5. Renal İskemi-Reperfüzyonda Sitokinlerin ve Kompleman Sisteminin Rolü

Sitokinlerin; allogenik organ transplantasyonunu takiben oluşan böbrek inflamasyonu, enfeksiyon ve akut/kronik atılım reaksiyonlarında kritik bir rol oynadığı bilinmektedir. İskemiden sonraki hasarı takiben akut faz cevaplı sitokinler adında bir grup sitokinlerin salgılandığı ve bunların doku hasarı oluşumunda önemli rol oynadığı iddia edilmektedir. Bugüne kadar kalp ve pulmoner sistem başta olmak üzere I/R'dan sonra birçok sitokin (IL-1 β , IL-2, TNF- α , IL-6, IL-8, INF- γ) dokularda mRNA düzeylerinin ve direkt miktarlarının arttığı bulunmuştur.^{36,37,38} Böbrek I/R modellerinde yapılan çalışmalarda hasarlı böbrek dokusunda INF- γ , IL-2, IL-10, granülosit/makrofaj ve TGF- β 1 mRNA larının önemli oranda arttığı gösterilmiştir. Aynı sitokin çalışmaları transplantlarda da çalışılmış olup benzer sonuçlar elde edilmiştir.³⁶ Zhou ve ark. C3, C4, C5, ve C6 eksikliği olan farelerin I/R hasarındaki durumlarını incelemişler, C3 ve C5 eksikliği olan farelerin iskemik hasara karşı daha iyi korunduğunu oysa C4 eksik farelerin korunmadığını göstermişlerdir.³⁹ Araştırmacılar buradan hareketle kalbin tersine böbrek I/R hasarında komplemanların primer etkilerinin MAC aracılı olarak sekonder şekilde, epitel hücreleri üzerine olduğunu savunmuşlardır. Ayrıca ne C4'ün dahil olduğu klasik yol ne de C5 aracılı nötrofil infiltrasyonu I/R hasarına katkıda bulunmamaktadır.⁴⁰

2.1.4.6. Renal İskemi-Reperfüzyonda Apoptozis

Apoptoziste inflamasyonun olmayışı, nekrozdan farklı olarak organellerin fizyolojik ve patolojik dengelerinin bozulmadan hücre ölümünün gerçekleşmesini sağlar. Hücrelerde meydana gelen bir çok değişiklikten hücrenin apoptotik sürece ya da nekrotik sürece girdiğini anlayabiliriz. Liberthal ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada, nekrozisde proksimal tübül hücrelerinin ATP düzeyinde çok şiddetli bir azalma gözlenirken apoptoziste orta düzeyde azalma tesbit edilmiştir.⁴¹ Aynı araştırmacılar başka bir çalışmalarında, düşük doz sisplatinin apoptozise neden olduğunu gösterirken, ancak yüksek doz

sisplatinin nekroza neden olduğunu göstermişlerdir.⁴² Yapılan bir *in vivo* çalışmada Schumer ve ark. kısa renal iskemik periyottan sonra on iki saatlik reperfüzyondan sonra hücrede morfolojik, biyokimyasal ve moleküler apoptotik değişiklikler tespit etmişlerdir.⁴³ Ueda ve Shah böbrek tübül epitel hücrelerinde hipoksi/reoksijenasyon hasarında hücre ölümü ve DNA bozulmasında endonükleaz aktivitesinin rolü olduğuna dair güçlü kanıtlar sunmuşlardır. Işık ve elektron mikroskopunda apoptozisdeki morfolojik değişiklik ve kromatin yoğunlaşması gözlemlenememiştir.⁴⁴ Son yapılan çalışmalarla birlikte, kromatin yoğunlaşmasının ve DNA fragmentasyonunun metabolik yollarla gerçekleştiği öngörülmektedir. Kaushal ve ark. böbrek tübül hücrelerinde ve I/R hasarında kaspazların katılımını göstermişler.^{45,46} Kaspazlar, sistein içeren hücre içi inaktif bulunan proteazlardır. Apoptoziste hücre içi sinyaller mitokondri aracılığı ile kaspazları aktive ederler. Aktive olan kaspazlar ise DNA bağlantısını kırarak endonükleazların ortaya çıkmasına yol açarlar. Bundan başka aktini yıkarlar ve hücre membranında konfigürasyon değişiklikleri meydana getirirler. İskemik hasara yanıtta tübüler hücre ölümünün anti-apoptotik Bcl-2 ailesiyle engellendiği gösterilmiştir.⁴⁷

İskemik yanıt ile meydana gelen apoptotik hücre ölümünün homeostazis’de herhangi bir faydası olduğuna dair açık bir bilgi bulunmamaktadır. Apoptozisi engelleyen teröpatik ajanların kullanımından önce bu sistemdeki olayları çok daha iyi kavramamız gerektiği açıktır.⁴⁷

2.1.4.7. Renal İskemi-Reperfüzyonda Endotelinin Rolü

ABY; GFH ani ve şiddetli düşme ile karakterizedir. GFH’daki bu düşmeden sorumlu mekanizma ABY’nin farklı tipleri arasında değişebilir. Bu konuda genel bir mekanizma tanımlanmamıştır. Son 15 yılda yapılan çalışmalarda, ET-1’in böbrek yetmezliğinin patogeneğinde önemli bir role sahip olduğu anlaşılmıştır. ET-1’in GFH ve RKA’ndaki azalmadan tek sorumlu ajan olmadığı açıktır. Fakat endotelin reseptör antagonistleriyle yapılan deney hayvanı çalışmalarında başta iskemik ABY deney modelleri olmak üzere birçok ABY türünde, endotelin reseptör antagonistlerinin önemli yararlar sağladığı görülmüştür. İnsanlar üzerinde bu konudaki çalışmalar henüz yetersizdir.

ET-1’in ABY ve kronik böbrek yetmezliği (KBY) fizyopatolojisinde önemli rol oynadığına dair ciddi kanıtlar vardır. Günümüzdeki araştırmalar endotelin reseptör antagonistlerinin ABY ve KBY durumlarında sağladığı önemli faydaları ortaya koymaya yöneliktir. Renal I/R hasarında ve diğer ABY fizyopatolojilerinde

gerek deney hayvanlarında ve gerekse insanlarda yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalarda ET-1 düzeyinin arttığı gösterilmiştir.⁴⁸

Endotelin reseptör blokajı yapılarak çalışılan iskemik ve iskemik olmayan ABY deney hayvanı modellerinde, ET-1'in rolünün açığa çıkması konusunda çok sayıda çalışma yapılmıştır. ET-1'in güçlü ve uzun süreli damar kasıcı etkisi ile ABY patogeneziindeki rolünün ve öneminin anlaşılmasına, bu çalışmalar katkıda bulunmuştur. ABY'nde, GFH'indeki ani azalma preglomerüler vazokonstriksiyona neden olur. Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir ki, endotelial hücrelerden ET-1 salınımı hipoksi ve iske mi durumlarında artmaktadır. İskeminin indüklediği ABY'nin; plazma ET-1 konsantrasyonunda, renal doku ET-1 içeriğinde ve endotelin reseptör bağlanmasında artışlara yol açtığı rapor edilmiştir.⁴⁹ Buna ilave olarak preproET-1, ET_A ve ET_B reseptörleri mRNA ekspresyonu renal iskemi yi takiben artmıştır.⁴⁹ Sıçan ve köpeklerde renal arter tıkanması, aortik kross-klempleme deney modellerinde GFH'daki azalmayı endotelin reseptör antagonistlerinin düzeltebildiği gösterilmiştir. ET_B reseptörleri vazodilatasyon ve vazokonstriksiyon yapabilmelerine rağmen Kuro ve ark. selektif ET_A reseptör antagonistlerinin sıçanlarda iskeminin indüklediği ABY'de koruyucu rolünün olduğunu, fakat ET_B reseptör antagonistlerinin koruyucu rolü olmadığını göstermişlerdir. Bundan başka, Matsumura ve ark. ilk defa *endotelin dönüştürücü enzim (EDE)*'in inhibisyonunun iskemik ABY'nde koruyucu olduğunu bildirmişlerdir.⁴⁹

Radyokontrast boya, siklosporin ve endoksin kullanılarak yapılan çalışmalarda ET-1'in ABY'nin indüklenmesinde de rolü olduğu gösterilmiştir.⁴⁹

2.2. ENDOTELİN

2.2.1. Endotel Kaynaklı Vazokonstriktörler ve Vazodilatatörler

Uzun yıllar boyunca sempatik otonom sinir sisteminden salgılanan adrenalin (A), noradrenalin (NA), renin-anjiotensin ve vazopressin gibi klasik humoral faktörlerin direkt olarak damar düz kasının tonusunu düzenlediği düşünülüyordu. Öte yandan periferik vasküler direncin bu faktörlerin etkisiyle gerçekleştiği ve bu ajanların etkisinin azalmasıyla da pasif olarak vazodilatasyonun olduğu düşünülüyordu. Ancak son yirmi yılda varlığı keşfedilen, damar endotelyumundan kaynaklanan faktörler sayesinde bu düşüncelerde değişme olmuştur.

Endotelyum; kalp ve diğer vücut boşlukları ile kan ve lenf damarlarının iç yüzeyini döşeyen tek sıra yassı hücrelerden (endotel hücrelerinden) oluşan

epitel tabakasıdır. Ağırlığı 70 kg olan bir erişkinde endotel hücrelerinin sayısı yaklaşık 6×10^{23} olup, toplam ağırlığı 1.5 kg kadardır. Endotelyum, özellikle kapiller endotelyum, vasküler permeabilite düzenleyicisi olarak önemli rol oynar ve dolaşımdaki hormonların etkilerini göstermede rol alır. Endotel hücresi membranının bir enzimi olan anjiotensin dönüştürücü enzim (ADE); anjiotensin-I (AI)'i AII'ye dönüştürür, bradikininini ise inaktif ürünlere parçalar.

Damar endotelyumu; kan damarının iç yüzeyinde damar düz kas hücreleri ile kan hücreleri arasında kanın pıhtılaşmasını da engelleyen önemli bir bariyer olmanın yanında, aynı zamanda ürettiği ve salgıladığı damar kasıcı ve damar gevşetici ajanlar sayesinde damar tonusunun düzenlenmesinde önemli rolü bulunan bir dokudur.⁵⁰ Bu ajanlar otokrin ya da parakrin bir tarzda etki edebilir. Bu kabul, 1980 yılında "Endotelyumdan salgılanan gevşetici faktör" (EDRF) olarak bulunan ve 1987 yılında NO olduğu anlaşılan keşifle ortaya çıkmıştır. EDRF'nin keşfinden önce Moncada ve ark. tarafından⁵¹ 1976 yılında endotelyumdan kaynaklanan vazoaaktif madde olarak tariflenen, damar düz kas tonusundaki rolü ile ilk defa 1980 yılında Furchgott ve Zawadzki tarafından⁵² keşfedilen prostasiklin (PGI_2) de damar endotelyumundan salgılanır ve damarlarda gevşeme yapar.⁵⁰

Elbette bu faktörlere zıt etkisiyle endotelyumdan salgılanan damarları kasan faktörler de bulunmaktadır. İlk olarak bildirilen endotel kaynaklı kasıcı faktör, Fujiwara ve ark. tarafından ileri sürülen Tromboksan- A_2 ⁵³ ve Katusic ve ark. tarafından ortaya konan $O_2^{\cdot -}$ 'dur.⁵⁴ Bunlardan başka endotel aracılı vazokonstriksiyona noradrenalin, trombin, hipoksi, damar içi basınç artışı ve mekanik gerilme de neden olur. Fakat endotelden kaynaklanan kasıcı faktörler içinde sadece bir peptid olan endotelin hakkında, araştırmalar halen devam etmektedir.⁵⁰

2.2.2. Endotelinlerin Keşfi

1985 yılında Hickey ve ark. sığır kültür ortamında endotel hücrelerinde peptid yapıda olduğunu düşündükleri vazokonstriktör bir ajanın olduğunu bildirmişler.^{55,56} Yanagisawa ve ekibi 1987 yılında sığır endotel hücrelerinden cDNA klonlama yöntemiyle arındırıp, aa dizisini belirledikleri bu peptide "Endotelin" adını vermişler. 1988 yılının ilk aylarında ise bu buluşlarını yayınlamaya dünyaya sunmuşlar.^{55,9} ET-1'in keşfini takip eden bir sene içinde yapısal olarak sadece 2 aa farklılık gösteren Endotelin-2 (ET-2) ve 6 aa farklılığı bulunan Endotelin-3 (ET-3) olarak adlandırılan iki izoformu keşfedilmiştir.⁵⁷

2.2.3. Endotelin Biyosentezinin Düzenlenmesi

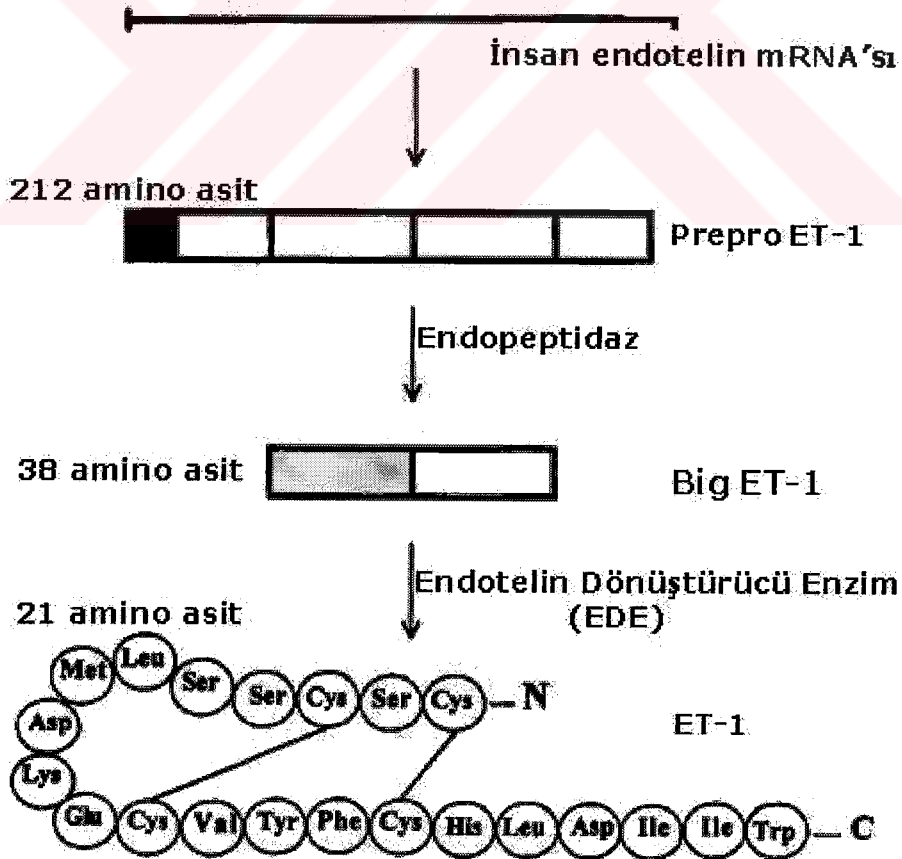
Kültür endotel hücrelerinde mekaniksel ve çeşitli kimyasal uyarıların ET-1'in mRNA ekspresyonunu uyardığı bildirilmiştir. ET-1'in oluşumunu sağlayan fizyolojik uyarıların listesi artmaya devam etmektedir (Tablo 1). Bunlardan trombin, AII ve vazopressin endotel hücrelerinde fosfolipaz C'yi aktive ederek inositol 1,4,5-trifosfat (IP₃) ve diaçil gliserol (DAG) oluşumuna yol açar. IP₃ oluşumu hücre içi kaynaklardan Ca⁺² salınımına yol açarken, DAG oluşumu ise protein kinaz C'yi stimüle eder. Gerçekten de ET-1 mRNA ekspresyonu ve peptidinin üretimi Ca⁺² iyonoforları ve forbol esterleri ile uyarılır.⁵⁰

Tablo 1: Gen transkripsiyonu yoluyla ET-1 üretimini etkileyen faktörler
(Kaynak 110'den düzenleme ve ekleme ile)

	STİMLATÖRLER	İNHİBİTÖRLER
Hormonlar	İnsülin	Atrial ve beyin NP
	AII	
	Epinefrin	
	Vazopressin	
	Kortizol	
Peptidler	IL-1	Adrenomedullin
	TGF-β	
	ET-1	
	NF-1	
	Endotoksin	
Fizikokimyasal Uyarılar	Düşük shear stres	Yüksek shear stres
	Hipoksi	
Kan komponentleri	Trombin	
	Okside LDL	
	HDL	
	Glukoz	
Xenobiyotikler		NO
		PGI ₂ ve PGE ₂
		Heparin
		Fe ⁺² ve Ca ⁺² şelatörleri

Yüksek shear stres (25 dynes/cm²) keskin bir şekilde mRNA düzeyini azaltırken, düşük shear stres (5 dynes/cm²) mRNA ekspresyonunu artırır. Pulsatil gerilim de endotel hücrelerinde ET-1 üretimini artırır. Shear stres, hücre içine Ca⁺² girişini artırarak ve hücre içi Ca⁺² depolarının serbestleşmesine yol açarak hücre içi Ca⁺² miktarını artırır. Böylece ET-1 üretimini artırır, ancak shear stresin ET-1'in salınımını düzenlemesinde birden fazla yol kullanıldığı düşünülmektedir. Transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β)da, nükleer faktör-1 (NF-1) bağlayıcı elementler aracılığı ile ET-1 sentez ve salınımını artırır.⁵⁰ Tersine ET-1 mRNA ekspresyonunu NO, PGI₂, ANP olasılıkla fosfatidilinositol difosfat (PIP₂) metabolizmasını cGMP aracılığı ile inhibe eder. Heparin ise, protein kinaz C inhibisyonu yoluyla azaltır.⁵⁰

Endotel hücrelerinde ET-1 mRNA seviyesinin sadece transkripsiyonel düzenleme değil, aynı zamanda post-transkripsiyonel düzenleme ile de azaltılabildiği ifade edilmektedir. Yarı ömür çalışmalarında aktinomicin-D'nin transkripsiyonu inhibe edici etkisi kullanılmasıyla ET-1 mRNA'sının oldukça labil ve hücre içi yarı ömrünün yaklaşık 15 dakika olduğu ortaya çıkmıştır.⁵⁰



Şekil 2: Endotelin-1(ET-1)'in biyosentezi kaynak 57'den modifiye edilerek).

2.2.4. Endotelin Peptidinin Biyosentezi

ET-1 cDNA dizi analizinde ilk önce 212 aa dizesine sahip preproET-1'in kodlandığı ortaya çıkmıştır. Şekil 2'de ET-1'in biyosentez basamakları görülmektedir. PreproET-1'den, Lys⁵¹-Arg⁵² ve Arg⁹²-Arg⁹³ pozisyonlarında proteolitik olarak dibazik spesifik bir endopeptidaz yoluyla, 38 aa'lık ara peptid olan "big ET-1" oluşur. BigET-1, Trp²¹- Val²² bölgesinden yeni bir endopeptidaz tarafından ayrılarak ET-1 oluşur. Metalloproteaz yapıda, 758 aa dizisine sahip, 130 kilodalton molekül ağırlığındaki bu enzime EDE denir. EDE-1 ve EDE-2 olmak üzere iki tipi vardır. Fosforamidon tarafından EDE inhibe edilerek ET-1 oluşumu engellenir. EDE'lerin, bigET'i endotelial hücre membranından geçişi sırasında parçaladığı düşünülmektedir.⁵⁰

2.2.5. Endotelin Türleri ve Yapısı

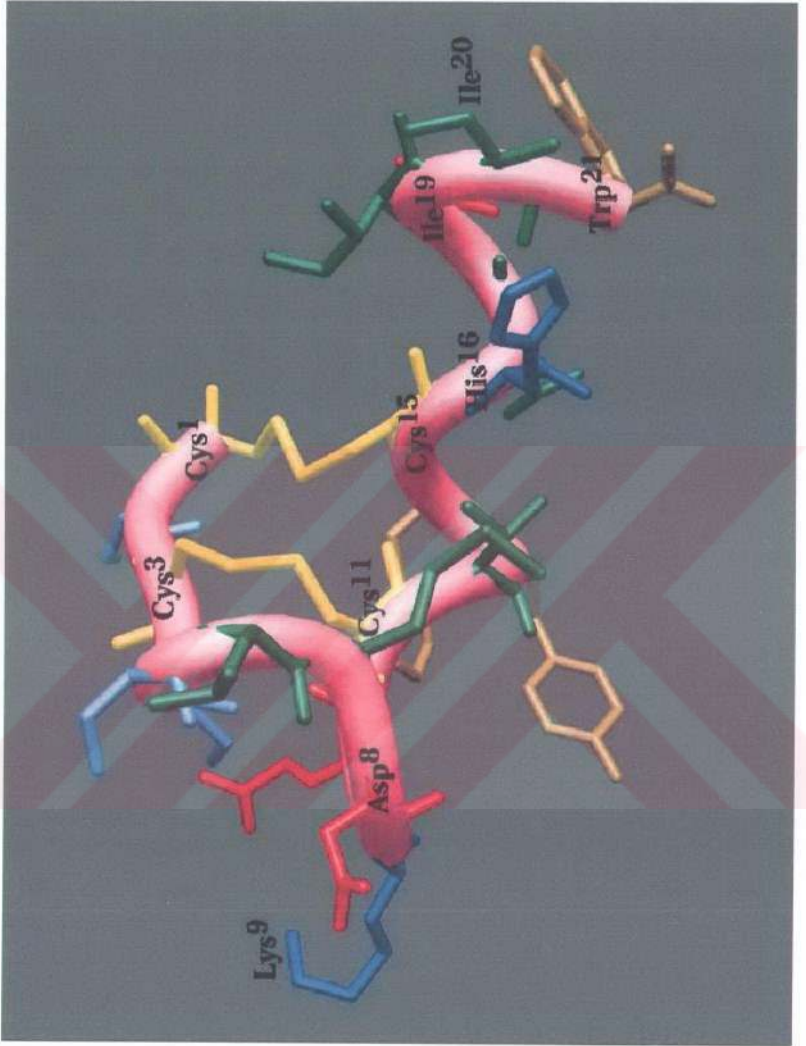
Endotelinlerin yapısı bir tür yılan zehirinde bulunan sarafotoksin polipeptidine çok benzemektedir. 21 aa'e sahip, 2492 dalton ağırlığında olan bu peptid, 4 sistein kalıntısı içermektedir. Sistein residüleri arasında, Cys¹-Cys¹⁵ ve Cys³-Cys¹¹ olmak üzere iki disülfid bağı bulunmaktadır.

