



**T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

**FOSFODİESTERAZ IV İNHİBİTÖRÜ OLAN
ROLİPRAMİN RENAL REPERFÜZYON HASARI
ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. Emin MAMMADOV

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç.Dr. Atilla ARIDOĞAN

ADANA – 2011



**T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

**FOSFODİESTERAZ IV İNHİBİTÖRÜ OLAN
ROLİPRAMİN RENAL REPERFÜZYON HASARI
ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. Emin MAMMADOV

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç.Dr. Atilla ARIDOĞAN

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fonu
TF2010LTT11 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

ADANA – 2011

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	II
TABLO LİSTESİ	IV
ŞEKİL LİSTESİ	V
KISALTMA LİSTESİ	VI
ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER	VIII
ABSTRACT AND KEYWORDS	IX
1 GİRİŞ VE AMAÇ	1
2 GENEL BİLGİLER	3
2.1 Böbreğin Anatomisi	3
2.2 Böbreğin Fonksiyonel Fizyolojisi	5
2.3 İskemi - Reperfüzyon Hasarının Fizyopatolojisi	9
2.3.1 Serbest Oksijen Radikallerinin Rolü	10
2.3.1.1 Hücrede Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynağı	15
2.3.1.2 Serbest Oksijen Radikallerinin Etkileri	20
2.3.2 Endojen ve Eksojen Antioksidanlar	23
2.3.2.1 Süperoksit dismutaz (SOD)	26
2.3.2.2 Katalaz (KAT)	26
2.3.3 İ/R Hasarında Kompleman, Endotel ve Lökositlerin Rolü	27
2.3.4 Akut Tübüler Nekroz ve Renal İskemi- Reperfüzyon	29
2.4 Fosfodiesteraz Ailesi ve Rolipram	33
3 GEREÇ ve YÖNTEM	35
3.1 Çalışma grupları	36
3.2 İstatistiksel Analiz	37
3.3 Histopatolojik inceleme	37
3.3.1 Hematoksilen Eozin (H&E) Kesitlerin Hazırlanması ve Değerlendirilmesi	37
3.3.2 İmmünohistokimyasal olarak Apop Tag Hazırlanması ve Değerlendirilmesi	38
3.4 Biokimyasal inceleme.	40
3.4.1 Katalaz	40
3.4.2 Süperoksit Dismutaz Tayini	42
3.4.3 Malondialdehit (MDA) Ölçüm Yöntemi	46

4	BULGULAR	49
4.1	Biyokimyasal Değerlendirme	49
4.1.1	Biyokimya sonuçlarının istatistikleri	49
4.2	Histopatolojik Değerlendirme	54
5	TARTIŞMA	59
	KAYNAKLAR	63
	ÖZGEÇMİŞ	68

TABLO LİSTESİ

Tablo No

Sayfa No

Tablo 1. Katalaz ölçümünde gereken örnek hazırlanışı için hacim ve sulandırma.	41
Tablo 2. UV katalaz enzim reaksiyon şeması	42
Tablo 3. SOD derişim hazırlanış şekli	44
Tablo 4. SOD ölçümü için kullanılacak ayıraçlar	45
Tablo 5. Standart eğri çizimi için gereken günlük standartlar	47
Tablo 6. MDA örnek çalışması için gereken ayıraçlar	48
Tablo 7. 5 grup için ortalama Katalaz, MDA ve SOD değerleri	49
Tablo 8. Katalaz ölçümünün gruplar arasında ikili karşılaştırma sonuçları	51
Tablo 9. MDA ölçümünün gruplar arasında ikili karşılaştırma sonuçları	52
Tablo 10. SOD ölçümünün gruplar arasında ikili karşılaştırma sonuçları	52
Tablo 11. Gruplara göre Tübüler nekroz dağılımı	54
Tablo 12. Gruplara göre inflamasyon dağılımı	54
Tablo 13. Gruplara göre Apop Tag ölçümleri	55
Tablo 14. Apop Tag ölçümünün gruplar arasında ikili karşılaştırma sonuçları	56

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No

Sayfa No

Şekil 1. Böbreğin anatomik yapısı	4
Şekil 2. Nefronun anatomik yapısı	6
Şekil 3. Moleküler oksijenden serbest radikal oluşumu	11
Şekil 4. Serbest radikal oluşumu	12
Şekil 5. Fenton ve Haber-Weiss Reaksiyonu	15
Şekil 6. Lipid peroksidasyonu sonucu MDA oluşumu	21
Şekil 7. İskemik ve tübüler ATN patogeneğinde rol oynayan faktörlerin şematik görünümü	32
Şekil 8. Siklik 3' 5' nükleotidlerin etki mekanizması	33
Şekil 9. Anestezi uygulanmış sıçan	36
Şekil 10. Böbrek pedikülü ortaya konulan sıçan	36
Şekil 11. Klemp konulmuş böbrek pedikülü	36
Şekil 12. Nefrektomi uygulanmış sıçan	36
Şekil 13. MDA Standart Eğrisi	47
Şekil 14. Grupların ortalama Katalaz miktarları	50
Şekil 15. Grupların ortalama MDA miktarları	50
Şekil 16. Grupların ortalama SOD miktarları	51
Şekil 17. Grupların Apop Tag ortalamaları	56
Şekil 18. 1. grup (kontrol), apop tag, İHK, x 200, normal tübüller oklarla gösterilmiştir	57
Şekil 19. 1.grup (kontrol), HE, x 200, normal tübüller oklarla gösterilmiştir	57
Şekil 20. 2. grup (İ/R), apop tag, İHK, x 400, boyanan apoptotik hücreler oklarla gösterilmiştir	57
Şekil 21. 2.grup (İ/R), HE, x 200, nekroza gitmiş tübül epitel hücreleri oklarla gösterilmiştir	57
Şekil 22. 5.grup, apop tag, İHK, x 400, boyanan apoptotik hücreler oklarla gösterilmiştir	58
Şekil 23. 5.grup, HE, x 200, nekroza gitmiş tübül epitel hücreleri oklarla gösterilmiştir	58

KISALTMA LİSTESİ

ABY	: Akut böbrek yetmezliği.
AST	: Aspartoaminotransferaz.
AT	: Anjiyotensin.
ATN	: Akut tübüler nekroz.
ATP	: Adenozin trifosfat.
ACTH	: Adrenokortikotropik hormon.
ADH	: Antidiüretik hormon.
Cr	: Kreatinin.
cAMP	: siklik 3',5'-adenozin monofosfat
c GMP	: siklik 3',5'-guanozin monofosfat
DAB	: Diaminobenzidin
FADH₂	: Flavinamid adenindinükleotid.
GFR	: Glomerüler Filtrasyon Hızı.
GSH	: Glutasyon.
GTP	: Guanozin trifosfat.
GST	: Glutasyon S-transferaz.
GSHPx	: Glutasyon peroksidaz.
GR	: Glutasyon redüktaz.
H₂O₂	: Hidrojen peroksit.
H&E	: Hemotoksilin Eozin
ICAM-1	: İnterselüler adhezyon molekül-1.
IL	: İnterlökin
İ/R	: İskemi-reperfüzyon.
KAT	: Katalaz.
Km	: Enzimin substrata olan ilgisi
LOOH	: Lipid hidroperoksit.
MDA	: Malondialdehit.

NADH	: Nikotinamid adenindinükleotid.
NO[•]	: Nitrik oksit radikali.
O₂^{•-}	: Süperoksit radikali
OH[•]	: Hidroksil radikali.
PMNL	: Polimorf nüveli lökositler.
PG	: Prostaglandin.
ROR	: Reaktif oksijen radikalleri.
ROO[•]	: Peroksit radikali.
SOD	: Superoksit dismutaz.
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktör-alfa.

ÖZET ve ANAHTAR SÖZCÜKLER

Fosfodiesteraz IV İnhibitörü Olan Rolipramın Renal Reperfüzyon Hasarı Üzerine Etkisi

Amaç: Böbrek iskemisi; böbrek transplantasyonu, parsiyel nefrektomi, sepsis, çeşitli ürolojik girişimler ve hidronefroz gibi çeşitli klinik durumlarda sık görülen bir tablodur. Bu yüzden nefron koruyucu cerrahinin önemi zamanla daha da artmaktadır. Böbrek iskemisine bağlı böbrek dokusunda meydana gelen hasarı en aza indirmek için çeşitli farmakolojik alanlar deneysel olarak çalışılmaktadır. Bunlar içinde çeşitli fosfodiesteraz inhibitörleri mevcuttur. Bizde bu çalışmamızda fosfodiesteraz 4 inhibitörü olan Rolipram adlı ajanın renal reperfüzyon hasarı üzerine olan etkisini araştırmayı amaçladık.

Yöntem ve Gereçler: Çalışmamızda 30 adet sıçan altışarlı 5 ayrı gruba ayrılması planlandı. 1.gruba herhangi bir şey yapılmadı, 2.gruba 30 dk boyunca renal pediküle klemp konuldu. 3.gruba klemp konulmadan 30 dk önce, 4.gruba klemp konulduğu esnada, 5.gruba klemp açıldıktan 30 dk sonra 1mg/kg intraperitoneal rolipram verildi. Klempleme süresi 30 dakika olarak belirlenmiştir. Bu grupların hepsine 24 saat sonra nefrektomi uygulandı. Alınan her böbrek dokusunun yarısının histopatolojik incelenmesiyle enflamasyon, tubuler nekroz ve apoptosize bakıldı. Diğer yarısının biokimyasal yöntemlerle malondialdehit, süperoksit dismutaz, katalaz seviyeleri ölçüldü.

Bulgular: Çalışmada Rolipram verilmesiyle, sıçanlarda renal İ/R hasarı belirgin azaldı. Oksidatif hasarda serbest radikallerin neden olduğu lipit peroksidasyonunun stabil metaboliti olan malondialdehid seviyeleri; 2.(İ/R) grupta özellikle 5 gruptan belirgin olarak daha yüksekti. Aynı zamanda antioksidan enzim olan Superoksit Dismutaz ve Katalaz seviyesi 5.grupta 2.gruptan anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Histopatolojik olarak enflamasyon açısından Rolipram verilen gruplarla 1.(kontrol) ve 2.(İ/R) gruplar arasında istatistiksel çok anlamlı fark olmamasına rağmen,5 grupta tubuler nekroz ve apoptosis 1.(kontrol) grup hariç diğer gruplardan anlamlı derecede düşük bulunmuştur

Sonuç: Rolipram, renal İ/R hasarına yol açabilecek cerrahi girişimlerde kullanılarak, oluşabilecek oksidatif renal doku hasarı azaltılabilir ve renal fonksiyonun ileri derecede bozulması engellenebilir kanısındayız.

Anahtar Sözcükler: Rolipram, renal iskemi, iskemi reperfüzyon hasarı (İ /R)

ABSTRACT and KEYWORDS

The Effect of Rolipram, a Fosfodiesterase 4 Inhibiting Agent, on Kidney Reperfusion Injury

Purpose: Renal ischemia is a common entity that seen in renal transplantation, partial nephrectomy, sepsis, and a variety of urological procedures and various clinical situations, such as hydronephrosis. Therefore, the importance of nephron-sparing surgery is increasing with time. To minimize the damage of renal ischemia in the kidney tissue, various pharmacological agents studied experimentally. These agents include the various phosphodiesterase inhibitors. In this study, we aimed to investigate the effect of the Rolipram as agent of phosphodiesterase 4 inhibitor, on renal reperfusion injury.

Method and Materials: The study was planned by separation of 30 rats to 5 different groups containing 6 in each. In the first group nothing was done. In the second group the renal pedicle clamped for 30 minutes. In the third group, 30 min before clamping, in fourth group when clamp is placed, in fifth group after 30 minutes opening the clamp, 1mg/kg rolipram was given intraperitoneally by injection. Clamping time was determined as 30 minutes. Nephrectomy was performed 24 hours after all of these groups. For each kidney, half of the tissues examined histopathologically for inflammation, tubular necrosis and apoptosize views. The other half of the kidneys examined by biochemical methods including malondialdehyde, superoxide dismutase, catalase levels measuring.

Findings: In rats with the administration of Rolipram, renal I / R injury significantly decreased. In oxidative damage, malondialdehyde levels, which is stable metabolite of lipid peroxidation caused by free radicals was significantly higher in second (I / R) group than fifth group in particular. At the same time that the antioxidant enzyme superoxide dismutase and catalase levels were significantly higher in Group 2 than group 5. Histopathologically, the inflammation of the groups which administrated Rolipram compared with group 1 (Control) and 2 (I / R), there was not a very significant difference. Tubular necrosis and apoptosis in group 5 was significantly lower than the other groups except group1(control).

Result: We consider that Rolipram is an opinion in surgical procedures which can lead to renal I / R injury and can decrease oxidative renal tissue damage and severe deterioration of renal function

Key Words: Rolipram, renal ishemia, ishemia reperfusion injury (I / R)

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Bir organa gelen kan akımının çeşitli nedenlerle (özellikle vasküler cerrahi işlemler ve organ transplantasyonu esnasında) yetersiz hale gelmesine veya durmasına iskemik denir. İskemi sonucunda doku hipokside kalır ve hipoksik doku hasarı ortaya çıkar. İskeminin uzun sürmesi sonucunda hücrelerin bütünlüğü kaybolur hatta hücre ölüm meydana gelir. Reperfüzyon ise dokunun kanlanması yeniden başlamasıdır. İskemik bir dokuda kan akımının yeniden başlaması durumunda (reperfüzyon), özellikle dokuya gelip yerleşen polimorfonükleer lökositler (PMNL) tarafından salınan reaktif oksijen radikalleri (ROR) dokudaki yıkımı artırıcı etki yapar. Bu olaya reperfüzyona bağlı doku hasarı denir¹⁻⁵.

Reaktif oksijen radikallerinin potansiyel zararlarına karşılık çok sayıda hücre koruyucu enzimler ile karşı koyulur ve antioksidan maddeler ile radikal hasar sınırlandırılmaya çalışılır. Vücuttaki hücresel antioksidan enzimler, antioksidan maddeler ve serbest radikallerin birbirleri arasındaki ilişki bir denge oluşturmaktadır^{4,5}. Hücre içinde oksijenin metabolize edildiği her yerde, antioksidanlar, oksijen ara metabolitlerini azaltmak için hızlı ve spesifik (enzimatik) olarak çalışırlar. Antioksidan savunmada öncelikle etkili olanlar enzimatik antioksidanlardır. Bunlar superoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GSHPx) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi enzimlerdir^{3,4,5}.

Böbrek iskemisi; böbrek transplantasyonu, parsiyel nefrektomi, kardiyopulmoner bypass, sepsis, çeşitli ürolojik girişimler ve hidronefroz gibi çeşitli klinik durumlarda görülür. İskemiden sonra gelişen akut böbrek yetmezliği, glomerüler filtrasyon hızında azalma, tübüler nekroz ve böbrek damarlarında direnç artışıyla karakterizedir. Reperfüzyon sonrası ortama gelen nötrofiller ve bunlardan açığa çıkan mediatörlerin etkileri de eklenince organ veya doku ölümü kaçınılmaz olmaktadır^{2,3,4}.

Tüm organ ameliyatlarında olduğu gibi renal cerrahi girişimlerde de iskemik-reperfüzyon (İ/R) kaçınılmazdır. Son zamanlarda yapılan çeşitli deneysel İ/R modellerinde, bir takım farmakolojik ajanların İ/R hasarında koruyucu veya önleyici

etkileri gösterilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmada, renal İ/R hasarında fosfodiesteraz IV inhibitörü olan rolipramın böbrekteki muhtemel koruyucu etkilerini incelenmesi amaçlandı.

2 GENEL BİLGİLER

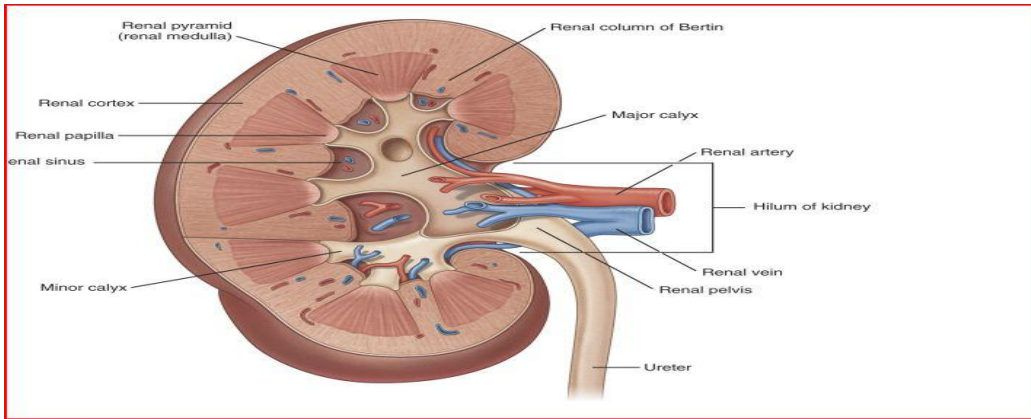
2.1 Böbreğin Anatomisi

Böbrekler, bir çift kırmızı-kahverengi, spinal kolonun iki tarafında, retroperitonda derinde, 12. torakal ve 3. lomber vertebralar arasında derinde yerleşmiş ve iyi korunan organlardır. Arkasında kalın sırt kasları, üstte ve yanda 11. ve 12. kostalar, önde ve yanda karın duvarı kasları yer almaktadır. Arkada, 1. ve 2. lomber vertebra, processus transversuslardan başlayıp 11. ve 12. kostalara yelpaze gibi dağılan fibröz Henle ligamenti, bu dış koruma tabakasına katkıda bulunur. Bu kas tabakasının altında pararenal yağ dokusu yer alır. Kalın pararenal yağ dokusu altında renal fasya (Gerota) bulunur. Bu fasya arkada biraz daha kalın olup önde peritona yapışmıştır. Gerota fasyasının ön ve arka yaprakları, medialde, büyük damarlar düzeyinde birleşirler. Böylece bir taraftan böbreği desteklerken diğer taraftan, bir taraf retroperitoneal infeksiyonların karşı tarafa geçmesini önler.^{6,7}

İdrar üreten organlar olarak böbrekler insanlarda su- elektrolit ve asit – baz dengesinde merkez oynamalarının yanı sıra renin ve eritropoetin yapımı ve D vitamini metabolizması gibi endokrin rol oynarlar. Normal koşullarda total kardiyak output'un 1/5'ini alan, çok vasküler organlardır. Renal parenkim kırılgandır. Parenkimi ince ve fibroelastik kapsül sarar⁸.

Erişkin erkekte normal böbrek ağırlığı yaklaşık 150 gr'dır. Ortalama, kadınlarda biraz daha düşük olup yaklaşık 135 gr'dır. Uzunluğu 10-12 cm, eni 5-7 cm ve kalınlığı 3 cm'dir. Yenidoğanda böbrekler tüm gövde ağırlığının 1/80'ini, erişkinde 1/240'ini oluşturur. Sağ böbrek, üstündeki karaciğer nedeniyle sola göre biraz daha aşağıdadır⁷. Böbreklerin komşulukları farklılık gösterir. Sağ böbrek karaciğerin arkasında uzanır. Duodenum medialden hiler yapıları örter. Kolonun hepatik fleksurası sağ böbreğin alt kutbunu çaprazlayarak devam eder. Solda böbrek hilusu ve üst 2/3 bölümü retroperitoneal pankreas kuyruğu ve dalak damarıyla komşudur. Yukarıda mide arka duvarıyla komşuluk yapar. Pankreas kuyruğunun altında medialde büyükçe bir peritoneal kese içinde jejunum ile komşudur⁸.

Renal pelvis 5-7 ml kapasiteli yapıdır. Pelvis 2-3 ana major kalikse, bunlarda papillalarda sonlanan birçok minör kalikslere ayrılır. Kaliks boyunları infundibulum olarak adlandırılır. Böbreğin renal arter, ven, lenfatikler, sinirler ve üreterin böbreğe giriş çıkış yaptığı mediale bakan yüzüne hilus denir. Hiler yapılar; en önde ven, arada arter ve en arkada pelvis olacak şekilde sıralanmışlardır. Böbrek parenkiminin en dışına korteks, korteksle toplayıcı boşluklar arasında kalan kesimine de medulla denir. Korteks bölgesinde glomerüller, proksimal ve distal kıvrıntılı tübüller ve toplayıcı kanallar bulunur. Böbrek parenkiminin daha derin bölgeleri medulladır. Medulla, renal piramit adı verilen 8-18 adet konik yapıda piramid içerir. Her bir piramidin yuvarlak tepesi papilla adını alır ve minor kalikslere açılır. Papilla yüzeyine 7 ana kollektor kanal açılır (Bellini kanalları) ve bu görünüm nedeniyle area kribrosa adını alır. Piramidlerin tabanlarından korteks içine doğru çizgiler uzanır (Stria medullaris kortisis –Ferrain uzantıları). Renal piramidlerin kesit yüzü, bir birine paralel seyreden Henle kolları, kollektor kanalları ve vaza rektalar nedeniyle çizgili görünümündedir^{6,7}.



