

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON ANABİLİM DALI

SPİNAL KORD İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI
OLUŞTURULAN RATLARDA PREGABALİNİN BÖBREK
DOKUSU ÜZERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ
Dr. EMİNE ÜNAL CERAN

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. NURTEN İNAN

ANKARA
ARALIK 2016

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON ANABİLİM DALI

SPİNAL KORD İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI
OLUŞTURULAN RATLARDA PREGABALİNİN BÖBREK
DOKUSU ÜZERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. EMİNE ÜNAL CERAN

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. NURTEN İNAN

ANKARA

ARALIK 2016

KABUL VE ONAY

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tez Sınav Tutanağı

Adı ve Soyadı	Dr. Emine Ünal CERAN
Baba Adı	İdris
Doğum Yeri/Tarihi	Sivas / 20.08.1985
Diploma Tarihi/Diploma No	05.08.2010 -152980
Mezun Olduğu Fakülte	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
İhtisas Yaptığı Anabilim Dalı/Bilim Dalı	Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD.
İhtisas Süresi	Yıl: 4 Ay: 4
Sınav Yapılmasını İsteyen Makam	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı

Uzmanlık Tezinin Adı: " Spinal Kord Iskemi Reperfüzyon Hasari Oluşturulan Ratlarda Pregabalinin Böbrek Dokusu Üzerine Etkisi"

JÜRİ KARARI:

28.12.2016 tarihinde saat 10⁰⁰ da toplanan Sınav Jürisi, adayın yapmış olduğu " Spinal Kord Iskemi Reperfüzyon Hasari Oluşturulan Ratlarda Pregabalinin Böbrek Dokusu Üzerine Etkisi " isimli uzmanlık tezini değerlendirmiş ve oy birliği ile yeterli olarak kabul etmiştir

JÜRİ ÜYELERİ

BAŞKAN

Prof. Dr. Ömer KURTIPEK
Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD.Başkanı



ÜYE

Doç. Dr.Nurten İNAN
Anesteziyoloji ve Reanimasyon
A.D. Öğretim Üyesi



ÜYE

Doç. Dr. Levent ÖZTÜRK
Yıldırım Bayazıt Üniversitesi
Anesteziyoloji ve Reanimasyon
A.D. Öğretim Üyesi



İçindekiler

KABUL VE ONAY	III
SİMGE ve KISALTMALAR.....	VI
TABLOLAR DİZİNİ.....	VIII
RESİMLER DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Pregabalin	3
2.1.1.Kimyasal Özellikleri	3
2.1.2.Farmakodinamik Veriler.....	5
2.1.3.Etki Mekanizması	5
2.1.3.1.Pregabalinin GABAerjik sisteme etkisi	6
2.1.3.2.Pregabalinin VGCC'na etkisi	7
2.1.4.Prelinik toksisite ve diğer veriler	9
2.2.Böbrek.....	10
2.2.1.Anatomi ve Histoloji.....	10
2.2.2.Fizyoloji	12
2.3.İskemi ve Reperfüzyon	16
2.3.1.İskemi	16
2.3.2.Reperfüzyon	19
2.3.3.İskemi Reperfüzyon Hasarı Mekanizmaları.....	20
2.3.4.Serbest Radikaller.....	22
2.3.5.Reaktif Oksijen Türleri.....	24
2.3.6.Reaktif Nitrojen Türleri	26
2.3.7.Serbest Radikallere Bağlı Hücresel Hasar.....	27
2.3.8.Antioksidan Savunma Sistemleri.....	31
2.4.Total Antioksidan Durum (TAS).....	36
2.5.Total Oksidatif Durum (TOS)	37
2.6.Oksidatif Stres İndeksi (OSi)	37
2.7.Apoptozis	38
2.8.Vasküler Endotelial Büyüme Faktörleri (VEGF)	40
2.9.DENEY MODELLERİ.....	42
3. GEREÇ VE YÖNTEM	44

3.1.Denek Seçimi	44
3.2.Kullanılan Yöntemler	44
3.2.1.Aortik Oklüzyon ve İskemi Reperfüzyon Modeli	45
3.3.Deney Grupları	46
Kontrol grubu	46
İskemi- Reperfüzyon.....	46
İskemi reperfüzyon+ düşük doz pregabalin grubu	46
İskemi reperfüzyon+ yüksek doz pregabalin grubu	46
3.4.Dokuların Homojenizasyonu	47
3.5.Total Antioksidan Durum (TAS) Ölçümü	48
3.6.Total Oksidatif Durum (TOS) Ölçümü.....	48
3.7.Histopatolojik İnceleme	49
3.8.İstatistiksel Analiz.....	50
4. BULGULAR	51
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	56
6. SONUÇ	64
7. KAYNAKLAR	66
8. ÖZET	80
9. SUMMARY	82
10.EKLER.....	84
Ek-1: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul Onayı	84
11.ÖZGEÇMİŞ	86

SİMGE ve KISALTMALAR

İ/R: İskemi–Reperfüzyon

SOR: Serbest Oksijen Radikalleri

GABA: Gama aminobutirik asit

VGCC: Voltaja duyarlı kalsiyum kanalları

LNAA: Geniş nötral aminoasit

LPS: Lipopolisakkarid

GFH: Glomerüler filtrasyon hızı

NO: Nitrik Oksit

ROS: Reaktif oksijen türevleri

eNOS: Endotelial Nitrik Oksit sentaz

COX-2: Siklooksijenaz-2

H₂O₂: Hidrojen peroksit

O₂⁻: Süperoksit radikali

ABH: Akut Böbrek Hasarı

SR: Serbest Radikaller

SOD: Süperoksid dismutaz

GSH-Px: Glutasyon peroksidaz

CAT: Katalaz

OH⁻: Hidroksit radikali

NOS: Nitrik oksit sentetaz

L: Lipid radikali

LOO: Lipid peroksit radikali

LOOH: Lipid Hidroperoksitleri

PMNL: Polimorf Nüveli Lökositler

PAF: Platelet Aktive Edici Faktör

TNF- α : Tümör Nekroz Faktör Alfa

C: Kompleman

MIP: Makrofaj İnflamatuar Protein

İL: İnterlökin

PG: Prostoglandin
TxA₂: Tromboksan A₂
GST: Glutasyon S transferaz
GSH-R: Glutasyon Redüktaz
MDA: Malondialdehit
TBARS: Tiyobarbitürik asit reaktif substans
TAS: Total antoksidan durum
TAA: Total antoksidan aktivite
TAOP: Total antoksidan güç
TAC: Total antoksidan kapasite
ABTS: 2-2azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat)
TOS: Total oksidatif durum
OSİ: Oksidatif Stres İndeksi
Rb: Retinoblastom geni
VEGF: Vasküler Endotelyal büyüme faktörü
PDGF-BB: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü-BB
FGF: Keratinosit Büyüme faktörü
EGF: Epidermal Büyüme faktörü
TGF- β 1: Transforming Büyüme faktörü
Grup-K: Kontrol
Grup İ/R: İskemi Reperfüzyon
Grup İ/R-DP: İskemi Reperfüzyon+ düşük doz pregabalin
Grup İ/R-YP: İskemi Reperfüzyon+ yüksek doz pregabalin
PAS: Periyodik Asid Schiff
ÇOYS: Çoklu organ yetmezliği sendromu
H-E: Hematoksilen Eozin

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 1. Serbest radikallerin başlıca kaynakları .	23
Tablo 2. Oksijen Bileşikleri	24
Tablo 3. Organizmada bulunan endojen antioksidan savunma sistemleri	32
Tablo 4. Sıçanların böbrek dokusunda oksidan durum parametreleri	51

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No:

Resim 1. Böbrek dokusu Hematoksilen Eozin sonuçları	52
Resim 2. Böbrek dokusu PAS boyama sonuçları	53
Resim 3. Böbrek dokusu VEGF ekspresyonu sonuçları	54
Resim 4. Böbrek dokusu p53 ekspresyonu sonuçları	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No:</u>
Şekil 1. GABA ve Pregabalinin Yapısı	3
Şekil 2. Pregabalinin etki mekanizması	6
Şekil 3. Böbreğin genel görünümü	12
Şekil 4. Böbreğin damarları ve kanlanması	13
Şekil 5. İskemi reperfüzyonda sitozolde oluşan değişiklikler	17
Şekil 6. İskemi reperfüzyonda oksijen radikali oluşumu	20
Şekil 7. Serbest radikallerin oluşumu ve enzimatik detoksifikasyonu	24
Şekil 8. Apoptozis Yolakları	38

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Pregabalin farklı dokularda oksidatif stres ve inflamatuvar süreçler üzerine etkileri araştırılan bir ilaçtır. Biz bu çalışmada ratlarda infrarenal abdominal aorta klemplenmesi ile meydana gelen iskemi sonrasında klemplerin açılmasıyla oluşan reperfüzyon ve bu reperfüzyona bağlı oluşacak iskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarında farklı dozlarda uygulanan pregabalinin böbrek dokusu üzerine koruyucu etkilerini araştırmayı amaçladık.

Abdominal aort anevrizma cerrahisi gibi infrarenal abdominal aortanın klemplenmesiyle kan akımının geçici olarak kesintiye uğratılması sık uygulanan bir cerrahi prosedürdür. Kesintinin sonlandırılması ile kan akımının ve oksijenin tekrar temin edilmesini tanımlayan reperfüzyon dönemi, iskemik periyotta meydana gelen hücresel düzeydeki hasarı kötüleştirmektedir. Bu fenomen “iskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarı” olarak bilinmektedir (1,2)

Abdominal aortayı içeren cerrahi girişimler sırasında karşılaşılabilen İ/R hasarı alt ekstremitelerin yanı sıra kalp, karaciğer, böbrek ve akciğerler gibi uzak organları da etkileyen karmaşık bir süreçtir (3). Abdominal aorta cerrahisi nedeniyle oluşan uzak organ hasarlarından en önemlilerinden biri de böbrek hasarıdır. Elektif infrarenal aorta cerrahileri sonrasında akut böbrek disfonksiyonu ve akut böbrek yetmezliği insidansları sırasıyla %15-%22 ve %1.8-%4 olarak bildirilmiştir (4,5). Aortik İ/R hasarı sonucu ortaya çıkan; serbest oksijen radikalleri (SOR)’nin oluşumu, sistemik vazokonstriktif mediatörler, nötrofil aktivasyonu, lipid peroksidasyonu ve sistemik inflamatuvar yanıt uzak organ hasarına neden olmaktadır(6). Bu nedenle aortik İ/R’nin indüklediği böbrek hasarı; aort cerrahisi sonrası yüksek mortalite ile seyreden akut renal yetmezlik gelişiminde önemli bir komplikasyon olarak kabul edilmektedir (7).

Pregabalin gama-aminobutirik asitin(GABA) yapısal bir analogudur. Hayvan deneyi modellerinde antikonvülsan, analjezik ve anksiyolitik etki gösteren “voltaja duyarlı kalsiyum kanallarının” (VGCC), “alfa-2-delta” alt üniteleri için yüksek potentli bir ligandır. Hipereksite nöronların kalsiyum kanallarının alfa-2-delta alt ünitesine güçlü şekilde bağlandıktan sonra, depolarizasyonla indüklenmiş kalsiyum akışını ve bu şekilde glutamat, noradrenalin ve substans P’yi de içerecek şekilde pek çok eksitatuvar nörotransmitterlerin salınımını azaltır (8). Pregabalinin spinal kord hasarı oluşturulan ratlarda anti-apoptotik ve anti-inflamatuar etkileri de ortaya konmuştur (9). İskemi reperfüzyon hasarı tedavisi için birçok ilaç ve antioksidan maddeler denenmiş ve halen üzerinde çalışılmaktadır.

Son yıllarda klinik çalışmalarda böbrek İ/R hasarını engellemeye yönelik birbirinden farklı yaklaşımlar denenmektedir. Spinal kord İ/R hasarında böbrek dokusu üzerinde farklı dozlarda uygulanan pregabalinin koruyucu etkisinin araştırılması ile az sayıda olan literatür çalışmalarına katkı sağlamayı hedefledik.

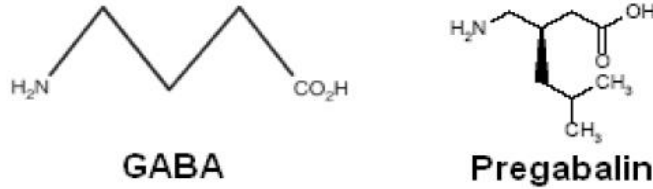
2.GENEL BİLGİLER

2.1.Pregabalin

Pregabalin epilepsi, nöropatik ağrı, anksiyete ve uyku bozukluklarında kullanılan ve araştırılan bir ilaçtır (10,11).

Pregabalin, GABA'nın yapısal bir analogudur (8),(Şekil-1). GABA yapısal analogu olmasına rağmen GABA benzeri mekanizmalar üzerine direkt etkisi yoktur. Hayvan deneyi modellerinde antikonvülsan, analjezik ve anksiyolitik etki gösteren VGCC'nın "alfa-2-delta" alt üniteleri için yüksek potentli bir ligandır (12). Hiperekstite nöronların kalsiyum kanallarının alfa-2-delta alt ünitesine güçlü şekilde bağlandıktan sonra, depolarizasyonla indüklenmiş kalsiyum akışını ve bu şekilde glutamat, noradrenalin ve substans P'yi de içeren pek çok eksitatuvar nörotransmitterlerin salınımını azaltır (12). Kalsiyum kanallarının bu alt birimine gabapentinden 6 kat daha güçlü bağlanma afinitesine sahiptir (13). Pregabalin GABA reseptörleri üzerinden etki etmez ve GABA gerilimini ve yıkımını değiştirmez (13,14).

2.1.1.Kimyasal Özellikleri



Şekil 1. GABA ve Pregabalinin Yapısı (8,15)

Pregabalin güçlü bir şekilde VGCC'lerine bağlanarak kalsiyum girişini ve bu şekilde eksitatuvar nörotransmitterlerin salımını azaltır (16). 3-isobutil-gamma-aminobutirik asidin (GABA) S-(+)-izomeri olan pregabalin, kimyasal olarak S-(+)-3-(aminometil)-5-metilheksanoik asit olarak tanımlanmaktadır (17). Pregabalin beyaz ile kirli beyaz arası renkte, pKa1'i 4,2 ve pKa2'si 10,6 olan kristal bir soliddir. Serbestçe suda ve hem bazik hem de asidik sulu solüsyonlarda eriyebilir (17). Pregabalinin, VGCC alfa-2-delta alt ünitesine ve de "L taşıyıcı sistemi" olarak adlandırılan geniş nötral aminoasit taşıyıcısına bağlanması, bileşiğin farmakolojik aktivitesi için önemlidir. Pregabalin oral uygulama sonrası, geniş nötral aminoasit (LNAA) taşıyıcısı aracılığıyla barsaklardan emilir (18). Pregabalin hem kan-beyin bariyeri (19,20), hem de barsakta geniş aminoasitlerin transportundan sorumlu L taşıyıcı sisteminin bir substratıdır (18). Pregabalin, klinik araştırmalarda sağlanandan 10 kat daha fazla olan konsantrasyonlarda sitokrom P450 izoenzimlerinin aktivitesine anlamlı hiçbir in vitro etki göstermemiştir (19,21,22).

Pregabalin emilimi hızlıdır ve biyoyararlanımı yaklaşık olarak %90'dır. Doruk plazma konsantrasyonuna oral alımından bir saat sonra ulaşır. Plazma proteinlerine bağlanmaz. Minimal metabolizmaya uğrar ve yarı ömrü 5.8–6.3 saat arasındır. Yaklaşık olarak %98'i böbrekten değişmeden atılır (23). Önerilen optimal terapötik dozu günlük 300-600 mg'dır. En sık rastlanan yan etkiler uyku hali ve sersemlik hissidir. Bunları baş ağrısı, baş dönmesi, ağız kuruluğu, kilo alımı takip eder (24).

2.1.2.Farmakodinamik Veriler

2.1.2.1.Antikonvülzan olarak pregabalin

Pregabalin, maksimal elektroşok tarafından indüklenen nöbetlerde, kimyasal konvülzanların indüklediği nöbetlerde, antikonvülzan aktivite göstermektedir (8,22).

2.1.2.2.Analjezik olarak pregabalin

Pregabalinin, sinir ligasyonu, enjekte edilmiş immun antijen, herpes enfeksiyonu, artrit, diabet, cerrahi ve termal hasarla indüklenen ağrı dahil nöropatik ve inflamatuvar ağrısı olan hayvan modellerindeki nosiseptif davranışları azalttığı gösterilmiştir. Ancak, duyuşal olarak akut nosisepsiyonu etkilememiştir (21). Pregabalinin antiallodinik ve antihiperaljezik etkisi gabapentinden 2-4 kat daha düşük dozda gözlenmiştir (25,26).

2.1.2.3.Anksiyolitik olarak pregabalin

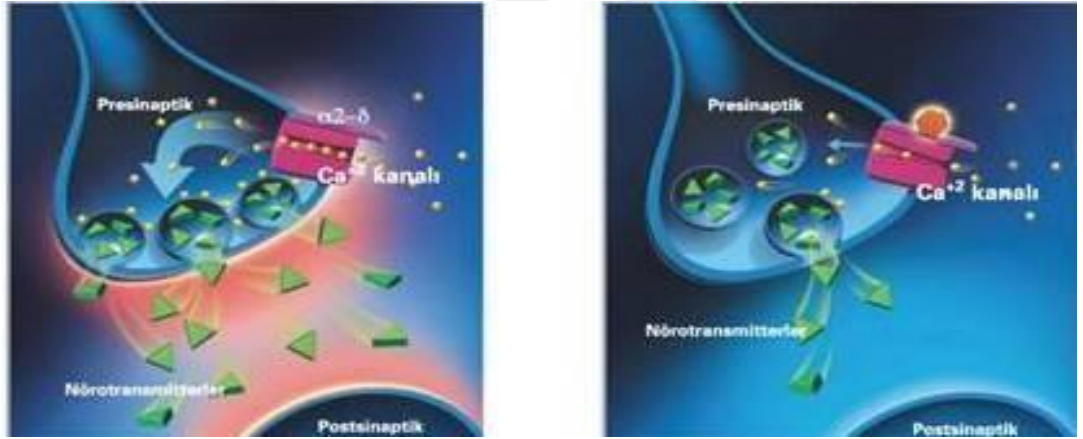
Pregabalinin potansiyel anksiyolitik etkilerinin öncü kanıtları, yükseltilmiş artı labirent sıçan testi ve zıtlasma testi gibi anksiyete test modelleri kullanan çalışmalardan sağlanmıştır. Bu preklinik çalışmalar pregabalinin iki modelde de doza bağımlı olarak anksiyolitiğe benzer etkileri indüklediğini göstermiştir. Pregabalin hem zıtlasma testinde hem de yükseltilmiş artı labirent testinde anksiyolitik benzeri etkileri indüklemiştir (27).

2.1.3.Etki Mekanizması

Pregabalin güçlü bir şekilde VGCC'lerine bağlanarak kalsiyum girişini ve bu şekilde eksitatuvar nörotransmitterlerin salımını azaltır (16). Voltaja duyarlı kalsiyum kanalları vasıtasıyla kalsiyum iyonlarının nöronlara girişi, veziküllerin hücre membranına yapışmalarını ve nörotransmitterlerin sinaptik aralığa salımını tetikler. Örneğin anormal nöron ateşlemesinin olduğu epilepside ya da nöronların

hasar gördüğü nöropatik ağrıda, bu nöronların fazla uyarılması ile sonuçlanır. Fazla uyarılmış nöronlarda; kalsiyum iyonlarının içeriye fazla akışı, norepinefrin, glutamat ve substans P'yi içeren nörotransmitterlerin geniş ve sürekli salımına yol açmaktadır (15).

Pregabalin; fazla uyarılmış nöronlardaki kalsiyum kanallarının, alfa-2-delta alt ünitesine potent olarak bağlandıktan sonra bu depolarizasyonla indüklenmiş kalsiyum akışını modüle eder ve bu yolla şekil 2' de gösterildiği gibi glutamat, noradrenalin ve substans P gibi pek çok eksitatuvar nörotransmitterlerin salımını azaltır. Bu, sırasıyla postsinaptik reseptörlerin stimülasyonunda azalmaya neden olur ve nöronları normal fizyolojik duruma geri getirir (15).



Şekil 2. Pregabalinin etki mekanizması (15)

2.1.3.1. Pregabalinin GABAerjik sisteme etkisi

Gama aminobutirik asit benzeri mekanizmalara direkt etkisi gözükmemektedir (14). Pregabalinin GABA-A, GABA-B ya da benzodiazepin reseptörlerine direkt olarak bağlanmadığı kaydedilmiştir (13). Aynı zamanda GABA'ya ya da GABA antagonistlerine metabolik olarak dönüşmez ve GABA alımı ya da degradasyonunu değiştirmez (11,19,22).

Bir hayvan modelinde, lipopolisakkarid (LPS), rektal distansiyonla beraber allodini ortaya çıkarmaktadır. LPS'nin rektal allodinik etkisi sistemik morfin sulfat (0,3 mg/kg s.c.) tarafından bloke edilirken, nalokson da morfinin etkisini antagonize etmiştir. Aynı şekilde, pregabalinle öntedavi (1, 3, 10 ve 30 mg/kg) rektal distansiyona karşı LPS'nin arttırdığı abdominal yanıtta doza bağımlı bir azalma oluşturmuştur ve aynı zamanda 30 mg/kg'lık tek bir dozun da etkili olduğu gösterilmiştir. Morfinden farklı olarak, pregabalinin antiallodinik etkisi nalokson ön tedavisi ya da GABA-A reseptör antagonisti ile bloke edilmemiştir. Bu pregabalinin GABA-A ya da opioid reseptörleri vasıtasıyla etki etmediğine ek kanıt oluşturmuştur (28).

2.1.3.2.Pregabalinin VGCC'na etkisi

Voltaja duyarlı kalsiyum kanalları, nöronal aksiyon potansiyelini düzenleyen kalsiyum iyonlarına seçici olarak geçirgen olan hücre membran glikoproteinleridir (15). Nöronal eksitabilite ve sinaptik transmisyonunda rol oynayan kalsiyum kanallarının elektrofizyolojik ve farmakolojik çalışmalarının voltaj bağımlılığı, kinetikler ve çeşitli farmakolojik ajanlara sensitiviteleri temel alınarak 6 sınıf VGCC tanımlanmıştır. Moleküler yapısı fonksiyonel olarak P-, Q-, N-, L-, R- ve T-tipi kalsiyum kanalları belirlenmiştir. Pek çok sinaps N-, P-, Q-'nun çeşitli kombinasyonuna ve zaman zaman R-tipi kalsiyum kanallarına bağımlıdır. VGCC alfa-1 alt ünitesi ve alfa-2-delta, beta ve gamma olan 1:1:1:1 oranındaki üç yardımcı alt ünitelerden oluşur (15). Presinaptik N ve P/Q VGCC vasküler kastaki, nifedipin gibi kalsiyum kanal blokerleriyle etkilenen L tipi voltaja duyarlı kalsiyum kanallarıyla ya da N metil D aspartat glutamat reseptörü kalsiyum kanalına duyarlı liganda-bağılı kalsiyum kanalları (ketamin ve memantinden etkilenen) karıştırılmamalıdır (21).