İnsan damar endoteliumundan sentezlenen yegane endotelin, ET-1'dir. Kanda başlıca bulunan endotelin türü de, ET-1'dir. Şekil 2'de ET-1'in üç boyutlu x-ray kristal yapısı görülmektedir. Fakat üç endotelin isopeptidi de vasküler düz kas, kardiyak miyozit, renal tübüler endotelial, glomerüler mezengial, bronşial epitelyal, glial, pitüiter, makrofaj ve mast hücrelerinde eksprese edilmiştir.^{58,59}

İnsan ET-1 geni 5 ekson, 4 intron içeren, yaklaşık 6.8 kb boyunda bir DNA zinciridir. Transkripsiyon, S1 nükleaz korunmasıyla haritalandırılarak 98. baz çiftinde CAAT kutusu ve 31. baz çiftinde TATAA kutusu ile başlamaktadır.⁵⁰

2.2.6. Endotelin Reseptörleri ve Hücre İçi Sinyal İletimi (Etki Mekanizması)

Endotelinin neden olduğu etkiler başlıca iki grupta incelenebilir. İlki vazokonstriksiyon, bronkokonstriksiyon, uterus düz kas kasılması, aldosteron sekresyonunun uyarılması. Bu etkileri ET-3 den oldukça güçlü bir şekilde ET-1 ve ET-2 eşit olarak gösterirler. İkincisi endoteliuma bağlı vazodilatasyon, astrosit proliferasyonu, *ex vivo* trombosit agregasyonunun inhibisyonu. Bu ikinci grup etkilere her üç endotelin de eşit güçte neden olurlar. Endotelinlerin, farklı iki grup etkilerinin olması, bu etkileri en az iki farklı reseptör aracılığıyla gerçekleştirdiğini düşündürmektedir. Endotelinlerin multipl reseptörlerinin



Şekil 3: Endotelin-1'in X-Ray yapısı (Kaynak 48'den).

varlığı "cross-link (çapraz bağlama) deneyleri", "radyoligand bağlama afinitesi" çalışmalarıyla anlaşıldı. Daha sonraki araştırmalarda endotelin reseptörlerinin cDNA'ları kodlandı ve aa dizileri ortaya çıkarıldı. Endotelin-A (ET_A) reseptörü ve

Endotelin-B (ET_B) reseptörü olarak adlandırılan bu reseptörlerden ET_A reseptörüne afinitesi bakımından endotelinler, ET-1 ≥ ET-2 >> ET-3 sıralaması şeklindedirler. ET_B reseptörüne ise her üç endotelin eşit güçte afinite gösterirler.⁵⁰

ET_A ve ET_B reseptörleri GTP-bağlayan proteinlere (G proteinleri :G_q, G_i, G_s, G_o gibi) bağlanarak sinyal iletimini gerçekleştirirler ve Fosfolipaz C (PLC)'nin aktifleşmesiyle IP₃ ve DAG oluşumuna neden olurlar. IP₃ yoluyla oluşan hücre içi kaynaklardan Ca⁺² serbestleşmesine yol açarak, hızlı geçici hücre içi Ca⁺² konsantrasyonunda artmaya neden olur. Sonraki devamlı hücre içi artmış Ca⁺²'unun nedeni ise hücre dışı Ca⁺²'un, voltaja bağlı L-tipi Ca⁺² kanalları veya nonselektif reseptör kanalları yoluyla hücre içine akmasından kaynaklanır. ET-1 ayrıca araşidonic asit metabolizmasını fosfolipaz A₂ ve D'yi aktive ederek uyarır. ET-1 in kısa dönem bu işlevlerinden başka vasküler düz kas hücrelerinde, kardiyak miyositlerde, glomerüler mezengial hücrelerde ve diğer hücrelerde güçlü mitojenik etkileri mevcuttur. Bu etkiler hücre içi raf-1, mitojen aktive eden protein kinaz (MAPK) ve S6 kinaz'ın dahil olduğu kinaz kaskatını aktive ederek oluşur.⁵⁰

Endothelinler sekreatuar glandlarda depolanmazlar. Regülasyonunda rol alan en önemli faktör gen transkripsiyonundaki değişimlerdir. Sekresyon değişiklikleri çabucak ortaya çıkmaktadır.

2.2.7. Plazma ve Doku Endotelin Düzeyinin Ölçümü

Vasküler tonusun parakrin regülatörü olan ET-1'in plazma düzeyi Radioimmunoassay (RIA) veya Enzim İmmuno Assay (EIA) yöntemiyle ölçülmektedir. RIA da ET-1'e karşı yalnız bir çeşit antikor kullanılırken, EIA'da N-terminal ve C-terminal bölgelerini tanıyan iki çeşit antikor kullanılır. Plazma ET-1 konsantrasyonu sağlıklı insanlarda 1.0-2.0 pg/ml olarak kabul edilmektedir. Dolaşımda, ET-1'den başka bir miktar bigET-1 de tespit edilebilmektedir.⁵⁰

2.2.8. Endotelinlerin Eliminasyonu

ET-1'in dolaşım konsantrasyonu yaklaşık 1-2 pg/ml'dir. Bu ise vazokonstiksiyon oluşturan eşik konsantrasyon değerinden oldukça aşağıdadır. Buna karşın ET-1'in damar düz kası yüzeyinde vazokonstiksiyon oluşturan konsantrasyon tam olarak bilinmemektedir. ET-1 dolaşım yoluyla etkiyen bir hormon olmaktan çok, lokal olarak etkiyen bir otokrin, parakrin faktör olmasının

bir diğ er nedeni ise dolaşımdan hızla uzaklaştırılmasıdır. Bir çalışmada intravenöz bolus tarzında verilen ET-1'in hızla dolaşımdan kaybolduğu ve yarı ömrünün birkaç dakika olduğu tespit edilmiştir. Dolaşımdan hızla uzaklaşan ET-1 akciğer, böbrek, karaciğer ve dalağa geçer. Akciğerden bir geçişte ET-1'in yaklaşık % 60'ı dolaşımdan uzaklaştırılır. ET-1-reseptör kompleksi internalizasyon ile hücre içine alınma süreci sonunda aspartik proteaz gibi lizozomal enzimler ile parçalanır. Nötral endopeptidaz (ensefalinaz) ve lizozomal katepsin G de ET-1'in enzimatik parçalanmasında rol alır. ET-1'in dolaşımdan hızla uzaklaştırılmasına karşın, oldukça uzun bir periyotta sürekli bir kan basıncında yükselmeyi sağlamasının nedeni tam bilinmemektedir.⁵⁰

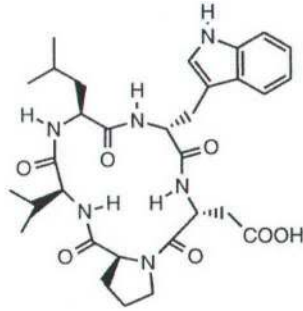
2.2.9. Endotelin Reseptör Antagonistleri

ET-1 güçlü bir vazokonstriktör ve mitojen olarak büyük bir ilgi odağı olmuştur. Endotelinler embriyonik gelişimde ve fizyolojik koşulların devamında rol almalarının yanısıra hipertansiyon, konjestif kalp yetmezliği, renal yetmezlik, pulmoner hipertansiyon gibi birçok patofizyolojik durumun oluşumuna ve devamına katılırlar. Endotelin reseptör antagonistleri 1990'lı yılların başından itibaren bu hastalıklarda kullanılmaya başlandı. İlk defa bu amaçla ET_A reseptör antagonisti BQ-123 denendi. Faz-II farmakolojik çalışmalara kadar kullanılması ilerletildi. Non-peptid yapısından dolayı oral olarak kullanılabilen ET_{A/B} reseptör antagonisti Bosentan ise konjestif kalp yetmezliği ve hipertansiyon faz-III klinik çalışmalarında kullanılmaktadır.⁶⁰ Endotelin reseptör antagonistleri üzerindeki bu yoğun çalışmalar, bunların, etkin tedavisi bugün için bulunmayan klinik problemlere gelecekte katkı sağlayabileceklerini düşündürtmektedir.

2.2.9.1. BQ-123: ET_A Reseptör Antagonisti

İlk üretilen endotelin reseptör antagonistlerinden olan BQ-123, ET_A reseptörüne karşı seğici bir antagonisttir. Anyonik (   D-aa'ı içeren) siklik pentapeptid [cyclo(-D-Trp-D-Asp-Pro-D-Val-Leu-)] şeklinde moleküler yapısı mevcuttur.⁶⁰ şekil 3'de bu yapısı g r lmektedir. BQ-123' n ET_B reseptörüne de afinitesi vardır. Ancak ET_A reseptörüne olan bu afinitesi, ET_B reseptörüne olan afinitesinden bin katdan daha fazladır.⁶⁰ BQ-123  n ET-1'e antagonize bağlanması rekombinant insan ET_A reseptörü için 13 nM yeterli olurken, ET_B reseptörü için 10  M den daha fazlaya ihtiyaç olmuştur. Benzer şekilde izole domuz koroner arterlerinde BQ-123, ET-1'in indüklediği kontraktil cevabı inhibe ettiği,⁶⁰ ayrıca anesteziye normotensif sıçan modelinde ve

normotensif gönüllü insanlarda ⁶⁰ benzer şekilde ET-1'in indüklediği kan basıncı artışını engellediği gösterilmiştir. Ancak BQ-123'ün peptid yapısı oral verilmesini engellemektedir.⁶⁰



Şekil 4:BQ-123'ün kimyasal yapısı (Kaynak 48'den)

2.1.10. Endotelinin Böbrekte Etkileri

Hedef hücrelerdeki endotelin reseptörlerine otokrin veya parakrin bir tarzda etkir. Endotelin RKA, renal plazma akımı, GFH, su ve sodyum transportunun düzenlenmesine katılır.

Sadece glomerüler endotelial hücre kültüründe değil, aynı zamanda glomerüler epitelial hücre kültüründe de ET-1 üretilmiştir.

Böbrekteki hücre tiplerinden bir çoğu, vasküler ve glomerüler endotelium, mezengial hücreler ve tübüler epitelyal hücreleri ET-1 sentezlerler. Sentez yerleri; vasküler düz kas, mezengial hücreler, böbrek medüller dolaşım içindeki perisitler ve (iç medüller toplayıcı kanal hücrelerinde daha fazla olmak üzere) tübüler epitelyumdur. ET_A ve ET_B reseptör alt tiplerinin aktivasyonu, hücre tipine bağlı cevaplar üretir. Bu farklı cevaplardan dolayı ET-1'in fizyolojik bir seviyede hem vasküler hem de tübüler fonksiyonu düzenlemede çok yönlü rollere sahip olduğu düşünülmektedir. ET-1, bir parakrin ve otokrin işlev görmesine karşın sıvı hacminin homeostazisinde ve arteriyel basıncın düzenlenmesinde çeşitli mekanizmalara katıldığı görülür. Ayrıca böbrek yetmezliğinde ET-1'in rolü, endotelin reseptör antagonistleri için potansiyel terapötik hedefleri düşündürür.

Renal tübül, mezengial, glomerüler endotelyum ve medüller interstisyum kültür hücrelerinde ET-1 sentezlenmiştir. Tüm böbrekte yapılan immünohistokimyasal analizler korteksle karşılaştırıldığında renal medullada ET-1 benzeri immünoreaktivitesinin daha yüksek miktarda olduğu açıklanmıştır. Renal kortekste; ET-1 benzeri (like) immünoreaktivitesi'nin arkuat arter, arterioller, peritübüller kapillerler ve venler, daha az olarak da glomerüler kapiller ve mezengial hücrelerin yanında proksimal tübülün ilk kısımlarında

olduğu görülmüştür. Bununla birlikte ET-1'in majör sentez yerinin renal medullanın içinde olduğu ve renal medullada spesifik lokalizasyonunun ise kalın çıkan henle kulpu dış ve iç medüller toplayıcı tübüller ve olasılıkla vasa rekta kapilleri olduğu bildirilmiştir. Aynı bölgelerde ECE-1'in de lokalize olduğu bulunmuştur.⁴⁹

PreproET-1 mRNA ekspresyonu kültür bovin glomerüler endotelial hücrelerde Northern Blot analiziyle gösterilmiş. Bu ekspresyon bradikinin, trombin, ATP ve PAF gibi agonistlerle artırılır (Tablo:1).

Endotelin reseptörleri, ET-1'in sentezlendiği yerlerde lokalizedirler. *In vitro* radyoligand bağlama çalışmalarında reseptörlerin renal vasküler düz kas hücrelerinde, mezengial hücrelerde ve kültür tübül hücrelerinde olduğu tespit edilmiştir. *In vivo* çalışmalarda ise endotelin reseptör yoğunluğunun iç medullada daha fazla olduğu, dış kortekse doğru bağlanmada azalma olduğu gösterilmiştir. Böbrekte endotelin reseptör alt tiplerinin dağılımı ise, bu reseptörlerin işlevleri hakkında bazı ipuçları sağlar. ET_A reseptörleri başlıca vasküler yapılar, ET_B reseptörleri ise daha çok tübüllerde bulunmuştur. Ancak ET_B reseptörleri vasküler düz kas hücrelerinde de yer almaktadır, fakat bu damar kasıcı endotelin reseptörlerinin göreceli miktarları türe bağlı olarak değişmektedir.⁴⁹

2.3. NİTRİK OKSİT (NO)

2.3.1. Nitrik Oksidin Keşfi

Ferid Murad 1979'da, damar duvarından elde edilmiş düz kas hücrelerinin, gliseril nitrat ya da nitroprusid gibi nitrodilatatörlerce gevşetilmesi esnasında, hücredeki siklik guanozin monofosfat (cGMP) düzeyinin arttığını göstermiştir. Furchgott, bu bilgilere dayanarak endotelden kaynaklanan bu aracı maddenin kas hücresindeki etkisini buradaki "guanil siklaz" adlı bir enzim aracılığıyla cGMP düzeyini artırarak yapabileceği görüşünü ortaya atmıştır. Bu görüş 1983'de Murad ve çalışma ark. tarafından deneysel modellerle ispatlanmış ve bu moleküle *endotel kökenli damar gevşetici madde (EDRF)* adı verilmiştir.⁶¹

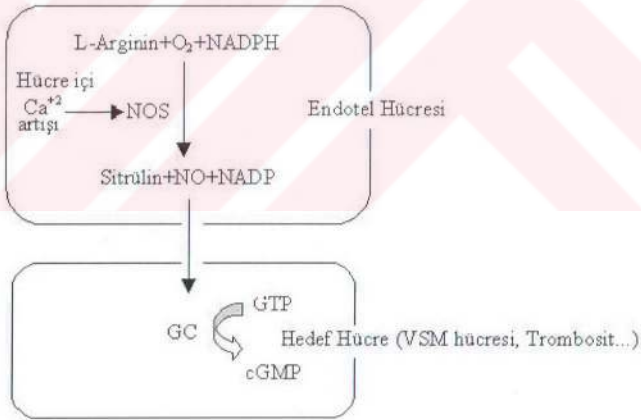
Moncada 1988'de NO'in damar endotel hücrelerinde L-arjinin'den sentezlendiğini göstermiştir.¹¹¹ Zamanla NO'i sentezleyen farklı izoenzim çeşitleri olduğu, farklı dokulardan sentezlendiği ve farklı etkilerinin olduğu gösterilmiştir.⁶²

2.3.2. Nitrik Oksit Sentez ve Sekresyonu

Lipofilik karakterde bir gaz olan NO'nın yarı ömrü salgılanan yere ve türe göre değişmekte olup, 2-30 saniye kadardır. Hücre membranından kolayca diffüze olabilir.⁶³ Renksiz ve kokusuz olmasına karşın hem atmosferde yaygın olarak bulunur, hem de egzoz, sigara dumanı ve kirli havada bulunur.⁶⁴ Suda çok az çözünen NO, vücutta biyolojik olayların düzenlenmesinden sorumlu bir moleküldür.⁶⁵ Reaktif nitrojen oksit çeşitleri ise çevre kirliliği yapmasının yanında kanserojenik etki de gösterir. Ayrıca nitratlar terapötik kullanımı olan önemli bir ilaç grubudur.⁶²

2.3.3. Nitrik Oksit'in Etki Mekanizması ve NOS İzoenzimleri

NO sitokrom p-450 redüktaz homoloğu olan ve nitrik oksit sentaz (NOS) olarak bilinen flavoprotein yapıdaki enzimler tarafından oluşturulur. Sitozolda bulunan NOS, L-Arg'den NO ve sitrüllin oluşumunu katalize eder (Şekil 5). L-Arg'den NO sentezi sırasında NADPH, NOS, kalmodulin, oksijen ve diğer bazı kofaktörlere (Hem, FMN, FAD ve tetrahidrobiopterin) gereksinim duyulur.^{16,65}



Şekil 5: Nitrik Oksidin (NO)'in oluşum ve etki mekanizması (Kaynak 16'dan)

NOS'nun üç farklı izoenzimi olup bunlar; nöronal NOS (nNOS), endotelial NOS (eNOS) ve indüklenebilen NOS (iNOS) olarak adlandırılır. Bunlardan nNOS ve eNOS, yapısal (konstitüv) NOS (cNOS) olarak da bilinir.

1- cNOS: cNOS sürekli olarak oluşturulan bir enzim olup, damar direncini düşürme ve sinir iletimi gibi fonksiyonları vardır. cNOS'lar, kofaktör olarak Ca^{+2} -kalmoduline bağımlıdır ve hücre içi kalsiyum düzeyini yükselten agonistlere iyi cevap verir. İntrasellüler kalsiyumun yükselmesi kalmodulinin cNOS'a bağlanmasını uyarır ve anında NO sentezlenir. Kalsiyum bağlayan maddeler ve kalmodulin inhibitörleri ile kalsiyum bağımlı NO sentezi (cNOS) inhibe edilebilir. Sentezlenen NO, esas olarak hücreler arası ve hücre içi haberleşmenin fizyolojik mediatörüdür.⁶² Normal endotelde sürekli olarak düşük düzeyde NOS aktivitesi devam eder. Fizyolojik şartlarda endotelden NO salınmasında başlıca uyaran shear stresdir. cNOS aktivasyonunda hücre cevabına bağlı olarak rol oynayan diğer bazı aktivatörler şunlardır: Kalsiyum iyonoforları, elektriksel uyarı, eksitator aa'ler, histamin, bradikinin, asetilkolin, trombin, lipopolisakkarid (LPS), adenozin difosfat, trombosit aktive edici faktör (PAF), substans P, tromboksan A_2 , lökotrienler ve endotelin.^{62,66} İki tür cNOS bulunmaktadır:

a) eNOS (NOS III): İlk olarak vasküler endotel hücrelerinde yapısal olarak tanımlanmıştır ve kalsiyum bağımlıdır. Geni 7. kromozomda lokalizedir.⁶⁷ eNOS endotel hücreleri, nöronlar ve barsak interstisyel hücrelerinde bulunabilir.

b) nNOS (NOS I): cNOS'un merkezi sinir sistemine özgü tipi, nNOS olarak adlandırılır. Nonadrenerjik nonkolinerjik sinir sonlarındadır. eNOS gibi kalsiyum bağımlıdır. Geni 12. kromozomda lokalizedir.⁶⁷

2-iNOS (NOS II): Endotoksinler ve sitokinler aracılığı ile karaciğer hücreleri ve makrofajlarda uyarılan bir enzim olarak tanımlanmıştır. iNOS aktivasyonu, transkripsiyonel indüksiyon yoluyla gerçekleşir. Bu izoform, kalmoduline çok sıkı bağlanmış olmasından dolayı, fizyolojik sınırlar içinde kalsiyum bağımlı değildir. Bazı sitokinler (interferon- γ , IL-1 β , TNF- α), lipopolisakkaritler (endotoksinler) tarafından üretimi uyarılırken; TNF- β , IL-4 ve IL-10 ve glukokortikoidler tarafından ise inhibe edilir.^{67,62,65,66} Geni 17. kromozomda lokalizedir.⁶⁷

Endotel hücreleri, damar düz kas hücreleri, makrofaj ve diğer immün hücrelerde, kalp kası ve endokard hücrelerinde, glial hücrelerde ve karaciğer kuffer hücrelerinde iNOS'un varlığı gösterilmiştir. Sitolinlerin uyarılması sonucu, birkaç saat sonra başlayan ve günlerce sürebilen NO sentezi söz konusudur. Sitolinler tarafından aktive edilmiş makrofajların tükettiği L-Arg'nin 1/3'ü NO üretmek için kullanılmaktadır. iNOS toksik düzeylerde NO üretebilen bir enzimdir. Beyinde iNOS enzimi; tümörler, travma, demiyelinizasyon, AIDS demansı, Alzheimer hastalığı ve serebral iskemi gibi değişik patolojik durumlarda tanımlanmıştır.⁶⁵

Özellikle mezengial hücrelerde iNOS gen transkripsiyonunun primer olarak cAMP aktivitesine bağlı olduğu bildirimiştir. cAMP, NF- κ B aktivasyonundaki değişimlerden bağımsız olarak iNOS ekspresyonunu artırdığı ifade edilmektedir. Ancak cAMP'nin iNOS üzerine olan etkisinin stimülatör veya inhibitör olması transkripsiyon faktörlerine bağlı olarak hücre tipine spesifiktir.⁶⁷

Her iki enzimatik sistem N-monometil-L-arjinin (L-NMMA), L-NAME ya da N-nitro-L-arjinin (L-NNA) gibi L-Arg analogları tarafından yarışmalı olarak inhibe edilebilir. L-Arg ise bir NO donörü olarak sentez ve salınımını artırır. NOS enzimi izoformları aynı hücrede birlikte de bulunabilirler. iNOS enzimi, inflamatuvar ya da immunolojik bir uyarı ile karşılaştıktan sonra birkaç gün boyunca yüksek miktarlarda NO üretebilmekte ve sonuçta vücut için toksik olabilmektedir.^{62,65}

Üç izoenzimin değişik hücrelerde bulunabildiği ve uyarılabildiği tespit edilmiştir.

