

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI**

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Sedat ÜSTÜNDAĞ

**DENEYSEL AKUT MİYOglobİNÜRİK
BÖBREK YETMEZLİĞİ GELİŞİMİNDE DEĞİŞİK
DOZLARDAKİ C VİTAMİNİNİN ETKİLERİ**

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Mehmet Şevki UYANIK

EDİRNE 2010

TEŐEKKÜR

Uzmanlık eğitim dđnemim boyunca ve tez çalışmam sırasında değerli fikirleriyle bana yol gđsteren, destek ve yardımlarını esirgemeyen hocam Doç. Dr. Sedat ÜSTÜNDAĞ'a, desteğini esirgemeyen İç Hastalıkları AD'nın eski ve yeni Başkanları Prof. Dr. Armağan TUĞRUL ve Prof. Dr. Gülbin DÖKMECİ'ye, eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleriyle katkıda bulunan Nefroloji BD Başkanı Prof. Dr. Saniye ŐEN ve İç Hastalıkları AD'de görevli tüm hocalarıma, uzman ve asistan arkadaşlarıma, Histoloji AD Başkanı Prof. Dr. Mehmet KANTER'e, Biyokimya AD öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Hakan ERBAŐ'a, Mikrobiyoloji AD öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Hakan KUNDURACILAR'a, Yüksek Kimyager Őentürk ÇİFTÇİ'ye, Uzm. Biyolog Cevat AKTAŐ'a, Biyolog Mustafa ERBOĞA'ya, Nefroloji Kliniği hemőire ve çalıőanlarına teőekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
AKUT BÖBREK YETMEZLİĞİ	3
MİYOglobİNÜRİK AKUT BÖBREK YETMEZLİĞİ	4
SERBEST RADİKALLER	8
SERBEST RADİKALLERİN KAYNAKLARI	13
SERBEST RADİKALLERE BAĞLI HASAR MEKANİZMALARI	16
SERBEST RADİKALLERE KARŞI SAVUNMA DÜZENEKLERİ	20
APOPTOZ	22
C VİTAMİNİ	24
GEREÇ VE YÖNTEMLER	28
BULGULAR	37
TARTIŞMA	66
SONUÇLAR	75
ÖZET	78
SUMMARY	80
KAYNAKLAR	82
EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

ABY	Akut böbrek yetmezliği
ATN	Akut tubüler nekroz
ATP	Adenin trifosfat
Ca⁺²	Kalsiyum
DNA	Deoksiribo nükleik asit
Fe⁺²	Ferröz demir
Fe⁺³	Ferrik demir
GFR	Glomerular filtration rate (Kreatinin klerensi)
GADPH	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
GPx	Glutasyon peroksidaz
GSH	Redükte glutasyon
H⁺	Hidrojen atomu
Hb	Hemoglobin
H+E	Hemotoksilen eozin
HO₂⁻	Protonlanmış süperoksit radikali
H₂O₂	Hidrojen peroksit
HK	Hastalıklı kontrol
im	İntramuskuler
ip	İntraperitoneal
K⁺	Potasyum
KAT	Katalaz
LOO⁻	Alkoksil radikali

MABY	Miyoglobürik akut böbrek yetmezliği
MDA	Malonil dialdehid
Na⁺	Sodyum
NaCl	Sodyum klorür
NAG	N-asetil glukozaminidaz
NO	Nitrik oksit
ODCV	Orta doz C vitamini
O₂^{-•}	Süperoksit radikali
OH^{-•}	Hidroksil radikali
ONOO⁻	Peroksinitrit
PBS	'Fosfat buffer salin'
PLT	Trombosit
ROO^{-•}	Organik (lipid, alkil veya kısa zincir) hidroperoksil radikali
ROOH	Organik (lipid, alkil veya kısa zincir) hidroperoksit
ROP	Reaktif oksijen partikülleri
ROR	Reaktif oksijen radikalleri
RNP	Reaktif nitrik oksit partikülleri
1ΔgO₂	Singlet Oksijen
sKr	Serum kreatinini
SK	Sağlıklı kontrol
SOD	Süperoksit dismutaz
UAA	Üriner albumin atılımı
uKr	Üriner kreatinin atılımı
YDCV	Yüksek doz C vitamini

GİRİŞ VE AMAÇ

Akut böbrek yetmezliği (ABY) böbrek işlevselliğinin saatler veya günler içerisinde kaybı, nitrojen artık ürünlerinin birikimi ve su-elektrolit dengesinin sürdürülememesi ile karakterizedir (1). İnsidansı milyonda 209 olarak bildirilen, mortalitesi %50-80'e ulaşan ABY'nin, % 2-15'i travmatik kas hasarı sonucu oluşan rabdomiyolize bağlı gelişir (2-4). Savaş dönemleri ve doğal afetlerde, rabdomiyolize bağlı gelişen miyoglobinürik akut böbrek yetmezliği (MABY) epidemik düzeylere ulaşabilir (4). Gölcük'te 1999 yılında gerçekleşen, 16 milyon insanımızın yaşadığı bölgede etkili olan ve kaydedilmiş en büyük renal felaket olarak nitelendirilen depremde çeşitli hastanelere yatırılan yaklaşık 24.000 hastanın 639'unda (% 12) MABY gelişmiş, 477 (% 9) vakaya acil hemodiyaliz tedavisi uygulanmak zorunda kalmış, teknik imkansızlıklar nedeni ile yeterli diyaliz hizmeti verilemeyen hastalar olmuştur (4). Ülkemizin deprem kuşağında olması ve yakın zamanda beklenen Marmara depremi, MABY gelişiminin önlenmesi ve hastalığının şiddetinin azaltılabilmesine yönelik çalışmaların öncelik ve gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Miyoglobinürik akut böbrek yetmezliği gelişiminde; hipovolemi ve miyoliz sonucu dolaşıma salınan hücre içi vazoaktif aminlerin etkisiyle gelişen intrarenal vazokonstriksiyona bağlı renal iskemi, intraluminal tıkaç oluşumu sonucu gelişen tubüler obstrüksiyon ve miyoglobin toksisitesi önemli rol oynamaktadır (5-7). Ayrıca, pek çok çalışma patogeneizde oksidatif stresin önemini ortaya koymaktadır (8-11). Rabdomiyoliz sonucu açığa çıkan ferröz demir (Fe^{+2}) 'Fenton' ve 'Haber-Weiss' kimyasal yolları sonucu hidroksil radikali (OH^{\cdot}), süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşumuna neden olur. Reaktif oksijen

partikülleri (ROP) tarafından başlatılan oksidatif stres sonucu protein denatürasyonu, deoksiribo nükleik asit (DNA) hasarı ve özellikle OH^{\cdot} 'in çoklu-doymamış lipidlere etkisi ile lipid peroksidasyonu gelişir (12). Gelişen lipid peroksidasyonu yaygın böbrek hasarına neden olur (13).

C vitamini temel etkisini serbest radikalleri temizleyerek gösteren güçlü bir antioksidandır (14). Lipid peroksidasyon reaksiyonunu başlatabilme özelliği bilinen OH^{\cdot} 'in yanı sıra; $\text{O}_2^{\cdot-}$, singlet oksijen ($1\Delta\text{gO}_2$), peroksil radikal, nitrojen peroksit, hipoklorik asit, nitroksit ve ONOO^- C vitamini'nin hedefi olan radikallerdir (15). C vitamini, ROP zincir reaksiyonlarını kırarak endojen antioksidanların tüketimini azaltır, yaşamsal enzimlerin indirgenmiş durumda kalmalarını sağlar. Böylece lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi önemli hücrel molekülleri oksidatif hasardan korumuş olur (16). C vitamini'nin, koyalarda gentamisin aracılı nefrotoksisitede; ratlarda parasetamole bağlı nefrotoksisite, arsenik ilişkili karaciğer ve böbrek hasarı, sisplatin ilişkili nefrotoksisite ve vankomisin ilişkili nefrotoksisitede oksidatif hasarı önleyerek nefron koruyucu etkili olduğu gösterilmiştir (17-21).

Literatürde, MABY modelinde güçlü antioksidan C vitaminin kullanıldığı tek çalışma olan ve kliniğimizde yapılan çalışmada; düşük dozdaki (20 mg/kg/gün; 4 gün) C vitamini'nin ratlarda oluşturulan MABY modelinde, oksidatif stresi, fonksiyonel-yapısal nefron hasarını kısmen düzelttiği saptanmıştır (22). Çalışmanın sonucunda, bu modelde daha yüksek doz C vitamini kullanımının olumlu etkileri artırabileceği vurgulanmıştır. Bu nedenle, çalışmamızda 150 ve 300 mg/kg dozlardaki C vitamini uygulamasının gliserol ile oluşturulan MABY modelinde oksidatif stres göstergeleri, nefron fonksiyonları, tubüler hücre nekroz-apoptozu ve tubüler tıkaç oluşumuna etkilerini araştırmayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

AKUT BÖBREK YETMEZLİĞİ

Akut böbrek yetmezliği böbrek işlevselliğinin saatler veya günler içerisinde kaybı, vücutta buna bağlı olarak nitrojen artık ürünlerinin birikmesi ve su-elektrolit dengesinin sürdürülememesi ile karakterizedir (1). ABY ile ilgili ilk tanımlama 1917 yılında Alman patolog Hackradt tarafından birinci dünya savaşında ciddi travmatik yaralanmaya maruz kalan askerlerde yapılmıştır (23).

Çeşitli araştırmalarda, ABY insidansı tanımlama kriterleri ve çalışma popülasyonlarının farklı olmasına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (23). Bazı çalışmalarda serum kreatinin (sKr) konsantrasyonu, bazılarında bazal sKr düzeylerindeki yükselme bazılarında da diyaliz tedavisini gerektirip gerektirmediği kriter olarak alınmıştır (23). Genel olarak hastaneye başvuruların % 1-5'ini ABY oluşturmaktadır (24). Başarılı kardiyopulmoner resüsitasyondan sonra % 12, koroner arter by-pass greft operasyonundan sonra % 22, yoğun bakım takiplerinde % 30 oranında ABY gelişimi saptanmıştır (25-27). Destek tedavisindeki devam etmekte olan tüm gelişmelere, aralıklı veya sürekli hemodiyaliz tedavilerine rağmen ABY'nin ne insidansı, ne de mortalite ve morbidite oranlarında gerileme olmamıştır (28-31). ABY mortalitesi prerenal azotemi nedeniyle hastaneye yatanlarda %7 iken, postoperatif ABY'de % 80'i geçecek kadar fazladır (24, 32).

Klinik olarak ABY prerenal, postrenal ve renal olmak üzere üçe ayrılır. Prerenal ABY % 70 ile ABY'nin en sık rastlanan formudur ve hafif-orta şiddette renal hipoperfüzyona fizyolojik bir yanıtıdır (24). Prerenal ABY renal kan akımı ve glomerüler filtrasyonun (GFR)

tekrar sağlanması ile geri dönüşümlüdür. Böbrek parankim dokusu hasarlı değildir. Daha ciddi hipoperfüzyon varlığında ise renal parankimal iskemik zedelenme ve sekonder renal ABY gelişir (1). Eğer böbrek yetersizliğinin nedeni primer renal parankimal yetmezlik ise intrinsik renal yetmezlik olarak adlandırılır. Eğer böbrek disfonksiyonu idrar yollarının tıkanması ile ilişkili ise postrenal böbrek yetmezliği olarak adlandırılır. Postrenal ABY böbrek yetmezliğinin % 5'inden azını oluşturur (26).

Akut böbrek yetmezliğinin en sık karşılaşılan şekli olan ve sıklıkla ABY ile sinonim olarak kullanılan akut tübüler nekroz (ATN) genelde iskemi (iskemik ABY) veya nefrotoksisite (nefrotoksik ABY) sonucu gelişir (26). Akut tübüler nekroz % 50 iskemik, % 35 nefrotoksik nedenlere bağlı gelişir fakat hastaneye yatışı gerektiren ATN'nin % 50 etyolojisi çok nedenlidir (33).

MİYOGLOBİNÜRİK AKUT BÖBREK YETMEZLİĞİ

Rabdomiyoliz çizgili kas hücrelerinin hasarı sonrası K^+ , P, ürik asit, miyoglobin ve sarkoplazmik proteinler gibi hücresel elemanların dolaşıma geçmeleri olarak tanımlanır (34). Rabdomiyoliz, ABY'nin temel nedenlerinden biridir ve yakın zamanda yapılan çalışmalar patofizyolojinin daha net anlaşılmasını sağlamıştır. MABY gelişiminde; hipovolemi ve miyoliz sonucu dolaşıma salınan hücre içi vazoaaktif aminlerin etkisiyle gelişen intrarenal vazokonstriksiyona bağlı böbrek iskemisi, intraluminal tıkaç oluşumu sonucu gelişen tübüler obstrüksiyon ve miyoglobin toksisitesi önemli roller oynamaktadır (7, 35). Ayrıca pek çok çalışma patogeneizde oksidatif stresin önemini ortaya koymaktadır (8-11).

Rabdomiyolize ikincil dolaşan plazma miyoglobin seviyelerinde yükselme hem-pigment ilişkili ATN'ye neden olabilir (6, 34-36). Rabdomiyoliz hem travmatik hem de non-travmatik kas hasarına ikincil gelişebilir (37).

Rabdomiyolize bağlı ATN ile ilişkili bilgilerin büyük çoğunluğu doğal veya insan yapısı felaketlerin sonucu oluşan 'crush sendromu'dan elde edilmiştir. Her ne kadar 20. yy başlarında savaş yaraları ve motorlu araç kazalarına bağlı ABY tanımlanmış olsa da miyoglobinürinin biyokimyasal olarak ilk saptanması ikinci dünya savaşı sırasında Londra hava saldırısında yaralanmış askerlerden alınan idrar örneklerinden yapılmıştır (38). Tarihteki ilk 'crush sendromu' tanımlaması bir Japon dermatolog olan Seigo Minami tarafından 1922 yılında birinci dünya savaşı sırasında yaralanan üç Alman askerinin ölümünden ağır hasar görmüş kaslarının yıkımına bağlı 'oto-zehirlenme'nin sorumlu tutulması ile yapılmıştır (39).

'Crush hasarı' yalnızca travmatik olayı tarif ederken 'Crush sendromu' travmaya bağlı rabdomiyoliz ve sonrasında gelişen belirti ve bulguları kapsar (40). Bu belirti ve bulgular arasında gergin, ödemli, ağrılı kaslar; hipovolemik şok, MABY, sıvı-elektroit dengesizlikleri, asidoz, kalp ve solunum yetmezliği vardır (41).

Deprem sonrasında ortaya çıkan 'crush sendromu' sıklığını incelemeyen önce şu bilgiler göz önünde tutulmalıdır: 1- Deprem travmalarının tümünde rabdomiyoliz gelişmez 2- Rabdomiyoliz gelişenlerin tümünde 'crush sendromu' gelişmez. 3- 'Crush sendromu' gelişenlerin de tümünde MABY gelişmez (41).

'Crush sendromu' travmatik rabdomiyolizin % 30-50'sinde gelişir ve sıklıkla katastrofik depremlerden sonra gözlenir (42). Yapılan bazı epidemiyolojik çalışmalarda katastrofik depremlerden sonra yaralı kurtulan kurbanların % 2-6'sında 'crush sendromu' geliştiği ifade edilmektedir (4, 43, 44).

Rabdomiyoliz depremlerden sonra gözlenen geç mortalitenin, travmadan sonra en sık nedenidir (45). Bir binanın ani çöküşünden 1-28 saat arasında kurtulan 18-41 yaş arası kazazedelerin değerlendirildiği bir çalışmada kurbanların % 80'i direk travma ile yaşamlarını kaybetmiş, % 10'u küçük travmalar ile hayatta kalmış, % 10'u ciddi şekilde yaralanmış ve bunların % 7'sinde 'crush sendromu' geliştiği gösterilmiştir (46, 47).

Aralık 1988'de Richter ölçeğine göre 6,9 olan 25.000'den fazla insanın öldüğü Ermenistan depremi, 600 kişide ABY gelişmesi ile renal felaket olarak adlandırılmıştır (48-50). Çin, Tangshan'da gerçekleşen ve 242.769 kişinin öldüğü depremde yaralananların % 2-5'inde 'crush sendromu' gelişmiştir (43). Kobe'de gerçekleşen 1995 yılındaki depremden sonra bu sendroma hastanede yatanların % 13,8'inde rastlanmış olup kurbanların yarısında ABY gelişmiştir (44).

Gölcük'te 1999 yılında gerçekleşen, 16 milyon insanımızın yaşadığı bölgede etkili olan ve kaydedilmiş en büyük renal felaket olan depremde çeşitli hastanelere yatırılan yaklaşık 24.000 hastanın 639'unda (% 12) MABY gelişmiş, 477 (% 9) vakaya akut diyaliz tedavisi uygulanmıştır (4). Söz konusu epidemi kayıt edilmiş en büyük nefrolojik felakettir (4). 1900-1999 yılları arasında ülkemizde 131 adet hasar yapan deprem meydana gelmiş ve bu depremler 398.331 binanın yıkılmasına veya ağır hasara uğramasına ve 65.662 insanın ölmesine neden olmuştur. Bu rakamlara göre Türkiye'de ortalama her 8 ayda bir hasar yapan deprem oluşmakta ve bu depremler ortalama olarak her yıl 4.024 binanın yıkılmasına ve 664 insanın ölmesine neden olmaktadır (51). Geçmişteki deprem kayıtları incelendiğinde

ülkemizin oldukça yüksek sismisiteye sahip olduğu görülmektedir. İstanbul ortalama standart sapma göz önüne alındığında 5 yıl içerisinde % 32±12 ve 25 yıl içerisinde % 62±15 büyük deprem riski ile çok yüksek olan yerlerden birisidir (52).

Fizyopatoloji

Koyu kırmızı renkli 17,8 kDa ağırlığında bir protein olan miyoglobin glomerülden serbestçe filtre olur, tübül hücresine endositoz yoluyla alınır ve metabolize olur (34). Miyoglobin renal üst sınırı olan 0,5-1,5 mg/dl düzeyini geçtikten sonra idrarda gözlenir ve 100 mg/dl düzeyinin aşılması halinde kırmızımsı-kahverengi (çay rengi) idrar olarak makroskopik olarak gözlemlenebilir (34).

Rabdomiyolizin patogenezinde iskelet kası iskemisi sonucu gelişen hücre içi Adenin trifosfat (ATP) azalması ve buna bağlı kalsiyum (Ca^{+2}) düzeylerinin artışı temel rol alır (53, 54). Aktin-miyozin bağlanması ve kas kontraksiyonu için gerekli sarkoplazmik Ca^{+2} bir seri pompa, kanal ve değiştirici aracılığıyla sıkı bir şekilde regüle edilir (55). Hücre içi ATP azalması bu pompaların bozulmasına dolayısıyla sarkoplazmik Ca^{+2} 'da artış ile Ca^{+2} bağımlı nötral proteaz ve fosfolipazlarda aktivasyona yol açar. Bunun sonucunda miyofibrillerin, sitoskeletal yapının ve membran proteinlerinin ani yıkımı dolayısıyla kas liflerinin lizozomal sindirimi gerçekleşir (55). Travmaya bağlı rabdomiyolize iskemi reperfüzyon hasarı ve hasarlı kasların nötrofillerle infiltre edilmesine bağlı inflamasyon da eşlik eder (56).

Kas hasarı sonucu gelişen çizgili kas hücre iskemisi, Na/K ATPaz pompa inhibisyonu ile sodyumun (Na^{+}) hücre dışına atılamamasına ve hücre içi ödeme yol açar, hasarlanmış kaslarda 15 litreye yaklaşan sıvı birikimi olur (53, 54). Dolaşım volümü azalmasına bağlı renal kan akımı azalması, MABY gelişimini kolaylaştıran en önemli faktör olarak ortaya çıkar. Tübüler hasar gelişimini kolaylaştıran diğer faktörler hipovolemiye ikincil renin-anjiyotensin sistemi, sempatik sinir sistemi aktivasyonu ve vazopressin artışı ile gelişen renal vazokonstriksiyondur (55). Çizgili kas hücre içeriğindeki toksik materyalin dolaşıma geçişinin uyardığı endotelin, tromboksan A2, tümör nekrozitan faktör α , F-2 izoprostan artışı; ayrıca renal mikrosirkülasyonda vazodilatatör olarak etkili olan NO'nun miyoglobin tarafından yakalanarak biyolojik aktivitesinin azalmasına ve renal vazokonstriksiyonun şiddetlenmesine yol açar (6, 57).

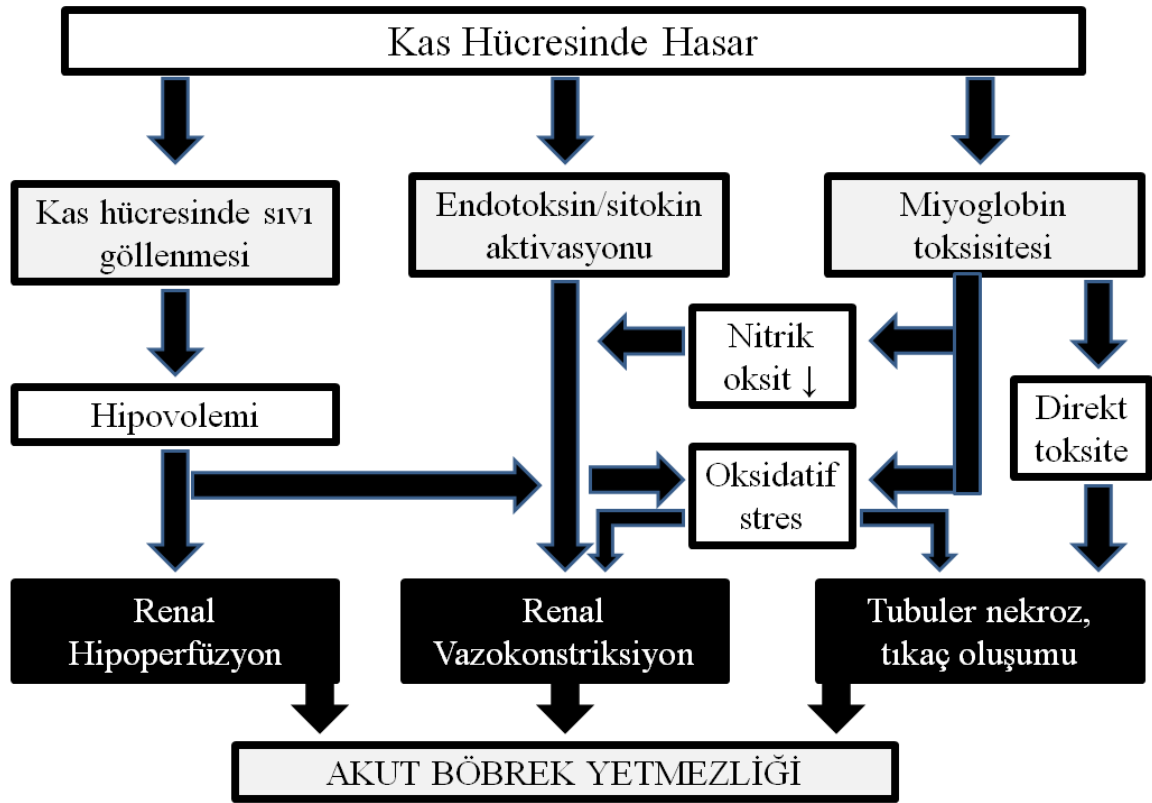
Bilinen en kuvvetli renal vazokonstriktör olan endotelin, 21 aminoasitli bir peptittir ve renal vazokonstriksiyonda başrolü oynar. Endotelin-1 böbreklerde renal damarların

vazokonstriksiyonu, nefronda Na^+ ve su reabsorbsiyonunun inhibisyonu, mezengial hücre konstriksiyonu, glomerüler hücre proliferasyonunun azaltılması ve ekstraselüler matriksin birikiminin arttırılması gibi geniş biyolojik etkiler gösterir. Endotelin-1 primer olarak otokrin veya parakrin olarak fonksiyon gösterir.

Miyoglobin hipovolemi ve renal vazokonstriksiyonun da etkisi ile renal tubüller boyunca konsantre olur ve asidik idrarın da yardımıyla katyonik yapısı nedeniyle Tamm-Horsfall proteinleri ile etkileşime geçerek prespitate olur (35). Miyoglobinin asidik idrar olmadan tubüllerde belirgin nefrotoksisitesi mevcut değildir (35). Tubül obstrüksiyonu temel olarak distal tubül seviyesinde gerçekleşirken, direk toksisite temelde proksimal tubülde gerçekleşir (35, 55).

Hem proteini kökenli respiratuar proteinler olan miyoglobin ve hemoglobin (Hb), peroksidaz benzeri enzim aktivitesi sergileyerek biyomoleküllerin oksidasyonuna neden olabilirler (58). Miyoglobin yapısında moleküler oksijene (O_2) bağlanmak için gerekli ferroz oksid formda (Fe^{+2}) demir atomu içerir. Fakat O_2 Fe^{+2} 'i OH^{\cdot} oluşturarak oksidasyonla ferrik okside (Fe^{+3}) dönüştürür. Bu oksidatif potansiyel hücre içi antioksidan moleküller tarafından etkisiz hale getirilir. Yine de miyoglobinin hücrel kaçışı ROP'nin sızmasına ve serbest radikal ilişkili hücrel hasara neden olur (55). Her ne kadar merkürük kloride bağlı deneysel ABY modellerinde gösterilemese de glutatyon ve bir demir şelatörü olan desferoksaminin kullanıldığı izole edilmiş proksimal tubül sistemlerinde yapılan çalışmalarda OH^{\cdot} ile ilişkili hem proteini ve serbest demir etkileşiminin tubül hasarında kritik roller aldıklarını göstermiştir (59, 60).

Miyoglobinürik akut böbrek yetmezliği gelişiminde etkili faktörler Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Miyoglobinürik akut böbrek yetmezliği fizyopatolojisi

SERBEST RADİKALLER

Dünya üzerindeki ilk yaşam belirtisi en basit hücre ile 4 milyar yıl önce başladığı tahmin edilmekte olup, 3,5 milyar yıl önce kayalar primitif tek hücreli canlılar olan mikrofosilleri içermeye başlamışlardır. Yaklaşık 3 milyar yıl önce fotosentetik mavi-yeşil algler ortaya çıkmışlardır ve atmosferik O₂ konsantrasyonunu 800 milyon yıl önce yükseltmeye başlamışlardır. Yaklaşık 540 milyon yıl önce ise atmosferik O₂ konsantrasyonu günümüzdeki konsantrasyonuna ulaşmıştır. Böylelikle aerob solunum metabolizması gelişmiş ve organizma kompleksliği artmıştır (12).

Oksijen ilk önce İsveç kimyacı Karl W. Scheele tarafından 1772'de keşfedilmiştir. İngiliz kimyacı Joseph Priestly 1774'de O₂'nin fotosentez sonrası oluşabileceğini ortaya koymuştur. O₂'nin ismi Yunanca asit üreten manasındadır ve O₂'nin asit ortamda oluştuğu zannedilerek verilmiştir. Lavoisier'den yaklaşık 100 yıl sonra O₂'nin toksisitesi 1878'de Paul Bert ve 1899'da J. Lorain Smith tarafından deneysel olarak hiperbarik O₂ çalışmalarında kanıtlanmıştır (12, 61). Sonraları O₂'nin santral sinir sistemindeki toksisitesi Bert etkisi ve akciğerlerdeki toksisitesi Lorain Smith etkisi veya Smith etkisi olarak anılmıştır (12). Rebecca Gerschman ROP'un varlığını 1954'de göstermiş (62). 1956'da ise Denham Harman bu

radikallerin sadece in-vivo oluşmadıklarını aynı zamanda organizmaya zarar verdiklerini de göstermiştir. Teoriye en önemli katkıyı ise Joe McCord ve Irwin Fridowich'in süperoksit dismutazı (SOD) keşfetmeleri yapmıştır. Hemen aynı zamanda H_2O_2 mitokondrial aerobik solunum esnasında üretildiği gösterilmiş, suyun radyolizi sonucu OH^{\cdot} oluştuğu saptanmış ve paramanyetik rezonans spektroskopisi ile bu radikalin canlı organizmalarda bulunduğu kanıtlanmıştır (12, 63-66).

Hipoksi ve reoksijenizasyon; aralarında şok, miyokard infarktüsü, pulmoner ödem, Diabetes Mellitus ve ABY'nin bulunduğu pek çok klinik durumda önemli roller alırlar (12, 63, 67-70). Bununla birlikte ROP normal biyolojik aktivitenin sürdürülmesinde de rol alırlar (12, 71). Bundan dolayı aerobik yaşam iki ucu keskin kılıç olarak adlandırılmıştır (12).