Pregabalin N ve P/Q kanallarının alfa-2-delta alt ünitesine bağlanırken, verapamil gibi dihidropiridinler L-tipi kalsiyum kanalları için selektiftir (21,29). Bu antihipertansif ilaç tedavilerinden farklı olarak, pregabalinin kan basıncı ya da kardiyak fonksiyon üzerine etkisi yoktur (29).

Voltaja duyarlı kalsiyum kanalları vasıtasıyla kalsiyum iyonlarının nöronlara girişi, veziküllerin hücre membranına yapışmalarını ve nörotransmitterlerin sinaptik aralığa salımını tetikler. Belirli patolojik durumlarda, örneğin anormal nöron ateşlemesinin olduğu epilepside ya da nöronların hasar gördüğü nöropatik ağrıda, bu nöronların fazla eksite edilmesi ile sonuçlanır. Fazla eksite edilmiş nöronlarda, kalsiyum iyonlarının içeriye fazla akışı norepinefrin, glutamat ve substans P'yi içeren nörotransmitterlerin geniş ve sürekli salımına yol açmaktadır (15).

2.1.3.3. Pregabalinin Alfa-2-delta alt ünitesi üzerine etkisi

Hipereksite nöronlardaki kalsiyum kanallarının alfa-2-delta alt ünitesine pregabalin potent olarak bağlandıktan sonra bu depolarizasyonla indüklenmiş kalsiyum akışını modüle eder ve bu yolla, glutamat, noradrenalin ve substans P gibi pek çok eksitatuvar nörotransmitterlerin salımını azaltır. Bu, sırasıyla postsinaptik reseptörlerin stimülasyonunda azalmaya neden olur ve nöronları normal fizyolojik duruma geri getirir (15). Pregabalinin bağlanması ile ilgili önemli bir nokta, normal sinir fonksiyonu değişmezken ektopik aktivitenin azalmasıdır (30).

Farklı ekspresyonla alfa-2-delta alt ünitesinin dört izoformu vardır (31). Alfa-2-delta-1 ve alfa-2-delta-2 küçük dorsal kök gangliyon hücrelerinde yüksek oranda ekspresedir ve alfa-2-delta-3 büyük dorsal kök gangliyon hücrelerinde ve beyinde yüksek oranda ekspresedir (31,32).

Pregabalinin alfa-2-delta-1 ve alfa-2-delta-2 izoformlarına yüksek afinitede bağlandığı, ama alfa-2-delta-3 ve alfa-2-delta-4 izoformlarına bağlanmadığı kaydedilmiştir (33). Nöropatik ağrı oluşumunda VGCC'lerin alfa-2-delta-1 alt ünitesinin rolü için önemli kanıtlar gösterilmiş ve gabapentin ile pregabalinin analjezik etkilerinin bu alt ünite izoformu ile etkileşimiyle gerçekleştiği ortaya konulmuştur. Ancak alfa-2-delta-2 alt ünitesi için halen nöropatik ağrı oluşumunda yeterli veri bulunmamaktadır (34). Gabapentinin etkili olduğu nöropatik ağrı modellerinde, alfa-2-delta-1 ekspresyonunun artışının dorsal kök gangliyonu ya da spinal kordda belirgin olduğu gözlenmiştir (33).

2.1.4.Prelinik toksisite ve diğer veriler

İnsanlarda gebelik kategorisi sınıfı C olarak bildirilmiştir. Pregabalin fare, sıçanlar ve tavşanlarda teratojenik bulunmamıştır. Pregabalin, in vitro ve in vivo testler dizisi sonuçları temel alındığında genotoksik değildir. Prenatal/postnatal toksisite çalışmalarında, pregabalin insanda önerilen maruziyetin iki katından daha fazlasına maruz kalan sıçanlarda gelişimsel toksisiteyi indüklemiştir (16).

Pregabalin, antikonvülzan etkinin yanısıra anksiyete (27) ve nöropatik ağrı modellerinde (25,35,36) anksiyolitik, antiallodinik ve antihiperalezik aktivitesini göstermiştir. Pregabalinin farmakokinetiği dozla orantılıdır ve pregabalin önemli oranda metabolize olmaz. Lineer farmakokinetiğe sahiptir ve kişiler arası farmakokinetik değişkenliği düşüktür (22). Pregabalin yüksek biyoyararlanıma sahiptir. Plazma proteinlerine bağlanmaz. Sitokrom p450 izoenzimlerinin aktiviteleri üzerine önemli in vitro etki göstermez (20,22). *Tmax* yaklaşık 1 saattir. Kararlı duruma ulaşma süresi 24-48 saattir. Biyoyararlanım %90'ın üzerinde olup dozdan bağımsızdır (22).

Pregabalin ile görülen advers etkiler arasında baş dönmesi, sersemlik, bulanık görme, uyku hali, bulantı, kusma, hipotansiyon, baş ağrısı, halsizlik, halüsinasyonlar ve ekstremitelerde ödem yer almaktadır. En sık görülen advers etkiler ise baş dönmesi (%37,5), sersemlik (%12,5) ve kabızlık (%8,3)'tır. Literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında, görülen advers etkiler arasında baş dönmesi, uyku hali, diplopi ve kilo alma yer almaktadır. Ancak bu tip advers etkilerin, epilepsi tedavisi gibi özellikle yüksek dozlarda (150 ve 600 mg) ve uzun süreli pregabalin kullanımında ortaya çıktığı görülmektedir (37,38).

2.2.Böbrek

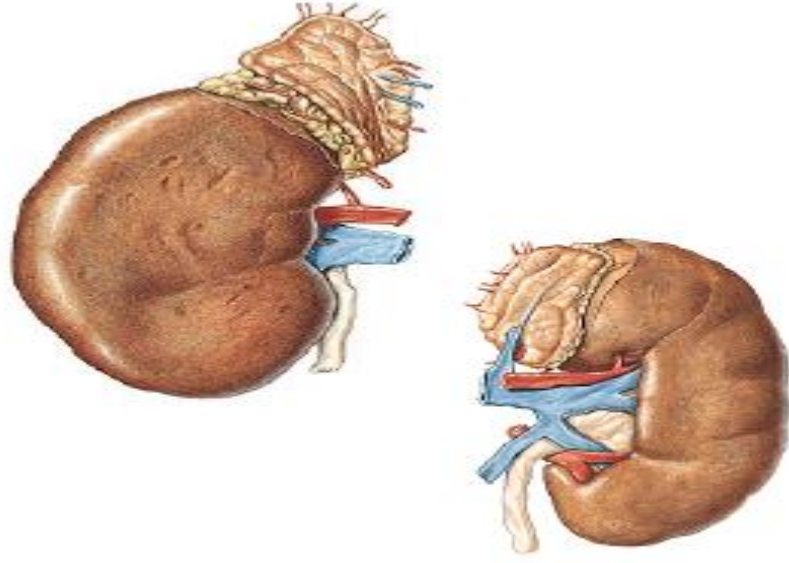
2.2.1.Anatomi ve Histoloji

Böbrekler kolumna vertebralis'in her iki tarafında ve karın arka duvarının üst kısmında bulunurlar. Böbreklerin etrafını gevşek bağ dokusu ve yağ dokusu sarar. Ön yüzünü periton örter (39). Üst uçları 12. torakal vertebranın üst kenarı, alt uçları 3. lomber vertebra seviyesinde bulunur. Karın boşluğunun sağ üst yanında karaciğer bulunması sebebiyle sağ böbrek sol böbreğe göre daha aşağıdadır (40). Her böbrek insanlarda yaklaşık 11,5 cm uzunluğunda, 5-7 cm genişliğinde ve 2,5 cm kalınlıktadır. Sol böbrek sağa göre biraz daha uzun ve dardır (41). Böbrekler ön yüzde, periton aracılığıyla intraperitoneal organlarla komşuluk yapar. Sol böbrek üstte sürrenal gland, üst dışta dalak, üst içte mide, hilus bölgesinde pankreas kuyruğu ve altta ince ve kalın barsakla komşuluk yapar. Sağ böbrek üstte sürrenal gland, üst içte karaciğer, hilusta duodenum ve altta kalın barsakla komşuluk yapar (30,31).

Böbrekleri kenarlarından geçen bir kesitle ikiye ayırarak incelendiğinde renk ve fonksiyon olarak iki farklı bölümden oluştuğu görülür. Daha açık renkli (kırmızı) dış bölüme korteks, daha koyu renkli (kahverengi-kırmızı) ve çizgili bölüme medulla denir. Orta bölümdeki boşluğa sinus renalis adı verilir. Korteks, renal korpüsküller, kıvrımlı ve düz tübülleri, toplama tübüllerini ve kanallarını bulundurur. Medulla renal korpüskül bulundurmaz; düz tübülleri ve toplayıcı kanalları içerir. Böbreğin medial kenarı hilum denilen derin ve vertikal çukur bulundurur. Kan damarları, sinirler ve üreterler bu bölgeden böbreğe giriş ve çıkış yaparlar (41).

Hilumda üreterler genişleyerek renal pelvisi meydana getirirler. Renal pelvis dallara ayrılarak renal kaliksleri oluşturur. Major kalikslerden minör kaliksler oluşur (40). Genelde her bir böbrekte iki major kaliks, 10-12 minör kaliks mevcuttur. Minör kalikslerin uç bölümleri papilla olarak adlandırılır. Her papillanın uç bölümleri toplama kanallarının açılması sebebiyle deliklidir ve papillanın uç bölümlerine *area cribrosa* adı verilir (41). Vertikal kesitlerde her papillanın piramidal şekilli böbrek dokusunun tepe noktasında bulunduğu görülür. Medüller piramid olarak adlandırılan bu bölümler düz seyirli tübüller ve bunlara paralel ilerleyen kan damarları sebebiyle çizgili görünümündedirler. İnsan böbreğinde yaklaşık olarak 8-18 piramid bulunur (42).

Böbreği içten dışa doğru *capsula fibroza*, *capsula adipoza* ve *fascia renalis* olmak üzere üç kılıf sarar. Karın arka duvarında retroperitoneal olarak yerleşen böbrekler bazı hallerde biraz aşağı ve yukarı doğru hareket edebilirler. Üst kısımlarının diafragmaya dayanması sebebiyle derin inspirasyonda 1-2 cm aşağı inerler. Böbrekleri yerlerinde tutan en önemli yapılar böbrek damarları ve *fascia renalis* 'tir. Ayrıca *capsula adipoza* ve pararenal yağ tabakasının da katkısı olur (43). (Şekil-3)



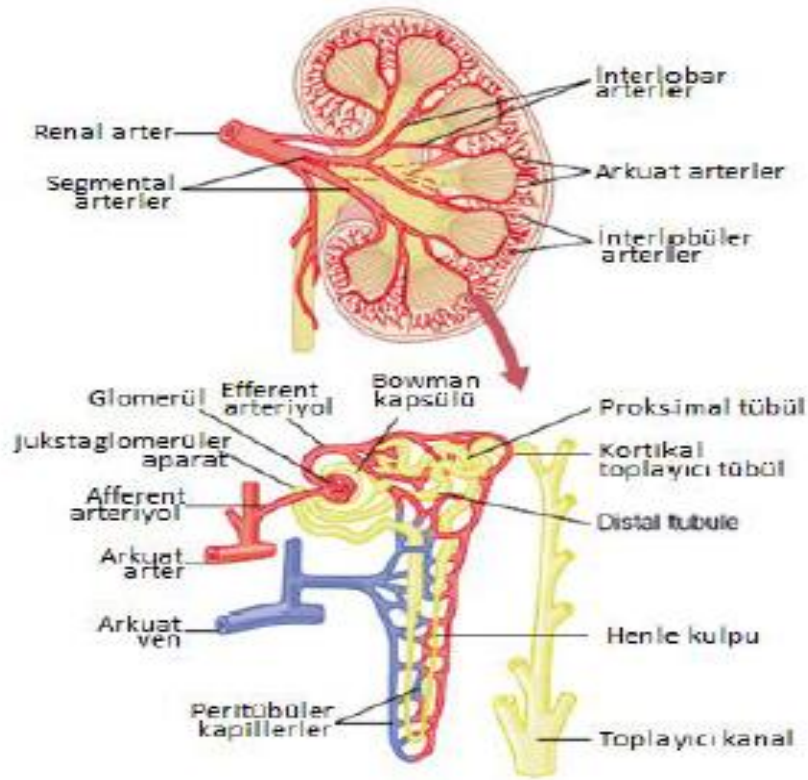
Şekil 3. Böbreğin genel görünümü (44).

Böbreğin kan akımı normal koşullarda kalp debisinin % 22'sidir ve yaklaşık olarak 1100 ml/dk'dır. Böbrek arteri hilum bölgesinde böbreğe giriş yapar. İnterlobar, arkuat, interlobüler arterlere (radyal arter) ve aferent arteriyollere ayrılır (Şekil-4). Aferent arteriyoller, plazma proteinlerinden başka, bol miktarda su ve maddenin filtre edilerek idrar yapımının başladığı yer olan glomerüler kapillerleri meydana getirir (45). Her glomerüler kapillerinin distal ucu toplanarak, böbrek tübüllerini çevreleyen, peritübüler kapiller adı verilen ikinci bir kapiller ağı meydana getirir. Peritübüler kapiller daha sonra venöz sistemin damarları olan interlobüler ven, arkuat ven, interlobar ven, en sonunda böbreği renal arter ve üreterle birlikte terk eden renal veni meydana getirirler. Böbrek kan dolaşımı glomerüler ve peritübüler kapiller olarak iki farklı kapiller yatağı bulunan özel bir dolaşımdır (45).

2.2.2.Fizyoloji

Böbreğin en küçük fonksiyonel birimi olan nefron her bir böbrekte 1 000 000 -1 200 000 kadar bulunur (46,47). Böbrek hasarı, hastalık veya yaşlanma ile nefron sayısı giderek azalır. 40 yaşından sonra işlev gören nefron sayısı her on yıl için % 10 azalır.

Her nefronun; kandan büyük miktarda sıvının filtre olduğu glomerül ve filtre edilen sıvının idrara dönüştüğü toplayıcı tübül olmak üzere iki ana bölümü vardır. Glomerül, diğer kapiller ağlar ile karşılaştırıldığında, daha yüksek hidrostatik basınca (60 mmHg) sahip olmakla beraber, dallanan ve anastomoz yapan kapiller bir ağdan oluşmuştur (48). Nefron, afferent ve efferent arteriyollerden meydana gelen bir kapiller yumağı olan glomerül ile başlamaktadır. Glomerüller özelleşmiş bir kılcal damar ağından oluşmuştur.



Şekil 4. Böbreğin damarları ve kanlanması (49).

Glomerül, renal tübülün genişlemiş ucu tarafından oluşturulan Bowman kapsülü ile sarılmıştır. Bowman kapsülü proksimal kıvrımlı tübülün başlangıcını oluşturur.

Proksimal tübül nefronun metabolik olarak en aktif bölümü olup, glomerüler filtrat hacminin %60-80'inin; filtre edilmiş sodyum ve klorun %70'inin; böbrekten atılan hidrojenin %90'ının; sülfat, fosfat, bikarbonat, glukoz ve potasyumun büyük bir bölümünün geri emilimini sağlar. Proksimal tübül önce Henle kulpunun aşağı doğru inen ince kulpuna boşalır ve yukarı doğru uzanan ilk ince dal, sonra da yukarı doğru çıkan kalın ilmeği oluşturur. Henle kulpunun ana görevi hipotonik ve konsantre idrar üretimini sağlamaktır. Distal tübül yukarı doğru çıkan henle kulpunu toplayıcı tübülle birleştirir. Sodyum, potasyum, klor, hidrojen atılımında ve geri emiliminde görev alır (50,51). Glomerüler filtrasyon hızı (GFH); birim zamanda filtre edilen hacim olarak tanımlanır. Sağlıklı, genç erkek erişkinde, GFH 180 L/gün' dür; bu da 125 mL/dk' ya tekabül eder. İnsanlarda ortalama plazma hacmi yaklaşık 3 litredir, günde plazma hacminin 60 katı kadarı böbrek tarafından filtre edilir (52,53).

Glomerülden filtre edilen sıvı sırasıyla proksimal tübül, henle kulpu, distal tübül ve toplayıcı kanallardan geçer, renal papillaların içinden renal kalikse oradan renal pelvis ve üretere geçer (49,54).

Distal tübülüsün başlangıcı her nefronda, afferent ve efferent arteriyoller ile temas halindedir ve bu üç yapı *jukstaglomerüler apparatus* denen yapıyı oluşturur. Jukstaglomerüler apparatusun görevi renin salgılamak, glomerüler filtrasyon ve renal kan akımının regülasyonunu idare etmektir. Jukstaglomerüler apparatusun distal tübülüsteki değişiklik gösteren hücrelerine *makula densa* denir ve distal tübülüsteki sıvının bileşimine göre jukstaglomerüler apparatusun aktivitesini ayarlar (55). Makula densa tübüldeki sodyum klorür değişikliklerini algılar ve jukstaglomerüler hücrelerden renin salgılanmasını ve aferent arteriol direncinin düzenlenmesine yardım ederek glomerüler hidrostatik basıncı düzenler, böylelikle GFH'nın normale dönmesine yardım eder (49).

Endotelden kaynaklanan nitrik oksit (NO), böbrek damar direncini azaltır ve glomerüler filtrasyonu artırır. Prostaglandin-E₂, Prostoglandin-I₂ ve bradikinin de damarları genişleten ve glomerüler filtrasyonu artıran diğer otakoidlerdir (56).

Vücut homeostazının sağlanmasında, böbreklerin birçok önemli görevi vardır.

Bunlardan bazıları;

- 1- Yabancı maddelerin, metabolik yıkım ürünlerinin, ilaçların ve hormon metabolitlerinin atılması
- 2- Su ve elektrolit dengesinin sağlanması
- 3- Arteriyel basıncın düzenlenmesi
- 4- Asit-baz dengesinin düzenlenmesi
- 5- Eritrosit yapımının düzenlenmesi
- 6- 1,25-dihidroksi vitamin D₃ yapımının düzenlenmesi
- 7- Glikoneojenez (49,57,58).

Normal bir erişkin günde 1000-1500 ml idrar çıkarır. Bu son idrarın başlıca özellikleri şunlardır: Normal koşullarda 0°C'de idrar dansitesi 1015-1025 arasındadır. Yani plazmaya göre hipertondiktir. İdrar dansitesi genellikle idrar miktarı ile ters orantılıdır. Böbrekler fizyolojik koşullarda, organizmanın hidrasyon durumuna göre idrarı dilüe (1001-1002'ye kadar) ve konsantre (1035-1036'ya kadar) etme yeteneğine sahiptir. İdrar dansitesi 1008-1010 civarında ise izoosmotiktir. İdrar pH'sı sabit olmayıp belirli sınırlar içinde değişir. Böylece asit-baz dengesinin regülasyonunda rol oynar. Normal beslenen bir insanın idrar pH'sı 6.2 civarındadır. Ayrıca 4.8'e inebilirdiği gibi 8.2'ye kadar da çıkabilir (49).

2.3.İskemi ve Reperfüzyon

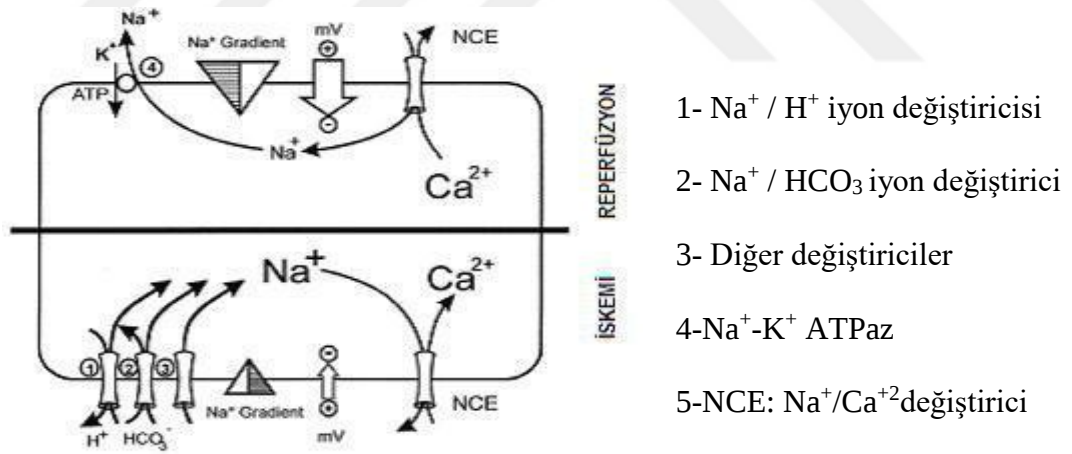
2.3.1.İskemi

İskemi; bir dokunun arteriyel ya da venöz kan akımının pıhtı veya mekanik etken gibi herhangi bir nedenle azalmasına bağlı yetersiz perfüzyonu sonucu dokunun oksijenden yoksun kalması ve beslenmesinin bozulmasına denir. İskemi sonucunda dokunun hipokside kalmasıyla hipoksik doku hasarı ortaya çıkar. İskemiye bağlı hücrelerde pek çok metabolik ve yapısal değişiklikler oluşmaktadır (59,60).

İskemiyle hücrede oksidatif fosforilasyon bozularak hücre içi ATP ve fosfokreatin sentezinde azalmaya neden olur. Sonuçta, asidoz oluşmakta ve boşalan ATP depoları uzun süren iskeminin ardından oluşturulan reperfüzyon sonrası organ canlılığını sürdürmek için yeterli miktarda doldurulamamaktadır. Bu durumda reaktif oksijen türevlerinin (ROS) prekürsörü hipoksantin hücresel içi birikiminin artmasına neden olur. İskemi sonrasında o bölgedeki kan akımının yeniden sağlanması (reperfüzyon) ve hücre içine moleküler oksijenin yeniden sunulması ile birlikte ROS türevleri hızla oluşur. Aynı zamanda iskemi endotel hücrelerinde bazı proinflamatuvar gen ürünlerinin (lökosit adhezyon molekülü, sitokinler vb.) ve biyoaktif bileşiklerin (endotelin, tromboksan A₂, vb.) sentezini artırırken, bazı koruyucu gen ürünlerinin [endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS), siklooksijenaz-2 (COX-2) ve bu enzimlerin ürünlerinin (NO, prostasiklin)] sentezini baskılamaktadır. Geri dönüşümsüz hücre hasarını önleyebilmek için organa/dokuya yeniden kan akımının sağlanması gerekir. Uzun süren iskeminin sonucunda hücrelerin bütünlüğü bozulup hücre ölümü neden olur (60).

İskemide hücre içi asidoz ile anaerobik metabolizma ön plandadır. Bu asidoz ve anaerobik metabolizma Na^+/H^+ değiştiricisini aktive eder. Böylece ATP üretimi için gerekli olan H^+ ortamdan uzaklaştırılır ve hücre içi Na^+ artar. Bununla birlikte ATP tüketimi $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaz enziminin inaktivasyonuna neden olur. Bu da hücre içi Na^+ yükünü artırır. Artan Na^+ yükü de $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{++}$ antiporter sistemini aktive eder. Bu sistem hücre dışına bir adet Na^+ çıkarırken hücre içine bir adet Ca^{++} 'u taşır. Bunun sonucu olarak da hücre içi Ca^{++} miktarı artar. Hücre içi aşırı Ca^{++} yükü hiperkontraktür ve hücre ölümü ile sonuçlanır (Şekil 5), (61).