Tablo 2. NOS türlerinin genel özellikleri (Kaynak 62'den modifiye edilerek).

	eNOS (NOSIII)	nNOS (NOSI)	iNOS (NOSII)
Primer düzenlenme	Ca ⁺² /Kalmodulin	Ca ⁺² /Kalmodulin	Gen ekspresyonu
Hücre içi lokalizasyon	Membran>>Sitozol	Sitozol?	Sitozol>>membran
NO üretim düzeyi	Düşük(pmolar)	Yüksek(pmolar)	Yüksek(μmolar)
Fonksiyonu	Hücrel sinyal	Hücrel sinyal	Sitotoksik(antimikrobial), Sitostatik(antitümoral) Sitoprotektif(hücre koruyucu)
Lokalizasyonu	7q	12q	17q
Amino asit sayısı	1203	1434	1153
Üretim süresi	kısa	kısa	uzun
Yanıt	ani	ani	gecikmiş
Glukokortikoid ile etkileşme	etkilenmez	etkilenmez	uyarılması inhibe edilir

2.3.4. Nitrik Oksitin Fizyolojik ve Biyokimyasal Fonksiyonları

NO, nitrojen gazından oluşan, tek değerlikli elektronları olan ($\cdot\text{N}=\text{O}$), kararlı olmayan gazdır. NO, diğer radikal bileşiklere göre daha az reaktif olmasına rağmen bazı durumlarda toksik olabilir. Sulu çözeltilerde O₂ ile reaksiyona girerek NO₂ (nitrit) ve H₂O ile çok hızlı tepkimeye uğrayarak (NO₂) ve nitrat (NO₃) bileşiklerine dönüştüğü için hücre içinde sadece birkaç saniye süresince oluşur ve hemen kaybolur. Endotel tabakasında yapılan NO hızla plazmaya geçer ve plazmada iki tür değişime uğrar: Ya eritrosit içine girerek

oksidi formu ile birleşip methemoglobin, NO_2 ve nitrozotoller oluşur ya da okside olmayan NO ile birleşir ve NO_3 'e dönüşür. NO_2 'ler ve NO_3 'ler, NO dönüşümünün son ürünleri olup vücuttaki NO üretim düzeyinin göstergesidir.^{68,69}

NO dolaşımında eritrositlerdeki hemoglobin ile, hücrede ise O_2^- ile katabolize edilir. O_2^- ile reaksiyonundan oluşan ONOO^- güçlü oksidan etkiye sahiptir. Bu reaksiyon, süperoksit dismutaz (SOD) ile O_2^- 'nin katabolizmasından 3 kat daha hızlı gerçekleşir. Düşük konsantrasyonlarda ONOO^- NO 'e benzer davranış gösterir; vasorelaksasyona, trombosit agregasyonunda azalmaya, damar duvarına lökosit adezyonunda azalmaya yol açarak NO donörü gibi davranıp sitoprotektif etki gösterir. Birkaç μm kalınlıktaki porlardan rahatlıkla diffüze olabilmektedir. Fakat yüksek konsantrasyonlarda ONOO^- çok toksiktir. Sitotoksik peroksinitroz asit (ONOOH) oluşumuna ve bu yolla nitrojen dioksit (NO_2) ayrılmasıyla $\cdot\text{OH}$ toksisitesine neden olabilir (Şekil 1).^{69,70}

NO 'in biyokimyasını ve biyolojik fonksiyonunu anlamak için ilk reaksiyon ürünleri olan NO^+ (nitrozonyum iyonu) ve NO^- (nitroksil anyonu) oluşumunu ve esas olan sekonder hedef etkilerinin iyi bilinmesi gerekmektedir. Biyolojik sistemlerde NO oksijen, süperoksit ve ara ürünler ile reaksiyona girer. Oluşan reaksiyon ürünleri sırasıyla NO metabolitleri, ONOO^- ve metal- NO bileşikleri olup indirgenme ve yükseltgenme yoluyla hedef dokularla ilişkiye girerek sonradan gelecek reaksiyonlar desteklenir. Tiollerin (RSH/RS^-) hücre içi reaktivitesi ve etkisi nükleofillerin desteklediği nitroztatif reaksiyonlar ile gerçekleşir ve sonuçta S-nitrozotoller oluşur. Böylece reseptörler, iyon kanalları, enzimler ve transkripsiyon faktörlerinin yanında geçiş metalleri ve tioller de içeren aktif ya da allosterik alanlar NO ileti sisteminin esas komponentini oluştururlar.⁶⁹

2.3.5. Nitrik Oksitin Fizyopatolojik Olaylardaki Rolü

Çok kısa bir yarı ömre sahip olan NO , insan fizyolojisi ve fizyopatolojisinde önemli bir rol oynar. NO 'in başlıca biyolojik etkileri şunlardır:^{66,16,71}

*Vasküler düz kas relaksasyonu ile vazodilatasyon,

*Nörotransmitter [santral sinir sisteminde ve periferde nonadrenerjik nonkolinerjik sinirlerde],

*Antiproliferatif etki; DNA sentezini baskılayarak (endotel ve damar düz kasında),

*Düşük konsantrasyonda eritrosit deformasyonunda artış,

- *Trombosit adezyon ve agregasyonunda inhibisyon, doku plazminojen aktivatörü (t-PA) artışı, fibrinoliz,
- *İmmünomodülatör etki,
- *Lökosit adezyonun inhibisyonu, antiinflamatuvar etki (NADPH oksidaz inhibisyonu),
- *Makrofaj aracılıklı nonspesifik immun yanıt (astım, ülseratif kolit, artrit, multipl skleroz),
- *Antimikrobial (sitotoksik) etki,
- *Antitümöral (sitostatik) etki,
- *Lipid peroksid radikali ile etkileşip antioksidan ve antiaterosklerotik etki oluşturur.
- * O_2^- ile etkileşimi temizlenmesi ve toksik $ONOO^-$ oluşumuna neden olur.
- *Sinyal iletimi için gereken fosforilasyonu bloke eder (Fe^{+3} 'den $2e^-$ alıp, demir nitrozonyum katyonunu oluşturur ve proteinlerde 3-nitro tirozin meydana getirir).

NO; sindirim, sinir, kardiyovasküler, immün ve ürogenital sistemlerde bulunan önemli bir düzenleyici molekül, ikinci haberci ve transmittedir. Normal fizyolojik fonksiyonlarının yanında hipertansiyon, septik şok, inme, epilepsi ve diğer nörodejeneratif hastalıklarla da yakından ilişkilidir. Yapılan çalışmalarda, NO'nın kan basıncının ve sindirim sisteminin düzenlenmesinden, bakterilere karşı özgül olmayan direnç; zehirli radikallerden, karaciğerin korunmasına değin bir çok alanda vazgeçilmez işlevlerinin bulunduğu saptanmıştır.

2.3.5.1. Sinir Sisteminde NO'nın Rolü

NO gaz yapısında merkezi sinir sistemimizde biyolojik mesajcı bir moleküldür.⁷² Glutamat reseptörlerinin aktive olması hücre içine Ca^{+2} akışına neden olarak kalmodulinin aktivasyonuna ve NO üretimine yol açar. NO'nun, glutamatın nörotoksik ve transsinaptik regülasyon etkilerine olduğu gibi, öğrenme ve hafıza sürecine olan etkilerine de aracılık ettiği öne sürülmektedir.⁷² Beyinde, öğrenme ve hafıza konusunda etkili ajanlardan birinin NO olduğu düşünülmektedir. Fare beyindeki hipokampus bölgesindeki sinir hücrelerinde NO sentezi inhibe edilerek Uzun Süreli Güçlendirme (LTP)'nin önlenmesiyle, ayrıca canlı sıçanlarda beyin içine NO inhibitörleri verilerek öğrenme işlevinin önlenmesi gösterilerek ispatlanmıştır.⁷³

NO, bilinen en farklı bir sinir iletim mediatörüdür. Normalde, bir sinir hücresinin uyarılmasıyla depo veziküllerinden aracı madde sinaptik aralığa

dökülür ve bu da postsinaptik hücrede bir uyarıya neden olur. NO'nın ise bu anlamda ne özel bir depolanma imkanı ve ne de özel bir salınım mekanizması bulunmamaktadır. NO gerektiği zaman ve yerde sentezlenip, üretildiği hücreden basit difüzyon yoluyla dışarıya çıkabilmektedir. Sinir iletimindeki aracı maddelerin çoğu, aa'ler veya bir takım peptitlerden oluşmuş olup bunlar alıcı hücre yüzeyindeki özel reseptörler ile ilişkilidir. NO ise özel reseptör içermez. NO hücre zarlarından geçer ve çevrede bulunan, ulaşabileceği her türlü hücreye girerek stoplazmanın derinliklerindeki enzimleri uyarak mesajını iletir. Bu sinirsel aracı mekanizmaların bir örneği, erkekte cinsel uyarı ile penis ereksiyonunun sağlanması arasındaki ilişkidir. Bu olayda rolü olan kasık bölgesindeki sinirler, beyinden aldıkları uyarının sonucunda, buna cevap olarak NO sentezlerler. NO'da gerekli bölgelerde damar gevşemesini sağlayarak ereksiyona neden olur. NO, sentezinin bloke edilmesiyle de ereksiyon önenebilir.¹⁶

2.3.5.2. Kardiyovasküler Sistemde NO'nın Rolü

Asetilkolin, bradikinin, histamin ve adenin nükleotidleri gibi maddelerin endotel hücreesindeki bir reseptörü etkilemesiyle salınan NO'nın kardiyovasküler fonksiyonların düzenlenmesinde çok önemli rolü vardır. Damar düz kas hücreesindeki cGMP düzeyini artırması, hücrenin gevşemesini ve sonuçta damarın genişlemesini sağlar. Endotel hücrelerinden NO salınımı, GTP-ilişkili proteinler (reseptör-NOS ilişkisi kurularak) aracılığı ile olur. Yüzyıllı aşkın bir süredir angina pectoris ve hipertansiyon tedavisinde kullanılan nitratlar, NO oluşumuna yol açarak etkilerini gösterirler.⁷⁴ Normal damar direnci, endotel kökenli gevşeticilerin (NO gibi) ve vazokonstriktör etkenlerin (endotelin gibi) ortak etkisiyle oluşur. NO, VCAM-1 adezyon molekülünün sentezini azaltarak lökositlerin endotele adezyonunu önler.⁶⁶ Ayrıca endotel permeabilitesini ve damar tonusunu azaltarak lipoproteinlerin damar dışına çıkışını zorlaştırır. Deney hayvanlarında eNOS inhibisyonu ateroskleroza hızlandırmaktadır. Aterosklerozun başlıca risk faktörlerinden olan hiperkolesterolemi, diyabet, hipertansiyon ve sigara içimi NO aktivitesinde bozulmayla ilişkilidir.⁷⁰ Ateroskleroz varlığında endotele bağımlı relaksasyon hem deney hayvanlarında hem de insanlarda belirgin biçimde azalır.⁶⁴ Hiperlipidemide olduğu gibi, endotel disfonksiyonunun mekanizmaları arasında, NO'nın $O_2^{\cdot-}$ tarafından yıkımının artması kadar, reseptör fonksiyonunun bozulması, endotel hücrelerinin NO prekürsörü olan L-Arg'ni alma veya metabolize etme kapasitesindeki azalma

sayılabilir. Ayrıca hiperkolesterolemik tavşanlarda endotel hücrelerinin O_2^- üretimi arttığı bildirilmiştir. Aterosklerotik koroner arterlerde bozulmuş olan endotelyuma bağımlı yanıtlar vazokonstriktör yanıtları arttırılabilir, lokal kan akımını azaltılabilir ve dolaşımdaki trombositlerin preaktivasyonuna yola açılabilir.⁶⁴

2.3.5.3. Böbrekte NO'in Rolü

NO normal diürezin, natriürezin ve GFH'nın korunmasında önemli bir faktördür. Böbrekte maküla densada nNOS predominant olarak eksprese edilir. Maküla densada üretilmesinin bir getirisi burada parakrin etki ile arteriolar vasküler tonusa ve lokal renin salınımına katkıda bulunmasıdır.²⁹ Makula densa'dan NOS ekspresyonunun, buraya ulaşan tuz miktarı ile değişip değişmediği araştırılması gereken bir konudur.⁷⁵ eNOS arteriolar endotelde eksprese edilir, iNOS ise buna karşılık olarak afferent arteriolün preglomerüler kısmında ve mesangial hücrelerde sentez edilir.²⁹

Normal şartlarda renal mezengial hücrelerde vazokonstriksiyon AII ile uyarılır, gevşeme ise NO tarafından oluşturulur. Ancak patolojik, farmakolojik nedenlerle renal mezengial hücrelerde iNOS ekspresyonu olur. Mezengial hücrelerde cAMP, iNOS'u tek başına indükler.⁶⁷

JG hücrelerde eNOS'dan sentezlenen NO, cAMP yıkımını azaltarak renin sekresyonunu artırır. Buna paralel olarak NO, cGMP'nin uyardığı protein kinaz aracılığıyla renin sekresyonunu inhibe eder. Normalde bu inhibitör etki baskın değildir. Ancak JG hücrelerde Ca^{+2} aktivitesinin artması gibi bazı durumlarda bu yolla renin salınımını inhibe edici etkisi ortaya çıkabilir.⁷⁵

2.3.5.4. Nitrik Oksitin İmmün Sistemdeki Rolü

Makrofajlar, immün stimuluslara ve inflamatuvar mediyatörlere NO salgılayarak yanıt verir. NO vücudun kansere karşı savunmasında rol alır. NO öncülü L-Arg kültür ortamından uzaklaştırıldığında, makrofajların tümör hücrelerini öldürme kabiliyetlerinin kaybolduğu bildirilmiştir.⁷¹ Enfeksiyon durumunda konak yaşamı için iNOS'un rolü kritik bir değer taşır ve makrofajlar tarafından iNOS aktivasyonu olur. Leişmaniazis, malarya ve tüberküloz gibi insan için kronik enfeksiyondan sorumlu mikroorganizmalarda major role sahiptir.⁷⁶ NO'in endotoksik şokta rolü olduğu da bildirilmiş olup, iNOS inhibitörlerinin endotoksik şokta kullanılması düşünülmektedir.^{69,77}

2.3.5.5. Nitrik Oksitin Solunum ve Sindirim Sistemindeki Rolü

NO pulmoner damarların tonusunu modüle etmektedir. İnhalasyonla akciğerlere NO gazı uygulanması ile pulmoner hipertansiyonu düşürmek mümkün olabilmektedir. NO gazı, deneysel koşullarda bronkospazmı yok etmede başarıyla kullanılmıştır.⁷⁸

NO bağırsaklarda ve akciğerlerde de nörotransmitter olarak görev yapar. Mide-bağırsak kanalının dalga şeklindeki kasılması ve gevşemesi işlevinin gevşeme aşamasında NO'nun rol aldığı gösterilmiştir.^{63,61} İnsan özefagus düz kası peristaltizminin düzenlenmesinden başka alt özefagial sfinkterin, anal sfinkterin ve yemek yeme esnasında midenin gevşemesinde etkili olduğu bildirilmiştir.⁶³ Endojen NO salınımı gastrik asit sekresyonunun uyarılmasıyla ilişkili olarak mukozal vazodilatasyona önemli katkısı vardır.⁷⁹

3- MATERYAL ve METOD

3.1. Deney Grupları

Deneylerde 48 erkek Sprague Dawley türü sıçan kullanıldı. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvarında, ebeveyn sıçanların çiftleştirilmesiyle tarafımızdan üretilen 2,5-3 aylık (155-220 gr) genç erişkin sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar, standart 12 saat karanlık 12 saat aydınlık, havalandırmalı, sabit ısıda ve her kafeste dörderli gruplar halinde bakıldı. Standart sıçan pellet yemi ve musluk suyu kullanılarak beslendi.

Randomize seçilen sıçanlardan her grupta 8 sıçan bulunan 6 grup oluşturuldu:

Grup 1 (Kontrol): Böbrekte iskemi ve sonrasında reperfüzyon oluşturulmayan ancak diğer tüm iskemi gruplarına uygulanan cerrahi işlemlerin hepsinin uygulandığı ve ağırlığına göre sadece juguler vene konan kataterden % 5 dekstrozun verildiği deney grubudur.

Grup 2 (I/R): Kontrol grubundan farklı olarak 30 dk böbrek iskemisini takiben 2 saat reperfüzyon uygulanan deney grubudur.

Grup 3 (L-NAME): I/R'na ek olarak 20 mg/kg dozunda L-NAME uygulanan deney grubudur.

Grup 4 (BQ): I/R'na ek olarak toplam 1,7 mg/kg BQ-123'ün uygulandığı deney grubudur.

Grup 5 (BQ+L-NAME): I/R'na ek olarak toplam 1,7 mg/kg BQ-123 ve 20 mg/kg dozunda L-NAME uygulanan deney grubudur.

Grup 6 (BQ+L-NAME+L-Arg): I/R'na ek olarak toplam 1,7 mg/kg BQ-123 ve 20 mg/kg dozunda L-NAME ve 400 mg/kg dozunda L-Arg uygulanan deney grubudur.

Tablo 3:Deney Grupları

Grup Adı	Sıçan Sayısı	Uygulama
Grup 1 (Kontrol)	8	Sham Opere-Kontrol
Grup 2 (I/R)	8	I/R-Kontrol
Grup 3 (L-NAME)	8	I/R+L-NAME
Grup 4 (BQ)	8	I/R+BQ-123
Grup 5 (BQ+L-NAME)	8	I/R+BQ-123+L-NAME
Grup 6 (BQ+L-NAME+L-Arg)	8	I/R+BQ-123+L-NAME+L-Arg

3.2. Cerrahi Uygulama

Deney günü, deney düzeneğinin hazırlanması ve düzenek kontrollerinin yapılmasından sonra tartılan sıçanlara, 1,2 g/kg dozda intra peritoneal (i.p.) ürat anestezisi yapıldı.

Boyun bölgesi açılarak sol karotis arterine konan katater, kalibrasyonu yapılan basınç transdüseri (Harward EM751) yoluyla osilografa bağlanarak I/R süresince kan basıncı takibi yapıldı.

Açılan boyun bölgesinde, sağ juguler vene yerleştirilen kateter ile deney esnasında % 5 dextroz solusyonu içinde çözünen ilaçların (BQ-123+L-NAME+L-Arg) insülin enjektörü ile yavaş intra venöz (i.v.) enjeksiyonu yapıldı. Grup 1 ve 2'ye ilaçsız %5 dektroz verildi. Deney süresince verilen toplam sıvı miktarı 200 g'lık bir sıçan için $0,4+0,4+0,4+(7 \times 0,04)=1,48$ cc'dir. L-NAME 25. dk'da, L-Arg 27. dk'da verildi. BQ-123 29.dk'da 1 mg/kg dozda verildi ve hemen sonra klemp açılarak reperfüzyon başlatıldı. Daha sonra yeterli kan düzeyi sağlamak amacıyla grup 4, 5 ve 6'da reperfüzyon süresince 15 dakika arayla 7 defa daha 0.1 mg/kg dozunda BQ-123 uygulaması yapıldı. Diğer gruplara eşdeğer zamanlarda sadece %5 dextroz verildi.



Şekil 6: Deney prosedürü

Sol mid klavikular hattın üst-orta abdomen bölgesinden yapılan yaklaşık 1-1,5 cm kesi ile periton boşluğu açıldı. Böbrek ortaya çıkarıldı (ekspoz edildi). Abdominal aorta ile böbrek hilusu arasına konan bulldog klemp ile renal kan akımı kesilerek böbrek dokusunun kanlanması engellendi (iskemi). Böylece oluşturulan 30 dakikalık iskemiden sonra klemp kaldırılarak sol bôbreğin tekrar kanlanması sağlandı (reperfüzyon). Deney süresince vücut sıcaklığı sabit tutuldu. Sıcaklık kontrolü rektal prob ile yapıldı. Deney süresince cerrahi işlem yapılan bölgelere homeostazisi sağlamak için NaCl solusyonu uygulandı.

İki saat süren bu reperfüzyon sonrasında orta abdominal hat açılıp heparinli enjektör ile *vena cava inferior*'dan olabildiğince kan alınıp (3-7 cc) plazmaları ayrılarak polipropilen tüplere alındı. Kan alınmasının hemen sonrasında kalpten kanatılarak sıçan öldürüldü. Böbrek dokuları ağırlıkları not edildikten sonra alüminyum-folyo ile sarılıp -70°C *deepfreeze*'de plazmayla

birlikte deney gününe kadar saklandı.