Atomlarda elektronlar orbital adı verilen uzaysal bölgede çiftler halinde bulunurlar (72). Çiftler halinde bulunmalarının nedeni elektronların çekirdek etrafında dönmelerinin yanında kendi eksenleri etraflarında dönmeleri ve stabilite için zıt yönde dönen bir başka elektrona ihtiyaç duymalarıdır (73). Atomların en dış yörüngelerinde dönen elektronlarının kendilerine zıt yönde dönen başka elektronları bulundurmaları halinde kararlı kabul edilirler (73). Reaktif oksijen radikalleri (ROR) dış orbitalinde çiftlenmemiş elektron taşıyan moleküllerdir (12, 66, 72). Başka moleküllerle çok kolay elektron alışverişine giren bu moleküllere oksidan moleküller veya ROP denir (72, 74). Serbest elektron mevcudiyeti moleküle daha fazla reaktivite özelliği kazandırır (71, 73). Serbest radikallerin ifadesi için genel kabul gören işaretleme molekülün sağ üst köşesine konulan tek noktadır (73) (Tablo 1).

Hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçen ve bazı fizyolojik rollere sahip bir moleküldür, fakat çiftlenmemiş elektrona sahip olmadığından radikal olarak adlandırılmaz. Bu nedenle ROP tanımı hem $O_2^{\cdot-}$ gibi ROR'u hem de H_2O_2 gibi radikal olmayan reaktif molekülleri kapsamak için türetilmiştir (12, 66, 72, 75-77). Organizmada pek çok türde ROP mevcuttur (Tablo 1).

Serbest oksijen radikallerinin oluşumunun temeli O_2 'ye dayanır (12, 66, 73). Aerobik yaşam için mutlak gerekli olan O_2 bir oksidan ajandır. Normal koşullarda O_2 'nin çoğu sitokrom sistemi gibi hücre içi sistemler içinde tetravalan redüksiyona uğrar. Bununla beraber % 1-2 oranında bu yoldan sızan oksijenin biyolojik yapılarda univalan redüksiyonu sonucu ROR denen reaktif ürünler açığa çıkar (Tablo 1) (12, 76). O_2 orbitalinde çiftlenmemiş bir adet elektron taşıyorsa $O_2^{\cdot-}$ olarak adlandırılır. $1\Delta gO_2$ ise yapısında iki adet çiftlenmemiş elektron barındırır (72, 78).

Tablo 1. Reaktif oksijen partikülleri

1- Radikaller: Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$) Protonlanmış Süperoksit Radikali ($HO_2^{\cdot-}$) Hidroksil Radikali ($OH^{\cdot-}$) Alkoksil Radikali ($LO^{\cdot-}$) Organik (lipid, alkil veya kısa zincir) Hidroperoksil Radikali ($ROO^{\cdot-}$) Peroksi Nitröz Asit ($ONOOH$) Karbonat Radikali ($CO_3^{\cdot-}$)
2- Radikal Olmayanlar: Hidrojen Peroksit (H_2O_2) Organik (lipid, alkil veya kısa zincir) Hidroperoksit ($ROOH$) Hipoklorik Asit ($HOCl$) Peroksinitrit ($ONOO^-$)
3- Singlet Oksijen ($^1\Delta_gO_2$)

Süpeoksit Radikali

Moleküler oksijenin bir elektron redüksiyonu ile $O_2^{\cdot-}$ oluşur ($HO_2^{\cdot-} / O_2^{\cdot-}$; $pK_a=4,88$). Normal fizyolojik koşullar ve pH 7,0'da $O_2 / O_2^{\cdot-}$ 'nin redüksiyon potansiyeli -160mV'dur. Bu düşük potansiyel nedeniyle tek elektron taşıyıcıları arasında sayılan demir-sülfür demetleri, semikinolonlar ve sitokromlar; $O_2^{\cdot-}$ oluşumunun en ideal katalizörleridir. $O_2^{\cdot-}$ pH bağımlı olacak şekilde pH 7,0'da spontan dismutasyon ile H_2O_2 'e hızlıca dönüşür. SOD'un bulunmasından sonra $O_2^{\cdot-}$ gibi bu kadar hızlı dönüşüm reaksiyonuna uğrayan bir molekül için neden bir antioksidan mekanizmaya gerek olduğu soru işaretlerine neden olmuştur. Fakat SOD nakavt farelerde yapılan deneylerde $O_2^{\cdot-}$ 'in pikomolar düzeylerde bile toksik olduğu saptanmış ve bu nedenle SOD'un hücre için gerekliliği kanıtlanmıştır (12, 78).

Süperoksit radikali hem redüksiyon hem de oksidasyon reaksiyonlarına katılır. Redüksiyon reaksiyonlarına temel olarak ferri-sitokromların ferro formlarına dönüştürülmesi gösterilebilir. Oksidan olarak özellikle $HO_2^{\cdot-}$ etkindir ve düşük potansiyelli demir-sülfür demetlerinin oksidasyonu, tiol ve ketollerin oksidasyonunda rol alır (12).

Reaktivitesi çok yüksek olan $O_2^{\cdot-}$ membranlardan geçerken membranın lipid yapısı ile reaksiyona girer. Dolayısıyla $O_2^{\cdot-}$, $HO_2^{\cdot-}$ formunda lipid peroksidasyonunu başlatır (12).

Süperoksitin rol aldığı bir üçüncü reaksiyon serbest radikal olarak diğer serbest radikallerle difüzyon limitli (çok hızlı) ve aktivasyon enerji bariyeri gerektirmeyen bir reaksiyonla etkileşime girmesidir. Bu reaksiyona en önemli örnek NO ile reaksiyonu sonucunda bilinen en potent RNP'lerden olan peroksinitrit (ONOO⁻) ve Peroksi nitroz asit oluşturmasıdır (12).

Süperoksit radikali ayrıca kısa zincir şekerlerin oksidasyonu, toksik α - β dikarbonillerin oluşumu ve tirozin peroksit oluşumuna neden olur. Ayrıca Hb ve miyoglobin gibi düşük potansiyel hem proteinlerinin oksidasyonu ve bu proteinlerin met formlarının oluşturularak toksik etki gösterir (12).

Hidrojen Peroksit

Süperoksitin dismutasyon ve oksidasyon reaksiyonları sonucunda H₂O₂ oluşur. O₂^{-•}'den daha fazla okside olan H₂O₂ pikomolar miktarlarda dahi hücre için toksik olan O₂^{-•}'e göre daha az toksiktir ve dokular için mikromolar miktarları dahi tolere edilebilir. H₂O₂ potent bir okside edici ajan olmasına rağmen her zaman hızlı oksidasyona neden olmaz. H₂O₂, O₂^{-•}'e göre membranlardan daha iyi diffüze olur. Çünkü göreceli daha az reaktiftir. H₂O₂ yavaş bir iki elektron okside edicidir. Fakat hem veya metal katalizör varlığında çok hızlı bir oksidan olarak davranabilir. Özellikle yavaş potansiyelli sisteinler H₂O₂'nin temel hedeflerini oluşturur. H₂O₂ tarafından indüklenmiş tiol oksidasyonu hücre için zararlıdır. Ayrıca bazı enzimlerin redüksiyon reaksiyonuna da katılır (12, 66).

Hidroksil Radikali

Tek elektron redüksiyonu ile H₂O₂'nin oksidasyon gücü artar ve kimya biliminde bilinen en güçlü oksidanlardan biri olan OH^{-•} radikali oluşur. OH^{-•} radikalinin oluşumu için iki adet yol tanımlanmıştır; 'Fenton' ve 'Haber-Weiss' reaksiyonları (12, 66, 78, 79).

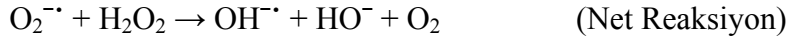
Serbest tranzisyon metallerinin (Fe, Cu, Mn) varlığında, H₂O₂'den OH^{-•} oluşumu gerçekleşebilir. Bu reaksiyona 'Fenton' reaksiyonu denir:



Süperoksit radikali de H₂O₂'e dönüşmeden tranzisyon metallerinin varlığında 'Haber-Weiss' reaksiyonu adı verilen bir yolla OH^{-•} oluşumuna neden olabilir:



Her iki reaksiyon alt alta yazıldığında bulunan net reaksiyon:



Hidroksil radikali difüzyon limitli bir şekilde neredeyse hücre içerisindeki her şeyle etkileşime girebilir. $OH^{\cdot-}$ radikali çok toksiktir ve difüzyon mesafesi çok kısadır. Bu kadar toksik olmasına rağmen organizmada $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 için detoksifiye edici enzim sistemleri olmasına rağmen $OH^{\cdot-}$ için mevcut değildir. Biyolojik sistemler $OH^{\cdot-}$ toksisitesini 'Fenton' reaksiyonunda görevli metal iyonlarını sıkı bir şekilde kontrol altında tutarak engellerler (12).

Nitrik Oksit

Nitrik oksitin memeli hücrelerindeki varlığının gösterilmesi ile serbest oksijen radikalleri yeni bir boyut kazanmıştır. NO gaz fazında bir serbest radikaldir. Kardiyovasküler sistem, bağışıklık sistemi ve sinir sistemi gibi temel organ ve sistemlerde hücreler arası mesajcı olarak görev alır. NO, NO sentetazlar adı verilen bir aile tarafından sentezlenir. Düşük molekül ağırlığı ve hidrofobik özellikleri nedeniyle NO hücre membranından kolayca difüzyona uğrar ve sentez edildiği bölgenin hemen etrafında görevini yerine getirir. Bu özellikleri nedeniyle beyinde sinapsise gerek duymaksızın nöronlar arasında etkileşimin sağlanmasında görev alır. Sinyalizasyonda NO tarafından aktive olarak siklik guanilat mono fosfat haline dönüşen guanilat siklaz temel hedefdir.

Nitrik oksitin keşfi ile yeni radikaller de bulunmuştur. Ortamda yüksek oranda O_2 'nin varlığında oto-oksidasyon sonucu nitratlama özelliği olan NO_2 ve N_2O_3 oluşur. NO'nun $O_2^{\cdot-}$ ile difüzyon kontrollü reaksiyonu sonucunda $ONOO^-$ oluşur. Süperoksit radikalının NO ile $ONOO^-$ oluşturmasının $O_2^{\cdot-}$ 'i SOD dismutasyonundan koruduğu düşünülmekteydi fakat yapılan yeni çalışmalarla bu reaksiyon ile bilinen en potent RNP'lerden olan $ONOO^-$ 'in oluşumunun gerçekleştiği saptanmıştır. NO'nun direk etkisi proteinlerin hem gruplarına bağlanmaları ile olurken indirek etkileri $O_2^{\cdot-}$ ile reaksiyona girmesi sonucu oluşur. Bu reaksiyon sonrası oluşan partiküllere RNP'ler denir. RNP'e bağlı DNA bazlarının, lipidlerin ve proteinlerin nitrasyonu gelişebilmesi nedeniyle 'nitrozatif stres' ve 'nitrooksidatif stres' terimleri kullanılmaktadır (66).

Hücrel yollarda NO'nun yaptığı etkilerin yanında RNP'ler de önemli patolojilere neden olmaktadır. $ONOO^-$ veya NO_2 tarafından gerçekleştirilen sitokrom C'nin nitrasyonu sonucunda protein kuvvetli bir peroksidasyon kabiliyeti kazanır ve mitokondri iç membranında bulunan kardiolipinin oksidasyonuna yol açar. Buna bağlı sitokrom C hücre

sitozolüne geçerek prokaspaz-9'u uyarır ve programlanmış hücre ölümü gerçekleşir. Bunun gibi fibrinojenin nitrasyonu pıhtı oluşumuna neden olur. Bunun yanında nitratlanmaya bağlı proteinlerde özellik kaybı da izlenebilir. Mitokondrial matrikste bulunan SOD'un nitratlanması sonucu fonksiyon kaybı buna bir örnektir (66).

SERBEST RADİKALLERİN KAYNAKLARI

Organizmada ROP'nin kaynakları oldukça yaygındır. Organizmada ROP'ler için pek çok kaynak vardır. Bu kaynaklar arasında dikkate değer olanlar; mitokondrial elektron transport zinciri, peroksizomal yağ asit metabolizması, sitokrom P-450 reaksiyonları ve fagositik hücrelerde gerçekleşen öldürme olayıdır (71, 72, 77, 78).

Mitokondrial Elektron Transfer Zinciri

Normal hücrel metabolizma esnasında gerçekleşen oksidatif fosforilasyonda Adenozin difosfatdan ATP elde edilmesi için elektronların mitokondrial elektron transport zincirinde transferi gerekmektedir (77). Normal mitokondrial solunum zincirinde O_2 'nin H_2O 'a dönüşümü dört adet elektronun (tetraalan) redüksiyonunun gerektirir. Elektronlar NADH veya süksinat tarafından sırasıyla kompleks I ve kompleks II'e verilir. Kompleks I (NADH dehidrogenaz) ve kompleks II (süksinat dehidrogenaz) tarafından sağlanan elektronları alan Ubiquinon (Koenzim Q veya UQ olarak da bilinir.) iki adet tekli elektron redüksiyonuna uğrayarak ubisemiquinona ve ubiquinole dönüşerek elektronlarını sırasıyla kompleks III (UQ, sitokrom c redüktaz), kompleks IV (sitokrom c oksidaz) ve nihayetinde O_2 'e aktarır (66, 77). Solunum zincirinin terminal proton pompasının son aşamasında O_2 sitokrom oksidaz enziminin katalizlediği bir reaksiyon ile elektron alır. Dolayısıyla O_2 'nin tam redüksiyonuyla ROR oluşmaz. Tam redüksiyonun tersine tam olmayan redüksiyon, bu durum önceden de ifade edildiği gibi % 1-2 oranında gözlenir, serbest radikal oluşumuna neden olur (12, 66, 71).

Oksijene tek bir adet elektron transferi ile $O_2^{\cdot-}$ anyonu oluşurken iki adet elektron transferi sonucunda H_2O_2 oluşur. Aslen H_2O_2 gerçek bir serbest radikal olmamasına rağmen OH^{\cdot} oluşumuna yol açtığından önemli bir oksidandır. $O_2^{\cdot-}$ 'in spontan dismutasyonu ile H_2O_2 oluşur. OH^{\cdot} 'nin oluşumu tranzisyon metallerinin varlığına bağlıdır. H_2O_2 tranzisyon metallerinin varlığında $O_2^{\cdot-}$ ile etkileşime girmesi sonucu OH^{\cdot} oluşur (71, 72, 77, 78, 80). Oksijen radikallerinin kimyasal oluşumları Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Oksijen radikallerinin kimyasal oluşumları

$O_2 + e \rightarrow O_2^{\cdot -}$
$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H \rightarrow H_2O_2 + O_2$ (Süperoksitin dismutasyonu)
$O_2^{\cdot -} + 2e + 2H \rightarrow H_2O_2$
$O_2^{\cdot -} + H_2O_2 + H \rightarrow O_2 + H_2O + OH^{\cdot}$
$O_2 + 4e + 4H \rightarrow 2 H_2O$

O_2 : Moleküler Oksijen; e^- : elektron; $O_2^{\cdot -}$: Süperoksit radikali; H_2O_2 : Hidrojen peroksit; OH^{\cdot} : Hidroksil radikali; H_2O : Su.

Peroksizomal Yağ Asit Metabolizması

Reaktif oksijen partikülleri için ikinci kaynak serbest yağ asitlerinin peroksizomal β -oksidasyonudur. Peroksizomal β -oksidasyon sonucu oluşan temel oksidan H_2O_2 'dir. Peroksizomların yüksek miktarda katalaz enzimi içermeleri nedeniyle normal koşullarda H_2O_2 sızıntısının sitozolik oksidatif strese neden olup olmayacağı bilinmemektedir. Yine de peroksizomal proliferasyonuna neden olan bazı mutajen olmayan karsinogenler tanımlanmıştır ve bunlara bağlı hepatoselüler peroksizomlarda artış sonucu rodentlerde karaciğer kanserinde artış ve normal koşullarda belirgin sitozolik oksidatif stres tanımlanmıştır. İlginç olarak parsiyel hepatektomi sonrası gelişen hızlı hücre proliferasyonunda hücrelerin katalaz (KAT) boyanmadığı izlenmiştir ve bu hızlı proliferasyon fazında peroksizomlardan oksidan sızıntısının değişmiş olduğu saptanmıştır (77).

Sitokrom P-450 Reaksiyonları

Mikrozomal sitokrom P-450 enzimleri, organizma tarafından sentezlenmeyen ve genelde bitki kökenli olan kimyasalların tekli oksidasyon veya redüksiyon yöntemleri ile metabolize edildikleri sistemlerdir. Her ne kadar bu reaksiyonlar NADPH ve bir organik substrat içerseler de bazı sitokrom P-450 izoenzimleri O_2 'i $O_2^{\cdot -}$ 'e okside eder ve böylelikle oksidatif strese neden olurlar (77).

Sitokrom P-450 için alternatif bir yol da redoks dönüşüm reaksiyonudur. Bu yolda substrat sitokrom P-450'den bir adet elektron alır ve bunu O_2 'e devreder. Sonuçta spontan olarak substrat oluşurken beraberinde $O_2^{\cdot -}$ oluşumuna ve oksidatif strese neden olur. Normal

koşullarda sitokrom P-450 enzim sistemine bağlı olarak ne düzeyde oksidatif stres oluştuğu bilinmemektedir. Oksidatif stres organizmanın detoksifikasyon için ödediği bedel olarak kabul edilmiştir (77).

Fagositik Hücrelerde Gerçekleşen Öldürme Olayı

Monosit, nötrofil, eozinofil ve makrofajlar normal işlevleri sırasında $O_2^{\cdot-}$ açığa çıkarırlar. Fagositoz enerji gerektiren bir olaydır ve sayısız intraselüler olayı stimüle eder. Bakterisidal etkinin gözlenmesi için de enerji gereksinimi doğacağından dolayı oksidatif stres için ilk kaynak yine mitokondrial elektron transfer zincirinde meydana gelen kaçaklardır. Hegzos monofosfat yolunda da NADPH oksidazın hızlı aktivasyonu sonucunda ROP oluşur (80). Daha sonra $O_2^{\cdot-}$ dismutasyon reaksiyonu ile (Tablo 2) H_2O_2 'e dönüşür ve bakterisidal olarak etkin olacağı iki yoldan birisinde kullanılır:

Hidrojen peroksit-miyeloperoksidaz-halid öldürme sistemi (mieloperoksidaz bağımlı öldürme sistemi)

Fagolizozom içerisinde oluşan H_2O_2 bakterilerin etkili şekilde öldürülmeleri için yeterli değildir. Nötrofillerin aktive olmuş komplemanla aktivasyonu bir respiratuar patlama enzimini uyarır. Bu durumla nötrofillerin oksijen tüketimi 80 kat artar. O_2 'nin kısa ömürlü olması nedeniyle nötrofiller daha uzun ömürlü toksik oksijen ürünlerine ihtiyaç duyarlar (81). Nötrofillerin azurofilik granülleri içerisinde bulunan myeloperoksidaz enzimi, klor iyonu gibi bir halid varlığında H_2O_2 'i daha uzun ömürlü hipokloroz aside dönüştürür. Hipokloroz asit güçlü bir antioksidan ve antimikrobiyal ajandır. H_2O_2 'in büyük bir çoğunluğu zamanla KAT tarafından H_2O ve O_2 'e parçalanır. Bir kısmı da glutatyon peroksidaz (GPx) etkisiyle yıkılır (77, 80).

Miyeloperoksidazdan bağımsız öldürme sistemi

Lökositlerdeki en etkin bakterisidal sistem mieloperoksidaz bağımlı öldürme sistemidir. Bununla birlikte mieloperoksidazdan yoksun lökositler de bakterileri öldürme sistemine sahiptir. O_2 gerektiren bu sistemde oksidatif metabolizma sırasında oluşan $O_2^{\cdot-}$ ve $OH^{\cdot-}$ etkilidir. Makrofajlar bakterileri yeterli miktarda H_2O_2 ve/veya $OH^{\cdot-}$ açığa çıkararak öldürebilirler (80).

SERBEST RADİKALLERE BAĞLI HASAR MEKANİZMALARI

Biyolojik makromoleküllerin üç temel sınıfı olan lipidler, nükleik asitler ve proteinler serbest oksijen radikal atağına maruz kalırlar. Eğer nötralize edilmezlerse ROP'ler çoklu-doymamış membran lipidlerinde oksitlenmiş çift bağlar oluşturabilir, mitokondrial ve nükleer DNA ile etkileşime girebilir, protein oksidasyonuna neden olabilirler. Bu nedenle metabolizmanın karanlık yüzü olarak adlandırılmışlardır (66) (Tablo 3).

Tablo 3. Artmış reaktif oksijen partiküllerinin zararları

Hücre Organelleri ve membranların lipid ve protein yapısının bozulması
Hücre içi yararlı enzimlerin etkisizleştirilmesi
Deoksiribo nükleik asitin tahrip edilmesi
Mitokondrideki aerobik solunumun bozulması
Litik enzimlerin (Elastaz, proteaz, fosfolipaz, lipooksijenaz, siklooksijenaz) aktive edilmesi
Hücrenin potasyum kaybının arttırılması
Trombosit agregasyonunun arttırılması
Dokulara fagosit toplanmasının kolaylaştırılması
Hücre dışındaki kollagen doku komponentlerinin, savunma enzimlerinin ve transmitterlerin yıkılması

Membran Lipidlerine Etkisi, Lipid Peroksidasyonu ve Malonil Dialdehit

Antioksidanların biyolojik moleküller üzerine yaptıkları hasar ilk önce lipidler üzerinde yapılan gıda mühendisliği çalışmalarıyla gösterilmiştir (77, 82). Gıda mühendisleri besinlerin bozulmasında lipidlerin peroksidatif zincir reaksiyonlarının rol aldığını göstermişler ve bunu 'otooksidasyon' olarak tanımlamışlardır (77). Lipid peroksidasyonunun biyolojik etkileri özellikle çoklu-doymamış yağ asitlerinin bulunduğu hücre membranında ve lizozom, mitokondri gibi organellerde görülür. Lipid peroksidasyonu ROP'lerin poliansatüre yağ asitlerinin metilenik karbonlarından H^+ çıkarmak için yaptıkları atakla başlar. Bu reaksiyonu ilk başlatan ROP sıklıkla HO_2^{\cdot} 'dir (12). H^+ 'in zincirden çıkarılması, karbon atomu üzerinde eşleşmemiş bir atom bıraktığında, karbon merkezli bir radikal oluşumuna neden olur. Bu radikal sıklıkla dien şekline çevrilir. Ve sonra O_2 ile reaksiyona girerek LOO^{\cdot} oluşur. Bu LOO^{\cdot} bir başka LOO^{\cdot} ile birleşebilir veya membran proteinleri ile etkileşebilir. Burada önemli olan, LOO^{\cdot} 'nin membrandaki komşu yan zincirden H^+ çıkararak peroksidatif

zincir reaksiyonunu yayabilmeleridir (81). Bir LOO^- yanındaki çift bağı doymamış lipidden H^+ 'unun bir hidroperoksit ve alkali radikali oluşturacak şekilde açığa çıkarır. Bir lipitte çift bağı sayısı ne kadar fazla ise, diğer bir deyişle doymamışlığın derecesi ne kadar fazla ise, peroksidasyon reaksiyonunun derecesi de o derecede fazla olur (12). LOO^- , O_2 ile birleşerek $ROOH$ oluşturarak yeni bir oksidasyon siklusu başlatır (77). Lipid peroksidasyonu sonucu membran akışkanlığında azalma ve iyonik permeabilitede artış ilk gözlenen etkilerdir. Yeterli seviyede lipid peroksidasyonu membran bariyer bozukluğu, hücre lizisi ve hücre ölümüne neden olabilir (12).

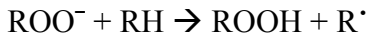
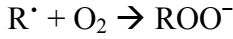
Organizmada Lipid Peroksidasyonu üç aşamada gerçekleşir:

Başlangıç aşaması serbest radikal oluşturacak şekilde enerji aktarımı ile başlar.

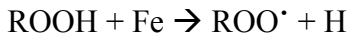
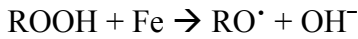


Lipidlerde çoklu-doymamış yağ asitleri oksidasyona oldukça duyarlıdır ve reaksiyon sonucu yağ asidi radikali oluşur. Başlangıç fazından sonra uygun koşullar olursa serbest radikalin tetikleyici rolü sonucu farklı radikal ürünleri ortaya çıkar.

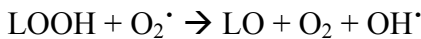
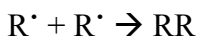
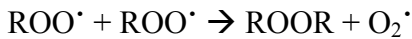
İlerleme safhasında; başlangıç aşamasının ürünü olan yağ asidi radikali (R^{\cdot}) O_2 'nin eklenmesi ile ROO^{\cdot} oluşur. İlerleme fazında lipid ROO^{\cdot} 'den $ROOH$ ve diğer radikal ürünleri oluşur. Lipid hidroperoksitler genellikle demir ve bakır gibi metallerin varlığında instabil olup LO^{\cdot} ve ROO^{\cdot} 'a dönüşür (35).



Hidroksil radikali, ROO^{\cdot} ve LO^{\cdot} 'nin çoğu çoklu-doymamış yağ asitlerinin direk oksidasyonuna neden olabilir. Lipid hidroperoksitlerin yıkımı sonucunda lipid peroksidasyonunu ilerleten radikaller ve biyolojik olarak aktif olan aldehitler gibi radikal olmayan ürünler oluşur.



Sonlanma aşamasında O_2^{\cdot} 'nin lipid hidroperoksitlerle reaksiyonları sonucunda yeni radikal reaksiyonları başlayabilir.



Bu reaksiyonla ROOH oluştukları yerden uzak bölgelerde hasara sebep olabilirler (81). Bu reaksiyonlar sonucunda oluşan hidroperoksitler, aldehitler ve epoksitler gibi lipid peroksidasyon ürünleri ve direk olarak serbest radikaller protein, enzim ve DNA ile reaksiyona girip onları inaktive ederler (78).

Lipid peroksitler bir dizi reaksiyon sonrasında aralarında reaktif aldehitler, alkanlar, isoprostanlar ve isoketallerin bulunduğu moleküllere dönüşürler. Malonil dialdehit (MDA) üç karbonlu bir dialdehittir. En önemli öncülleri beş üyeli hidroperoksi epidioksitler (endoperoksitler) ve 1,3 dihidroperoksillerdir. MDA ölçümü için kullanılan tiobütirik asit reaksiyon kolaylığı ve duyarlılığı nedeniyle en çok kullanılan ve en eski yöntemdir. Bu yöntem çoklu-doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan aldehitlerin son ürünü olan tiobütirik asitin varlığını ölçer. Fakat sonradan anlaşılmıştır ki sert izolasyon yöntemi nedeniyle *in vivo* lipid peroksidasyonun gösterilmesinde >% 90 sinyal yanlış pozitiflik olarak belirir. Son dekatta bu yöntemin yerine gaz kromatografinin de kullanıldığı pek çok yeni yöntemle yanlış pozitifliğin önüne geçilmiştir (12, 78).

Reaktif Oksijen Partiküllerinin Proteinler Üzerine Etkileri

Reaktif oksijen partiküllerinin proteinler üzerine olan etkileri daha az çalışılmıştır (77). ROP atağı sonucunda proteinlerde oluşan yapısal değişiklikler üçe ayrılır; 1- aminoasitlerin modifikasyonu, 2- Proteinlerin fragmentasyonu, 3- Proteinlerin agregasyonu veya çapraz bağlanmalar. Radikaller membran proteinleri ile de reaksiyona girebilir ve enzim, nörotransmitter ve reseptör proteinlerinin fonksiyonlarını bozarlar (81). En iyi bilinen protein oksidasyon tipleri trozinin nitrasyonu, metiyoninin sülfoksidasyonu ve aminoasit rezidülerinin karbonilasyonudur (12, 66).