Aynı zamanda hücre içinde artan Ca^{++} proteaz, lipaz gibi enzimleri aktive ederek de hücre lizisine neden olur (62,63). Reperfüzyon da hücre içi kalsiyumda artış ile ilişkilidir (62).



Şekil 5. İskemi reperfüzyonda sitozolde oluşan değişiklikler.

Hipoksida ATP düzeyinin azalmasına karşın ADP düzeyi artar. Artan ADP'ler önce AMP'ye daha sonra adenosin, inozin ve en sonunda hipoksantine dönüşür (Şekil 6), (62).

Hipoksinin devamı durumunda ortamda O_2 olmadığından ksantin, NAD ve H^+ ile reaksiyona girerek ürik asit, NADH ve H^+ oluşturur. Ortamda O_2 varsa onunla reaksiyona girer ve ürik asit, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit (O_2^-) radikali oluşturur (62).

İskemi esnasında O_2 yetersizliği ATP sentezinde azalmaya; bu da hücrede enerji açığına neden olur (64). Hücrede enerji açığı, Na^+ pompasının çalışmamasına; K^+ hücre dışında, Na^+ ve suyun hücre içinde birikimine neden olur. Organellerde ve hücrenin tamamında şişme ortaya çıkar. Granüllü endoplazmik retikulumdan ribozomlar ayrılarak protein sentezi durur (65).

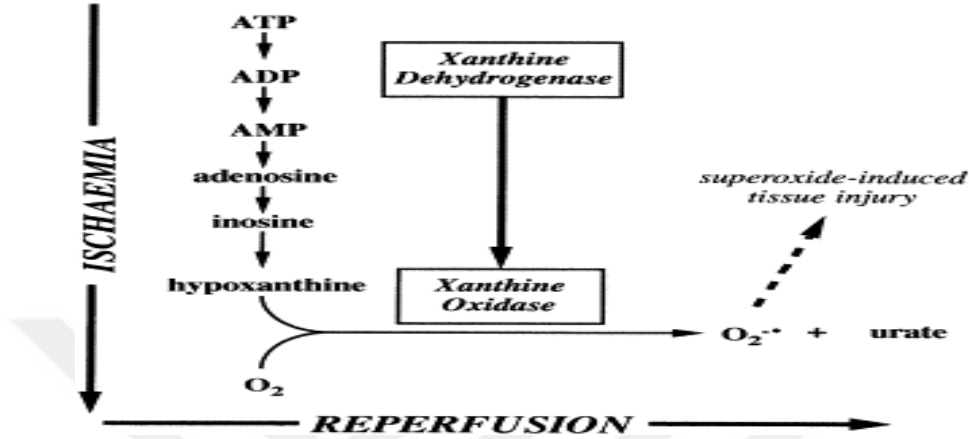
Hücre iskeletinin bozulması ve böbrekte özellikle proksimal tübüllerdeki mikrovillusların kaybıyla devam eden süreç, tübüllerde yüzey alanının ve emilim etkinliğinin azalmasıyla sonuçlanır (66). Tübüllerdeki bu fonksiyon bozukluğu, distal bölümlere ulaşan solüt miktarını artırır, bu da tübüloglomerüler geribildirim mekanizmasıyla böbrek medullasında kortekse göre az olan kan akımını vazokonstriksiyonla daha da azaltır. Hem hayvan hem de insan böbrek I/R durumlarında reperfüzyondan sonra toplam böbrek kan akımındaki ve GFH miktarındaki düşmenin sebebinin bu glomerüler geribildirim mekanizması olduğu düşünülmektedir (66).

İskemiye bağlı hasarın şiddeti, hipoperfüzyonun süresi ve miktarı ile orantılı olup, hücrenin tipi, yaralanmaya karşı hassasiyeti, diferansiyasyonu, kan ihtiyacı ve metabolizmasına göre farklılık gösterir. İskemiye bazı dokular dirençli iken (kemik, deri), bazı dokular hassastır (iskelet kası, böbrek) (67).

2.3.2.Reperfüzyon

Reperfüzyon, iskemide kalan dokuya kan akımının ve bununla birlikte O₂'nin tekrar gelmesidir, yani dolaşımın düzeltilmesidir. Reperfüzyonun, iskemik dokuda enerji ihtiyacının sağlanması ve toksik metabolitlerin uzaklaştırılması gibi iki olumlu etkisi vardır. Reperfüzyon iskemik hasarın düzeltilebilmesi için gerekli bir süreçtir. Kısa süreli iskemilerde reperfüzyon hasarının şiddeti hafif olurken, iskemi süresinin uzun ve geri dönüşümsüz hasarın olduğu durumlarda reperfüzyonla birlikte hücrelerin kurtarılması mümkün olmayabilir. Eğer hücrede geri dönüşümsüz hasar oluşmamış ise enerji depolar ve hücrel homeostaz geri kazanılır. Reperfüzyon sağlanırken iskemik hücreler geri dönüşümsüz hasara uğrayabilirler. Hatta reperfüzyon sonucunda ortaya çıkan hasar iskeminin tek başına oluşturduğu hasardan daha fazla olabilir. Bu fenomeni açıklamaya yönelik bir takım hipotezler geliştirilmiştir. İskemi sırasında bazı hücrelerin hasara karşı duyarlı hale gelebileceği ve reperfüzyon sırasında ortaya çıkan bazı zararlı etkenler karşısında bütünlüklerini kaybedebilecekleri ileri sürülmüştür. Duyarlı hale gelmiş bu hücreleri öldürebilen en olası zararlı etkenin SOR olduğu ileri sürülmüştür. Bunlar endotel ve parankimal hücrelerden ve inflamasyon nedeniyle dokuya nüfuz etmiş nötrofillerden kaynaklanabilir. SOR lipid peroksidasyonu ile membranlara zarar verebildikleri gibi, protein, deoksiribonükleik asit (DNA) ve mitokondrilere de zarar verebilirler. Bunun dışında reperfüzyon esnasında hücre içine Ca⁺⁺ akümüülasyonunun masif bir hal aldığı ve ardından Ca⁺⁺ un özellikle mitokondrilere alınmasının reperfüzyon hasarının belkemiğini oluşturduğu yönünde kanıtlar mevcuttur.

İskemi sırasında dokuda oluşan metabolitler sirkülasyon olmadığından dokuda birikir. Kan akımının normale dönmesiyle (reperfüzyon) oluşan metabolitlerin oksidasyonu sonucu oluşan maddeler dolaşıma karışır ve kan yolu ile tüm vücuda yayılarak uzak organ hasarından sorumlu olurlar (68).



Şekil 6. İskemi-reperfüzyonda oksijen radikali oluşumu (62)

2.3.3.İskemi Reperfüzyon Hasarı Mekanizmaları

İskemik dokunun infarktüsden kurtulması için reperfüzyon şarttır. Ancak reperfüzyon iskeminin dokuda yapmış olduğu hasarı artırarak infarkt sahasının genişlemesine neden olur. Bu olayların tamamına birden “reperfüzyon hasarı” adı verilir. İskemiye maruz kalan her dokuda reperfüzyon hasarı oluşur (68). Böbrek İ/R hasarı, ciddi doku ve organ hasarına neden olan hemorajik şok, vasküler cerrahi, parsiyel nefrektomi, kazara ya da iatrojenik travmada sık karşılaşılan ciddi bir klinik durumdur. Böbrek İ/R hasarının altında yatan mekanizmalar karmaşık ve tam olarak aydınlatılamamıştır. Böbrek İ/R hasarı patogeneze katkıda bulunan önemli bir yol oksidatif stresdir. Böbrek kan akımı kesilmesi ve reperfüzyon sonrası akut oksidatif stres cevabı ROS üretimine neden olur. Sonuç olarak, ROS’un fazla üretimi lipid peroksidasyonu, DNA mutasyonu ve apoptotik ve nekrotik kaskadlar kaynaklı çeşitli yollarla hücre ölümüne neden olur (69). Reperfüzyon sonucu meydana gelen hasar, hasarlı doku ya da organlardaki inflamatuvar cevap nedeniyle meydana gelmektedir.

Oksijenlenmiş kanın tekrar dokuya dönmesiyle lökositler bu bölgede birikir ve interlökinler gibi inflamatuvar faktörler aynı zamanda doku hasarı sonucu oluşan serbest radikaller salınır. Tekrar normale dönen kan akışı ile hücresel proteinler, DNA ve plazma membranı hasar görmektedir. Hücre membranına verilen zarar çok daha fazla serbest radikalın salınımına neden olmaktadır (68).

İskemi reperfüzyon hasarından sorumlu tutulan mekanizmalar olarak SOR, proinflamatuvar mediatörlerin artması, lökosit infiltrasyonu, Ca^{++} yüklenmesi, fosfolipit peroksidasyonu ve azalması ileri sürülmektedir (70).

İskemik dokunun reperfüzyonu sırasında dokuya sağlanan O_2 ve metabolitler, hasarı geriletebileceği gibi hasarın ilerlemesine de neden olabilir. Bu ince çizgi, iskemik hasarın geri dönüşümlü olup olmadığına bağlıdır.

Jiang ve ark. çalışmalarında, böbrek iskemi hasarlarının özellikle süperoksid radikalleri üretiminin artmasına, yüksek lipid peroksidasyonu ve alt enzimatik antioksidan savunma ile ilişkili olduğunu göstermektedir (69).

Böbrek yüksek enerji gereksinimi ve karmaşık mikrovasküler damar ağı nedeniyle İ/R hasarına çok duyarlıdır. Böbrek İ/R hasarı transplantasyon sonrası gecikmiş greft fonksiyonu, şok komplikasyonu ve kardiyak veya aortik cerrahide artmış mortalite ve morbidite ile ilişkilidir (71).

İskemi reperfüzyon hasarı öncelikle böbreğin hipoksiye duyarlı kısmından başlar. Böbreğe gelen kan akımının büyük kısmı renal korteksten geçer ve renal medullanın kanlanmasını sağlayan *vasa recta*ya çok az kan gider, bu da renal medullayı hipoksiye daha duyarlı hale getirir. Medüller hipoksi ayrıca hücresel enerji depolarının azalmasına, endotel ve düz kas hücrelerindeki aktin hücre iskeletinin bozulmasına neden olur.

Bunun sonucu ise hücresel deformite ve çevre dokulardaki hipoksinin artmasıdır. Renal hasar öncelikle tübülüslerde oluşur. Nedeni iskemiye bağlı gelişen tübüler nekrozdur. Genellikle geriye dönüşümlüdür, reperfüzyonla birlikte 1-2 hafta içinde tübül fonksiyonları normale dönmektedir (72).

İskemi reperfüzyon hasarından kaynaklanan ABH, GFH' da azalma, tübüler hücre hasarı ve nekroz, glomerüler hasar ve hücre artıkları kaynaklı tübüler obstrüksiyon belirtileri ile karakterize karmaşık ve dinamik bir süreçtir (73).

2.3.4.Serbest Radikaller

Serbest radikaller (SR) için birçok tanım yapılmasına rağmen otoritelerin üzerinde birleştiği tanım; moleküler ya da atom yörüngesinde genelde çok reaktif olan çiftleşmemiş elektron bulunduran bir kimyasal ürün olduğu şeklindedir (74). Atomlardaki elektronlar yörünge olarak bilinen boşluklarda hareket ederler. Her yörüngede birbirine zıt yönde hareket eden en fazla iki elektron bulunur. Paylaşılmamış elektrona sahip moleküller kararsız bir haldedir. Başka bir molekülle etkileşime girerek, dış yörüngesindeki elektronu eşleme ve kararlı duruma gelme eğilimindedirler (75). SR, başlıca 3 temel mekanizma ile oluşurlar:

1. Kovalent bağların homolitik kırılması ile
2. Normal bir molekülün elektron kaybetmesi ile
3. Normal bir moleküle elektron transferi ile (74).

Serbest radikaller organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında oluşabildiği gibi, dış etkenlerin etkisiyle de oluşmaktadır. Çok kısa yaşam süreli, ancak yapılarındaki dengesizlik nedeniyle çok reaktif olan SR, tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliği göstermektedir ve yararlı biyomoleküllerin fonksiyonlarını yitirmesine neden olmaktadır (76).

Serbest oksijen radikalleri aerobik hücrelerde normal metabolizma esnasında oluşmasının dışında; inflamasyon, İ/R, bazı ilaçların alınmasıyla, radyasyon, hiperoksi gibi durumlarda da oluşur.

Tablo 1: Serbest radikallerin başlıca kaynakları (76).

A-Endojen kaynaklar
Mitokondrial elektron transport zinciri
Endoplazmik retikulum
Redoks döngüsü
Araşidonik asit metabolizması
Fagositik hücreler (monosit ve makrofajlar vs.) ve endotelial hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar
Ksantin oksidaz, redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz vs. enzimler
Otooksidasyon reaksiyonları
B-Ekzojen Kaynaklar
Diyet faktörleri
Çevresel faktörler (hava kirliliği)
İlaçlar, ksenobiyotikler
Zararlı ışınlar (X ışınları, ultraviyole)

Biyolojik sistemlerdeki SR'nin en önemli kaynağı O_2 ' dir. O_2 ' nin dış yörüngesinde eşleşmemiş 2 tane elektronu bulunması nedeniyle diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girebilir. Son ürün olarak suya indirgenir ve bu arada kısmi redüksiyonla çok sayıda yüksek derecede reaktif ürünler de oluşabilir (74,77).

Oluşan bu radikaller endojen mekanizmalarla etkisiz hale getirilirler. İskemi sonrası reperfüzyon safhasında oluşan SOR düzeyi vücut savunma sistemlerini aştığından lokal ve sistemik etki oluşmasına neden olur (78).

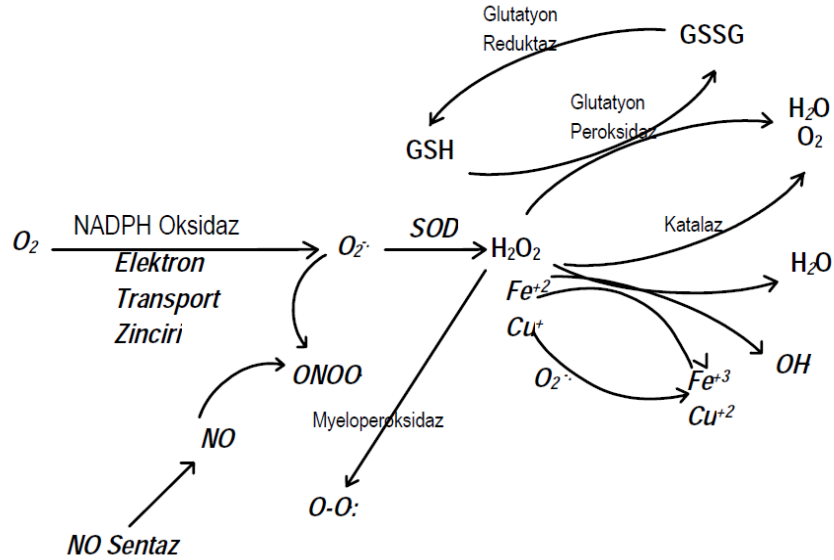
Tablo 2. Oksijen Bileşikleri.(79)

Reaktif Bileşikler	Reaktif Olmayan Bileşikler
O_2^- : Süperoksit	H_2O_2 : Hidrojen peroksit
OH^- : Hidroksil	O_2 : Oksijen
HO_2^* : Hidroperoksil	$HOCl$: Hipokloröz asit
RO^* : Alkoksil	$ONOO^*$: Peroksinitrit radikali
NO^* : Nitrik Oksit	O_3 : Ozon
NO_2^* : Azot Dioksit	$LOOH$: Lipid hidroperoksit

2.3.5.Reaktif Oksijen Türleri

2.3.5.1.Süperoksit Radikali (O_2^-)

Tüm aerobik hücrelerde O_2 ' in bir elektron alarak indirgenmesi sonucu O_2^- anyonu meydana gelir. Genellikle mitokondriyal elektron transfer zincirinde NADH' ın okside nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+)' a oksidasyonu ile üretilir (Şekil-7), (77).



Şekil 7. Serbest radikallerin oluşumu ve enzimatik detoksifikasyonu (77,80)

Asıl önemi hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. O_2^- spontan ve SOD enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonlar sonucunda, dismutasyona uğrayarak H_2O_2 ve O_2 'ye dönüştürülür (81,82).

2.3.5.2.Hidrojen Peroksit

Doğal oksijen molekülü başka bir molekülden iki elektron almışsa peroksit oluşur. Peroksit molekülü iki hidrojen (H^+) molekülü ile birleşirse H_2O_2 oluşur. H_2O_2 süperoksitin SOD ile dismutasyonu sonucu veya spontan olarak da üretilmektedir. H_2O_2 aslında radikal değildir. Ancak üretildiği bölgede kalan süperoksitin aksine membranları geçen, sitozole diffüze olan ve uzun ömürlü bir oksidan olarak bilinir. Bu nedenle süperoksitin ulaşamadığı membranla korunan yapılara kolaylıkla ulaşabilir. Burada süperoksitle reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici radikal olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir (Haber-Weiss reaksiyonu). H_2O_2 başka bir şekilde de serbest Fe^{+2} ile reaksiyona girerse demir okside olurken hidroksil radikali oluşur (Fenton reaksiyonu). H_2O_2 de bakterilere karşı lokosit defansının diğer bir komponentidir (80). H_2O_2 , CAT ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) tarafından toksik olmayan ürünlere dönüştürülür (59)

2.3.5.3.Hidroksil Radikali ($\text{OH}^\cdot$)

Bilinen en reaktif radikaldır, biyolojik sistemlere en fazla hasar yapan oksijen radikalidir. Yarı ömrü çok kısa olup hücrede meydana geldiğinde ikincil reaksiyonlara sebep olur ve yakındaki diğer hücresel yapılara saldırır (83). Amino asitler, nükleik asitler, organik asitler, fosfolipidler ve şekerler gibi biyokimyasal maddelerin birçoğu ile reaksiyona girebilir (84).

2.3.6.Reaktif Nitrojen Türleri

2.3.6.1.Nitrik Oksit (NO)

Lipid ve suda çözünen serbest radikal bir gazdır. Endojen NO oluşturan tek kaynak NO sentaz (NOS) enzimleridir. L-argininin L- sitruline metabolizması sırasında oluşur. Bu oluşum esnasında moleküler oksijen ile, kofaktör olarak, NADPH, flavin adenin dinükleotid, flavin mononükleotid ve tetrahidrobiyopterin ihtiyacı vardır (85).

Radikal olarak reaktivitesi düşük olan NO, metal içeren merkezler ve radikaller ile büyük bir hızla tepkimeye girer. Süperoksit ile NO arasındaki tepkime ile oluşan peroksinitrit, hidroksil radikali benzeri aktiviteye sahip olup radikalik tepkimeleri başlatmaya ilave olarak biyomoleküllerin nitrasyonuna neden olur. Fizyolojik derişimde üretilen NO, esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrata oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır. Oksijen radikallerindeki durumun aksine, NO'ı ortamdaki temizleyen herhangi bir özel enzim yoktur. Aerobik ortamda NO stabil değildir, derişiminin artması ile oksidasyonu hızlanır. Bu nedenle ortamdaki derişimi ile kendi ömrü arasında ters bir orantı vardır (86).

Nitrik Oksit; nörotransmisyon, kan basıncı regülasyonu, savunma mekanizmaları, düz kas gevşemesi ve immün regülasyon gibi çeşitli fizyolojik olaylarda rol olan önemli bir oksidatif biyolojik sinyal molekülüdür (87).

2.3.7.Serbest Radikallere Bağlı Hücresel Hasar

Serbest radikallerin yüksek konsantrasyonları lipidler, nükleik asitler ve proteinlerin hücresel hasarlanmasında önemli rol oynarlar (75).

Lipidler SR'ye en hassas moleküllerdir. Hücre membranlarında bulunan yağ asitleri ve kolesterolün doymamış bağları SR ile kolayca reaksiyona girebilir. Çoklu doymamış yağ asitlerinin ROS'a maruz kalması lipid peroksidasyonu olarak tanımlanır. Lipid peroksidasyonunun ilk aşamasında yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren H atomu çıkarılması ile lipid radikali ($L^{\cdot}$) oluşur. $L^{\cdot}$ de oksijenle reaksiyona girerek lipid peroksit radikalini (LOO) oluşturur. LOO' da diğer doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girer. Böylece zincirleme bir reaksiyon başlamış olur. Ayrıca lipid peroksitler ortamdaki H atomları ile de reaksiyona girerek lipid hidroperoksitleri (LOOH) oluştururlar. Lipid peroksitler daha sonra malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksi nonenal gibi yıkım ürünlerine dönüşürler. Bu yıkım ürünleri de DNA ya da proteinler ile reaksiyona girebilir ve mutajeniktirler. MDA, üç veya daha fazla çift bağa sahip yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşmaktadır. MDA lipid peroksidasyonunun şiddetiyle orantılı olarak artar, ancak spesifik değildir. Aynı zamanda membran bileşenlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmasına neden olabilir (80).

DNA'nın temel yapı taşı olan nükleotidin yapısı içinde yer alan purin ve pirimidin bazları ve deoksiriboz bağlanma bölgesi oksijen radikallerinin etkilerini gösterdiği bölgelerdir. Özellikle guanin bazının bu radikaller aracılığı ile hidroksilasyonu sonucunda DNA molekülünün yapısı değişmekte ve mutasyonlar ortaya çıkmaktadır (75,88).

2.3.7.1. Polimorf Nüveli Lökositler (PMNL)

Reperfüzyon hasarını önlemeye yönelik yapılan çalışmalar, mikrovasküler permeabilitedeki artıştan başlıca nötrofillerin sorumlu olduğunu göstermiştir. İ/R ile lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit endotel hücre adhezyonu meydana gelir (89). Ayrıca, PMNL yüksek miktarda SOR üretme kapasitesine de sahiptir. İskemi reperfüzyon sırasında PMNL'ler, mikrovasküler tıkaç, SOR üretimi, sitotoksik enzim salınımı, vasküler geçirgenlikte artış, sitokin salınımının da artış gibi önemli rol üstlenerek hücre hasarına neden olurlar (90,91).

Aktive olmuş lökositler, Fosfolipaz A₂ aktivasyonu ile Araşidonik asit metabolitleri üretimi, lizozomların degranülasyonu sonucu sitotoksik enzimlerin salınımı ve SOR üretimini gerçekleştirirler. Sonuçta endotel hasarı ve doku zedelenmesi ile inflamatuvar yanıt sonucunda, mikrovasküler permeabilite artışı, ödem, tromboz ve parankim hücre ölümü gerçekleşir (92).

Reperfüzyon sonrasında, arteriyollerde endotel bağımlı dilatasyonun bozulmasına, kapillerlerde lökosit tıkaçlarının oluşmasına ve postkapiller venüllerde plazma proteinlerinin damar dışına geçmesi ile mikrovasküler fonksiyonun bozulmasına neden olur. Sonuçta endotel hücrelerinden fazla miktarda SOR üretilirken NO oluşumu ise azalır. Süperoksit radikali ile NO arasındaki dengenin bozulması, endotel hücrelerinden Platelet Aktive Edici Faktör (PAF), Tümör Nekroz Faktör-alfa (TNF- α) gibi inflamatuvar mediyatörlerin salınmasına ve lökosit-endotel hücre adhezyonuna aracılık eden adhezyon moleküllerinin biyosentezinin artmasına sebep olur (93).