3.3. Ortalama Kan Basıncı

Kan basınçları sol karotid artere yerleştirilen katetere bağlı basınç transduseri (Harvad, EM751) ile osilografa (Harvad Univesal Oscillograph) kaydedildi. Yaklaşık Ortalama Kan Basınçları (OKB) hesaplaması "diastolik basınçla nabız basıncının üçte birinin toplamı" işlemine göre¹⁶ yapıldı.

3.4. Biyokimyasal Analizler

3.4.1. Katalaz (KAT) Enzim Aktivitesi

Katalaz (KAT, EC 1.11.1.6) enzim aktivitesi Aebi'nin metodu uygulanarak ölçüldü.⁸¹ H_2O_2 , 240 nm'de maksimum absorpsiyon verdiğinden numuneye eklenen H_2O_2 , katalaz tarafından H_2O ve O_2 'ye parçalanır:⁶⁹



Ultraviyole spektrumunda H_2O_2 'nin bu dönüşümü absorpsiyon azalması şeklinde kendini gösterir. Absorbanstaki bu azalma katalaz enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır. Absorpsiyon H_2O_2 ile 0.500'e ayarlanmış pH 7 deki 50 mM fosfat tamponuna, numune eklenmesiyle 240 nm dalga boyunda absorpsiyondaki düşüş 15 sn aralıklarla kaydedildi. Hesaplama 1 dakikalık lineer absorpsiyon azalması dikkate alındı. Sonuçlar k/g protein olarak ifade edildi.

$$k = [2.3 \times \log (OD_1 / OD_2)] / 30 \text{ (sn)}$$

3.4.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi

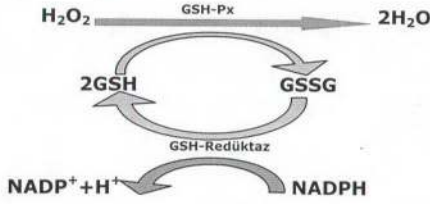
Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1) enzim aktivitesi ölçümü nitroblue tetrazolium (NBT) ile ortaya çıkan $O_2^{\cdot -}$ 'nin indirgenmesi esasına dayanır.^{82,83} Ortamdaki $O_2^{\cdot -}$ 'leri, NBT'yi indirgeyerek renkli formasyon oluşturur. Bu kompleks 560 nm'de maksimum absorpsiyon verir. SOD enzimi ortamda bulunmadığında daha koyu bir mavi-mor renk değişikliği meydana gelirken, ortamda SOD enzimi bulunduğunda ise enzim miktarına bağlı olarak daha açık bir renk değişikliği meydana gelmektedir.

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

$$\text{Enzimin \% inhibisyonu} = (Abs_{k\ddot{o}r} - Abs_{num}) / Abs_{k\ddot{o}r} \times 100$$

3.4.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) Enziminin Aktivitesi

Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px, EC 1.11.1.9) enzim aktivitesi Paglia ve arkadaşlarının metodu uygulanarak ölçüldü.⁸⁴ GSH-Px, H_2O_2 varlığında redükte glutasyonun (GSH) okside glutatyon (GSSG) yükseltgenmesini katalizler. H_2O_2 'in bulunduğu ortamda GSH-Px'in oluşturduğu GSSG, glutasyon redüktaz ve NADPH yardımıyla tekrar GSH oluşturulur. GSH-Px enzim aktivitesi; NADPH'in $NADP^+$ 'ya yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalmasının 340 nm'de okunmasıyla hesaplandı.



Şekil 7: GSH-Px döngüsü.⁶⁹

Enzim Ünitesi; Birim zamanda okside olan $NADPH$ 'in mikromol miktarıdır. Sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

3.4.4. Ksantin Oksidaz (XO) Enziminin Aktivitesi

Ksantin Oksidaz (XO, EC 1.1.3.22) enzim aktivitesi Prajda ve Weber metodu uygulanarak ölçüldü.⁸⁵ Metoddaki XO aktivitesi; numunede bulunan XO'n ortamdaki ksantinden ürik asit oluşturması temeline dayanır. Oluşan ürik asit miktarı, %100'lük TCA solüsyonunun eklenmesi ile stabilize edildi. Spektrofotometrede 293 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçülür. Böylece 30 dakika içerisinde üretilen ürik asit miktarı belirlenir ve aktivite U/mg protein cinsinden ifade edildi.

3.4.5. Miyeloperoksidaz (MPO) Enziminin Aktivitesi

Miyeloperoksidaz (MPO, EC 1.11.1.7) enzim aktivitesi Gallin ve arkadaşları ile Wei ve arkadaşlarının metoduna göre ölçüldü.⁸⁶ MPO, hasarlanan dokuya lökosit geçişinde aktivitesi artan bir enzimdir. H_2O_2 'in, Cl^- varlığında MPO enzimiyle hipoklorata (HOCl) dönüşmesi prensibine dayanır. %0.5'lik Hexadecyltrimethyl ammonium bromid (HDTMAB) ile homojenize edilen dokular 3220 rpm'de, 45 dakika, $+4^\circ C$ 'de santrifüj edildi. 510 nm'de 5 dakika boyunca absorbans artışı kaydedildi. Lineer aktivite artışının gözlemlendiği absorbans değerleri hesaba katıldı. Substrat olarak 4-aminoantipyrine/phenol

solusyonu kullanılarak aktivite tayini yapıldı.

1 enzim Ünitesi; 25 °C'de 1 dakikada 1µmol H₂O₂'yi harcayan enzim olarak ifade edildi.

$$U/L = [\Delta OD / \Delta t \text{ (dakika)}] \times (3/0.2)] \times F$$

3.4.6. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeleri (TBARS) Miktarının Tayini

Esterbauer ve Cheeseman'nin metodu ile çalışıldı.⁸⁷ En çok kullanılan lipid peroksitasyon tayin yöntemidir.⁶⁹ Asidik ortamdaki tiyobarbitürik asit ile 90-95°C'de reaksiyona giren malondialdehit (MDA) ve diğer TBARS, pembe renkli kromojen meydana getirir. Onbeş dakika sonra hızla soğutulan numunelerin absorbanları 532 nm'de spektrofotometrik olarak okundu.

Sonuçlar nmol/g yaş doku olarak ifade edildi.

3.4.7. Protein Karbonil (PC) Miktarı Tayini

Metod; karbonil grubunun 2,4-dinitrofenilhidrazin ile reaksiyona girerek 2,4-dinitrofenilhidrazon oluşturmaya prensibine dayanır.⁸⁸



2,4-dinitrofenilhidrazin oksidasyona maruz kalmış proteinlerde açığa çıkan karbonil gruplarının gösterilmesinde kullanılan ajandır. 2M HCl içerisinde hazırlanan 2,4-dinitrofenilhidrazin solüsyonunun homojenattaki karbonil içeriği ile reaksiyona girmesi sağlanmış, etanol/etil asetat karışımı ile yıkanan çökelti bir sonraki aşamada 100 mM NaOH çözeltisi içerisinde çözülmesinden sonra 360 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüm yapılmıştır. Sonuçlar; nmol/mg protein olarak hesaplanmıştır.

3.4.8. Nitrik Oksit (NO) Miktarının Tayini

Vücutta üretilen NO saniyeler içinde okside olarak önce azot dioksit (NO₂) sonra NO₂⁻ ve NO₃⁻ dönüşür. Bu oluşum şu şekilde gerçekleşir.⁶⁹



Doku homojenatındaki spesifik olmayan reaksiyonlar meydana gelmesini önlemek için homojenatları önce deproteinize edip daha sonra nitrit ve nitrat konsantrasyonları *Griess reaksiyonu* ile belirlendi.⁸⁹ Total nitrit (nitrit + nitrat) konsantrasyonu modifiye kadmiyum redüksiyon metodu ile değerlendirildi. pH 9.7 glisin tamponunda bakır (Cu) kaplı kadmiyum granülleri deproteinize

numune süpernatantı ile 90 dakikalık inkübasyon sonunda nitrat redüksiyonu sağlandı. Üretilen nitrit; sulfanilamid ve buna bağlı *N-naphthylethylene diamin* (NDA) diazotizasyonu ile reaksiyon sonucu oluşan pembe rengin 545 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunması ile belirlendi. Sonuçta elde edilen nitrit konsantrasyonu ilk konsantrasyondan çıkarılarak nitrat miktarı belirlendi.

3.4.9. Protein Tayini

Enzim aktivitelerinin ölçümünde ölçüt olarak kullanılan protein tayini Lowry metoduna göre çalışıldı.⁹⁰ Derişik alkali çözeltide bakır-protein kompleksi, fosfomolibdat-fosfotungstat reaktifini (Folin-Ciocalteu-Phenol reaktifi) indirger. Amino asitler ve dipeptidler bu reaksiyonu vermezler. Alkali ortamda aktif olan Folin-Ciocalteu-Phenol reaktifi, asit ortamda dayanıklıdır. Oluşan menekşe renginin koyuluğu ile orantılı protein konsantrasyonu vardır.

Numuneler köre karşı 700 nm'de okundu.

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

F (faktör) = standart hacmi (0.5 mL)/numune hacmi (0.010mL) = 50

Not: Faktör, kullanılan numunenin miktarına göre değişir. Kullanılan numunenin miktar değişikliği distile su hacmi ile ters orantılı olarak pipetlenir.

3.5. Diğer Biyokimyasal Analizler

Plazma BUN, Kreatinin (Cr) ve Na⁺ değerleri ticari Olympus kitleri kullanarak bir otoanalizatör ile (Olympus AU600) ölçüldü.

3.6. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler "SPSS 10.0 for Windows" ile yapıldı. Veri dağılımı uygunluğu non-parametrik testlerden "one-sample Kolmogorov-Smirnov Testi" ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren gruplarda, grupların karşılaştırılmasında parametrik testlerden "one-way ANOVA Testi" ve "Post Hoc" testlerden "LSD" kullanıldı. Grup içi karşılaştırmalarda "pair-T testi" ve "Wilcoxon Testi" uygulandı. Normal dağılım göstermeyen gruplarda non-parametrik testlerden "Kruskal-Wallis Varyans Analizi" kullanıldı.

Değerler ortalama $\pm$ standart hata olarak verildi. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0.05$ olan değerler anlamlı olarak kabul edildi.

4- SONUÇLAR

4.1. Ortalama Kan Basıncı Sonuçları

Deney süresince kayıt edilen kan basıncı değişiklikleri Grafik 1 ve Grafik 2 de yer almaktadır. Gruplara göre deney süresince OKB değerleri tablo4 de verilmiştir.

Tablo 4: Gruplara göre OKB değerleri. Sonuçlar mmHg cinsinden ortalama± ortalamanın standart hata olarak verilmiştir.

Gruplar	Grup 1 (Kontrol)	Grup 2 (I/R)	Grup 3 (L-NAME)	Grup 4 (BQ)	Grup 5 (BQ+L-NAME)	Grup 6 (BQ+L-NAME +L-Arg)
Preis	102.6 ± 3.1	101.3 ± 4.1	99.3 ± 3.9	97.4 ± 4.3	106.1 ± 2.8	102.2 ± 1.4
İşk 1.dk	99.1 ± 4.2	80.3 ± 5.6	87.5 ± 4.3	93.5 ± 6.3	94.5 ± 3.3	90.5 ± 4.2
İşk 25.dk	105.2 ± 3.6	97.8 ± 5.9	102.1 ± 4.9	102.6 ± 4.3	93.6 ± 2.9	96.2 ± 3.4
Re 1.dk	96.9 ± 3.8	91.2 ± 5.1	152.5 ± 4.9	104.4 ± 4.4	147.0 ± 5.2	119.9 ± 4.2
Re 5.dk	98.8 ± 3.1	98.0 ± 3.2	158.0 ± 5.5	100.1 ± 3.8	151.6 ± 5.9	129.2 ± 2.8
Re 30.dk	95.0 ± 4.3	100.0 ± 2.8	166.1 ± 6.8	93.3 ± 3.2	146.5 ± 4.3	124.1 ± 3.0
Re 60.dk	89.6 ± 3.6	103.0 ± 3.9	158.6 ± 6.8	86.9 ± 4.3	148.8 ± 7.1	125.4 ± 3.1
Re 120.dk	88.3 ± 3.7	109.5 ± 5.7	152.3 ± 7.5	82.3 ± 5.5	148.1 ± 5.1	121.4 ± 4.0

Preiskemi döneminde ve iskeminin 25. dakikasındaki yapılan OKB ölçümlerine göre gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu. İskeminin 1. dakikasında yapılan ölçümlere göreyse I/R grubu Kontrol ve BQ+L-NAME gruplarından anlamlı olarak düşük OKB değerine sahipti ($p<0.05$).

Reperfüzyonun 1. dakikasında L-NAME ve BQ+L-NAME gruplarının OKB değerleri Kontrol, I/R, BQ ve BQ+L-NAME+L-Arg gruplarına göre anlamlı olarak yüksekken ($p<0.05$), ayrıca BQ+L-NAME+L-Arg grubu OKB değeri Kontrol, I/R ve BQ gruplarından anlamlı olarak yüksekti ($p<0.05$). Reperfüzyonun 1. dakikasında Kontrol, I/R ve BQ grupları arasında OKB açısından anlamlı bir fark yoktu.

Reperfüzyonun 5. dakikasında L-NAME, BQ+L-NAME ve BQ+L-NAME+L-Arg gruplarının OKB değerleri, Kontrol, I/R ve BQ gruplarına göre anlamlı olarak yüksekti ($p<0.05$), ayrıca L-NAME grubu BQ+L-NAME grubu hariç diğerlerinden anlamlı olarak yüksek ($p<0.05$) ve ayrıca BQ+L-NAME grubu BQ+L-NAME+L-Arg grubundan anlamlı olarak daha yüksek OKB değerine sahipti ($p<0.05$). Kontrol, I/R ve BQ grupları arasında reperfüzyonun 5.

dakikasında ölçülen OKB değerleri açısından anlamlı bir fark bulunmamaktaydı.

Reperfüzyonun 30. dakikasında Kontrol, I/R ve BQ grupları arasında ölçülen OKB değerleri açısından anlamlı bir fark yoktu. Fakat L-NAME grubu diğer gruplara göre anlamlı olarak yüksek ($p<0.05$), Kontrol, I/R ve BQ gruplarının OKB değerleri ayrıca BQ+L-NAME ve BQ+L-NAME+L-Arg gruplarına göre anlamlı olarak düşük ($p<0.05$), ve BQ+L-NAME grubu L-NAME grubu hariç diğer gruplara göre anlamlı olarak daha yüksek OKB değerine sahipti ($p<0.05$).

Reperfüzyonun 60. dakikasında Kontrol grubu OKB değeri L-NAME, BQ+L-NAME ve BQ+L-NAME+L-Arg gruplarına göre anlamlı olarak düşük ($p<0.05$), I/R grubu ise BQ grubundan anlamlı olarak yüksek Kontrol dışındaki diğer gruplardan anlamlı olarak düşük ($p<0.05$), L-NAME grubu ise BQ+L-NAME grubu dışında diğer gruplara göre anlamlı olarak yüksek ($p<0.05$) ve BQ+L-NAME+L-Arg grubu L-NAME ve BQ+L-NAME gruplarına göre anlamlı olarak yüksek, diğer gruplara göre ise düşük OKB değerine sahipti ($p<0.05$).

Reperfüzyonun 120. dakikasında Kontrol ve BQ grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Fakat Kontrol ve BQ grupları OKB değerleri I/R, L-NAME, BQ+L-NAME ve BQ+L-NAME+L-Arg gruplarına göre anlamlı olarak düşük ($p<0.05$), I/R grubu ise ayrıca L-NAME ve BQ+L-NAME gruplarından anlamlı olarak düşük ($p<0.05$), L-NAME grubu da ayrıca BQ+L-NAME+L-Arg grubuna göre yüksek ($p<0.05$) ve BQ+L-NAME grubu da ayrıca BQ+L-NAME+L-Arg grubuna göre anlamlı olarak yüksek OKB değerine sahipti ($p<0.05$).

Kontrol grubunda; preiskemi ve iskeminin 25. dakikasına göre, reperfüzyonun 60. ve 120. dakikalarındaki OKB'de anlamlı düşüş ($p<0.05$) görüldü. Ayrıca iskeminin 25. dakikasına göre, reperfüzyonun 1. dakikasında anlamlı düşüş saptandı.

I/R grubunda; iskeminin 1. dakikası ile reperfüzyonun 5., 60. ve 120. dakikaları karşılaştırıldığında anlamlı olarak OKB artışı ($p<0.05$) izlenirken, preiskemi ve iskeminin 25. dakikası ile reperfüzyon dönemi arasında OKB değerleri açısından anlamlı bir fark bulunmadı.

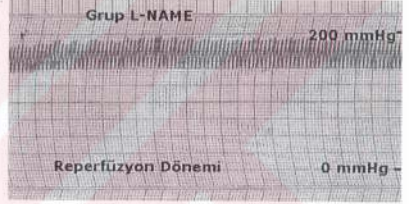
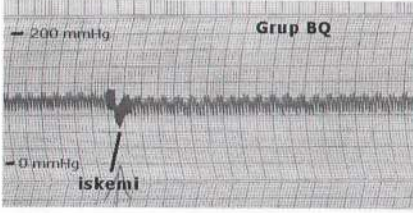
L-NAME grubunda; tüm reperfüzyon dönemi, preiskemi ve iskemi dönemlerine göre OKB'leri anlamlı yüksek ($p<0.001$) bulundu.

BQ grubunda; reperfüzyonun 60. ve 120. dakikalarındaki OKB değerleri iskeminin 25. dakikasına göre anlamlı olarak düşüş, reperfüzyonun 1. ve 120. dakikalarındaki OKB değerleri preiskemi dönemine göre anlamlı olarak düşüş ($p<0.05$) gösterdi.

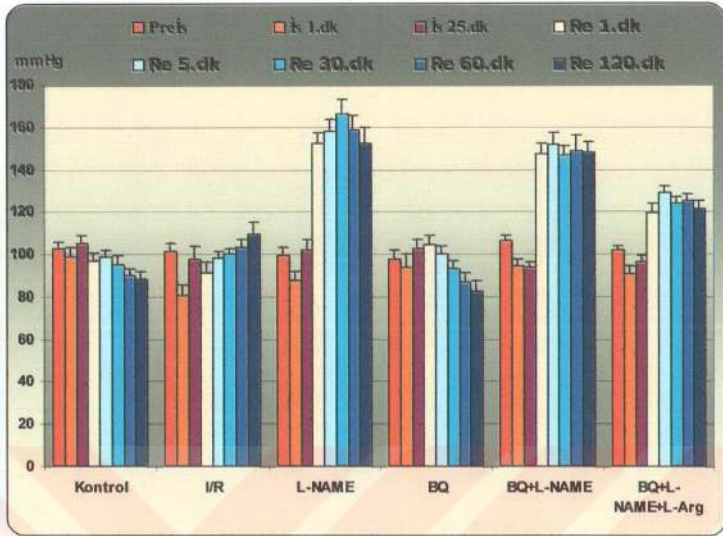
BQ+L-NAME grubunda; reperfüzyon dönemindeki OKB değerleri iskemi ve preiskemi dönemlerine göre anlamlı olarak yükseldi ($p<0.001$).

BQ+L-NAME+L-Arg grubu reperfüzyon dönemindeki OKB değerleri iskemi ve preiskemi dönemlerine göre anlamlı olarak yükseldi ($p<0.001$).

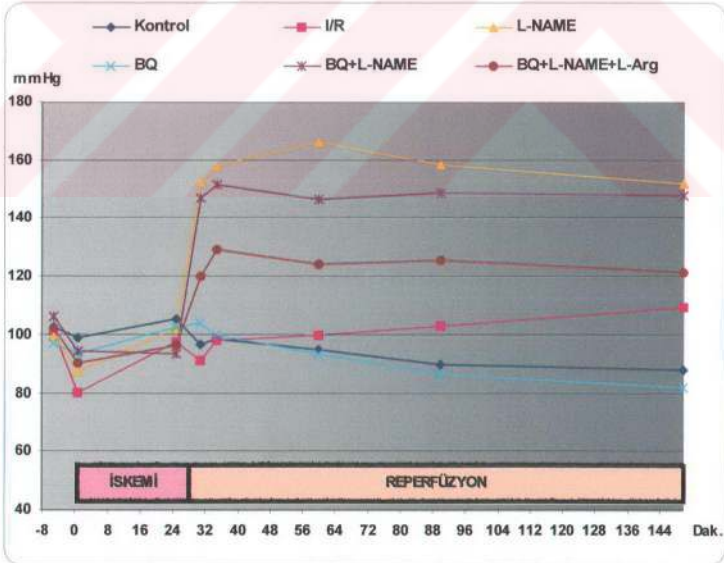
Aşağıda osilograf kan basınçları kayıtlarından örnekler bulunmaktadır:



Resim 1: Kan basıncı kayıt örnekleri.



Grafik 1: Ortalama kan basıncı (OKB) değişikliklerinin grup grup, sütun olarak gösterimi.



Grafik 2: Deney süresince izlenen ortalama kan basıncı değişiklikleri.

4.2. Biyokimyasal Parametreler

Tablo 5: Böbrek dokusu katalaz (KAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidad (GSH-Px) ve ksantin oksidaz (XO) enzim aktiviteleri ile bunlara ait *p* değerleri.