Nitrik oksitin $O_2^{\cdot-}$ ile reaksiyonu sonrası oluşan $ONOO^-$, tirozini nitrotirozine dönüştürür. Tirozinin hidroksil grubu bazı enzimlerde ve hücre sinyalizasyon moleküllerinde (tirozin fosforilasyonu) çok önemlidir. *Escherichia coli*'deki glutamin sentetazın tirozin rezidülerinin ikisinden birisinin nitrasyonu sonucu enzim aktivitesinin kaybolduğu gösterilmiştir. ROP'lere bağlı inaktive olan enzimler arasında ayrıca akonitaz ($O_2^{\cdot-}$ tarafından geri-dönüşümlü), ribonükleotid redüktaz ($O_2^{\cdot-}$ tarafından irreversible), gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) (H_2O_2 tarafından irreversible) ve karbonik anhidraz sayılabilir (12, 66).

Aromatik aminoasitlerde (Fenilalanin, tirozin, triptofan) doymamış yapılar bulunduğu için oksidatif ataklara çok hassastırlar. Sülfürlü aminoasitler olan metiyonin,

sistein ve sistin de serbest radikal hasarına hassas aminoasitlerdendir (81). Bu aminoasitlerin oksidasyonu H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, $ONOO^-$ ve hatta O_2 'nin kendisi ile dahi olabilir (12). Bu kolay oksitlenebilme özellikleri nedeniyle bu proteinlerin oksidatif modifikasyonu organizmada tamir edilebilen tek protein modifikasyonudur (12). Sülfidril gruplarının oksidasyonu, disülfidlerin redüksiyonu, metal bağlanma kısımlarına komşu bölgelerde metalin katalize ettiği oksidasyon nedeniyle aminoasitlerin oksidasyonu, aldehidler aracılığıyla reaksiyonlar ROP'nin proteinler üzerine yaptığı hasar mekanizmalarındandır (77).

Aminoasit rezidülerinin karbonilasyonu çeşitli yollarla gerçekleşebilir. Bunlar histidin, arginin, prolin, lizin ve treonin gibi bazı spesifik aminoasitlerin metal katalizörler eşliğinde oksidasyonu ve karbonil grubu içeren okside lipid veya şekerlerle karşılaşma sonucudur (12).

Reaktif Oksijen Partiküllerinin Deoksiribo Nükleik Asit Üzerine Etkileri

Reaktif oksijen partiküllerine bağlı hasarın son aşamasında ATP depleasyonu ve DNA hasarı yer alır (71, 83). ROP'nin nükleik asitler üzerine yaptığı hasar DNA omurgasında bulunan tekli-çiftli bağlarda kırılma, baz ve şeker gruplarının hasarı ile diğer moleküllerle çapraz bağlanmayı içerir. DNA peroksidasyonu iyonizan radyasyona bağlı oluşabilir. Pirimidinler özellikle bu hasara hassastır. Pirimidinleri takiben sırasıyla pürinler ve deoksiriboz gelir. DNA çift sarmalının ayrılması kromozomal delesyona veya aberan gen ifadesine sebep olarak hücre ölümüne neden olabilir.

Serbest oksijen radikallerinin aşırı miktarda üretimi, hücre harabiyeti oluşturabilir. Bunlardan H_2O_2 , hızla çevre hücrelere geçerek hem glikolitik hem de oksidatif fosforilasyon yollarını etkilerken ATP sentezinin inhibisyonuna neden olmaktadır. Glikolitik yolda H_2O_2 'nin, GADPH üzerine etkisi ve indirek olarak da GADPH'ın kofaktörü olan nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) konsantrasyonunda azalma oluşturması sonucu ATP sentezi bozulmaktadır. H_2O_2 bu son etkisinin DNA onarımında rol oynayan poliadenozin difosfat riboz polimeraz enziminin aktivasyonu sonucu geliştiği bildirilmektedir. Aktifleşen ADP-riboz-polimeraz enzimi substratı olan NAD'ı bol miktarda kullanarak konsantrasyonunu azaltır. NAD konsantrasyonunda azalma, pH azalması ile birleşince glikolitik yolun inhibisyonuna neden olur. H_2O_2 düşük konsantrasyonlarında bile (20-80 /JM) birçok hücrede DNA harabiyeti gelişir, bunun sonucunda bir geçiş metalinin de varlığı ile $OH^{\cdot-}$ açığa çıkar. DNA'da gelişen bu harabiyet malign transformasyonlara da yol açabilir. DNA harabiyetinden sadece H_2O_2 değil ama $O_2^{\cdot-}$ ve $OH^{\cdot-}$ de sorumludur. Ayrıca bu metabolitlerin hücre

membranında başlattıkları lipid peroksidasyon ürünleri de yine DNA harabiyetine yol açabilmektedir. Lipid peroksidasyon ürünlerinden MDA, DNA'nın nitrojen bazları ile de reaksiyona girebilir, amino grupları arasında çapraz bağlanmalara yol açabilir. Oksidanlara maruz kalan hücrelerde çok kısa zaman birimi içinde DNA harabiyetinin geliştiği ileri sürülmektedir (12).

Deoksiribo nükleik asit moleküllerinin nükleusta bulunması ve sıkı heliks yapı ile düzenlenmiş olmaları nedeniyle serbest oksijen radikalleri ile temasları daha azdır. Ayrıca DNA, histon adı verilen proteinlerle korunur ve hasar oluşumu halinde tamir edici enzim sistemlerine de sahiptir (81).

SERBEST RADİKALLERE KARŞI SAVUNMA DÜZENEKLERİ

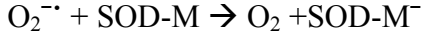
Organizma oksidan strese karşı etkileyici bir antioksidan enzim sistemi ve genelde sebze ve meyvelerden sağlanan küçük antioksidan moleküllerle karşı koyar (Tablo 4). Bunlar;

- 1- Süperoksit radikalının H_2O_2 'e yıkılmasından sorumlu SOD, $O_2^{\cdot-}$ 'i su ve H_2O_2 'e yıkan KAT ile glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimatik yıkıcılar
- 2- Vitamin C, ürat ve glutatyon (GSH) gibi hidrofilik radikal yıkıcılar
- 3- Tokoferoller, flavanoidler, keratonoidler ve ubikuinol gibi lipofilik radikal yıkıcılar
- 4- Küçük moleküler okside antioksidanların redüksiyonunda (GSH redüktaz, dehidroaskorbat redüktaz) veya protein tiollerin yapısının korunmasında rol alan enzimler (tiodoksin redüktaz) ve
- 5- Redüksiyon yapımını kolaylaştırıcı çevre oluşturan hücresel mekanizmaları (NADPH'ı tekrar oluşturan glikoz 3-fosfat dehidrogenaz) içerir (12, 72, 77, 78, 81).

Süperoksit Dismutaz

Süperoksit dismutaz antioksidan enzimler arasında en bilineni ve ilk keşfedilenidir. *Escherichia coli*, mantar, sinek ve farelerde yapılan nakavt deneyleri SOD'un organizma için gerekliliğini kanıtlamıştır. Üç çeşit izoenzimi bulunan SOD'yi üç farklı gen kodlar. *Sod1* geni bakır-kurşun SOD'yi kodlar. Bakır-çinko SOD (Cu-ZnSOD) sitoplazma ve mitokondrial membranlar arası boşlukta yer alır. *Sod2* mitokondrial matrikste yer alan Mangenez SOD'u (MnSOD) kodlar. Son olarak *Sod3* ekstraselüler mesafede bulunan ve hücre tarafından sekresyona uğrayan bir başka bakır-çinko SOD'yi (Cu-ZnSOD) kodlar.

Süperoksit dismutazın mekanizması aşağıdaki gibi özetlenebilir.



Süperoksitin spontan dekompozisyonu pH bağımlıdır ve aşağıdaki gibi yazılabilir:



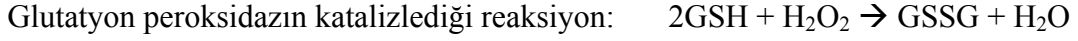
Süperoksit dismutaz $O_2^{\cdot-}$ 'nin dismutasyon reaksiyonunu 1000 kattan daha fazla hızlandırır ve $O_2^{\cdot-}$ konsantrasyonundan bağımsız bir hale getirerek reaksiyonu ikinci derece reaksiyon statüsünden birinci derece reaksiyon statüsüne yükseltir. Bu $O_2^{\cdot-}$ 'in düşük konsantrasyonlarda SOD ile dismutasyonunun spontan dismutasyonununundan daha hızlı olmasına neden olur. Reaksiyonun yönü değişmediğinden çok düşük $O_2^{\cdot-}$ konsantrasyonlarında SOD redüksiyon işlemi gerçekleştiremeyebilir.

Süperoksit dismutaz (en iyi Cu-ZnSOD ile dokümanite edilmiştir.) $O_2^{\cdot-}$ 'nin dismutasyonunu katalize etmenin yanında H_2O_2 bağımlı bir şekilde yüksek oranda oksidasyon kabiliyetine sahip $OH^{\cdot-}$ ve karbonat radikalinin olduğu 'peroksidaz reaksiyonu' isimli radikal oluşum yan reaksiyonuna da yol açabilir. Buna ek olarak $ONOO^{\cdot-}$ 'i yüksek reaktiviteye sahip NO_2^{\cdot} radikaline dönüştürebilir. Son olarak bakır çinko SOD (Cu-ZnSOD) sistein ve glutatyon içindeki tiollerin oksijen bağımlı oksidasyonunu katalize eder (12).

Katalaz, Glutatyon Peroksidaz ve Peroksiredoksinler

Hidrojen peroksit detoksifikasyon sisteminde pek çok enzim rol alır. Bunlar bir selanoenzim olan GPx, KAT ve peroksiredoksinleri içerir (12, 72). Klasik bilgilerimize göre GPx ve KAT hücrel H_2O_2 'nin temel süpürücüleri olarak bilinmekteydi. Fakat mantar, fare ve insanlarda yapılan genetik bazlı çalışmalar KAT yokluğunda oksidatif stresin yıkıcı herhangi bir etkisi izlenmemiş hatta akatalazemili hastalarda hiçbir major patolojiye rastlanmamıştır. Fakat KAT egzojen eklenen H_2O_2 için çok önemli roller üstlenmektedir. KAT gibi GPx da çok hızlı etki eden H_2O_2 süpürücü olsa da yokluğunda herhangi bir patoloji izlenmemiştir. Hatta *Drosophila* ve bir rat türü olan *Heterocephalus glaber* de *GPx1*'in eksik olduğu saptanmıştır. *GPx1*-eksik farelerde yapılan çalışmalar da GPx'in egzojen ROP oluşumunda önemli roller aldığını göstermiştir. KAT ya da GPx eksikliğinin endojen H_2O_2 üretimine bağlı oksidatif hasarda çok az rol üstlenmelerinin nedeni peroksiredoksinler adı

verilen bir başka enzim sınıfının endojen H₂O₂'i detoksifiye etmesinde etkin olmasına bağlanmıştır (12, 72, 78). KAT ve GPx reaksiyonları aşağıdaki gibi özetlenebilir:



Peroksiredoksinler ilk önce mantarlarda tiol-spesifik antioksidan tsall olarak tanımlanmış ve tüm canlılarda homolog olarak bulunduğu saptanmıştır. GPx ve KAT knockout çalışmalarda ciddi patolojilere rastlanılmamasına rağmen tsall nakavt çalışmalarda aralarında artmış oksidatif hasar, aerobik ortamda azalmış büyüme ve stabil fazda azalmış canlılık gibi patolojilere rastlanmıştır. İlginç olarak mutagenез ve genomik instabilitede 10 ile 20 kat kadar dramatik artış izlenmiştir (12).

Tablo 4. İşlevlerine göre antioksidanlar

Serbest Radikal Oluşumunu Engelleyenler	Zincir Kıran Ajanlar
Metal Bağlayıcılar	Yağda eriyenler
Transferrin	Alfa Tokoferol
Albümin	Ubikuinon
Seruloplazmin	Beta Karoten
Süperoksit Dismutaz	Suda eriyenler
Katalaz	Glutasyon
Glutasyon Peroksidaz	Ürat
Peroksiredoksinler	Sistein
	C vitamini

APOPTOZ

Tanım

Yaşayan organizmalarda apoptoz ve nekroz olmak üzere iki temel ölüm şekli tanımlanmıştır. Programlı hücre ölümü anlamına gelen apoptoz hem hücre sel hemostazisin devamlılığı hem de hücre çoğalması ve farklılaşmasında çok önemli olan hücre eliminasyonu için gerekli fizyolojik bir işlemdir. Apoptoz, nekrozdaki tamamen farklıdır. Nekrozda hücre membran bütünlüğü hücre büzülmesi ve lizisine neden olacak şekilde ciddi hasara uğramıştır. Genelde nekrozis bir hücre topluluğunda veya bir dokunun belli bir bölgesinde olurken apoptoz genelde tek hücre seviyesinde gerçekleşir. Apoptoz, enerji gerektiren, aktif bir

hücre ölüm şeklidir. Apoptozun erken dönemlerinde hücre membranının bütünselliği fagositozun önüne geçecek şekilde korunur. Apoptoz çeşitli uyarılarla tetiklenebilir, bu uyarılar hücre içi ve hücre dışı uyarılar olarak ikiye ayrılmaktadır. Bunlara örnek olarak; reseptör aracılı sinyaller, büyüme faktör eksiklikleri, anti-tümör ilaçlar, tümör nekrozis faktör- α , hücre içi Ca^{+2} düzeylerinde artış, glukokortikoidler, ROP'leri, UV ışık, radyasyon ve infeksiyonlar sayılabilir (84).

Mitokondrinin apoptoz için merkezi önemi geniş kabul görmektedir. Uyarı ister hücre içi ister hücre dışı olsun sonuçta mitokondriden sitokrom C serbestlenmesine etki ederek apoptozun gelişimine neden olur. Apoptoz için mitokondrinin yanında kaspazlar da merkezi bir rol oynarlar. Kaspazlar, apoptoz için gerekli olan bir grup sistein proteaz enzimidir ve aspartik asitten sonraki peptid bağı kırarlar. Kaynağına ya da ölüm uyarısına bakılmaksızın apoptoze giden tüm hücrelerde sistein proteaz aktivitesi mevcuttur. Hücrede inaktif olarak bulunurlar ve proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler. Kaspazlar, apoptozda hücreyi parçalayan etkenler olarak bilinirler (84).

Apoptoz, Oksidatif Stres İlişkisi

Artmış oksidatif stres, hücreleri ya nekroz ile ya da apoptoz ile ölüme sürükler (84). Mitokondri hem ROP'leri için hem de apoptoz için bir kaynak olarak kabul görmektedir (84). Mitokondri, hücrenin redoks hal değişimlerine oldukça duyarlıdır. Oksidatif stres altında mitokondrial fonksiyonların bozulmasının, apoptoze neden olduğunu göstermiştir. Ayrıca apoptoz modellerinde hücrenin daha okside bir hal alması ile artmış kaspaz aktivitesini gösterilmiştir. Bunun yanında N-asetil sistein gibi bazı antioksidanlar ile apoptozun azaldığının gösterilmesi oksidatif stres ile apoptoz arasındaki ilişkinin kanıtlarından bir tanesidir (85).

Çok hücreli canlıların normal gelişimi ve homeostazisi için gerekli doğal hücre ölümü olan apoptozun aşırı yavaşlaması veya hızlanmasının doku ve organlarda yapısal ve fonksiyonel bozulmaya yol açtığı gösterilmiştir (86).

Apoptoz, Akut Böbrek Yetmezliği İlişkisi

Renal tübül hücrelerin nekrozun yanı sıra apoptoz mekanizması ile de işlevlerini yitirdikleri hem deneysel böbrek yetmezliği modellerinde hem de insanda yapılan ATN çalışmalarıyla kanıtlanmıştır (87). Günümüzde *in vivo* ABY'e nekroz veya apoptozdan

hangisinin daha fazla katkısının bulunduğu bilinmemektedir (87). Hücre nekrozu gelişmesinde rol alan oksidatif stres artışının kaspaz aktivasyonuna yol açarak apoptozu da hızlandırabildiği; diyabetik nefropati, siklosporin nefropatisi, üriner obstrüksiyon, iskemik ve toksik ABY'de gözlenen apoptoz hızlanmasının yapısal ve fonksiyonel böbrek hasarı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (84, 87-89). Homsı ve ark (90), gliserolle MABY oluşturdukları erkek Wistar-Honover cinsi ratlarda, tubüler apoptotik hücrelerin sayısının kaspaz aktivasyonu ile ilişkili olarak gliserol uygulamasının çok erken evresinden itibaren artmaya başladığını göstermişlerdir. Bununla beraber kaspaz inhibitörlerinin ve antioksidan tedavilerin hızlanmış apoptozu yavaşlatabildiği gösterilmiştir (90). Ayrıca Perz-Cruz ve ark, C vitamini'nin hücre kültüründe kaspaz 8 aktivasyonu inhibisyonu, monositlerde de Fas (CD95) aktivasyonu inhibisyonu yolu ile hızlanmış apoptozu yavaşlattığını göstermişlerdir (91, 92).

C VİTAMİNİ (ASKORBİK ASİT)

C vitamini yapıcı, glukoza ve diğer altı karbonlu monosakkaritlere benzeyen bir ketolaktondur. İnsan, kobay ve diğer primatlarda sentez edilemediği halde incelenen diğer memeli türlerinde glukozdan başlayarak L-glukronik asit üzerinden sentez edilir.

Dokularda bir enzimin katalitik aracılığı olmadan bile kolayca dehidroaskorbik aside oksitlenir. Dehidro şekline dönüşmesi molekül başına iki hidrojen atomunun serbest kalmasına neden olur. Bu özelliği nedeniyle askorbik asit indirgeyici nitelik gösterir. Dehidro askorbik asit ortamda iki H⁺ almak suretiyle kolaylıkla askorbik aside indirgenir. Bu kimyasal özelliklerinden dolayı askorbik asit ve dehidroaskorbik asit vücut sıvılarında denge halinde bulunurlar, birbirlerine kolayca dönüşürler ve böylece redoks niteliği gösterirler. İki şekilde aynı derecede fizyolojik etkinlik gösterir (14).

C vitamini en fazla turunçgillerde bulunur. Yeşil yapraklı bitkiler, domates, kuşburnu, yeşilbiber, lahana, çilek, böğürtlen, kavun, karpuz, muz ve patatesten de vardır. Portakal suyunun mililitresinde 0,5 mg C vitamini bulunur. Hayvansal ürünlerin C vitamini kaynağı olarak önemi yoktur (14).

Vitaminler içinde kimyaca en labil olan vitamin C vitamini'dir. Ortamın asit olması C vitamininin dayanıklılığını artırır (14). C vitamini mide-bağırsak kanalından doyurulabilir bir transport olayı ile kolayca absorbe edilir. Bir defada alınan miktar 1 gramın altında ise biyoyararlanımı tam veya tama yakındır. Alınan doz arttıkça biyoyararlanım ters orantılı olarak azalır. Hücrelerin içi dahil organizmada geniş bir alana dağılır. Vücutta depolanır.

Plazma konsantrasyonu 1 mg/dl'dir. Kanda lökosit ve trombositlerin içerisinde plazmadaki konsantrasyonundan çok daha yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Bu nedenle lökositlerin C vitamini içeriğinin ölçümü C vitamini eksikliğinin teşhisinde kullanılır. Günde 75 mg veya daha yüksek dozlarda C vitamini verilmesi halinde vücudun bu vitamene doyduğu kabul edilir. Doygunluk halinde plazma C vitamin konsantrasyonu 1,4 mg/dl veya bunun üzerindedir. Böbreklerden itrahında eşik değeri söz konusudur ki bu eşik değer aşağı yukarı sözü edilen doygunluk miktarı ile eşittir. Fazla miktarda C vitamini alındığında eşik değer aşılmış olacağından dolayı C vitamininin fazlası itrah edilir. Bu nedenle klasik bilgi olarak vitaminin fazla miktarda alınmasının bir yararı olmaz. İki hafta süreyle insan deneklerinde günde ağızdan 3 gr dozunda C vitamini verildiğinde bunun % 90'ının değişmemiş olarak atıldığı % 6'sının dehidroaskorbik asit olarak idrarla atıldığı saptanmıştır. Bu durumda idrar ile 31 mg C vitamini kaynaklı oksalik asit atılır (14).

Yukarıda belirtilen aşırı doz haricinde C vitamininin vücuttan eliminasyonu yavaştır. Normal alım halinde C vitaminin vücuttan eliminasyonunun yarılanma ömrü yaklaşık 16 gün olarak saptanmıştır. Askorbik asit kısmen karaciğerde oksalik aside dönüştürülerek kısmen de sülfatlanarak elimine edilir (14).

C vitamini, dehidroaskorbik asit ile aralarında oluşturduğu oksidasyon-redüksiyon reaksiyonunun yanı sıra vücutta pek çok oksidasyon-redüksiyon reaksiyonuna da katılır. C vitamini hematopoetik dokuda tetrahidrofolik asitin oksidlenmeden kalmasını sağlar. İnce bağırsakta demir absorpsiyonunu artırır (14).

C vitamini ekstraselüler sıvıda bulunan en önemli antioksidan maddedir. Hücrelerin içerisinde de antioksidan özellik gösterir. $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $OH^{\cdot-}$, LOO^{\cdot} ve $1\Delta gO_2$ gibi pek çok radikali güçlü bir şekilde bağlayarak inaktive eder. Plazma lipitleri ile yapılan incelemeler, LOO^{\cdot} oluşmasını indükleyen maddelerin yaptığı lipid peroksidasyonunu inhibe eden en önemli plazma komponentinin C vitamini olduğunu göstermiştir. Böylece biyomembranları ve DNA'yı peroksidatif zedelenmeden koruyabilir. Ayrıca tokoferolün antioksidan etkinliğini güçlendirir. Folik asitin tetrahidrofolik aside ve midede non-hem ferrik demirin ferro demire indirgenmesine katkıda bulunur (14).

C vitamini'nin diğer bir önemli fonksiyonu, belirli hidrosilasyon ve amidasyon reaksiyonlarının koenzimi olmasıdır. Bu özelliği nedeniyle kollajen sentezinde, ksenobiyotiklerin mikrozomal metabolizmasında, Hb'in sentezinde, nörohipofiz hormonların biyosentezinde ve muhtemelen adrenal korteksteki steroid hormon sentezinde rol oynar (14).

C vitamini ayrıca lipid peroksidasyonunu önleyen antioksidan bir molekül olan karnitinin biyosentezini olumlu yönde etkiler (93, 94). Bunların yanında C vitamini ferri-miyoglobinürik oluşumunu engeller (95). Miyoglobinürik bu formunun oksidasyonu tetikleyerek lipid peroksidasyonundaki rolü gösterilmiştir (95, 96).

L-karnitin uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondriye taşınarak β -oksidasyonu ile hücre enerji üretiminde rol almaktadır. Filtre edilen karnitinin %90'ı proksimal tubülden reabsorbe edilmektedir. Renal tubüler bozulmaya yol açan hastalıklarda plazma ve kas karnitin düzeyinin azaldığı, üremiklerde azalan hücre içi ATP konsantrasyonunun, karnitin tedavisi ile düzeldiği gösterilmiştir. L-karnitin ve esterlerinin, ROR üretimini azaltma ve radikal tutucu etki ile primer, daha ağırlıklı olarak da hücre membran lipid peroksidasyonunu azaltarak sekonder yoldan antioksidan etki gösterdiği bildirilmiştir. Karnitinin MABY üzerindeki olumlu etkisi deneysel çalışmalarla gösterilmiştir (97).

C vitamini'nin oldukça fazla miktarda bulunduğu ve miktarının fonksiyonla ilgili değişme gösterdiği bir doku adrenal bezin korteksidir. Adrenokortikotropik hormon tarafından bu yapının stimülasyonu ve steroidogenezin artması bezde C vitamini konsantrasyonunda azalmaya neden olur. Deney hayvanlarına bakteriyel toksinler injekte edildiğinde adrenal korteksteki vitaminin belirgin şekilde azaldığı saptanmıştır. Bu gözlemler nedeniyle C vitamininin ağır infeksiyon ve stres hallerinde strese karşı hormonal reaksiyonun oluşmasında katkısının bulunduğu ileri sürülmüştür (14).

C vitamini'nin erişkinlerdeki günlük gereksinimi 10 mg kadardır. Gebelik, laktasyon halleri, ağır infeksiyon, travma ve cerrahi girişim gibi stres halleri ve hipertroidizmde günlük gereksinimi 10 mg'ın üzerine çıkar (14).

C vitamini skorbütün önlenmesi ve tedavisi, üst solunum yolları infeksiyonlarının önlenmesi ve tedavisi, idrarın asitleştirilmesi, methemoglobineminin tedavisi ve yanık sonrası yara dokusunun iyileştirilmesinde kullanılır. Kullanım dozu skorbüt tedavisinde bir hafta boyunca günlük 100 mg kullanılırken, idrarın asitleştirilmesinde günlük 2 gr'a kadar kullanılabilir (14).

C vitamini yan etkisi oldukça az olan bir ilaçtır. Fazla miktar alınması halinde diyare ve karın ağrısı yapabilir. Yüksek doz ile tedavi sırasında idrarda oksalat itrahi artar, idrarın asitleştirilmesi oksalatın ve sistinin çökmesine neden olur. İdrarın asitliği önlenirse bile oksalat taşı oluşumuna neden olabilir. Demir absorpsiyonunu artırabilir. Bu nedenle hemakromatozis, talasemi veya sideroblastik anemisi olanlarda sakıncalıdır. Yüksek dozda C

vitamini hafif hemakromatozisi olan hastalara verilirse kardiyomyopati yapar; bunun nedeni, hücrenin demir deposunun fazla olduğu durumlarda askorbik asitin antioksidan değil prooksidan etki yapmasıdır (14, 72).

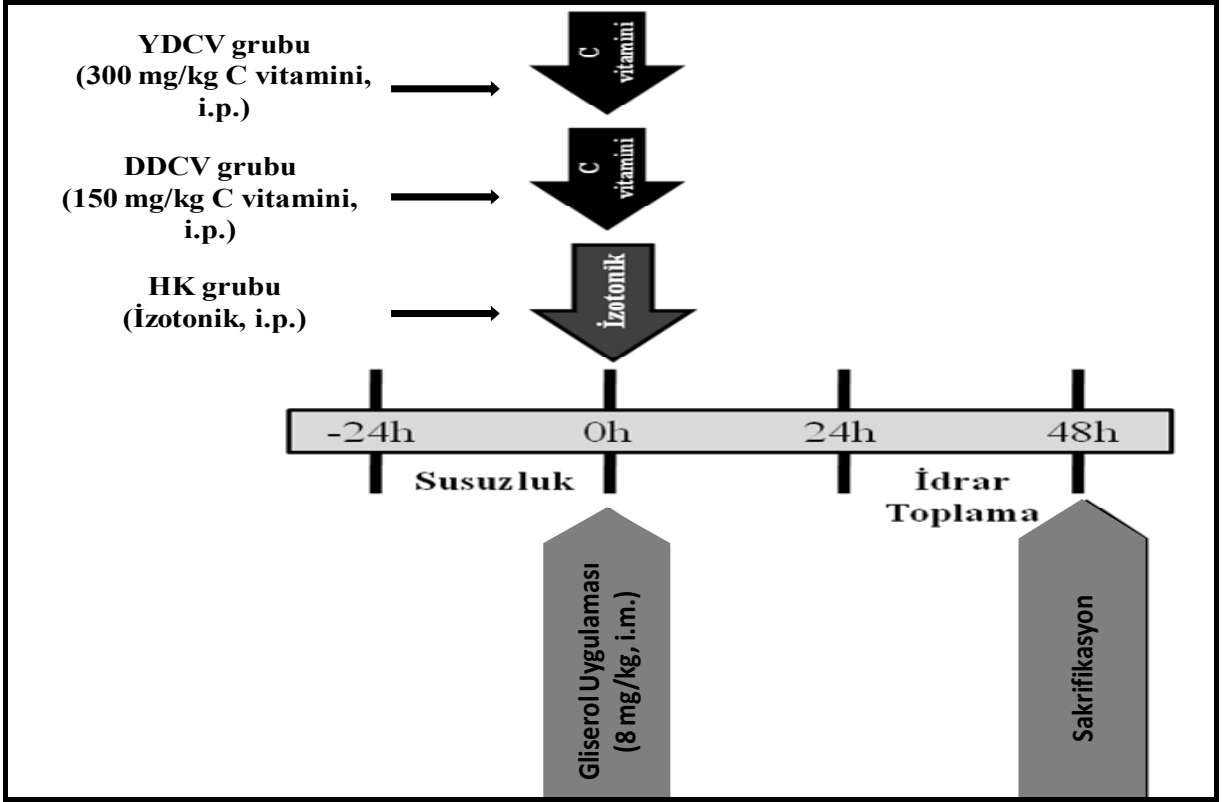
GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma 2009-2010 yılları arasında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Nefroloji Bilim Dalı, Histoloji Ana Bilim Dalı, Biyokimya Anabilim Dalı ve Deney Hayvanları Laboratuvarında; Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu onayı ve Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi desteği ile gerçekleştirildi (Ek-1, 2).