Şekil 1. Böbreğin anatomik yapısı (Drake RL, Vogl W, Mitchell AWM: Gray's. 'Öğrenciler için Anatomi' den alınmıştır).

Böbrek damar pedikülü deyince, renal hilusun medialinden olarak böbreğe giren bir arter ve ven anlaşılır. Böbrek veni daha önde, arter venin arkasındadır. En önde pelvis renalis vardır. Böbrek arterleri ve venleri 2.lumbar vertebra düzeyinde superior mezenterik arterin altından aort ve v.kava inferiorundan dallanır. Sağ böbrek arteri v.kava inferiorun arkasından geçer ve sol böbrek arterine göre daha uzundur. Aksesuar sağ

renal arter olasılığı % 30' dur. Arter tam hilusta ön ve arka segmenter dallarına ayrılır. İlk ve en sabit segmental bölünme arka daldır. Genellikle ana renal arterden renal hilusa girmeden çıkar ve pelvis renalisin arkasından geçerek böbreğin büyük posterior segmentini besler.^{7,8}

Ön dal ise apikal, üst, orta ve alt anterior segmental 4 dala bölünerek böbreğe girer. Ana renal arter, segmental arterler ve onların dalları anastomoz yapmayan ve kollateral dolaşımı olmayan end arterlerdir. Bunların herhangi birinin oklüzyonunda beslediği böbrek parenkiminde iskemi ve enfarktüs oluşur. Bu segmenter dağılım, böbreğin posterolateral bölümünde avasküler bir çizgi oluşturur (Brodel hattı). Bu hattın avasküler bir plan olduğu kabul edilir ve parenkim açılacaksa hat boyunca açılması önerilir⁸.

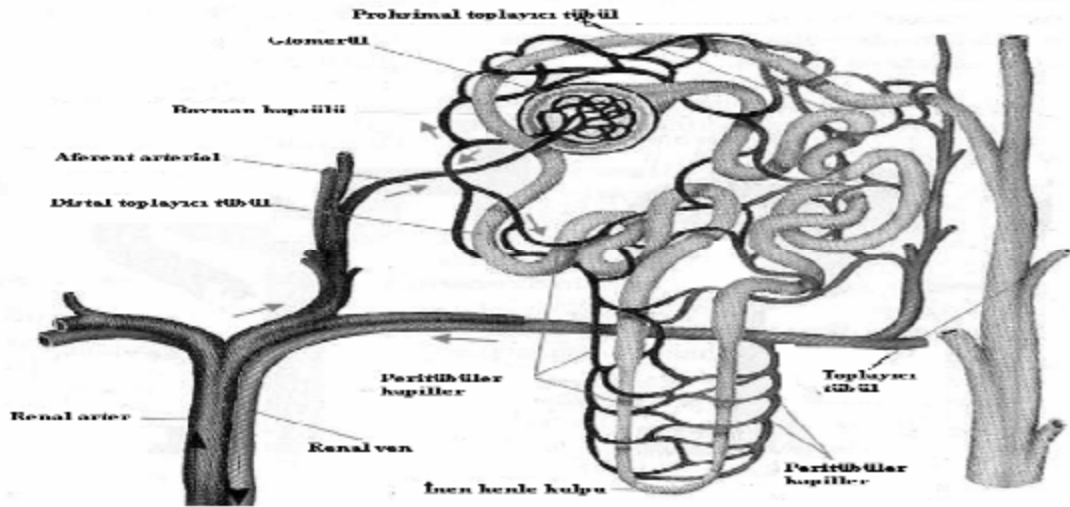
Segmenter arterler renal sinüstan sonra lobar arterleri oluşturur. Bunlar bölünerek renal parenkime girer ve interlober arterleri oluşturur. Her bir piramit tabanında, interlober arterler, arkuat arter olarak devam eder. Arkuat arterlerden birçok interlobüler arter çıkar. İnterlobüler arterlerin ana dalları afferent glomerüler arteriolu oluşturur ve bunlarda glomerüle dağılır. Böbreğin venöz kanı da interlobüler venler aracılığıyla arkuat venlere dökülür. Arkuat venler interlober venlere açılır ve bunlar da sonuçta renal veni oluşturur. Sağ renal ven kısa olup vena kava inferiora açılır. Kol sayısı azdır ve varsa yalnız aberan gonadal veni alır. Uzun olan sol renal vene inferior frenik, adrenal, gonadal ve 3.lomber ven açılır^{6,7}.

2.2 Böbreğin Fonksiyonel Fizyolojisi

Böbrekte idrar oluşumunu sağlayan en küçük yapısal ve anatomik birim nefrondur. Her bir böbrekte, her birinin idrar yapabilme fonksiyonu olan yaklaşık 1 milyon nefron bulunur. Böbrek yeni nefron rejenere edemez. Dolayısıyla renal bir hasar, hastalık veya normal yaşlanma ile nefron sayısında kademeli bir azalma olur. Her bir nefronun iki kısmı vardır: 1) Glomerül; sıvının kandan filtre edildiği kısım, 2) Tübülüsler; filtre edilen sıvının idrara dönüştüğü proksimal ve distal tübülüsler, Henle Kulpu ile toplayıcı kanallarda oluşan kısımdır. Glomerüller, proksimal ve distal tübülüsler ve dış kortekste nefronların Henle kulpları kortekste; toplayıcı kanallar,

Henle kulpları ve vasa rectalar medullada bulunur. Nefronlar böbrek dokusunda ilerledikleri derinliğe göre kortikal ve jukstaglomerüler olmak üzere 2 tiptir. Glomerül, dallanan ve anastomozlar yapan ve epitelyal hücreler ile kaplı kapiller bir yumaktır. Bowman kapsülü denen bir yapı içinde bulunur. Glomerülden filtre edilen sıvı sırasıyla proksimal tübül, henle kulpu, distal tübül ve toplayıcı kanallardan geçer, renal papillaların içinden kalikse açılır. Oradan da renal pelvis ve üretere geçer^{6,8,9,10}.

Distal tübülünün başlangıcı her nefronda afferent ve effent arteriyoller ile temas halindedir ve bu üç yapı jukstaglomerüler apparatus denen yapıyı oluşturur. Bu apparatusun görevi renin salgılayarak kan basıncı üzerinde etkili olmak, glomerüler filtrasyon ve renal kan akımının regülasyonunu idare etmektir. Jukstaglomerüler apparatusun distal tübülündeki değişiklik gösteren hücrelerine maküle densa ismi verilir ve distal tübülündeki sıvının birleşimine göre jukstaglomerüler apparatusun aktivitesini ayarlar^{7,10}



Şekil 2. Nefronun anatomik yapısı (Biocarampangue-Recursos De Biologia 2007'den alındı)

Nefronların temel işlevi istenmeyen maddeleri plazmadan temizlemektir. Bunun için kullanılan mekanizmalar şunlardır:

- 1) Glomerüler Filtrasyon: Glomerüldeki kanın plazmasının bir bölümü (yaklaşık 1/5'i) glomerüler membrandan filtre edilir.

- 2) Tübüler Reabsorpsiyon: Filtre edilen sıvı, tübüllerde ilerlerken su ve diğer gerekli maddeler reabsorbe edilir. İstenmeyen maddeler geri emilmez ve oluşumuna katkıda bulunur.
- 3) Tubuler Sekresyon: Plazmadaki bazı maddeler tübüleri döşeyen epitelyum hücrelerince doğrudan tübüler sıvı içine sekrete edilir⁹⁻¹⁰.

Glomeruler Fonksiyonlar:

Nefronun bir bölümü olan glomerulün fonksiyonu, afferent arteriolle gelmekte olan kanı filtre etmektir. Hücreler ve büyük moleküller hariç her türlü madde nefronun daha ileri bölümlerine doğru ilerler. Bazı faktörler filtrasyonu kolaylaştırır. Bunlardan birincisi, iki arteriol arasındaki pozisyonundan dolayı oluşan kapillerdeki yüksek basınçtır. Diğer bir faktör yarı geçirgen glomerüler membrandır. Bu membranın eşik değeri yaklaşık olarak 66000 daltondur (Albuminin molekül büyüklüğüyle aynı). Bu nedenle su, elektrolitler ve glukoz, üre, kreatinin gibi küçük moleküller serbestçe geçerler. Ancak albumin, bazı plazma proteinleri, selüler elementler, lipid-bilirubin gibi proteine bağlı moleküller geçemezler. Bir diğer faktör bazal membranın negatif şarj olmuş olmasıdır. Böylece, örneğin protein gibi negatif yüklü moleküller filtrata geçemezler. Böbreklere dakikada 1200-1500 ml kan akımı gelir ki bu miktar total kardiyak outputun yaklaşık ¼'üdür. Glomerüller ise 125-130 ml filtrat oluştururlar ve bu filtrat proteinleri ve hücreleri içermez. Dakikada filtre edilen kan volümü Glomerüler Filtrasyon Hızı (GFR) olarak bilinir^{6,8,9}.

Tübüler Fonksiyonlar

Proksimal Tübül: Proksimal tübül, hücreden arınmış ve özellikle protein - kan filtratının ulaştığı nefronun diğer bir bölümüdür. Bu süzüntü hem belli bir konsantrasyonun üzerindeki vücut için zehirli olan artık ürünleri hem de vücut için gerekli maddeleri içerir. Proksimal tübülün bir fonksiyonu da bu değerli maddelerin her birinin çoğunluğunu kan dolaşımına tekrar geri döndürmesidir. Böylece suyun üçte ikisi, sodyum ve klorla, glukozun tümü (renal eşik kadar), proteinlerin, vitaminlerin ve aminoasitlerin hemen hemen tümü ve değişik miktarlarda magnezyum, kalsiyum, potasyum ve bikarbonat gibi iyonlar yeniden emilirler.^{9,10}

Proksimal tübülün diğerk bir fonksiyonu da, penisilin gibi ilaçları ve hidrojen iyonu gibi böbreğin tübüler hücre metabolit ürünlerini sekrete etmektedir^{6,9,10}.

Henle lupu: Ters akıntı üreten sistemdir. Nefronun bu bölümünde medüllada osmolarite kortikomedüller bileşkeden içeriye doğru devamlı artar. Suyun, sodyumun ve klorun reabsorbsiyonu uyarılır. Hiperosmolarite gelişir. Henle lupu proksimal tübül ile distal tübül arasındadır. Henlenin inen kolunda akım aşağıya doğrudur ve çıkan kolunda akım yukarıya doğrudur ve ters eğimli akım diye adlandırılır. Çıkan kol boyunca sodyum ve klor aktif ve pasif olarak medüller interstisyel sıvı içerisine absorbe olur. Çıkan kol rölatif olarak suya geçirgen olmadığı için hiperosmolarite gelişir. İnen kol ise suya çok geçirgendir, sodyum ve kloru reabsorbe etmez. İnterstisyel hiperosmolaritenin nedeni, çıkan kolda klor ve sodyum iyonlarının içeriye pompalanmasıdır⁸.

İnen lupu terkeden suyla, çıkan lupu terkeden sodyum ve klor arasındaki etkileşim yüksek osmolariteyi sağlar ve böbrek medüllasında hipoosmolar idrarın lupu terketmesine neden olur. Bu süreç ters akım toplayıcı sistem olarak adlandırılır⁸.

Distal tübül: Filtrat nefronun bu bölümünde son şeklini alır. Distal tübülün fonksiyonu elektrolit ve asit baz homeostazında küçük ayarlamalar yapmaktır. Aldosteronun hormonal kontrolü altındadır⁸.

Toplayıcı tübül: Üst bölümlerinde aldosteronun etkisiyle sodyum reabsorbsiyonu gerçekleşir. Klor ve üre de burada reabsorbe edilir. İlaveten toplayıcı tübül antidiüretik hormon (ADH)'nın kontrolü altındadır. Bu peptid hormon, posterior hipofizden salgılanır ve salınımını kan osmolaritesinin artması veya intravasküler volüm azalması tetikler. Yarı ömrü kısadır. ADH su reabsorbsiyonunu stimule eder. Toplayıcı kanal normalde suya geçirgen değildir (Çıkan henle gibi). Ancak ADH varlığında toplayıcı kanalın lümeninden medullaya pasif difüzyonla su geçişi olur ve idrar daha konsantre hale gelir^{6,9,10}.

Nonprotein nitrojenlerin (NPN) metabolit eliminasyonları : Nükleik asitler, aminoasitler ve proteinlerin yıkım metabolizmaları sonucunda vücutta NPN atıklar üretilir. Bu ürünlerin atılımı böbreğin önemli fonksiyonlarından biridir. Üç önemli madde üre, kreatinin ve ürik asittir⁹.

Böbrekler sıvı-elektrolit ve asit-baz dengesi ayarlanmasında önemli rola sahiptir. Böbrekler aynı zamanda endokrin bir organ olup, renin, eritropoietin prostaglandinler ve vitamin D mekanizmalarında rol alır.^{6,9,10}

2.3 İskemi - Reperfüzyon Hasarının Fizyopatolojisi

İskemi, hücrede enerji düzeyinin düşmesine ve toksik metabolitlerin dokuda birikmesine yol açarak hücre disfonksiyonu ve sonrasında hücre ölümüne kadar gidebilen bir dizi biyokimyasal reaksiyonu başlatır. İskemik ortamda doku ATP düzeyi azalmakta, asidoz oluşmakta ve uzun iskemi sürelerinin ardından gelen reperfüzyon sonrası boşalan ATP depoları organ canlılığını sürdürmek için yeterli miktarda doldurulamamaktadır. Reperfüzyon sonrası ortama gelen nötrofiller ve bunlardan açığa çıkan mediatörlerin zararlı etkileri de eklenince organ veya doku ölümü kaçınılmaz olmaktadır³.

İ/R sonrası dokularda mikrovasküler fonksiyon bozukluğu gelişir. Arteriyollerde endotele bağımlı dilatasyon bozulur. Kapillerlerde lokosit tıkaçları oluşur, sıvı filtrasyonu artar. Postkapiller venüllerde plazma proteinlerinin damar dışına çıkması ve lokositlerin hareketliliği başlar. Mikrosirkülasyonun bütün segmentlerinde aktive olan endotel hücreleri daha fazla reaktif oksijen radikalleri (ROR) ve daha az nitrik oksit (NO) üretir. Endotel hücrelerinde süperoksit radikali ve nitrik oksit arasındaki dengesizlik inflamatuvar mediyatörlerin üretim ve salınımına öncülük ederken, adhezyon moleküllerinin biyosentezini de artırır^{11,12}.

Hipoksi sonucu geri dönüşümsüz değişikliklerin gelişmesi için geçen süre değişkendir. İskelet kaslarının saatlerce hipoksiyi tolere edebilmesine karşın beyin için bu süre çok kısadır; kalp için yaklaşık 60 dakika, böbrek için ise 30 dakika kadardır. Sonuç olarak iskemi, hücreleri hasara uğratar ve öldürür. Bu nedenle iskemi durumunda kan akımı en kısa zamanda tekrar sağlanmalıdır. Fakat dokularda oksijenizasyonun tekrar sağlanması hasarlı bölgede ROR'ların artmasına ve geçici olarak hasarın ağırlaşmasına sebep olabilmektedir. İskemi nedeniyle ortamın asitleşmesi, hasarlı hücrelerden demir iyonlarının salınımı, mitokondrial solunum zincirlerindeki aksamalar

ile dokularda ROR'ların sentezi uyarılır. Kan akımı tekrar sağlandığında ortama oksijenin ulaşmasıyla hasar daha da artar¹³.

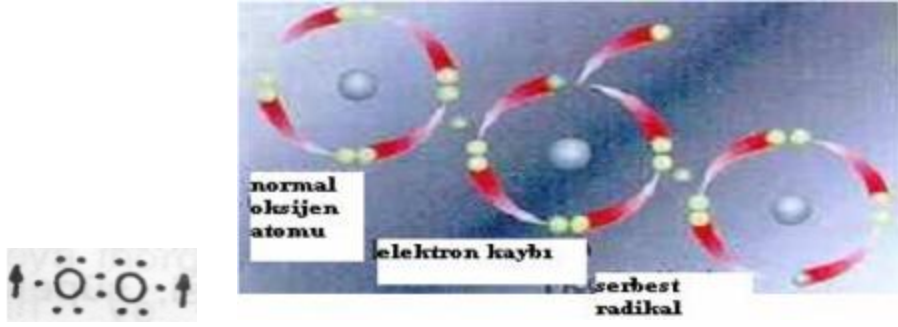
İ/R hasarının fizyopatolojisi tam olarak açığa kavuşmamış, birbiriyle ilişkileri net olarak ortaya konulamamış olsa da, hücrel ve humoral olaylar dizisidir. ROR'lar, kompleman, endotel ve polimorf nüveli lökositler (PMNL) olmak üzere başlıca dört komponent bu olaylar dizisinde etkilidir^{5,13}.

2.3.1 Serbest Oksijen Radikallerinin Rolü

Total oksijen tüketimimizin %90'dan fazlasından elektron transport zinciri (solunum zinciri), %5-10'undan da diğer oksijen gerektiren reaksiyonlar sorumludur. Elektron transport zincirinde moleküler oksijen, yakıtlardan (glukoz, yağ asidi ve amino asitlerin karbon iskeleti) türeyen NADH (Nikotinamid adenindinükleotid) ve $FADH_2$ (Flavinamid adenindinükleotid)'den elektronları alarak suya indirgenir. Bu yolda; oksijen molekülünün kuvvetli oksitleyici gücü, ATP'nin yüksek enerjili fosfat bağı haline dönüştürülür. Moleküler oksijen gerektiren fakat ATP'nin oluşumu reaksiyonuyla eşleşmeyen diğer reaksiyonlar, amino asitlerin katabolizması, ilaçların detoksifikasyonu ve steroid hormonların sentezi gibi spesifik metabolik yollar için önemlidirler. Bu reaksiyonlarda diğer oksidazlar (oksijeni suya veya hidrojen perokside indirgeyen enzimler) ve oksijenazlar (oksijeni okside olan moleküle bağlayan enzimler) görev alırlar⁵.

Moleküler oksijenin özellikleri

Moleküler oksijen (O_2), paralel spin durumlu iki ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektrona sahiptir (Şekil 3).



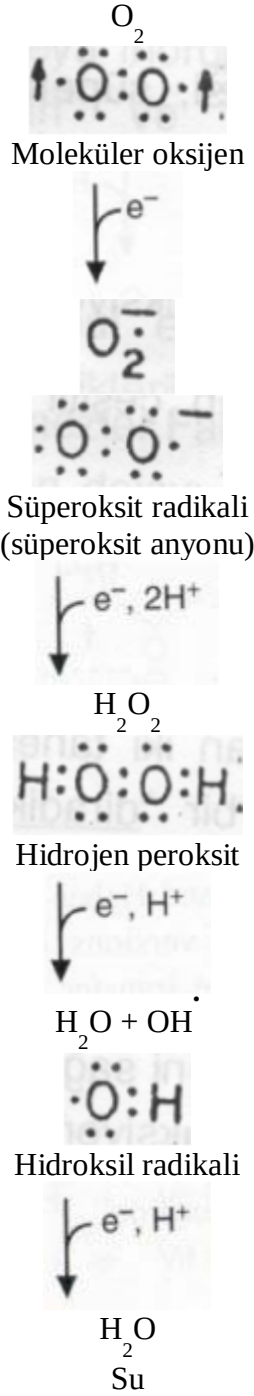
Şekil 3. Moleküler oksijenden serbest radikal oluşumu(Green fast glossary,2007'den alındı)

Ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektron içeren atom, atom grubu veya moleküller **serbest radikal** olarak tanımlanırlar. Ancak Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} ve Mo^{5+} gibi geçiş metalleri de ortaklanmamış elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmezler, fakat serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar. Serbest radikaller pozitif yüklü (katyon), negatif yüklü (anyon) veya elektriksel olarak nötral olabilirler. Serbest radikal tanımına göre moleküler oksijen, bir biradikal (diradikal) olarak değerlendirilir. Biradikal oksijen, radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girdiği halde diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer^{5,13}.

Bir radikal oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle singlet oksijen oluşur. Singlet oksijen, eşleşmemiş elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür, delta ve sigma olmak üzere iki şekli vardır. Organizmada geçiş metallerini (Fe^{2+} ve Cu^{+} gibi metaller) içeren enzimler vasıtasıyla moleküler oksijene tek elektronların transferi suretiyle oksidasyon reaksiyonları meydana gelir. Moleküler oksijen, biradikal doğasının bir sonucu olarak yüksek derecede **ROR** oluşturma eğilimindedir⁵.

Reaktif oksijen türleri

Reaktif oksijen radikalleri; normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan **süperoksit radikali** ($\text{O}_2^{\cdot-}$), **hidrojen peroksit** (H_2O_2) ve **hidroksil radikali** ($\text{OH}^{\cdot}$)'dir (Şekil 4).