Serbest radikallerin oluşumunda ve İ/R hasarında önemli bir kaynak olan nötrofillerde NADPH oksidaz, elastaz ve miyeloperoksidaz enzimlerini içerirler. Bu enzimler oksidan doku hasarında önemli roller üstlenir, aktive nötrofillerde ksantin oksidaz'ın artması ile SOR üretimi olur. İskemi sonrası reperfüzyonun başlaması ile birlikte, dokuya sunulan oksijenin yaklaşık % 70'i NADPH bağımlı oksidaz ile süperoksit iyonlarına oksitlenmektedir. Süperoksit iyonu, çoğu kez spontan dismutasyonla H₂O₂'ye dönüşür. H₂O₂ ise klorür iyonlarının varlığında miyeloperoksidaz enzimi aracılığı ile hipoklorik aside indirgenir. Hipoklorik asit güçlü bir oksidandır. Nötrofillerin aktivasyonu ile nötrofil sekonder granüllerden salıverilen Apolaktoferrin, Plazminojen Aktivatörü, Kompleman (C)'ı aktive eden enzim ve Elastaz, Kollajenaz, ve Jelatinaz gibi proteolitik enzimler damar endotelinde hasara neden olmaktadır. Proteinazların etkisi ile damar duvarında yapının değişimi ve duvar yapısının gevşemesi ile nötrofillerin dokuya göçü kolaylaşır (94).

2.3.7.2.Kompleman Sistemi

İskemi reperfüzyon hasarında kompleman sisteminin aktivasyonu ile proinflatuar komponentler oluşur. Bunlar C3a, C5a, iC3b ve C5b-9'dur. C3a ve C5a anaflatoksinlerdir ve lökositleri aktive ederler. Lökosit aktivasyonu ve kemotaksisin uyarılmasına ek olarak C5a, Makrofaj İnflamatuvar Protein (MIP)-2, MIP-1a, MIP-1b, TNF- α , İnterlökin-1 (İL-1) ve İL-6 üretimini uyarak inflamatuvar yanıtını artırır. C5b9 endotelde İL-1a, İL-8 salgısını uyarak lökosit aktivasyonu ve kemotaksisi artırır. Aynı zamanda endotel bağımlı vazodilatasyonu inhibe ederek ve endotelde siklik guanozin monofosfatı azaltarak vasküler tonusu bozar (95,96).

2.3.7.3.Endotel Hücresinin Rolü

Oksidatif stres endotel hücrelerinin aktivasyonuna ve işlevlerinin bozulmasına neden olur. Endotel hücreleri hem SOR üretim kaynağı olup hem de hedef konumundadır. Endotel, mikrovasküler homeostazdan sorumlu olan Endotelin'i ve NO'ı üretir. NO arteriyel dolaşımda Endotelinin vazokonstriktör etkisini tersine çevirme eğilimindedir. Venlerde ise bunun tersi söz konusudur. İ/R hasarında Endotelin/NO oranı endotelin lehine bozulur. Sonuçta arteriyel vazokonstriksiyon, venlerde vazodilatasyon olur (97). Endotel hücrelerinin oksidatif stresi sonucu kompleman aktive edilir ve lökosit adhezyon moleküllerinin üretimi artar. SOR etkisi ile endotel hücreleri hasara yanıt olarak İL-1, PAF, prostaglandinler (PG I2, PG E2), büyüme faktörleri, endotelin, NO ve tromboksan A2 (TxA2) salgırlar. Aktive olan endotel hücreleri ek olarak kendi bazal membranlarını sindiren kollajenazlar salgılama yeteneğindedir (98).

2.3.7.4.Platelet Aktive Edici Faktör (PAF)

Endotel hücreleri tarafından Fosfolipaz A2'nin etkisiyle membran fosfolipidlerinden üretilir. Trombositlerin şekil değişikliğine, agregasyonuna ve granül içeriğinin salınmasına yol açar. Ek olarak PAF kuvvetli bir nötrofil aktivatör bir maddedir ve TNF- α üretiminde önemli bir rol oynar. Dokuların reperfüzyonu sonucu lökositlerin aktivasyonuna, adhezyon ve vasküler geçirgenlikte artışa yol açar. Pek çok çalışmada PAF'ın in vitro ve in vivo ortamda lökositlerin mikrovasküler endotele adhezyonunu arttırdığını göstermiştir. PAF'ın, reperfüzyon sonucu gerçekleşen kemotaksisin bir düzenleyicisi olduğu düşünülmektedir (99).

2.3.7.5.Sitokinler

Reperfüzyon sonrası, dolaşıma İL-1, İL-6 ve TNF- α gibi sitokinler salınır. Bu ajanlara karşı antagonistler kullanılarak, hem İL-1'in hem de TNF- α 'nın vasküler yaralanmaya katkıda bulundukları ve endotel adhezyon moleküllerini arttırdıkları gösterilmiştir (99). İ/R'da sitokin salınımının bilinmesine rağmen bu sitokinlerin permeabilite üzerine olan etkilerinin direk mi yoksa hücre adhezyon molekülleri ekspresyonu ve nötrofil adhezyon aktivasyonu yoluyla mı olduğu bilinmemektedir (100).

2.3.8.Antioksidan Savunma Sistemleri

Reaktif oksijen türevlerinin oluşumunu engelleyen ve oluşuktan sonra meydana getirdiği hasarı önleyici çeşitli antioksidan savunma mekanizmaları vardır. Vücutta oksidan ve antioksidan mekanizmalar arasında bir denge olmakla birlikte, bu dengenin bozulduğu durumlarda oksidatif stres meydana gelir (101).

Endojen veya eksojen kaynaklı olan bu savunma sistemi oldukça karmaşıktır (102).

Tablo 3. Organizmada bulunan endojen antioksidan savunma sistemleri

ENZİMLER	YAĞDA ÇÖZÜNEN RADİKAL TUTUCULAR
Süperoksit dismutaz	E Vitamini
Katalaz	β -Karoten
Glutasyon peroksidaz	Bilirubin
Glutasyon redüktaz	Ubikinol
Glikoz-6-fosfat dehidrogenaz	Flavonoidler
Sitokrom oksidaz	Melatonin
SUDA ÇÖZÜNEN RADİKAL TUTUCULAR	METAL İYONLARINI BAĞLAYAN PROTEİNLER
Glutasyon	Fenitin
C Vitamini	Transferrin
Ürik asit	Haptoglobulin
Glikoz	Hemopeksin
Sistein	Seruloplazmin

Endojen antioksidanlar enzimatik veya nonenzimatik olabilirler. A, C ve E vitaminleri, glutasyon, karotenoidler, alfa lipoik asit, koenzim-Q10, mineraller (bakır, çinko, mangan, selenyum), kofaktörler (folik asit, ürik asit, albumin, vitamin B₁, B₂, B₆, B₁₂) nonenzimatik antioksidanlardır. Enzimatik antioksidanlar ise SOD, CAT, GSH-Px, glutasyon-S transferaz (GST), glukoz 6 fosfat dehidrogenazdır (103).

Eksojen antioksidanlar; ilaçlar, gıdalar ve vitaminlerde doğal ve yapay olarak bulunan antioksidanlar olarak sınıflandırılabilirler (104).

İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar şunlardır; troloks-C (vitamin E analoğu), endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Px aktivitesini artıran ebse-len ve asetilsistein), ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten), rekombinant SOD, NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar, dipheny-line iodonium), sitokinler (TNF ve İL-1), nonenzimatik SR toplayıcılar (mannitol, albümin), demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferoksamin), nötrofil adezyon inhi-bitörleri, barbitüratlar, demir şelatörleridir (104).

2.3.8.1.Süperoksid Dismutaz (SOD)

Metalloprotein yapıda olan SOD, O_2^- molekülünü O_2 molekülüne yükseltge-yip, diğer O_2^- molekülünü H_2O_2 'ye indirger. İki tip SOD vardır. Birincisi sitozolde bulunan dimerik yapıdaki bakır ve çinko içeren SOD (Cu-Zn SOD); ikincisi ise mi-tokondride bulunan tetramerik yapıdaki mangan içeren SOD (Mn SOD)' dir (77). Bu reaksiyon “oksidatif strese karşı ilk savunma” olarak da adlandırılmaktadır. Çünkü süperoksit zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü bir başlatıcısıdır. Bu sistem sa-yesinde hücrel kompartmanlardaki süperoksit düzeyleri kontrol altında tutulmaktadır. Aynı zamanda SOD, lipid peroksidasyonunu da inhibe etmektedir. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanan dokularda fazladır (105).

2.3.8.2.Katalaz (CAT)

Hemoprotein yapıdaki CAT peroksizomlarda lokalizedir. H_2O_2 'yi oksijen ve suya indirger. CAT aktivitesi en fazla eritrosit, karaciğer ve böbrektedir (80). Yapılan çalışmalarda diyabetlilerde serum CAT aktivitesinde artış olduğu saptanmıştır (106). CAT hücrenin kendi respiratuar patlamasına karşı koruyucu olarak hizmet etmektedir (105).

2.3.8.3. Malondialdehit (MDA)

Malondialdehit, poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu meydana gelir ve tiyobarbutirik asit reaktif substans (TBARS) olarak ölçülmektedir. MDA, spesifik olmamakla birlikte lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon göstermektedir (80). Serbest radikallere bağlı hücre hasarındaki en önemli mekanizmalardan biri lipid peroksidasyonudur (107).

2.3.8.4. Glutasyon S-Transferaz (GST)

Glutasyon S-transferaz dimerik yapıda olup sitozolde bulunur. Yabancı maddelerin biyotransformasyonunda rolleri olan GST'ler çeşitli endojen ve eksojen bileşiklerin GSH ile konjugasyonunu katalize eder (108).



2.3.8.5. Mitokondrial Sitokrom Oksidaz

Solunum zincirinin son enzimi olan sitokrom oksidaz süperoksit radikalini suya çevirerek etki göstermektedir (105).

2.3.8.6. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) ve Glutasyon Redüktaz (GSH-R)

Gerek H_2O_2 ve gerekse lipid peroksitleri metabolize etmektedir. Selenyum-bağımlı ve Selenyum-bağımsız iki farklı tipi vardır. Selenyum-bağımlı tipi H_2O_2 ve Lipid peroksitleri, Selenyum-bağımsız tipi sadece Lipid peroksitleri metabolize eder. Bu reaksiyonlar esnasında Glutasyon hidrojen verici olarak görev yaptığından H_2O_2 ve Lipid peroksitleri indirgenirken Glutasyon ise okside Glutatyona dönüştürür. Okside Glutasyon ise NADPH bağımlı GSH-R tarafından tekrar Glutatyona indirgenir.

GSH-Px‘ın fagositik hücrelerde de önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında SR etkisi ile fagositik hücrelerin zarar görmesini önler. GSH-Px eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır (109).

2.3.8.7.Melatonin

Melatonin, hidroperoksitleri metabolize eden GSH-Px enzimini aktive ederek, O_2 radikalini H_2O_2 ‘ye kataliz eden SOD aktivitesini artırarak, oksidatif stres esnasında CAT aktivitesindeki azalmayı önleyerek ve NO oluşumundan sorumlu NOS enzimini inhibe ederek, antioksidan etki göstermektedir (110).

2.3.8.8.Vitamin E

Vitamin E yağda eriyen çok güçlü bir antioksidandır, hücre zarı fosfolipitlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerini SR etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur. Vitamin E, O_2^- ve OH^- , LOO ve diğer radikalleri indirger (111).

2.3.8.9.Vitamin C

Vitamin C suda çözünen en güçlü antioksidan moleküldür. Organizmada kolayca dehidroaskorbik aside oksitlenebilir. O_2^- , OH^- ile kolayca reaksiyona girerek onları etkisizleştirir. Askorbik asit proteine bağlı ferrik demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan indirgeyerek Fenton reaksiyonunda H_2O_2 ile etkileşmeye ve sonunda OH^- oluşturmaya uygun ferröz demire dönüştürür. Bu özelliğinden dolayı vitamin C, SR reaksiyonlarının önemli bir katalizörü veya bir prooksidan olarak değerlendirilir (112).

2.3.8.10. Vitamin A

Vitamin A'nın ön maddesi olan β -karotenin Moleküler Oksijeni bastırabildiği, O_2^- 'ı temizlediği ve OH^- , alkoksil ve peroksil radikalleriyle direkt olarak etkileşerek antioksidan görev gördüğü ve lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu önleyebildiği saptanmıştır. Moleküler Oksijen uzaklaştırıcı olarak bilinen en güçlü karotenoid likopendir (113).

2.4. Total Antioksidan Durum (TAS)

Birçok oksidan ve antioksidan molekülün serum veya plazma düzeylerini ölçen çeşitli analitik yöntemler bulunmaktadır (114). Ancak bu moleküllerin ayrı ayrı ölçülmesi hem zaman alıcı, hem de zordur. Ayrıca ekonomik yönden de zorlayıcıdır. Bu nedenle “total antioksidan durum” ya da “total oksidan durum” ölçümü bir örnekteki oksidan ve antioksidan moleküllerin ayrı ayrı ölçülmesinden daha pratiktir (115,116). Bir örnekteki total antioksidan düzeyi, antioksidan aktivite (TAA) (117), total antioksidan güç (TAOP) (118,119), total antioksidan durum (80) veya total antioksidan kapasite (TAC) (120,121) olarak da ifade edilmektedir.

Total antioksidan durum ölçümü için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerde bir radikal oluşturularak bu radikale karşı örneğin antioksidan aktivitesi ölçülür. En yaygın kullanılan kolorimetrik yöntemler, 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat) (=ABTS) kullanan yöntemlerdir. Renksiz indirgenmiş ABTS molekülü, mavi-yeşil renkli $ABTS^+$ radikale okside edilir. Renkli $ABTS^+$ radikali, okside olabilecek herhangi bir molekül ile karıştırılırsa yeniden orijinal renksiz ABTS formuna dönüşür, reaksiyona giren madde ise okside olur. Bu özellik ABTS kullanan yöntemlerin temelini oluşturur (120,122,123).

2.5.Total Oksidatif Durum (TOS)

Vücudumuzda mevcut oksidan ve antioksidan dengenin, oksidanlar lehine bozulması sonucu meydana gelen patolojik durum oksidatif stres olarak adlandırılır. Oksidatif stresin toplam değeri Total Oksidatif Durum (TOS) olarak ifade edilir (124). Bu durum, aşırı miktarda reaktif oksijen radikali veya nitrojen radikallerinin oluşumu veya antioksidan tampon sisteminin yetersizliği sonucu ortaya çıkar. Reaktif oksijen ve radikallerinin seviyelerindeki artış ise hücrelere toksik etki yapar ve hücrenin lipid, protein ve DNA benzeri moleküllerine zarar verir.

Yöntemin esası, örnekteki oksidanların ferroz iyon-şelatör kompleksini ferrik iyonlara okside etmesine ve oluşan ferrik iyonların asidik ortamda kromatojen madde ile renk oluşturması esasına dayanır (120). Spektrofotometrik olarak ölçülen rengin yoğunluğu örnekteki oksidan moleküllerin total miktarı ile ilişkilidir.

2.6.Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

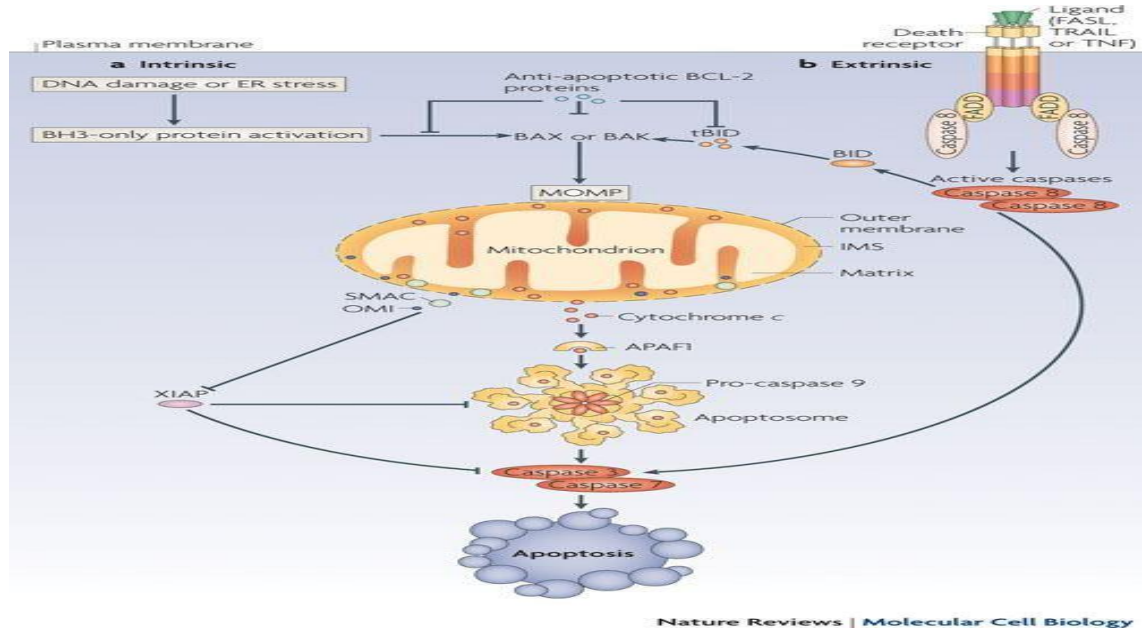
Oksidatif stres indeksi, TOS değerinin TAS değerine oranıdır. TAS'ın birimi $\mu\text{mol Trolox Ekivalent/L}$ 'ye çevrildikten sonra oksidatif stres indeksi hesaplanır (125).

2.7.Apoptozis

Apoptozis biyolojik görevlerini tamamlamış yapısal elemanları ya da DNA'sı hasar görmüş hücrelerin, ilişkili olduğu doku ve hücrelere zarar vermeyecek bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan, genlerle kontrol altında tutulan ve gerçekleşmesi için enerjiye ihtiyaç duyan programlı hücre ölümüdür.

Apoptozis de kendi içerisinde bir denge halindedir. Artması durumunda nörodejeneratif hastalıklara, azalması durumunda ise kanser ve fazla otreaktif hücrelerin ortadan kaldırılamaması sonucu otoimmün hastalıklara yol açabilmektedir. Apoptozisi hem fizyolojik hem de patolojik olarak yaşamın her döneminde görebiliriz (126).

Apoptozisin oluşum mekanizması incelendiğinde çok çeşitli ve sayıca fazla mediatörler tarafından kontrol edildiği görülür. Bu mediyatörler arasında başlıca iyon (kalsiyum), molekül (seramid), gen (c-myc, p53), enzim (Kaspaz) ve hatta organeller (endoplazmik retikulum ve mitokondri) bulunmaktadır (126), (Şekil 8).



Şekil 8. Apoptozis Yolakları (127)

Kalsiyum iyonunun; endonükleaz, doku transglutaminaz ve bazı proteazların aktivasyonunda önemli görevleri bulunmaktadır. Apoptozisle ilişkili bir proteaz olan Kalbin, sistein proteaz ailesinin bir üyesidir. Kalbin'in aktive olabilmesi için Ca^{++} 'a ihtiyaç vardır ve hücre iskelet yapısında hasar meydana getirir. Apoptotik süreç boyunca hücre pH'sı hızla düşer, kalsiyum pompası yetersizliği sonucu hücre içine sürekli kalsiyum girişi olur ve kalsiyum hücrede artar. Bu durum da, hücre için potansiyel zararlı etkilere sahip çok sayıda enzimi aktif hale geçirir (118,129).

Isı, hipoksi, kanser ilaçları, ultraviyole ayrıca serbest radikaller DNA hasarı oluşturarak apoptozis meydana getirebilirler. Buradaki mekanizma bu tür etkenlerin hücre DNA'sına zarar vermesi sonucu p53 genini aktive etmesi veya mitokondri hasarına yol açarak sitokrom c salınımına neden olup hücreyi apoptozise götürür (130).

p53 geni DNA tamiri yapan proteinlerin yazılımını sağlar. Normalde inaktif bulunan p53 geni hücrede çeşitli etkilerle (radyasyon, kemoterapi vb.) meydana gelen DNA hasarında, aktifleşerek hücre döngüsünü G1 fazında bloke eder ve hücrenin DNA'sını kontrol edebilmesi ve gerekirse tamiri için zaman tanır. Böylelikle hücre siklusu durdurulur ve DNA hasarlı hücrenin çoğalması engellenir. Normal hücrelerde mitozdan sonra siklus G1-S-G2 (interfaz) ve M (mitoz) şeklinde bir döngü içindedir. Mitozu sona eren hücreler tekrar büyüme emri almadığı sürece G0 fazında istirahat halinde bulunurlar. G1, S, G2 fazları hücre siklusunun %90'lık büyük bir bölümünü kapsar. G1 fazı DNA sentezi için hazırlık yapıldığı aşamadır. Aynı zamanda protein ve RNA sentezi de bu aşamada gerçekleşir. Siklusun S fazı DNA'nın sentezlendiği aşamadır. G2 fazında ise protein sentezi ve hücre büyümeye devam ederken aynı zamanda RNA sentezi de bir yandan devam eder.

Böylelikle hücre mitozaya hazırlanır. Hücrenin maruz kaldığı dış etkenler sonucu (radyasyon, SR) DNA hasarı meydana geldiğinde, hücre p53 düzeyini artırarak bu duruma yanıt verir. p53'ün düzeyi arttığında p21' in aktivasyonu sağlanır siklus G1 kontrol noktasında Rb (Retinoblastoma geni) proteinin daha fazla fosforlanması önlenerek durdurulur. DNA tamiri yapan proteinler, oluşmuş DNA hasarını onarabilirse hücre siklusundaki blok kalkar ve hücre çoğalmaya devam eder. p53 geni tarafından sentezlenen proteinler yardımıyla, bir hücrede normalde birbirini takip eden 7 kırılma onarılabılır. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse hücre onarımı yapılamaz ve apoptozis yolu açılır. Bu durumda p53 geni Bax proteininin (proapoptotik üye) aktivasyonunu sağlayarak mitokondri aracılığı ile apoptozisi başlatır. Böylelikle DNA hasarlı hücre ortadan kaldırılmış olur. Apoptotik bir hücre DNA'sında yaklaşık 300.000 kırılma meydana geldiği tahmin edilmektedir (131).

2.8.Vasküler Endotelial Büyüme Faktörleri (VEGF)

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) çeşitli uyaranlara yanıt olarak farklı hücre tipleri tarafından üretilen 34-46 kDa ağırlığında, homodimerik bir glikoproteindir. Vasküler endotel hücreleri üzerinde spesifik transmembran reseptörlere bağlanarak etki gösterir.

VEGF'in dört ana biyolojik aktivitesi vardır. Bunların tümü anjiyogenez indüksiyonuna katkıda bulunur ve kapsamlı biçimde araştırılmıştır (132-134).

- Vasküler endotel hücrelerin büyümesi ve proliferasyonu
- Vasküler endotel hücrelerin göçü
- Apoptozdan korunma yoluyla olgunlaşmamış endotel hücrelerin sağkalması
- Kapillerlerde artmış vasküler permeabilite.