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Deney Hayvanları

Çalışmamızda ağırlıkları 325-483 gr arasında değişen ortalama yaşam süreleri 9 ay olan 48 adet *Sprague dawley* erkek rat kullanıldı. Ratlar, çalışma sürecinde uluslararası bakım standartlarına uygun olarak Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi'nin klimalı oda koşullarına sahip, sıcaklığı $21\pm 2^{\circ}\text{C}$, nemliliği % 60-65 arasında olan ve 12 saatlik aydınlık-karanlık siklusların birbirini takip ettiği deney hayvanları biriminde izlendi. Deney hayvanları standart sıçan yemi ve musluk suyu ile beslendi.



Şekil 2. Çalışma protokolü: HK grubu: im gliserol uygulaması sonrası %0,9 Sodyum klorür (NaCl) uygulanan ratlar; ODCV grubu: im gliserol uygulaması sonrası ip 150 mg/kg C vitamini uygulanan ratlar; YDCV grubu: im gliserol uygulaması sonrası ip 300 mg/kg C vitamini uygulanan ratlar

Sağlıklı kontrol grubu

Sağlıklı kontrol (SK) grubuna 9 rat alınarak 3 gün boyunca metabolik kafeste tutuldular. Ratlar bu süre boyunca standart rat yemi ve musluk suyu ile beslendiler. Son 24 saatlik idrarları toplanan ratların su, yiyecek tüketimleri ve 24 saatlik idrar miktarları kayıt edildi.

Hastalıklı kontrol grubu

Hastalıklı kontrol (HK) grubuna 13 rat alındı. Metabolik kafeste tutulan ratlara 24 saat susuzluğu takip eden sabah, % 50 gliserol (8 ml/kg, Merck) her iki arka ekstremiteye eşit miktarda olacak şekilde derin intramuskuler (im) injeksiyonla verildi. Gliserol injeksiyonu ile eş zamanlı olarak 2 ml %0,9 NaCl intraperitoneal (ip) yolla uygulandı. Gliserol uygulamasını

takiben 48 saat izlenen ratların son 24 saatlik idrarları toplanarak su, yiyecek tüketimleri ve 24 saatlik idrar miktarları kayıt edildi (Şekil 2).

Orta doz C vitamini grubu

Orta doz C vitamini (ODCV) grubuna 13 rat alındı. 24 saat susuzluğu takip eden sabah, % 50 gliserol (8 ml/kg, Merck) her iki arka ekstremiteye eşit miktarda olacak şekilde derin im injeksiyonla verildi. Gliserol injeksiyonu ile eş zamanlı olarak 150 mg/kg C Vitamini (Bayer, Almanya), % 0,9 NaCl ile birlikte toplam doz 2 cc olacak şekilde ip uygulandı. Gliserol uygulamasını takiben 48 saat izlenen ratların son 24 saatlik idrarları toplanarak su ve yiyecek tüketimleri, 24 saatlik idrar miktarları kayıt edildi (Şekil 2).

Yüksek doz C vitamini grubu

Yüksek doz C vitamini (YDCV) grubuna 13 rat alındı. 24 saat susuzluğu takip eden sabah, % 50 gliserol (8 ml/kg, Merck) her iki arka ekstremiteye eşit miktarda olacak şekilde derin im injeksiyonla verildi. Gliserol injeksiyonu ile eş zamanlı olarak 300 mg/kg C Vitamini (Bayer, Almanya), % 0,9 NaCl ile birlikte toplam doz 2 cc olacak şekilde ip uygulandı. Gliserol uygulamasını takiben 48 saat izlenen ratların son 24 saatlik idrarları toplanarak su ve yiyecek tüketimleri, 24 saatlik idrar miktarları kayıt edildi (Şekil 2).

Tüm gruplarda ağırlık, tüketilen yem ve su miktarları günlük olarak ölçülerek, 100 gr doku ağırlığı başına su ve yem tüketimleri kayıt edildi. Çalışmanın sonunda ratlara 10 mg/kg Xylazin ve 40 mg/kg Ketamin anestezisi uygulandı ve ratlar deney masasına yatırılarak batın ön duvarları insizyonla açıldı. Diyafragmadan kalbe ulaşılarak intrakardiyak yolla alınan kan, hemogramlarının değerlendirilmesi amacıyla tam kan sayımı tüpüne 1 cc % 0,9 NaCl, 1 cc tam kan olacak şekilde alınarak karıştırıldı. Tam kan sayımı analizi bekletilmeden yapıldı. Biyokimyasal incelemeler için 3 cc kan kuru tüpe alındı. Kuru tüpe alınan kan 3000 devirde 5 dk santrifüje edildikten sonra elde edilen serumdan biyokimyasal parametreler çalışıldı. Rutin biyokimyasal inceleme kan alımından hemen sonra yapıldı. Plazmada MDA ve SOD düzeylerinin belirlenmesi amacıyla EDTA'lı tüplere konulan kanlar soğuk santrifüj cihazında (Hettich EBA20 D-78532-0005532, Almanya) +4 °C'de 3000 devirde 5 dk santrifüje edildikten sonra plazmaları alınarak epanorp tüplere konuldu, -72°C derin dondurucuda (Nuaire Ultraflow freezer NU-6613W34, Amerika) depolandı. Eritrosit KAT düzeyi belirlenmesi için EDTA'lı tüplerdeki kanın ilk santrifüj sonrasında dipte kalan eritrositler üç

katı volümde % 0,9 NaCl ile karıştırılarak +4 °C’de soğuk santrifüj yapıldı. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Üçüncü santrifüjden sonra süpernatant kısım atılarak dipte kalan eritrositler alındı, epandorp tüplere konularak -72°C derin dondurucuda (Nuair Ultraflow freezer NU-6613W34, Amerika) depolandı.

Toplanan 24 saatlik idrarların volüm ölçümü yapıldıktan sonra pH ölçümleri (inoLab, MTW KS05, pHmetre, Amerika) yapıldı. İdrar örnekleri 3000 devirde 5 dk santrifüje (Hettich D-78532-0013754, Almanya) edilerek süpernatant kısımlarından mikroalbumin ve uKr çalışıldı. Ayrıca idrarda NAG tayini yapılması amacıyla birer cc süpernatant epandorp tüplere alınarak -72°C derin dondurucuda (Nuair Ultraflow freezer NU-6613W34, Amerika) depolandı.

Histolojik inceleme amacıyla her iki böbrek çıkarıldı, kapsülü sıyrılarak longitudinal kesile ikiye ayrıldı. Böbrek dokusu % 10 Formalin Solüsyonuna ileri histolojik inceleme için saklandı.

BİYOKİMYASAL ANALİZ

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı Biyokimya biriminde Konelap Prime 60 İ cihazı kullanılarak AKŞ, üre, sKr, T. protein, Albumin, Na⁺, K⁺, Ca⁺², P ve 24 saatlik idrar örneklerinde üriner albumin atılımı (UAA), GFR ve uKr belirlendi.

N-Asetil Glukoz Aminidaz Miktar Tayini

Yirmidört saatlik idrarda N-Asetil Glukoz Aminidaz (NAG) ölçümü için Diazyme (Katalog numarası: DZ062A, Amerika) marka NAG kiti kullanıldı. NAG; 2-metoksi-4-(2’ nitrovinil)-fenil 2-asetamido-2deoksi-β-D-glukopiranozid’i (MNP-GlcNAc) 2-metoksi-4-(2’-nitrovinil)-fenol’e hidrolize eden glikoprotein yapıda bir lizozomal enzimdir. Bu reaksiyon sonucu oluşan ürün rengi 505 nm’de absorban ölçümü ile değerlendirilebilir.

Kit substrat 1 (S1) olarak MNP-GlcNAc, hidroklorik asiti, substrat 2 (S2) olarak sitrik asiti, potasyum fosfatı (pH:4,7), substrat 3 olarak Na⁺ karbonat ‘Buffer’ı (pH:10), kalibratörü ve kontrolü içermekteydi.

Çalışma gününe kadar kit -20°C’de saklandı. S1 ve S2 5/1 oranında S1+S2 solüsyonunun elde edilmesi amacıyla karıştırıldı. Karışım kullanım öncesi +4°C’de tutuldu.

Manuel çalışma amacıyla substratlar 12X75 mm'lik cam tüplere alındı. Benmaride (Nüve ST402, Almanya) 37°C'de 5 dk inkübe edildi. S3'ten tüm tüplere renk oluşturma amacıyla konuldu. Örnekler küvete (Hellman 10 mm., Almanya) alınarak 505 nm'de spektrofotometri (Schimadzu UV-1208, Almanya) altında absorbans ölçümü yapıldı.

Örnek sonuçları (505nm'de örneğin absorbansı - Boş kuyucuğun 505 nm'deki absorbansı) değerinin (505 nm'de Standartın absorbansı - Boş kuyucuğun 505 nm'deki absorbansı) değerine bölünmesi ile IU/L olarak hesaplandı. İdrar NAG aktivitesi/idrar kreatinin atılımı oranı $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ cinsinden hesaplandı.

Malonil Dialdehit Miktar Tayini

Malonil dialdehit miktar tayini Cell Biolabs marka Oxiselect MDA Adduct elisa Kit (Katolog No: STA-332) kullanılarak yapıldı. Kit 96 kuyucuk protein bağlayan plate, Anti-MDA antikor, sekonder antikor, HRP konjugatı, çalışma çözücüsü, 10x yıkama 'Buffer'ı, substrat solusyonu, stop solusyonu, BSA standart ve MDA-BSA standart'ını içermekteydi. Redükte edilmiş BSA ve MDA-BSA -20°C'de saklandı. Diğer kit komponentleri -4°C'de saklandı. Bir ölçek yıkama 'Buffer'ının hazırlanması için kitten çıkan 10 ölçek yıkama 'Buffer'ı bir ölçek deiyonize su ile konsantre edildi. Homojenite sağlandı. Kullanmadan önce anti-MDA antikor 1/1000 ve sekonder antikor 1/1000 assay çözücüsü ile dilüe edildi. İndirgenmiş BSA'ı 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ şeklinde taze hazırlandı ve 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'e dilüe edildi. MDA-BSA'ı taze şekilde hazırlandı ve 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'e dilüe edildi. Plazma örneği 10 mg/ml olacak şekilde fosfat 'Buffer' salin (PBS) ile dilüe edildi. Her plazma ve MDA-BSA standardı duplike veya triplike şekilde ayarlandı. 10 ng/ml 'lik plazma örneğinden 100 μl veya indirgenmiş MDA-BSA standartları 96 kuyucuğa eklendi. 37°C'de 2 saat inkübe edildi. Kuyucuklar 2 kez 250 μl 1xPBS ile yıkandı. Son yıkamadan sonra kuyucuklar boşaltıldı ve mikrokuyucukları absorban pede solusyonun temizlenmesi için bırakıldı. 200 ml çalışma çözücüsünden eklendi ve 1-2 saat oda ısısında orbital karıştırıcı eşliğinde enkübe edildi. 3 kez 250 ml aynı miktar PBS ile yıkandı, son yıkamadan sonra kuyucukları boşaltıldı ve absorban beze tabi tutuldu. 100 ml anti-MDA tüm kuyucuklara dolduruldu ve 1 saat oda ısısında orbital karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. Strip kuyucukları 3 kez yıkandı. 100 μl dilüe sekonder antikor-HRP tüm kuyucuklara konjuge edildi ve 1 saat orbital karıştırıcıda inkübe edildi. Yine strip kuyucukları aynı şekilde yıkandı. Substrat solusyonu oda ısısında ılıtıldı. 100 adet substrat solusyonu tüm kuyucuklara eklendi. Oda ısısında 5-20 dakika orbital karıştırıcıda inkübe edildi. Enzim

reaksiyonunu stop solusyonu dökerek durduruldu. Sonuç absorbansları 450 nm mikroplate reader kullanarak hızlıca okundu.

Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi Biovision marka SOD aktivite kiti (Katolog No: K335-100) kullanılarak kalorimetrik bir metod ile ölçüldü. Kit; 1 ml WST Solusyonu, 20µl SOD enzim solusyonu, 20 ml SOD çalışma 'Buffer'ı ve 10 ml SOD dilüsyonunu içermektedir. 1 ml WST solusyonu 19 ml çalışma 'Buffer'ı ile dilüe edildi. Enzim solusyonunu 5 sn santrifüje edildi. Pipet kullanarak iyice karıştırıldı. 2,5 ml dilüsyon 'Buffer'ı 15 µl ile dilüe edildi. Etilen daimin tetra asetik asitli tüplere toplanan kanlar 1000 g' de 10 dk 4°C' de santrifüje edildi. Plazma kısmı ayrı bir tüpe transfer edildi fakat 'buffy' tabakasına müdahale edilmedi ve -80°C'de analize kadar saklandı. 'Buffy' kısmı kırmızı hücre tabakasından uzaklaştırıldı. Eritrositleri x5 hacminde buz soğukluğunda su ile birleştirildi ve 10000g'de santrifüje edildi. Süpernatanı -80°C'de saklandı. Örnek solusyonunu örnek ve 'blank' 2 kuyucuğuna eklendi; 'blank' 1 ve 3 kuyucuklarına 20 µl H₂O eklendi. 'WST working solusyonu'ndan 200 µl tüm kuyucuklara eklendi. Dilüsyon 'Buffer'dan 'blank' 2 ve 3 kuyucuklarına eklendi. 'Enzim working solusyon'undan 'blank'1'e ve örnek kuyucuklarına eklendi, iyice karıştırıldı ve 37°C' de 20 dk inkübe edildi. Absorbansı 450 nm'de 'mikroplate okuyucu'da (Microplate EL309 autoreader, Amerika) okundu. SOD aktivitesini aşağıdaki formülle saptandı:

SOD aktivitesi: $(A \text{ 'blank' } 1 - A \text{ 'blank' } 3) - (A \text{ örnek} - A \text{ 'blank' } 2) / (A \text{ 'blank' } 1 - A \text{ 'blank' } 3) \times 100$

Katalaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Katalaz ölçümü Biovision KAT ölçüm kiti (Catalog #K773-100, Amerika) kullanılarak yapıldı. Biovision katalaz çalışma kiti HTS-hazır biyolojik örneklerde KAT aktivitesini yüksek derecede sensitif, basit ve direk ölçen bir kittir. Kit H₂O₂'nin deiyonize su (DiH₂O) ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan O₂ reaksiyonunu katalize etmesi esasına dayanarak çalışır. Kit 25 ml KAT çalışma 'Buffer'ı, 2 şişe 'Oxired prob'u, 0,4 ml DMSO (Anhidroz), 1 şişe HRP, 25 µl H₂O₂ (%3; 0,88M), 1 ml durdurma solüsyonu ve 1 şişe KAT pozitif kontrol içermektedir. Kit -20°C'de ışıktan saklanacak şekilde saklandı. Kullanımdan önce kit oda koşullarına ılıtıldı. Çalışma öncesinde ayıraç rekonstrüksiyonu yapıldı. 'Oxired

prob'u her şişe 110 µl DMSO ile olacak şekilde çözüldü ve 18°C'e kadar sıvı hale gelinceye kadar elde ılıtıldı. HRP solusyonu 220 µl çalışma 'Buffer'ı ile çözüldü. Pozitif kontrol solusyonu 500 µl çalışma 'buffer'ında çözüldü. Şişe başına 100 ml'e bölündü. -20°C'de saklandı. Çalışma 'buffer'ı kullanım öncesi oda ısısına getirildi. Örnekler alındı ve KAT çalışma boyunca buzda tutuldu. Eritrosit (0,2 cc) üzerine 1 ml. soğuk çalışma 'buffer' eklenerek homojenizatör (Heidolph DiaX900, Almanya) ile homojenize edildi. 4°C'de 10.000 g'de 15 dk santrifüje edildi. Süpernatanı toplandı. Beş ve 10 µl pozitif kontrol solusyonu 2 ayrı kuyucuğa kontrol amacıyla eklendi ve total hacmi çalışma 'Buffer'ı ile kuyucuklarda aynı miktar olacak şekilde ayarlandı. Total hacmi 78 µl olacak şekilde çalışma 'Buffer'ı ile tamamlandı. 10 µl stop solusyonu pozitif kontrol örneğine eklendi, karıştırıldı ve 25°C'de 4 dk katalaz aktivitesini tamamen inhibe edecek şekilde inkübe edildi.

Örnek körünün hesaplanması amacıyla 10 µl çalışma 'buffer'ı ile 78 µ'e tamamlanan 68 µl örnekler kuyucuklara eklendi. Üzerlerine 10 µl durdurma solüsyonu eklendi. Karıştırıldıktan sonra 25°C'de 5 dk inkübe edildi.

5 µl 0.88 M'lik H₂O₂'i 215 µl DiH₂O ile H₂O₂ forme etmek için dilüe edildi. Elde edilen bu karışımdan 50 µl alındı ve üzerine 950 µl DiH₂O eklendi. Elde edilen 1 mM H₂O₂'den 6 adet kuyucuğa sırasıyla 0-2-4-6-8-10 µL'leri, 0-2-4-6-8-10 mmol/kuyu H₂O elde etmek için eklendi. Son hacmi 96 µl olacak şekilde çalışma 'buffer'ı ile tamamlandı. 10 µl' lik durdurma solüsyonunu tüm bu kuyucuklara eklendi.

Fluometrik çalışma için standart H₂O₂'i 10 satandard eğri eldesi için dilüe edildi. Dilüe H₂O₂'nin instabil olması nedeniyle her seferinde yeni dilüsyon hazırlandı.

Katalaz reaksiyonunu başlatmak için tüm örnek kuyucuklarına ve pozitif kontrol örneğine 12 µl taze 1 mM H₂O₂ eklendi 25°C de 30 dk inkübe edildi ve sonra 10 µL' lik durdurma solusyonunu örnek kuyucuklarına reaksiyonu durdurmak için döküldü.

'Develop Mix' hazırlanması için kit içeriğinde bulunan 46 M çalışma 'buffer'ı, 2 µl 'Oxired probe'u, 2 µl'lik HRP solusyonu kullanıldı. Tüm test örneklerine kontrollere ve standartlara 50 µl 'Develop Mix' eklendi, iyice karıştırıldı ve 25°C' de 10 dk inkübe edildi. Sonuçlar 540 nm'de 'plate reader'da (Microplate EL309 autoreader, Amerika) okundu.

Bir örnekteki KAT ile sağlanan sinyal değişimleri (ΔA) = pozitif kontrol örneğinin okunması (AHC) - örneğin 30. dk'daki okunması (Aörnek) olarak adlandırıldı. Sonuçlar H₂O₂'li standart eğriye iliştilirdi. ΔA 'ı H₂O₂ i standart eğrisine 30 dk'lık KAT tarafından dekompanse edilmiş B nmol H₂O₂ eldesi için iliştilirdi.

Katalaz aktivitesi nmol/dk/ml cinsinden değeri = $B/30 \times V \times \text{örnek dilüsyon faktörü}$ olarak hesaplandı.

IŞIK MİKROSKOPİK İNCELEME

Işık mikroskopik incelemeler için böbrek dokuları, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Işık Mikroskopi Laboratuvar'ında işlemlendirildi. Bu amaçla böbrek dokuları 'Bouin' fiksatoründe 4 gün fikse edildikten sonra yıkama işlemine geçildi. Dokular iki gün %70'lik alkolde yıkanarak, dehidratasyon işlemine geçildi. Dokular artan alkol serilerinde (%70, 90, 96, 100) birer saat tutuldu. Dehidratasyon aşamasından sonra saydamlaştırma basamağı için dokular üç seri 15'er dk toluol ile muamele edildi. Gömme işleminden önce dokular yumuşak parafinde bir gece tutuldu. Bir sonraki gün böbrek dokuları yumuşak parafinden alınarak bir saat sıvı sert parafinde tutularak bloklandı. Bu bloklardan mikrotom (Leica RM-2245 silindirik mikrotom, Amerika) kullanılarak 6 µm (mikrometre) kalınlığındaki kesitler alındı. Böbrek dokusunun genel özelliklerini ortaya koyabilmek amacıyla alınan kesitler Hematoksilen+Eozin (H+E) ile boyandı. Kontrol ve deney gruplarında, nekroz ve tıkaç oluşumu semikantitatif olarak saptandı (Tablo 6). Semikantitatif değerlendirme, aşağıdaki biçimde yapıldı; yok (-), nadir (±), az(+), orta (++) , fazla (+++), çok fazla (++++).

TUNEL BOYAMA

Parafin bloklardan lam üzerine alınan 6 µm'lik kesitler bir gece 37°C'lik etüvde tutulduktan sonra toluolde 3x5 dk bekletilerek parafinden iyice arındırılarak azalan alkol serilerinden (%100, %95, %70) 3'er dk geçirilip distile suya indirildi. Beş dk DiH₂O'da tutulan kesitlere daha sonra antijen iyileştirme amacıyla onbeş dk oda ısısında proteinaz K (20 µg/ml, Chemicon, 21627, Amerika) uygulandı. Distile su ile yıkanan kesitler endojen peroksidazı bloklamak için metanolde hazırlanan %3'lük H₂O₂'de beş dk bekletildi. Distile su ve PBS ile çalkalandıktan sonra lam üzerinde kesitlerin etrafı hidrofobik kalem (Zymed, 00-8899, Amerika) ile çizilerek havuz oluşturuldu ve kesitlere beş dk oda ısısında dengeleme tamponu uygulandı. Daha sonra kesitler 37°C'de terminal deoksinükleotidil transferaz enziminde bir saat bekletildikten sonra durdurma/yıkama tamponuyla onbeş saniye çalkalandı ve oda ısısında on dk bekletildi. Üç kez PBS'de yıkanan kesitlere antidigoksinin konjüгатı uygulandı ve oda ısısında otuz dk tutuldu. Kesitlere üç kez PBS ile yıkama sonrasında on dk

diamino benzidin kromojen solüsyonu (LabVision, TA-002-HAC, Amerika) uygulaması yapıldı. Kesitler diH₂O ile yıkandıktan sonra on dk 'Methyl green' uygulanarak zıt boyama yapıldı. Distile sudan hızla geçirilen kesitler %100 N-Butanolden de hızla geçirildi. Dehidrate edilen kesitler 3x2 dk toluolde tutulduktan sonra kapatma solüsyonu konarak lamel ile kapatıldı ve ışık mikroskobunda değerlendirmeye alındı. Işık mikroskobunda (Olympus CX31-Japan, Japonya) incelenerek, bulguların fotoğrafları çekildi. Kontrol ve deney gruplarında, TUNEL pozitif (apoptotik) hücre sayıları semikantitatif olarak saptandı (Tablo 7). Semikantitatif değerlendirme, aşağıdaki biçimde yapıldı; yok (-), nadir (\pm), az(+), orta (++) , fazla (+++), çok fazla (++++).

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Çalışma gruplarının verileri bilgisayar ortamına kaydedildi. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Bilgi İşlem Merkezi'ndeki STATISTICA AXA 7,1 (Lisans Kodu:AXA507C775506FAN3) programı kullanılarak istatistiksel değerlendirmeler yapıldı. Verilerin ortalama ve standart sapmaları kaydedildi. Grupların verileri arasındaki farklılık 'Mann Whitney U' testi kullanılarak araştırıldı. Çalışma grupları arasında tubüler nekroz, apoptoz ve tubuler tıkaç oluşumu açısından farklılığın araştırılmasında 'Ki-kare' testi kullanıldı. Gliserol uygulanan ratların (HK, ODCV, YDCV) verileri bir arada alınarak, parametrik veriler arasındaki çoklu ilişkilerin incelemesinde 'Pearson korelasyon' testi, kategorik veriler arasındaki çoklu ilişkilerin incelemesinde 'Spearman korelasyon' testi kullanıldı. $p < 0,05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışma süresince HK, ODCV ve YDCV gruplarından üçer rat eksitus olduklarından çalışma SK grubunda dokuz; HK, ODCV ve YDCV gruplarında onar rat olmak üzere toplam 39 rat ile tamamlandı. Gliserol uygulanan gruplarda SK grubuna göre serumda üre ve sK_r değerlerinde anlamlı yükseklik, GFR değerlerinde anlamlı düşüklük ve histopatolojik incelemede tubüler hücrelerde nekroz ve tubüler lümende tıkaç varlığı ile belirgin MABY tablosu geliştiği gözlemlendi. Grupların tüm parametreleri Tablo 12-15’de gösterilmiştir.

BİYOKİMYASAL PARAMETRELER

Gliserol uygulanan grupların lökosit sayıları SK grubu ile benzerdi (HK grubu $p=0,182$; ODCV grubu $p=0,315$; YDCV grubu $p=0,297$). HK grubu ile ODCV grubu arasında lökosit düzeyleri açısından istatistiki fark saptanmadı ($p=0,529$). HK grubunda lökosit düzeyleri YDCV grubuna göre belirgin olarak yüksek saptandı ($p=0,043$). C vitamini uygulanan gruplar arasında lökosit sayıları arasında fark saptanmadı ($p=0,447$).

Gliserol uygulanan grupların Hb düzeyleri SK grubuna göre düşük bulundu (HK grubu $p=0,01$; ODCV grubu $p=0,043$; YDCV $p=0,006$). Gliserol uygulanan gruplar arasında Hb düzeyleri açısından istatistiki fark saptanmadı (HK-ODCV grupları için $p=0,971$; HK-YDCV grupları için $p=0,356$; ODCV-YDCV grupları için $p=0,211$).

Gliserol uygulanan gruplarda trombosit sayıları SK grubuna benzerdi (HK grubu $p=0,720$; ODCV grubu $p=0,497$; YDCV $p=0,370$). Gliserol uygulanan gruplar arasında

trombosit sayıları açısından istatistiksel fark saptanmadı (HK-ODCV grupları için $p=0,460$; HK-YDCV grupları için $p=0,408$; ODCV-YDCV grupları için $p=0,408$).

Gliserol uygulanan gruplarda total protein değerleri SK grubuna göre düşük saptandı (HK grubu $p=0,005$; ODCV grubu $p=0,008$; YDCV grubu $p=0,001$). Gliserol uygulanan gruplar arasında total protein düzeyleri açısından istatistiksel fark saptanmadı (HK-ODCV grupları arası için $p=0,796$; HK-YDCV grupları arası için $p=0,579$; ODCV-YDCV grupları arası için $p=0,436$).

Gliserol uygulanan gruplarda albumin değerleri SK grubuna göre düşük saptandı (HK grubu $p=0,002$; C vitamini uygulanan gruplarda $p=0,004$). Gliserol uygulanan gruplar arasında albumin düzeyleri açısından istatistiksel fark saptanmadı (HK-ODCV grupları arası için $p=0,739$; HK-YDCV grupları arası için $p=0,631$; ODCV-YDCV grupları arası için $p=0,853$).

Gliserol uygulanan gruplarda Na^+ değerleri SK grubuna göre düşük saptandı (HK grubu $p=0,00004$; C vitamini uygulanan gruplarda $p=0,00002$). Gliserol uygulanan gruplar arasında Na^+ düzeyleri açısından istatistiksel fark saptanmadı (HK-ODCV grupları arası için $p=0,436$; HK-YDCV grupları arası için $p=0,481$; ODCV-YDCV grupları arası için $p=0,912$).

Gliserol uygulanan gruplarda K^+ değerleri SK grubuna göre yüksek (HK grubu $p=0,002$; ODCV grubu $p=0,001$; YDCV grubu $p=0,035$) saptanmakla birlikte SK grubuna en yakın değerler YDCV grubunda elde edildi.

Gliserol uygulanan grupların Ca^{+2} düzeyleri SK grubu ile benzerdi (HK grubu $p=0,842$; ODCV grubu $p=0,113$; YDCV grubu $p=0,905$). Gliserol uygulanan gruplar arasında Ca^{+2} düzeyleri açısından istatistiksel fark saptanmadı (HK-ODCV grupları arası için $p=0,393$; HK-YDCV grupları arası için $p=0,739$; ODCV-YDCV grupları arası için $p=0,218$).