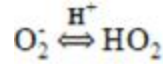
Şekil 4. Serbest radikal oluşumu (Free radical. Halliway and Gutteridge, 1992'den alındı)

Reaktif oksijen türleri, çeşitli serbest radikallerin oluştuğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli organik radikaller ($\text{R}^\bullet$), peroksit radikalleri ($\text{ROO}^\bullet$), alkoksi radikalleri ($\text{RO}^\bullet$), tiyil radikalleri ($\text{RS}^\bullet$), sülfonil

radikalleri ($\text{RSO}^\bullet$), tiyil peroksit radikalleri ($\text{RSO}_2^\bullet$) gibi çeşitli serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar^{4,5,13,16}.

Süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\bullet-}$)

Süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\bullet-}$) hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu, süperoksit radikali oluşumuna neden olur⁵. Süperoksit radikalının kendisi direkt olarak zarar vermez. Bu radikal anyonun asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksit radikali düşük pH değerlerinde daha reaktiftir ve oksidan perhidroksi radikali ($\text{HO}_2^\bullet$) oluşturmak üzere aşağıdaki gibi protonlanır^{4,5,12,13,14,15}.

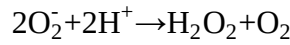


Süperoksit radikali hem oksitleyici hem indirgeyici özelliğe sahiptir. Örneğin ferrisitokrom c ya da nitroblue tetrazolium ile reaksiyonunda indirgeyici olarak davranarak bir elektron kaybeder ve moleküler oksijene okside olur. Kimyasal reaksiyon şöyledir;

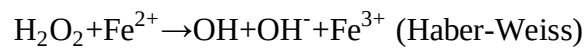
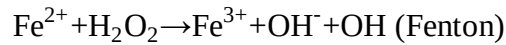
Süperoksit radikali epinefrinin oksidasyonunda oksidan olarak davranarak bir elektron alır ve hidrojen perokside (H_2O_2) indirgenir. Süperoksit radikalının fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit ($\text{NO}^\bullet$) ile birleşmesi sonucu bir reaktif oksijen türü olan peroksinitrit (ONOO^-) meydana gelir. Peroksinitrit, nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-) oluşturmak üzere metabolize edilir. Peroksinitrit, azot dioksit ($\text{NO}_2^\bullet$), hidroksil radikali ($\text{OH}^\bullet$), nitronyum iyonu (NO_2^+) gibi toksik ürünlere dönüşebilir ki nitrik oksitin ($\text{NO}^\bullet$) zararlı etkilerinden peroksinitrit sorumludur^{4,5,14,15,16}.

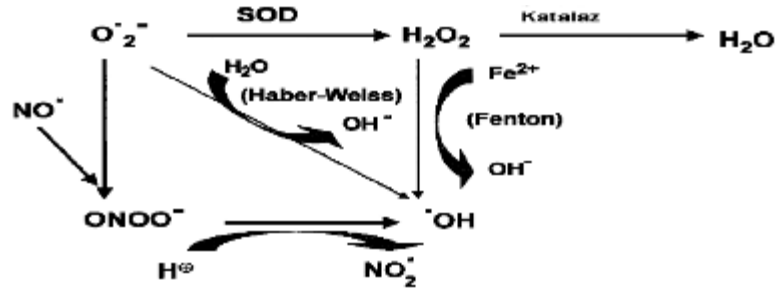
Hidrojen peroksit (H₂O₂)

Hidrojen peroksit (H₂O₂), süperoksidin çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu oluşan peroksitin iki proton (H⁺) ile birleşmesi sonucu meydana gelir. Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi, süperoksidin (O₂^{•-}) dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü, süperoksidin dismutasyonu reaksiyonunda iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni şöyle oluştururlar:



Bu reaksiyon; radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden, dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir, ya spontan gerçekleşir ya da süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenir. Spontan dismutasyon pH 4,8'de en hızlıdır, enzimatik dismutasyon ise spontan dismutasyonun nispeten yavaş olduğu nötral ya da alkali pH'da daha belirgindir. Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen radikali (ROR) kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü Fe²⁺ veya diğer geçiş metallerinin varlığında **Fenton reaksiyonu** sonucu, süperoksit radikalinin (O₂^{•-}) varlığında **Haber-Weiss reaksiyonu** sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali (OH[•]) oluşturur. Bu reaksiyonlar şöyledir (Şekil-5):





Şekil 5. Fenton ve Haber-Weiss Reaksiyonu (Galle,J.Nephrol.Dial.Transplan.2001'den alındı)

Süperoksit radikalinin lipid solubilitesi (yağda çözünürlüğü) sınırlı olduğu halde hidrojen peroksit lipid solubldur. Bu nedenle hidrojen peroksit kendisinin olduğu yerden uzakta olan fakat Fe^{2+} içeren membranlarda hasar oluşturabilir¹³⁻¹⁶.

Hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$)

Hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$), Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda oluşur. Hidroksil radikali son derece reaktif bir oksidan radikaldır, yarılanma ömrü çok kısadır. Hidroksil radikali olasılıkla reaktif oksijen radikallerinin (ROR) en güçlüsüdür. Oluştugu yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak tiyil radikalleri ($RS^{\cdot}$), karbon merkezli organik radikaller ($R^{\cdot}$), organik peroksitler ($RCOO^{\cdot}$) gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasara neden olur¹³⁻¹⁶.

2.3.1.1 Hücrede Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynağı

Hücrede normal metabolik yollardaki enzimatik reaksiyonlarda enzimlerin aktif yerinde ara ürünler olarak devamlı şekilde serbest radikaller oluşabilir. Bazen bu serbest radikal ara ürünler enzimlerin aktif yerinden sızarlar, moleküler oksijenle kazara etkileşirler ve sonuçta reaktif oksijen radikalleri oluşur^{4,5,17}.

Normalde hücrelerde en büyük serbest oksijen radikali kaynağı mitokondriyal elektron transport zincirinden sızıntıdır. Mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgendiği zaman mitokondriyal

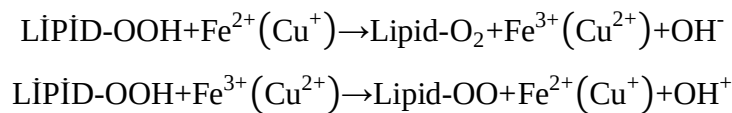
süperoksit radikal üretimi artar. Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda serbest radikal üretimi, membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır. Birçok enzimin katalitik döngüsü sırasında da serbest radikaller ortaya çıkar. Bu enzimlerden biri ksantin oksidazdır. Ksantin oksidaz hasarlanmamış dokularda bir dehidrojenaz olarak vardır, pürinlerin yıkılım yolunda hipoksantinden ksantin ve ksantinden ürik asit oluşumu basamaklarında elektron alıcısı olarak moleküler oksijenden daha çok NAD^+ kullanır. Oksijensizliğe bağlı olarak ADP'nin ATP'ye fosforilasyonunun azaldığı durumlarda (iskemi durumlarında) ADP yıkılır ve pürin bazı, ksantin oksidazın bir oksidaz olarak etkili olmasıyla hipoksantine dönüştürülür. Ksantin oksidazın oksidaz olarak aktivite göstermesi durumunda, hipoksantin ksantine ve ksantin ürik aside dönüşürken moleküler oksijen kullanılmakta, moleküler oksijen hidrojen perokside indirgenmektedir. İskemi durumlarında oksijen seviyesi düşük olduğundan önemli hasar olmaz. Ancak oksijen seviyesi reperfüzyon sırasında normale dönünce iskemi yerinde ksantin oksidaz etkisiyle fazla miktarda hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$) oluşur, bunların etkisiyle de iskemi/reperfüzyon hasarı denen durum ortaya çıkar. Ksantin oksidazın özellikle intestinal mukoza hücrelerinde görülen iskemi/reperfüzyon hasarında önemli faktör olduğu düşünülmektedir^{4,5,13,14,15,17}.

Aldehit oksidaz yapı itibarıyla ksantin oksidaza benzer, substratlarının (enzimin etki ettiği bileşikler) çoğu aynıdır ve süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$) üretir. Dihidroorotat dehidrojenaz, flavoprotein dehidrojenaz, amino asit oksidaz ve triptofan dioksijenaz gibi enzimler de serbest radikal oluşmasına neden olurlar. Peroksizomlar çok önemli hücre içi hidrojen peroksit (H_2O_2) kaynağıdır. Peroksizomlardaki D-amino asit oksidaz, ürat oksidaz, L-hidroksil asit oksidaz ve yağ asidi açıl-CoA oksidaz gibi oksidazlar, süperoksit üretmeden bol miktarda hidrojen peroksit (H_2O_2) üretimine neden olurlar. Ancak peroksizomlarda, hidrojen peroksidin suya ayrışmasını katalizleyen katalaz (KAT) enziminin aktivitesi de çok yüksek olduğundan peroksizomlardan sitozole ne kadar hidrojen peroksit (H_2O_2) geçtiği bilinmemektedir. Organizma hücrelerinde askorbik asit, tiyoller, adrenalin ve flavin koenzimleri gibi bazı bileşiklerin otooksidasyonu da süperoksit radikalının bir başka kaynağıdır. Araşidonik asit metabolizması da reaktif oksijen metabolitlerinin önemli bir kaynağıdır. Fagositik

hücrelerin uyarılması, fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonuna ve plazma membranından araşidonik asidin serbestleşmesine yol açar. Araşidonik asidin enzimatik oksidasyonu da çeşitli serbest radikal ara ürünleri meydana gelirler. Araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine **"enzimatik lipid peroksidasyonu"** denir⁵.

Serbest radikallerle prostaglandin metabolizması birbiriyle yakından ilişkilidir. Reaktif oksijen metabolitleri, fosfolipaz aktivasyonu yoluyla prostaglandin (PG) E_2 , PGF_2 , 6-keto $PGF_{1\alpha}$ ve tromboksan (TX) B_2 sentezini sağlarlar. PGE_2 ve I_2 (prostasiklin) de adenilat siklazı aktive ederek cAMP (Siklik adenosin monofosfat) sentezini arttırmırlar. PGA , PGE_1 ve PGE_2 'nin burun mukozası damarlarında vazokonstriksiyona neden olduğu bilinmektedir^{4,5,13,14,15,17}.

Özellikle demir ve bakır olmak üzere geçiş metalleri, fizyolojik şartlarda elektron alış veriş şeklinde gerçekleşen oksidoredüksiyon reaksiyonlarında görev alırlar. Geçiş metalleri bu özellikleri nedeniyle serbest radikal reaksiyonlarını hızlandıran katalizör vazifesi görürler. Demir ve bakır, tiyollerden tiyil sentezini H_2O_2 ve $O_2^{\cdot-}$ den $OH^{\cdot}$ sentezini katalizlerler. Mn^{2+} nın $O_2^{\cdot-}$ tarafından oksidasyonu Mn^{3+} veya Mn-Oksijen kompleksinin oluşumunu sağlar, bunlar da $O_2^{\cdot-}$ den daha çok oksitleyicidirler. Metal iyonlarının serbest radikal reaksiyonlarındaki asıl önemi lipid peroksidasyonundaki etkileriyle ilgilidir. Geçiş metalleri lipid peroksidasyonunu başlatmaktan çok, sentezlenmiş olan lipid hidroperoksitlerinin (LOOH) parçalanmalarını ve lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonlarını katalize ederler. Böylece daha az zararlı olan radikalleri daha zararlı hale getirirler. Bu zincir reaksiyon şöyledir:



Aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller ve eozinofillerde fagositik solunumsal patlama sırasında da çeşitli serbest radikallerin oluşumuna neden olur. Fagositik lökositler opsonize mikroorganizmalar, C5a kompleman fragmanı, lökotrien B_4 ,

bakteriyel orijinli N-formil oligopeptitler gibi partiküler ya da çözünebilir bir uyarıcıyla uyarıldıklarında lizozomal komponentleri dışarıya vermeye başlarlar ve reaktif oksijen metabolitlerinin oluşumuyla birlikte mitokondri dışında oksijen tüketiminde bir patlama (solunumsal patlama) gösterirler. Fagosit edilmiş bakteri, solunumsal patlama ürünlerinin etkisiyle öldürülür. Ancak bu oksidan ürünler hücrelerin antioksidan savunma güçlerini aştığında normal konak hücrelere zarar verirler ve çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol oynarlar^{4,5,17}.

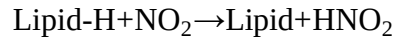
Fagositlerin uyarılması, heksoz monofosfat şantı yoluyla glukozun oksidasyonunda artışa yol açar. Solunumsal patlama sırasında elektron vericisi olarak NADPH kullanılır ve moleküler oksijenin (O_2) süperoksit radikaline ($O_2^{\cdot-}$) indirgenmesi sonucu $NADP^+$ üretimi artar ve heksoz monofosfat yolu aktive olur. Heksoz monofosfat yolunun aktivasyonuna neden olan $NADP^+$ 'nin diğer kaynağı hidrojen peroksidin (H_2O_2) detoksifikasyonundan sorumlu olan glutatyon peroksidaz-glutatyon redüktaz sistemidir. Nötrofiller ve monositlerin primer lizozomal granüllerinde Fe-hem içeren miyeloperoksidaz enzimi bulunur. Çeşitli uyarıcıların etkisiyle fagositler miyeloperoksidaz içeren granüllerini ekstrasellüler aralıktaki fagositik vakuol içine boşaltırlar. Miyeloperoksidaz, hidrojen peroksit (H_2O_2) varlığında klorür, iyodür ve bromürün oksidasyonunu katalizleyerek hipoklorik asit (HOCl), hipoiyodik asit (HOI) ve hipobromik asit (HOBr) oluşturur. Bu bileşikler ve bunların tuzları güçlü oksidanlardır, biyolojik olarak önemli moleküllerle reaksiyona girerek mikroorganizmayı etkileyen toksik ajanlar meydana getirirler^{4,5,13,14,15,17}.

Fagositin kendisi de reaktif oksidanların zarar vermelerine karşı hassastır. Bununla birlikte kendilerini oksidanlarına karşı koruyabilirler. Fagositlerin antioksidan sistemleri, süperoksidi hidrojen perokside dönüştüren süperoksit dismutaz (SOD), hidrojen peroksidi suya indirgeyen katalaz (KAT), hidrojen peroksidi detoksifiye edici glutatyon peroksidaz-glutatyon redüktaz sistemi, antioksidan vitaminlerden α -tokoferol (vitamin E) ve askorbik asit (vitamin C) gibi antioksidanlardır^{5,17}.

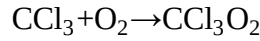
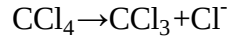
Nötrofillerden toksik ajanların sızıntısı veya sekresyonu, yakın hücrelere ve çözünebilir sistemlere zarar verir. Fagosit kaynaklı oksidanlar ototoksik, immünosupresif ve mutajenik etkiler gösterirler. Örneğin romatoid artritli hastaların diz

eklemlerinde fazla miktarda nötrofil birikir ve bu nötrofillerden ortama salıverilen serbest radikaller eklem hasarını hızlandırırlar. Bazı yabancı toksik maddeler hücrede serbest radikal üretimini artırırılar. Bu maddeler ya doğrudan serbest radikal üretirler ya da serbest radikallerin ortadan kaldırılmasını sağlayan antioksidan aktiviteyi düşürürler. Bu tip maddeler dört grupta toplanabilirler:

- 1) Toksinin kendisi bir serbest radikaldir. Örneğin kirli havanın koyu rengini veren azot dioksit gazı ($\text{NO}_2^\bullet$) böyle bir maddedir. Azot dioksit ($\text{NO}_2^\bullet$) etkili bir lipid peroksidasyonu başlatıcısıdır:



- 2) Toksin bir serbest radikale metabolize olur. Örneğin kuru temizlemede kullanılan toksik bir madde olan karbon tetraklorür (CCl_4), karaciğerde sitokrom p450 tarafından triklorometil serbest radikaline ($\text{CCl}_3^\bullet$) dönüştürülür. Triklorometil serbest radikali de moleküler oksijenle (O_2) etkileşerek peroksil serbest radikali ($\text{CCl}_3\text{O}_2^\bullet$) oluşturur:



Triklorometil serbest radikali ($\text{CCl}_3^\bullet$) ve peroksil serbest radikali ($\text{CCl}_3\text{O}_2^\bullet$) kuvvetli lipid peroksidasyonu başlatıcısıdırılar. Böylece reaktif serbest radikal üretimi karaciğerde antioksidan savunmaları aşar, sellüler membranlarda oksidatif yıkım ve ciddi doku hasarı meydana gelir^{4,5,13,14,15}.

- 3) Toksinin metabolizması sonucu serbest oksijen radikali meydana gelir. Örneğin özellikle karaciğerde biriken paraquat bir serbest radikale indirgendikten sonra tekrar yükseltgenerek rejenere edilirken, oksijen indirgenir ve böylece bol miktarda süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\bullet-}$) üretilmiş olur. Diyabetik bir ajan olan alloksan da paraquat gibi etki eder^{4,5,13,14,15}.

Antikanserojen bir madde olan doxorubicin de DNA replikasyonunu inhibe ederken olasılıkla önemli miktarda süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\bullet-}$) ve hidroksil radikali ($\text{OH}^\bullet$) üretimine neden olur. Birçok endojen bileşiğin ve ksenobiyotiğin hidroksilasyonunu,

endoplazmik retikulum membranında yerleşmiş iki üniteden oluşmuş bir hem proteini olan sitokrom P450 katalize eder. Bu reaksiyonlarda oksijen kaynağı olarak moleküler oksijen kullanıldığı gibi peroksitler (ROOH) de kullanılabilir. Ancak, alkol ve asetonla indüksiyonunda olduğu gibi bazı hallerde sitokrom P450 aşırı miktarda süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) üreten bir izoenzime dönüşür^{4,5,13,14,15,17}.

- 4) Toksin antioksidan aktiviteyi düşürür. Örneğin parasetamolün karaciğerde sitokrom P450 tarafından metabolizması antioksidan aktivitede önemli yeri olan glutatyonla reaksiyona giren bir ürün oluşturarak sonuçta glutatyonun miktarını azaltır^{4,5,13,14,15,17}.

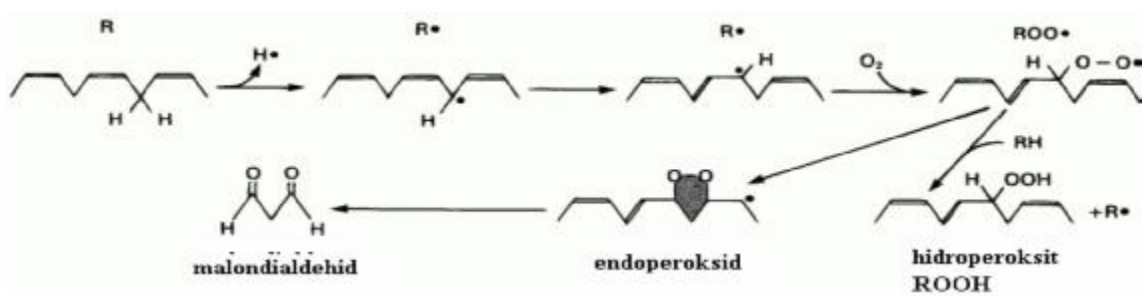
2.3.1.2 Serbest Oksijen Radikallerinin Etkileri

Belirli bir düzeye kadar olabilen oksidan molekül artışı yine vücutta daima belirli bir düzeyde bulunan doğal antioksidan moleküller tarafından etkisiz hale getirilmektedir. Yani sağlıklı bir organizmada oksidan düzeyi ve antioksidanların bunları etkisizleştirme gücü bir denge içindedir. Oksidanlar belirli düzeyin üzerine çıkar veya antioksidanlar yetersiz olursa yani denge bozulursa söz konusu oksidan moleküller organizmanın yapı elemanları olan protein, lipid, karbohidrat, nükleik asitler ve yararlı enzimlerini bozarak zararlı etkilere yol açarlar. Çoğu hastalıklarda artmış reaktif oksijen radikalleri (ROR) hastalığın sebebi değildir, primer bozukluğa ikincil olarak oluşurlar ve ardından patogeneizde yer alırlar¹³.

Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) ve hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) sitoplazma, mitokondri, nükleus ve endoplazmik retikulum membranlarında lipid peroksidasyonunu başlatır. Membranlarda lipid peroksidasyonu meydana gelmesi sonucu membran permeabilitesi artar. Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerdeki sistein sülfhidril grupları ve diğer amino asit kalıntıları okside olarak yıkılır, nükleer ve mitokondriyal DNA okside olur. Reaktif oksijen radikallerinin tüm bu etkilerinin sonucunda hücre hasarı olur. Hücrede reaktif oksijen türlerinin ve serbest radikallerin artışı hücre hasarının önemli bir nedenidir. İskemi sonrasında reperfüzyon da reaktif oksijen türlerinin artışına bağlı olarak iskeminin oluşturduğu hücre hasarını artırır^{4,5,13}.