Gruplar	KAT (k/g prot)	SOD (U/mg prot)	GSH-Px (U/g prot)	XO (U/g prot)
Grup 1 (Kontrol)	1.258 ± 0.044	0.190 ± 0.013	1.177 ± 0.053	1.297 ± 0.097
Grup 2 (I/R)	1.197 ± 0.072	0.184 ± 0.014	1.585 ± 0.063	2.221 ± 0.180
Grup 3 (L-NAME)	1.066 ± 0.065	0.178 ± 0.012	1.526 ± 0.071	1.737 ± 0.148
Grup 4 (BQ)	1.463 ± 0.070	0.241 ± 0.014	1.508 ± 0.060	1.784 ± 0.166
Grup 5 (BQ+L-NAME)	1.255 ± 0.049	0.206 ± 0.010	1.350 ± 0.104	1.527 ± 0.129
Grup 6 (BQ+L-NAME+L-Arg)	1.318 ± 0.070	0.212 ± 0.096	1.719 ± 0.169	1.695 ± 0.103
<i>P</i>				
1-2	A.D.	A.D.	0.004	0.001
1-3	0.035	A.D.	0.013	0.033
1-4	0.025	0.005	0.019	0.019
1-5	A.D.	A.D.	A.D.	A.D.
1-6	A.D.	A.D.	0.001	A.D.
2-3	A.D.	A.D.	A.D.	0.019
2-4	0.004	0.002	A.D.	0.033
2-5	A.D.	A.D.	A.D.	0.001
2-6	A.D.	A.D.	A.D.	0.012
3-4	0.001	0.001	A.D.	A.D.
3-5	0.038	A.D.	A.D.	A.D.
3-6	0.007	A.D.	A.D.	A.D.
4-5	0.024	0.047	A.D.	A.D.
4-6	A.D.	A.D.	A.D.	A.D.
5-6	A.D.	A.D.	0.009	A.D.

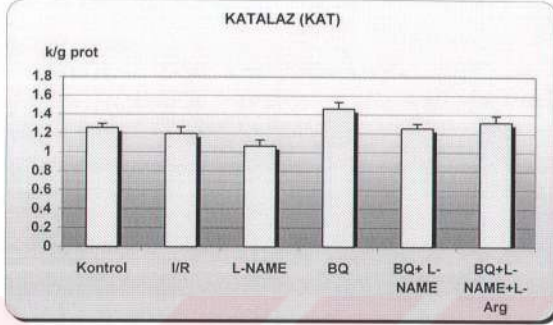
A.D.: Anlamlı Değil

Tablo 6: Doku tiobarbitürik asit reaktif substans (TBARS), protein karbonil (PC) ve nitrik oksit (NO) düzeyleri ile miyeloperoksidaz (MPO) aktiviteleri ve bunlara ait *p* değerleri.

Gruplar	MPO (mU/g prot)	TBARS (nmol/g yaş doku)	PC (nmol/mg prot)	NO (nmol/g yaş doku)
Grup 1 (Kontrol)	51.28 ± 4.10	41.184 ± 4.187	1.187 ± 0.145	134.957 ± 7.090
Grup 2 (I/R)	120.11 ± 4.97	77.473 ± 5.319	2.479 ± 0.152	171.770 ± 8.187
Grup 3 (L-NAME)	115.19 ± 8.98	72.933 ± 4.748	2.366 ± 0.152	122.626 ± 9.897
Grup 4 (BQ)	73.21 ± 5.59	50.543 ± 4.109	1.902 ± 0.117	162.772 ± 10.485
Grup 5 (BQ+L-NAME)	104.86 ± 12.37	55.294 ± 8.089	2.267 ± 0.132	127.494 ± 9.198
Grup 6 (BQ+L-NAME+L-Irg)	99.34 ± 10.56	44.121 ± 4.123	1.878 ± 0.148	173.348 ± 10.272
<i>P</i>				
1-2	0.001	0.001	0.001	0.008
1-3	0.001	0.001	0.001	A.D.
1-4	A.D.	A.D.	0.001	0.040
1-5	0.001	A.D.	0.001	A.D.
1-6	0.001	A.D.	0.001	0.005
2-3	A.D.	A.D.	A.D.	0.001
2-4	0.001	0.001	0.006	A.D.
2-5	A.D.	0.005	A.D.	0.002
2-6	A.D.	0.001	0.004	A.D.
3-4	0.001	0.005	0.025	0.004
3-5	A.D.	0.023	A.D.	A.D.
3-6	A.D.	0.001	0.019	0.001
4-5	0.010	A.D.	A.D.	0.010
4-6	0.032	A.D.	A.D.	A.D.
5-6	A.D.	A.D.	A.D.	0.001

A.D.: Anlamlı Değil

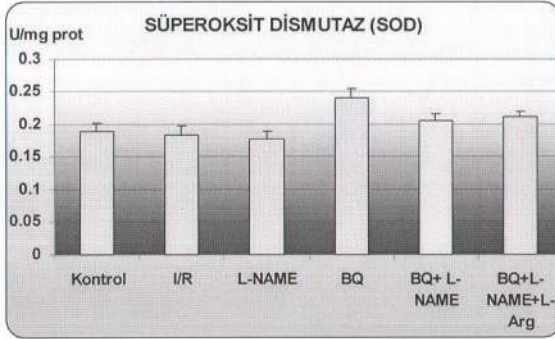
Grupların ortalama KAT, SOD, GSH-Px ve XO enzim aktiviteleri tablo 5’de standart hataları ve *p* değerleri ile verilmiştir. MPO enzim aktivitesi, TBARS, PC, NO düzeyleri standart hataları ve *p* değerleri ile birlikte tablo 6’de verilmiştir.



Grafik 3: Böbrek dokusu katalaz (KAT) enzim aktiviteleri.

Böbrek KAT enzim aktiviteleri Kontrol grubunda ortalama 1.258 ± 0.044 , I/R grubunda 1.197 ± 0.072 , L-NAME grubunda 1.066 ± 0.065 , BQ grubunda 1.463 ± 0.070 , BQ+L-NAME grubunda 1.255 ± 0.049 ve BQ+L-NAME+L-Arg grubunda ise 1.318 ± 0.070 k/g prot olarak tespit edildi (Grafik 3).

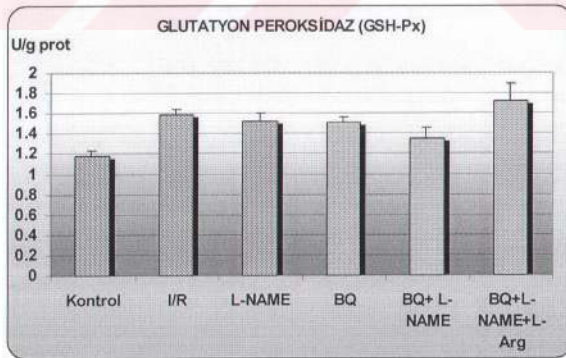
Kontrol grubu KAT aktivitesi L-NAME grubundan istatistiksel olarak anlamlı yüksekken ($p < 0.05$), BQ grubundan anlamlı olarak düşüktü ($p < 0.05$). Katalaz aktivitesi I/R grubunda BQ grubuna göre anlamlı olarak düşüktü ($p < 0.05$). Diğer gruplar ile I/R grubu arasında anlamlı bir fark yoktu. L-NAME grubu KAT aktivitesi I/R grubu dışında diğer tüm gruplardan anlamlı olarak düşük olduğu tespit edildi ($p < 0.05$). BQ grubu KAT aktivitesi BQ+L-NAME+L-Arg grubu dışında diğer tüm gruplardan anlamlı olarak yüksekti ($p < 0.05$). Katalaz aktivitesi BQ+L-NAME grubunda BQ grubundan anlamlı olarak düşük ($p < 0.05$), L-NAME grubundan ise anlamlı olarak yüksek olarak ölçüldü ($p < 0.05$). BQ+L-NAME+L-Arg grubu KAT aktivitesinde L-NAME grubuna göre anlamlı artış vardı ($p < 0.05$).



Grafik 4: Böbrek dokusu süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi.

Böbrek SOD enzim aktivitesi; Kontrol grubunda ortalama 0.190 ± 0.013 , I/R grubunda 0.184 ± 0.014 , L-NAME grubunda 0.178 ± 0.012 , BQ grubunda 0.241 ± 0.014 , BQ+L-NAME grubunda 0.206 ± 0.010 ve BQ+L-NAME+L-Arg grubunda ise 0.212 ± 0.096 U/mg prot olarak hesaplandı (Grafik 4).

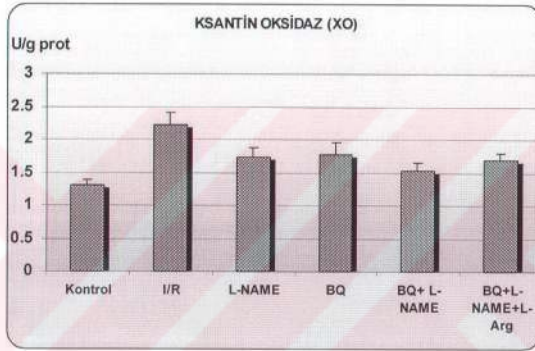
Böbrek dokusu SOD enzim aktivitesinin BQ grubunda Kontrol, I/R, L-NAME ve BQ+L-NAME grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artışı tespit edildi ($p < 0.05$). Doku SOD enzim aktivitesi açısından BQ grubu ile BQ+L-NAME+L-Arg grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamaktaydı.



Grafik 5: Böbrek dokusu glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi.

Böbrek dokusu GSH-Px enzim aktiviteleri; Kontrol grubunda ortalama 1.177 ± 0.053 , I/R grubunda 1.585 ± 0.063 , L-NAME grubunda 1.526 ± 0.071 , BQ grubunda 1.508 ± 0.060 , BQ+L-NAME grubunda 1.350 ± 0.104 ve BQ+L-NAME+L-Arg grubunda ise 1.719 ± 0.169 U/g prot. olarak tespit edildi (Grafik 5).

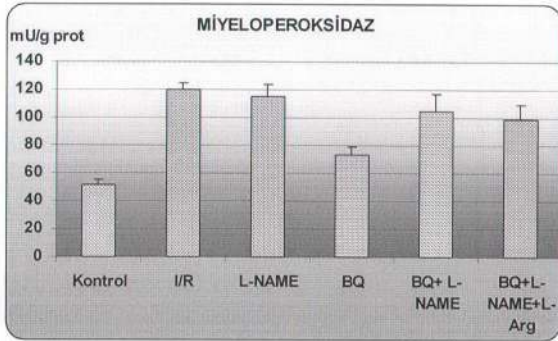
Kontrol grubuna göre GSH-Px aktivitesi; I/R, L-NAME, BQ ve BQ+L-NAME+L-Arg gruplarında anlamlı olarak yüksekti ($p<0.05$). Doku GSH-Px aktivitesi BQ+L-NAME+L-Arg grubunda BQ+L-NAME grubuna göre anlamlı olarak yüksekti ($p<0.05$).



Grafik 6: Böbrek dokusu ksantin oksidaz (XO) enzim aktiviteleri.

Böbrek XO enzim aktiviteleri Kontrol grubunda ortalama 1.297 ± 0.097 , I/R grubunda 2.221 ± 0.180 , L-NAME grubunda 1.737 ± 0.148 , BQ grubunda 1.784 ± 0.166 , BQ+L-NAME grubunda 1.527 ± 0.129 ve BQ+L-NAME+L-Arg grubunda ise 1.695 ± 0.103 U/g prot olarak bulundu (Grafik 6).

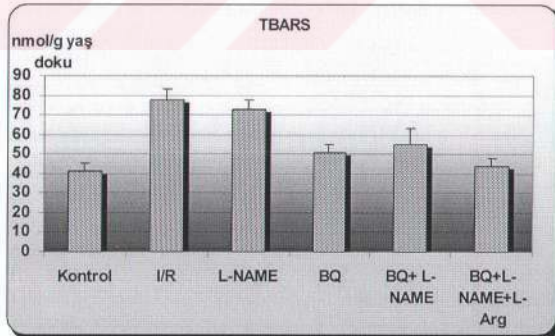
Kontrol grubu XO aktivitesinin I/R, L-NAME ve BQ gruplarına göre anlamlı olarak düşük olduğu tespit edildi ($p<0.05$). Doku XO aktivitesinin I/R grubunda diğer tüm gruplara göre yüksek olduğu görüldü ($p<0.05$). Diğer gruplar arasında XO aktivitesi açısından istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yoktu.



Grafik 7: Böbrek dokusu miyeloperoksidaz (MPO) enzim aktiviteleri.

Böbrek dokusunda MPO enzim aktiviteleri; Kontrol grubunda ortalama 51.28 ± 4.10 , I/R grubunda 120.11 ± 4.97 , L-NAME grubunda 115.19 ± 8.98 , BQ grubunda 73.21 ± 5.59 , BQ+L-NAME grubunda 104.86 ± 12.37 ve BQ+L-NAME+L-Arg grubunda 99.34 ± 10.56 mU/g prot olarak hesaplandı (Grafik 7).

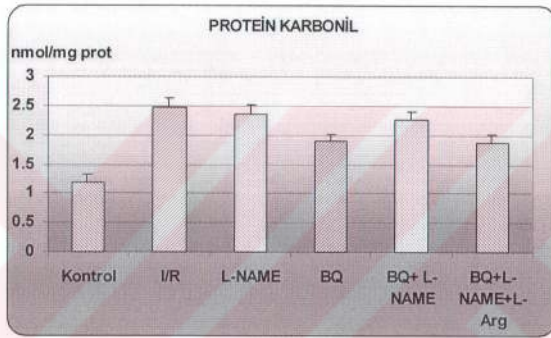
Böbrek dokusu MPO enzim aktivitesi I/R, L-NAME, BQ+L-NAME ve BQ+L-NAME+L-Arg gruplarında Kontrol ve BQ gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği tespit edildi ($p < 0.05$). Diğer gruplar arasında ise anlamlı bir fark bulunmamaktadır.



Grafik 8: Böbrek dokusu tiobarbitürik asit reaktif substans (TBARS) düzeyleri.

Böbrek TBARS seviyeleri Kontrol grubunda ortalama 41.184 ± 4.187 , I/R grubunda 77.473 ± 5.319 , L-NAME grubunda 72.933 ± 4.748 , BQ grubunda 50.543 ± 4.109 , BQ+L-NAME grubunda 55.294 ± 8.089 ve BQ+L-NAME+L-Arg grubunda ise 44.121 ± 4.123 nmol/g yaş doku olarak hesaplandı (Grafik 8).

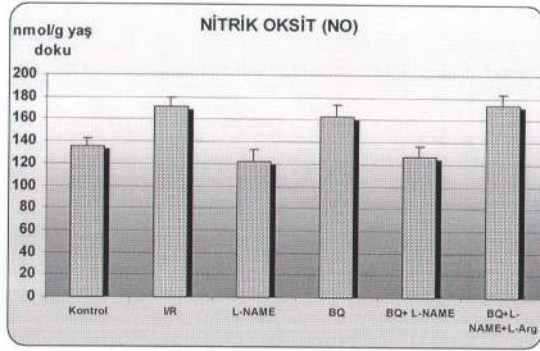
Böbrek dokusu TBARS seviyesi I/R ve L-NAME gruplarında Kontrol, BQ, BQ+L-NAME ve BQ+L-NAME+L-Arg gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği tespit edildi ($p < 0.05$). Diğer gruplar arasında ise anlamlı bir fark bulunmamaktadır.



Grafik 9: Böbrek dokusu protein karbonil (PC) miktarları.

Böbrek PC miktarı; Kontrol grubunda ortalama 1.187 ± 0.145 , I/R grubunda 2.479 ± 0.152 , L-NAME grubunda 2.366 ± 0.152 , BQ grubunda 1.902 ± 0.117 , BQ+L-NAME grubunda 2.267 ± 0.132 ve BQ+L-NAME+L-Arg grubunda ise 1.878 ± 0.148 nmol/mg prot olarak saptandı (Grafik 9).

Böbrek dokusu PC seviyesi I/R ve L-NAME gruplarında Kontrol, BQ ve BQ+L-NAME+L-Arg gruplarına göre, BQ, BQ+L-NAME ve BQ+L-NAME+L-Arg grupları Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği tespit edildi ($p < 0.05$). Diğer gruplar arasında ise anlamlı bir fark bulunmamaktadır.



Grafik 10: Böbrek dokusu nitrik oksit (NO) düzeyleri.

Böbrek NO düzeyleri sırasıyla; Kontrol grubunda ortalama 134.957 ± 7.090 , I/R grubunda 171.770 ± 8.187 , L-NAME grubunda 122.626 ± 9.897 , BQ grubunda 162.772 ± 10.485 , BQ+L-NAME grubunda 127.494 ± 9.198 ve BQ+L-NAME+L-Arg grubunda ise 173.348 ± 10.272 nmol/g yaş doku olarak hesaplanmıştır (Grafik 10).

NO düzeyi I/R, BQ ve BQ+L-NAME+L-Arg gruplarında Kontrol, L-NAME ve BQ+L-NAME gruplarına göre anlamlı olarak yüksekti ($p < 0.05$). Gruplar arası başka bir anlamlılık bulunmamaktaydı.

4.3. Diğer Biyokimyasal Parametreler

Plazma BUN, Cr ve Na değerlerinin grafikleri sırasıyla tablo 11, 12 ve 13'de verilmiştir.

Plazma BUN değerleri Kontrol grubunda 34.5 ± 4.39 , I/R grubunda 41.6 ± 4.53 , L-NAME grubunda 43.0 ± 3.42 , BQ grubunda 30.5 ± 1.78 , BQ+ L-NAME grubunda 38.7 ± 2.39 , BQ+L-NAME+L-Arg grubunda 52.3 ± 4.21 mg/dL olarak bulundu.

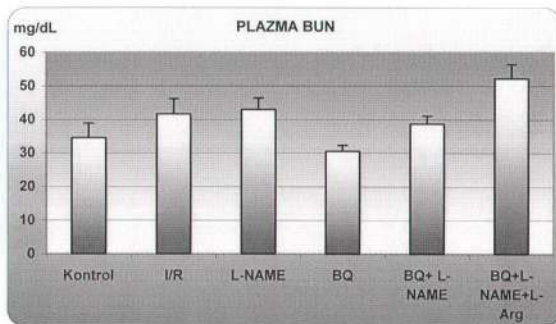
Plazma BUN değerleri Kontrol, I/R ve BQ+L-NAME gruplarında BQ+L-NAME+L-Arg grubuna göre ($p<0.05$), BQ grubunda da I/R, L-NAME ve BQ+L-NAME+L-Arg gruplarına göre anlamlı olarak düşük olduğu ($p<0.05$) tespit edildi. Diğer gruplar arasında plazma BUN değerleri açısından anlamlı fark saptanmadı.

Plazma Cr değerleri Kontrol grubunda 0.68 ± 0.07 , I/R grubunda 0.86 ± 0.10 , L-NAME grubunda 0.84 ± 0.10 , BQ grubunda 0.68 ± 0.06 , BQ+ L-NAME grubunda 0.67 ± 0.06 , BQ+L-NAME+L-Arg grubunda 0.58 ± 0.05 mg/dL olarak bulundu.

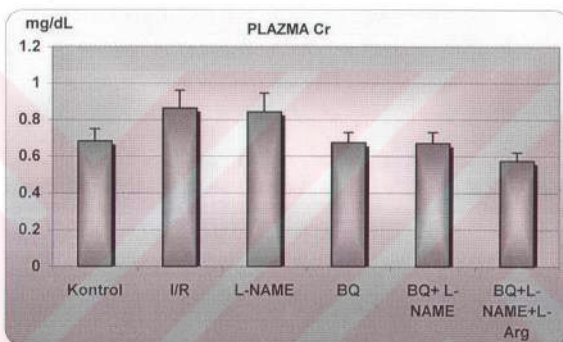
Plazma Cr değerleri BQ+L-NAME+L-Arg grubunda I/R ve L-NAME gruplarına göre anlamlı olarak azaldığı ($p<0.05$) bulundu. Diğer gruplar arasında plazma Cr değerleri açısından anlamlı fark saptanmadı.

Plazma Na^+ değerleri Kontrol grubunda 140.8 ± 1.4 , I/R grubunda 140.8 ± 0.8 , L-NAME grubunda 146.4 ± 2.0 , BQ grubunda 132.6 ± 3.4 , BQ+ L-NAME grubunda 140.7 ± 2.2 , BQ+L-NAME+L-Arg grubunda 140.4 ± 1.0 mmol/L olarak bulundu.

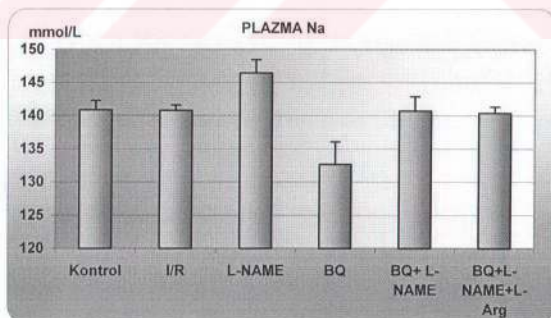
Plazma Na^+ değerleri L-NAME grubunda BQ ve BQ+L-NAME+L-Arg gruplarına göre anlamlı olarak arttığı ($p<0.05$) görüldü. BQ grubu plazma Na^+ değerlerinin ise tüm gruplardan anlamlı olarak düşüş gösterdiği ($p<0.05$) saptandı. Diğer gruplar arasında plazma Na^+ değerleri açısından anlamlı fark saptanmadı.



Grafik 11: Plazma BUN seviyeleri.



Grafik 12: Plazma kreatinin düzeyleri.



Grafik 13: Plazma Na seviyeleri.