Gliserol uygulanan gruplarda P değerleri SK grubuna göre yüksek saptandı (HK grubu $p=0,00002$; C vitamini uygulanan gruplarda $p=0,00004$). Gliserol uygulanan gruplar arasında P düzeyleri açısından istatistiksel fark saptanmamakla birlikte (HK-ODCV grupları için $p=0,400$; HK-YDCV grupları için $p=0,353$; ODCV-YDCV grupları için $p=0,661$) YDCV grubunda P değerleri SK grubuna daha benzer bulundu (Tablo 5).

NEFRON FONKSİYONLARI

Serum üre düzeyi gliserol uygulanan tüm gruplarda SK grubuna göre anlamlı yüksek bulundu (tüm gruplar için $p=0,0002$). Gliserol uygulanan gruplar arasında üre düzeyleri

arasında istatistiki fark saptanmamakla birlikte YDCV grubunda üre değerleri SK grubuna daha benzer bulundu (HK-ODCV grupları için $p=0,739$; HK-YDCV grupları için $p=0,481$; ODCV-YDCV grupları için $p=0,190$).

Serum kreatinin düzeyi gliserol uygulanan tüm gruplarda SK grubuna göre anlamlı yüksek bulundu (tüm gruplar için $p=0,0002$). YDCV uygulanan grupta sKr değeri HK grubuna göre anlamlı düşük bulundu (HK grubuna göre $p=0,01$). YDCV grubunun sKr düzeyi ODCV grubuna göre istatistiksel fark olmamakla birlikte hafifçe düşük bulundu ($p=0,247$).

Sağlıklı kontrol grubuna göre yapılan karşılaştırmada HK grubunda idrar miktarı anlamlı düşük bulundu ($p=0,028$). C vitamini uygulanan gruplarda idrar miktarı SK grubuna göre farksız bulundu (ODCV ve YDCV gruplarının her ikisi için $p=0,356$). YDCV uygulanan grupta idrar miktarı HK grubuna göre belirgin yüksek bulundu ($p=0,005$). Sağlıklı kontrol grubunun verilerinin gliserol uygulanan grupların verileriyle karşılaştırılması Tablo 5'te gösterilmiştir.

Endojenik kreatinin atılımına göre hesaplanan GFR değeri gliserol uygulanan tüm gruplarda SK grubuna göre anlamlı düşük bulundu (SK grubuna göre karşılaştırmada tüm gruplar için $p=0,0002$). YDCV uygulanan grupta GFR değeri HK grubuna göre 4,6 kat ($p=0,0114$), ODCV grubuna göre 2,9 kat ($p=0,0354$) yüksek bulundu. ODCV uygulanan grupta GFR değeri HK grubuna göre 1,6 artmış bulunmakla birlikte aradaki fark istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştı ($p=0,436$) (Şekil 3).

Tablo 5. Sağlıklı kontrol grubunun verilerinin gliserol uygulanan grupların verileriyle karşılaştırılması

Grup Parametreler	SK	HK		ODCV		YDCV	
	Ort. ± Std	Ort. ± Std	p=	Ort. ± Std	p=	Ort. ± Std	p=
İlk kilo (gr)	405±40	401±44	0,720	405±48	0,905	411±53	0,780
Son kilo (gr)	407±40	393±40	0,400	396±51	0,661	398±50	0,315
Hemoglobin (gr/dl)	14,5±1,6	12,3±1,5	0,010	12,4±1,7	0,043	11,3±1,8	0,006
Lökosit (x10 ³ /mm ³)	7,1±5,3	10,2±4,2	0,182	9,6±4,4	0,315	8,8±3,3	0,297*
Trombosit (x10 ³ /mm ³)	786±180	816±223	0,720	813±120	0,497	784±208	0,370
T. protein (gr/dl)	5,7±0,4	5,12±0,39	0,005	5,15±0,41	0,008	5,0±0,3	0,001
Alb (gr/dl)	1,3±0,1	1,08±1,13	0,002	1,1±0,12	0,004	1,1±0,1	0,004
Na ⁺ (mmol/L)	142,0±1,5	134,9±3,4	0,00004	133,7±3,5	0,00002	133,0±5,6	0,00002
K ⁺ (mmol/L)	5,7±0,4	6,8±0,8	0,002	7,27±1,1	0,001	6,8±1,4	0,035
Ca ⁺² (mg/dl)	9,5±0,2	9,8±1,4	0,842	9,9±0,5	0,113	9,6±0,68	0,905
P (mg/dl)	7,7±0,8	20,0±9,0	0,00002	16,3±4,3	0,00004	15,5±5,8	0,00004

HK Hastalıklı kontrol; ODCV: Orta doz C vitamini; SK: Sağlıklı kontrol; YDCV: Yüksek doz C vitamini;

Alb: Albumin; Ca⁺²: Kalsiyum; K⁺: Potasyum; Na⁺: Sodyum; P: Fosfor; Ort ±Std: Ortalama± Standart sapma; T. protein: Total protein;

İstatistiksel değerlendirmede 'Mann-Whitney U' testi kullanılmıştır. p değeri SK grubu ile gliserol uygulanan gruplar arasındaki istatistiksel farkı; *= HK grubu ile ODCV ve YDCV gruplarının değerleri arasındaki istatistiksel karşılaştırmada p<0,05; # = ODCV ve YDCV gruplarının değerleri arasındaki istatistiksel karşılaştırmada p<0,05.

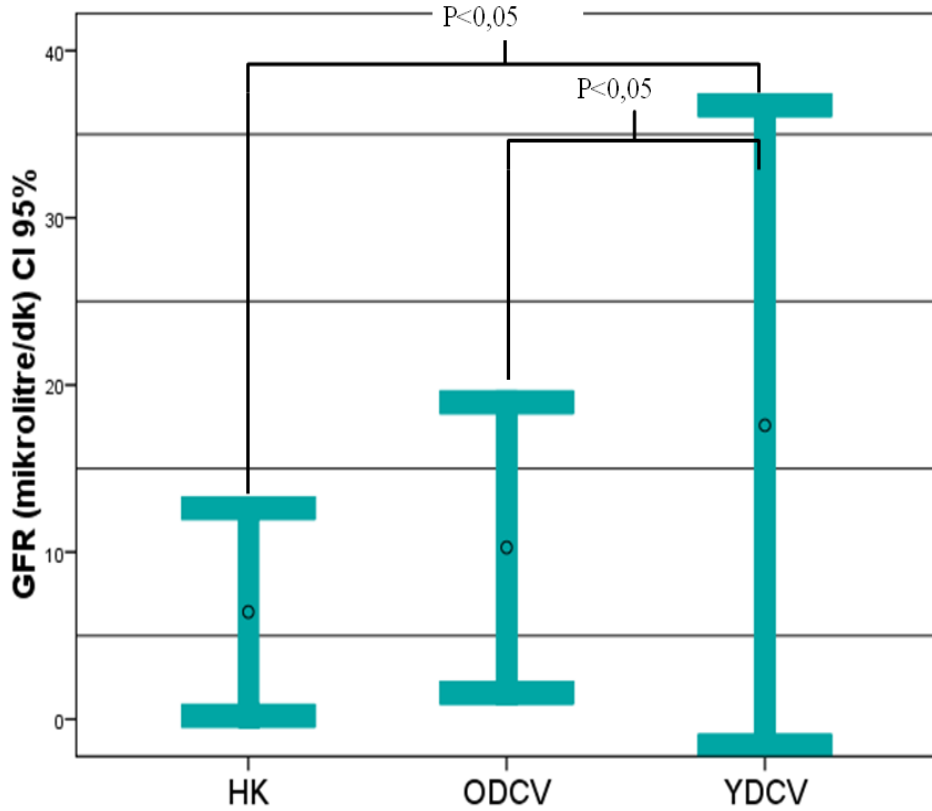
Tablo 5. (Devam) Sağlıklı kontrol grubunun verilerinin gliserol uygulanan grupların verileriyle karşılaştırılması

Grup Parametreler	SK	HK		ODCV		YDCV	
	Ort. ± Std	Ort. ± Std	p=	Ort. ± Std	p=	Ort. ± Std	p=
İdrar miktarı (ml)	5,8±5,0	2,2±2,8	0,028	4,0±3,3	0,356	8,8±5,7	0,356*
İdrar pH	9,0±0,6	8,8±0,6	0,864	8,5±0,9	0,481	8,6±0,5	0,351
Üre (mg/dl)	33,2±3,1	537±82	0,00002	523±106	0,00002	485±103	0,00002
sKr (mg/dl)	0,47±0,09	7,4±0,6	0,00002	6,6±1,5	0,00002	6,2±1,0	0,00002*
GFR (µl/dk)	992±574	6,4±8,6	0,00002	10,3±12,1	0,00002	29,6±27,8	0,00002*#
UAA/uKr (µg/µmol)	2,25±2,06	25,01±22,00	0,0003	14,14±7,93	0,0003	11,82±8,75	0,001
NAG/uKr (U/µmol)	2,13±2,27	41,3±86,7	0,026	9,4±6,5	0,004	10,6±6,0	0,012
MDA (pmol/mg pr)	13,00±13,57	35,0±20,2	0,010	23,06±8,79	0,065	23,2±7,1	0,053
SOD (U/ml)	3,54±2,33	1,5±1,1	0,028	1,95±1,69	0,113	2,25±1,74	0,211
KAT (mU/ml)	4,79±4,40	2,16±2,23	0,481	2,64±2,05	0,423	3,3±2,1	0,837

HK Hastalıklı kontrol; **ODCV**: Orta doz C vitamini; **SK**: Sağlıklı kontrol; **YDCV**: Yüksek doz C vitamini;

GFR: Glomerüler filtrasyon hızı; **KAT**: Katalaz; **MDA**: Malonil dialdehit; **NAG/uKr**: Üriner N-asetil glukozaminidaz aktivitesi/Üriner kreatinin atılımı oranı; **Ort ±Std**: Ortalama ± Standart sapma; **sKr**: Serum kreatinin düzeyi; **SOD**: Süperoksit dismutaz; **UAA/uKr**: Üriner albumin atılımı/Üriner kreatinin atılımı;

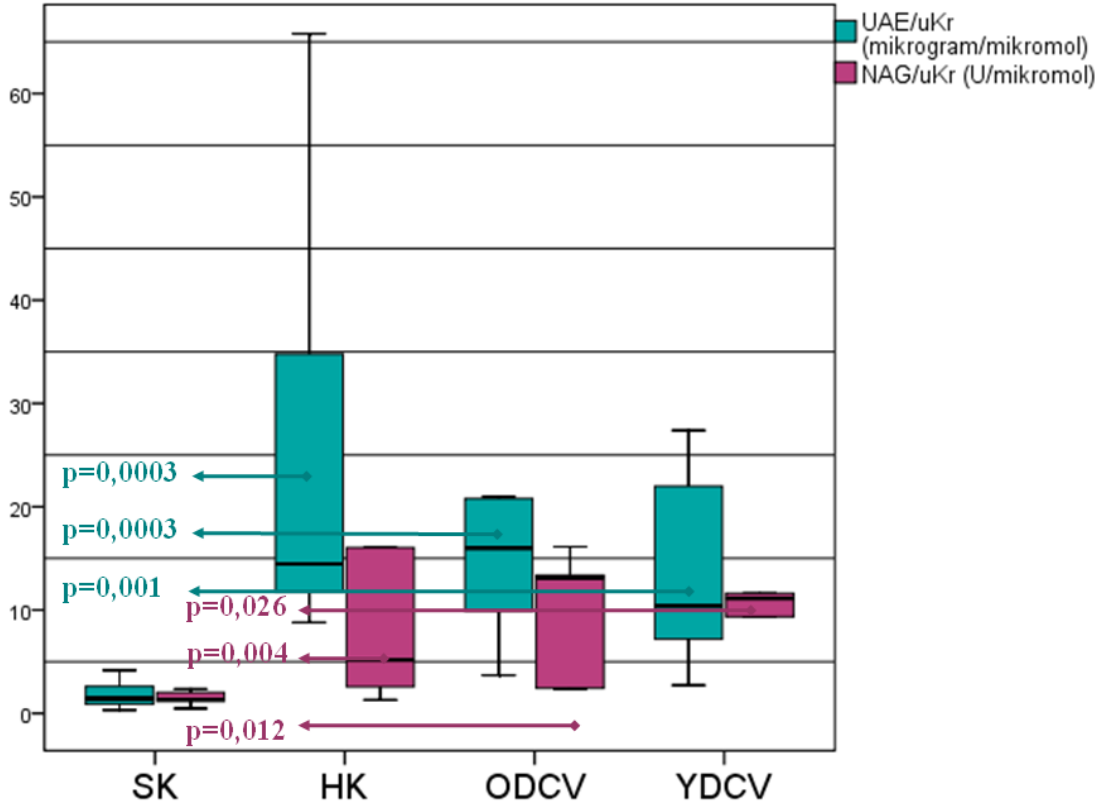
İstatistiksel değerlendirmede 'Mann-Whitney U' testi kullanılmıştır. p değeri SK grubu ile gliserol uygulanan gruplar arasındaki istatistiksel farkı; *= HK grubu ile ODCV ve YDCV gruplarının değerleri arasındaki istatistiksel karşılaştırmada p<0,05; # = ODCV ve YDCV gruplarının değerleri arasındaki istatistiksel karşılaştırmada p<0,05.



Şekil 3. Gliserol uygulanan gruplarda endojenik kreatininle hesaplanan kreatinin klerensi ($\mu\text{l}/\text{dk}$) değerleri
HK: Hastalıklı kontrol; ODCV: Orta doz C vitamini; YDCV: Yüksek doz C vitamini; GFR: Endojen kreatinin ile hesaplanan kreatinin klerensi
İstatistiksel karşılaştırmada ‘Mann-Whitney U’ testi kullanılmıştır

İdrar pH değeri gliserol uygulanan gruplarda SK grubuna göre farksız bulundu (HK grubu $p=0,864$; ODCV grubu $p=0,481$; YDCV grubu $p=0,315$).

İdrar volümünün etkisini ortadan kaldırmak için UAA/uKr $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ cinsinden alınarak SK grubu ile yapılan karşılaştırmada gliserol uygulanan tüm gruplarda UAA/uKr oranı istatistiksel olarak yüksek bulundu (HK grubu $p=0,003$; ODCV grubu $p=0,0003$; YDCV grubu $p=0,001$). Gliserol uygulanan gruplar arasında UAA/uKr oranı istatistiksel olarak farksız bulunmakla birlikte, bu oranının SK grubuna en yakın olduğu grup YDCV grubu idi (HK-ODCV grupları için $p=0,414$; HK-YDCV grupları için $p=0,145$; ODCV-YDCV grupları için $p=0,541$) (Şekil 4).



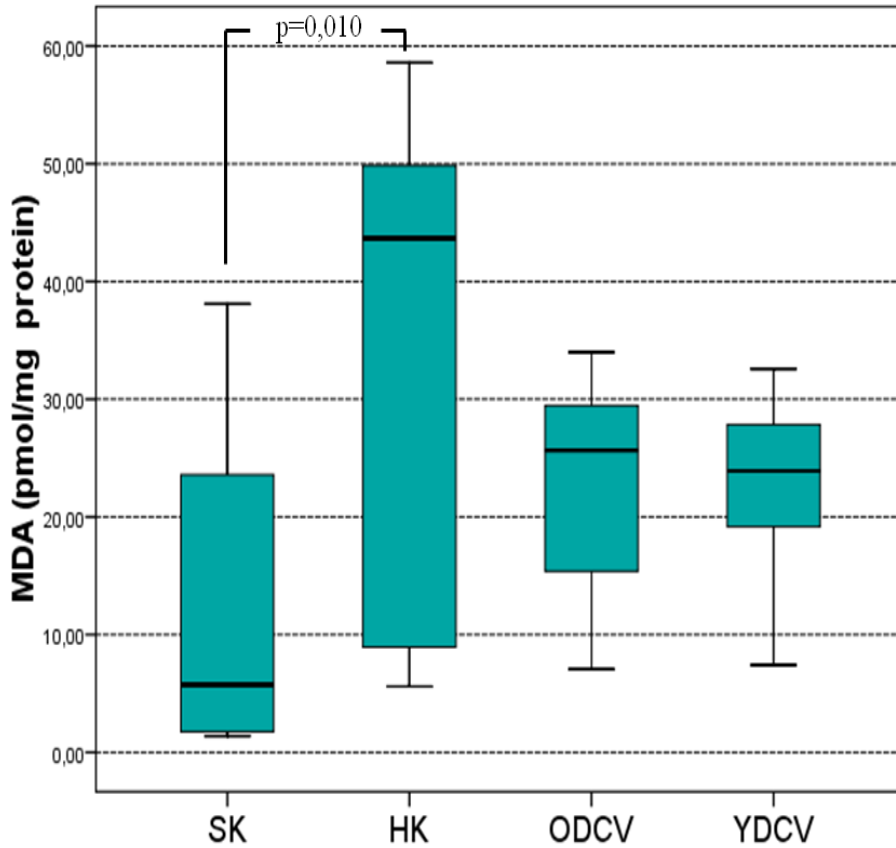
Şekil 4. Çalışma gruplarının üriner albumin atılımının üriner kreatinin atılımına oranı ($\mu\text{g}/\mu\text{mol}$) ve üriner N-asetil glukozaminidaz atılımının üriner kreatinin atılımına oranı ($\text{IU}/\mu\text{mol}$) oranlarının karşılaştırması
HK: Hastalıklı kontrol; ODCV: Orta doz C vitamini; SK: Sağlıklı kontrol; YDCV: Yüksek doz C vitamini; UAE: Üriner albumin atılımı; uKr: Üriner kreatinin atılımı; NAG: Üriner N-asetil glukozaminidaz aktivitesi
İstatistiksel karşılaştırmada ‘Mann-Whitney U’ testi kullanılmıştır

İdrar volümünün etkisini ortadan kaldırmak için uriner NAG atılımının, üriner kreatinin atılımına oranı $\text{IU}/\mu\text{mol}$ cinsinden alınarak SK grubu ile yapılan karşılaştırmada gliserol uygulanan tüm gruplarda NAG/uKr oranı istatistiksel olarak yüksek bulundu (HK grubu $p=0,026$; ODCV grubu $p=0,004$; YDCV grubu $p=0,012$). Gliserol uygulanan gruplar arasında NAG/uKr oranı istatistiksel olarak farklı bulunmakla birlikte, C vitamini uygulanan gruplarda bu oran HK grubuna göre yaklaşık dört kat düşük bulundu (HK-ODCV grupları için $p=1,00$; HK-YDCV grupları için $p=0,792$; ODCV-YDCV grupları için $p=0,841$) (Şekil 4). Çalışma gruplarının nefron fonksiyonlarına ilişkin verileri ve karşılaştırmaları Tablo 5’de gösterilmiştir.

OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİ

Lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeyi, HK grubunda SK grubuna göre anlamlı yüksek bulundu ($p=0,0101$). C vitamini tedavisi uygulanan gruplarda istatistiksel olarak MDA düzeyi SK grubundan farksız bulundu (ODCV grubu $p=0,0652$; YDCV grubu için $p=0,0534$) (Şekil 5).

Sağlıklı kontrol grubuna göre yapılan karşılaştırmada eritrosit içi KAT aktivitesi gliserol uygulanan gruplarda SK grubuna göre istatistiksel olarak farksız bulunmakla birlikte HK grubu $p=0,481$; ODCV grubu $p=0,423$; YDCV grubu için $p=0,837$), KAT değerinin SK grubuna en benzer olduğu gruplar sırasıyla yüksek ve düşük doz C vitamini grupları idi. Çalışma gruplarının eritrosit içi KAT aktiviteleri Şekil 6'da gösterilmiştir. Grupların oksidatif stres göstergeleri ve istatistiki karşılaştırmaları Tablo 5'de gösterilmiştir.

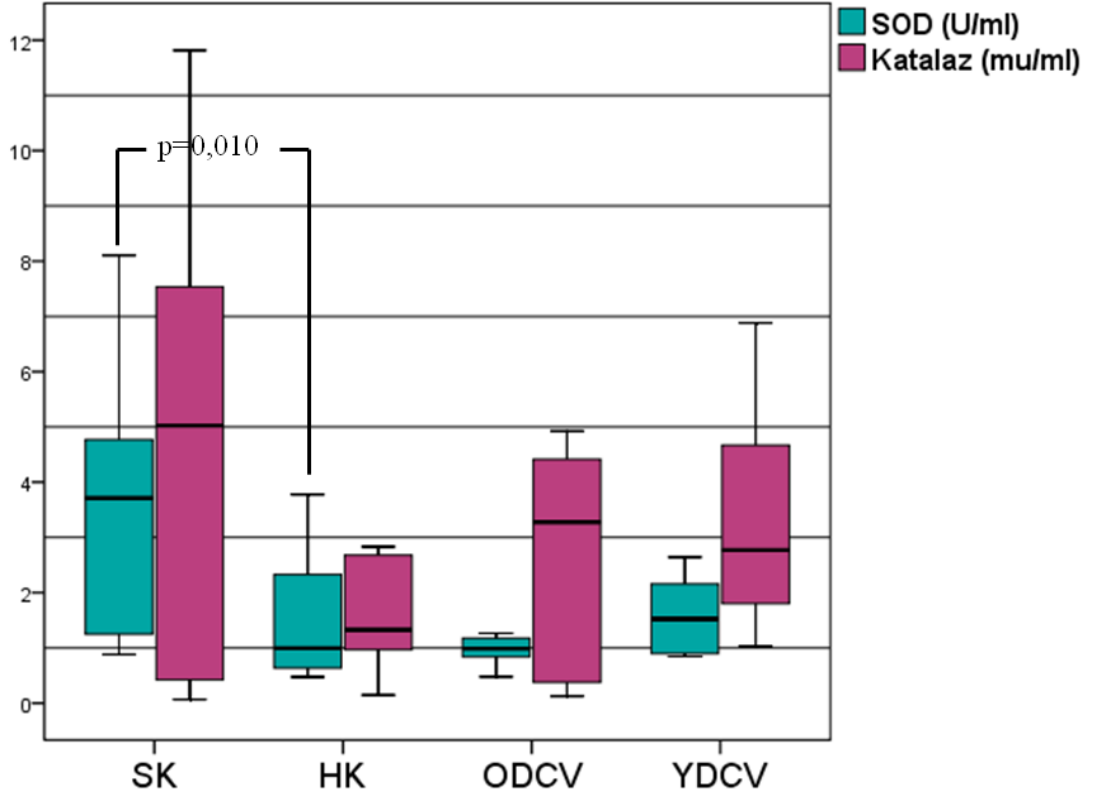


Şekil 5. Çalışma gruplarının malonil dialdehit (pmol/mg protein) düzeylerinin karşılaştırması

HK Hastalıklı kontrol; ODCV: Orta doz C vitamini; SK: Sağlıklı kontrol; YDCV: Yüksek doz C vitamini

İstatistiki karşılaştırmada 'Mann-Whitney U' testi kullanılmıştır

Sağlıklı kontrol grubuna göre yapılan karşılaştırmada serum SOD aktivitesi HK grubunda SK grubuna göre anlamlı yüksek bulundu ($p=0,028$). C vitamini tedavisi uygulanan gruplarda MDA düzeyi istatistiksel olarak SK grubundan farksız bulundu (ODCV grubu $p=0,113$; YDCV grubu için $p=0,211$). Çalışma gruplarının antioksidan enzim aktiviteleri ve karşılaştırmaları Şekil 6’da gösterilmiştir.



Şekil 6. Çalışma gruplarının antioksidan enzim düzeylerinin karşılaştırması

SOD: Serum süperoksit dismutaz enzim aktivitesi (U/ml), Katalaz:

Eritrosit içi katalaz enzim aktivitesi (mu/ml)

HK: Hastalıklı kontrol; ODCV: Orta doz C vitamini;

SK: Sağlıklı kontrol; YDCV: Yüksek doz C vitamini

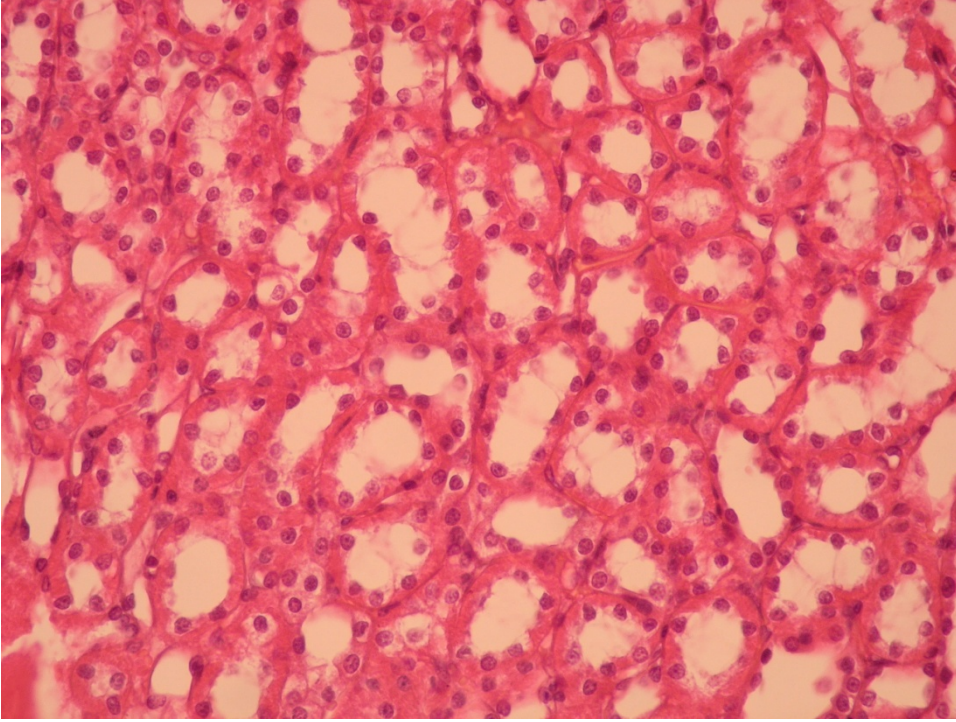
İstatistiksel karşılaştırmada ‘Mann-Whitney U’ testi kullanılmıştır

HİSTOLOJİK İNCELEME BULGULARI

Hematoksilen-Eosin Boyalı Böbrek Kesitlerinin İnceleme Bulguları

Çalışmamızda; SK grubundaki ratların H+E boyalı böbrek kesitleri ışık mikroskopunda incelendiğinde; tubüllerin normal yapıda olduğu gözlemlendi (Şekil 7).

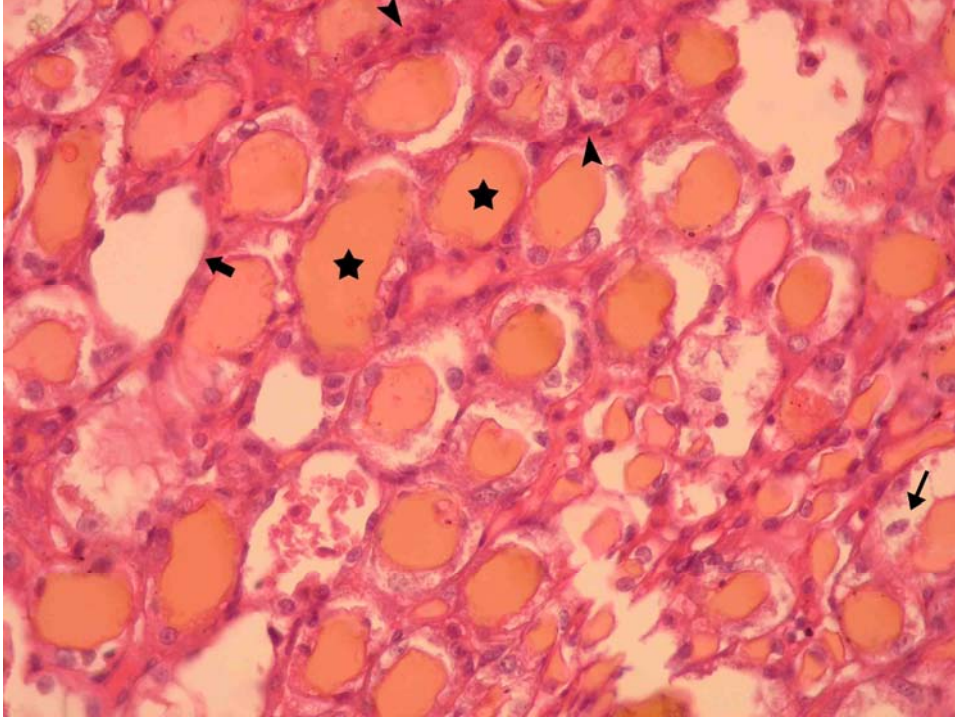
Hastalıklı kontrol grubundaki sıçanların H+E boyalı böbrek kesitleri ışık mikroskopunda incelendiğinde; en çarpıcı değişiklikler tubüllerde gözlenirken, glomerüllerde belirgin bir değişiklik görülmedi. Korteksteki proksimal tubüllerde nekrotik alanlara rastlandı.