Endotel hücreleri için önemli bir mitojen olan ve migrasyon etkisine sahip bu faktör, fizyolojik olarak ovulasyondan hemen önce ovaryum folliküllerinden salgılanarak yeni damarların oluşumunu artırırken, ovulasyondan sonra bu salgılama görevini korpus luteum üstlenir. Erken implantasyon döneminde embriyo trofoblastlarınca salgılanır (135). Embriyolojik gelişimin ilk dönemlerinin sonuna doğru VEGF biraz azalırken, organogenez döneminde oldukça yükselir. Yine VEGF yetişkinde akciğer alveolar hücrelerinde, böbrek glomerüllerinde, proksimal tübüllerde ve düşük seviyede de olsa karaciğer hepatositleri ve beyinde gösterilmiştir (136). Ayrıca, adrenal korteksin tüm hücrelerinde ve testiste testosteron üreten Leydig hücrelerinde VEGF yapımına ait mRNA'ların sentezlendiği gösterilmiştir. VEGF'nin gösterilmesi için yapılan immunosito kimyasal çalışmalarda aktive makrofajlarda, arterioller çevreleyen fibroblastlarda, akciğer bronşiyol epitelinde, koroid pleksus epitelinde ve renal glomerül visseral epitelinde varlığı gösterilmiştir (137).

VEGF mRNA'sının transkripsiyonu; trombosit kaynaklı büyüme faktörü-BB (PDGF-BB), keratinosit büyüme faktörü (FGF-7), epidermal büyüme faktörü (EGF), TNF- α , transforming büyüme faktörü- β 1 (TGF- β 1) ve interlekin- β 1 gibi çeşitli faktörler tarafından başlatılır. Böylece bu maddelerin direk mitojenik etki göstermediği, ancak VEGF salgılanmasına yol açarak mitojeniteyi arttırdıkları anlaşılmıştır (138). VEGF salgılatan bir başka faktör hipoksidir. Hipoksi, VEGF ve reseptörlerinin yapımını indükleyerek anjiogenezi başlatan etkili uyarıcılardan biridir. Buna örnek olarak, büyüyen tümörlerde hipoksik merkezlerin oluşması ve bunu engellemek için tümör hücrelerinden VEGF ekspresyonu ve yeni damar yapımı gösterilmiştir.

Yine, tıkalı kalp damarlarına bağılı olarak gelişen hipoksi sonrasında da, VEGF ekspresyonu artmaktadır. VEGF yapımı hipoksi tarafından tetiklenirken, CO tarafından da inhibe edilmektedir (139). Ayrıca hiperglisemi, oksidatif stres, angiotensin II ve ileri derecede glikolize olmuş son ürünler VEGF düzeyini artırmaktadırlar (140).

2.9.DENEY MODELLERİ

Omurilikte iskemi oluşturmak üzere çeşitli deneysel modeller geliştirilmiştir. Zivin ve DeGirolami tavşanlarda aortanın infrarenal segmentinin oklüzyonu ile barsak ve böbrek iskemisi ve kardiyak dilatasyon gibi nadir komplikasyonlara neden olan bir spinal kord iskemi modeli tanımlamışlardır (141). Ancak bu model insanlardaki durumu yansıtmayabilir, çünkü insanlarda Adamkiewicz arteri nedeniyle infraaortik klemplemenin parapleji oluşturması oldukça nadir bir durumdur.

Sulfanova ve arkadaşları spinal kord iskemisi oluşturmak üzere ratlarda abdominal aorta ve dallarının intravasküler oklüzyonunu deneysel model olarak tanımlamışlardır (142).

Lang-Lazdunski ve arkadaşları, farelerde arkus aorta, sol subklavian arter ve internal mamarian arteri 9 ya da 11 dakika süreyle klempleyerek spinal iskemi oluşturmuşlardır (143).

Boğa ve arkadaşları tavşanlarda oluşturdukları deneysel bir modelde spinal kord iskemisinde N-Asetilsistein ve iloprostun önleyici etkilerini incelemişlerdir (144).

Tator ve Rivlin ise spinal kord iskemisi yaratmak için klip kompresyon modelini tanımlamışlardır (145,146).

Pregabalin hayvan deneyi modellerinde oral ve intraperitoneal olarak uygulanabilmektedir. Deney hayvanı olarak tavşan ya da rat kullanılmakta, spinal kord iskemisi reperfüzyonu modeli için laminektomi ya da klempleme yöntemleri uygulanabilmektedir.

Ha ve arkadaşları çalışmalarında ratlarda laminektomi yöntemi uygulamış, pregabalini intraperitoneal olarak kullanmışlardır (9).

Kazancı ve arkadaşları çalışmalarında ratlarda aortu klemplemiş, pregabalini intraperitoneal 30 mg/gün olarak uygulamışlardır (147).

Aşçı ve arkadaşları çalışmalarında pregabalini 50mg/kg/gün oral olarak uygulamışlardır (148).

Kale ve arkadaşları tavşanlarda infrarenal abdominal aortayı klempleyerek İ/R hasarı oluşturmuşlardır (149).

Bu çalışmamızda ratlarda laparotomi sonrası infrarenal abdominal aortaya, atravmatik mikrovasküler klemp konularak spinal kord İ/R hasarı oluşturulması amaçlanmıştır. Pregabalin intraperitoneal olarak uygulanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan 18.02.2016 tarih ve G.Ü.ET-16.016 kod numaralı etik kurul onayı alındıktan sonra gerçekleştirildi.

3.1.Denek Seçimi

Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi (GÜDAM) Laboratuvarında gerçekleştirilen bu çalışmada, ağırlıkları 200-300 gr arasında değişen 24 adet, erkek wistar cinsi albino rat kullanıldı. Ratlar 20-21°C ısıda, 12 saat gece 12 saat gündüz periyodları sağlanarak ve anestezi uygulamasından 2 saat öncesine kadar yemelerine izin verilecek şekilde bakıldı.

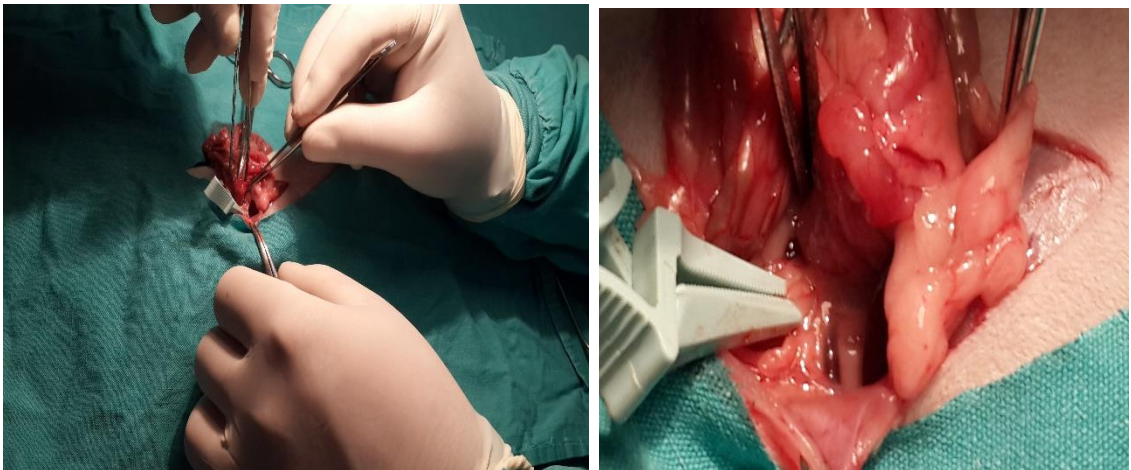
3.2.Kullanılan Yöntemler

İşlem öncesi ratlar her grupta 6 adet olmak üzere, rastgele 4 gruba ayrıldılar: (Kontrol, İskemi reperfüzyon, İskemi reperfüzyon+ düşük doz pregabalin, İskemi reperfüzyon+ yüksek doz pregabalin.)

Grup K	Kontrol	n=6
Grup İ/R	İskemi reperfüzyon	n=6
Grup İ/R-DP	İskemi reperfüzyon+ düşük doz pregabalin	n=6
Grup İ/R-YP	İskemi reperfüzyon+ yüksek doz pregabalin	n=6

3.2.1.Aortik Oklüzyon ve İskemi Reperfüzyon Modeli

Deney başlangıcında; intramusküler enjeksiyonla, 50 mg/kg dozda ketamine hydrochloride (Ketalar® flakon, Parke-Davis, USA) verilerek anestezi sağlandı. İşlem, bir ısıtma lambası altında, ratlar supin pozisyonunda iken gerçekleştirildi. Ciltleri aseptik olarak hazırlanan ratlara orta hat laparotomi yapıldı. Barsakların ıslak gazlı bez yardımıyla uzaklaştırılmasının ardından, infrarenal abdominal aorta eksplere edildi. Abdominal aortaya, atravmatik bir mikrovasküler klemp konuldu. 120 dakika sonra abdominal aortadaki mikrovasküler klemp kaldırıldı ve 120 dakika süreyle reperfüzyon sağlandı. Aortik iskemi; klempleme işlemi sırasında distal aortada pulsasyonun kaybolmasıyla, aortik reperfüzyon ise; klempin kaldırılması sonrası distal aortada pulsasyonun geri gelmesiyle onaylandı. Kontrol grubunu oluşturacak ratlarda laparotomi ve abdominal aort diseksiyonu eşit sürede (240 dakika) uygulandı ancak bu grupta İ/R oluşturulmadı. İ/R dönemlerinde peritoneal boşluktan ısı ve sıvı kaybını en az miktara indirmek için; abdominal aortaya klemp konulması ve kaldırılması sonrası dönemlerinde, peritoneal boşluğa serum fizyolojik uygulanıp, batın insizyonu geçici olarak ıslak gazlı bez ile sarılarak kapatıldı. Sonrasında böbrek dokuları alındı. 2 saatlik periyot sonrasında hayvanlar sakrifiye edildi. Ötenazi sonrasında böbreklerden bir tanesi dokusu bütünlük bozulmayacak ve travmatize edilmeyecek şekilde alındı ve formol ile tespit edildi.



Biyokimyasal inceleme Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD' da yapıldı. Histopatolojik inceleme Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD' de yapıldı.

3.3.Deney Grupları

Kontrol grubu (Grup K, n=6): Bu gruptaki ratlara spinal kord İ/R hasarı yapılmaksızın sadece laparotomi yapıp kapatıldı, işlemden 120 dakika sonra anestezi altında ratların böbrek dokuları histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler için alındı.

İskemi- Reperfüzyon (Grup İ/R, n=6): Bu gruptaki ratlara spinal kord İ/R hasarı yapıldı, işlemden 120 dakika sonra anestezi altında ratların böbrek dokuları histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler için alındı.

İskemi reperfüzyon+ düşük doz pregabalin grubu (Grup İ/R-DP, n=6): Bu gruptaki ratlara iskemiden 15 dakika önce 30mg/kg pregabalin (Lyrica,Pfizer,ABD) intraperitoneal olarak uygulandı. Laparotomi sonrasında 120 dakika süre ile abdominal aortaya kros klempli konularak spinal kord iskemisi gerçekleştirildi. 120 dakikalık iskemiyi takiben damar klempini açılarak reperfüzyon sağlandı. İşlemden 120 dakika sonra anestezi altında ratların böbrek dokuları histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler için alındı.

İskemi reperfüzyon+ yüksek doz pregabalin grubu (Grup İ/R-YP, n=6): Bu gruptaki ratlara iskemiden 15 dakika önce 200 mg/kg pregabalin intraperitoneal olarak uygulandı.

Laparotomi sonrasında 120 dakika süre ile abdominal aortaya kros klemp konularak spinal kord iskemi hasarı gerçekleştirildi. 120 dakikalık iskemi takiben damar klempini açılarak reperfüzyon sağlandı. İşlemden 120 dakika sonra anestezi altında ratların böbrek dokuları histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler için alındı.

Ötenazi sonrasında böbrek dokuları bütünlük bozulmayacak ve travmatize edilmeyecek şekilde alındı. Sol böbrek histopatolojik inceleme için %10' luk formol içine konuldu, sağ böbrek sıvı azot içinde dondurulduktan sonra biyokimyasal inceleme için -80°C' de saklandı.

3.4.Dokuların Homojenizasyonu

-80° dondurucuda tutulan dokular sıvı azot dolu taşıyıcı kaba alındıktan sonra kullanılacak olan örnek eppendorf tüpünden çıkarıldı. Çözünmesine izin verilmeden dokular hızla hassas terazide tartılıp 22 numaralı bistüri ucu (PLUSMED®) kullanılarak 80-100 mg olarak ayrıldı. Alınan doku parçaları porselen havanda sıvı azot varlığında ezildi. Toz halindeki dokular homojenizasyon tüpüne aktarılıp üzerlerine; her bir gram doku için, dilüsyon 1/10 olacak şekilde 140 mM KCl solüsyonu eklendi. Homojenizasyonda ısı artışı olmaması için homojenizasyon tüpü kar dolu cam beher içinde tutularak, iki dakika süre ile 50 dönüş/dakika (rpm) hızda homojenizatör (Glas_Col K5424®) ile homojenizasyon işlemi tamamlandı. Homojenizatör eppendorf tüpüne alındı. Eppendorf tüpleri parafilm ile kaplandıktan sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj (Hettich Mikro 200R®) edildi. Santrifüj sonrası süpernatant başka bir eppendorf tüpüne alınarak Total Oksidatif Durum (TOS) ve Total Antioksidan Durum (TAS) ölçümleri yapıldı.

3.5.Total Antioksidan Durum (TAS) Ölçümü

Total antioksidan seviye ölçümünde, TAS kiti (RelAssay Diagnostic®, Türkiye) kullanıldı. TAS ölçümü için, kitin prosedüründe belirtildiği şekilde, 500 ml reaktif 1 (ölçüm tamponu) ve 30 ml örnek karıştırılıp spektrofotometre ile (NanoDrop® ND-1000), 660 nm’de absorbans ölçümü yapıldı (A1). Eppendorf tüpündeki karışıma 75 ml reaktif 2 (renkli 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit), (ABTS) solüsyonu eklendi. Tüp parafilmle kaplanarak, 37 °C deki sıcak su banyosunda (Şimşek Labortechnik®) 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 660 nm’de absorbans ölçümü yapıldı (A2). Standart ölçümü için, 1 mmol/L konsantrasyonundaki Trolox Eq çözeltisi örnek yerine kullanıldı. İlk ve ikinci ölçümler üçer defa yapılarak ortalaması alındı. İkinci absorbans değerinden (A2) ilk absorbans değeri (A1) çıkarılarak absorbans değişimi (Δ Abs) hesaplandı. TAS düzeyleri kitte belirtilen formülle hesaplandı ve mmol Trolox Eq/L olarak ifade edildi.

$$TAS = [(\Delta Abs \text{ H}_2\text{O} - \Delta Abs \text{ Örnek}) / (\Delta Abs \text{ H}_2\text{O} - \Delta Abs \text{ Standart})]$$

3.6.Total Oksidatif Durum (TOS) Ölçümü

Total oksidan seviye ölçümünde, TOS kiti (RelAssay Diagnostic®, Türkiye) kullanıldı. TOS ölçümü için, kitin prosedüründe belirtildiği şekilde, 500 ml reaktif 1 (ölçüm tamponu) ve 75 ml örnek karıştırılıp spektrofotometre (NanoDrop® ND-1000) ile 530 nm’de absorbans ölçümü yapıldı (A1). Karışıma 25 ml reaktif 2 (pro-kromojen solüsyon) eklendi. Tüp parafilmle kaplanarak 37°C’deki sıcak su banyosunda (Şimşek Labortechnik®) 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 530 nm’de absorbans ölçümü yapıldı (A2). Standart ölçümü için kitte verilen, 10 μ mol/L hidrojen peroksit (H_2O_2) ekivalan/ litre içeren standart çözeltisi kullanıldı. İlk ve ikinci ölçümler üçer defa yapılarak ortalaması alındı.

İkinci absorbans değerinden (A2) ilk absorbans değeri (A1) çıkarılarak absorbans değişimi (Δ Abs) hesaplandı. TOS düzeyleri kitte belirtilen formülle hesaplandı, mmol H₂O₂ Eq/L olarak ifade edildi.

$$TOS = [(\Delta Abs \text{ örnek}) / (\Delta Abs \text{ standart})] \times \text{Standart Konsantrasyonu (10 } \mu\text{mol/L)}$$

3.7.Histopatolojik İnceleme

Deney sonunda deneklerden alınan böbrek dokusu örnekleri trimlendikten sonra sonra doku takip kasetlerine kondu ve 3 gün süreyle %10 nötral formalinde fikse edildikten sonra klasik histolojik doku takibine alındı. Doku takibi sonucu parafine gömülen bloklardan 5 mikron kalınlığında seri kesitler klasik ve poly-l-lysine kaplı lamalar üzerine alındı.

Klasik lamalar üzerine alınan kesitler histokimyasal olarak Hematoksilen Eozin ve Periyodik Asid Schiff (PAS) boya ile boyandı. Hematoksilen Eozin boyama ile genel doku özellikleri değerlendirmesi yapılırken PAS boyaması ile böbrek tübülleri ve Bowman kapsülündeki bazal membran değerlendirmeleri yapıldı.

Poly-l-lysine kaplı lamalara alınan kesitler vasküler değişimi ve enflamatuvar aktivasyonu değerlendirmek için VEGF primer antikoru ile değerlendirilirken diğer yandan hücre genomu koruyucusu olan ve hücrede stres olduğunda aktive olarak hücrenin tamirini veya tamir edilemeyecek düzeyde bir hasar varsa apoptozisle ölümünü düzenleyen p53 genine özel primer antikorla immunohistokimyasal metod kullanılmak suretiyle özel boyama yapıldı.

3.8.İstatistiksel Analiz

İstatistik değerlendirme SPSS 20.0 bilgisayar programında sıralanan testler kullanılarak gerçekleştirildi. İstatistiksel analiz verileri [Ortalama $\pm$ standart sapma] olarak sunuldu. Yapılan tüm istatistiksel analizlerde anlamlılık sınırı olarak $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

llebilir parametrelere Kolmogorov-Smirnov testi uygulanarak dağılımın normal ya da anormal olup olmadığı belirlendi. Normal dağılım gösterenler için gruplar arasında fark olup olmadığını belirlemede bağımsız gruplarda Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi. Farklılık olması durumunda gruplar arası Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılma yapıldı

4. BULGULAR

Tablo 4. Sıçanların böbrek dokusunda oksidan durum parametreleri [Ort $\pm$ SS]

	Grup K (n=6)	Grup İ/R (n=6)	Grup İ/R- DP (n=6)	Grup İ/R- YP (n=6)	P**
TOS (mmol H ₂ O ₂ Eq/l)	0.92 $\pm$ 0.10*	1.18 $\pm$ 0.15	1.03 $\pm$ 0.13*	0.96 $\pm$ 0.08*	0.005
TAS (mmol Trolox Eq/l)	38.23 $\pm$ 5.27*	47.73 $\pm$ 2.18	42.71 $\pm$ 3.15*	39.31 $\pm$ 4.19*	0.002

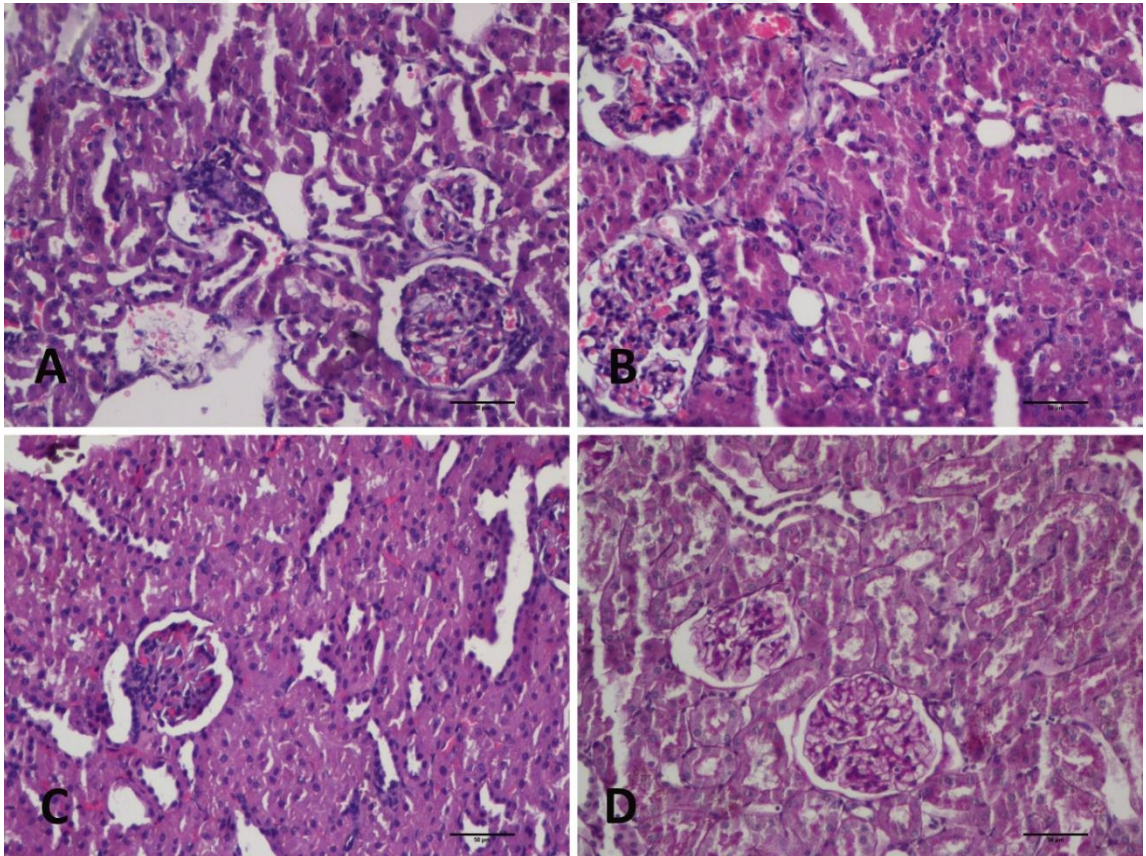
P**: Kruskal Wallis testi ile anlamlılık düzeyi $p < 0.05$

* $p < 0.05$: Grup İ/R ile karşılaştırıldığında

Gruplar (böbrek dokusu) TOS enzim aktivitesi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı ($p=0.005$). TOS enzim aktivitesi İ/R grubunda K, İ/R-DP ve İ/R-YP gruplarına göre anlamlı yüksek olarak bulundu ($p=0.001$, $p=0.039$, $p=0.004$, sırasıyla), (Tablo 1).