5.1. Renal İskemi-Reperfüzyon Hasarı

Böbrekte I/R hasarı ile ortaya çıkan ABY birçok ameliyatta, ameliyat sonrası komplikasyon olarak, transplantasyon amacı ile böbreklerin vericiden alındıktan sonra transferi esnasında ortaya çıkan önemli bir problemdir. Endikasyonu olan hastalara transplantasyon vazgeçilemez bir operasyon olduğundan yapılacak en önemli katkılar bu işlemler esnasında veya sonrasında açığa çıkacak problemleri önlemenin çaresini bulmaktır. Bu problemi ortadan kaldırmak veya en azından hasarı minimum düzeye indirmek için yıllardan beri birçok çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmaların büyük bir çoğunluğu yeni kimyasal ajanların denenmesi şeklinde olmaktadır. Bu bağlamda birçok bilinen veya yeni saptanmış maddelerin denenme işlemleri sürmektedir.

Renal I/R RKA'da, GFH'da, glomerüler kapiller ultrafiltrasyon katsayısında (Kf) azalma ve tübüler disfonksiyon ile karakterizedir. Tübüler disfonksiyon; NaCl reabsorbsiyonunda azalma, hücre döküntüleri ve atıkların meydana getirdiği obstriksiyon, tübül epitelindeki hasardan dolayı glomerüler filtratın geri sızması ile karakterizedir. Bunun sonucunda, idrar atımında artma, natriürezis ve idrarın konsantrasyon yeteneğinde bozulma olur.⁹¹ I/R'un patofizyolojisine birçok medyatör katılabilir: Pürin metaboliteri, ROT, vazodilatatif maddeler (Endotelin, AII, tromboksan A₂, prostaglandinler ve NO) gibi.

5.2. Renal İskemi-Reperfüzyon Hemodinamiği

Bu deneysel çalışmada sol böbrekte yapılan iskemi sonucu, beklenen en önemli fizyolojik cevap dokuya kan akımı geçişinin kesilmesine bağlı olarak renin salgılanmasının artmasıdır. Ancak renin, arter ve ven birlikte klemplendiğinden dolaşıma geçemeyecektir. Olasılıkla; dokuya (sol böbreğe) kan gitmemesi, refleks etkiyle bir miktar vazodilatasyon meydana gelmesine neden olur ve kan basıncı bir miktar düşer. Kontrlatelateral (sağ) böbrekte ise iskeminin başında meydana gelen vazodilatasyon ile sağ renal kan akımı artacaktır. Kan akımının artması renin salınımını ve dolayısıyla AII salınımını azaltarak OKB'nin bir miktar düşmesine katkıda bulunacaktır. Bu durumda santral mekanizmaların devreye girmesiyle iskeminin ilerleyen dakikalarında kontrlatelateral böbrekte renin, AII salgılanması artar ve OKB normal düzeylerde seyreder (Grafik: 1,2)

Reperfüzyonda ise iskemik böbrekte biriken renin klempin kaldırılmasıyla dolaşıma geçecek ve AII yapımını artıracığından OKB'yi artıracaklardır. Hipoksinin ve AII'nin stimüle etmesiyle artan ET-1 yapımı, renal vazokonstriksiyonu daha da artıracaktır. Deney grafiğinden de görüleceği gibi (Grafik 2) reperfüzyonun ilerleyen dakikalarında OKB kontrol grubunda azalma eğilimi göstermesine karşın, I/R grubunda artış olmaktadır. Reperfüzyonun 120. dakikasında I/R grubundaki OKB artışı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksektir. Renal I/R durumlarında plazma ve doku AII ile ET-1 düzeylerinin arttığı bildirilmiştir.^{16,92,93,94} Artan AII ve ET-1 OKB'de artmaya neden olur.

İskemi gruplarında bu mekanizmalar işlerken kontrol grubunda ise iskemi öncesi ve iskemi dönemi arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. Ancak I/R gruplarından farklı olarak reperfüzyonun ilerleyen dakikalarında olasılıkla anestezi etkisiyle ve/veya metabolizmanın yavaşlamasından dolayı OKB'de bir düşme eğilimi görülmektedir.

Bir çalışmada kronik L-NAME uygulamasının erkek ve dişi sıçanlarda OKB'yi kontrole göre belirgin artırdığı bildirilmiştir.⁹⁵ Çalışmamızda ise akut olarak L-NAME uygulamasının kan basıncını diğer tüm grupların üstünde artırdığı görülmektedir. L-NAME grubunda OKB'deki yükseliş ET_A reseptör antagonisti BQ-123'ün verilmesiyle bir miktar düşmesinin yanı sıra, NO donörü olan L-Arg de ilavesiyle daha da belirgin bir düşmeye neden olmaktadır. Reperfüzyon sonunda BQ+L-NAME+L-Arg grubu ile I/R grubu OKB düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu. Bundan da anlaşılabileceği gibi, renal reperfüzyonda L-NAME'in oluşturduğu hipertansiyonu ancak BQ-123 ve L-Arg'in birlikte uygulanması büyük ölçüde azalttı.

Selektif ET_A reseptör antagonisti BQ-123'ün sistemik vazodilatasyona ve plazma ET-1 konsantrasyonunda anlamlı olmayan değişmelere yol açtığı bildirilmektedir.⁹⁶ Grafik 1 ve 2'de görüleceği gibi BQ-123'ün I/R grubunda oluşan OKB'deki yükselişi antagonize ettiği ve hatta istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kontrol grubundan da daha fazla düşürmekte olduğu görülmektedir. Bunu da sadece ET_A reseptörünü bloklayarak ET-1'in etkisini ortadan kaldırmakla izah etmek oldukça zordur. Çünkü I/R'da salınımı artan başta AII olmak üzere başka vazokonstriktör ajanlar da vardır. Öyleyse, ET_A reseptör antagonisti, bu etkisini olası bazı vazodilatatör ajanların salınımı artırarak gerçekleştirdiği söylenebilir.

5.3. Renal İskemi-Reperfüzyonunda Antioksidan Enzimler

KAT, SOD ve GSH-Px birbirini tamamlayıcı özelliğine sahip olan antioksidan enzimlerdir. Antioksidan enzimler oksidatif stresin arttığı koşullarda kompensatuvar bir mekanizma olarak devreye girebilmektedir. Aktivitesi ve/veya miktarı azalan bir enzimin katalizlediği reaksiyon başka bir enzim tarafından katalizlenebilmekte veya zararlı olan substrat farklı bir yola yönlendirilebilmektedir.

Sonuçlara toplu olarak bakıldığında iskemik durumda böbrek dokusunda SOD aktivitesinin değişmediği KAT aktivitesinin anlamlı olmayan bir şekilde azaldığı, GSH-Px aktivitesinin ise anlamlı bir şekilde arttığı gözlenmektedir. Dikkat edildiğinde aynı substratı alarak iki farklı şekilde kataliz gerçekleştiren iki enzim olan KAT ve GSH-Px enzimleri iskemiden farklı şekillerde etkilenmiştir. Biri azalırken diğerinin artması kompensasyon mekanizmasını akla getirmektedir. Bu enzimlerin substratı olan H_2O_2 ise SOD aktivitesi değişmediğinden olasılıkla sabit bir hızda üretilmekte ve aynı hızda suya dönüştürülmektedir. Burada zıt bir bulgu olarak görülebilecek bir sonuç vardır: XO aktivitesinin artması ve diğer mekanizmalarla birlikte I/R'da fazla miktarda $O_2^{\cdot-}$ 'nin üretilmesidir. Bu radikaller SOD enziminde bir artışa yol açması gerekirken bu enzimin aktivitesinde herhangi bir değişiklik olmamıştır. O zaman $O_2^{\cdot-}$ 'nin başka bir yolla harcanmış olması gerekir. Burada akla gelen ilk konu yine iskemi ile miktarı artan NO molekülüyle birleşip ONOO⁻ oluşturulmuş olma ihtimalidir. Bu bileşik aşırı oksidan bir bileşik olup hücresel yapılara oldukça toksik etkileri mevcuttur. Reperfüzyon ile birlikte sıçanlara L-NAME verilmesi KAT enziminde bir miktar düşme yaparken diğer enzim aktivitelerinin en son aldıkları aktivite paternine herhangi bir etkide bulunmamıştır. Kronik L-NAME uygulamasının oksidan-antioksidan sistem üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada, 15 gün süreyle oral L-NAME verilmesi ile KAT aktivitesinde artış, GSH-Px aktivitesinde ise azalma tespit edilmiştir.⁹⁷ Çalışmamızda I/R uygulaması olduğundan ve L-NAME akut uygulandığından bu çalışmayla çelişen bir yönü bulunmamaktadır. Ancak BQ-123'ün verilmesi ile SOD aktivitesi ve KAT aktivitesi kontrol düzeylerinden daha yukarı çıkmıştır ve bu artışlar istatistiksel olarak anlamlıdır. GSH-Px aktivitesinde ise bir değişiklik görünmemektedir. Bu sonuçlardan, BQ-123'ün iskemik durumlarda antioksidan aktiviteyi arttırarak böbrekleri koruyucu etki yaptığını söyleyebiliriz. BQ-123'ün diğer kombinasyonları, adı geçen enzimlerin aktivitesini farklı şekillerde etkilemiştir. BQ-123'ün olası antioksidan etkinliğini hangi hücre içi

basamaklarda gerçekleştirdiği meselesi ileri çalışmaların araştırma konusudur. İhtimallerden birisi enzimin DNA'dan ekspresyonunun hızlanması, diğeri ise mRNA düzeyinde bir düzenlemeye yol açılmasıdır. Yapılan bir çalışmada transplantasyon için alınan böbreğin BQ-123 içerikli sıvıda saklanması oksidan hasarın engellenmesini sağlamış ve BQ-123'ün antioksidan özellik gösterdiğini düşündürmüştür.⁹⁸ Çalışmamız endojen antioksidan enzimler bağlamında bu öngörüyü desteklemektedir.

Hughes ve ark. yaptıkları çalışmada eksojen ve endojen ROT'un insan mezengial hücrelerinde ET-1 üretimini artırabildiğini bildirmişlerdir. XO, glukoz oksidaz ve H_2O_2 'nin doza bağlı ET-1 salınımında artışa, $O_2^{\cdot-}$ 'nin ise azalmaya yol açtığını ifade etmişlerdir. Renal I/R hasarının oluşmasında bozulan glomerüler hemodinami ile mezengial hücre ET-1 üretiminin ROT'lar ile uyarılması arasında ilişki olabileceğini öne sürmüşlerdir.⁹⁹ Bu da oksidan/antioksidan sistem ile ET-1 arasındaki ilişkiyi düşündürmesi açısından çalışmamız için önemlidir.

5.4. Renal İskemi-Reperfüzyonunda XO

I/R olgularında en önemli mekanizmalardan birisi XO enziminin rol aldığı reaksiyonlar zinciridir. Bu enzim normal koşullarda çekirdekli bütün hücrelerde bulunur, ancak bulunduğu form ksantin dehidrojenaz formudur. Bu izoenzim XO ile aynı reaksiyonu katalizlemekte ancak yan ürün olarak $O_2^{\cdot-}$ oluşturmamaktadır. I/R hasarında $O_2^{\cdot-}$ 'nin oluşum yerleri ve mekanizmaları arasında XO önemli bir yer tutmaktadır. İskemik dokularda, proteolitik enzimler de aktive olduğundan birçok protein yapısı proteolitik parçalanmaya maruz kalmaktadır. Özel olarak ksantin dehidrojenaz da bir ucundaki bir peptid parçasını kaybederek XO izoenzimi haline dönüşür. Bu dönüşüm sonucunda, %80'e karşı %20 olan ksantin dehidrojenaz ve XO oranları tamamen değişir ve ters döner. Artık pürin nükleotidlerinin yıkılması ile çok fazla miktarda süperoksit radikalleri ortama verilmeye başlanır. Çalışmamızın iskemi grubunda XO aktivitesinin yaklaşık olarak 2 kat artması bu gerçeklerle örtüşmektedir. L-NAME ile BQ-123'ün ayrı ayrı verilmesinde olduğu kadar birlikte verilmesinde de XO aktivitesi azalma göstermiş fakat hiçbir durumda kontrol grubunda tespit edilen aktivitelere inmemiştir. Bu açılarından bakıldığında bu ajanların ayrı ayrı veya kombine olarak kullanılmaları XO aktivitesine etki açısından benzerlik göstermekte, her durumda ksantin dehidrojenaz enziminin katalizi gerçekleştirmesini sağlamaktadırlar. Bu çalışmada ksantin dehidrojenaz aktivitesi ölçülmemiş olup bu enzim ile ilgili yorumlar, bu enzimin iskemik

ortamlardaki izoformu olan XO ile değerlendirilmiş, XO aktivitesi arttığında azalabileceği, azaldığında ise artabileceği öngörüsü ile yorum yapılmıştır. Son olarak bu ikili kombinasyona L-Arg ilave edildiğinde de dokunun XO aktivitesinde kayda değer herhangi bir değişiklik tespit edilememiştir. Bu grupta da XO aktivitesi kontrol grubu düzeyine inememiştir. Fakat iskemik koşullardaki XO aktivitesi ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmıştır.

5.5. Renal İskemi-Reperfüzyonunda MPO

Bu çalışmada en önemli bulgularda biri de MPO ile ilgili bulgulardır. Bu enzim sadece lökositlerde bulunduğu dokulara nötrofil invazyonunun çok önemli bir göstergesi kabul edilmektedir.¹⁰⁰ Böbrek dokusunun normal yapısında nötrofil bulunmamaktadır, ancak enflamasyon, iskemi gibi durumlarda veya kemotaksisi arttıracak aracı moleküllerin farklı mekanizmalarla harekete geçmesi durumlarında dokuya nötrofil invazyonu olur.

Deney sistemimizde I/R gerçekleştirildiğinden, bu patolojik süreçlere bağlı olarak invazyon gerçekleşmesi beklenebilir. Bu da I/R sonrasında beklenebilecek radikal hasarına katkıda bulunan ayrı bir antitedir. Sıçanlarda 30 dk bilateral iskemiye takiben 4., 24., 48., 72., saatlerde Kelly ve ark.'nın MPO aktivitesine baktıkları çalışmada 4. saatte MPO aktivitesinde yaklaşık 4 kat artış tespit etmişler ve bu artış 24. saatte pik düzeye ulaşmış.¹⁰¹ Çalışmamızda tespit edilen 2 saatlik reperfüzyon ile MPO aktivitesi kontrol grubuna göre yaklaşık olarak 2.5 kat artmıştır. Bu artışın anlamı, beklendiği gibi iskemiye bağlı olarak gerek damar yapılarının bütünlüğünün bozulması gerekse ortaya çıkan IL, HAM gibi aracı moleküller vasıtasıyla nötrofillerin dokuya invazyonudur. L-NAME verilen ratlarda MPO'daki artma iskemi grubundaki gibi kalmıştır. L-NAME, nitrik oksit sentaz inhibitörü olduğundan damar yapılarının gevşemesini baskılamaktadır. Böylece dokuya kan akımının akışının azalmasını beklemek mantıklı bir yaklaşım olur. BQ-123, MPO enzim aktivitesinin azalmasını sağlamıştır. Bunun anlamı şudur, şu anda bilemediğimiz, ancak yorum yapabileceğimiz bazı mekanizmalarla veya başka bir mekanizma ile BQ-123, ileri radikal hasarının önlenmesine temel teşkil edecek şekilde dokuya beyaz küre invazyonunu engellemiştir. İleri radikal hasarı ifadesini kullanmamızın nedeni, fagositoz için dokuya invaze olmuş nötrofillerden doku aralığına salgılanacak olan aşırı oksidan bileşiklerin (hipokloröz asit gibi) ve ilave 'OH, O₂' gibi ROT'nin normalde iskeminin etkisi ile olan hasarı daha da ilerletme

özelliğinin bulunmasıdır. Bu çalışmanın sonuçlarından açıkça görüleceği üzere BQ-123'ün L-NAME ile birlikte verilmesi, BQ-123'ün yalnız verilmesi durumundaki etkinliğini oldukça azaltmıştır. MPO düzeyi yüksekliğini muhafaza etmiştir. Dolayısıyla hasarda koruyuculuk kısmen de olsa ortadan kalkmıştır. Bu ikiliye L-Arg eklenmesi de tablonun değişmesine herhangi bir katkıda bulunmamıştır.

5.6. Renal İskemi-Reperfüzyonunda TBARS ve PC

Vücutta endojen olarak üretilen TBARS, lipid peroksidasyonunun önemli bir göstergesidir. Hem hücre hem de organel zarlarının yapısında bulunup bu yapıların büyük bir kısmını oluşturan fosfolipidler temel olarak gliserol veya sfingozin ile çoklu doymamış yağ asitlerinin birleşmesinden oluşur. Bu çoklu doymamış yağ asitleri yapılarında taşıdıkları çift bağlar nedeni ile serbest radikal hasarına oldukça yatkındırlar. Herhangi bir sebeple hücre içinde ROT çok üretildiğinde veya tüketimi azaldığında bunların etkisi ile doymamış yağ asitlerinin çift bağ noktalarında oksidasyon gerçekleşir. Bu patolojik sürecin sonucunda molekül içi yeniden düzenlenmeler ile aynı zamanda lipid peroksidasyonu oluşur. Sonuçta hem membran yapıları bozulur hem de ortama lipid peroksidasyon son ürünleri salınır. TBARS bu açılarından bakıldığında lipid peroksidasyon sürecinin ara basamaklarında ve en son ürün olarak üretilen maddelerin toplamı anlamını taşımaktadır. Bu şekilde dokuda veya vücut sıvılarında TBARS düzeyinin bakılması oksidatif stres hakkında indirekt olarak fikir verme özelliğine sahiptir.⁸⁷

Çalışmamızda iskemik grupta doku TBARS düzeyi yaklaşık olarak 2 kat artmıştır. Bu bulgu aynı zamanda böbrek iskemisinin tam olarak oluştuğu anlamına da gelebilir. Reperfüzyon ile birlikte L-NAME verilmesiyle TBARS düzeyinde herhangi bir değişiklik olmamış, halbuki BQ-123 verilen, BQ+L-NAME verilen ve BQ+L-NAME+L-Arg verilen grupta belirgin bir azalma olmuştur. Knoll ve ark.¹¹ yaptığı çalışmada, ET_A reseptör antagonisti LU-135252'nin akut iskemik renal yetmezlikte doza bağlı iyileşme gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca Büyükgebiz ve ark. sıçanlarda deneysel böbrek transplantasyonu çalışmasına dayanarak endotelin reseptör antagonistlerinin ikincil bir yol olarak antioksidatif ve antiproliferatif etkilerinin göz ardı edilemeyeceği ifade edilmektedir.¹¹ Büyükgebiz ve ark.⁹⁸ tarafından endotelin reseptör antagonisti BQ-123 ile yapılan çalışmada lipid ve protein oksidasyon ürünlerinin oluşumunu engellediği bildirilmiştir. Bu ise sonuçlarımız ile paralellik göstermektedir.

Sonuçlarımızdan anlaşılmaktadır ki deney hayvanlarına koruma amacı ile verilen L-NAME dışındaki ajanların hepsi böbrek dokusunu lipid peroksidasyonundan korumaktadır. Bir diğer dikkat çeken konu da L-NAME'in yalnız kullanılması durumunda herhangi bir koruyucu etkisi olmamasına karşılık kombine kullanımlarda diğer maddelerin koruyuculuğuna etki etmemesidir. BQ-123'ün dokuyu en azından lipid peroksidasyonundan koruma etkisinin bulunduğu açıktır. Benzer bulgular protein karbonil çalışmasında da elde edilmiştir.

Oksidatif strese bağlı olarak proteinlerin yapısal bazı değişikliklere uğrarlar. Lipid peroksidasyonuna benzer şekilde, serbest radikallerin etkisi sonucu proteinlerden oluşan serbest karbonil grupları tespit edilebilir. Protein karbonil (PC) miktarı, I/R grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artarken L-NAME grubunda iskemi grubu ile karşılaştırıldığında herhangi bir değişim görülememektedir. Dolayısıyla ROT'un proteinlere hasar yapıcı etkisini engelleyememektedir. Halbuki BQ-123 verildiğinde tekrar PC miktarı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaktadır. Fakat bu azalma kontrol grubundaki değerlere ulaşacak şekilde devam etmemektedir. Bulgularımız Büyükgebiz ve ark.'nin⁹⁸ BQ-123'ün protein oksidasyonundan koruyuculuğu bulgusunu desteklemektedir. BQ maddesinin L-NAME ile kombine halde kullanılması PC miktarında iskemi grubu ile karşılaştırıldığında herhangi bir değişiklik oluşturmazken L-arg'in üçüncü bir bileşen olarak eklenmesi durumunda koruyuculuk tekrar artmaktadır.

5.8. Plazma Biyokimyasal Parametreleri

KBY olan hastalarda plazma kreatinin seviyeleri ile plazma ET-1 seviyeleri arasında pozitif bir korelasyon olduğu kanıtlanmıştır.⁴⁸ Diğer bir çalışmada doza bağımlı olarak reperfüzyonun 1., 2. ve 4. günlerinde serum Cr düzeylerinde düşme olduğunu bildirilmiştir.¹¹ Çalışmamızda BQ-123 ve BQ-123+L-NAME gruplarında I/R'da artan plazma Cr seviyesinde anlamlı olmasa da bir düşme olduğu, BQ+L-NAME+L-Arg uygulamasının ise plazma Cr seviyelerinde I/R ve L-NAME gruplarına göre anlamlı bir düşüş sağladığı görülmektedir.

Plazma BUN seviyesinde BQ-123 uygulanmasının I/R, L-NAME ve BQ+L-NAME gruplarına göre anlamlı bir düşme sağladığı görülmektedir.