Serbest radikallerin lipidlere etkileri

Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipid serbest radikalleri ($R^\bullet$) ve lipid peroksit radikallerinin ($ROO^\bullet$) oluşması, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Serbest radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna "**nonenzimatik lipid peroksidasyonu**" denir. Hücre membranlarında lipid peroksidasyonuna uğrayan başlıca yağ asitleri poliansatüre (çoklu doymamış) yağ asitleridir. Lipid peroksidasyonu genellikle yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipid radikali niteliği kazanmasıyla başlar. Lipid radikali ($R^\bullet$) dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Lipid radikallerinin ($R^\bullet$) moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikalleri ($ROO^\bullet$) oluşur. Lipid peroksit radikalleri ($ROO^\bullet$), membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipidperoksitlerine ($ROOH$) dönüşürler ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder (Şekil-6)^{4,5,13}.



Şekil 6. Lipid peroksidasyonu sonucu MDA oluşumu (Mechanisms of Aging, 2006'dan alındı)

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid peroksitlerinin (ROOH) yıkılımı geçiş metalleri iyon katalizini gerektirir. Plazma membranı ve subsellüler organel lipid peroksidasyonu serbest radikal kaynaklarının hepsiyle uyarılabilir ve geçiş metallerinin varlığında artar. Lokal olarak hidrojen peroksitten (H_2O_2) Fenton reaksiyonu sonucu hidroksil radikali ($OH^\bullet$) oluşması zincir reaksiyonunu başlatabilir^{4,5,13}.

Lipid peroksitleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehit (MDA) meydana gelir. MDA kanda ve idrarda ortaya çıkar, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmamakla beraber lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenle biyolojik materyalde MDA ölçülmesi lipid peroksit seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır. Nonenzimatik lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve ürettiği reaktif aldehitlerle indirekt olarak diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece doku hasarına ve birçok hastalığa neden olur^{4,5,13}.

Serbest radikallerin proteinlere etkileri

Proteinler serbest radikallere karşı poliansatüre yağ asitlerinden daha az hassastırlar. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme derecesi amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Bu etki sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşur. Serbest radikallerin etkileri sonunda, yapılarında fazla sayıda disülfid bağı bulunan immünoglobülin G (IgG) ve albümin gibi proteinlerin tersiyer yapıları bozulur, normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Prolin ve lizin reaktif oksijen türleri üreten reaksiyonlara maruz kaldıklarında nonenzimatik hidroksilasyona uğrayabilirler. Hemoglobin gibi hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin süperoksit

radikali ($O_2^{\cdot-}$) veya hidrojen peroksitle (H_2O_2) reaksiyonu methemoglobin oluşumuna neden olur^{4,5,13}.

Serbest radikallerin nükleik asitler ve DNA'ya etkileri

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit (H_2O_2) membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Süperokside ($O_2^{\cdot-}$) maruz kalan DNA molekülleri hayvanlara enjekte edildiklerinde daha fazla antijenik özellik gösterirler ki bu oldukça önemli bir etkidir; örneğin, otoimmün bir hastalık olan sistemik lupus eritematozusta (SLE) ve romatoid artritte dolaşımda anti-DNA antikorlar bulunur^{4,5,13}.

Serbest radikallerin karbonhidratlara etkileri

Serbest radikallerin karbonhidratlara etkisiyle çeşitli ürünler meydana gelir ve bunlar, çeşitli patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar. Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının gelişimi, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, psöriyazis, romatoid artrit, Behçet hastalığı, çeşitli deri ve göz hastalıkları, kanser gibi birçok hastalıkta ve yaşlılıkta serbest radikal üretiminin arttığı, antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu gösterilmiştir. Ancak bu hallerde serbest radikal artışının sebep mi yoksa sonuç mu olduğu tam olarak bilinmemektedir⁵.

2.3.2 Endojen ve Eksojen Antioksidanlar

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler:

- 1) Reaktif oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme **toplayıcı etkidir**. Antioksidan enzimler, trakeobronşiyal mukus ve küçük moleküller bu tip etki gösterirler,
- 2) Reaktif oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme **bastırıcı etkidir**. Vitaminler, **flavanoidler** bu tarz bir etkiye sahiptirler,
- 3) Reaktif oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki **zincir kırıcı etkidir**. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.
- 4) Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması **onarıcı etkidir** ⁴.

Antioksidanlar, endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı olabilirler. Eksojen antioksidanlar, vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olmak üzere sınıflandırılabilirler:

Vitamin eksojen antioksidanlar şunlardır ^{4,5,13} :

- 1) α - tokoferol (vitamin E),
- 2) β -karoten(vitamin A),
- 3) Askorbik asit (vitamin C),
- 4) Folik asit (folat).

İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar şunlardır ^{4,5,13} :

- 1) Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten),
- 2) NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflatuvar ilaçlar, diphenylene iodonium),
- 3) Rekombinant süperoksit dismutaz,
- 4) Trolox-C (vitamin E analogu),
- 5) Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Px aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein),
- 6) Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin),
- 7) Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin),
- 8) Nötrofil adezyon inhibitörleri,
- 9) Sitokinler (TNF ve IL-1),
- 10) Barbitüratlar,
- 11) Demir şelatörleri.

Gıdalardaki eksojen antioksidanlar şunlardır^{4,5,13} :

- 1) Butylated hydroxytoluene (BHT),
- 2) Butylated hydroxyanisole (BHA),
- 3) Sodium benzoate,
- 4) Ethoxyquin,
- 5) Propylgalate,
- 6) Fe-superoxyde dismutase.

Endojen antioksidanlar, enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar:

Enzim olan endojen antioksidanlar şunlardır^{4,5,13} :

- 1) Süperoksit dismutaz (SOD),
- 2) Glutasyon peroksidaz (GSH-Px),
- 3) Glutasyon S-Transferazlar (GST),
- 4) Katalaz (CAT),
- 5) Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi,
- 6) Hidroperoksidaz.

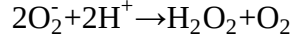
Enzim olmayan endojen antioksidanlar şunlardır^{4,5,13} :

- 1) Melatonin,
- 2) Seruloplazmin,
- 3) Transferin,
- 4) Miyogloblin,
- 5) Hemogloblin,
- 6) Ferritin,
- 7) Bilirubin,
- 8) Glutasyon,
- 9) Sistein,
- 10) Metiyonin,
- 11) Ürat,
- 12) Laktoferrin,
- 13) Albümin.

Biz çalışmamızda örneklerde aşağıdaki antioksidanların seviyesine bakmayı amaçladık.

2.3.2.1 Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz, süperoksit serbest radikalinin($O_2^{\cdot-}$) hidrojen peroksit(H_2O_2) ve moleküler oksijene(O_2) dönüşümünü aşağıdaki reaksiyonla katalizleyen antioksidan enzimdir:



İnsanda süperoksit dismutazın iki izomer tipi bulunmaktadır. Cu-Zn SOD sitozolde bulunur, Cu ve Zn içerir, dimerik yapıdadır, siyanidle inhibe edilir. Mn SOD mitokondride bulunur, Mn içerir, tetramerik yapıdadır, siyanidle inhibe olmaz. Genel olarak hücrede en bol bulunan izomer sitozolik Cu-Zn SOD'dır. SOD'ın fizyolojik fonksiyonu oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikalinin ($O_2^{\cdot-}$) lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerine karşı korumaktır. SOD, fagosite edilmiş bakterilerin intrasellüler öldürülmesinde de rol oynar. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır ve doku pO_2 artışıyla artar. SOD'nin ekstrasellüler aktivitesi çok düşüktür. Cu-Zn SOD'nin spesifik aktivitesi Down sendromlu hastaların eritrositlerinde yüksek, prematürelerin ve yaşlıların eritrositlerinde ve psöriyazisli hastaların lökositlerinde düşük bulunmuştur⁵.

2.3.2.2 Katalaz (KAT)

Katalaz ($H_2O_2:H_2O_2$ oksidoredüktaz) yapısında dört tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Katalaz esas olarak peroksizomlarda daha az olarak sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur. Katalaz hidrojen peroksidi (H_2O_2) suya ve oksijene parçalar. Granulomatöz hücrelerde katalaz, hücreyi kendi solunumsal patlamasına karşı koruma işlevini de görür. Hücrede oluşan hidrojen peroksidi (H_2O_2) hidroksil serbest radikali ($OH^{\cdot}$) oluşumunu önlemek için ortadan kaldırır⁵.

2.3.3 İ/R Hasarında Kompleman, Endotel ve Lökositlerin Rolü

Sitokinler, doğal ve spesifik immünitenin bir protein mediyatör grubudur. Genelde sitokinler bir inflamatuvar veya antijenik etkileşime yanıt olarak sentezlenir. Sitokinler lenfositlerin olgunlaşıp diferansiye olmalarını sağlarlar. Dokuya zarar verebilirler, hatta ölüme kadar (dokunun ölümü) götürebilirler. Travma veya enflamasyonlu bölgede makrofaj ve monositlerden salınan bir sitokin olan interlökin-1 (IL-1) isimli polipeptid cerrahiden sonra gelişen birçok değişiklikten sorumlu bulunmuştur. Bu maddenin başta immün yanıt ve doku tamiri üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir. IL-1 ve Tümör Nekrozis Faktör-alfa (TNF- α), akut ve kronik inflamasyonun birçok lokal ve sistemik özelliklerinin oluşumunda rol oynamaktadır. Düşük dozlarda lokal inflamasyonun mediatörleri iken, yüksek miktarlarda salgılandıklarında dolaşıma geçerek endokrin etkiler oluştururlar. İskemi/reperfüzyon kompleman sistemini aktive eder. Kompleman aktivasyonunun başlangıç dönemi ve mekanizması halen tartışmalıdır ve tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Kompleman aktivasyonu sonucu oluşan, proinflamatuvar komponentler bir yandan lokositleri aktive ederken, diğer yandan TNF- α , IL-1 ve IL-6 oluşumunu uyararak inflamatuvar cevabı güçlendirir¹⁸.

TNF- α , ciddi bir ameliyata bağlı doku travması veya infeksiyonlar sonucu oluşan inflamatuvar kompleks, bir proinflamatuvar sitokin döngüsünün başlamasına neden olur. Bu sitokinler arasında TNF- α , konakçı cevabının oluşumuna yol açan ilk ve en güçlü mediyatörlerden biridir. TNF- α sentezinin kaynağı, periton ve splanknik dokularda çok bulunan monositler, makrofajlar ve T hücreleridir. İç organlardaki cerrahi veya travmatik yaralanmalar, inflamatuvar mediatörlerin oluşumu ve akut faz proteinlerinin yapımı gibi homeostatik cevapların oluşumunda belirgin etkiye sahiptir. Akut travmaya cevap olarak TNF- α salınımı hızlı ve kısa sürelidir. Endotoksin uyarısı ile akut inflamatuvar cevap gelişimini taklit eden deneylerde tümör nekroz faktörünün monofazik bir eğri izlediği, 90 dakikada pik yapıp 4 saat içinde ölçülmeyecek düzeye indiği saptanmıştır. Yarı ömrü 15 -18 dk. olmasına rağmen, TNF'nin kısa süreli ortamda bulunması bile önemli metabolik ve hemodinamik değişikliklerin gelişmesine ve döngünün ileri kısmındaki sitokinlerin aktive olmasına neden olur. TNF üretiminin kısa

sürmesi, ortamda regüle edilemeyecek kadar çok TNF- α aktivitesinin oluşmasını engelleyen efektif endojen mediatörlerin olduğuna işaret eder. TNF yapımı ve aktivasyonunu engelleyen birçok doğal mekanizma bulunduğu gösterilmiştir. Dolaşımda transmembranöz TNF reseptörlerinin (solubl TNF reseptörleri = sTNFR) endojen inhibitörleri saptanmıştır. Bu reseptörlerin kompotetif olarak dolaşımda bulunan fazla TNF'yi sekestrize ederek koruyucu rol aldıkları sanılmaktadır. TNF- α 'nın diğer fonksiyonları arasında; koagülasyonun aktivasyonu, prostaglandin E2, platelet aktive edici faktör (PAF), glukokortikoidler ve eikozanoidlerin salınımının arttırılması sayılabilir^{18,19,20,21}.

İyon ve organik moleküllere geçirgenlikte bariyer oluşturması, prostoglandinlerin dolaşımdan kısmen uzaklaştırılması, akciğerlerde Anjiotensin I'in Anjiotensin II'ye dönüştürülmesi ve koagülasyondaki rolü, endotel hücresinin bilinen klasik görevlerindendir. Endotel hücresinin yukarda sayılan işlevlerine ek olarak, vazomotor etkinlikleri düzenlemesi ve hasara cevap olarak salgıladığı mediyatörler nedeniyle giderek daha fazla ilgi çekmeye başlamıştır. Endotel hücrelerinin oksidatif stresi sonucu kompleman aktive edilir, lökosit adhezyon moleküllerinin üretimi artar. ROR etkisi ile endotelden salınan trombosit aktive edici faktör lökositleri aktive eder. Lökosit endotel hücre etkileşimi sonucu lökositler endotele yapışır ve göç gerçekleşir^{11,14,20}.

İskemi/reperfüzyon lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit endotel hücre adhezyonuna yol açar. Polimorf nüveli lökositler (PMNL) de, endotel hücreleri gibi ROR üretme kapasitesine sahiptir. İ/R hasarında PMNL'in rolü ile ilgili bazı mekanizmalar ileri sürülmüştür. Bunlar;

1. Mikrovasküler oklüzyon;
2. ROR salınması;
3. Sitotoksik enzim salınması;
4. Vasküler permeablite artışı ve
5. Sitokin salınımında artıştır.

Polimorf nüveli lökositlerin başlangıçtaki biyokimyasal reaksiyonları endotel hücreleri ve ksantin oksidaz aracılığı ile olur. Aktivasyon ve migrasyonları ise endotel hücrelerde ve lökositlerde bulunan adhezyon molekülleri aracılığı ile olur. Lökosit adhezyon molekülleri (LAM) lökositlerde ve diğer başka hücrelerde de bulunan ve gelişme, haberleşme, inflamasyon ve apoptosis (programlı hücre ölümü) gibi pek çok

biyolojik olaylarda rol alan yapılardır. Selektin grubu adhezyon molekülleri, doku hasarı olan bölgede aktive olmuş endotele, PMNL'lerin başlangıçtaki adhezyonunda rol alırlar. L, P ve E selektin olmak üzere bilinen üç üyesi vardır. İ/R, endotelde P-selektin ekspresyonunu artırır. Bu molekül, PMNL'lerde bulunan P-selektin glikoprotein 1(PSGL-1) adlı reseptörü ile etkileşerek düşük afiniteli lökosit endotel bağlantısını oluşturur. İkinci aşamada lökosit Beta-2 integrinler ile endotelial intersellüler adhezyon molekülü 1(ICAM-1) arasında etkileşim ile lökosit adhezyon ve agregasyonu gelişir. Üçüncü aşamada platelet endotelial hücre adhezyon molekül 1 ile endotel hücre bağlantıları arasındaki etkileşim ile lökosit transmigrasyonu gelişir. Aktive lökositler ekstrasvasküler kompartmana ulaşınca hasar bölgesine doğru göç etmeye başlarlar (kemotaksis). Burada aktive lökosit cevabı şu mekanizmalarca gerçekleştirilir:

1. Fosfolipaz A2 aktivasyonu sonucu araşidonik asit metabolitleri (prostaglandin ve lökotrienler) üretilir,
2. Degranülasyon sonucu lizozomal enzimler salınır,
3. ROR üretimi gerçekleşir^{11,19,21,22}.

Bu ürünler endotel hasarı ve doku zedelenmesinin güçlü mediyatörleridir ve başlangıçtaki inflamatuvar uyarının etkisini güçlendirir. Bazı durumlarda lizozomal enzimler hücre dışına salınabilir. Hasar yapıcı etkeni ortadan kaldırmaya veya dilue etmeye yönelik bu inflamatuvar cevap sonucu mikrovasküler permeablite artışı, ödem, tromboz ve parankim hücre ölümü de gerçekleşir. Görevini tamamlayan lökositler apoptotik hücre ölümüne uğrarlar ve lenfatik dolaşım ile ortamdan uzaklaştırılırlar^{11,19,21,23}.

2.3.4 Akut Tübüler Nekroz ve Renal İskemi- Reperfüzyon

İskemik hasar akut böbrek yetmezliği (ABY)'nin oluşmasında ve devam etmesindeki tek faktör değildir. Çoğu zaman iskemik hasar kısa süreli olsa bile ABY tablosu gelişmekte ve uzunca bir süre de devam edebilmektedir. Akut tübüler nekroz (ATN) gelişen hastaların böbrek dokuları morfolojik olarak incelendiğinde, nekrozun çoğunlukla olmadığı ya da fokal olduğu belirtilmiştir. Patolojik kesitlerde tübül epitel

hücrelerinin döküldüğü ve bu dökülmelerden dolayı tübül bazal membranlarında yer yer boş alanların olduğu rapor edilmiştir. Nekroz olmaksızın da ölümcül olmayan hasara bağlı ATN tablosu gelişebilir. İskemik hasar sırasında gelişen hücre içi bir dizi metabolik olay çeşitli şekillerde hücre ölümüne sebep olur. Bu değişiklikler arasında ATP eksikliği, hücre içi pH değişiklikleri, intraselüler kalsiyum miktarının artması, serbest radikallerin artması, apoptozis gibi değişiklikler yer alır. ABY vakalarının önemli bir kısmında prerenal ABY söz konusudur. Prerenal faktörlere kısa sürede müdahale edilirse ölümcül olmayan hasarın, apoptozisin veya nekrozun gelişmesi önlenabilir²⁴.

Tübüler hasarın boyutları çoğu zaman nekrozdan çok subletal hasar şeklindedir. Preglomerüler vazokonstriksiyon GFR'nin azalmasındaki en önemli sebep olarak gözükmektedir. Nörohormonal cevabın uyarılması ile renin anjiyotensin aldosteron sistemi (RAS) aktive olur. Sempatik sinir sistemi de aktive olur ve vazopresin salgılanması artar. Afferent ve efferent arteriyollerde vasküler rezistans artar. Glomerüler plazma akımı %30-50 oranında azalır. Katekolaminlerin, anjiyotensin II (AT II) 'nin ve endotelinin seviyeleri artar. Bunun sonucunda vazokonstriksiyon gelişir. Vazokonstriksiyonun erken döneminde kompensatuar mekanizmalar da aktive olur. Başlangıçta, lokal miyenterik refleks, AT-II ve prostaglandin sentezi ile renal kan akımı kompanse edilir. Nitrik oksidin (NO) vazodilatör etkisinin yanı sıra endotelinin etkilerini azaltıcı etkisi de vardır²⁴.

İskemik böbrekte vazokonstriktör maddelerin etkisine karşı aşırı bir hassasiyet ve vazodilatör maddelerin etkisine karşı da bir direnç söz konusudur. Oksijenlenmenin bozulması ile artan intraselüler kalsiyum birikimi afferent arteriyollerdeki direnç artışı ile ilişkilidir. Kalsiyum kanal blokerlerinin kaybolan otoregülasyonu düzeltmesi ve renal sinir inervasyonuna olan sensitiviteyi azaltması bir kanıt olarak sunulmaktadır. Ayrıca intraselüler kalsiyum intraselüler proteazları ve fosfolipazları da aktive ederek hücre nekrozuna sebep olur²⁴.