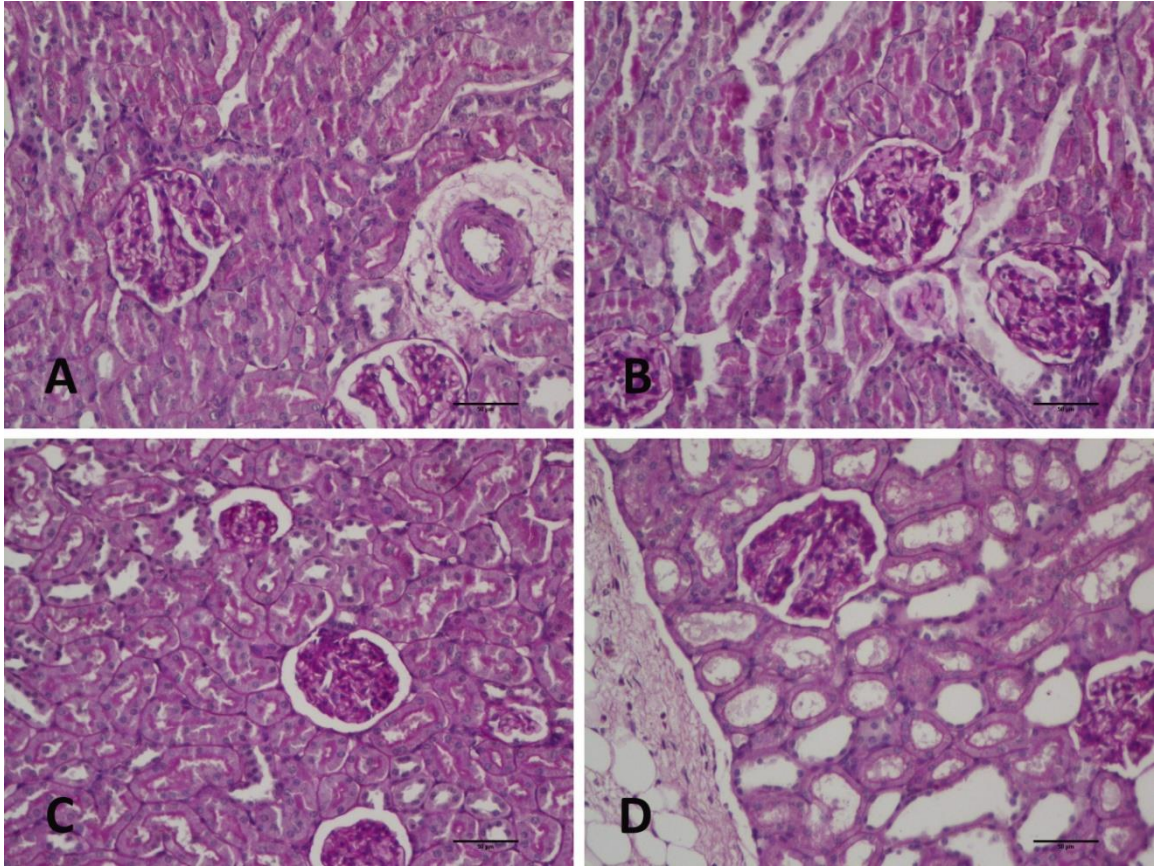
Gruplar (böbrek dokusu) TAS enzim aktivitesi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı ($p=0.002$). TAS enzim aktivitesi İ/R grubunda K, İ/R-DP ve İ/R-YP gruplarına göre anlamlı yüksek olarak tespit edildi ($p < 0.0001$, $p=0.036$, $p=0.001$, sırasıyla), (Tablo 1).

Hematoksilen Eozin boyaması ile yapılan genel doku değerlendirmesinde İ/R grubunda bowman kapsülünde yer alan damar ağından dışarı sızan eritrosit miktarının kontrol grubuna göre fazla olduğu yani bowman kapsülünde ödem mevcut olduğu tespit edildi. Düşük doz grubunda bu histopatolojik bulguda değişme olmadığı ama 200 mg grubunda belirgin şekilde iyileşme göstererek kontrol grubuna benzer görüntü olduğu tespit edildi. Bununla birlikte herhangi bir inflamatuvar hücre göçü, angiogenetik değişiklikler yani neovaskülarizasyon olmadığı gözlemlendi (Resim 1 A-D).



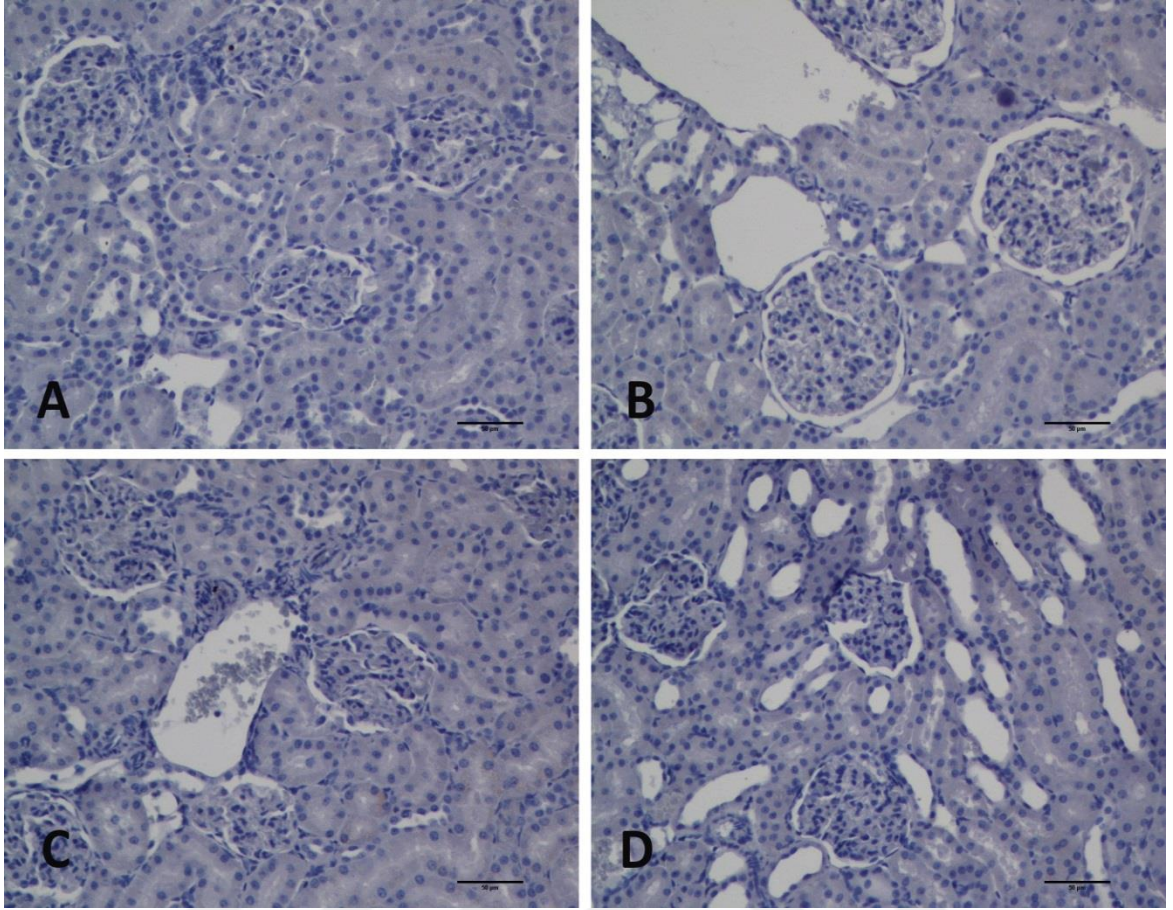
Resim 1: Böbrek dokusu Hematoksilen Eozin sonuçları (A: Kontrol grubu, B: İskemi reperfüzyon grubu, C: İskemi reperfüzyon düşük doz pregabalin grubu, D: İskemi reperfüzyon yüksek doz pregabalin grubu)

PAS boyamasında ise İ/R ve düşük doz grubunda çok hafif ödematöz değişiklikler var olmasına karşın kontrol ve 200 mg grubuna göre karşılaştırıldığında aralarında belirgin bir farklılık olmadığı ve gerek bowman kapsülü içi damarlarda ve diğer tüm tübüllerde bazal membranda hiçbir sorun olmadığı gözlemlendi (Resim 2 A-D).



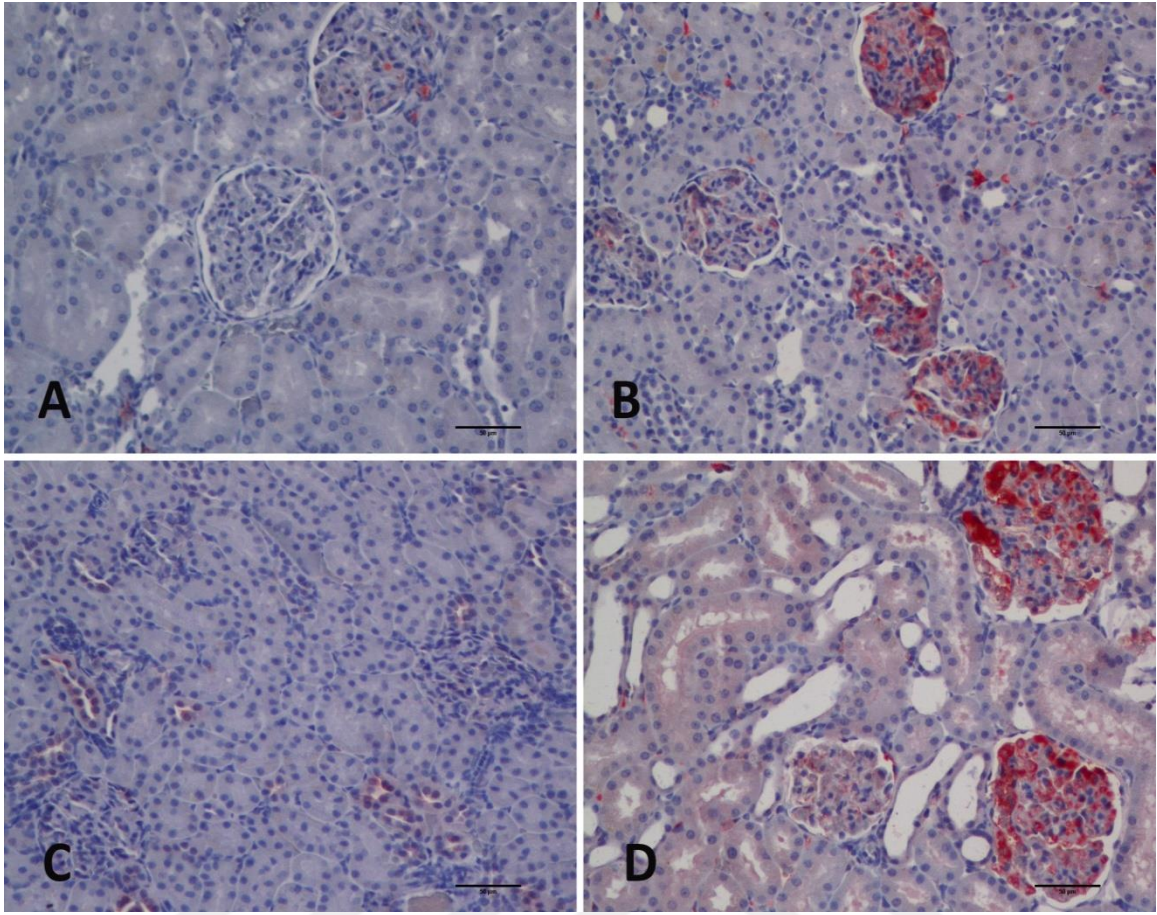
Resim 2: Böbrek dokusu PAS boyama sonuçları (A: Kontrol grubu, B: İskemi reperfüzyon grubu, C: İskemi reperfüzyon düşük doz pregabalin grubu, D: İskemi reperfüzyon yüksek doz pregabalin grubu)

VEGF boyamasında ise tüm dokularda hiçbir VEGF ekspresyonu olmadığı gözlemlendi (Resim 3 A-D).



Resim 3: Böbrek dokusu VEGF ekspresyonu sonuçları (A: Kontrol grubu, B: İskemi reperfüzyon grubu, C: İskemi reperfüzyon düşük doz pregabalin grubu, D: İskemi reperfüzyon yüksek doz pregabalin grubu)

p53 boyaması ise önemli bulgular içermektedir. Kontrol grubunda hiçbir p53 eksprese eden hücre bulunmazken İ/R grubunda çok belirgin ve bilhassa bazı bowman kapsülleri içinde farklı yoğunluklarda p53 ekspresyonu tespit edildi. Genel tübüllerde herhangi bir ekspresyon tespit edilmedi. İlginç olarak düşük doz uygulanan grupta p53 ekspresyonunun belirgin derecede silikleştiği ancak 200 mg uygulanan grupta çok belirgin şekilde olduğu tespit edildi. Bu gruptaki ekspresyon İ/R grubundan bile daha belirgindi (Resim 4 A-D).



Resim 4: Böbrek dokusu p53 ekspresyonu sonuçları (A: Kontrol grubu, B: İskemi reperfüzyon grubu, C: İskemi reperfüzyon düşük doz pregabalin grubu, D: İskemi reperfüzyon yüksek doz pregabalin grubu)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Spinal kord İ/R hasarı nedeniyle oluşan nörolojik komplikasyonların insidansını en aza indirmek için operatif ve nonoperatif tekniklerin gelişmesine rağmen, parapleji torakoabdominal aortik cerrahilerinin yıkıcı bir komplikasyonu olmaya devam etmektedir. Spinal kord İ/R hasarı, nekroz veya apoptozis yoluyla nöronal hasara yol açan kompleks patolojik kaskadları aktive eder. Spinal kord İ/R hasarının patojenik mekanizmalarının tam olarak anlaşılamamış olmasıyla birlikte, endojen antioksidan savunma sistemlerinin tükenmesi ile ROS'un aşırı üretilmesinden kaynaklanan oksidatif stresin İ/R hasarı oluşumunda önemli bir rol oynadığı iyi bilinmektedir. Bu SOR'ların neden olduğu hücre zarlarının lipid peroksidasyonu ve inflamatuvar sitokin üretimi ikincil nöronal hasarı daha da kötüleştirir.

Spinal kord İ/R hasarı torakoabdominal aortik cerrahilerin yıkıcı ve öngörülemeyen bir komplikasyonu olup hastaların %40'ında paraplejiye neden olabilir. Bu katastrofik komplikasyonu önlemek için çeşitli koruyucu stratejiler denenmiştir, bununla birlikte etkili bir terapötik yöntem henüz geliştirilmemiştir. Spinal kord İ/R hasarının patofizyolojik mekanizmaları hala tam olarak anlaşılamamış olmasına rağmen, paradoksal olarak reperfüzyon ile şiddetlenen başlangıçtaki iskemik hasarın glutamat aracılı ekzitotoksisite, oksidatif stres, lipid peroksidasyonu, inflamasyon ve apoptozisi de içeren birbiri ile bağlantılı patolojik kaskadlar aracılığı ile nöronal doku hasarına neden olduğu kanıtlanmıştır (147).

Bununla ilgili olarak, hem bu hasarı azaltarak hastayı koruyacak hem de klempleme süresini uzatarak cerrahın işini kolaylaştıracak ilaçların uygulanması faydalı bir yaklaşım olacaktır. Bu nedenle, bu çalışma bazı dokuların İ/R hasarlanmasında koruyucu etkisi gösterilmiş (147) olan pregabalinin rat spinal kord İ/R hasarı modelindeki böbrek hasarı üzerine olası yararlı etkilerinin araştırılması amacıyla yapıldı.

Böbrek İ/R hasarı, ciddi doku ve organ hasarına neden olan hemorajik şok, vasküler cerrahi, parsiyel nefrektomi, kazara ya da iyatrojenik travmada sık karşılaşılan ciddi bir klinik durumdur. Böbrek İ/R hasarının altında yatan mekanizmalar karmaşık ve tam olarak aydınlatılamamıştır. Böbrek İ/R hasarı patogenezinde katkıda bulunan önemli bir yol oksidatif stresdir. Böbrek kan akımı kesilmesi ve reperfüzyon sonrası akut oksidatif stres cevabı ROS üretimine neden olur. Sonuç olarak, ROS'un fazla üretimi lipid peroksidasyonu, DNA mutasyonu ve apoptotik ve nekrotik kaskadlar kaynaklı çeşitli yollarla hücre ölümüne neden olur (69).

Böbrek İ/R hasarı, ABY nedeniyle artmış mortalite ve morbidite oranları ile ilişkilidir. Böbrek transplantasyonu, bypass süreçleri, renal anjioplasti ve renal pedikül ve renal arterlerin üzerinde aortun klemplenmesinin sık olduğu ürolojik ya da vasküler vakalar gibi farklı klinik cerrahiler renal perfüzyonun geçici olarak durdurulması veya azaltılmasını gerektirir. İskemik dokuya kan akışının yeniden dönüşü her ne kadar normal işlevlerin geri kazanılmasıyla sonuçlansa da reperfüzyon sırasında doku paradoksal şekilde hasarlanabilir. Bu duruma neden olan organ disfonksiyonu genellikle artmış mikrovasküler permeabilite, interstisyel ödem, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, parankimal hücre disfonksiyonu, azalmış vazoregülasyon ve nekroz ile ilişkilidir (150).

Perioperatif ABH'nın en yaygın nedenlerinden bir tanesi İ/R hasarıdır. Çünkü böbreklere kan akımının geçici olarak azalması kan akımı geri döndüğünde böbrek parankiminde şiddetli ve sürekli hasara yol açar (151).

Renal tübüller iskemiye çok duyarlıdır ve uzun süreli iskemik karşılaşma renal tübüllerin proksimal bölgelerinde epitelyal hücre ölümüne yol açar. Bu durumda olmasına rağmen uzun iskemiye maruz kaldıktan sonra böbreğin hala normal doku yapısı ve işlevlerini kurtarmak mümkündür. İ/R hasarını takip eden inflamasyon sonrası hasarlı böbrek genellikle iyileşir. Aslında, proinflamatuvar/antiinflamatuvar ve hasar/onarım süreçleri, İ/R hasarının ardından tüm kurtarma işlemleri sırasında yakından iç içe geçmiştir (152).

Böbrek yüksek enerji gereksinimi ve karmaşık mikrovasküler damar ağı nedeniyle İ/R hasarına çok duyarlıdır. Böbrek İ/R hasarı transplantasyon sonrası gecikmiş greft fonksiyonu, şok komplikasyonu ve kardiyak veya aortik cerrahide artmış mortalite ve morbidite ile ilişkilidir (153).

Uzak organlardan klinik olarak ilk belirti verenler akciğerler ve böbreklerdir. Bu organların yanı sıra, karaciğer, miyokard ve santral sinir sistemi fonksiyonlarının da etkilenmesiyle ÇOYS tablosu gelişebilir (71).

İskemi reperfüzyon zedelenmesinden sorumlu tutulan mekanizmalar olarak SOR, proinflamatuvar mediatörlerin artması, lökosit infiltrasyonu, Ca^{++} yüklenmesi, fosfolipit peroksidasyonu ve azalması ileri sürülmektedir (70).

Pregabalin, GABA'nın yapısal bir analogudur. GABA yapısal analogu olmasına rağmen GABA benzeri mekanizmalar üzerine direkt etkisi yoktur. Hayvan modellerinde antikonvülsan, analjezik ve anksiyolitik etki gösteren VGCC'nin, "alfa-2-delta" alt üniteleri için yüksek potentli bir ligandır (12). Hipereksite nöronların kalsiyum kanallarının alfa-2-delta alt ünitesine güçlü şekilde bağlandıktan sonra, depolarizasyonla indüklenmiş kalsiyum akışını ve bu şekilde glutamat, noradrenalin ve substans P'yi de içerecek şekilde pek çok eksitatuvar nörotransmitterlerin salınımını azaltır (10,12)

Ha ve arkadaşlarının sıçanlarda spinal kord yaralanmasında pregabalinin nöroprotektif etkisini araştırdıkları çalışmada pregabalinin antienflamatuvar ve antiapoptotik etkisinin olduğunu histopatolojik ve biyokimyasal parametrelerle ortaya koymuşlardır. Pregabalinin nöroprotektif ajan olarak kullanılabileceğini tavsiye etmişlerdir (9,154)

Düşük ve yüksek doz pregabalinin renoprotektif etkisini araştırdığımız çalışmamızda; H&E ve PAS boyamada yüksek doz pregabalinin koruyucu etkisi olduğunu tespit ettik. H&E boyamada İ/R grubunda bowman kapsülünde yer alan damar ağından dışarı sızan eritrosit miktarının kontrol grubuna göre fazla olduğu yani bowman kapsülünde ödem mevcut olduğu tespit edildi. Düşük doz grubunda bu histopatolojik bulguda değişme olmadığı ama 200 mg grubunda belirgin şekilde iyileşme göstererek kontrol grubuna benzer görüntü olduğu tespit edildi. Benzer şekilde PAS boyamada İ/R ve düşük doz grubunda çok hafif ödematöz değişiklikler var olmasına karşın kontrol ve 200 mg grubuna göre karşılaştırıldığında aralarında belirgin bir farklılık olmadığı ve gerek bowman kapsülü içi damarlarda ve diğer tüm tübüllerde bazal membranda hiçbir sorun olmadığı gözlemlendi.

Li ve ark. spinal kord hasarı sonrası metilprednizolon tedavisinin kaspas-3 ekspresyonunu azaltmadığı göstermişlerdir (155). Ha ve ark. pregabalinin ratlarda spinal kord kontüzyon modelin astrositlerde kaspas-3 ve p38 MAPK ekspresyonunun azalttığını fakat BCL-2 yi değiştirmedğini böylelikle pregabalinin antienflamatuar ve anti-apoptotik olduğunu belirtmişlerdir. Yine aynı çalışmacılar metilprednizolonun oligositlerde antiapoptotik etkili olduğunu fakat nöronlarda antiapoptotik etkisinin olmadığını göstermiştir (9,154).

Biz de p53 gen ekspresyonunu değerlendirdiğimiz çalışmada düşük doz pregabalin uygulamasının ekspresyonu İ/R grubuna göre azaltırken, yüksek doz pregabalinin ise değiştirmedğini tespit ettik. Çalışmamızda, kontrol grubunda hiçbir p53 eksprese eden hücre bulunmazken İ/R grubunda çok belirgin ve bilhassa bazı bowman kapsülleri içinde farklı yoğunluklarda p53 ekspresyonu tespit edildi. Genel tübüllerde herhangi bir ekspresyon tespit edilmedi. İlginç olarak düşük doz uygulanan grupta p53 ekspresyonunun belirgin derecede silikleştiği ancak 200 mg uygulanan grupta çok belirgin şekilde olduğu tespit edildi.

Ha ve ark. nın araştırmasında, istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen, pregabalin ile tedavi edilen grup kontrol grubuna göre daha düşük fosforile MAPK ekspresyonu gösterdi. Bu bulgu mikroglia aktivasyonunu dikkate alarak histolojik farklılıkları desteklemektedir(154)

Daha sonraki aşamalarda, astrositler TGF-beta, glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör, B-FGF ve VEGF gibi çeşitli sitokin üretimi yoluyla rejenerasyona yardım edebilir. Bu büyüme faktörlerinden bazıları oligodendrosit prekürsör migrasyonunu, proliferasyonunu ve farklılaşmasını kolaylaştırabilir(154). Çalışmamızda VEGF gruplar arasında benzer bulundu.

Kim ve ark., oklüzyondan 20 dakika önce pregabalin izoform gabapentini intravenöz yolla 0.1mg/kg, 0.5mg/kg ve 5mg/kg dozlarda uyguladıkları fokal serebral İ/R, (orta serebral arter oklüzyonu ve 24 saat sonra reperfüzyon) çalışmasında gabapentin uygulanan tüm gruplarda infarkt hacmini ve beyin ödemi azaltarak nöroprotektif etki gösterdiğini ve 5mg/kg daha belirgin olduğunu bildirmişlerdir (157).

Ha ve ark. spinal kord hasarı uygulanan ratlarda pregabalinin nöroprotektif etkilerini araştırmış, histolojik ve biyokimyasal parametreler yoluyla pregabalinin antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkilere sahip olduğunu göstermiştir (9,154).