Knoll ve ark. ET_A reseptör antagonisti LU-135252'nin iskemik renal yetmezlikte doza bağlı olarak böbrek fonksiyonlarında düzelme yaptığını bildirmişlerdir.¹¹ Çalışmamızda plazma BUN ve plazma Cr sonuçları 30 dk iskemi sonrası 2 saat reperfüzyon ile BQ-123'ün renal fonksiyonlarda düzelme

oluşturduğunu göstermektedir. Ancak daha uzun bir reperfüzyon süresi bu olumlu etkiyi daha belirgin bir şekilde ortaya koyabilirdi.

Bu çalışmanın şüphesiz başlangıçta ileri sürülen teoriye zıt gibi görünen bulgusu BUN değerlerinin düşük çıkması beklenirken BQ+L-NAME+L-Arg grubunda yüksek çıkmasıdır. Vücutta proteinlerin degradasyonu, deaminasyon reaksiyonlarıyla ve son olarak transaminasyon reaksiyonlarıyla elde edilen amin grupları karaciğerde ve kısmen de böbrekte üre haline dönüştürülerek yine böbrek yolu ile atılır. Üretimde veya atılmasında herhangi bir problem olduğunda kanda BUN artışı görülür. Bu bulgularımızın ışığında birbirine zıt olmayan ama konunun patofizyolojisini açıklayabilecek iki farklı mekanizma akla gelmektedir: i) iskemiyi engellemek amacıyla verilen kimyasal ajanlar olasılıkla bazı enzimatik sistemleri transkripsiyon aşamasından başlamak üzere, translasyon, posttranslasyonel ve kovalent modifikasyon aşamalarında etkileyerek ürenin kanda artışını sağlamak üzere üre yükünü arttırdığından BUN miktarı 2 saatlik reperfüzyon sonunda yüksek olarak bulunmuştur. Bu konuda akla gelen ilk biyokimyasal siklus üre siklusu ve bunun enzimleridir. Özellikle bu döngünün kontrolünün yapıldığı enzimatik aşamada herhangi bir aktivasyon üre sentezinin artması ile sonuçlanabilir. Ayrıca hücre seviyesinde proteolitik enzimlerin aktivitesi şu anda bizim bilemediğimiz bir yol ile aktive edilmiş olabilir. Bu da daha önce bahsedilen konuya uygun olarak geçici bir süre ürenin kanda yüksek kalmasına sebep olabilir. ii) Vücutta endojen olarak BUN üretiminin normal olduğu öngörüldüğünde, akla gelebilecek ikinci ve çalışmamızla da direkt ilgisi olan başka bir olasılık da böbreklerin süzme kapasitesinde meydana gelebilecek değişikliklere bağlı olarak BUN düzeyinin artmasıdır. Her ne kadar verilen ajanların değişik mekanizmalarla reperfüzyon hasarını azaltmaları ve gelişebilecek ikincil patolojileri engellemeleri bizim savunduğumuz hipotez olsa da iskemî ile başlayıp reperfüzyon ile hızlanan hasar mekanizması biyokimyasal olarak engellense bile sürenin kısa olması nedeniyle fizyolojik olarak engellenemeyebilir. Çünkü böbreklerin bir hasardan sonra kendini toparlayıp sağlıklı zamanındaki gibi süzme fonksiyonlarına kavuşması zaman gerektiren bir olaydır. İskemi ve reperfüzyonun gerçekleştirildiği zaman aralığı bunun için yeterli olmayabilir. Bu deney hayvanları biraz daha yaşatılıp kan örneklerinin alınması mümkün olsa idi belki de BUN değerleri şimdi ölçülenden daha düşük düzeylerde olacaktı.

NO kortikal toplayıcı tübülde Na reabsorbsiyonunu, tubuloglomer ler feedback mekanizmasını inhibe eder ve fraksiyonel Na atılımını artırır.⁹¹ Dolayısıyla L-NAME uygulamasının plazma Na konsantrasyonunda artmaya yol açması beklenen bir sonuçtur.

Sistemik ET-1 infüzyonunun filtrasyon yükünde azalmadan dolayı natri rezde (Na atılımında) azalmaya neden olduğu bildirilmiştir.¹⁰² ET_A reseptör antagonisti BQ-123' n natri reze neden olarak plazma Na konsantrasyonunda azalmaya yol açması yine beklediğimiz bir sonuçtur.

5.8. Renal  skemi-Reperfüzyonunda NO düzeyleri

NO böbrekte bir çok fonksiyonu etkiler. Bunlar; böbrek kan akımının otoregülasyonu, renin sekresyonu, glomerüler, mezengial ve epitelyal hücre aktivitesi, tübüloglomerüler feedback mekanizması ve tübüler fonksiyonlardır.⁹¹ NO'ın bazal düzeyde üretimi normal glomerüler fonksiyon için gereklidir. NO sentezinin inhibisyonu efferent arteriol rezistansında artmaya, dolayısıyla glomerüler kapiller basınçta artmaya yol açar.⁹¹

Böbrekte NO'ın aktive olmasıyla kortikal toplayıcı tübüllerde Na⁺ reabsorbsiyonu inhibe olur ve NO'ın AII'nin afferent arterioldeki vazokonstriksiyon etkisini inhibe etmekle TGF mekanizmasını da böylece inhibe edebilir.⁹¹

Siçanlarda unilateral 30 dk iskemiye takiben 30 dk reperfüzyon uygulanan bir çalışmada I/R sonrasında NO metabolitlerinin plazma seviyelerinde azalmaya karşın, renal NO metabolitlerinin klirensi ve atılımında artma olduğu gösterilmiştir. Atılımdaki bu artışın RKA veya GFH'dan bağımsız olduğu fakat NO metabolitlerinin tübüler reabsorbsiyonunda bozulmadan ve intrarenal NO  retiminde artıştan kaynaklandığı ifade edilmiştir.⁹¹

Renal iskemi, NOS aktivasyonuyla NO sentezini artırır. Bir çalışmada artan NO  retiminin I/R'nin indüklediği renal hasarda korucuyu rol oynadığı ifade edilmektedir.¹⁰³ NO prekürsörü L-Arg veya NO donörü Na-nitroprussit'in I/R hasarından sonra renal fonksiyonları düzelttiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.⁹¹

Doku NO düzeylerinin verilen ajanlara göre birbirinden farklılıklar göstermesi de bu çalışmadan elde edilen ve dikkatle değerlendirilmesi gereken ayrı bir bulgudur. Böbrekte bulunan NOS izoenzimi normal fizyolojik koşullarda bir taraftan su-elektrolit metabolizmasında önemli olan sıvı ve elektrolitlerin damar içi ve dışına çıkışına damarın duvar kaslarını gev eterek katkıda

bulunurken diğer taraftan da süzme fonksiyonu dışında böbreğin kendisine ait doku dengesinin korunması işlevine katkıda bulunmaktadır. İskemi ve ardından gelişen reperfüzyon her dokuda olduğu gibi böbrekte de büyük bir travmadır. Bulgularımıza göre ilk başta iskemiye cevap olarak olasılıkla NOS'un aktivasyonu ile NO miktarı kontrol grubu ile karşılaştırıldığına istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır. Burada NO miktarının kısa sürede artışını izah edebilecek NOS aktivasyonundan başka mantıklı bir izah olmadığından NOS aktivasyonundan bahsetmek mümkündür. Bu çalışmada total NOS veya NOS izoenzimlerinin herhangi bir teknikle miktar veya aktivitelerine dair bir araştırma yapılmadı. Ölçülen analitler nitrit ve nitrat olup metod bölümünde total nitrit ölçümü olarak nitelendirildi ve bunların NO'nun ileri oksidasyon ürünleri olduğunu belirtildi. Dolayısıyla NO artışı direkt olarak NOS aktivasyonunun bir sonucu olabilir. Bu artışın mantıksal olarak gerekliliği ise ortadadır: bir süre oksijensiz kalmış bir dokuya oksijen sağlayabilmek için refleks olarak damarların gevşemesi gerekir, bunu yapabilecek en etkin moleküllerden biri de hiç şüphesiz ki lokal NO üretimidir. L-NAME kullanılması ile beklendiği gibi NO sentezi enzim aktivitesinin baskılanması nedeniyle azalmıştır. BQ-123 verilmesi ise yine aynı şekilde NO düzeyini iskemi seviyesinde tutmuş ve kontrol grubu düzeylerine düşmesini engelleyerek dokunun korunmasını sağlamıştır. BQ-123'ün L-NAME ile birlikte kullanılması BQ-123'ün NO düzeyini yüksek tutma özelliğini kaybettirmiştir. Dolayısıyla BQ-123'ün L-NAME ile kombine olarak kullanılması böbrek dokusunun lehine değil de aleyhine gibi görünmektedir. NO donörü olan L-Arg ilavesiyle NO miktarı tekrar iskemide görülen düzeye yükselmiş, dolayısıyla L-Arg, BQ-123'ün biyo-yararlılığını arttırmıştır.

Gaurine ve ark.³ yaptıkları çalışmada I/R hasarında ET_A reseptör antagonisti LU-135252'nin kalbi hasardan korumasında, NO ile ilişkili bir mekanizmanın rol aldığını öne sürmüşlerdir. Çalışmamızda bir NOS blokörü olan L-NAME'in eklenmesi ile NO üretiminin azalması, NO donörü L-Arg eklenmesiyle bu etkinin geri döndürülmesi ET_A reseptör antagonistinin etkisini NO üretimine bağlı bir mekanizma ile gerçekleştirdiğini düşündürmektedir. Ayrıca Gonon ve ark. da ET_A reseptör blokajı ile yapılan kalp I/R hasarının önlenmesinde NO'nun yer aldığını belirtmişlerdir.¹⁰⁷

5.9. Renal İskemi-Reperfüzyonunda ET-1'in Rolü

ET-1 renal disfonksiyonun patogenezinde yer aldığı halde, mekanizması hakkında bildiklerimiz oldukça yetersizdir. İnsanda ET-1 infüzyonu potent biyolojik etkilerini ET_A reseptörleri yoluyla gerçekleştirerek RKA'da, GFH'da, idrar volümünde ve natriürezisde azalma yaparak göstermektedir. ET-1'in güçlü bir büyümeyi ilerletici özelliği ve mezengial hücrelerde ekstrasellüler matriks proteinlerinin ekspresyonu artırıcı rolü vardır ET-1'in renal vasküler yatakta AII'den 5 kat daha ve NA'dan 10 kat daha güçlü vazokonstriksiyon yaptığı bildirilmiştir.¹⁰⁸

I/R'de direkt veya indirekt mekanizmalar yoluyla ET-1 üretiminin artması endotel hücrelerinde zararlı etkiler meydana getirebilir. Örneğin ET-1'in nötrofilleri stimüle ettiği bilinmektedir.¹⁰⁷ Bu da bir kısır döngü içinde endotel hasarına neden olur. ET-1'in doku ve plazma seviyeleri ABY'de artmakta ve akut renal hipoksi, renal ET reseptörlerinin upregülasyonuna yol açtığı belirtilmektedir.¹¹

5.10. Renal İskemi-Reperfüzyonunda ET_A Reseptör Antagonistlerinin Koruyucu Rolü

İnsanda ABY'de endotelin reseptör antagonistlerinin teröpatik yararları hakkında az şey bilinmesine karşın, süreç ET-1'in kompleks doğasından dolayı yavaş bir şekilde ilerlemektedir.

Endotelin nötralize edici antikorların, ET_A (BQ-123 gibi) ve ET_{A/B} (Bosentan gibi) reseptör antagonistlerinin sıçan ve köpeklerde, iskeminin indüklediği ABY'nin etkilerinde iyileşmelere yol açtığı bulunmuştur.⁴⁸ Bunun yanında Knoll ve ark. ET_A reseptör antagonistinin doza bağımlı olarak İskemik ABY'yi düzelttiğini yaptıkları çalışma ile göstermişlerdir.¹¹

Gellai ve ark.'nın 24 saat iskemi uyguladıkları sıçanlara BQ-123 vererek 14 gün süreyle yaşam sürelerini, GFH'larını, plazma K⁺ değerlerini kontrol grubuyla karşılaştırmışlar. Üçüncü günün sonunda kontrol grubundaki sıçanların tamamının öldüğünü, BQ-123 grubundaki sıçanların ise 14 günün sonunda % 75'inin hayatta kaldığını tespit etmişler. BQ-123 grubundaki sıçanların GFH'larının ve plazma K⁺ bazal seviyelere döndüğünü bildirmişlerdir. Bu çalışma da renal I/R'da ET_A reseptör antagonisti BQ-123'ün koruyucu rolünü açık bir şekilde ortaya koymaktadır.¹⁰⁹

Endotelinlerin iskemi sonrası renal hasarlanmanın patogenezinde rol aldığı birçok çalışmada gösterilmiştir.¹⁰⁸ ET_A ve ET_{A/B} reseptör antagonistlerinin

deneysel KBY ve ABY modellerinde koruyucu olduğu çalışmalarla gösterilmiştir.¹⁰⁸

Bir ABY deney modelinde ET-1 mRNA ekspresyonunun arttığı, ayrıca ET_A ve ET_B gen ekspresyonunun artmış olduğu gösterilmiş, bu artışın ise endotel disfonksiyonunun indüklenmesi ile meydana geldiği ve sistemik damarlarda olduğu kadar renal damarlarda da vazokonstriksiyonu arttırdığı bildirilmiştir. ET-1'in indüklediği sistemik vasküler disfonksiyon, endotelial disfonksiyonu ve ABY'ye gidişi düzeltmede terapötik yaklaşımın temelini oluşturabileceği ifade edilmektedir.¹⁰⁸

5.11. Renal İskemi-Reperfüzyonda NO-ET-1 İlişkisi

Gonan ve ark.¹⁰⁷ tarafından yapılan kardiyak I/R'da endotelin ile NO arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmanın sonunda; I/R esnasında ET-1 ve NO arasındaki ilişkinin arkasındaki tam mekanizmanın ortaya konması için yeni çalışmalara ihtiyaç olduğu ifade edilmiştir. Çalışmamızda, renal I/R hasarında endotelin ile NO arasındaki ilişki farklı parametreler ışığında irdelenmiştir.

Mezengial ET-1 sentezinin NO ve ANP ile inhibe edildiği gösterilmiştir.¹⁰⁸ Bunun yanı sıra ET-1 salınımını NO'nun inhibe ettiği çalışmalarla gösterilmiştir.^{12,13,14} Bundan başka ET_{A/B} reseptör antagonisti Bosentan'ın sıçanlarda NOS inhibisyonunun baskılayıcı etkilerini azalttığı gösterilmiştir. Bu bulgular NO'nun, ET-1'in oluşumunu baskılayarak vazodilatör etkilerini potansiyalize ettiğini göstermektedir. Diğer yandan ET-1, NO oluşumunu endotelial ET_B reseptörlerinin aktivasyonu ile stimüle etmektedir.⁸ Eğer NO ve ET-1 arasında vasküler düz kas kasılması düzeyinde bir ilişki varsa, NO üretiminin herhangi bir şekilde engellenmesi eksojen ET-1'e artmış sensitivite ile sonuçlanır. Nitekim NOS blokajı yapılan bir çalışmada, arteriyel ET-1 seviyesinde artma olduğu ve RKA'nın azaldığı gösterilmiştir.⁸ Yine yapılan çalışmalarda akut sistemik NO blokajının, endotelinin vazokonstriktör etkilerini, aynı zamanda endotelin sentez ve salınımını artırdığı gösterilmiştir.¹⁰⁵

Yakın zamanlarda yapılan bir çalışmada, bir NO donörü olan FK409'un I/R hasarında sıçanlarda renal disfonksiyonu düzelttiği gösterilmiştir. NF-κB'nin ise iskemik hasar gelişiminde çeşitli genlerin ekspresyonunun düzenlenmesi yoluyla anahtar bir rol oynadığı, FK409'un kültür damar endotel hücrelerinde ET-1'i azalttığı belirtilmiştir. FK409'in endotel hücrelerde bazal ve TNF-α'nın indüklediği preproET-1 mRNA ekspresyonunu anlamlı olarak azalttığı, bazal ve TNF-α'nın stimüle ettiği NF-κB aktivasyonunu azaltmakta olduğu bildirilmiştir.

Bundan başka NF- κ B aktivasyonunu inhibe eden ajanların bazal ve TNF- α 'nın indüklediği ET-1 mRNA ekspresyonunu etkili bir şekilde azalttığı bulunmuş. Tüm bunlardan; NO'nun, ET-1 üretiminde yaptığı inhibisyonu NF- κ B aktivasyonunu baskılayarak yaptığı anlaşılmaktadır.¹⁰⁶

Ganon ve ark.'nın yaptığı kardiyak I/R'da, sadece ET_A reseptör antagonisti LU-135252 verilmesiyle LU-135252+L-Arg verilmesi arasında ilave bir infarkt alanında azalma olmaması ve önceki bir çalışmada L-Arg tek başına verildiği zaman infarkt alanını yaklaşık % 50 oranında azaltması ET_A reseptör antagonisinin ve NO'nin ortak bir yol ile kardiyak I/R'dan korudukları şeklinde yorumlanmıştır.¹⁰⁷

Sağlıklı insanlarda yapılan bir çalışmada N^G-monomethyl-L-Arginine (L-NMMA) ile NO sentezinin inhibe edilmesiyle ortaya çıkan periferik ve renal hemodinamik bir kısım etkilerin ET_A reseptör blokörü BQ-123 ile geri çevrildiği gösterilmiştir. Bundan dolayı ET_A reseptör antagonistleriyle NO sentez inhibitörleri arasında fonksiyonel bir antagonizmayı düşündürdüğü ifade edilmiştir.¹⁰⁵

Sonuç olarak; reperfüzyonun ilerleyen dakikalarında OKB değerlerinin artma eğiliminde olması, vasküler tonusta normalde denge halinde işlev gören mediatörlerden vazokonstriktörler lehine bir değişme olduğunu düşündürmektedir. BQ-123'ün ise bu yükselişi engellemesi, reperfüzyonda OKB artışında ET-1'in önemli katkısını düşündürmektedir. BQ-123'ün OKB'yi kontrol seviyelerinin altına düşürmesi, diğer vazokonstriktörlerin de etkileri dikkate alındığında ayrıca vazodilatatörlerin salınımına olanak sağladığını düşündürmektedir. Ayrıca L-NAME'in oluşturduğu yüksek kan basıncının BQ-123 ve L-Arg ilavesiyle düşmesi ve reperfüzyonun 120. dakikasında I/R grubu ile arasında anlamlı bir fark kalmaması L-NAME'in hemodinamik etkisinin BQ+L-Arg ilavesiyle antagonize olabileceğini göstermektedir.

BQ-123'ün kontrol, I/R ve L-NAME gruplarına göre KAT ve SOD aktivitesinde anlamlı artış sağlaması, GSH-Px aktivitesinde ise bu gruplara göre anlamlı artış olmaması, ET_A reseptör antagonisinin SOD ve KAT enzim aktivitelerinde artış yoluyla antioksidan etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda BQ-123 uygulamasıyla TBARS ve PC düzeylerinde azalma BQ-123'ün lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonunu engellediğini ortaya koymaktadır.

Gourine ve ark.³ ET_A blokajı ile NO arasındaki ilişkinin mekanizmasını ortaya çıkarmak için ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu ifade etmektedirler.

Çalışmamızda bu konuda ortaya konan yeni parametrelerle ET_A reseptör antagonisti BQ-123'ün renal I/R hasarında koruyucu rolü ve bunun NO ile ilişkisi yeni bir boyut kazanmaktadır. Sonraki çalışmalarda daha uzun süreli I/R ile ET_A reseptör antagonistlerinin antioksidan sisteme, lipid peroksidasyonuna ve protein oksidasyonuna etkileri daha net ortaya konabilir.

Böbrek İskemi-Reperfüzyonunda Endotelin-A Reseptör Antagonisti BQ-123'ün Nitrik Oksit Üretimiyle İlişkili Koruyucu Etkisi

Bu çalışma bir ET_A reseptör antagonisti olan BQ-123'ün renal iskemide reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkisinin nitrik oksit üretimiyle ilişkili olup olmadığı; L-Arginin ya da bir NO sentaz inhibitörü olan L-NAME ile birlikte hemodinami, plazma BUN, kreatinin ve Na konsantrasyonları ile renal oksidan/antioksidan sistem üzerinden araştırılmak üzere yapıldı.

Erkek Sprague Dawley sıçanlar 8'erli olarak 6 gruba ayrıldı; Kontrol, I/R, L-NAME, BQ, BQ+L-NAME, BQ+L-NAME+L-Arg. Kontrol haricindeki gruplara 30 dk iskemide ve 2 saat reperfüzyon uygulandı.