Hipoksinin devam etmesi ve inflamatuvar cevap, ABY'nin uzama fazında rol oynamaktadır. Her iki olay da medullanın dış kısmında yer almaktadır. Normal fizyolojik şartlarda oksijen basıncı korteksten medullaya doğru inildikçe azalmaktadır. Akut tübüler nekrozun başlangıcındaki iskemik olay düzelse bile kan akımı bozuklukları ATN geliştikten sonra da devam etmektedir. Reperfüzyon sırasında kan

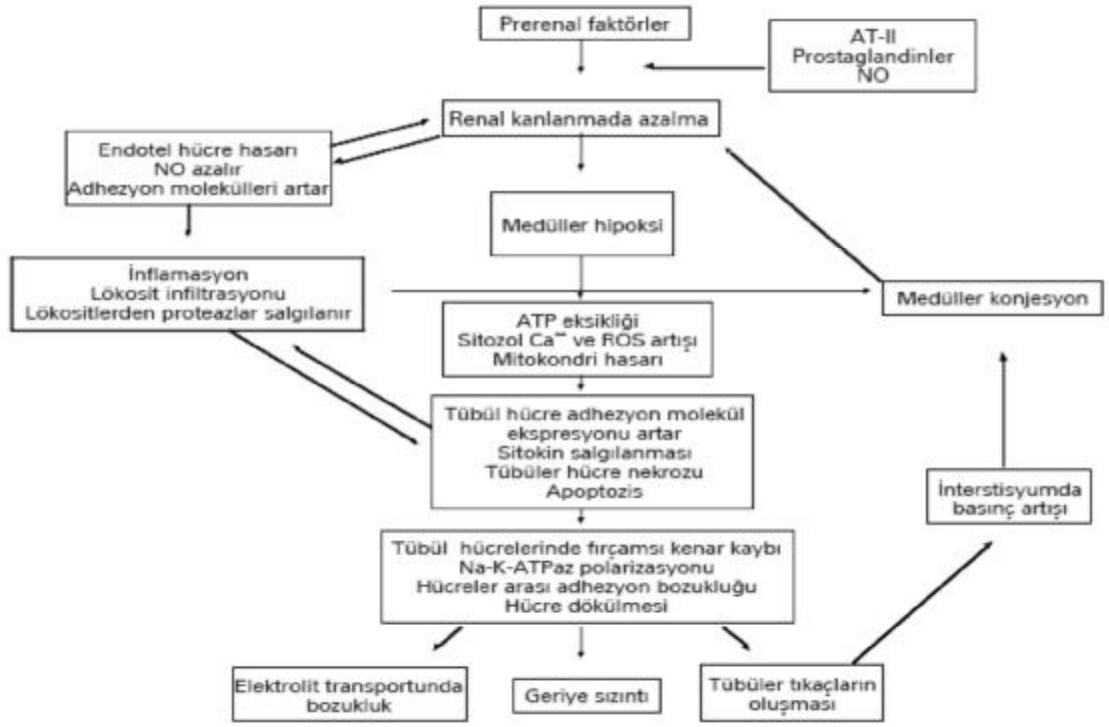
akımında %40-50 oranında azalma devam eder. Kan akımındaki bu azalma tam açıklanamamakla birlikte endojen vazokonstriktörlere karşı antagonistler kullanıldığı zaman kan akımının düzeldiğine dair bulgular rapor edilmiştir. Hayvan modellerinde endotel geçirgenliğinin iskemik ABY sonrasında arttığı bilinmektedir. Gelişen interstisyel ödem kan akımını, medulladaki damarlara bası uygulayarak daha da bozabilmektedir. Plazmanın damar dışına kaçağı sonrası hemokonsantrasyon gelişir ve dolaşım daha da bozulur. Bu durum lökositlerin endotel hücreleri ile karşılaşması olasılığını arttırmaktadır. Eritrositler ve lökositlerin medullada biriktikleri deney hayvanlarında gösterilmiştir. Endotel hücrelerinde P ve E selektin ekspresyonu arttığından, lökositlerin endotel hücrelerine adhezyonu artar. Aynı şekilde interselüler adhezyon molekül-1 (ICAM-1) ekspresyonu da artmaktadır^{11,14,24}.

ICAM-1'e karşı antikorların kullanılması ile iskemiden korunulması, adhezyon moleküllerinin ATN gelişimindeki rolünü göstermektedir¹⁸. Hasarlı endotel hücrelerinin nitrik oksit salgılamaları da bozulmaktadır. Bu olayları takiben lökosit adhezyonu ve infiltrasyonu ile vazokonstriksiyon ve lokal kan akımındaki azalma (konjesyon) bir kısır döngü halinde devam eder. Sonuçta GFR'de azalma ile birlikte subletal hasardan apoptoza ve nekroza kadar gidebilen bir tablo gelişir²⁴ (Şekil-7).

Hücrelerde aktin hücre iskeleti yapısında da bozulma izlenir. Bu bozulma kan akımındaki değişikliklerde de rol oynamaktadır. Hipoksi sırasında intraselüler kalsiyum konsantrasyonu artışına bağlı kalpain (Ca^{+2} bağımlı nötral sistein proteaz) aktivitesi artış gösterir. İskemik renal hasar sırasında da spektrin ve ankirin gibi aktin bağlayıcı proteinlerin bazolateral membrandan sitoplazmaya yöneldiği ve sonra da bu proteinlerin yıkımının arttığı tespit edilmiştir. Tübüler hücrelerde izlenen bu değişiklikler proksimal tübül hücrelerinin fırçası kenarlarının ve hücrelerin bazal membrandan koparak tübül lümenine dökülmesine ve tübül lümeninde tıkanmaya sebep olur²⁴.

Tübüler hasar gelişimindeki bir diğer mekanizma da oksidatif strestir. Özellikle proksimal tübül hücrelerinin metabolik açıdan yoğun olmaları, ATN sırasında mitokondriyal hasar ve intrasitoplazmik kalsiyum artışı nedeniyle, oksidatif moleküller fazla miktarlarda oluşur. Hücre hasarı sırasında oluşan süperoksitten yoğun miktarlarda hidrojen peroksit oluşur. Hidrojen peroksit normalde su molekülüne çevrilebildiği halde hasarlı hücrelerde hidroksil radikallerine de dönüşebilir. Oluşan hidroksil radikalleri

gibi reaktif oksijen radikalleri (ROR) lipid peroksidasyonuna sebep olarak, hücre proteinlerini okside ederek, plazma ve mitokondri membranını bozarak ve DNA'ya hasar vererek hücre zedelenmesine sebep olur^{4,24}.



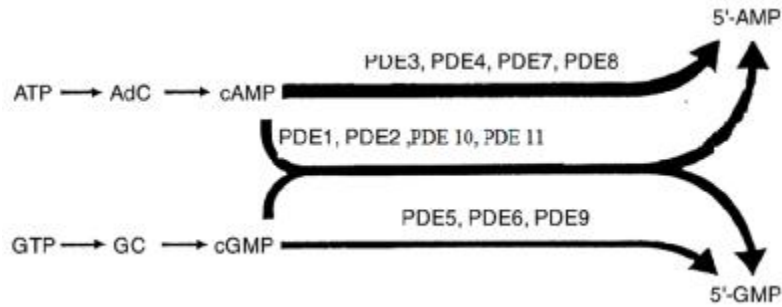
Şekil 7. İskemik ve tübüler ATN patogenezinde rol oynayan faktörlerin şematik görünümü. (Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi 2006:15'den alındı).

İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz (iNOS) da tübüler hasarın gelişmesine katkıda bulunabilmektedir. Hipoksiyle iNOS protein düzeyleri ve NO seviyeleri artmaktadır. Salgılanan NO'nun oksijen radikalleri ile uzaklaştırılması sırasında oluşan peroksinitrit tübül hasarına yol açmaktadır. iNOS blokajı sağlandığında ise lökosit infiltrasyonu ve iskemi-reperfüzyon hasarı engellenebilmektedir. Hemodinamik etkilerinin yanı sıra NO reaktif nitrojen türevlerinin de oluşmasına katkıda bulunarak sitotoksik etki gösterebilir²⁴.

AST (Aspartat amino transferaz) sadece karaciğere özgü bir enzim olmayıp böbrek ve düz kas gibi diğer organlarda da bulunur. Bu enzimin ratlarda, özellikle renal tübüler hasar sonrası yükseldiği, Feilleux ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir²⁵.

2.4 Fosfodiesteraz Ailesi ve Rolipram

Fosfodiesterazlar 11 farklı enzimlerden oluşan büyük multigen ailedir. Siklik nükleotid fosfodiesterazlar (PDE), hücre içinde ikincil habercilerden siklik AMP (cAMP= siklik 3',5'-adenozin monofosfat) ve cyclic GMP (cGMP= siklik 3',5'-guanozin monofosfat)'lerin hidrolizini katalize ederler.²⁶



Şekil 8. Siklik 3' 5' nükleotidlerin etki mekanizması

Siklik AMP'yi hidroliz eden PDE 4 ailesinin kendi içindede 4 subtipi mevcuttur(4A,4B,4C,4D). PDE- 4 A ve D çoğu dokulara dağılmışken, PDE- 4 B, özellikle akciğer, kalp, beyin ve iskelet kasında; PDE – 4 C neonatal ve kısmen de immun ve inflamatuvar hücrelerde yoğunlaşmıştır.²⁷

Çeşitli in vitro ve in vivo çalışmalarda hücrel trafığı regülasyonunu, hücre adezyon molekülü ekspresyonu, mikrovasküler kaçak, SOR ürünleri, inflamatuvar hücrelerden salınan sitokin ve kemokinleri içeren inflamasyon sürecinde, bu enzimlerin anahtar rol oynadığı ortaya konulmuştur²⁸⁻³⁰. Spesifik inhibitörler PDE-4 aktivitesini azalttığında, inflamatuvar ve immunokompetan hücrelerdeki hücre içi cAMP seviyesi artar. Siklik AMP, hücre membranında yerleşmiş bulunan adenil siklaz enziminin katalitik etkisiyle adenosin trifosfat (ATP)'tan sentezlenen ve fosfodiesteraz enziminin etkisiyle 5' -Adenosin mono fosfat'a (5' -AMP) dönüşerek inaktif hale gelen çok önemli hücre içi bir nükleotiddir^{31,32}.

Yükselmiş cAMP seviyeleri inflamatuvar alanda tümör nekroz faktör 1 ve interlökin 2 gibi kemokin üretimi ve hücre adezyon molekülü ekspresyonu ile ilişkili

potent proinflatuar sitokinlerin salınmasını azaltır. Rolipram(Sigma, Aldrich, R6520) akciğer³³, mide³⁴ ve barsak iskemi-reperfüzyon hasarı³⁵ ve lipopolisakkarid ile indüklenen üveiti³⁶ de içeren çeşitli deneysel ROS ilişkili doku hasarı modellerinde etkin olduğu bulunan selektif bir PDE-4 inhibitorudur. Rolipram aynı zamanda anti depresan özelliğe sahip olmakla beraber damarsal bozuklukların tedavisinde de kullanılır.³⁷ Çalışmamızda rolipram kullanarak iskemi reperfüzyon hasarında böbrek üzerinde koruyucu etkisini araştırdık.

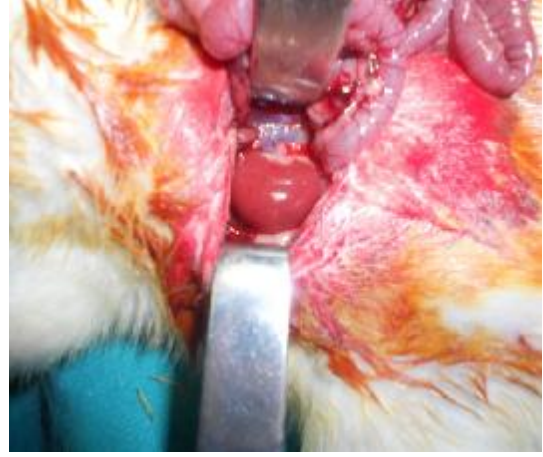
3 GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada Wistar Albino cinsi, ağırlığı 150-250 gr arasında değişen 4-5 aylık 30 adet dişi sıçan kullanıldı. Hayvanlar Çukurova Üniversitesi Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (TIBDAM) kontrollü ortamdaki standart sıçan kafesleri içinde her kafeste en çok yedi veya sekiz sıçan olacak şekilde barındırıldı ve tüm işlemler 1986 Uluslararası Strasbourg Hayvan Hakları Evrensel Beyannamesi koşullarına uygun olarak, Etik Kurul onayı ile veteriner hekim kontrolünde gerçekleştirildi. Sıçanlar, kemirgenlere özel palet yem ve su ile beslendi. Hayvan atıklarının uzaklaştırılması, su ve yemlerinin sağlanması, kafeslerinin temizlenmesi ve kontrolü merkezin veteriner hekimi ve deneyimli personelleri tarafından yapıldı.

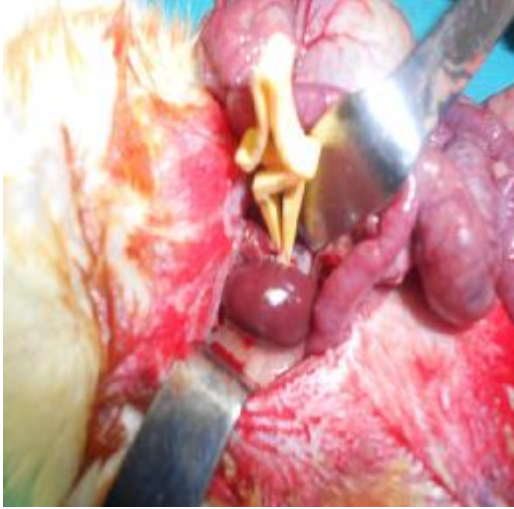
Sıçanlara anestezi için % 2'lik ksilazine hidroklorür (Rompun) 6mg/kg ve ketamin hidroklorür (Ketalar) 75 mg/kg kombinasyonu intraperitoneal olarak uygulandı. Sıçanlar karın bölgeleri traş edildikten sonra supin pozisyonda ameliyat masasına yatırıldı (Şekil 9). Rolipram intraperitoneal 1mg/kg olacak şekilde uygulandı⁴⁷. Orta hat kesiyle karın içine ulaşıldı ve eksplorasyonda sağ renal arter ve ven bulundu (Şekil-10). Ardından sağ renal pedikül, mikrovasküler klemple oklüze edildi ve pulsasyon olmayışı ile arterial kan akımının durduğu teyid edildi (Şekil- 11). Otuz dakikalık iskemi sonrası mikrovasküler klemp açılarak arteriovenöz akımın tekrar başladığı, böbreğin renginin açılması ve pulsasyonun başlaması ile teyid edildi. Batın 2-0 ipek dikişle yaklaştırıldı. Yirmidört saat sonra sağ nefrektomi (Şekil- 12) uygulanıp çıkarılan böbrek dokusunun yarısı serum fizyolojik içine konulup biokimyasal inceleme için alındı. Diğer yarısı ise içerisinde formaldehit bulunan flakonlara konulup histopatolojik inceleme için alındı.



Şekil 9. Anestezi uygulanmış sıçan



Şekil 10. Böbrek pedikülü ortaya konulan sıçan



Şekil 11. Klemp konulmuş böbrek pedikülü



Şekil 12. Nefrektomi uygulanmış sıçan

3.1 Çalışma grupları

Sıçanlar her biri 6'şarlı 5 gruba ayrıldı ve şu yöntem izlendi:

Grup 1 (Kontrol grubu): Sadece laparotomi yapıp, sağ nefrektomi uygulandı. Batın 2-0 ipek dikişle yaklaştırıldı.

Grup 2 (İ/R grubu): Laparotomi yapıp, renal pedikül bulunup, 30 dk klemp konuldu. Klem açıldıktan 24 saat sonra sağ nefrektomi yapıldı. Batın 2-0 ipek dikişle yaklaştırıldı.

Grup 3 (İ/R+ ilaç grubu 1): Renal pedikül klemplenmeden 30 dakika önce rolipram intraperitoneal verildi. Daha sonra laparotomi yapıp, renal pediküle 30 dk klemp konuldu. Klemp açıldıktan 24 saat sonra sağ nefrektomi yapıldı. Batın 2-0 ipek dikişle yaklaştırıldı.

Grup 4 (İ/R + ilaç grubu 2): Laparotomi yapıp, renal pedikül klemplenme esnasında rolipram intraperitoneal verildi. Klemp süresi 30 dk. Klemp açıldıktan 24 saat sonra sağ nefrektomi yapıldı. Batın 2-0 ipek dikişle yaklaştırıldı.

Grup 5 (İ/R+ ilaç grubu 3) : Laparotomi yapıp, renal pediküle 30 dk klemp konuldu. Klemp açıldıktan 30 dk sonra rolipram intraperitoneal verildi. 24 saat sonra sağ nefrektomi uygulandı. Batın 2-0 ipek dikişle yaklaştırıldı.

3.2 İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS 18.0 paket programı kullanıldı. Kategorik ölçümler sayı ve yüzde olarak, sayısal ölçümlerse ortalama ve standart sapma (gerekli yerlerde ortanca ve minimum - maksimum) olarak özetlendi. Kategorik ölçümlerin gruplar arasında karşılaştırılmasında Ki Kare test istatistiği kullanıldı. İki'den fazla grubun sayısal ölçümlerinin genel karşılaştırılmasında Tek Yönlü Varyans Analizi kullanıldı. Bu analizde anlamlı bulunan sayısal ölçümler için ikili alt grup karşılaştırmaları Bonferroni analizi ile yapıldı. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi 0.05 olarak alındı.

3.3 Histopatolojik inceleme

3.3.1 Hematoksilen Eozin (H&E) Kesitlerin Hazırlanması ve Değerlendirilmesi

Yüzde 10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edilerek gönderilen böbrek dokularından rutin doku takip işlemlerini takiben parafin bloklardan Hematoksilen

Eozin boyalı preperatlar hazırlandı. Tüm gruplara ait her bir H&E boyalı preparatta tübüler nekroz ve inflamasyon aşağıda belirtildiği şekilde değerlendirildi³⁸:

Tübüler nekroz, nekrozun yaygınlığına göre;

0: Normal

1: %5'in altında (minimal)

2: %5-25 arası (hafif)

3: %25-75 arası (orta)

4: %75'in üstü (ağır) ,

İnflamasyon, böbrek parenkimindeki yoğunluğuna göre:

0: Normal

1: Minimal

2: Hafif

3: Orta

4: Ağır olarak değerlendirildi.

3.3.2 İmmünohistokimyasal olarak Apop Tag (Kod: S-7101 Milipore 40 testlik) Hazırlanması ve Değerlendirilmesi

Yüzde 10'luk formaldehitte tespit edilen dokular; otomatik doku takip cihazında takip edildikten sonra dokular parafine gömülerek blok dökme işlemi tamamlandı. Parafine gömülü dokular; mikrotom cihazında 3-4 µm kalınlığında kesildi ve 56 °C'de su banyosundan Polysineli Lamlara alındı ve 60°C lik etüvde 30-45 dakika bekletildi. Daha sonra oda ısısına alınarak;

Dokular 3 ayrı ksilol (xylene) de 10'ar dakika tutuldu.

Dokular 3 ayrı alkolde (%95 lik) 10'ar dakika tutuldu.

Çeşme suyunda iyice yıkandı. Distile suda yıkanarak deparafinize işlemi tamamlandı.

- Dokular PBS'de (Phosphate Buffer saline Ph:7,4) 2-3 dakika bekletildi.
- Doku çevresi kağıt havlu ile silinerek fazla sıvısı alındı.

- Doku üzerine Proteinaz K damlatılarak oda ısısında 30 dakika inkübe edildi. (DBS KO30 kullanıldı. **Çalışma için:**100 µl-stok Proteinaz K+ 2400 µl. PBS ilave edilerek hazırlandı)
- Dokular PBS de 3 ayrı şalede 2 şer dakika yıkandı.
- Doku çevresi kağıt havlu ile silinerek fazla sıvısı alındı.
- Doku üzerine PBS’li % 3 lük H₂O₂ damlatılarak 5 dakika inkübe edildi.
- Dokular PBS ’ de 3 ayrı şalede 2-3 dakika yıkandı.
- Doku çevresi kağıt havlu ile silinerek fazla sıvısı alındı.
- Doku üzerine 5 cm² için 75 µl’lik Equilibration Buffer (-20 °C) damlatıldı. Oda ısısında 3-5 dakika bekletildikten sonra üzerindeki Equilibration buffer direk süzüldü ve doku çevresi kağıt havlu ile silinerek fazla sıvısı alındı.
- Doku üzerine 5 cm² için 55 µl Tdt enzimi damlatıldı. 37 °C de 60 dakika inkübe edildi.(385 µl reaction Buffer+165µl Tdt enzyme= 550 µl 5 cm² için 10 testlik)
- Doku üzerindeki fazla solüsyon süzülerek direk birinci stop-wash Buffer solüsyonu bulunan şalede oda ısısında 15-20 saniye çalkalandı.
- Direk ikinci stop/wash Buffer solüsyonu bulunan şalede oda ısısında 10 dakika inkübe edildi. Bu aşamada beklenirken Anti-Digoxigenin Conjugate oda ısısına getirildi.
- Dokular stop-wash Bufferden PBS ye alınarak 3 ayrı şalede 2-3’er dakika yıkandı.
- Doku çevresi kağıt havlu ile silinerek fazla sıvısı alındı.
- Doku üzerine 5 cm² için Anti-Digoxigenin Conjugate 60 µl damlatılıp oda ısısında 30 dakika inkübe edilir.
- Dokular 4 ayrı PBS şalesinde 2’şer dakika yıkandı ve doku çevresi kağıt havlu ile silinerek fazla sıvısı alındı.
- Doku üzerine DAB solüsyonu damlatılarak 3-6 dakika inkübe edildi.

(DAB Hazırlanışı:1470 µl DAB Buffer+30 µl DAB substrate=1500 µl Total)

- Renk oluşumu olan preparatlar direk distile suya alınarak yıkandı.
- Dokular % 0,5’lik Methyl Green içinde 10 dakika inkübe edilerek karşıt boyama işlemi yapıldı.
- Distile suda yıkandı.

- % 100'lük N-Butanol (1- Butanol) ile 1-2 kez çalkalandıktan sonra kurutuldu.
- Ksilolde 10 dakika bekletildikten sonra entellan (Permount) ile kapatıldı.
- Hazırlanan preperatlarda, ışık mikroskopunda x40 büyütmede, 20 büyük büyütme alanında pozitif boyanan nükleuslar sayıldı.