Şekil 7. Sağlıklı kontrol grubuna ait böbreğinin histolojik görünümü; H+E, X400

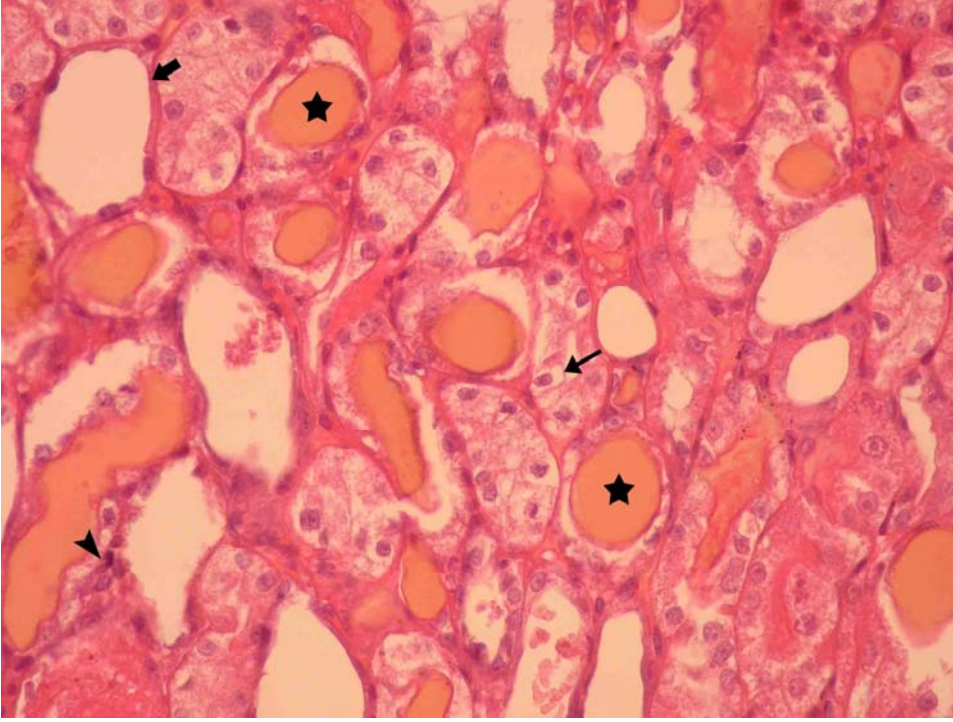
Distal tubülde tıkaç şeklinde dens proteinöz madde birikimi izlendi. Tubüllerde belirgin bir dilatasyon vardı. Proksimal tubül epitellerinde hidropik sitoplazmik şişme ve vakuolizasyon dikkati çekti. Aşırı genişleme sonucu bazı tubüllerde hücrelerin normal şekillerini kaybettiği ve yassı hücre haline dönüştüğü izlendi. Proksimal tubül hücrelerinin sitoplazma yoğunluğunu kaybettiği, yer yer lümen içerisine döküldükleri, tubül duvarında kalanların ise fırçamsı kenar yapılarının bozulduğu gözlemlendi (Şekil 8). Ayrıca tıkaç ve nekroz oluşumunun semikantitatif değerlendirilmesi sonucu HK grubunda SK grubuna göre anlamlı artmış tubüler nekroz ($p=0,00027$) ve tubüler tıkaç oluşumu ($p=0,000013$) izlendi (Tablo 6).

Orta doz C vitamini grubundaki ratların H+E boyalı böbrek kesitleri ışık mikroskopunda incelendiğinde; HK grubuna oranla proksimal tubül epitelinde nekroz ve distal tubülde proteinöz birikimlerde azalma görüldü.



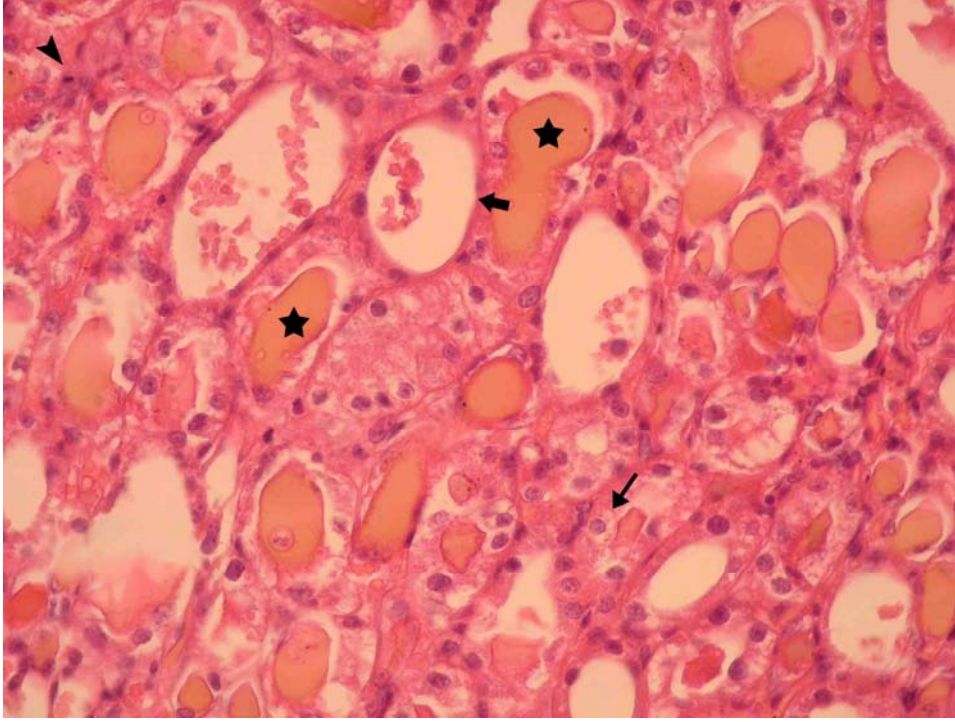
Şekil 8. Hastalıklı kontrol grubuna ait böbreğin histolojik görünümü
Yıldız: Tıkaç oluşumu, Okbaşı: Nekrotik alanlar, İnce ok: Hidropik sitoplazmik şişmeler, Kalın ok: Dilate olmuş tubüller; H+E, X400

Tübüler dilatasyonların ve tubül hücre hasarlarının hastalıklı kontrol deneklerine oranla daha az olduğu dikkati çekti. Tübüler hücrelerde hidropik sitoplazmik şişme ve vakuolizasyonlarda azalma görüldü (Şekil 9). ODCV grubunda SK grubuna göre anlamlı artmış tubüler nekroz ($p=0,0019$) ve tubüler tıkaç oluşumu ($p=0,00078$) izlendi. Ancak, HK grubuna göre yapılan değerlendirmede tubüler nekroz ($p=0,0054$) ve tubüler tıkaç oluşumlarının ($p=0,00049$) ODCV grubunda anlamlı düzeyde hafif gerçekleşmiş olduğu görüldü (Tablo 6).



Şekil 9. Orta doz C vitamini grubuna ait böbreğinin histolojik görünümü
Yıldız: Tıkaç oluşumu, Okbaşı: Nekrotik alanlar, İnce ok: Hidropik sitoplazmik şişmeler, Kalın ok: Dilate olmuş tubüller; H+E, X400

Yüksek doz C vitamini grubundaki sıçanların H+E boyalı böbrek kesitleri ışık mikroskopunda incelendiğinde; tubüler dilatasyon ve hidropik sitoplazmik şişme ve vakuolizasyonun HK grubuna göre belirgin şekilde azaldığı, histolojik yapının büyük oranda korunduğu gözlemlendi (Şekil 10). YDCV grubunda SK grubuna göre anlamlı artmış tubüler nekroz ($p=0,0068$) ve tubüler tıkaç oluşumu ($p=0,0068$) izlendi. Ancak, HK grubuna göre yapılan değerlendirmede tubüler nekroz ($p=0,011$) ve tubüler tıkaç oluşumlarının ($p=0,00016$) YDCV grubunda anlamlı düzeyde hafif gerçekleşmiş olduğu görüldü. ODCV grubuna göre yapılan karşılaştırmada tubüler tıkaç oluşumunun YDCV grubunda anlamlı ($p=0,029$), tubüler nekroz oluşumunun ise istatistiksel anlamlılık sınırında ve belirgin ($p=0,066$) düşük olarak gerçekleşmiş olduğu saptandı (Tablo 6).



Şekil 10. Yüksek doz C vitamini grubuna ait böbreğinin histolojik görünümü
Yıldız: Tıkaç oluşumu, Okbaşı: Nekrotik alanlar, İnce ok: Hidropik
sitoplazmik şişmeler, Kalın ok: Dilate olmuş tubüller; H+E, X400

Tablo 6. Kontrol ve deney gruplarına ait nekroz ve tıkaç oluşumunun semikantitatif değerlendirmesi

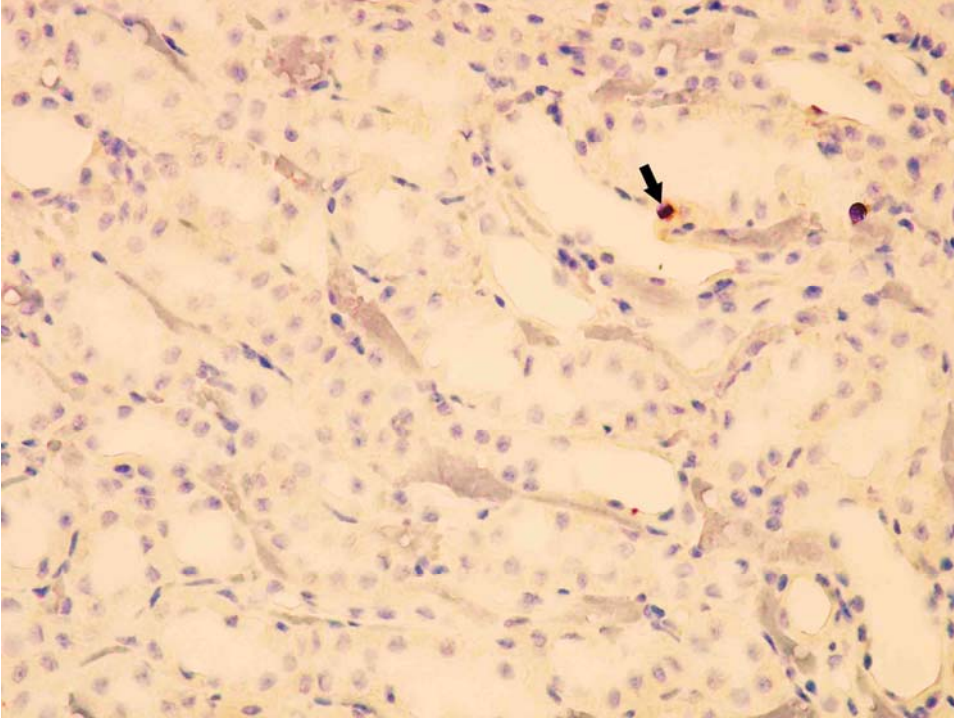
	SK	HK	p=	ODCV	p=	YDCV	p=
Nekroz	-	++	0,00027	+*	0,0019	±*	0,0068
Tıkaç oluşumu	-	++++	0,000013	++**	0,00078	+**/#	0,0068

HK: Hastalıklı kontrol; **ODCV:** Orta doz C vitamini; **SK:** Sağlıklı kontrol; **YDCV:** Yüksek doz C vitamini. Nekroz veya tıkaç oluşumu: yok (-), nadir (±), az(+), orta (++) , fazla (+++) , çok fazla (++++) İstatistiksel karşılaştırmada 'Ki-kare' testi kullanılmıştır. p değeri SK grubu ile gliserol uygulanan gruplar arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir. HK grubu ile C vitamini uygulanan grupların değerlerinin istatistiki karşılaştırmasında *=p<0.05, **p<0,0005; ODCV ve YDCV gruplarının değerlerinin istatistiki karşılaştırmasında #=p<0,029

İMMUNHİSTOKİMYASAL İNCELEME BULGULARI

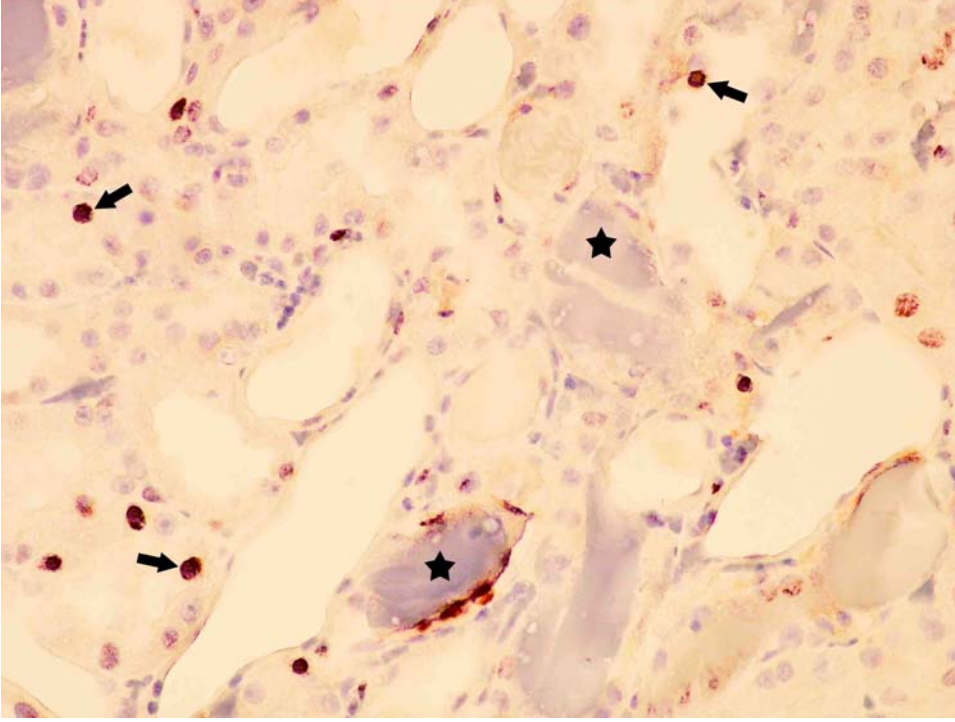
TUNEL (Apoptotik Hücre) Boyama Bulguları

Sağlıklı kontrol grubuna ait böbrek kesitlerinin apoptozisi göstermesi açısından TUNEL boyası yapıldıktan sonra gerçekleştirilen semikantitatif analizde tubül epitelyum hücrelerinde TUNEL reaktivitesinin oldukça az olduğu görüldü (Şekil 11).



**Şekil 11. Sağlıklı kontrol grubuna ait böbrek kesitinde TUNEL boyaması
Ok: TUNEL pozitif hücreler; TUNEL boyası, X400**

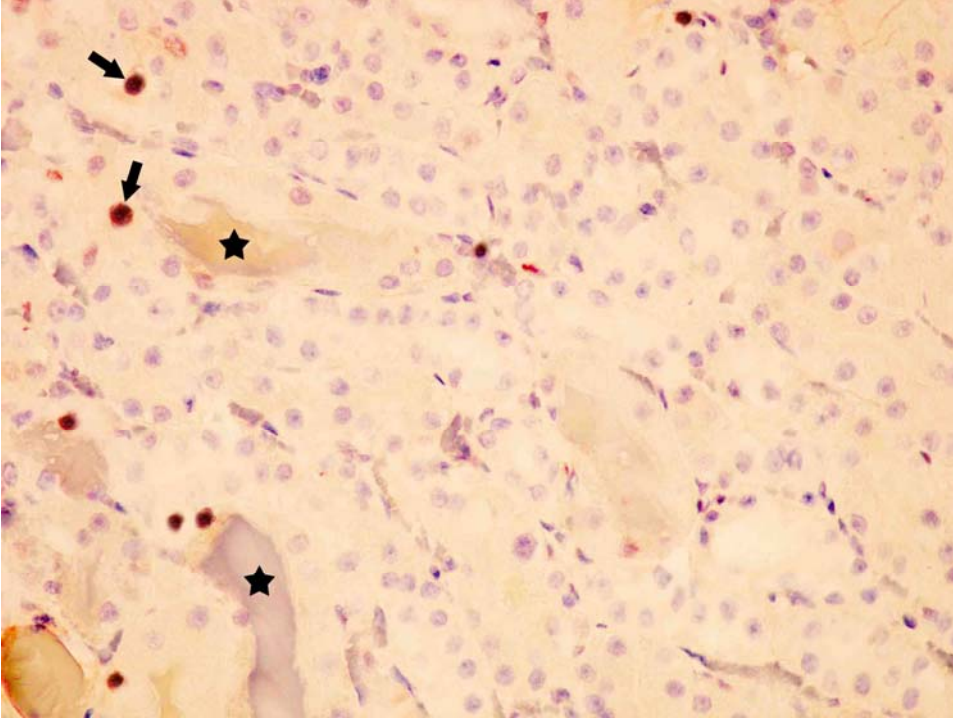
Hastalıklı kontrol grubuna ait böbrek kesitlerinin apoptozisi göstermesi açısından TUNEL boyası yapıldıktan sonra gerçekleştirilen semikantitatif analizde tubül epitel hücrelerinde TUNEL reaktivitesinin oldukça fazla olduğu saptandı (Şekil 12). HK grubuna ait TUNEL boyamanın semikantitatif inceleme sonuçları Tablo 7’de gösterilmiştir.



Şekil 12. Hastalıklı kontrol grubuna ait böbrek kesitinde TUNEL boyaması

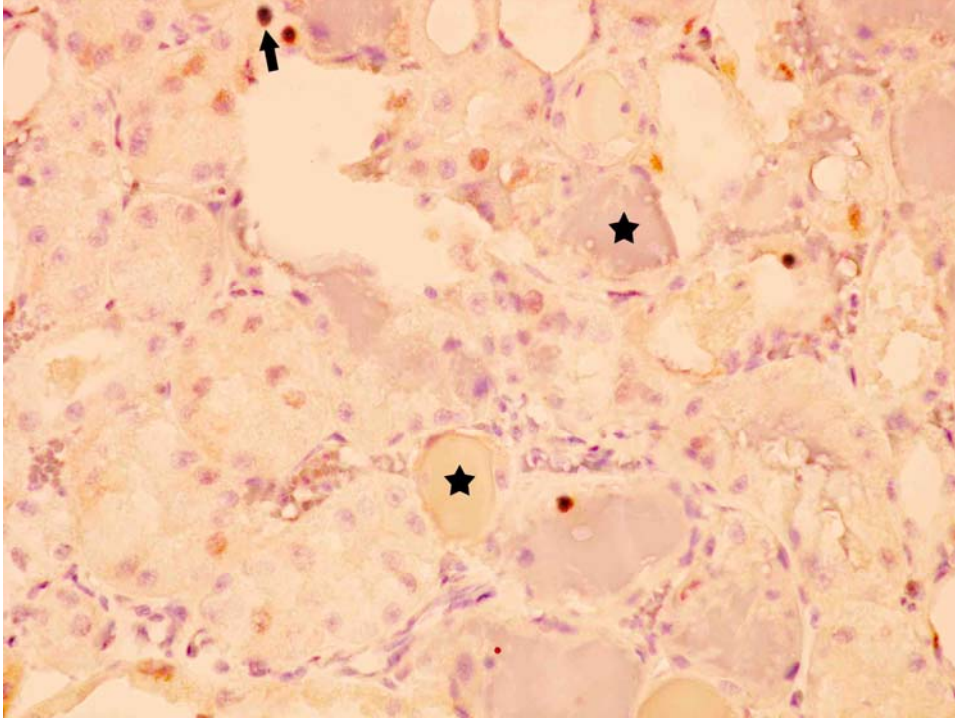
Ok: TUNEL pozitif hücreler, Yıldız: Tıkaç oluşumu; TUNEL boyası, X400

Orta doz C vitamini grubuna ait böbrek kesitlerinin apoptozisi göstermesi açısından TUNEL boyaması yapıldıktan sonra gerçekleştirilen semikantitatif analizinde, tubül epitel hücrelerindeki TUNEL reaktivitesinin hastalıklı kontrol grubuna göre belirgin azaldığı tespit edildi (Şekil 13). ODCV grubuna ait TUNEL boyamanın semikantitatif inceleme bulguları Tablo 7’de gösterilmiştir.



Şekil 13. Orta doz C vitamini grubuna ait böbrek kesitinde TUNEL boyaması
Ok: TUNEL pozitif hücreler, Yıldız: Tıkaç oluşumu; TUNEL boyası, X400

Yüksek doz C vitamini grubuna ait böbrek kesitlerinin apoptozisi göstermesi açısından TUNEL boyaması yapıldıktan sonra gerçekleştirilen semikantitatif analizinde, tubül epitel hücrelerindeki TUNEL reaktivitesinin hastalıklı kontrol grubuna göre oldukça azaldığı tespit edildi (Şekil 14). YDCV grubuna ait TUNEL boyamanın semikantitatif inceleme bulguları Tablo 7’de gösterilmiştir.



Şekil 14. Yüksek doz C vitamini grubuna ait böbrek kesitinde TUNEL boyaması Ok: TUNEL pozitif hücreler, Yıldız: Tıkaç oluşumu; TUNEL boyası, X400

Tablo 7. Kontrol ve deney gruplarına ait TUNEL pozitif (apoptotik) hücrelerin semikantitatif değerlendirmesi

	SK	HK	p=	ODCV	p=	YDCV	p=
Apoptotik Hücre sayısı	-	++++	0,000013	+++*	0,00027	++**/#	0,00027

HK: Hastalıklı kontrol; **ODCV:** Orta doz C vitamini; **SK:** Sağlıklı kontrol; **YDCV:** Yüksek doz C vitamini. Apoptotik hücre sayısı: yok (-), nadir (\pm), az(+), orta (++) , fazla (+++), çok fazla (++++). İstatistiksel karşılaştırmada 'Ki-kare' testi kullanılmıştır. p değeri SK grubu ile gliserol uygulanan gruplar arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir. HK grubu ile C vitamini uygulanan grupların değerlerinin istatistiki karşılaştırmasında *=p<0,05, **p<0,0005; ODCV ve YDCV gruplarının değerlerinin istatistiki karşılaştırmasında #=p<0,025

GLİSEROL UYGULANAN GRUPLARDA BAZAL VERİLER ARASINDAKİ ÇOKLU İLİŞKİLER

GFR Değeri ile Diğer Bazal Veriler Arasındaki Çoklu İlişkiler

Gliserol uygulanan tüm gruplardaki (HK, ODCV ve YDCV grupları) verilerin birlikte alınarak yapılan değerlendirmede GFR değeri ile, tubüler hücre nekrozu (-r=0,581; p=0,0008), tubuler tıkaç oluşumu (-r=0,575; p=0,0009), tubüler apoptotik hücre varlığı (-r=0,528; p=0,003), serum kreatinin (-r=0,512; p=0,004), serum potasyum (-r=0,462;

p=0,009), ve serum fosforu (-r=0,405; p=0,029) arasında negatif doğrusal ilişki saptandı (Tablo 8).

Tablo 8. Gliserol uygulanan gruplarda kreatinin klerensi değeri ile diğer bazal veriler arasındaki çoklu ilişkiler

Veriler	r=	p=*
Tübüler hücre nekrozu	-0,581	0,0008
Tübüler tıkaç oluşumu	-0,575	0,0009
Tübüler apoptotik hücre varlığı	-0,528	0,003
Serum kreatinin	-0,512	0,004
Serum potasyum	-0,462	0,009
Serum fosforu	-0,405	0,029

İstatistiksel analiz: *=kreatinin klerensi değeri ile diğer parametrik veriler arasındaki çoklu ilişki araştırılmasında 'Pearson' korelasyon testi kullanıldı.

Tübüler Hücre Nekrozu ile Diğer Bazal Veriler Arasındaki Çoklu İlişkiler

Gliserol uygulanan tüm gruplardaki (HK, ODCV ve YDCV grupları) verilerin birlikte alınmasıyla yapılan değerlendirmede tübüler hücre nekrozu ile, tübüler apoptotik hücre varlığı (r=0,889; p<0,000001), tübüler tıkaç oluşumu (r=0,816; p<0,000001), serum MDA düzeyi (r=0,547; p=0,002) ve serum kreatinin değeri (r=0,404; p=0,03) pozitif; GFR değeri arasında (-r=0,581; p=0,0008) negatif doğrusal ilişki saptandı (Tablo 9).

Tablo 9. Gliserol uygulanan gruplarda tübüler hücre nekrozu ile diğer bazal veriler arasındaki çoklu ilişkiler

Veriler	r=	p=*
Tübüler apoptotik hücre varlığı	0,889	<0,000001
Tübüler tıkaç oluşumu	0,816	<0,000001
Kreatinin klerensi	-0,581	0,0008
Serum Malonil Dialdehit düzeyi	0,547	0,002
Serum kreatinin	0,404	0,03

*= Tübüler hücre nekrozu ile diğer parametrik veriler arasındaki çoklu ilişki araştırılmasında Spearman korelasyon testi kullanıldı.

Tubüler Tıkaç Oluşumu ile Diğer Bazal Veriler Arasındaki Çoklu İlişkiler

Gliserol uygulanan tüm gruplardaki (HK, ODCV ve YDCV grupları) verileri birlikte alınarak yapılan değerlendirmede tubüler tıkaç oluşumu ile, tubüler apoptotik hücre varlığı ($r=0,906$; $p<0,000001$), tubüler hücre nekrozu ($r=0,816$; $p<0,000001$), serum kreatinin değeri ($r=0,384$; $p=0,036$) pozitif doğrusal; GFR değeri arasında ($-r=0.575$; $p=0,0009$) negatif doğrusal ilişki saptandı (Tablo 10). Bu ilişkilerin dışında tubüler tıkaç oluşumu ile serum MDA düzeyi arasında serum MDA düzeyi ($r=0,324$; $p=0,08$) (Şekil 15), istatistiki anlamlılık sınırında pozitif doğrusal ilişki olduğu gözlemlendi.

Tablo 10. Gliserol uygulanan gruplarda tubüler tıkaç oluşumu ile diğer bazal veriler arasındaki çoklu ilişkiler

Veriler	r=	p=*
Tubüler apoptotik hücre varlığı	0,906	<0,000001
Tubüler hücre nekrozu	0,816	<0,000001
Kreatinin klerensi	-0,575	0,0009
Serum kreatinin	0,384	0,036
Serum Malonil dialdehit düzeyi	0,324	0,08

*= Tubüler tıkaç oluşumu ile diğer parametrik veriler arasındaki çoklu ilişki araştırılmasında 'Spearman' korelasyon testi kullanıldı.