KAT aktivitesi BQ grubunda Kontrol, I/R, L-NAME ve BQ+L-NAME gruplarına göre artmış ($p<0.05$), L-NAME grubunda I/R grubu hariç diğer gruplara göre azalmış ($p<0.05$) olarak bulundu. SOD aktivitesinin BQ grubunda, BQ+L-NAME+L-Arg grubu hariç diğer gruplara göre arttığı tespit edildi. GSH-Px aktivitesinin Kontrol grubunda BQ+L-NAME grubu hariç diğer gruplara göre azaldığı ($p<0.05$) ve BQ+L-NAME grubunda BQ+L-NAME+L-Arg grubuna göre azaldığı ($p<0.05$) görüldü. XO aktivitesinin I/R grubunda tüm gruplara göre ($p<0.05$), ayrıca L-NAME ve BQ gruplarında da kontrole göre arttığı ($p<0.05$) tespit edildi. Doku TBARS seviyelerinin I/R ve L-NAME gruplarında diğer gruplara göre arttığı görüldü ($p<0.05$). Kontrol ve BQ gruplarının MPO aktivitelerinin diğer gruplara göre düşük olduğu tespit edildi ($p<0.05$). Kontrol grubu PC miktarının diğer gruplarla karşılaştırıldığında azaldığı ($p<0.001$), ayrıca I/R ve L-NAME gruplarının PC miktarları BQ ve BQ+L-NAME+L-Arg gruplarına göre arttığı görüldü ($p<0.05$). Doku NO seviyeleri I/R, BQ ve BQ+L-NAME+L-Arg gruplarında Kontrol, L-NAME ve BQ+L-NAME gruplarına göre yüksekti ($p<0.05$). Plazma BUN değeri BQ+L-NAME+L-Arg grubunda L-NAME grubu hariç yüksek ($p<0.05$) ve ayrıca I/R ve L-NAME gruplarında da BQ grubuna göre yüksek bulundu ($p<0.05$). Plazma Cr değerinin ise BQ+L-NAME+L-Arg grubunda I/R ve L-NAME gruplarına göre azaldığı bulundu ($p<0.05$). Plazma Na konsantrasyonunun BQ grubunda diğer tüm gruplara göre azaldığı ($p<0.05$) ve ayrıca L-NAME grubunda BQ+L-NAME+L-Arg grubuna göre arttığı ($p<0.05$) tespit edildi. L-NAME, BQ+L-NAME ve BQ+L-NAME+L-Arg gruplarında reperfüzyon dönemi, preiskemi ve iskemide

dönemine göre ortalama kan basınçları (OKB) yüksek iken ($p<0.05$), Kontrol ve BQ gruplarında reperfüzyonun 60 ve 120. dakikalarının kan basıncı değerleri iskemi dönemine göre düşüktü ($p<0.05$). L-NAME, BQ+L-NAME ve BQ+L-NAME+L-Arg gruplarının kan basıncı değerleri diğer gruplara göre reperfüzyon döneminde yüksekti ($p<0.05$).

ET_A reseptör antagonisti BQ-123 renal I/R hasarına karşı koruyucu etkisini olasılıkla antioksidan etkileri aracılığıyla ikincil bir yol ile ortaya çıkarabileceği düşünüldü. Ayrıca mevcut bulguların NOS blokörü ile önlenmesi ve NO öncülü L-Arg ile geri dönmesi NO bağımlı bir mekanizmanın aracılığını düşündürmektedir.

7- SUMMARY

Protection From Renal Ischemia Reperfusion Injury By An Endothelin A-Receptor Antagonist BQ-123 In Relation To Nitric Oxide Production

The aim of this study was to investigate whether the protective effect of ET_A receptor antagonist BQ-123 (BQ) against renal I/R injury is related to nitric oxide (NO) production by combining it with L-Arginine (L-Arg) or the NO synthase inhibitor L-NAME through hemodynamic, plasma BUN, creatinine (Cr) and Na concentration and renal oxidant/antioxidant system.

Male Sprague Dawley rats were divided into 6 groups each has 8 rats; control, I/R, L-NAME and BQ+L-NAME groups Control, I/R, L-NAME, BQ, BQ+L-NAME, BQ+L-NAME+L-Arg. 30 min renal ischemia and 2 hours reperfusion were performed in all groups except Control group.

The activity of CAT was found increased in BQ group in comparison with Control, I/R, L-NAME and BQ+L-NAME groups ($p<0.05$) and decreased in L-NAME groups in comparison with the other groups ($p<0.05$), except I/R group. The SOD activity of BQ group was higher than all other groups ($p<0.05$), except BQ+L-NAME+L-Arg group. The GSH-Px activity was lower in control group than the other groups ($p<0.05$), except BQ+L-NAME group and lower in BQ+L-NAME group than BQ+L-NAME+L-Arg group ($p<0.01$). The activity of XO was higher in I/R group than all the other groups ($p<0.05$), higher in L-NAME and BQ than Control group ($p<0.05$). The level of tissue TBARS were increased in I/R and L-NAME groups in comparison with the other groups ($p<0.05$). The MPO activities of Control and BQ groups were significantly lower than the other groups ($p<0.05$). The PC content of control group was lower than all the other groups ($p<0.001$), as well the PC contents of I/R and L-NAME groups were higher than BQ and BQ+L-NAME+L-Arg groups ($p<0.05$). The tissue NO levels of I/R, BQ ve BQ+L-NAME+L-Arg groups were significantly higher than Control, L-NAME and BQ+L-NAME groups ($p<0.05$). The plasma BUN was increased in BQ+L-NAME+L-Arg group in comparison with the other groups ($p<0.05$), except L-NAME, and as well significantly increased in I/R and L-NAME groups in comparison with BQ groups ($p<0.05$). The plasma Cr was lower in BQ+L-NAME+L-Arg groups than I/R and L-NAME groups ($p<0.05$). The plasma Na concentration was lower in BQ group than the all other groups ($p<0.05$) and in addition higher in L-NAME group than BQ+L-NAME+L-Arg group ($p<0.05$). Blood pressures during reperfusion period in L-NAME, BQ+L-NAME ve BQ+L-NAME+L-Arg groups were higher than during preischemia and ischemia periods ($p<0.05$), however blood pressures at 60th

and 120th min of reperfusion in Control and BQ groups were lower than during ischemia period ($p<0.05$). Blood pressures of L-NAME, BQ+L-NAME and BQ+L-NAME+L-Arg groups were significantly higher than the other groups during reperfusion period ($p<0.05$).

It can be concluded that ET_A receptor antagonist BQ-123 may be revealed a protective agent against renal I/R injury with a possible secondary pathway via its antioxidant effects. In addition, the present findings are abolished by a NOS blocker and a restoration by addition of the NO precursor L-Arg, suggested that are mediated via a NO-dependent mechanism.

8- KAYNAKLAR

- 1- Molitoris BA, Marrs J. The role of adhesion molecules in ischemic acute renal failure. *Am J Med* 1999;106:583-592.
- 2- Yamashita J, Itoh M, Kuro T, Kobayashi, Ogata M, Takaoka M, Matsumura Y. Pre- or post-ischemic treatment with a novel Na⁺/Ca²⁺ exchange inhibitor, KB-R7943, shows renal protective effects in rats with ischemic acute renal failure. *J Pharmacol* 2001;296:412-419.
- 3- Gourine AV, Gonon AT, Pernow J. Involvement of nitric oxide in cardioprotective effect of endothelin receptor antagonist during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H1105-1112.
- 4- Ahlborg G, Lundberg JM. Nitric oxide-endothelin-1 interaction in humans. *J Appl Physiol*. 1997;82:1593-600.
- 5- Valdivielso JM, Crespo C, Alonso JR, Martinez-Salgado C, Eleno N, Arevalo M, Perez-Barriocanal F, Lopez-Novoa JM. Renal ischemia in the rat stimulates glomerular nitric oxide synthesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;280:R771-779.
- 6- Saito M, Miyagawa I. Real-time monitoring of nitric oxide in ischemia-reperfusion rat kidney. *Urol Res* 2000;28:141-146.
- 7- Schramm L, Heidbreder E, Lopau K, Schaar J, De Cicco D, Gotz R, Heidland A. Toxic acute renal failure in the rat: effects of L-arginine and N-methyl-L-arginine on renal function. *Nephrol Dial Transplant* 1994;9 Suppl 4:88-93. [Abstract]
- 8- Muijsers RB, Folkerts G, Henricks PA, Sadeghi-Hashjin G, Nijkamp FP. Peroxynitrite: a two-faced metabolite of nitric oxide. *Life Sci* 1997;60:1833-1845. [Abstract]
- 9- Yanagisawa, M, Kurihara H, Kimura, S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K and Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988;332, 411-415. [Abstract]
- 10- Masaki T. The discovery of endothelins. *Cardiovasc Res* 1998;39:530-533.
- 11- Knoll T, Schult S, Birck R, Braun C, Michel MS, Bross S, Juenemann KP, Kirchengast M, Rohmeiss P. Therapeutic administration of an endothelin-A receptor antagonist after acute ischemic renal failure dose-dependently improves recovery of renal function. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001;37:483-488.
- 12- Boulanger C, Luscher TF. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest* 1990;85:587-590. [Abstract]
- 13- Saijonmaa O, Ristimäki A, Fyhrquist F. Atrial natriuretic peptide, nitroglycerine, and nitroprusside reduce basal and stimulated endothelin production from cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;173:514-20. [Abstract]
- 14- Yokokawa K, Kohno M, Yasunari K, Murakawa K, Takeda T. Endothelin-3 regulates endothelin-1 production in cultured human endothelial cells. *Hypertension* 1991;18:304-15. [Abstract]
- 15- Arıncı K, Elhan A. Anatomi 1. Cilt, 2. Baskı, Güneş Kitabevi Lmtđ Şti, Ankara,1997;392-398.
- 16- Ganong WF. Review of Medical Physiology. 19th edition. Appleton&Lange, Stamford, CT 1999;409-410,559,569-570,608,668,671-686.
- 17- Peker Ş. Histoloji 1. Baskı Uludağ Üniversitesi Basımevi, Bursa, 1993;449-451.
- 18- Junquera LC, Carnerio J, Kelley RO. Çeviri editörü: Aytekin Y. Temel Histoloji. eight edition, Barış Kitabevi/Appleton&Lange 1998;363-377.
- 19- Tanyolaç A. Özel Histoloji. Yorum Bas. Yay. San. Lmt. Şti. Ankara 1999;127-30.
- 20- Young B, Heath JW. Wheeler's Functional Histology. 4th edition, Churchill Livingstone, Harcourt Publishers Limited, London 2000;297-300.
- 21- Berne RM, Levy MN. Physiology. 4th edition. Mosby, New York 1994;677-687.
- 22- Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology 10th edition. WB Saunders Company, Philadelphia 1996;279-312, 295-312.

- 23- Heinzelmann M, Mercer-Jones MA, Passmore JC. Neutrophils and renal failure. *Am J Kidney Dis* 1999;34:384-399.
- 24- Caramelo C, Alvarez AM. Polymorphonuclear neutrophils in acute renal failure: New insights. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:2185-2188.
- 25- Paller MS. Effect of neutrophil depletion on ischemic renal injury in the rat. *J Lab Clin Med* 1989;13:113:379-386. [Abstract]
- 26- Thornton MA, Winn R, Alpers CE, Zager RA. An evaluation of the neutrophil as a mediator of in vivo renal ischemic-reperfusion injury. *Am J Pathol* 1989;135:509-515. [Abstract]
- 27- Rabb H, Mendiola CC, Diets J et al. Role of CD11a and CD11b in ischemic acute renal failure in rats. *Am J Physiol* 1994;267:F1052-1058. [Abstract]
- 28- Kelly KJ, Williams WW Jr, Colvin RB, Bonventre JV. Antibody to intercellular adhesion molecule 1 protects the kidney against ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:812-816.
- 29- Weight SC, Bell PRF, Nicholson ML. Renal ischemia-reperfusion injury. *Brit J Surg* 1996;83:162-170.
- 30- Molitoris BA, Marrs J. The role of cell adhesion molecules in ischemic acute renal failure. *Am J Med.* 1999;106:583-592.
- 31- William C, Schindler R, Frei U, Eckardt K-U. Increases in oxygen tension stimulate expression of ICAM-1 and VCAM-1 on human endothelial cells. *Am J Physiol* 1999; 45:H2044-H2052.
- 32- Ling H, Edelstein C, Gengaro P, Meng X, Lucis S, Knotek M, Wangsiripaisan A, Shi Y, Schrier R. Attenuation of renal ischemia-reperfusion injury in inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Am J Physiol* 1999;277:F383-390.
- 33- Eckardt KU. Acute renal failure--more than kidney ischemia? *Wien Klin Wochenschr.* 2000;112:145-148.
- 34- Zuk A, Bonventre JV, Brown D, Matlin KS. Polarity, integrin, and extracellular matrix dynamics in the postischemic rat kidney. *Am J Physiol* 1998;275:C711-C731.
- 35- Luster AD. Mechanism of disease: chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *NEJM* 1998;338:436-445.
- 36- Land W. Postischemic Reperfusion Injury and Cytokines. *Transplantation Proceedings.* 1998;30:4237-4238.
- 37- Herkowitz A, Choi S, Ansari AA, et al. *Am J Pathol* 1995;146:419.
- 38- Palace GP, Del Vecchio PJ, Horgan MJ et al. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:143.
- 39- Zhou W, Farrar CA, Abe K, Pratt JR, Marsh JE, Wang Y, Stahl GL, Sacks SH. Predominant role for C5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 2000;105:1363-1371.
- 40- Bonventre JV. Complement and renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Kid Dis.* 2001;38:430-436.
- 41- Lieberthal W, Menza SA, Levine JS. Graded ATP depletion can cause necrosis or apoptosis of cultured mouse proximal tubular cells. *Am J Physiol* 1998;274:F315-327.
- 42- Lieberthal W, Triaca V, Levine J. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. *Am J Physiol* 1996;270:F700-708.
- 43- Schumer M, Colombel MC, Sawczuk IS, Gobe G, Connor J, O'Toole KM, Olsson CA, Wise GJ, Buttyan R. Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. *Am J Pathol* 1992;140:831-838. [Abstract]
- 44- Ueda N, Shah SV. Endonuclease-induced DNA damage and cell death in oxidant injury to renal tubular epithelial cells. *J Clin Invest* 1992;90:2593-2597. [Abstract]
- 45- Kaushal GP, Ueda N, Shah SV. Role of caspases (ICE/CED 3 proteases) in DNA damage and cell death in response to a mitochondrial inhibitor, antimycin A. *Kidney Int* 1997;52:438-445. [Abstract]

- 46- Kaushal GP, Singh AB, Shah SV. Identification of gene family of caspases in rat kidney and altered expression in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1998;274:F587-595.
- 47- De Broe ME. Apoptozis in acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:23-26.
- 48- Webb ML, Meek TD. Inhibitors of endothelin. *Med Res Rev* 1997;17:17-67.
- 49- Pollock DM. Endothelin antagonists in the treatment of renal failure. *Curr Opin Invest Drugs*. 2001;2:513-520.
- 50- Goto K. History of endothelin In: Pulmonary actions of endothelins. (eds. GoldieRG and Hay DWP) Birkhauser Verlag Basel, Switzerland, 1999;1:1-20.
- 51- Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 1976;263:663-665.
- 52- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-376. [Abstract]
- 53- Shirahase H, Usui H, Kurahashi K, Fujiwara M, Fukui K. Possible role of endothelial thromboxane A2 in the resting tone and contractile responses to acetylcholine and arachidonic acid in canine cerebral arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 1987;10:517-522. [Abstract]
- 54- Katusic ZS, Shepherd JT, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contraction to stretch in canine basilar arteries. *Am J Physiol* 1987;252:H671-H673. [Abstract]
- 55- Masaki T. The discovery of endothelins. *Cardiovasc Res* 1998;39:530-533.
- 56- Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, Highsmith RF. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 1985;248:C550-556. [Abstract]
- 57- Mateo AO, De Arinano AA. Highlights on endothelins: a review. *Pharmacol Res* 1997;36:339-351.
- 58- Goto K. Basic and therapeutic relevance of endothelin-mediated regulation. *Biol Pharm Bull* 2001;24:1219-1230.
- 59- D'Orleans-Juste P, Labonte J, Bkaily G, Choufani S, Plante M, Honore J. Function of the endothelin(B) receptor in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Pharmacol Ther* 2002;95:221-238.
- 60- Ray A, Hegde LG, Chugh A, Gupta JB. Endothelin-receptor antagonists: current and future perspectives. *Drug Discov Today* 2000;5:455-464.
- 61- Çakmakçı M. Zehirli molekülden haberci maddelerin kraliçeliğine; Nitrik Oksit. *Tübitak Bilim ve Teknik Dergisi* 1999;374:58-62.
- 62- Moncada S, Higgs A, Furchgott R. International union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research. *Pharmacol Rev* 1997;49:137-142.
- 63- Atmaca G. Nitrik oksit'in periferik ve santral sinir sistemindeki rolü. *Sendrom Dergisi* 2001;7:18-20.
- 64- Soydan İ. Nitrik oksidin hastalıklardaki fizyopatolojik rolü. *Ege Üniv Tıp Fak Ayın Kitabı Dergisi Editör; Koşay S.* 1996;83:26-52.
- 65- Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993;329:2002-2012.
- 66- Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 9. baskı Ankara Hacettepe TAŞ Yayınları 2000;Cilt 2:1533-1536.
- 67- Galea E, Feinstein DL. Regulation of the expression of the inflammatory nitric oxide synthase (NOS2) by cyclic AMP. *FASEB J* 1999;13:2125-2137.
- 68- Lui SL, Zhang XH, Zhu W, Lo CY, Chan TM, Fung P, Lai KN. Demonstration of nitric oxide generation during renal ischemia reperfusion injury using paramagnetic resonance spectroscopy. *Transplant Proc* 1999;31:1020-1021.
- 69- Harmankaya Ç. Gülhane Askeri Tıp Akademisi Ayın Kitabı. GATA Basımevi, Ankara. 2001:33-34,38,42.
- 70- Wever RM, Luscher TF, Cosentino F, Rabelink TJ. Atherosclerosis and the two faces of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 1998;97:108-112.
- 71- Birman H. Nitrik oksitin fizyolojik rolleri. *Sendrom Dergisi* 1999;11:104-108.

- 72- Pogun S. Sex differences in brain and behavior: emphasis on nicotine, nitric oxide and place learning. *Int J Psychophysiol* 2001;42:195-208.
- 73- Schulman H. Nitric oxide: a spatial second messenger. *Mol Psychiatry* 1997;2:296-299.
- 74- Türköz Y, Özerol E. Nitrik Oksit'in Etkileri ve Patolojik Roller. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi* 1997;4:453-461.
- 75- Kurtz A, Wagner C. Role of nitric oxide in the control of renin secretion. *Am J Physiol* 1998;275:F849-862.
- 76- Nathan C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* 1997;100:2417-2423.
- 77- Nava E, Palmer RMJ, Moncada S. The role of nitric oxide in endotoxic shock: Effects of N-Monomethyl-L-arginine. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992;220:132. [Abstract]
- 78- Dupuy PM, Shore SA, Drazem JM, Frostell C, Hill WA, Zapol WM. Bronchodilator action of inhaled nitric oxide in guinea-pig. *J Clin Invest* 1992;90:421. [Abstract]
- 79- Pique JM, Esplugues JV, Whittle BJ. Endogenous nitric oxide as a mediator of gastric mucosal vasodilatation during acid secretion. *Gastroenterology* 1992;102:168-74. [Abstract]
- 80- Mehta JL. Endothelium, coronary vasodilatation and organic nitrates. *Am Heart J* 1995;129:382-391.
- 81- Aebi H. Catalase. In Bergmeyer HU (ed). *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York and London, 1974;673-677.
- 82- Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988;34:497-500.
- 83- Durak I, Yurtarslan Z, Canbolat O, Akyol O. A methodological approach to superoxide dismutase (SOD) activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction. *Clin Chim Acta* 1993;214:103-104.
- 84- Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158-170.
- 85- Prajda N, Weber G. Malign transformation-linked imbalance: decreased XO activity in hepatomas. *FEBS Lett* 1975;59:245-249.
- 86- Metcalf JA, Galin JJ, Nauseef WM, Roo RK (eds). *Laboratory Manual of Neutrophil Function*. Raven Pres: New York, 1986; 150-153.
- 87- Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. In *Methods in Enzymology*, V 186, Oxygen radicals in biological systems edited by Packer L, Glazer AN. Academic Press, California, 1990, pp 407-421.
- 88- Packer L, Glazer NA. Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins, *Methods in Enzymology*. California. 1990;186:464-479.
- 89- Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990;36:1440-1443.
- 90- Lowry O, Rosenbraugh N, Farr L, Rondall R. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;183:265-275.
- 91- Wayne R. Waz, Judith B. Van Liew, and Leonard G. Feld. Nitric oxide metabolism following unilateral renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Pediatr Nephrol* 1998;12:26-29.
- 92- Brooks DP, dePalma PD, Gellai M, Nambi P, Ohlstein EH, Elliott JD, Gleason JG, Ruffolo RR Jr. Nonpeptide endothelin receptor antagonists. III. Effect of SB 209670 and BQ123 on acute renal failure in anesthetized dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;271:769-775.
- 93- Krishan P, Sharma A, Singh M. Effect of angiotensin converting enzyme inhibitors on ischaemia-reperfusion-induced renal injury in rats. *Pharmacol Res.* 1998;37:23-29.

9- TEŞEKKÜR

Beni böbrekte endotelinler ile ilgili bu çalışmayı yapmaya yönlendiren ve her türlü imkanlar açısından destekleyen kıymetli hocam **Doç. Dr. M. Hanifi EMRE**'ye, çalışmalarımda beni destekleyen ve katkılarıyla teşvik eden kıymetli hocam **Öğ. Grv. Dr. Ersin FADILLIOĞLU**'na, uzun tez çalışmamda büyük özveride bulunan sevgili eşim **Stj. Dr. Filiz (KİRAZ) ERDOĞAN**'a, çalışmalarımı destekleyen anabilim dalımızın değerli öğretim elemanları **Yrd. Doç. Dr. Yunus KARAKOÇ**'a, **Öğr Grv. Halil DÜZOVA**'ya ve asistan arkadaşım **Araş. Grv. Dr. Alaadin POLAT**'a teşekkürü bir borç bilirim.

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Hasan ERDOĞAN'a ait bu bilimsel çalışma jüri üyeleri olarak tarafımızdan Fizyoloji Anabilim Dalı **Uzmanlık Tezi** olarak kabul edilmiştir.

İMZA

Başkan

ÜYE

ÜYE

ÜYE

ÜYE

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

...../...../2003

.....

Fakülte Dekanı