3.4 Biokimyasal inceleme.

3.4.1 Katalaz

Katalaz tayini spektrometri (Shimadzu UV- 260, Japonya) esasına dayalı katalaz kitiyle (Sigma, ABD) ölçülmüştür ³⁹. Kitin çalışma yöntemi aşağıda ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

Ayırıcılar.

Potasyum fosfat tamponu (pH 7,0) 500 mM

Kromojen ayıraç

Sodyum asid çözeltisi (Durdurma çözeltisi) 15 mM

Katalaz pozitif kontrol

Timol % 0,1

Protein 30-50 mg/mL

3-10x10⁶ Ü*/mL aktivite içerecek şekilde hazırlanır.

UV substrat çözeltisi**

Hidrojen peroksit 20mM

Hidrojen peroksid çözeltisi % 3

Peroksidaz

25 °C ve pH 5.0'da substrat olarak ABTS kullanımıyla ölçülen her mg katı madde başına 800-1200 Ü olacak şekilde hazırlanır.

Enzim sulandırma tamponu

Potasyum fosfat tamponu (pH 7,0) 50 mM

TRITON X-100 %0.1

Örnek hazırlanışı

Sıçan böbrek dokusu 1 x çalışma tamponu (1 mL) eklenerek homojenizatör (Heidolph 50110) ile parçalanmıştır. Her bir sıçan böbreği örneği için reaksiyonda kullanılacak hacim ve sulandırma aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Katalaz ölçümünde gereken örnek hazırlanışı için hacim ve sulandırma

Doku	Protein derişimi için gereken sulandırma miktarı	Reaksiyon karışımına eklenen hacim	Reaksiyon süresi(dakika)	Her reaksiyon için ΔA_{520} aralık (kör-örnek)
Kör	-	-	-	1.20-1.32 (başlangıç A_{520})
Sıçan böbreği	0.3 mg/ml	5-10 μ L	3 dak	0.28-0.57
Katalaz standartı	10.000-katı	2-4 μ L	1 dak	0.36-0.71

UV ölçüm reaksiyonu.

Bu ölçüm kinetik olarak 240 nm’de hidrojen peroksidin absorpsiyonunun azalmasının spektrofotometrik takibine dayanır. Bu çalışma hidrojen peroksid konsantrasyonunun (10 mM) sistemdeki K_m ’sinin (1,2 M) çok düşük olmasından dolayı çok kısa zaman dilimi (30 saniye) içinde gerçekleşir.

Ölçüm reaksiyonu oda ısısında gerçekleşir (yaklaşık 25 °C). Çalışma kinetiği aşağıdaki değişkenleri içermektedir.

Başlangıç gecikme = 3saniye

Aralık = 5 saniye

Okunmalar = 7 saniye

Katalaz enzim reaksiyonu:

1. Örnek yukarıda anlatılan şekilde hazırlandıktan sonra kuvartz küvete konulur.
2. Kuvartz küvete 1x çalışma tamponundan 490 μ l küvete eklenip iyice alt üst edilerek karıştırılır.
3. 0.5 ml UV substrat çözeltisi eklenerek iyice alt üst edilerek karıştırılıp reaksiyon başlatılır.
4. 30 saniye süreyle A_{240} ’daki düşüş ölçülür.

Not: Başlangıç $A_{240} \approx 0.500$ olmalıdır.

Tablo 2. UV katalaz enzim reaksiyon şeması

	Örnek hacmi	1 x çalışma tamponu	20 mM H_2O_2 çözeltisi
Kör	0	500 μ L	500 μ L
Örnek	10 μ L	490 μ L	500 μ L

Hesaplanması:

$$\ddot{U} \text{ nite/ml} = \frac{\left[\frac{\Delta A}{\text{dak(kör)}} - \frac{\Delta A}{\text{dak(örnek)}} \right] * d * l}{V * 0,0436}$$

d= katalaz reaksiyonu için olan örnekte orijinal sulandırma

V=Katalaz reaksiyonunda örnek hacmi

0.0436= 10^{-4} M hidrojen peroksit

l= ml'deki reaksiyon hacmi

* $\ddot{U}$, Bir ünite katalaz substrat konsantrasyonu 50 mM olan hidrojen peroksidi, pH 7.0 ve 25 °C' sıcaklıkta bir dakikada 1 mikromol hidrojen peroksidi oksijen ve suya ayırır.

** UV dalga boyu ölçümlerinde kullanılır.

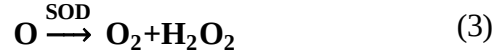
3.4.2 Süperoksit Dismutaz Tayini

Prensip: Süperoksit Dismutaz (SOD), oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan toksik süperoksit radikallerinin ($O_2^{\cdot-}$) hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandırır. Bu yöntem, ksantin ve ksantin oksidaz (XOD) kullanılarak oluşturulan süperoksit radikallerinin, 2-[4-iyodofenil]-3-[4-nitrofenol]-5-feniltetrazolium klorit (p-iyodonitrotetrazolium viyole: INT) ile meydana getirdiği kırmızı renkli

formazan boyasının 505 nm dalga boyunda verdiği optik dansitenin (OD) okunması esasına dayanmaktadır. Örnekte bulunan SOD, süperoksit radikallerini ortamdan uzaklaştırarak 2 numaralı formazan tepkimesini inhibe eder. Sonuçta oluşan kırmızı rengin OD'si SOD yokluğunda oluşan renge göre azalır. Bu aradaki farkın belirlenmesiyle SOD aktivitesi ölçülür⁴⁰.



Veya



Ayırıcılar:

1. CAPS (3-(sikloheksilamino)-1-propan sülfonik asit) Tamponu

CAPS(pH 10,2) 50,00 mmol/L

EDTA 0,94 mmol/L

CAPS tamponu 2-8°C'da saklanmalıdır.

2. Stok Substrat karışımı

Ksantin 1,0 mmol/L

INT 0,5 mmol/L

Substrat karışımı CAPS tamponuyla hazırlanmakta olup 2-8°C'da 10 gün süreyle dayanıklıdır (Örnek 0,00152 g ksantin ve 0,00253 g INT 10 mL CAPS tamponunda çözülür.).

3. Günlük Substrat Karışımı

0,05 mM Ksantin ve 0,025 mM INT hazırlamak amacıyla stok substrat karışımından 1 mL alınıp 19 mL CAPS ile sulandırılır (1/20).

4. Ksantin Oksidaz (80 U/L)

Redistile su ile hazırlanır. 2-8°C'da saklandığında 2 hafta dayanır.

5. 0,01 M Fosfat Tamponu (pH 7,0)

6. Standart (S₆)

Derişimi 5,6 Ü/mL olacak şekilde hazırlanmış SOD çözeltisidir. Bu liyofilize ayıraç 10 mL bidistile su ile sulandırılır. Standart eğri çiziminde kullanılacak olan diğer SOD derişimleri ise fosfat tamponuyla aşağıdaki tabloda verildiğı şekilde hazırlanmalıdır. 2-8°C'da saklandığında 2 hafta dayanır.

Tablo 3. SOD derişim hazırlanış şekli

Standart	Kullanılacak Standart ve Hacmi	Eklenecek Fosfat Tamponu Hacmi	Derişim (U/mL)
S ₅	5 mL S ₆	5 mL	2,8
S ₄	5 mL S ₅	5 mL	1,4
S ₃	5 mL S ₄	5 mL	0,7
S ₂	3 mL S ₃	6 mL	0,23

S₁ kör olup sadece fosfat tamponu içermektedir.

Örneğın Hazırlanması:

EDTA'lı veya heparinli tam kan 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek üstteki plazma atılır. Daha sonra eritrositler 3 mL %0,9'luk NaCl ile 4 kez yıkanır. Her yıkamadan sonra süspansiyon 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek eritrositler ayrılır. Yıkanmış eritrositler'den 0,5 mL alınarak soğuk redistile su ile 2,0 mL'ye tamamlandıktan sonra karıştırılır. +4°C'da 15 dakika bekletilir. Oluşan lizat, 0,01 M fosfat tamponu (pH 7,0) ile seyreltilerek yüzde inhibisyon %30-60 arasına düşürülür. Lizatın, insan örnekleri için 20 kez (seyreltme faktörü= 80) ve sığır örnekleri için 50 kez (seyreltme faktörü= 200) seyreltilmesi önerilmektedir.

Yöntem:

Ayıraçlar, 1 cm ışık yoluna sahip küvetler içine aşağıdaki tabloda gösterildiğı gibi konulur.

$$\% \text{ inhibisyon} = 100 - \frac{\Delta A_{\text{Örnek/dk}} * 100}{\Delta A_{\text{ÇalışmaKörü/dk}}}$$

Tablo 4. SOD ölçümü için kullanılacak ayraçlar

	Çalışma Körü	Standart	Seyrelmiş Örnek
Seyrelmiş örnek(mL)	-	-	0,05 (0,025)
Standart(mL)	-	0,05 (0,025)	-
Fosfat tamponu(mL)	0,05 (0,025)	-	-
Substrat Karışımı(mL)	1,70 (0,850)	1,70 (0,850)	1,70 (0,850)
Küvetler iyice karıştırılır.			
Ksantin Oksidaz(mL)	0,25 (0,125)	0,25 (0,125)	0,25 (0,125)

Tekrar karıştırıldıktan 30 saniye sonra çalışma körünün, standartın ve örneğin 37°C, 505 nm dalga boyunda havaya karşı başlangıç absorbensları (A_1) okunur. Aynı anda kronometre çalıştırılarak 3 dakika sonra son absorbensları (A_2) tekrar okunur.

Yorum ve Hesaplama:

Çalışma körüne ait değer inhibisyona uğramış tepkime olarak kabul edilir ve değeri %100 olarak alınır. Tüm standart ve örnekler için % inhibisyon değeri ise bunlara ait değerlerin çalışma körüyle oranlanarak 100'den çıkarılması sonucu hesaplanır.

Standart hazırlama tablosunda verilen tüm standart derişimleri, ayrı ayrı çalışılarak yüzde inhibisyon değerleri hesaplanır. Daha sonra, X (yatay) eksenine standart SOD derişimlerinin (U/mL) logaritmik dönüşüm değerleri, Y (dikey) eksenine standartlara ait % inhibisyon değerleri yerleştirilerek bir standart eğri grafiği çizilir.

$$\Delta A/\text{dakika} = \frac{A_2 - A_1}{3 \text{ dakika}}$$

$$\% \text{ inhibisyon} = 100 - \frac{\Delta A_{\text{Std/dk}} * 100}{\Delta A_{\text{ÇalışmaKörü/dk}}}$$

Örneğe ait hesaplanan yüzde inhibisyon değerine karşılık gelen SOD değeri ise bu eğri kullanılarak bulunur. Tam kan SOD aktivitesi (U/mL), eğriden bulunan bu değerlerin seyreltme faktörüyle çarpımı sonucu elde edilir. SOD aktivitesinin U/gHb biriminden belirtilmesi ise aşağıdaki şekilde hesaplanarak bulunur.

$$\text{SOD aktivitesi (U/gHb)} = \frac{\text{Örneğin SOD aktivitesi (U/mL)}}{\text{Hemolizatın Hb Değeri (g/dL)}}$$

Doğrusal çalışma alanı içinde kalabilmek için örnekler, çalışma körüne ait değerler %30-60 arasında inhibisyon verecek şekilde seyreltilmelidir.

Referans değerler her laboratuvar tarafından belirlenmelidir.

3.4.3 Malondialdehit (MDA) Ölçüm Yöntemi

Prensip: Malondialdehit lipid peroksidasyonunun sekonder ürünü olup , lipitlere ait peroksidasyonun belirlinmesinde kullanılan önemli bir parametredir. Malondialdehit, aerobik koşullarda pH 3.4’ te tiyobarbitürik asit ile 95°C’de inkubasyonu sonucunda pembe renkli bir kompleks oluşturur. Pembe reng 532 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülür⁴¹.

Ayırıcılar

%8 ‘lik Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)

%20’lik Asedik Asit (CH₃COOH)

Doymuş NaOH ile pH 3’5’e ayarlanır.

%0,8’lik Tiyobarbitürik Asit (TBA)

Doymuş NaOH ile pH 3’5’e ayarlanır

n-Butanol /Pridin Çözeltilisi(15/1)

n-Butanol 14 ml

Piridin 1 ml

Günlük olarak hazırlanır

Stok Standart

1,1,3,3-Tetrametoksipropan (Yoğunluk 0,997 g/dL)

Standart Eğri Çizimi

Stok standarttan 10 µL alınıp,100 mL’ye saf su ile tamamlanır.

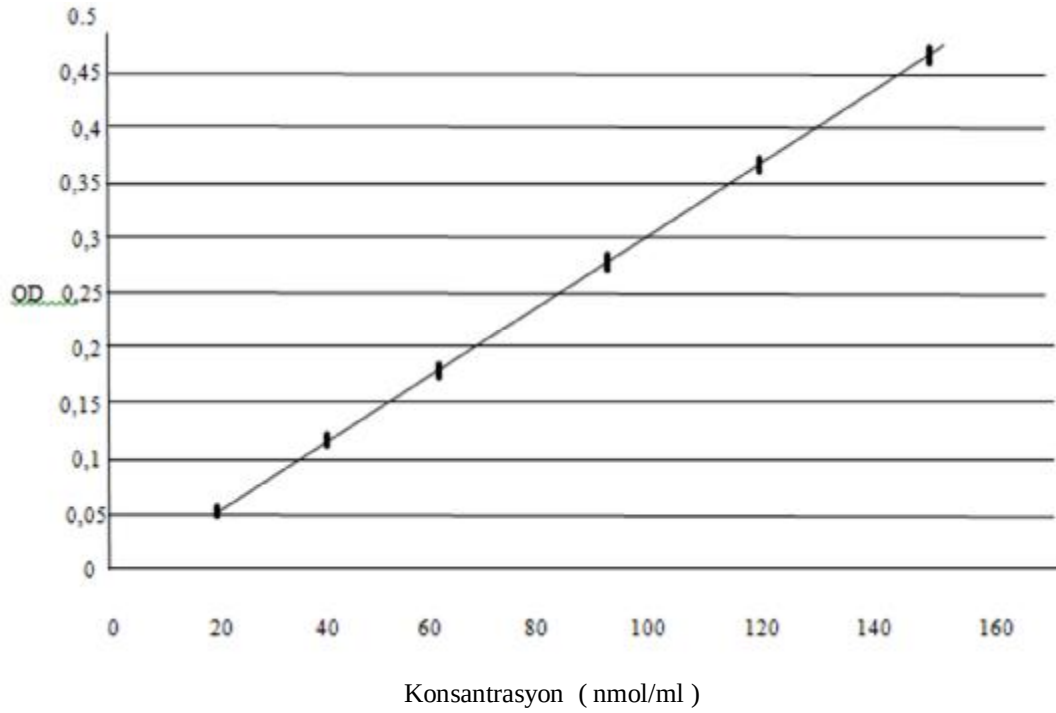
Hazırlanan stok standarttan 1/4, 1/5, 1/7, 1/10, 1/20, 1/40 derişimlerinde günlük standartlar hazırlanır.

Tablo 5. Standart eğri çizimi için gereken günlük standartlar

Tüp no	1. Tüp Kör	2. Tüp ¼	3. Tüp 1/5	4. Tüp 1/7	5. Tüp 1/10	6. Tüp 1/20	7. Tüp 1/40
Derişim (nmol/mL)	0	151,7	121,4	86,7	60,7	30,3	15,1
Standart (mL)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
% 8 SDS(mL)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
% 20 CH ₃ COOH(mL)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
% 0,8 TBA(mL)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Saf Su	0,8	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7

95°C’de 30 dakika inkubasyondan sonra ,musluk suyunda soğutularak üzerine n-Bütanol/Piridin karışımı ilave edilerek karıştırılır.

Saf Su (mL)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
n-But/Pri (mL)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0

**Şekil 13. MDA Standart Eğrisi**

2000 g’de 10 dakika santrifüj işleminden sonra üstteki organik kısım alınarak 532 nm’de absorbans okunur. Standart eğri çizilir

Örnek ölçümü:

Örnek çalışması aşağıdaki tabloda belirtildiği biçimde hazırlanarak uygulanır.

Tablo 6. MDA örnek çalışması için gereken ayraçlar

Tüp no	Kör	Standart 1/7	Örnek
Derişim (nmol/mL)	-	0,1	-
Plazma (mL)	-	-	0,1
% 8 SDS(mL)	0,2	0,2	0,2
% 20 CH ₃ COOH(mL)	1,5	1,5	1,5
% 0,8 TBA(mL)	1,5	1,5	1,5
Saf Su	0,8	0,7	0,7

Tüplerin içindeki çözeltiler karıştırılarak, 2000 g'de 10 dakika santrifüj edilir ve üstteki organik faz alınarak 532 nm'de okuma yapılır.

Hesaplama: 532 nm dalga boyunda okunan örnekler iki şekilde değerlendirilebilir; standart eğriden karşılaştırılarak derişimleri nmol/mL olarak hesaplanır. Bu çalışmada ikinci bir değerlendirme olan;

$$\frac{\text{Örnek OD}}{\text{Std.OD}} * \text{Std Derişim}$$

formülü kullanılmıştır.

4 BULGULAR

4.1 Biyokimyasal Değerlendirme

4.1.1 Biyokimya sonuçlarının istatistikleri

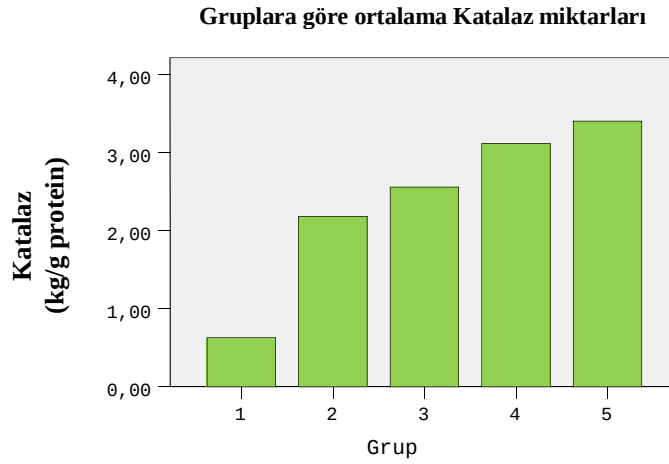
Tanımlayıcı istatistikler

Yapılan çalışmada her grupta 6 sıçan olmak üzere 5 farklı gruba ayrı ayrı yöntemler uygulanmış ve bu yöntemler sonucunda elde edilen Katalaz, MDA, SOD değerleri incelenmiştir.

Tablo 7. 5 grup için ortalama Katalaz, MDA ve SOD değerleri (Grup ortalamaları ve güven aralıkları %95 güven düzeyinde)

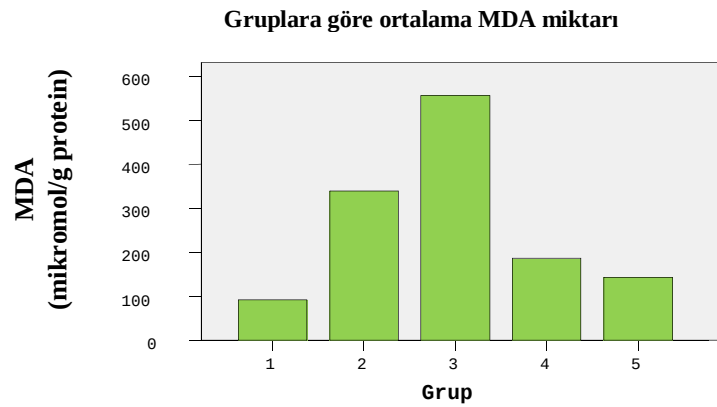
Grup	Katalaz (k/g protein)	MDA (mikromol/g protein)	SOD (U/mg protein)
1.Grup	0,628 ± 0,124	92,113 ± 19,287	0,312± 0,044
2.Grup	2,182 ± 0,360	339,665± 62,547	0,752± 0,062
3.Grup	2,557 ± 0,407	556,713±91,276	0,827± 0,038
4.Grup	3,112 ± 0,177	186,283± 16,761	0,893± 0,041
5.Grup	3,398 ± 0,325	143,842± 17,719	0,932± 0,038
P	<0,001	<0,001	<0,001

Grafikler



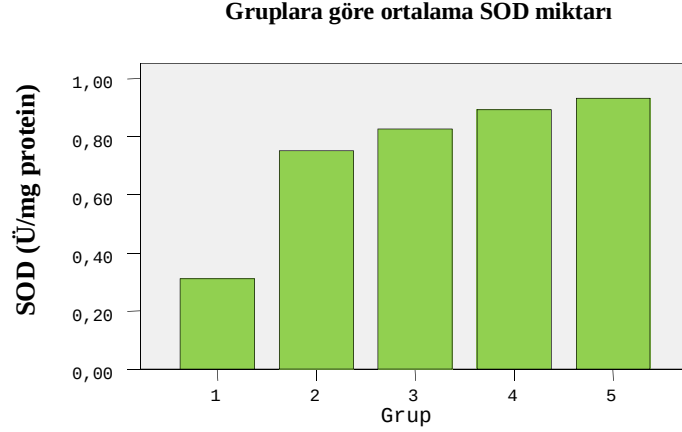
Şekil 14. Grupların ortalama Katalaz miktarları

Yukarıdaki grafik gruplara göre ortalama katalaz miktarlarını göstermektedir. Görüldüğü üzere, en çok katalaz miktarı 5. Grupta, en az 1. Gruptadır.