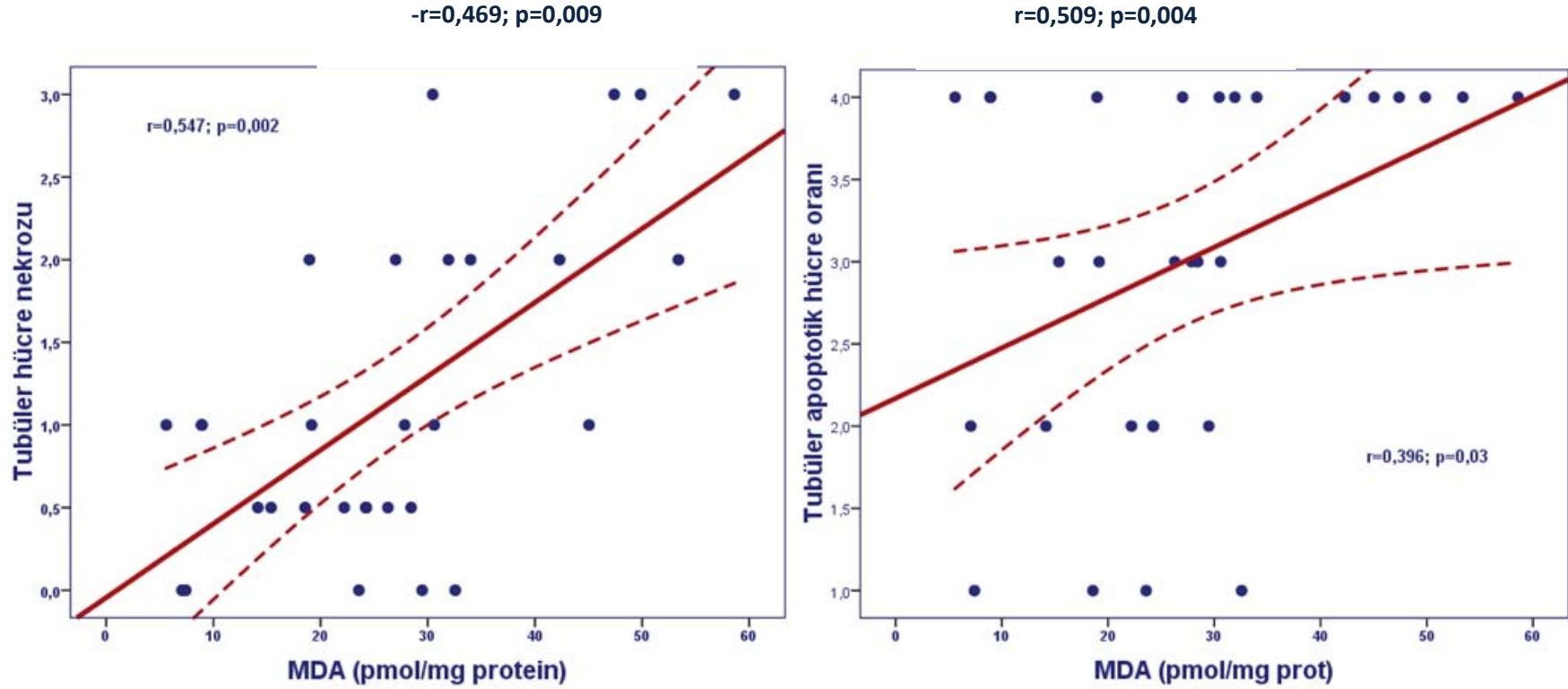
Tubüler Apoptotik Hücre Varlığı ile Diğer Bazal Veriler Arasındaki Çoklu İlişkiler

Gliserol uygulanan tüm gruplardaki (HK, ODCV ve YDCV grupları) verileri birlikte alınarak yapılan değerlendirmede tubüler apoptotik hücre varlığı ile, tubüler tıkaç oluşumu ($r=0,906$; $p<0,000001$), tubüler hücre nekrozu ($r=0,889$; $p<0,000001$), MDA düzeyi ($r=0,395$; $p=0,003$) (Şekil 15), serum kreatinin değeri ($r=0,364$; $p=0,048$) pozitif doğrusal; GFR değeri arasında ($-r=0.528$; $p=0,003$) negatif doğrusal ilişki saptandı (Tablo 11).

Tablo 11. Gliserol uygulanan gruplarda tubüler apoptotik hücre varlığı ile diğer bazal veriler arasındaki çoklu ilişkiler

Veriler	r=	p=*
Tübüler tıkaç oluşumu	0,906	<0,000001
Tübüler hücre nekrozu	0,889	<0,000001
Kreatinin klerensi	-0,528	0,003
Serum MDA	0,395	0,03
Serum kreatinin	0,364	0,048

*= Tübüler tıkaç oluşumu ile diğer parametrik veriler arasındaki çoklu ilişki araştırılmasında 'Spearman' korelasyon testi kullanıldı.



Şekil 15: Gliserol uygulanan gruplarda tubüler hücre nekrozu ile GFR ($\mu\text{l}/\text{dk}$) ve serum MDA (pmol/mg protein) arasındaki ilişki
 GFR: Endojenik kreatininle hesaplanan glomerüler filtrasyon hızı; MDA: malonil dialdehid

Tablo 12. Sağlıklı kontrol grubunun demografik özellikleri ve laboratuvar bulguları

Parametre	İlk kilo (gr)	Son kilo (gr)	Üre (mg/dl)	sKr (mg/dl)	T. protein (gr/dl)	Alb (gr/dl)	Na ⁺ (mmol/L)	K ⁺ (mmol/L)	Ca ⁺² (mg/dl)	P (mg/dl)	BK (/mm ³)	Hb (gr/dl)	PLT (/mm ³)
1	453	470	29	0,4	5,9	1,3	140	6,4	9,8	7,1	3.800	12,8	710.000
2	443	427	30	0,5	6,6	1,4	145	6,0	10,0	9,5	12.600	17,2	898.000
3	376	374	37	0,4	6,0	1,2	143	5,6	9,5	7,5	1.400	12,4	764.000
4	360	360	37	0,4	5,8	1,3	142	5,7	9,5	7,8	7.200	15,4	924.000
5	382	378	34	0,4	5,0	1,4	141	6,2	9,7	7,7	13.200	15,6	868.000
6	357	368	36	0,6	5,3	1,1	142	5,4	9,3	7,6	15.500	15,4	924.000
7	402	429	33	0,4	5,5	1,2	143	5,5	9,2	7,0	2.200	13,2	686.000
8	409	399	33	0,6	5,7	1,5	140	5,1	9,4	8,5	5.000	15,4	922.000
9	461	456	30	0,5	6,2	1,4	142	5,4	9,5	6,9	3.200	13,2	378.000

Alb: Albümin; **BK:** Beyaz küre; **Ca⁺²:** Kalsiyum; **Hb:** Hemogloblin; **P:** Fosfor; **PLT:** Platelet; **K⁺:** Potasyum; **sKr:** serum kreatinin; **Na⁺:** Sodyum; **T. protein:** Total protein.

Tablo 12. (Devam) Sağlıklı kontrol grubunun demografik özellikleri ve laboratuvar bulguları

Parametre	MDA (pmol/mg)	KAT (mU/ml)	SOD (U/ml)	NAG/uKr (IU/ μ mol)	İdrar pH	İdrar miktarı (ml)	GFR (μ l/dk)	UAA/uKr (μ g/ μ mol)	TUNEL
1	18,3	0,42	1,25	0,5	8,7	7,5	2330,5	2,62	\pm
2	38,1	9,94	3,71	2,0	9,2	3,5	761,4	0,89	\pm
3	5,75	11,82	5,15	2,3	7,9	3,0	843,9	0,76	\pm
4	1,38	2,15	0,88	1,7	8,4	1,8	367,8	1,43	-
5	2,06	5,02	1,06	1,2	9,8	1,7	625,5	0,32	\pm
6	1,43	0,11	8,10	1,4	9,4	5,5	865,0	4,17	-
7	1,77	6,09	3,73	1,0	9,1	7,0	1213,3	1,33	+
8	24,66	0,07	3,21	1,3	8,2	18,0	1258,3	6,83	+
9	23,58	7,54	4,77	8,0	9,2	4,0	658,3	1,94	\pm

GFR: Glomerüler filtrasyon hızı; **KAT:** Katalaz; **MDA:** Malonil dialdehit; **NAG/uKr:** N-asetil glukozaminidaz/Üriner kreatinin oranı; **SOD:** Süperoksit dismutaz; **UAA/uKr:** Üriner albumin atılımı/Üriner kreatinin atılımına oranı. TUNEL ile gösterilen apoptotik hücre sayısı: yok (-), nadir (\pm), az(+), orta (++) , fazla (+++), çok fazla (++++).

Tablo 13. Hastalıklı kontrol grubunun demografik özellikleri ve laboratuvar bulguları

Parametre	İlk kilo (gr)	Son kilo (gr)	Üre (mg/dl)	Kreatinin (mg/dl)	T. protein (gr/dl)	Alb (gr/dl)	Na ⁺ (mmol/L)	K ⁺ (mmol/L)	Ca ⁺² (mg/dl)	P (mg/dl)	BK (/mm ³)	Hb (gr/dl)	PLT (/mm ³)
1	376	376	616	8,3	4,5	0,9	130	7,0	10,6	18,1	4.600	12,8	732.000
2	430	409	499	8,1	5,3	1,0	137	7,0	9,2	16,5	13.400	13,2	970.000
3	447	423	455	8,3	5,2	0,9	135	8,4	9,5	40,9	15.000	13,4	834.000
4	456	452	475	6,5	5,5	1,2	136	7,3	9,6	11,0	4.600	12,0	942.000
5	373	362	457	7,1	5,1	1,0	137	5,2	9,7	13,6	10.000	11,8	742.000
6	348	353	601	7,8	5,3	1,2	138	7,0	9,6	18,5	5.400	12,8	1.146.000
7	341	335	666	7,3	4,9	1,1	133	6,7	9,5	28,3	15.400	11,6	302.000
8	447	439	628	6,7	4,6	1,1	129	7,1	8,2	17,7	8.800	9,2	722.000
9	422	415	511	7,0	5,0	1,3	134	6,9	13,5	24,2	11.100	15,0	918.000
10	365	364	458	7,4	5,8	1,1	140	6,2	9,3	12,1	12.800	12,0	854.000

Alb: Albümin; **BK:** Beyaz küre; **Ca⁺²:** Kalsiyum; **Hb:** Hemoglobin; **P:** Fosfor; **PLT:** Platelet; **K⁺:** Potasyum; **sKr:** serum kreatinin; **Na⁺:** Sodyum; **T. protein:** Total protein.

Tablo 13. (Devam) Hastalıklı kontrol grubunun demografik özellikleri ve laboratuvar bulguları

Parametre	MDA ($\mu\text{mol/mg}$)	KAT (mU/ml)	SOD (U/ml)	NAG/uKr ($\text{IU}/\mu\text{mol}$)	İdrar pH	İdrar miktarı (ml)	GFR ($\mu\text{l/dk}$)	UAA/uKr ($\mu\text{g}/\mu\text{mol}$)	TUNEL	NEKROZ	TIKAÇ
1	47,40	-	1,02	-	-	0	0	-	++++	+++	++++
2	49,86	0,86	3,78	-	-	0	0	-	++++	+++	++++
3	30,46	2,52	3,13	-	-	0	0	-	++++	+++	++++
4	5,60	1,19	0,74	2,57	8,0	8,0	15,6	15,4	++++	+	++++
5	58,60	2,83	0,53	3,91	9,0	5,5	16,9	13,5	++++	+++	++++
6	53,39	7,28	0,99	16,04	8,1	1,0	0,7	65,8	++++	++	++++
7	42,29	-	2,57	6,44	9,2	4,0	8,0	11,8	++++	++	++++
8	45,04	1,07	1,52	1,29	9,2	1,5	22,3	8,8	++++	+	++++
9	8,94	1,46	0,47	218,03	9,6	1,7	0,7	34,8	++++	+	++++
10	8,89	0,15	0,99	-	-	0	0	-	++++	+	++++

GFR: Glomerüler filtrasyon hızı; **KAT:** Katalaz; **MDA:** Malonil dialdehit; **NAG/uKr:** N-asetil glukozaminidaz/Üriner kreatinin oranı; **SOD:** Süperoksit dismutaz; **UAA/uKr:** Üriner albumin atılımı/Üriner kreatinin atılımına oranı. TUNEL ile gösterilen apoptotik hücre sayısı: yok (-), nadir (\pm), az(+), orta (++) , fazla (+++), çok fazla (++++).

Tablo 14. Orta doz C vitamini grubunun demografik özellikleri ve laboratuvar bulguları

Parametre	İlk kilo (gr)	Son kilo (gr)	Üre (mg/dl)	sKr (mg/dl)	T. protein (gr/dl)	Alb (gr/dl)	Na ⁺ (mmol/L)	K ⁺ (mmol/L)	Ca ⁺² (mg/dl)	P (mg/dl)	BK (/mm ³)	Hb (gr/dl)	PLT (/mm ³)
1	440	425	539	8,2	5,4	1,1	133	8,2	9,6	17,0	9.600	10,6	1.010.000
2	438	425	441	7,9	5,2	1,2	136	6,5	9,6	12,5	12.200	13,6	724.000
3	337	322	577	7,1	5,6	1,3	136	6,6	9,6	17,7	10.600	12,0	776.000
4	335	337	655	6,7	5,0	1,0	130	8,3	9,5	11,3	13.200	14,4	830.000
5	422	439	599	7,4	5,1	1,1	136	8,1	10,5	17,2	2.800	10,4	806.000
6	435	418	588	7,6	5,2	1,2	135	7,2	9,5	19,4	17.200	11,2	872.000
7	423	412	568	7,9	5,7	1,2	135	7,1	9,3	15,9	5.200	11,0	952.000
8	336	313	370	5,0	5,3	1,0	139	5,1	10,5	11,0	4.400	12,2	922.000
9	430	427	564	5,5	4,3	0,9	128	6,8	10,8	24,9	11.800	15,8	938.000
10	450	443	330	4,5	4,7	1,0	129	8,8	10,1	-	9.200	13,4	302.000

Alb: Albümin; **BK:** Beyaz küre; **Ca⁺²:** Kalsiyum; **Hb:** Hemoglobin; **P:** Fosfor; **PLT:** Platelet; **K⁺:** Potasyum; **sKr:** serum kreatinin; **Na⁺:** Sodyum; **T. protein:** Total protein.

Tablo 14. (Devam) Orta doz C vitamini grubunun demografik özellikleri ve laboratuvar bulguları

Parametre	MDA (pmol/mg)	KAT (mU/ml)	SOD (U/ml)	NAG/uKr (IU/ μ mol)	İdrar pH	İdrar miktarı (ml)	GFR (μ l/dk)	UAA/uKr (μ g/ μ mol)	TUNEL	NEKROZ	TIKAÇ
1	18,96	2,97	1,27	-	8,4	3,0	3,4	7,23	++++	++	+++
2	31,93	3,58	1,09	-	-	0	0	-	++++	++	+++
3	15,38	0,22	4,73	13,4	6,4	5,0	12,2	15,99	+++	\pm	++
4	33,99	0,53	0,48		8,9	1,6	4,6	8,60	++++	++	+++
5	7,07	0,13	0,90	16,1	8,1	2,5	9,0	9,91	++	-	\pm
6	28,44	4,92	0,80	2,4	8,8	5,7	28,8	3,67	+++	\pm	++
7	24,27	4,01	0,88	2,4	9,2	4,4	10,3	20,78	++	\pm	+
8	29,47	4,81	1,07	13,1	9,0	11,6	34,5	20,97	++	-	\pm
9	27,01	-	3,50	-	9,4	1,0	0,4	26,00	++++	++	+++
10	14,15	-	4,79	-	-	0	0	-	++	\pm	++

GFR: Glomerüler filtrasyon hızı; **KAT:** Katalaz; **MDA:** Malonil dialdehit; **NAG/uKr:** N-asetil glukozaminidaz/Üriner kreatinin oranı; **SOD:** Süperoksit dismutaz; **UAA/uKr:** Üriner albumin atılımı/Üriner kreatinin atılımına oranı. TUNEL ile gösterilen apoptotik hücre sayısı: yok (-), nadir (\pm), az(+), orta (++) , fazla (+++), çok fazla (++++).

Tablo 15. Yüksek doz C vitamini grubunun demografik özellikleri ve laboratuvar bulguları

Parametre	İlk kilo (gr)	Son kilo (gr)	Üre (mg/dl)	sKr (mg/dl)	T. protein (gr/dl)	Alb (gr/dl)	Na ⁺ (mmol/L)	K ⁺ (mmol/L)	Ca ⁺² (mg/dl)	P (mg/dl)	BK (/mm ³)	Hb (gr/dl)	PLT (/mm ³)
1	431	422	499	7,6	4,9	1,0	134	6,3	9,2	18,9	8.800	8,0	566.000
2	387	363	657	7,9	4,9	1,1	132	6,7	9,1	22,0	15.000	13,4	678.000
3	483	472	539	7,3	5,4	1,2	138	8,3	10,2	18,6	7.800	13,2	1.198.000
4	370	382	534	6,54	5,3	1,0	134	8,8	9,3	11,0	6.200	11,4	860.000
5	448	425	473	7,0	4,9	1,1	132	5,5	9,4	10,6	5.000	10,0	654.000
6	325	305	412	4,56	5,0	1,2	136	5,7	9,4	9,3	-	-	-
7	342	353	547	6,35	4,4	1,1	134	7,0	8,8	19,1	12.000	12,8	844.000
8	463	454	528	6,53	5,4	1,2	135	6,8	10,1	11,1	10.400	10,2	-
9	442	401	306	4,33	5,4	1,3	137	4,8	10,3	9,7	5.200	10,4	590.000
10	421	403	353	5,87	4,5	0,9	118	8,9	11,0	25,5	9.200	13,0	878.000

Alb: Albümin; **BK:** Beyaz küre; **Ca⁺²:** Kalsiyum; **Hb:** Hemoglobin; **P:** Fosfor; **PLT:** Platelet; **K⁺:** Potasyum; **sKr:** serum kreatinin; **Na⁺:** Sodyum; **T. protein:** Total protein.

Tablo 15. (Devam) Yüksek doz C vitamini grubunun demografik özellikleri ve laboratuvar bulguları

Parametre	MDA (pmol/mg)	KAT (mU/ml)	SOD (U/ml)	NAG/uKr (IU/ μ mol)	İdrar pH	İdrar miktarı (ml)	GFR (μ l/dk)	UAA/uKr (μ g/ μ mol)	TUNEL	NEKROZ	TIKAÇ
1	30,60	-	3,87	10,1	8,5	8,0	16,3	24,2	+++	+	++
2	23,58	3,79	1,52	19,9	7,6	15,2	36,5	27,4	+	-	-
3	32,57	2,21	2,61	-	8,7	15,0	34,7	9,8	+	-	-
4	24,22	-	0,84	-	7,8	3,0	7,8	18,0	++	\pm	+
5	7,42	-	1,18	11,6	8,6	10,7	23,5	7,2	+	-	+
6	27,85	2,77	0,86	1,2	8,8	12,0	89,1	2,7	+++	+	-
7	26,28	1,40	0,93	9,4	9,1	2,9	4,6	10,4	+++	\pm	++
8	18,57	5,55	1,68	11,1	9,1	3,7	12,8	22,0	+	\pm	+
9	22,20	1,03	2,64	-	8,8	16,0	64,6	2,1	++	\pm	+
10	19,16	6,88	6,36	-	9,3	1,5	6,2	6,8	+++	+	++

GFR: Glomerüler filtrasyon hızı; **KAT:** Katalaz; **MDA:** Malonil dialdehit; **NAG/uKr:** N-asetil glukozaminidaz/Üriner kreatinin oranı; **SOD:** Süperoksit dismutaz; **UAA/uKr:** Üriner albumin atılımı/Üriner kreatinin atılımına oranı. TUNEL ile gösterilen apoptotik hücre sayısı: yok (-), nadir (\pm), az(+), orta (++) , fazla (+++), çok fazla (++++).

TARTIŞMA

Travmatik kas dokusu hasarına bağlı gelişen MABY savaşlarda ve deprem gibi doğal felaketler sırasında epidemik düzeylere ulaşabilmektedir (4, 5, 45, 48, 56). Geçmişteki deprem kayıtları incelendiğinde ülkemizin oldukça yüksek sismisiteye sahip olduğu görölmektedir. Ülkemizde 1900–1999 yılları arasında 131 adet hasar yapan deprem meydana gelmiş ve bu depremler 398.331 binanın yıkılmasına veya ağır hasara uğramasına ve 65.662 insanın ölmesine neden olmuştur. Bu rakamlara göre Türkiye’de ortalama her 8 ayda bir hasar yapan deprem oluşmakta ve bu depremler ortalama olarak her yıl 4.024 binanın yıkılmasına ve bine yakın insanımızın ölmesine neden olmaktadır (51). Gölcük’te 1999 yılında gerçekleşen Marmara depremi, 16 milyon insanımızın yaşadığı bölgede etkili olmuştur (4). Bu depremde çeşitli hastanelere yatırılan yaklaşık 24.000 hastanın 639’unda (% 12) MABY gelişmiş, 477 (% 9) vakaya akut diyaliz tedavisi uygulanmak zorunda kalmıştır (4). Yakın zamanda Kuzey Anadolu fayında yıkıcı bir deprem beklentisi vardır. Bu bağlamda, ülkemizin en büyük sanayi, ticaret ve kültür kenti olan İstanbul’da 5 yıl içerisinde % 32±12 ve 25 yıl içerisinde % 62±15 lik büyük deprem riskinin söz konusu olduğu bildirilmektedir (52). Büyük doğal felaketler sırasında, Marmara depreminde de görüldüğu üzere sağalıtım hizmetlerinin sunulmasında büyük zorluklar yaşanmaktadır (4, 50). Hasar gören, yıkılan binalar ve lojistik yetersizlikler nedeni ile hasta takip-tedavisi ile diyaliz hizmetlerinde büyük aksamalar yaşanabilmekte, bu durum göçük altından kurtarılan ve diyaliz tedavisi gerektirecek ağırlıkta nefron fonksiyon bozukluğu gelişmiş hastaların sağkalımını olumsuz yönde etkilemektedir (4, 41, 42, 45). Bu nedenle, özellikle ülkemiz gibi göçük altında kalma olayları ve deprem gibi

doğal felaketlerin sık görüldüğü yerlerde MABY gelişimini ve diyaliz tedavisi ihtiyacını azaltıcı tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi toplum sağlığı açısından öncelik kazanmaktadır.

Miyoglobürik akut böbrek yetmezliğinin araştırılması amacıyla aralarında; özel sıkıştırıcı düzeneğe kas üzerine bası yapılması, atlardan elde edilen miyoglobinin iv yoldan ratlara uygulanması ve ratlardan elde edilen kas dokusunun izotonik ile homojenize edilerek sağlanan süpernatanın femoral venden injeksiyonu gibi deneysel yöntemler tanımlanmıştır (98-102). Günümüzde MABY geliştirilmesi için en sık kullanılan yöntem ratların bilateral alt ekstremitesine gliserol injeksiyonu ile ATN geliştirilmesi olup bu yöntem insanda gelişen MABY modeline eşdeğer olarak kabul edilmiştir (5, 22, 103). Gliserol uygulanan ratlarda, SK grubuna göre serumda üre ve kreatinin değerlerinde anlamlı yükseklik, GFR değerlerinde anlamlı düşüklük gelişmesi, histopatolojik incelemede tübül hücrelerde nekroz ve apoptotik hücre artışı, tübül lümeninde tıkaç varlığı deneysel modelin başarılı olduğunu göstermiştir (5, 22, 97).

Çalışmamızda, gliserol uygulanan tüm ratların verileri birlikte alınarak yapılan çoklu ilişki analizinde endojenik kreatininle belirlenen GFR'nin, tübül hücre nekrozu ve TUNEL yöntemi ile saptanan tübül apoptotik hücre sayısı, lipid peroksidasyonu-oksidatif stres artışının göstergesi olan MDA düzeyleri ile ilişkilili bulunmuştur. Ayrıca, HK grubunda MDA düzeyi SK grubuna göre 2,7 kat ve istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur. Bu iki bulgumuz, MABY gelişimine oksidatif stresin önemli rol aldığını düşündürmüştür. Travmatik kas hasarı sonucu gelişen iskemi, Na/K ATPaz pompa inhibisyonu ile sodyumun kas hücresi dışına çıkarılmasına ve hücre içi ödem gelişimine yol açar. Hasarlanmış kaslarda on litreyi aşan sıvı birikimi oluşabilir (53, 54). Sıvının hasarlı hücrelerde depolanması gelişen hipovolemiye bağlı böbrek kan akımı azalması, MABY gelişimini kolaylaştıran önemli bir faktör olarak ortaya çıkar. Hipovolemiye ikincil renin-anjiyotensin sistemi, sempatik sinir sistemi aktivasyonu ve vazopressin artışı ile böbrek arterlerinde vazokonstriksiyon gelişir (55). Gelişen iskeminin etkisi ile bütünlüğü bozulan kas hücresinin, toksik sitoplazmik içeriğinin dolaşıma geçişinin uyardığı endotelin, tromboksan A2, tümör nekrozitan faktör α , F-2 izoprostan artışı; ayrıca renal mikro-sirkülasyonda vazodilatatör olarak etkili olan NO'nun miyoglobin tarafından yakalanarak biyolojik aktivitesinin azalmasının da renal vazokonstriksiyonun şiddetlenmesine yol açarak tübül hasar gelişimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (6, 57). Çalışmamızdaki bulguya benzer şekilde, giderek artan sayıdaki veriler oksidatif stres artışının da MABY patogeneğinde önemli rol oynadığını düşündürmektedir

(22, 35, 59, 60, 97). Renal hipoperfüzyon/vazokonstriksiyon sırasında ATP hipoksantine dönüşmekte, O_2 varlığında bu hipoksantin'in ksantin oksidaz katalizörlüğünde hipoksantine çevrilmesi ile O_2^- üretilmektedir (8). Öte yandan, kas hücre hasarı ile dolaşıma geçen miyoglobin, molekül büyüklüğü nedeni ile kolayca glomerüler filtrasyona uğrar ve tubüler sisteme ulaşır (5). Burada porfirin halkası hızla katabolize olur böylece serbest demir açığa çıkar (9, 10). Serbest demir, 'Haber-Weiss' ve 'Fenton' reaksiyonlarına girerek, ROP'lerden olan H_2O_2 ve O_2^- ve OH^- oluşmasına yol açar (9, 10). OH^- 'in çoklu doymamış yağ asitlerinden H^+ 'i alması ile lipid peroksidasyonu başlar (10). Tüm bu reaksiyonların ek olarak miyoglobinin kendisi de direk olarak tubüler hücre düzeyinde lipid peroksidasyon reaksiyonlarını tetikler (95). Lipid peroksitlerin birikimi ile ağır tubüler hücre hasarı ve ABY'ye ulaşabilen ağır fonksiyon bozukluğu gelişebilir (10).

Rabdomiyoliz çizgili kas hasarı sonrası elektrolit, miyoglobin ve diğer sarkoplazmik proteinlerin dolaşıma dağılımlarına verilen addır (55). Rabdomiyoliz ABY'nin temel nedenlerinden bir tanesidir ve yakın zamanda yapılan çalışmalar patofizyolojinin daha net anlaşılmasını sağlamıştır. Renal yetersizlik hipovolemi, oksidatif strese bağlı tubüler hasar, renal vazokonstriksiyon ve tubüler obstrüksiyona bağlı gelişir (57).

C vitamini'nin oksidatif doku hasarına karşı koruyucu etkileri çeşitli deneysel modellerde araştırılmıştır (17-21). Ratlarda parasetamole, arseniğe, sisplatine ve vankomisine bağlı nefrotoksite modellerinde (17-20); kobaylarda gentamisine bağlı nefrotoksite C vitamini'nin oksidatif hasarı önleyerek nefron fonksiyonunu koruyucu etkileri gösterilmiştir. C vitamini suda eriyen ve biyolojik sıvılarda bulunan güçlü bir antioksidandır (104-106). Dokularda bir enzimin katalitik aracılığı olmadan da kolayca dehidroaskorbik aside oksitlenir, böylelikle iki H^+ serbest kalır. Bu özelliği nedeniyle C vitamini indirgeyici özellik gösterir. Dehidro askorbik asit, ortamdan iki H^+ alarak hızla C vitaminine (askorbik aside) indirgenebilir (14). C vitamini'nin ROR ve RNP ile direk reaksiyona girerek zararlı etkilerini ve oksidatif doku hasarlarını azalttığı gösterilmiştir (104-106). Lipid peroksidasyon reaksiyonunu başlatabilme özelliği bilinen OH^- 'in yanı sıra O_2^- , $1\Delta gO_2$, peroksil radikal, nitrojen peroksit; ayrıca hipoklorik asit, ozon, nitroksit ve $ONOO^-$ 'de C vitaminin hedefidir (104-106). Bu yolla C vitamini serbest radikal zinciri reaksiyonlarını kırar, antioksidan enzimlerin tüketimini azaltır, biyolojik önemi olan lipid, protein, nükleik asit gibi molekülleri oksidatif hasardan korur.