Çelik ve ark. siyatik sinir hasarında pregabalinin rolünü araştırdıkları çalışmada pregabalin ile tedavi edilen grupların kontrol grubuna göre periferik sinir yaralanmalarında anlamlı derecede üstün histopatolojik rejenerasyona sahip olduklarını buldular. Buna ek olarak siyatik fonksiyonel indeks artmakta olduğunu ve pregabalin gruplarında TGF-beta gen ekspresyonunda artış gözlemlendiğini rapor etmişlerdir (157).

Çalikoğlu ve ark. çalışmalarında pregabalinin travma sonrası ödem, inflamasyon ve nöronal hasarı etkili bir şekilde önlediğini rapor etmişlerdir (157).

Literatürde pregabalinle serebral İ/R, spinal kord hasarında nöroprotektif ve siyatik sinir hasarında periferik sinir koruyucu etkisi ile ilgili çalışmalar yapıldığı görülmüştür(157) . Çalışmamızda biz de spinal kord İ/R hasarında pregabalinin farklı dozlarının böbrek dokusu üzerine koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırdık.

Oksidatif stres, antioksidan savunma sistemi ROS üretimiyle başedemediğinde ortaya çıkar. Antioksidanlar ve diğer hücre redoks durumu modülatör enzim sistemleri, tüm sellüler ve ekstrasellüler kompartmanlarda ROS'a karşı savunmada ilk basamak olarak hareket eder. SOD, CAT ve GSH-PX, ROS'a karşı en önemli antioksidan enzimlerdir. Diğer yandan TBARS gibi MDA ve NO ile reaksiyona giren lipid peroksidasyon belirteçleri oksidatif strese artmaktadır (150).

Deneyisel ve klinik araştımlar antioksidanların endojen antioksidan enzimler ve serbest radikal üretiminin baskılanması yoluyla İ/R hasarının gelişmesinden koruyabileceğini göstermiştir (150).

Oksidatif stres reaksiyonları ve membran lipid peroksidasyonu, SOR oluşması sonucu beyinde oksidatif hasara neden olur. Ratlarda, serebral İ/R hasarının ardından SOD, CAT ve GSH-Px gibi endojen antioksidan enzimler azalmış ve nitrik oksit ve TBARS gibi lipid peroksidasyon belirteçlerinin seviyeleri artmış bulunmuştur (150).

Orta serebral arter oklüzyonundan sonra 24 saat reperfüzyon yapılan bir çalışmada, CAT enziminde anlamlı düşüş gösterilmiştir. Çalışmalarında İ ve İ/R gruplarındaki CAT aktivitesinin de önemli ölçüde azaldığını gösterdiklerini belirtmişlerdir. Pregabalin tedavisinin, Pİ ve PİR gruplarındaki aktiviteyi anlamlı bir şekilde arttırdığını rapor etmişlerdir (148).

Birçok oksidan ve antioksidan molekülün serum veya plazma düzeylerini ölçen çeşitli analitik yöntemler bulunmaktadır (114). Ancak bu moleküllerin ayrı ayrı ölçülmesi hem zaman alıcı, hem de zordur. Ayrıca ekonomik yönden de zorlayıcıdır. Bu nedenle “total antioksidan durum” ya da “total oksidan durum” ölçümü bir örnekteki oksidan ve antioksidan moleküllerin ayrı ayrı ölçülmesinden daha pratiktir. Biz de çalışmamızda TOS ve TAS yöntemini kullandık.

Serebral iskemide oksidatif stresi belirlemede birçok metod kullanılmıştır. Literatürde serebral iskemi modellerinde TOS ve OSİ değerlerinin arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur (156).

Uzar ve ark., çalışmalarında, tüm gruplara ait beyin dokularında TAS, TOS ve OSİ değerlendirmişlerdir. Tüm gruplarda TAS değerlerinde bir değişiklik görülmezken TOS düzeylerinde ve OSİ de anlamlı değişiklikler bulunmuştur. İskemi oluşturulan ratların beyin dokularında TOS düzeyleri kontrolle kıyaslandığında anlamlı şekilde artmıştı. Memantin grubunda ise değerler kontrole yakındı. Bu bulguların; memantin, İ/R hasarının ortaya çıkmasını azalttığını fakat oluşmuş olan hasarı geri döndürmediğini düşündüklerini belirtmişlerdir(156).

Çalışmamızda düşük ve yüksek doz pregabalin uygulamasının İ/R hasarında oluşan oksidatif stresi azalttığını tespit ettik. TOS enzim aktivitesi İ/R grubunda K, İ/R-DP ve İ/R-YP gruplarına göre anlamlı yüksek olarak bulundu. Benzer şekilde TAS enzim aktivitesi İ/R grubunda K, İ/R-DP ve İ/R-YP gruplarına göre anlamlı yüksek olarak tespit edildi.

Ratlarda lipopolisakkaridle indüklenmiş rektal hipersensitivite ağrı modelinde, pregabalinin tek intraperitoneal (10 ve 30 mg/kg) ve oral (1, 3, 10 ve 30 mg/kg) dozları doza bağımlı şekilde rektal distansiyonla indüklenmiş allodiniyi suprese etmiştir. Ratlardaki vinkristinin indüklediği noropatik ağrı modelinde, pregabalin 80 mg/kg'ın tek bir intraperitoneal dozu plaseboyla karşılaştırıldığında ($P<0.001$), uygulamadan 45 dakika sonra ulaşılan ve doz verildikten 90 dakika sonrasına (deneyin sonu) kadar devam eden zirve etkisi ile allodiniyi anlamlı şekilde suprese etmiştir (8).

Bir çalışmada, pregabalin (i.v. 5-50 mg/kg ve intratekal 3.8-60 µg arasında değişen dozlarda) fotokimyasal yolla indüklenen iskemik sinir lezyonunda doza bağımlı biçimde taktil allodiniyi suprese etmiştir (6).

Çalışmalarda pregabalin farklı yollardan uygulanmıştır. Literatürde oral, intravenöz, intraperitoneal ve intratekal uygulamalar görülmektedir. Biz de çalışmamızda pregabalini intraperitoneal yoldan uyguladık.

6. SONUÇ

Düşük ve yüksek doz pregabalinin renoprotektif etkisini araştırdığımız çalışmamızda; H&E ve PAS boyamada yüksek doz pregabalinin koruyucu etkisi olduğunu tespit ettik. H&E boyamada İ/R grubunda bowman kapsülünde yer alan damar ağından dışarı sızan eritrosit miktarının kontrol grubuna göre fazla olduğu yani bowman kapsülünde ödem mevcut olduğu tespit edildi. Düşük doz (30 mg) grubunda bu histopatolojik bulguda değişme olmadığı ama yüksek doz (200 mg) grubunda belirgin şekilde iyileşme göstererek kontrol grubuna benzer görüntü olduğu tespit edildi. Benzer şekilde PAS boyamada İ/R ve düşük doz grubunda çok hafif ödematöz değişiklikler var olmasına karşın kontrol ve 200 mg grubuna göre karşılaştırıldığında aralarında belirgin bir farklılık olmadığı ve gerek bowman kapsülü içi damarlarda ve diğer tüm tübüllerde bazal membranda hiçbir sorun olmadığı gözlemlendi.

p53 gen ekspresyonunu değerlendirdiğimiz çalışmada düşük doz pregabalin uygulamasının ekspresyonu İ/R grubuna göre azaltırken, yüksek doz pregabalinin ise değiştirmedini tespit ettik. Çalışmamızda, kontrol grubunda hiçbir p53 eksprese eden hücre bulunmazken İ/R grubunda çok belirgin ve bilhassa bazı bowman kapsülleri içinde farklı yoğunluklarda p53 ekspresyonu tespit edildi. Genel tübüllerde herhangi bir ekspresyon tespit edilmedi. İlginç olarak düşük doz uygulanan grupta p53 ekspresyonunun belirgin derecede silikleştiği ancak 200 mg uygulanan grupta çok belirgin şekilde olduğu tespit edildi.

Çalışmamızda VEGF gruplar arasında benzer bulundu.

Çalışmamızda düşük ve yüksek doz pregabalin uygulamasının İ/R hasarında oluşan oksidatif stresi azalttığını tespit ettik. TOS enzim aktivitesi İ/R grubunda K, İ/R-DP ve İ/R-YP gruplarına göre anlamlı yüksek olarak bulundu. Benzer şekilde TAS enzim aktivitesi İ/R grubunda K, İ/R-DP ve İ/R-YP gruplarına göre anlamlı yüksek olarak tespit edildi.

Artan sayıda hasta ameliyat olmakta ve bunlarda mortalite ve morbidite hala yüksek oranda görülmektedir. Kardiyovasküler ve vasküler cerrahilerde böbrek hasarı diğer ameliyatlara göre yüksek oranda görülmektedir. Bu amaçla böbrek hasarını önleyici stratejiler araştırılmaktadır.

Ratlarda iskemiden önce intraperitoneal olarak uygulanan farklı dozlarda pregabalinin lipid peroksidasyonunu ve oksidatif stresi azalttığını ve böbrek histopatolojisinde meydana gelen hasarlanmayı düzelttiğini tespit ettik. Ratlarda İ/R öncesi uygulanan pregabalinin renoprotektif etkisinin olduğunu düşünmekteyiz. Ancak yüksek doz pregabalin uygulamasında H&E ve PAS boyamada histopatolojik iyileşme, p53 ekspresyonunun çok belirgin olduğu bulundu. Düşük doz pregabalin uygulamasında ise p53 ekspresyonunun belirgin derecede silikleştiği, H&E ve PAS histopatolojik bulguda değişme olmadığı tespit edildi.

Bu sonuçlar bize İ/R hasarında pregabalinin farklı mekanizmalar üzerinden etki ettiğini düşündürmektedir. Pregabalinin İ/R hasarında böbrek dokusu üzerine koruyucu etkisinin araştırılmasında farklı parametrelerin değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir. Çalışmamızın sonuçlarının daha geniş serili ve uzun süreli çalışmalarla desteklenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Xu SQ, Li YH, Hu SH, Chen K, Dong LY. Effects of Wy14643 on hepatic ischemia reperfusion injury in rats. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 6936-42.
2. Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado JA, Pina E, Geller DA. Factors in the pathophysiology of the liver ischemia reperfusion injury. *J Surg Res* 2008; 147 (1): 153–9.
3. Teke Z, Adali F, Kelten EC, Enli Y, Sackan KG, Karaman K, et al. Mannitol attenuates acute lung injury induced by infrarenal aortic occlusion-reperfusion in rats. *Surg Today* 2011; 41:955-65.
4. Ellenberger C, Schweizer A, Diaper J, Kalangos A, Murith N, Katchatourian G, et al. Incidence, risk factors and prognosis of changes in serum creatinine early after aortic abdominal surgery. *Intensive Care Med* 2006; 32:1808-16.
5. Tallgren M, Niemi T, Pöyhiä R, Raininko E, Railo M, Salmenperä M, et al. Acute renal injury and dysfunction following elective abdominal aortic surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2007; 33:550-5.
6. Joyce M, Kelly C, Winter D, Chen G, Leahy A, Bouchier-Hayes D. Pravastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, attenuates renal injury in an experimental model of ischemia-reperfusion. *J Surg Res* 2001; 101:79-84.
7. Ozcan AV, Sacar M, Aybek H, Bir F, Demir S, Onem G, et al. The effects of iloprost and vitamin C on kidney as a remote organ after ischemia/reperfusion of lower extremities. *J Surg Res* 2007; 140:20-6.
8. Martin L, Rabasseda X, Leeson P, Castaner J. Pregabalin. *Drugs of the Future*. 1999; 24(8):862–70.
9. Ha K, Kim Y, Rhyu K, Kwon S. Pregabalin as a neuroprotector after spinal cord injury in rats. *Eur J Spine* 2008; 17:864-72.
10. Partridge BJ, Chaplan SR, Sakamoto E, Yaksh TL. Characterization of the effects of gabapentin and 3-isobutyl-aminobutyric acid on substance P-induced thermal hyperalgesia. *Anesthesiology* 1998; 88(1): 196-205.

11. Jun J, Yaksh T. The effect of intrathecal gabapentin and 3-isobutyl-aminobutyric acid on the hyperalgesia observed after thermal injury in the rat. *Anesth Analg* 1998; 86(2): 348-54.
12. Brodie MJ. Pregabalin as adjunctive therapy for partial seizures. *Epilepsia* 2004; 45(Suppl 6): 19-27.
13. Jones DL, Sorkin LS. Systemic gabapentin and (S-[+]-3-isobutyl-aminobutyric acid block secondary hyperalgesia. *Brain Res* 1998; (1-2); 810: 93-9.
14. Welty D, Wang Y, Busch JA, Taylor CP, Vartanian MG, Radulovic LL et al. Pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics (PD) of CI-1008 (pregabalin) and gabapentin in rats with maximal electroshock. *Epilepsia* 1997; 38(6): 35-43.
15. Kavoussi R. From molecule to medicine. *Eur Neuropsychopharmacol* 2006; 16: 128-33.
16. Cada DJ, Levien T, Baker DE. Pregabalin. *Hospital Pharmacy* 2006; 41(2): 157-72.
17. Yargıç I, Özdemiroğlu FA. Pregabalin kötüye kullanımı: bir olgu sunumu. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni-Bulletin of Clinical Psychopharmacology* 2011; 21(1): 64-6.
18. Jezyk N, Li C, Stewart BH, Wu X, Bockbrader HN, Fleisher D. Transport of pregabalin in rat intestine and Caco-2 monolayers. *Pharm Res* 1999; 16: 519-26.
19. Johnson S, Johnson FN. Pregabalin. *Pharmacotherapy Monographs* 2007; 2 Maurius Press, Lancashire, UK.
20. Radulovic LL, Busch JA, Windsor BL, McNally WP, Sinz MW, Bockbrader HN. Pharmacokinetics of the anticonvulsant agent, CI-1008, in laboratory animals. *Pharm Res* 1996; 13 (Suppl): 480.
21. Guay DR. Pregabalin in Neuropathic Pain: A More "Pharmaceutically Elegant" Gabapentin. *Am Geriatr Pharmacother* 2005; 3: 274-87.
22. Ben-Menachem E. Pregabalin pharmacology and its relevance to clinical practice. *Epilepsia* 2004; 45 (Suppl 6): 13-8.
23. Luszczki JJ. Third-generation antiepileptic drugs: mechanisms of action, pharmacokinetics and interactions. *Pharmacol Rep* 2009; 61(2):197-216.
24. Tassone DM, Boyce E, Guyer J, Nuzum D. Pregabalin: a novel gamma-aminobutyric acid analogue in the treatment of neuropathic pain, partial-onset seizures, and anxiety disorders. *Clin Ther* 2007; 29(1):26-48.
25. Frampton JE, Scott LJ. Pregabalin In the Treatment of Painful Diabetic Peripheral Neuropathy. *Drugs* 2004; 64 (24): 2813-20.

26. Bryans JS, Wustrow DJ. 3-Substituted GABA Analogs with Central Nervous System Activity: A Review. *Med Res Rev* 1999; 19: 149-77.
27. Field MJ, Oles RJ, Singh L. Pregabalin may represent a novel class of anxiolytic agents with a broad spectrum of activity. *Br J Pharmacol* 2001; 132(1): 1-4.
28. Eutamene H, Coelho AM, Theodorou V, Toulouse M, Chovet M, Doherty A, et al. Antinociceptive effect of pregabalin in septic shock-induced rectal hypersensitivity in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 295(1): 162-7.
29. Gajraj NM. Pregabalin for Pain Management. *Pain Practice* 2005; 5(2): 95-102.
30. Chen SR, Xu Z, Pan HL. Stereospecific effect of pregabalin on ectopic afferent discharges and neuropathic pain induced by sciatic nerve ligation in rats. *Anesthesiology* 2001; 95: 1473-79.
31. Taylor CP. The Biology and Pharmacology of Calcium Channel α_2 -a Proteins Pfizer Satellite Symposium to the 2003 Society for Neuroscience Meeting New Orleans, November 10, 2003 *CNS Drug Reviews*, 10(2):183-8.
32. Yusaf SP, Goodman J, Pinnock RD, Dixon AK, Lee K. Expression of voltagegated calcium channel subunits in rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett* 2011; 311: 137-41.
33. Gilron I, Flatters SJL. Gabapentin and pregabalin for the treatment of neuropathic pain: A review of laboratory and clinical evidence. *Pain Res Manage* 2006; 11 (Suppl A): 16-29.
34. Luo ZD, Chaplan SR, Higuera ES, Sorkin LS, Stauderman KA, Williams ME, et al. Upregulation of dorsal root ganglion (α)₂(δ) calcium channel subunit and its correlation with allodynia in spinal nerve-injured rats. *J Neurosci* 2001; 21: 868-75.
35. Martin L, Rabasseda X, Leeson P, Castaner J. Pregabalin. *Drugs of the Future* 2000; 25(8): 877-9.
36. Julia V, Raymond F, Chovet M, Doherty AM. Ligature of the left pelvic nerve: A new model of chronic non inflammatory visceral hyperalgesia. Effect of naproxen and pregabalin. *Gastroenterology* 2000; 118(4, Suppl. 2, Part 1).
37. Lesser H, Sharma U, LaMoreaux L, Poole RM. Pregabalin relieves symptoms of painful diabetic neuropathy: a randomized controlled trial. *Neurology* 2004; 63: 2104-10.

38. French JA, Kugler AR, Robbins JL, Knapp LE, Garofalo EA. Doseresponse trial of pregabalin adjunctive therapy in patients with partial seizures. *Neurology* 2003; 60(10): 1631-7.
39. Moore KL, Agur AMR. *Temel Klinik Anatomi*. (A. Elhan, Çev.). Ankara: Güneş Kitabevleri; 2006.
40. Arıncı K, Elhan A. *Anatomi* (4. bs.). Ankara: Güneş Kitabevleri; 2006.
41. Standring S. *Gray's Anatomy* (40. bs.). London, UK: Churchill Livingstone Elsevier; 2008.
42. Eşrefoğlu M. *Genel Histoloji*. (1. bs.). Malatya: Medipres yayıncılık; 2009
43. Chung KW. *Gross Anatomy* (5. bs.). United States: Lippincott Williams and Wilkins; 2005.
44. Putz R, Pabst R. *Sabotta* (22 bs.). (A. Elhan, çev.). İstanbul: Beta Basım Yayım Dağıtım 2. Cilt; 2006.
45. Berne RM, Levy MN. *Fizyoloji*. (5. Bs). (Türk Fizyolojik Bilimler Derneği çev.). Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri; 2008.
46. Erdogan H. Böbrek İskemi-Reperfüzyon Hasarında Endotelin-A Reseptör Antagonisti BQ-123'ün Nitrik Oxit Üretimiyle İlişkili Koruyucu Etkisi (Tez). Malatya: İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2003.
47. JunqueraLC, CarnerioJ, Kelly RO. (Çeviri editörü: Aytekin Y. *Temel Histoloji*)8th ed, Barış Kitabevi/Appleton&Lange 1998;363-77.
48. Guyton AC. The kidneys and body fluids. In: Guyton AC (eds). *Textbook of Medical Physiology*. WB Saunders Company, Philadelphia 1991; 273–353.
49. Guyton AC, Hall JE. *Tıbbi Fizyoloji*. (11. bs.) (H. Çavuşoğlu, B. Çağlayan Yeğen, Çev.). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. şti; 2006.
50. İşlekel H. Böbrek fonksiyonları ve bozuklukları. Onat T, Emerk K, Sözman EY (Editörler). *İnsan Biyokimyası*. Ankara: Palme Yayıncılık; 2002; 37-42.

51. Burtis CA, Ashwood ER, Tietz NW. Basic prenciples in clinical chemistry. Aslan D (ed). Klinik kimyada temel ilkeler. Ankara: Palme Yayıncılık; 2005; 308-722.
52. Berne RM, Levy MN. Physiology. 4th edition. Mosby, New York 1994;677-87.
53. Guyton AC, Hall JE. Urine Formation by the Kidneys: I. Glomerular Filtration, Renal Blood Flow, and Their Control: Textbook of Medical Physiology. Dokuzuncu baskı. WB Saunders Company Philadelphia, Pennsylvania 1996;315-30.
54. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Uriner sistem. Aytekin Y, Solakoğlu S (Editörler). Temel Histoloji. İstanbul: Barış Kitabevi; 1993; 437-62.
55. Tisher CC. Structure and function of kidneys. In: Goldman L, Bennet JC (eds). Cecil Textbook of Medicine. 7th ed. Pensylvania: WB Saunders Company, 2000; 532-9.
56. Navar LG, Carmine PK, Mitchell KD. Renal circulation In: Text book of Nephrology. Williams&Wilkins Baltimore, 1995; 41-54.
57. Öner G. Böbreklerde İdrar Oluşumu: I. Glomerüler Filtrasyon, Böbrek Kan Akımı ve Bunların Kontrolü, Arthur C, Guyton MD, John E, Hall PhD, Tıbbi fizyoloji, 11. basım, Nobel Tıp Kitapevleri; 2007: 307-27.
58. Robins SL, Kumar V, Cotran SR (Çeviri: U. Çevikbaş). Temel Patoloji. İstanbul Nobel ve Yüce Kitabevi; 1992: 3-24.
59. Şener G, Yeğen BÇ. İskemi Reperfüzyon Hasarı. Klinik Gelişim Dergisi. 2009; 22: 5-13.
60. Kandilci HB, Gümüşel B. Akciğerlerde İskemi-Reperfüzyon Hasarı ve İskemik Önkoşullama. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi 2005; 25: 35-49.
61. Allen DG, Xiao XH. Role of the cardiac Na⁺/H⁺ exchanger during ischemia and reperfusion. Cardiovasc Res 2003; 57:934-41.
62. Maxwell SR, Lip GY. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. Int J Cardiol 1997; 58:95-117
63. Park JL, Lucchesi BR. Mechanisms of myocardial reperfusion injury. AnnThorac Surg 1999; 68:1905-12

64. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 2000; 88: 1474–80.
65. Forsythe J, Jiang B, Iyer N, Agani F, Leung SW, Koos RD, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 4604–13.
66. Sharfuddin AA, Molitoris BA. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol* 2011; 7 (4): 189-200.
67. Semenza GL. Perspective on oxygen sensing. *Cell* 1999; 98 (3): 281-4.
68. Zhao ZQ, Vinten-Johansen J. Postconditioning: Reduction of reperfusion-induced injury. *J Cardiovasc Res* 2006; 70: 200-11.
69. Jiang G, Liu X, Wang M, Chen H, Chen Z, Qiu T. Oxymatrine ameliorates renal ischemia-reperfusion injury from oxidative stress through Nrf2/HO-1 pathway. *Acta Cir Bras* 2015; 30- (6): 422-9.
70. Kiriş İ, Okutan H, Savaş Ç, Yönden Z, Delibaş N. Deneysel Aortik İskemi-Reperfüzyon modelinde renal hasara gadolinyum klorürün etkisi. *Turkish J Vasc Surg* 2005; 14 (2): 13-8.
71. Homer-Vanniasinkam S, Crinnion JN, Gough MJ. Post-ischaemic organ dysfunction: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997; 14: 195–203.
72. Tassiopoulos AK, Carlin RE, Gao Y, Pedoto A, Finck CM, Landas SK, et al. Role of nitric oxide and tumor necrosis factor on lung injury caused by ischemia-reperfusion of the lower extremities. *J Vasc Surg* 1997; 26: 647-65.
73. De Carvalho AL, Vital RB, Kakuda CM, Braz JR, Castiglia YM, Braz LG, et al. Dexmedetomidine on renal ischemia-reperfusion injury in rats assessment by means of NGAL and histology. *Ren Fail* 2015; 37 (3): 526–30.
74. Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. *Turk J Biochem*

2006; 31(2):51–6.

75. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(1):44-84.
76. Gümüştas MK, Atukeren P, Oksidatif ve nitrozatif stresin psikiyatrik bozukluklar ile ilişkisi. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Sempozyum Dizisi No:62. Mart 2008; 329-40.
77. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative Stress İn The Pathogenesis Of Diabetic Neuropathy. *Endocr Rev* 2004; 25: 612–28.
78. Dormandy Tl. An approach to free radicals. *Lancet* 1983; 2: 1010-4.
79. Kapan G. Deneysel Aortik iskemi Reperfüzyon Modelinde Akciğer Hasarı Üzerine Eritropoetin'in Etkisi. Uzmanlık Tezi. T.C. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı. 2007
80. Memişoğulları R. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi* 2005; 3: 30-9.
81. Flora SJ. Structural chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxid Med Cell Longev* 2009; 2: 191-206.
82. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 2001; 54: 176-86.
83. Özata M. Endokrinoloji Metabolizma ve Diyabet. *İstanbul Tıp*, 2. Baskı, 2011; 655-63.
84. Funk JL. Endokrin Pankreas Bozuklukları. İn: McPhee S.J, ed. Süleymanlar G, ç.ed. Hastalıkların Patofizyolojisi, Dördüncü baskıdan çeviri. Palme Yayınları, 2006; 502-30.
85. Aladağ MA, Türköz Y, Özerol İH. Nitrik Oksit ve Nörofizyopatolojik Etkileri. *T Klin Tıp Bilimleri* 2000; 20:107-11.

86. Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. Hacettepe Tıp Dergisi 2002; 33(2):110 -8.
87. Souza MA, Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Ribeiro LR, Lima FD, et al. Swimming training prevents pentylenetetrazol-induced inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. Epilepsia 2009; 50(4):811-23.
88. Akkoç H. Miyokardiyal İskemi Reperfüzyon Hasarı. Dicle Tıp Dergisi 2008; 35(3):211-5.
89. Frangogiannis NG. Chemokines in ischemia and reperfusion. Thromb Haemost 2007; 97:738-47.
90. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. Br Med Bull 2004; 19: 70-86.
91. Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2007; 27:2514-23.
92. Adams JE, Bodor GS, Davila-Roman VG, Delmez JA, Apple FS, Ladenson JH, et al. Cardiac troponin I. A marker with high spesificity for cardiac injury. Circulation 1993;88: 101-06.
93. Chatterjee PK. Novel pharmacological approaches to the treatment of renal ischemia-reperfusion injury:a comprehensive review. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2007; 376:1-43.
94. Korthuis RJ, Granger DN. Reactive oxygen metabolites, neutrophils, and the pathogenesis of ischemic-tissue/reperfusion. Clin Cardiol 1993; 16:19-26.
95. Thrane AS, Skehan JD, Thrane PS. A novel interpretation of immune redundancy and duality in reperfusion injury with important implications for intervention in ischemic disease. Med Hypotheses 2007; 68: 1363-70.

96. Zhang W, Smith C, Shapiro A, Monette R, Hutchison J, Stanimirovic D. Increased expression of bioactive chemokines in human cerebrovascular endothelial cells and astrocytes subjected to simulated ischemia in vitro. *J Neuroimmunol* 1999; 101:148-60.
97. García-Villalón AL, Amezquita YM, Monge L, Fernández N, Salcedo A, Diéguez G. Endothelin-1 potentiation of coronary artery contraction after ischemia-reperfusion. *Vascul Pharmacol* 2008; 48: 109-14.
98. Göksel S, Yeğen BC. İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Klinik Gelişim Dergisi* 2009; 22:5-13.
99. Stammberger U, Carboni GL, Hillinger S, Schneiter D, Weder W, Schmid RA. Combined treatment with endothelin-and PAF-antagonists reduces posttransplant lung ischemia/reperfusion injury. *J Heart Lung Transplant* 1999; 18:862-8.
100. Lin E, Calvano SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery* 200; 127:117-26.
101. Cemeli E, Baumgartner A, Anderson D. Antioxidants and the comet assay. *Mut Res* 2009; 681: 51-67.
102. Halliwell B. Free Radicals and other reactive species in Disease. *Encyclopedia of Life Sciences* 2001; 1-7.
103. Matough FA, Budin SB, Hamid ZA, Alwahaibi N, Mohamed J. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Diabetic Complications. *Sultan Qaboos Univ Med* 2012; 12: 5-18.
104. Sezenler E. Deneysel Olarak Oluşturulan Böbrek İskemi Reperfüzyon Sonrası Oluşan Böbrek Hasarına Karşı Sesamin'in Koruyucu Etkisinin İncelenmesi (Tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2013.
105. Wijnberger LD, Krediet TG, Visser GH, Van Bel F, Egberts J. Early neonatal antioxidant capacity after preexisting impaired placental function. *Early Hum Dev* 2003; 71: 111-6.

106. Kakkar R, Mantha SV, Radhi J, Prasad K, Kalra J. Increased oxidative stress in rat liver and pancreas during progression of streptozotocin-induced diabetes. *Clin Sci* 1998; 94: 623-32.
107. Özer Ç, Gönül B. Diyabetik Sıçanlarda Askorbik Asit Uygulamasının Karaciğerde Oksidan Olaylara Etkisi. *Gazi Tıp Dergisi / Gazi Medical Journal* 2006; 17: 196-9.
108. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, et al. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res* 1995; 18: 1-11.
109. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 2005; 16:577-86.
110. Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi W, Tan DX. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 917:376-86.
111. Gonzalez-Perez O, Moy-Lopez NA, Guzman-Muniz J. Alpha-tocopherol and alpha-lipoic acid. An antioxidant synergy with potential for preventive medicine. *Rev Invest Clin* 2008; 60: 58-67.
112. Silalahi J. Anticancer and health protective properties of citrus fruit components. *Asia Pac J Clin Nutr* 2002;11:79-84.
113. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. *Mimoza Yayınları* 1995; 1-60.
114. Tarpey MM, Wink DA, Grisham MB. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 286(3):R431-44.
115. Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med* 2000; 29(11):1106-14.

116. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005; 38(12):1103-11.
117. Koracevic D, Koracevic G, Djordjevic V, Andrejevic S, Cosic V. Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *J Clin Pathol* 2001; 54(5):356-61.
118. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239(1):70-6.
119. Benzie IF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol* 1999; 299:15-27.
120. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004; 37(4):277-85.
121. Kampa M, Nistikaki A, Tsaousis V, Maliaraki N, Notas G, Castanas E. A new automated method for the determination of the Total Antioxidant Capacity (TAC) of human plasma, based on the crocin bleaching assay. *BMC Clin Pathol* 2002; 2(1):3-18.
122. Janaszewska A, Bartosz G. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand J Clin Lab Invest* 2002; 62(3):231-6.
123. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999; 26(9-10):1231-7.
124. Agarwal A, Prabakaran SA, Said TM. Prevention of oxidative stress injury. *J Androl* 2005; 26(6):654-60.

125. Belguith-Hadriche O, Bouaziz M, Jamoussi K, El Feki A, Sayadi S, Makni-Ayedi F. Lipid-lowering and antioxidant effects of an ethyl acetate extract of fenugreek seeds in high-cholesterol-fed rats. *J Agric Food Chem* 2010; 58(4):2116-22.
126. Elmore S. Apoptosis: A Review Of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495-516.
127. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11: 621-632.
128. Hockenbery D. Defining Apoptosis. *Am J Pathol* 1995; 146(1): 16– 19.
129. Tandoğan B, Ulusu NN. Kalsiyum Bağlayıcı Proteinler. *Türk Biyokimya Dergisi* 2006; 31 (1): 36–40.
130. Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, Sınıgaglia E, Sinha AA, Natale C, et al. Cell death: Apoptosis Versus Necrosis. *Int J Oncol* 2000; 21(1): 165-70.
131. Zhang J, Xu M. Apoptotic DNA Fragmentation And Tissue Homeostasis. *Trends in Cell Biology* 2002; 12 (2): 84- 9.
132. Ferrara N. An update on biological and therapeutic aspects. *Curr Opin Biotechnol* 2000; 11:617-24.
133. Ferrara N. Role of Vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280:C1358-66.
134. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9:669-76.
135. Tamanini C, De Ambrogi M. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reprod Domest Anim* 2004; 39:206-16.
136. Thomas KA. VEGF, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chemistry* 1996; 271:603-6.
137. Bren EC. VEGF in biological control. *J Cell Biochem* 2007;102:1358-67.

138. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor-dependent and- independent regulation of angiogenesis. *BMB Reports* 2008; 41(4):278-86.
139. Bikfalvi A. Recent developments in the inhibition of angiogenesis: Examples from studies on platelet factor-4 and the VEGF/VEGFR system. *Biochemical Pharmacology* 2004; 68:1017-21.
140. Deguchi T, Hashiguchi T, Horinouchi S, Uto T, Oku H, Kimura K, et.al. Serum VEGF increases in diabetic polyneuropathy, particularly in the neurologically active symptomatic stage. *Diabet Med* 2009; 26:247-52.
141. Zivin JA, De Girolami U. Spinal cord infarction: a highly reproducible stroke model. *Stroke* 1980;11:200-2
142. Sufianova GZ, Usov LA, Sufianov AA, Shapkin AG, Raevskaya LY. New minimally invasive model of spinal cord ischemia in rats. *Bull Exp Biol Med* 2002; 133:116-20
143. Lang-Lazdunski L, Matsushita K, Hirt L, Waeber C, Vonsattel JG, Moskowitz MA. Spinal cord ischemia development of a model in the mouse. *Stroke* 2000; 31:208-13
144. Boğa M, Disçigil B, Özkısacık E, Gürcün U, Badak İ, Dikicioğlu E, et al. The combined effect of iloprost and N-Acetylcysteine in preventing spinal cord ischemia in rabbits. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2006; 31:366-72
145. Tator CH, Kaptanoğlu E. Strategies for Neuroprotection after spinal cord injury. In: Zileli M, Özer AF (eds). *Omurilik ve Omurga cerrahisi* 2002; 813-32
146. Mautes AEM, Weinzierl MR, Donovan F, Noble LJ. Vascular events after spinal cord injury: contribution to secondary pathogenesis. *Physical Therapy* 2000; 80:673-87
147. Kazanci B, Ozdogan S, Kahveci R, Gokce EC, Yigitkanli K, Gokce A, et al. Neuroprotective Effects of Pregabalin Against Spinal Cord Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *Turk Neurosurg* 2016; 10.5137/1019-5149.
148. Aşcı S, Demirci S, Aşcı H, Doğuç DK, Onaran İ. Neuroprotective Effects of Pregabalin on Cerebral Ischemia and Reperfusion. *Balkan Med J* 2016; 33(2):221-7.

149. Kale A, Börcek AÖ, Emmez H, Yildirim Z, Durdağ E, Lortlar N, et al. J Neurosurg Spine 2011 ;15(3):228-37.
150. Cakir M, Polat A, Tekin S, Vardi N, Taslidere E, Rumeysa Duran Z, et al. The effect of dexmedetomidine against oxidative and tubular damage induced by renal ischemia reperfusion in rats. Renal Fail 2015; 37(4): 704-708.
151. Khajuria A, Tay C, Shi J, Zhao H, Ma D. Anesthetics attenuate ischemia reperfusion induced renal injury: Effects and mechanisms. Acta Anaesthesiol Taiwan 2014; 52: 176-84.
152. Wan X, Hou LJ, Zhang LY, Huang WJ, Liu L, Zhang Q, et al. IKK α is involved in kidney recovery and regeneration of acute ischemia/reperfusion injury in mice through IL-10-producing regulatory T cells. Dis Model Mech 2015; 8: 733-42.
153. Nigwekar SU, Kandula P, Hix JK, Thakar CV. Off-pump coronary artery bypass surgery and acute kidney injury: a meta-analysis of randomized and observational studies. Am J Kidney Dis 2009; 54(3): 413-23.
154. Ha KY, Carragee E, Cheng I, Kwon SE, Kim YH. Pregabalin as a Neuroprotector after Spinal Cord Injury in Rats: Biochemical Analysis and Effect on Glial Cells. J Korean Med Sci 2011; 26: 404-11.
155. Li M, Ona VO, Chen M, Kaul M, Tenneti L, Zhang X, et al. Functional role and therapeutic implications of neuronal caspase-1 and -3 in a mouse model of traumatic spinal cord injury. Neuroscience 2000; 99(2): 333-42.
156. Uzar E, Acar A, Fırat U, Evliyaoğlu O, Alp H, Tüfek A, et al. Deneysel Serebral İskem/Reperfüzyon Hasarında Kafeik Asit Fenetil Esterin Koruyucu Etkisi. Turk Norol Derg 2011;17:131-6.
157. Calikoglu C, Aytekin H, Akgul O, Akgul MH, Gezen AF, Akyuz F, et al. Effect of Pregabalin in Preventing Secondary Damage in Traumatic Brain Injury: An Experimental Study. Med Sci Monit 2015; 21:813-20.

8. ÖZET

SPİNAL KORD İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI OLUŞTURULAN RATLARDA PREGABALİNİN BÖBREK DOKUSU ÜZERİNE ETKİSİ

Dr. Emine Ünal Ceran, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilimdalı

Ankara, Türkiye

Amaç: Bu çalışmanın amacı sıçanlarda spinal kord iskemi-reperfüzyon (İR) modelinde iskemi ile birlikte uygulanan düşük ve yüksek doz pregabalinin böbrek dokusu üzerine koruyucu etkilerini araştırmaktır.

Metot: Etik kurul onayı alındıktan sonra, 24 tane Wistar rat randomize olarak dört gruba ayrıldı (n=6). Kontrol (grup K), İ/R (grup İ/R), İ/R-düşük doz pregabalin (grup İ/R-DP), İ/R-yüksek doz pregabalin (grup İ/R-YP). Tüm gruplara anestezi altında laparotomi uygulandı. Grup İ/R’ de laparotomi sonrasında 120 dakika süre ile abdominal aortaya kros klemp konularak spinal kord iskemi hasarı gerçekleştirildi. 120 dakikalık iskemiye takiben damar klempini açılarak reperfüzyon sağlandı. Grup İ/R-DP’ de iskemiden 15 dakika önce 30 mg/kg pregabalin, grup İ/R-YP’ de iskemiden 15 dakika önce 200 mg/kg pregabalin intraperitoneal uygulandı. Reperfüzyon dönemi bitiminde böbrek dokusu biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler için alındı.

Bulgular: Hematoksilen Eozin boyaması ile yapılan genel doku değerlendirmesinde İ/R grubunda bowman kapsülünde yer alan damar ağından dışarı sızan eritrosit miktarının kontrol grubuna göre fazla olduğu yani bowman kapsülünde ödem mevcut olduğu tespit edildi. Düşük doz grubunda bu histopatolojik bulguda değişme olmadığı ama 200mg grubunda belirgin şekilde iyileşme göstererek kontrol grubuna benzer görüntü olduğu tespit edildi.

Bununla birlikte herhangi bir inflamatuvar hücre göçü, angiogenetik değişiklikler yani neovaskülarizasyon olmadığı gözlemlendi. PAS boyamasında ise İ/R ve düşük doz grubunda çok hafif ödematöz değişiklikler var olmasına karşın kontrol ve 200 mg grubuna göre karşılaştırıldığında aralarında belirgin bir farklılık olmadığı ve gerek Bowman kapsülü içi damarlarda ve diğer tüm tübüllerde bazal membranda hiçbir sorun olmadığı gözlemlendi.

p53 boyaması ise önemli bulgular içermektedir. Kontrol grubunda hiçbir p53 ekspresyon eden hücre bulunmazken İ/R grubunda çok belirgin ve bilhassa bazı Bowman kapsülleri içinde farklı yoğunluklarda p53 ekspresyonu tespit edildi. Genel tübüllerde herhangi bir ekspresyon tespit edilmedi. İlginç olarak düşük doz uygulanan grupta p53 ekspresyonunun belirgin derecede siliştiği ancak 200 mg uygulanan grupta çok belirgin şekilde olduğu tespit edildi. Bu gruptaki ekspresyon İ/R grubundan bile daha belirgindi. TOS enzim aktivitesi İ/R grubunda K, İ/R-DP ve İ/R-YP gruplarına göre anlamlı yüksek olarak bulundu. Benzer şekilde TAS enzim aktivitesi İ/R grubunda K, İ/R-DP ve İ/R-YP gruplarına göre anlamlı yüksek olarak tespit edildi.

Sonuç: Bu sonuçlar ratlarda spinal kord İ/R hasarında iskemi öncesi uygulanan farklı dozda pregabalinin böbrekleri kısmen koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: spinal kord iskemi reperfüzyon, pregabalin, böbrek, p53, TOS, TAS, histopatoloji

9. SUMMARY

EFFECTS OF PREGABALINE ON KIDNEY TISSUE IN SPINAL CORD ISCHEMIA REPERFUSION INJURED RATS

Dr. Emine Ünal Ceran, Gazi University Faculty of Medicine's Department of Anesthesiology and Reanimation,

Ankara, Turkey

Aim: The purpose of this study was to investigate the protective effects of low and high dose pregabalin on renal tissue that was administered in rat spinal cord ischemia-reperfusion (I/R) model.

Methods: 24 Wistar rats were randomized into four groups after approval of the ethical committee (n=6). Experimental groups were indicated as; control (C group), I/R (I/R group), I/R-low dose pregabalin (I/R-LP group), I/R-high dose pregabalin (I/R-HP group). Laparotomy was performed in all groups under anesthesia. After laparotomy in I/R group, a cross clamp was placed in the abdominal aorta for 120 minutes to cause spinal cord ischemia injury. Following 120 minutes of ischemia, reperfusion was achieved by opening the vascular clamp. I/R-LP group received 30 mg/kg pregabalin intraperitoneally 15 minutes before ischemia. Likewise, 200 mg/kg of pregabalin was administered intraperitoneally for 15 minutes in I/R-HP group. At the end of the reperfusion period, kidney tissue was extracted for biochemical and histopathological examinations.

Results: Hematoxylin-eosin staining revealed that the amount of erythrocytes leaking out of the vein web in the bowman capsule was higher in the I/R group compared to the controls, indicating the presence of edema in the bowman capsule. In the

low-dose group, there was no change in the histopathological findings, but a significant improvement was observed in the 200 mg group where the histopathological findings were similar to that of controls. In addition, inflammatory cell migration was not observed. Similarly, there was no effect in angiogenic changes, in other words, there was not any neovascularization. Even though there was a very slight edematous change in the I/R and low dose groups after PAS staining, this change was not significant compared to the controls and 200 mg group. Moreover, there was not any effect in the basal membrane of inner vessels of the bowman capsule and all other tubules.

p53 staining revealed important findings. In the control group, p53-expressing cells were not detected, however, the presence of p53-expressing cells were identified clearly in the IR group, especially at different intensities in some bowman capsules. No expression was detected in general tubules. Interestingly, a significant reduction of p53 expression was observed in the low-dose group. Conversely, it was significantly increased in the 200 mg administered group. Expression in this group was even more pronounced than in the I/R group. TOS enzyme activity was found to be significantly higher in the I/R group compared to the C, I/R-LP and I/R-HP groups. Likewise, TAS enzyme activity was found to be significantly higher in the I/R group compared to the C, I/R-LP and I/R-HP groups.

Conclusions: These results demonstrate that pregabalin administered at different doses before the ischemia has a partial protective effect in rats with spinal cord IR injury.

Key Words: Spinal cord ischemia-reperfusion, pregabalin, kidney, p53, TOS, TAS, histopathology.

10.EKLER

Ek-1: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul Onayı

Ek Tarih ve Sayısı: 18/02/2016-E.21631

 T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Doç. Dr. Nurten İNAN
Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Nurten İNAN, Emine ÜNAL CERAN, Ayşegül KÜÇÜK, Mustafa ARSLAN, Murat TOSUN, Ali Doğan DURSUN, Yakup TATAR ve Abdullah ÖZER'den oluşan, G.Ü.ET-16.016 kod numaralı ve "Spinal Kord İskemi Reperfüzyon Hasarı Oluşturulan Ratlarda Farklı Dozlarda Kullanılan Pregabalinin Koruyucu Etkisinin Araştırılması" adlı başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-16.016 and entitled "*Protective Effects of Different Doses of Pregabalin on Spinal Cord Ischemia Reperfusion Injury in Rats*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

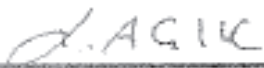
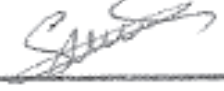
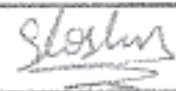
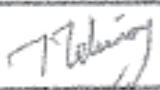
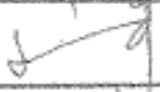
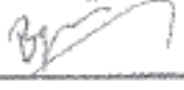
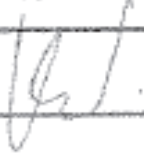
e-imzalıdır
Prof. Dr. Leyla AÇIK
Kurul Başkanı

EK :
1 Liste

Ankara
Tel 0 (312) 202 20 57 Faks 0 (312) 202 20 63

Bilgi için Şenay Seloğlu
Genel Evrak Sorumlusu

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM
LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ :27.01.2016		TOPLANTI SÁYISI : 02	
ADI-SOYADI		İMZA	
Prof.Dr.Leyla AÇIK (Başkan)			
Uzman Dr.Şeyda DİKER (Başkan Yrd.)			
Prof.Dr.Esra AKKOL			
Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU			
Prof.Dr.Tuncay PEKER		KATILMADI	
Prof.Dr.Şule COŞKUN CEVHER			
Doç.Dr.Turgay TEKİNAY			
Doç.Dr.Süleyman YEŞİL			
Yrd.Doç.Dr.İhsan YIKILGAN			
Uzm.Dr.Burcu EKİM			
Dr.Kadir BAŞAR		KATILMADI	
Osman İC			

11.ÖZGEÇMİŞ

Adı: EMİNE

Soyadı: ÜNAL CERAN

Doğum Yeri ve Tarihi: SİVAS / 20.08.1985

Eğitim:

Tıpta Uzmanlık: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilimdalı 2012-2017

Lisans - Y. Lisans: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi 2003-2010

Ortaöğretim: Sivas Selçuk Anadolu Lisesi- Sivas Fen Lisesi 1996-2003

İlköğretim: Kazım Karabekir Paşa İlkokulu 1991-1996

Yabancı Dil: İngilizce

ÇALIŞTIĞI KURUMLAR

Altınyayla İlçe Devlet Hastanesi, SİVAS

Gazi üniversitesi Tıp Fak. Anesteziyoloji ve Reanimasyon AB, ANKARA

KATILDIĞI KONGRE, TOPLANTI ve KURSLAR

1. Türk Anestezi ve Reanimasyon Derneği 49. Ulusal Kongresi, 2015
2. Türk Anestezi ve Reanimasyon Derneği 50. Ulusal Kongresi, 2016
3. İletişim Becerileri Kursu, 2015
4. Periferik Blok Kursu, 2013