Şekil 15. Grupların ortalama MDA miktarları

Yukarıdaki grafikte gruplara göre ortalama MDA miktarları verilmiştir. Ortalama MDA miktarı en çok olan 3. Grup, en az olan 1. Gruptur.



Şekil 16. Grupların ortalama SOD miktarları

Yukarıdaki grafikte gruplara göre ortalama SOD miktarları verilmiştir. Ortalama SOD miktarı en çok olan 5. Grup, en az olan 1. Gruptur. Bu gruptaki SOD miktarı diğer gruplara kıyasla önemli derecede azdır.

Tablo 7'yi incelediğimizde, her üç ölçüm için anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ 'tir. Dolayısıyla ölçümler istatistik olarak önemli olacak düzeyde gruplar arasında farklı bulunmuştur. Gruplar arasında ölçümler içinde farklılığa yol açan durumları saptamak amacıyla ikili karşılaştırmalar yapıldığında, aşağıda tablolarda verilen sonuçlar elde edilmiştir.

Tablo 8. Katalaz ölçümünün gruplar arasında ikili karşılaştırma sonuçları

İkililer	Katalaz için p değerleri
Grup 1 vs Grup2	<0,001
Grup 3	<0,001
Grup 4	<0,001
Grup 5	<0,001
Grup 2 vs Grup 3	0,032
Grup 4	0,002
Grup 5	<0,001
Grup 3 vs Grup 4	0,002
Grup 5	<0,001
Grup 4 vs Grup 5	0,094

Tablo 9. MDA ölçümünün gruplar arasında ikili karşılaştırma sonuçları

İkililer	MDA için p değerleri
Grup 1 vs Grup2	<0,001
Grup 3	<0,001
Grup 4	0,003
Grup 5	0,079
Grup 2 vs Grup 3	<0,001
Grup 4	<0,001
Grup 5	<0,001
Grup 3 vs Grup 4	<0,001
Grup 5	<0,001
Grup 4 vs Grup 5	0,0146

Tablo 10. SOD ölçümünün gruplar arasında ikili karşılaştırma sonuçları

İkililer	SOD için p değerleri
Grup 1 vs Grup2	<0,001
Grup 3	<0,001
Grup 4	<0,001
Grup 5	<0,001
Grup 2 vs Grup 3	0,006
Grup 4	<0,001
Grup 5	<0,001
Grup 3 vs Grup 4	0,014
Grup 5	<0,001
Grup 4 vs Grup 5	0,0140

Anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olan gruplar arasında farklılık vardır. Buna göre;

KATALAZ

Katalaz doku ortalama değerleri; grup 1’de $0,628 \pm 0,124$, grup 2’de $2,182 \pm 0,3599$, grup 3’te $2,557 \pm 0,407$, grup 4’te $3,112 \pm 0,177$, grup 5’te $3,398 \pm 0,325$ k/g protein olarak belirlendi (Tablo-7).

Katalaz ölçümü için Tablo 8’i incelediğimizde anlamlılık düzeyi grup 4 ve 5 karşılaştırması dışındaki tüm durumlarda $p < 0,05$ ’tir. Dolayısıyla grup 4 ve 5 Katalaz ölçümü yönünden benzer, diğer tüm gruplar istatistik olarak anlamlı olacak düzeyde

birbirlerinden farklıdır. Dört ve 5 gruplar diğer gruplarla karşılaştırıldığında doku katalaz seviyesi önemli miktarda yüksektir.

MDA

Hücre içinde oksidatif hasara bağlı lipid peroksidasyon ürünü olan MDA doku ortalama değerleri; grup 1'de $92,11 \pm 19,29$, grup 2'de $339,67 \pm 62,55$, grup 3'te $556,71 \pm 91,28$, grup 4'te $186,28 \pm 16,76$, grup 5'te $143,84 \pm 17,72$ mikromol/g protein olarak belirlendi (Tablo-7).

MDA ölçümü için Tablo 9'u incelediğimizde anlamlılık düzeyi grup 1 ve 5 karşılaştırması ve grup 4 ve 5 karşılaştırması dışındaki tüm durumlarda $p < 0.05$ 'tir. Dolayısıyla grup 1 ve 5 ve grup 4 ve 5 MDA ölçümü yönünden benzer, diğer tüm gruplar istatistik olarak anlamlı olacak düzeyde birbirlerinden farklıdır. İki ve 3 grupta, 1, 4 ve 5'e göre doku MDA seviyesinin yüksek olduğu söylenebilir ($p < 0.05$).

SOD

SOD doku ortalama değerleri; grup 1'de $0,312 \pm 0,044$, grup 2'de $0,752 \pm 0,062$, grup 3'te $0,827 \pm 0,038$, grup 4'te $0,893 \pm 0,041$, grup 5'te $0,932 \pm 0,038$ Ü/mg protein olarak belirlendi (Tablo 7).

SOD ölçümü için Tablo 10'u incelediğimizde anlamlılık düzeyi grup 4 ve 5 karşılaştırması dışındaki tüm durumlarda $p < 0.05$ 'tir. Dolayısıyla grup 4 ve 5 SOD ölçümü yönünden benzer, diğer tüm gruplar istatistik olarak anlamlı olacak düzeyde birbirlerinden farklıdır. Dördüncü ve 5 grupların diğer üç gruptan farklı olduklarını %95 güven düzeyinde söyleyebiliriz.

4.2 Histopatolojik Değerlendirme

Tanımlayıcı istatistikler

Tablo 11. Gruplara göre Tübüler nekroz dağılımı

	Tübüler nekroz				Toplam
	%0-5'in arasında	%5-25'in arasında	%25-50'nin arasında	%50-75'in arasında	
Grup 1	2	4	0	0	6
Grup 2	0	1	2	3	6
Grup 3	0	2	1	3	6
Grup 4	0	1	1	4	6
Grup 5	0	5	1	0	6
Toplam	2	13	5	10	30

Tübüler nekroz verilerini, gruplara göre incelediğimizde;

1. grupta tübüler nekroz seviyesi %5'in altında olan sıçan sayısı 2, %5-25 arasında olan sıçan sayısı ise 4 tür.
2. grupta tübüler nekroz seviyesi %5-25 arasında olan 1 sıçan, %25-50 arasında olan 2 sıçan, %50-75 arasında olan 3 sıçan vardır.
3. grupta tübüler nekroz seviyesi %5-25 arasında olan 2 sıçan, %25-50 arasında olan 1 sıçan, %50-75 arasında olan 3 sıçan vardır.
4. grupta tübüler nekroz seviyesi %5-25 arasında olan 1 sıçan, %25-50 arasında olan 1 sıçan, %50-75 arasında olan 4 sıçan vardır.
5. grupta tübüler nekroz seviyesi %5-25 arasında olan 5 sıçan, %25-50 arasında olan 1 sıçan vardır.

Tablo 12. Gruplara göre inflamasyon dağılımı

	İnflamasyon			Toplam
	Yok	%0-5'in arasında	%5-25'in arasında	
Grup 1	2	4	0	6
Grup 2	1	5	0	6
Grup 3	0	3	3	6
Grup 4	0	4	2	6
Grup 5	0	5	2	6
Toplam	3	21	1	30

İnflamasyon verilerini, gruplara göre incelediğimizde ise;

1. 1.grupta inflamasyon olmayan 2 sıçan, inflamasyon seviyesi %5'in altında kalan 4 sıçan vardır.
2. 2.grupta inflamasyon olmayan 1 sıçan, inflamasyon seviyesi %5'in altında kalan 5 sıçan vardır.
3. 3.grupta inflamasyon seviyesi %5'in altında kalan 3 sıçan, %5-25 seviyesi arasında olan 3 sıçan vardır.
4. 4.grupta inflamasyon seviyesi %5'in altında kalan 4 sıçan, ,%5-25 seviyesi arasında olan 2 sıçan vardır.
5. 5.grupta inflamasyon seviyesi %5'in altında kalan 5 sıçan, ,%5-25 seviyesi arasında olan 1 sıçan vardır.

Tübüler nekroz yönünden gruplar arasında karşılaştırma yapıldığında, 5 grubun tübüler nekroz yüzdelerinin istatistiksel olarak farklı oldukları yapılan ki kare testi sonucunda elde edilmiştir ($p=0,037$). Gruplardaki nekroz oranları incelendiğinde grup 1'deki tüm sıçanlarda %25'in altında nekroz görülürken, grup 5'teki sıçanların büyük çoğunluğunda %5-25 arasında bir yüzdede nekroz görüldüğü saptanmıştır. Grup 2, 3 ve 4'teki sıçanlarda ise nekroz yüzdesinin diğer 2 gruptan oldukça yüksek olduğu (%50'nin üzerinde nekroz) gözlenmiştir.

Gruplar inflamasyon oranları yönünden karşılaştırıldığında ise gruplar arasında istatistik olarak fark olmadığı yapılan ki kare testi sonucunda görülmüştür ($p=0,188$).

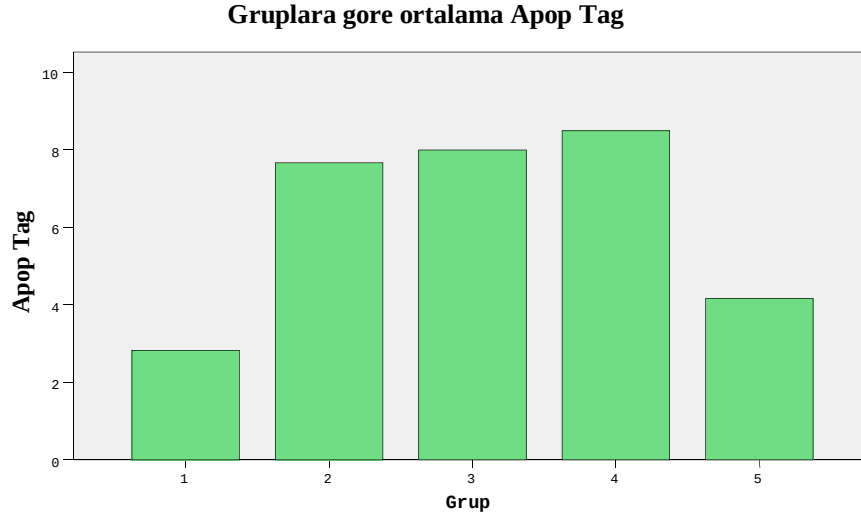
Önemli Not: Tübüler nekroz ve inflamasyon için yapılan kategorik grup karşılaştırmasında gruplardaki sıçan sayısının yetersiz olmasından dolayı, elde edilen istatistik analiz sonucunun gücünün düşük olduğu göz önünde bulundurulmalıdır.

Grupları Apop Tag miktarına göre incelediğimizde; Tablo 13'te verilen sonuçlar elde edilmiştir.

Tablo 13. Gruplara göre Apop Tag ölçümleri

Grup	Apop Tag
1.Grup	2,83±2,04
2.Grup	7,67±1,84
3.Grup	8,00±3,04
4.Grup	8,50±1,85
5.Grup	4,17±1,68
P	<0,001

Grafik



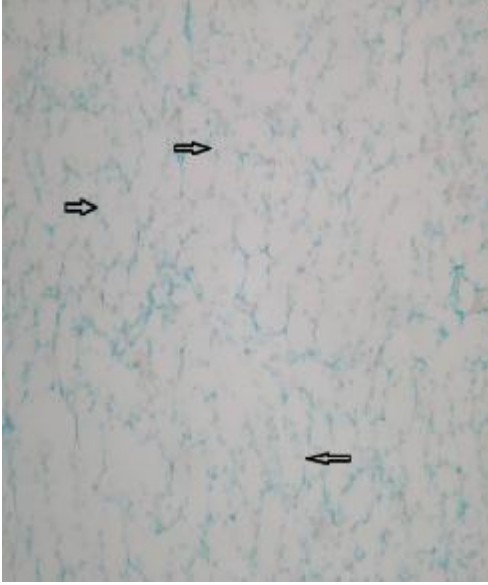
Şekil 17. Grupların Apop Tag ortalamaları

Tablo 13'ü incelediğimizde, anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ 'tir. Dolayısıyla Apop Tag ölçümü istatistik olarak önemli olacak düzeyde gruplar arasında farklı bulunmuştur. Gruplar arasındaik ölçümler içinde farklılığa yol açan durumları saptamak amacıyla ikili karşılaştırmalar yapıldığında, Tablo 14'te verilen sonuçlar elde edilmiştir.

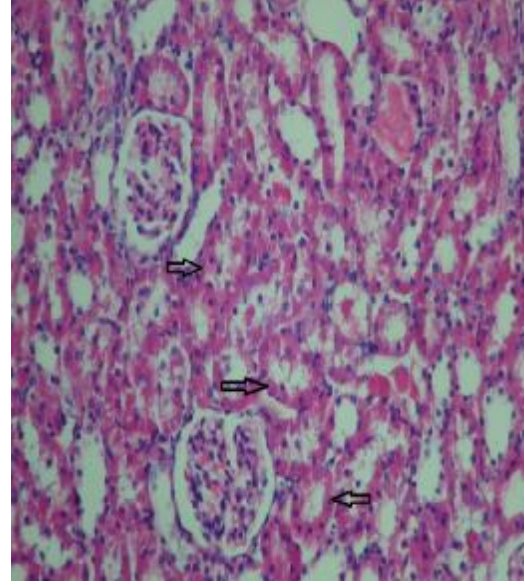
Tablo 14. Apop Tag ölçümünün gruplar arasında ikili karşılaştırma sonuçları

İkililer	Apop Tag için p değerleri
Grup 1 vs Grup 2	<0,001
Grup 1 vs Grup 3	<0,001
Grup 1 vs Grup 4	<0,001
Grup 1 vs Grup 5	0,269
Grup 2 vs Grup 3	0,780
Grup 2 vs Grup 4	0,487
Grup 2 vs Grup 5	0,007
Grup 3 vs Grup 4	0,675
Grup 3 vs Grup 5	0,003
Grup 4 vs Grup 5	0,001

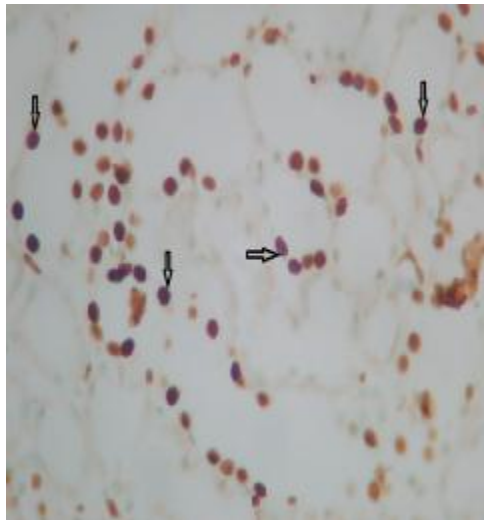
Apop Tag ölçümü için Tablo 14'ü incelediğimizde grup 1'in grup 5 ile benzer ve diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha düşük olduğu görülmektedir. Ayrıca grup 2, 3 ve 4'ün Apop Tag ölçümlerin benzer olduğu ve bu üç grubun Apop Tag ölçümünün grup 5'ten istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha yüksek olduğu görülmektedir.



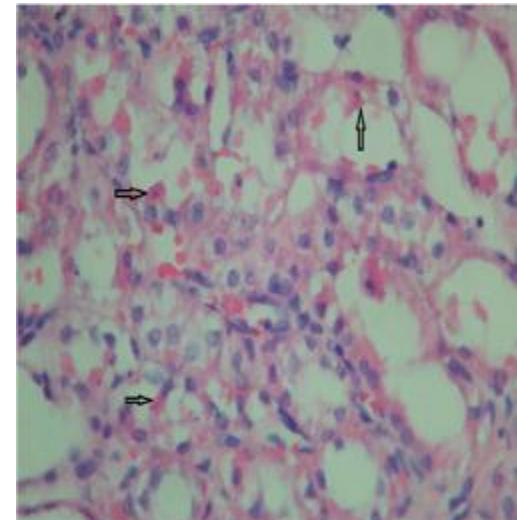
Şekil 18. 1. grup (kontrol), apop tag, İHK, x400, normal tubüller oklarla gösterilmiştir



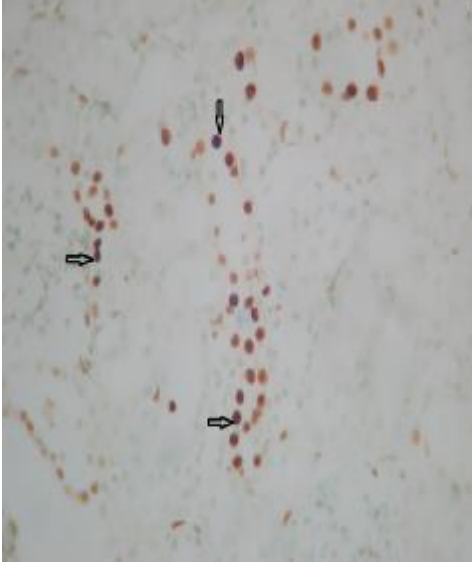
Şekil 19. 1.grup (kontrol), HE, x 200, normal tubüller oklarla gösterilmiştir



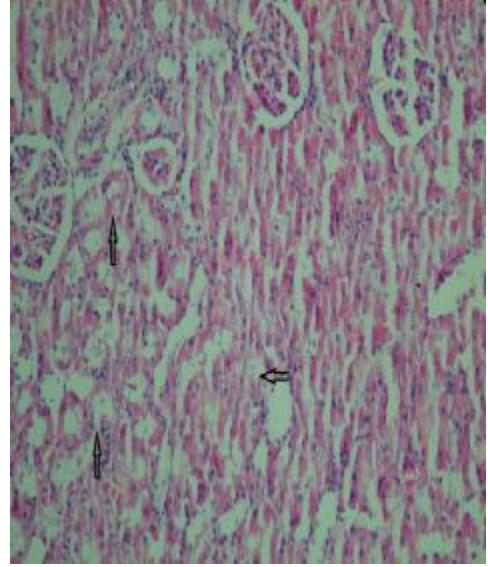
Şekil 20. 2. grup (İ/R), apop tag,İHK, x 400, boyanan apoptotik hücreler oklarla gösterilmiştir



Şekil 21. 2.grup (İ/R), HE, x 200, nekroza gitmiş tübül epitel hücreleri oklarla gösterilmiştir



Şekil 22. 5. grup, apop tag, İHK, x 400, apoptotik hücreler oklarla gösterilmiştir



Şekil 23. 5.grup, HE, x 200, nekroza gitmiş tübül epitel hücreleri oklarla gösterilmiştir

5 TARTIŞMA

Renal kan akımındaki ciddi azalma, yüksek enerjili fosfat tüketilmesi ve bunu izleyen hücre membranının ana fizyolojik iyonlara geçirgenliğinin bozulması, renal hücre hasarına neden olmaktadır. Bu hasarın derecesi iskeminin süresine ve uygun kollateral dolaşımın varlığına göre değişiklik göstermektedir. Çelişki gibi görünse de, kan akımının tekrar başlaması, daha fazla hücre hasarına neden olmaktadır; bu da reperfüzyon hasarı olarak bilinmektedir. Böbrek kanlanması azalmasıyla, akım iskemiye metabolik olarak daha hassas olan renal medullada yoğunlaşır. Bunun sonucunda, değişik oranlarda kortikal nekroz ve glomerüler filtrasyonda azalma meydana gelir. İskemi; renal tübüllerde genişleme, vazokonstriksiyon, ödem, endotel aktivasyonu ve tübüler hücre dökülmesine neden olur. Endotel adezyon molekülünün ekspresyonu ve lökositin endotele göçü ya da kemotaksisi artar^{3,42,43}.

Renal iskemi sonrası oksijenlenmiş kan ile reperfüzyon uygulanması, serbest radikallerin oluşmasına, lipid peroksidasyonuna, polisakkarit depolimerasyonuna ve DNA yapısının bozulup, yıkılmasına neden olur. Hasarlanmış endotelde vazodilatasyon olmaz; vasküler düz kaslar etkili vazokonstriktörler salgılar ve şişer. Bunun sonucunda da vasküler geçirgenlik artar. Renal distal nefronlarda, hücreler arası birleşim yerleri bozulur. Bu da sodyumun emilimini bozar hücre polaritesinin kaybına ve proksimal tübüllerde Na-K-ATPaz pompasının bozulmasına yol açar. Vazokonstriksiyon, hücre şişmesi, ekstraselüler ödem oluşur. Sonrasında, lökosit ve trombositlerin endotele yapışmasıyla doku perfüzyonu daha da bozulur^{20,43,44}. Renal kan akımında oluşan aksamalardan sonra tekrar akımın sağlanmasıyla oluşan reperfüzyon sonucu doku hasarı oluşur. Bu olaylar nonimmünolojiktir⁴⁵.

Belirli bir düzeye kadar olabilen oksidan molekül artışı yine vücutta daima belirli bir düzeyde bulunan doğal antioksidan moleküller tarafından etkisiz hale getirilmektedir. Yani sağlıklı bir organizmada oksidan düzeyi ve antioksidanların bunları etkisizleştirme gücü bir denge içindedir. Oksidanlar belirli düzeyin üzerine çıkar veya antioksidanlar yetersiz olursa yani denge bozulursa söz konusu oksidan moleküller organizmanın yapı elemanları olan protein, lipid, karbonhidrat, nükleik asitler ve yararlı enzimlerini bozarak zararlı etkilere yol açarlar. Çoğu hastalıklarda artmış reaktif oksijen

radikalleri (ROR) hastalığın ana sebebi değildir. Ancak primer bozukluğa ikincil olarak oluşurlar ve ardından patogeneizde yer alırlar¹³.

Normal bir insan böbreğinde, bir saatten kısa süren sıcak iskei, geçici disfonksiyondan başka hasar yapmazken, üç saat ve daha uzun süren sıcak iskei ise geriye dönüşü olmayan hasara neden olmaktadır⁴³. Bu çalışmada da iskei süresi 1 saatten daha kısa 30 dakika olarak uygulandı. Renal cerrahi operasyonlarda, operasyonun gereği olarak, böbreğin anatomik pozisyonunun bozulup farklı yönlere yer değiştirmesi durumunda renal vasküler hilüsün etkileneerek kan akımının azalması ya da böbreğin bazı bölgelerinin basıya bağlı olarak iskemide kalması kaçınılmazdır. Operasyonlardaki bu iskei süresi 5-10 dakika gibi kısa bir zaman olabileceği gibi, 1 saate kadar da uzayabilir. Kan akımının tekrar sağlanmasıyla, belirtilen İ/R hasarı meydana gelmektedir. Bizim çalışmamızda ise 30 dakika iskei ardından 24 saat reperfüzyon uygulandı.

Mark ve ark.⁴⁶ ratlarda yaptıkları bir çalışmada renal iskemide MDA artışının, reperfüzyonla daha da arttığını göstermişlerdir. Reaktif oksijen radikalleri; iskeiyle hücrel hasar oluştuğu zaman, hücre membranındaki poliansatüre lipidlerin peroksidasyonu sonucu membrandaki geçirgenliği bozar. Aynı şekilde hücre içindeki mitokondri ve lizozomal membranlarında oksidatif hasar oluşup mitokondrial membranda onarımı olmayan fosforilizasyon ve lizozomal membranda geçirgenlik artışına bağlı hidrolitik enzimlerle hücre yıkımı meydana getirir. Tübüler hücrelerde aynı olaylar olurken, tübüler transportta bozulur^{4,46}. Oksidatif doku hasarının göstergesi olarak, 1980'li yıllardan beri serum ve doku MDA değerlerine bakılmakta olduğunu belirten Singh ve Chopra⁴⁷ ratlarda yaptıkları renal İ/R'de renal oksidatif doku hasarının göstergesi olarak doku MDA düzeylerine bakmışlardır. Erdoğan ve ark⁴⁸ yaptığı başka bir çalışmada pyelonefrotik böbrekte yükselmiş MDA seviyesini rolipram uygulamakla kontrol grup seviyesine indirmişler. Bizim çalışmamızda da doku hasarının göstergesi olarak renal doku MDA değerlerine bakılmış ve 2 (İ/R) grupta MDA değerlerinin 4 ve 5 gruplara oranla belirgin olarak arttığı gösterilmiştir.

Superoksit radikallerinin yol açtığı oksidatif hasara karşı antioksidan savunmada görev alan ilk enzim, SOD'dur. SOD, superoksit radikallerini hidrojen peroksit ve oksijene dönüştürür⁵. CAT ya da GPx ise hidrojen peroksidi zararsız yan ürünlere dönüştürür. Bu yüzden hücrel hasarın şiddetinde önemli rol oynarlar. Hidrojen

peroksitein zararsız hale getirilmesinde, glutatyon, glutatyon peroksidaz ile okside glutatyonu dönüştürülür. Glutatyon okside glutatyonu katalizlenirken glutatyon reduktaz kullanılarak NADPH üretilir⁴⁹. CAT bir hemoproteindir ve aktif formda olabilmesi için NADPH'ye ihtiyaç duyar. Bu yüzden NADPH SOD ve CAT'ın iş görebilmesinde önemli bir role sahiptir. NADPH seviyesi, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesine bağlıdır. CAT başlıca peroksizomlarda aktiftir. Katalazın üretimi için gerekli olan NADPH pentoz fosfat yolunda üretilmektedir⁵⁰.

Inoue ve ark.⁵¹ artmış oksidatif stresi önlemek için proksimal tübüler hücrelerde SOD ve CAT enzimleri ve mRNA düzeylerinin artmış olduğunu göstermişlerdir.

Dobashi ve ark.⁵² sol böbrekte iskemi (30, 60, 90 dk) ve reperfüzyonu (2, 24, 72, 120 saat) farklı sürelerde yaptıkları çalışmada; iskemi süresi uzadığı zaman, SOD, CAT ve GPx aktivitelerinde anlamlı azalma ve lipid peroksidasyon düzeyinde artma olduğu bildirilmiştir.

Görür ve ark.⁵³ yaptığı çalışmada oksidatif renal hasarda koruyucu etkiye sahip SOD, CAT, NO ve zararlı etkiye sahip MDA seviyesinin yükseldiği ve bununda rolipram verilerek SOD,CAT,NO seviyelerinin daha da yükseltildiği, MDA seviyesinin ise düşürüldüğü görülmüştür.

Bizim yaptığımız çalışmada da rolipram verilen özellikle 4 ve 5. gruplarda SOD ve CAT seviyesinin yükseldiği, MDA seviyesinin düştüğü görüldü ki,bu da yukarıdaki çalışmalarla uyumluluk göstermektedir.

Renal transplantasyon, renal arter cerrahisi, renal tümör cerrahisi, parsiyel nefrektomi ve suprarenal aortik anevrizma tedavisinde değişik oranlarda renal İ/R hasarı olduğu bilinmektedir. Görüntüleme tekniklerinin de ilerlemesiyle, özellikle renal tümör cerrahisi ve diğer renal cerrahi prosedürlerde nefron koruyucu cerrahi popöler hale gelmiştir. Bu tür ameliyatlarda, özellikle 30 dakikadan uzun sıcak iskemilerde, hücresel hasarı en aza indirmek ve oksidatif hasara engel olmak için eksojen farmakolojik ajanlardan faydalanmak gerekebilir^{20,54}. Üreteropelvik obstrüksiyon cerrahisi gibi elektif bir ameliyatta; böbreğin bası ya da elevasyona bağlı kısa süreli İ/R hasarına maruz kalması kaçınılmazdır. Sürenin 30 dakikadan fazla olması durumunda, ameliyat sonrası oluşan fonksiyon kaybı veya renal skar oluşumunda ameliyatta oluşan İ/R hasarı da ihmal edilmemelidir. Böyle bir durumda ameliyat öncesi antioksidan veya antioksidan özelliği olan ajan kullanma gerekliliği düşünülebilir. Cerrahi olmayan renal

hastalıklarda nefron koruyucu ve olası oksidan hasardan korumak amacıyla mevcut medikal tedaviye ek olarak farmakolojik ajan kullanılması da değerlendirmeye alınabilir.

Rolipramın serbest radikal toplayıcı etkisi, antioksidan aktivitesi, antikarsinojenik, antiinflamatuvar, antibakteriyel, immünosuppressif, etkileri olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir^{30,35,48,53,55,56,57}. Ancak; Rolipramın renal İ/R hasarında dokuyu koruyucu etkisi araştırılmamıştır. Çalışmamızda Rolipramın renal İ/R hasarını önleyici veya azaltıcı etkisini daha önce yukarıda genel bilgilerde anlatıldığı gibi iskemi zamanı gelişen enflamasyon, tübüler nekroz ve apoptozise bakmayı amaçladık. Bulguların değerlendirilmesinde; bakılan örneklerde gerçek anlamda enflamasyon görülmemekle beraber Rolipramın istatistiksel olarak inflamasyonun şiddetini çok değiştirmediği görüldü. Bunun dışında rolipramın, tübüler nekroz ve apoptozisi özellikle 5 grupta anlamlı derecede azaltması ile İ/ R hasarına karşı koruyucu etkisi olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak; Rolipram, renal İ/R hasarına yol açabilecek cerrahi girişimlerde kullanılarak, oluşabilecek oksidatif renal doku hasarı azaltılabilir ve renal fonksiyonun ileri derecede bozulması engellenebilir kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. **Cotran RS, Kumar V, Robbins SL.** *Temel patoloji.* Çevikbaş U (Çeviren) 5. Baskı. İstanbul: Nobel ve Yüce, **1995**.
2. **Conesa LE, Valero F, Nadal JC ve ark.** N-acetyl-L-cysteine improves renal medullary hypoperfusion in acute renal failure. *Am J Physiol* **2001**; 281: 730-737.
3. **Önal A, Astarcıoğlu H, Örmən M, Atila K, Sarıoğlu S.** Sıçandaki renal iskemi reperfüzyon hasarında L-karnitinin koruyucu etkisi. *Ulus Travma Derg* **2004**; 10(3) : 161 .
4. **Slater TF.** Free radical mechanisms in tissue injury. *J Biochem* **1984**; 222:1-15.
5. **Akkuş İ.** *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik etkileri.* 1. Baskı Konya:Mimoza Yayınları. **1995**:3-95.
6. **Başaklar AC.** *Böbrek ve üreterin konjenital malformasyonları. İçinde: Bebek ve çocukların cerrahi ve ürolojik hastalıkları* II.cilt, I.baskı:Palme Yayınları **2007**;1205-1215.
7. **Anafarta K, Bedük Y, Arıkan N.***Temel Üroloji.*4 Baskı .Güneş Kitabevi Yayınları **2011**;1-5
8. **Kabalin JN.** The surgical anatomy of the retroperitoneum, kidney and ureter. *Campel urology* **2007**:3-38.
9. **Guyton AC, Hall JE.** *The kidneys and body fluids.* Textbook of Medical Physiology, WB Saunders Company, Philadelphia,**1996**:315-365.
10. **Kelalis PP, King LR, Belman AB.** *Renal physiology and function: Clinical pediatric urology,* W.B Saunders Company, Philadelphia, volume two, third edition (25) **1992**:1106-1117.
11. **Chamoun F, Burne M, O' Donnel M., Rabb H.** Pathophysiologic role of selectins and their ligands in ischemia reperfusion injury. *Front. Biosci.* **2000**(5): 103-109.
12. **Furuichi K, Wada K, Iwata Y, Kitagawa K, Kobayashi K, Hashimoto H et al.** CCR2 Signaling Contributes to Ischemia-Reperfusion Injury in Kidney. *JAm Soc Nephrol* **2003**;14:2503-2515.
13. **Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T.** Hastalıkların patogenezi ve tedavisinde reaktif oksijen partikülleri ve antioksidanlar. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* **1997**; 3-4: 96-101.
14. **Wall J.** Antioxidants; In Prevention Of Reperfusion Damage Of Vascular Endothelium. *TSMJ* **2000**;1:67-70.

15. **Hamulu AR, Buket S, Alayunt A, Mutaf I, Durmaz İ, Özbaran M.** Allopurinol ve deferoksaminin kardiyopulmoner bypass sırasında oksijen serbest radikali oluşumu üzerine etkileri. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi* **1994** ;2:95-100.
16. **Armstrong D.** *Oxygen Consumption Methods. Free Radical and Antioxidant Protocols*, Humana press, Totova, New Jersey, **1998**:1-5.
17. **Evans CAR, Diplock A T, Symons M.C.R.** *Introduction to free radicals and Mechanisms of radical production* .Techniques in free radical research volume 22, Elsevier, London, New York, Tokyo, **1991**:1-49.
18. **Kılıç R, Yaşar M.A, Avcıl, Demirel İ, Yaşar D.** Alt Batın Cerrahisi Olgularında Genel Anesteziye Eklenen Epidural Anestezinin Plazma Sitokinleri Ve Kortizol Seviyelerine Etkisi. *Fırat Tıp Dergisi* **2005**;10(2): 59-63.
19. **Blackwell T.S, Chirstman JW.** Sepsis and cytokines: current status. *British Journal of Anesthesia* **1996**;77:110-117.
20. **Derwesh IH, Novick AC.** Mechanism of renal ischaemic injury and their clinical impact. *BJU International* **2005**;95:948-950.
21. **Cobb JP, Hotchkiss HS, Karl IE, Buchman TG.** Mechanism of cell injury and death. *British Journal of Anesthesia* **1996**;77:3-10.
22. **Desborough JP.** The stress response to trauma and surgery. *Br J Anaesth* **2000**;85:109-117.
23. **Hoffman JN, Vollmar B, Laschke MW, Fertmann JM, Jauch KW, Menger MD.** Microcirculatory alterations in ischemia-reperfusion injury and sepsis of activated protein C and thrombin inhibition. *Critical Care* **2005**;9 :33-37.
24. **Noiri E, Gailit J, Sheth D.** Cyclic RGD peptides ameliorate ischemic acute renal failure in rats. *Kidney Int* **1994**; 46:1050-1058.
25. **Feilleux-Duche S, Garlatti M, Aggerbeck M, Poyard M, Bouguet J, Hanoune J.** Cell-specific regulation of cytosolic aspartate aminotransferase by glucocorticoids in the rat kidney. *AJP - Cell Physiology* **2003**; 265:1298-1305.
26. **Soto FJ, Hanania NA.** Selective phosphodiesterase-4 inhibitors in chronic obstructive lung disease. *Curr Opin Pulm Med* **2005**; 11: 129-34.
27. **Grootendorst D, Rabe KF.** Selective phosphodiesterase-4 inhibitors for the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Allergy Clin Immun* **2002**; 2: 61-7.

28. **Sanz MJ, Cortijo J, Morcillo EJ.** PDE4 inhibitors as new antiinflammatory drugs: Effects on cell trafficking and cell adhesion molecules expression. *Pharmacol Ther* **2005**;106:269-297.
29. **Burnouf C, Pruniaux MP.** Recent advances in PDE4 inhibitors as immunoregulators and anti-inflammatory drugs. *Curr Pharm Des* **2002**;8:1255-1296.
30. **Souness JE, Aldous D, Sargent C.** Immunosuppressive and antiinflammatory effects of cyclic AMP phosphodiesterase (PDE) type4 inhibitors. *J Immunopharmacol.* **2000**;47:127-162.
31. **Lehlinger, A . L,** *Principles of Biochemistry*, ed. 2. New York , Worth Publisher Inc, **1982**, p: 374, 731-735.
32. **Denishefsky, I.** *Biochemistry for medical sciences*, ed. 1,Boston little brown and company, **1980**, p. 198-199,557-558.
33. **Schütte H, Schell A, Schafer C, et al.** Subthreshold doses of nebulized prostacyclin and rolipram synergistically protect against lung ischemia-reperfusion. *Transplantation.* **2003**;75:814-821.
34. **Kyoi T, Kitazawa S, Tajima K, et al.** Phosphodiesterase type IV inhibitors prevent ischemia-reperfusion-induced gastric injury in rats. *J Pharmacol Sci* **2004**;95:321-328.
35. **Souza DG, Cassali GD, Poole S, et al.** Effects of inhibition of PDE 4 and TNF-alpha on local and remote injuries following ischemia and reperfusion injury. *Br J Pharmacol* **2001**;134:985-994.
36. **Chi ZL, Hayasaka S, Zhang XY, et al.** Effects of rolipram, a selective inhibitor of type 4 phosphodiesterase, on lipopolysaccharide-induced uveitis in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **2004**;45:2497-2502.
37. **Torphy TJ, Page C.** Phosphodiesterases: journey towards therapeutics. *Trends Pharm Sci* **2000**;21:157–159.
38. **Honglin Hu, Frederic Batteux, et al.** Clopidogrel protects from cell apoptosis and oxidative damage in a mouse model of renal ischaemia–reperfusion injury. *J Pathol* **2011**; 225: 265–275
39. **Aebi,H.,** *Methods of enzymatic Analysis*, Bergmeyer, H.U.,ed., Verlag Chemie, **1973**, pp 673-684
40. **Yüregir GT, Arpacı A, Tuli A.** *Temel ve Klinik Biyokimya ileri teknolojik Yöntemler.* Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, Adana **1995**.6-9
41. **Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K.** Assay for lipid in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* **1979**;95:351-358

42. **Woolfson RG, Millar CG, Neild GH.** Ischaemia and reperfusion injury in the kidney: current status and future direction. *Nephrol Dial Transplant* **1994**;9, 1529-31.
43. **Singbartl K, Ley K.** Protection from ischemia-reperfusion induced severe acute renal failure by blocking E-selectin. *Crit Care Med* **2000**; 28(7):2507-2514.
44. **Ozcan AV, Sacar M, Aybek H, Bir F, Demir S, Onem G.** The Effects of Iloprost and Vitamin C on Kidney as a Remote Organ After Ischemia/Reperfusion of Lower Extremities. *Jour of Surg Res* **2007**;140, 20–26.
45. **Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB.** Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg* **1991**;78:651-5.
46. **Mark SP, Hoidal JR, Ferris TF.** Oxygen Free Radicals in Ischemic Acute Renal Failure in the Rat. *J. Clin. Invest* **1984**;1156-1164.
47. **Singh D, Chopra K.** Effect of trimetazidine on renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Pharmacological Research* **2004**;50 :623–629.
48. **Erdogan S, Celik S, Aslantas O, et al.** Elevated cAMP levels reverse.Brucella melitensis-induced lipid peroxidation and stimulate IL-10 transcription in rats. *Res Vet Sci.* **2007**;82:181-186.
49. **A. Meister and M. E. Anderson.** Glutathione, *Annu. Rev. Biochem*, **1983**,52, 711-760.
50. **G. F. Gaetani, S. Galiano, L. Canepa, A. M. Ferraris and H. N. Kirkman.** Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxication of hydrogen peroxide in human erythrocytes, *Blood* **1989**, 73, 334-339
51. **Inoue M, Hishikawa M, Sato E, Matsuno K, Sasaki J.** Synthesis of superoxide dismutase derivative that specifically accumulates in renal proximal tubule cells. *Arch Biochem Biophys* **1999**, 368(2):354-360.
52. **Dobashi K, Ghosh B, Orak JK, Singh I, Singh AK.** Kidney ischemia-reperfusion: Modulation of antioxidant defenses. *Mol Cell Biochem* **2000**; 205: 1-11.
53. **Görür S, Çelik S, Hakverdi S, Aslantas Ö, Erdogan S, Aydın M, Ocak S, and Kiper A N.** Preventive Effect of Rolipram, a Phosphodiesterase 4 Enzyme Inhibitor, on Oxidative Renal Injury in Acute Ascending Pyelonephritis Model in Rats. *Ambulatory & Office Urology* **2008** Oct;72(4):743-748
54. **Deniz E, Colagoglu N, Sari A, Sonmez MF, Tugrul I, Oktar S.** Melatonin attenuates renal ischemia–reperfusion injury in nitric oxide synthase inhibited rats. *Acta histochemica* **2006**;108:303-309.

55. **Teixeira, M M, Gristwood, R W, Cooper, N, Hellewell, P G.** *Phosphodiesterase (PDE)4 inhibitors: anti-inflammatory drugs of the future?* 1997.
56. **Bopp, T, Dehzad, N, Reuter, S, Klein, M, Ullrich, N, Stassen, M, Schild, H, Buhl, R, Schmitt, E, Taube, C.** Inhibition of cAMP degradation improves regulatory T cell-mediated suppression. *J Immunol* **2009**, 182, 4017–4024
57. **Follin-Arbelet V, Hofgaard PO, Hauglin H, Naderi S, Sundan A, Blomhoff R, Bogen B, Blomhoff HK.** Cyclic AMP induces apoptosis in multiple myeloma cells and inhibits tumor development in a mouse myeloma model. *BMC Cancer*, **2011** Jul 18;11:301.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : EMİN MAMMADOV

Doğum Tarih ve Yeri : 06.03.1982 AZERBAYCAN, BAKÜ

Medeni Durumu : EVLİ

Adres : SEYHAN/ADANA ,YEŞİL YURT MAH

Telefon : 05468206652, 05556626087

E-posta : mammadovemin82@yahoo.com

Mezun Oldugu Tıp Fakültesi : AZERBAYCAN TIP FAKÜLTESİ

Varsa Mezuniyet Derecesi :

Görev Yerleri : Ç.Ü.TIP FAKÜLTESİ ÜROLOJİ ABD

Dernek Üyelikleri :

Alınan Burslar :

Yabancı Dil(ler) : RUS, İNGİLİZ