Çalışmamızda, C vitamini uygulanan ratlarda HK grubuna göre böbrek hasarının daha düşük düzeyde gerçekleşmiş olduğu gözlenmiştir. Yüksek doz C vitamini uygulanan ratlarda GFR değerinin HK grubuna göre anlamlı yüksek olduğu saptanmıştır. Gerek orta gerek yüksek doz C vitamini uygulanan ratlarda istatistiki anlamlılık düzeyine ulaşmamakla birlikte serumda kreatinin, idrarda UAA/uKr ve NAG/uKr oranlarının HK grubu verilerine göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu biyokimyasal göstergelerin yanısıra, C vitamini uygulanan ratlarda tübül hücre nekrozu, apoptotik tübül hücre varlığı ve tübül tıkaç gelişiminin HK grubuna göre anlamlı derecede daha az oranda geliştiği görülmüştür. MABY gelişiminde önemli rol aldığını belirlediğimiz oksidatif hasar ürünü MDA düzeylerinin HK grubunda SK grubuna göre anlamlı artmış olmasına rağmen orta ve yüksek doz C vitamini uygulanan ratlarda MDA düzeylerinin SK grubundan istatistiksel farklılık göstermemesi, benzer şekilde antioksidan savunma sisteminin önemli bir ögesi olan SOD düzeyleri HK grubunda SK grubuna göre anlamlı olarak düşük olmasına karşın C vitamini uygulanan ratlarda istatistiksel olarak SK grubu ile benzer olması, C vitamini'nin direk antioksidan özellikleri ile (OH^- , $\text{O}_2^{\cdot-}$ ve $1\Delta\text{gO}_2$ temizleyici etki) kas hücre hasarı sonucu gelişen böbrek bozulmasını önleyici etki göstermiş olabileceğini düşündürmüştür.

Özellikle hipovolemi varlığında böbrek kanlanması sağlanmasında NO önemli görev alır. Rabdomiyoliz sürecinde dolaşıma geçen miyogloblin, direkt NO tutucu etkisi ile biyoyararlılığını azaltır (6, 58). Öte yandan, hipoperfüzyon/vazokonstriksiyon şartlarında dolaşımda ve renal dokuda artan $\text{O}_2^{\cdot-}$, NO'e büyük bir afinite ile bağlanır ve NO'ü toksik olan ONOO⁻'e dönüştürür. Miyogloblinin'in direk tutucu etkisi ve oksidatif stres sonucu çok güçlü vazodilatör olan NO'ün biyoyararlılığının azalması MABY sürecinde ortaya çıkmış olan renal vazokonstriksiyonu daha da artırarak tübül hücre hasarı gelişimi ve nefron fonksiyon bozukluğuna katkıda bulunur (107, 108). Bilinen en toksik RNP olan ONOO⁻ etkisi ile DNA bazlarının, lipidlerin ve proteinlerin nitrasyonu ile ortaya çıkan 'nitrozatif stres' ile böbrek hasarı daha da belirginleşir (66). C vitamini'nin oksidatif stresi azaltarak NO biyoyararlılığını dolayısıyla NO etkisi ile gelişen vasküler dilatasyonu artırdığı gösterilmiştir (16). C vitamini'nin, yukarıda özetlenen oksidatif stresi azaltıcı direkt etkilerinin yanı sıra NO biyoyararlılığını böylece böbrek kanlanmasını artırıcı, renal vazokonstriksiyonu azaltıcı indirekt etkilerinin de çalışmamızda gözlenen MABY gelişimini yavaşlatıcı etkiye katkıda bulunmuş olabileceğini düşünüyoruz (5).

Oksidatif ve nitrozatif stresi azaltıcı etkilerine ek olarak C vitamini'nin diğer antioksidan moleküllerin rejenerasyonuna katkıda bulunduğu da gösterilmiştir. E vitamini (alfa-tokoferol) toksik peroksil radikal ile reaksiyona girerek alfa-tokoferol'un fenoksi radikali oluşur, böylelikle güçlü antioksidan etki gelişir (13, 109). Stoyanovsky ve ark, (110) C vitamini'nin retina vitamin E rejenerasyonunu sağladığını bildirmişlerdir. Güçlü antioksidan olan glutatyon eksikliği olan rat ve kobayların yaşamlarının ilk günlerinde proksimal tubul, karaciğer, akciğer ve beyinde gelişen oksidatif hasar sonucu kaybedildikleri, bu hayvanalara C vitamini uygulanmasının glutatyon sentezini sağlayarak oksidatif doku hasarlarını engellediği gösterilmiştir (109). Rabdomiyoliz sırasında gelişen hipovolemi-vazokonstriksiyon etkisi ile böbrek kan akımı ve O₂ sunumu azalır. O₂ açlığına bağlı tubüler hücrelerde mitokondrial oksidatif reaksiyonlar yavaşlar, ATP üretimi azalır (111). Oksidatif hücre membran hasarının tamiri zorlaşır. L-karnitin (β -hidroksi- γ -N-trimetil amonyum-butirat) uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondriye taşınarak oksidasyonunu kolaylaştıran, hücre ATP üretimini artıran moleküldür (111). Bu yolla, oksidatif hücre membran hasarının tamirini kolaylaştırarak sekonder antioksidan etki sergiler (112). C vitamini'nin L-karnitin biyosentezini artırdığı (94), L-karnitin tedavisinin deneysel modelde MABY gelişimini azalttığı gösterilmiştir (97). Tüm bu indirekt antioksidan etkilerinde, deney hayvanlarımızda gliserol ile oluşturduğumuz MABY sürecinde gelişen oksidatif hasarın şiddetinin azalmasına katkıda bulunmuş olması olasıdır. MABY sürecinde miyoglobinin kendisi de okside olarak (ferril-miyoglobin) lipid peroksidasyon gelişimine yol açabilir. Glaris ve ark (95) diğer antioksidanlardan farklı olarak, C vitamini'nin toksik ferril-miyoglobin oluşumunu da etkili şekilde azalttığını göstermişlerdir. Travmatik kas hasarı sonucu gelişen kas hücre nekrozu ile bol miktarda miyoglobin kas hücre sitoplazmasından dolaşıma geçmekte, molekül büyüklüğünün yaklaşık 19 kD olması dolaşımdaki miyoglobin'in glomerülden filtre olarak tubüler sisteme geçişini, tubüler hasar gelişimini kolaylaştırmaktadır (5). Çalışmamızda, C vitamini'nin ferril-miyoglobin oluşumunu önlemek yoluyla da olumlu etki sergilemiş olabileceğini düşünmekteyiz.

Bilinen bu antioksidan etkilerinden farklı olarak teorik açıdan C vitamini prooksidan etkiler de sergileyebilir. C vitamini geçiş metallerini indirgeyerek, indirgenmiş geçiş metallerinin MABY sürecinde ortaya çıkan H₂O₂ ve lipid hidroperoksitler ile reaksiyona girmesine böylece OH⁻ ve LOO⁻ oluşumuna yol açabilir (113). Her ne kadar bu reaksiyonlar *in vitro* ortamda kolayca gelişebilirse de reaksiyonların gelişmesi için serbest-katalitik metal

iyonlarının varlığına da ihtiyaç olduğundan, C vitamini'nin *in vivo* ortamda prooksidan etkili olup olmadığı tartışmalıdır. Canlıda, metal iyonları ferritin, transferrin ve seruloplazmin gibi proteinlerde depolandıkları için serbest düzeyleri oldukça düşüktür (114). Ancak, doku hasarı sürecinde metal iyonları depolardan serbestlenerek C vitamini ile reaksiyona girebilirler (113). Bu teorik pro-oksidan etki potansiyeline karşın, bizim çalışmamızda C vitamini tedavisi uygulanan ratlarda gözlenen güçlü antioksidan etkiye benzer şekilde, bir katalitik metal iyonu olan demir'in C vitamini ile birlikte uygulandığı klinik ve deneysel çalışmalarda dahi C vitamini'nin prooksidan değil antioksidan etkinlik gösterdiği saptanmıştır (104). Berger ve ark (115), insan plazma örneklerine transferrini satüre edecek, plazmada serbest-katalitik demir varlığına yol açacak dozda demir eklediklerinde dahi C vitamini'nin prooksidan değil antioksidan etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Retsky ve ark (116), C vitamini'nin, aşırı demir yüklü insan plazmasında, düşük dansiteli lipoprotein kolesterolü (LDL) metal iyonu bağımlı oksidasyondan koruduğunu göstermişlerdir. Chen ve ark (117), C vitamini eksikliği olan kobaylarda demir uygulamasının, karaciğer ve plazmada bir oksidatif stres göstergesi olan F₂-isoprostan artışına yol açtığını, demirle eş zamanlı C vitamini uygulanan kobaylarda ise F₂-isoprostan düzeylerinin azaldığını göstermişlerdir. Benzer şekilde, sağlıklı gönüllülere demir ile birlikte 60-260 mg/gün C vitamini uygulandığında *invitro* LDL oksidasyonun azaldığı, trombosit fonksiyonlarının düzeldiği, prooksidan etkiye işaret eden herhangi bir bulgu gelişmediği bildirilmiştir. Bulgularımız, C vitamini'nin, daha önce *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda gerçekleştirilen ve bulguları yukarıda özetlenen çalışmalara benzer şekilde, ratlarda gliserolle oluşturduğumuz MABY modelinde de prooksidan değil antioksidan etki sergilediğini göstermiştir.

Çalışmamızda, gliserol uygulanan gruplarda tübül hücre nekrozunun yanı sıra, böbrek doku kesitlerinde immünohistokimyasal TUNEL boyaması ile belirlediğimiz tübül apoptotik hücre sayısındaki aşırı artışın da renal fonksiyonel bozulmaya katkıda bulunduğunu düşünmekteyiz. Çok hücreli canlıların normal gelişimi ve homeostazisi için gerekli doğal hücre ölümü olan apoptozun aşırı yavaşlaması veya hızlanmasının doku ve organlarda yapısal ve fonksiyonel bozulmaya yol açtığı gösterilmiştir (86). Hücre nekrozu gelişmesinde rol alan oksidatif stres artışının kaspaz aktivasyonuna yol açarak apoptozu da hızlandırabildiği; diyabetik nefropati, siklosporin nefropatisi, üriner obstrüksiyon, iskemik ve toksik akut böbrek yetmezliğinde gözlenen apoptoz hızlanmasının yapısal ve fonksiyonel böbrek hasarı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (84, 87-89). Homsı ve ark (90), gliserolle MABY

oluşturdukları erkek Wistar-Honnover cinsi ratlarda, tubüler apoptotik hücrelerin sayısının kaspaz aktivasyonu ile ilişkili olarak gliserol uygulamasının çok erken evresinden itibaren artmaya başladığını, altıncı saatte apoptotik hücre oranının pik yaptığını göstermişlerdir. Çalışmamızda gliserol uygulanan ratlarda gözlenen hızlanmış apoptoz, MABY gelişiminde O_2^- , OH^- ve H_2O_2 'in organizmanın antioksidan kapasitesini aşacak şekilde artması ile ortaya çıkan oksidatif stresden kaynaklanmış olmalıdır. Çoklu ilişki incelemesinde tubüler apoptotik hücre sayısı ile MDA düzeylerinin pozitif doğrusal ilişkili saptamamız bu düşüncemizi desteklemektedir. Kaspaz inhibitörlerinin ve antioksidan tedavilerin hızlanmış apoptozu yavaşlatabildiği gösterilmiştir (90). Çalışmamızda, C vitamini uygulanan gruplarda apoptotik hücrelerin sayısı HK grubuna göre anlamlı düzeyde azalmış bulunmuştur. Bulgumuza benzer şekilde, Perz-Cruz ve ark, C vitamini'nin hücre kültüründe kaspaz 8 aktivasyonu inhibisyonu, monositlerde de Fas (CD95) aktivasyonu inhibisyonu yolu ile hızlanmış apoptozu yavaşlattığını göstermişlerdir (91, 92).

C Vitamin'nin gliserol ile oluşturulan MABY modelindeki etkileri ilk kez kliniğimizde gerçekleştirilen deneysel çalışmada araştırılmıştı (22). Bu çalışmada, antioksidan olarak C vitamini, güçlü antioksidan etkili oluşunun yanı sıra tubüler hasar gelişiminde önemli rolü olan toksik ferril miyoglobin oluşumunu engellediği için tercih edilmişti (22, 95). Ancak, MABY modelinde tubüler sisteme geçmiş olan miyoglobinin katabolizması ile bol miktarda serbest demir oluşabilmesi ve C vitamini'nin serbest metal iyonları varlığında prooksidan etki gösterebileceği yönündeki teorik bilgilerin varlığı nedeni ile bu ilk çalışmada 20 mg/kg gibi düşük bir C vitamini dozu denenmişti (5, 22, 95). Bu çalışmada, C vitamini'nin gliserol uygulaması ile eş zamanlı olarak 20 mg/kg/gün (toplam olarak 80 mg/kg) dozda uygulanması ile 96 saatlik takip süresinin sonunda, HK grubundaki ratlara göre tümü istatistiksel anlamlılık düzeyinde olmak üzere böbrek doku MDA düzeyi %60, tubüler nekroz oranı %15 ve tubüler tıkaç oluşumu %18 azalmış; GFR %30 artmış bulunmuştu. Bu çalışmanın bulgularına benzer şekilde, Bulduk ve ark (118), streptozotosin ile diyabet oluşturdukları *Wistar albino* ratlarda, ip yolla 21 gün süreyle uyguladıkları 20 mg/kg/gün C vitamini'nin, MDA ve glutatyon düzeylerinde kısmi ancak olumlu etki oluşturduğunu total NO düzeyini değiştirmedini bildirmişlerdir. Antunes ve ark (20) ise ratlarda sisplatin uygulaması ile geliştirdikleri nefropati modelinde, sisplatinden hemen önce uygulanan 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarında C vitamini'nin nefron fonksiyonları ve oksidatif strese etkisini araştırdıkları çalışmalarında, C vitamini'nin MDA düzeylerini azalttığını, glutatyon

düzeylerini ve GFR değerini artırdığını, tüm olumlu etkilerin yüksek dozda C vitamini uyguladıkları gruplarda daha belirgin olduğunu göstermişlerdir.

Kliniğimizde uygulanan ilk çalışmada, 20 mg/kg dozda C vitamini uygulaması ile MABY modelinde de prooksidan değil antioksidan etki gözlenmesi, C vitamini'nin fonksiyonel ve yapısal göstergeleri olumlu etkilediğinin saptanması; Antunes ve arkadaşlarının çalışmasında C vitamini dozu arttıkça oksidatif doku hasarına karşı koruyucu etkilerin arttığının gösterilmiş olması nedeniyle bu çalışmamızda 150 mg/kg (orta doz) ve 300 mg/kg (yüksek) doz C vitamini'nin MABY modelindeki etkilerini araştırdık. Kliniğimizde gerçekleştirilen ilk çalışmada gliserol uygulaması ile eş zamanlı olarak ip yolla 20 mg/kg/gün C vitamini uygulanmaya başlanmış, ratlar 96 saat izlenmiş ve toplam 80 mg/kg C vitamini uygulanmıştı (22). Bu çalışmamızda, C vitamini'ni gliserol uygulaması ile eş zamanlı olarak tek doz 150 veya 300 mg/kg (ip) olarak uyguladık, gliserol uygulamasından 48 saat sonra ratları sakrifiye ettik. İki çalışma tam karşılaştırılabilir nitelikte olmasa da düşük doz C vitamini uyguladığımız ilk çalışmaya göre orta ve yüksek doz gruplarındaki biyokimyasal ve histopatolojik nefron koruyucu etkinin daha belirgin gerçekleştiğini saptadık (22). Gerek orta, gerekse yüksek doz C vitamini uygulaması ile HK grubundaki ratlara göre MDA düzeyleri %35 oranında ve istatistiksel olarak SK grubundan farksız düzeylere incek kadar azaldı. Serum SOD aktivitesi ve eritrosit içi KAT aktivitesi arttı. Bu durum, düşük dozdakine benzer şekilde, yüksek doz C vitamininde MABY modelinde, antioksidan etki gösterdiğini düşündürmektedir (115-117). Çalışmamızdaki orta ve yüksek doz C vitamini uygulanan ratların verilerini karşılaştırdığımızda, YDCV grubunda antioksidan enzim (SOD ve KAT) aktivitelerinin ODCV grubuna göre daha belirgin yüksek olduğunu; YDCV grubunda endojenik kreatininle hesaplanan GFR değerinin ODCV grubuna göre üç kat ve istatistiksel anlamlı artmış olduğunu, tübüler apoptotik hücre sayısı ve tıkaç oluşumlarının anlamlı, tübüler nekroz oluşumunun ise belirgin azaldığını gözlemledik. Antunes ve ark, (20) çalışmasının sonuçlarına benzer olarak çalışmamızda da yüksek doz grubunda biyokimyasal ve histolojik olumlu etkilerin daha belirgin gelişmiş olması, C vitamini'nin böbrek koruyucu etkilerinin doza bağımlı olduğunu, daha yüksek dozlarla daha güçlü böbrek koruyucu etki elde edilebileceği düşündürmektedir.

Özetle, ratlarda gliserolle oluşturduğumuz travmatik kas hasarı sonucu gelişen MABY patogenezinde artmış oksidatif stresin önemli rol oynadığını, oksidatif stresin tübüler hücre düzeyinde nekroz gelişimi ve apoptoz hızlanması ile ilişkili olduğunu gözledik. C vitamini

uygulamasý ile oksidatif stres ve yapýsal-fonksiyonel nefron hasarý geliþiminde anlamlý azalma olduðunu; 150 mg/kg C vitamini uygulamasý ile elde edilen koruyucu etkinin 300 mg/kg uygulama ile anlamlý olarak arttýðýný saptadýk. Bulgularýmýz deneysel modelde saptadýðýmýz bu olumlu etkilerin klinik çalıþmalarda da gösterilebilmesi durumunda, C vitamini tedavisinin travmatik kas yaralanmasý oluþanlarda, diyaliz gerektirecek kadar ađır böbrek yetmezliđi geliþme olasýlýđını azaltabileceđini, lojistik nedenlerle diyaliz tedavi uygulama olanađının imkansýz hale gelebildiđi deprem gibi büyük felaket durumlarında, C vitamini tedavisinin insan sađlýđý açasýndan olumlu katkılar sađlayabileceđi dþndrmektedir.

SONUÇLAR

Çalışmamızda, ratlarda gliserol ile oluşturduğumuz deneysel MABY'de, ip yolla uyguladığımız 150 mg/kg ve 300 mg/kg C vitamininin nefron fonksiyonu, renal histopatoloji, lipid peroksidasyon son ürünü olan serum MDA düzeyleri ve antioksidan enzim (serum SOD ve eritrosit içi KAT) aktivitesi üzerine etkilerini inceleyerek ATN gelişimindeki etkilerini araştırdık. Sonuç olarak:

- 1- İntramuskuler yolla 8 mg/kg gliserol uygulanan gruplarda (HK, ODCV, YDCV grupları) SK grubuna göre serum üre ve kreatinin değerlerinde anlamlı yükseklik, GFR değerlerinde anlamlı düşüklük ve histopatolojik incelemede tubüler hücrelerde nekroz, apoptozda hızlanma ve tubüler lümende tıkaç varlığı ile belirgin MABY tablosu geliştiği gözlemlendi.
- 2- Gliserol uygulanan ratlarda tubüler hücre nekrozu ve tubüler apoptotik hücre varlığı, lipid peroksidasyon göstergesi olan MDA düzeyi ile pozitif doğrusal ilişkili bulundu. Ayrıca, tubüler tıkaç oluşumu ile MDA arasında istatistiksel anlamlılık sınırında pozitif doğrusal ilişki saptadık. Hastalıklı kontrol grubunda MDA düzeyinin SK grubuna göre 2,7 kat ve anlamlı yüksek olduğunu gözlemlendi. Bu bulgular, MABY gelişiminde oksidatif stresin önemli rol oynadığını düşündürdü.
- 3- Hastalıklı kontrol grubunda serum üre ve kreatinin değeri, UAA/uKr, NAG/uKr oranı, serum MDA düzeyi SK grubuna göre anlamlı yüksek, idrar miktarı, GFR ve serum SOD düzeyi anlamlı, eritrosit içi KAT aktivitesi belirgin düşük bulundu. Hastalıklı

- kontrol grubu tubüler hücre nekrozu, apoptotik hücre sayısı ve tubüler tıkaç oluşumunun en fazla görüldüğü gruptu.
- 4- Orta doz C vitamini uygulanan grupta HK grubundan farklı olarak, serum MDA düzeyi istatistiksel olarak SK grubundan farksızdı. Bu gruptaki ratlarla HK grubu arasında serum SOD ve eritrosit içi KAT aktiviteleri arasında istatistiksel anlamlılığa ulaşan fark gözlenmemekle birlikte ODCV grubunun antioksidan enzim aktiviteleri SK grubu değerlerine daha benzer bulundu.
 - 5- Orta doz C vitamini uygulanan grupta HK grubundan farklı olarak, idrar miktarı istatistiksel olarak SK grubundan farksızdı. Orta doz C vitamini uygulanan ratlarla, HK grubu arasında nefron fonksiyon göstergeleri arasında istatistiksel anlamlılığa ulaşan fark gözlenmemekle birlikte ODCV grubunun sKr, GFR, UAA/uKr oranı, NAG/uKr oranı SK grubu değerlerine daha benzer bulundu.
 - 6- Orta doz C vitamini uygulanan grupta HK grubuna göre tubüler hücre nekrozu, apoptotik hücre sayısı ve tubüler tıkaç oluşumu anlamlı düşük bulundu.
 - 7- Yüksek doz C vitamini uygulanan grupta HK grubundan farklı olarak, serum MDA düzeyi ve serum SOD enzim aktivitesi istatistiksel olarak SK grubundan farksızdı. Bu gruptaki ratlarla HK grubu arasında eritrosit içi KAT enzim aktiviteleri arasında istatistiksel anlamlılığa ulaşan fark gözlenmemekle birlikte YDCV grubunun KAT enzim aktivitesi SK grubu değerlerine daha benzer bulundu.
 - 8- Yüksek doz C vitamini uygulanan grupta HK grubundan farklı olarak, idrar miktarı istatistiksel olarak SK grubundan farksızdı. Bu gruptaki ratlarda GFR değeri HK grubuna göre 4,6 kat ve istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu. Yüksek doz C vitamini uygulanan ratlarla, HK grubu arasında diğer nefron fonksiyon göstergeleri arasında istatistiksel anlamlılığa ulaşan fark gözlenmemekle birlikte YDCV grubunun sKr, UAA/uKr ve NAG/uKr oranı SK grubu değerlerine daha benzer bulundu.
 - 9- Yüksek doz C vitamini uygulanan grupta HK grubuna göre tubüler hücre nekrozu, apoptotik hücre sayısı ve tubüler tıkaç oluşumu anlamlı düşük bulundu.
 - 10- Yüksek doz C vitamini uygulanan grupla ODCV grubu arasında lipid peroksidasyon ve antioksidan enzim düzeyleri arasında istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşan bir fark gözlenmemekle birlikte bu gruptaki serum SOD ve eritrosit içi KAT enzim aktiviteleri SK grubuna daha benzer bulundu.

- 11- Yüksek doz C vitamin uygulanan grupta GFR değeri ODCV grubuna göre 1,6 kat ve istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu. Yüksek doz C vitamini uygulanan ratlarla ODCV grubu arasında diğer nefron fonksiyon göstergeleri arasında istatistiksel anlamlılığa ulaşan fark gözlenmemekle birlikte YDCV grubunun sKr, UAA/uKr oranı ve NAG/uKr oranı SK grubu değerlerine daha benzer bulundu.
- 12- Yüksek doz C vitamini uygulanan grupta tubüler apoptotik hücre sayısı ve tubüler tıkaç oluşumu ODCV grubuna göre anlamlı derecede, tubüler nekroz oranı ise belirgin düşük bulundu.
- 13- Bulgularımız, 150-300 mg/kg C vitamini tedavisinin antioksidan etki ile gliserol ile travmatik kas hasarı oluşturduğumuz ratlarda nefron koruyucu etkili olduğunu ve MABY gelişiminin şiddetini azalttığını ortaya koymaktadır.

ÖZET

Savaş dönemleri ve doğal afetler sırasında kas travmasına bağlı miyoglobinürik akut böbrek yetmezliği epidemik düzeylere ulaşabilir. Oksidatif stres miyoglobinürik böbrek yetmezliği gelişiminde önemli rol oynar. C vitamini, serbest radikalleri temizleyen güçlü bir antioksidandır. Daha önce düşük doz C vitamini'nin miyoglobinürik akut böbrek yetmezliği gelişimini kısmen engellediği gösterildiğinden, bu çalışmamızda orta ve yüksek doz C vitamini'nin ratlarda gliserolle geliştirilen akut böbrek yetersizliği modelindeki etkilerini araştırdık. Çalışmamızda 4 grup rat kullanıldı. 1. grup sağlıklı kontrol olarak alındı, 2. Grup gliserol (8ml/kg, im) uygulanan hastalıklı kontrol grubu, 3. grup gliserolle beraber orta doz C vitamini (150 mg/kg, ip) verilen ve 4. Grup gliserolle beraber yüksek doz C vitamini (300 mg/kg, ip) verilen grup olarak ayrıldı. Nefron fonksiyonun değerlendirilmesi amacıyla üre, kreatinin, endojenik kreatinin klirensi, üriner N-asetil glukozaminidaz enzim aktivitesi ve albumin atılımının üriner kreatinin atılımına oranları, nefron yapısının değerlendirilmesi amacıyla böbrek doku kesitlerinde tubüler nekroz, tubüler apoptotik hücre sayısı ve tıkaç oluşumu değerlendirildi. Nefron hasarı gelişiminde oksidatif stresin etkisini belirlemek amacı ile serum malonil dialdehit düzeyi, süperoksit dismutaz ve eritrosit içi katalaz aktivitesi incelendi.

Bulgularımız, ratlarda gliserolle oluşturduğumuz miyoglobinürik böbrek yetmezliği patogenezinde artmış oksidatif stresin önemli rol oynadığını; C vitamini uygulaması ile oksidatif stres ve yapısal-fonksiyonel nefron hasarı gelişiminde anlamlı azalma oluştuğunu; 150 mg/kg C vitamini uygulaması ile elde edilen koruyucu etkinin 300 mg/kg uygulama ile

anlamli olarak arttiğını gstermektedir. Deneysel modelde saptadığımız bu olumlu etkilerin klinik çalışmalarda da gsterilebilmesi durumunda, diyaliz tedavisinin uygulama olanağının imkansız hale gelebildiği deprem gibi bryk felaket durumlarında C vitamini tedavisinin insan sağlığı açısından olumlu katkılar sağlayabileceği dűřündürmektedir.

Anahtar kelimeler: rabdomiyoliz, miyoglobinurik akut bbbrek yetmezliği, C vitamini, oksidatif stres, serbest radikaller

**THE EFFECTS OF DIFFERENT DOSAGES OF VITAMIN C ON
EXPERIMENTAL ACUTE MYOGLOBINURIC RENAL FAILURE
SUMMARY**

In wars and natural disasters myoglobinuric acute renal failure can reach epidemic proportions. Oxidative stress plays a major role in the development of acute myoglobinuric renal failure. Vitamin C is a powerful antioxidant which shows its action by scavenging free oxygen radicals. A partial effect of low dose of vitamin C on acute myoglobinuric renal insufficiency was shown before, therefore, we aimed to investigate the protective effects of different doses of vitamin C on acute myoglobinuric renal failure. Four groups of rats were used. Group 1 enrolled as healthy subjects; group 2 glycerol injected (8 ml/kg, im) group; group 3 Vitamin C (150 mg/kg, im) injected immediately after the glycerol injection which was defined as middle dose vitamin C group and group 4 Vitamin C (300 mg/kg, im) injected immediately after the glycerol injection which was defined as high dose vitamin C group. We investigate urea, creatinine, glomerular filtration rate, N-asetile glucose aminidase/Urine creatinine ratio and urine albumine excretion/Urine creatinine ratio to determine nephron functions. Tubular necrosis, apoptosis and cast formation was investigated to define renal architecture. Serum malonyl dialdehyde, superoxide dysmutase and erythrocyte catalase activity was studied to investigate the role of oxidative stress on renal dysfunction. We found that; oxidative stress plays a major role on myoglobinuric renal failure, after vitamin C usage oxidative stress was decreased, architectural and functional renal insufficiency was decreased and 300 mg/kg Vitamin C protected the kidneys more than 150 mg/kg vitamin C. Therefore

vitamin C usage, especially after natural disasters such as earthquakes where effective hemodialysis could be difficult, could have benefits on human health.

Key Words: rhabdomyolysis, myoglobinuric acute renal failure, vitamin C, oxidative stress, free radicals

KAYNAKLAR

1. Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure. *N Engl J Med* 1996;334(22):1448-60.
2. Star RA. Treatment of acute renal failure. *Kidney Int* 1998;54(6):1817-31.
3. Beetham R. Biochemical investigation of suspected rhabdomyolysis. *Ann Clin Biochem* 2000;37 (Pt 5):581-7.
4. Sever MS, Ereğ E, Vanholder R, Akoglu E, Yavuz M, Ergin H, et al. The Marmara earthquake: epidemiological analysis of the victims with nephrological problems. *Kidney Int* 2001;60(3):1114-23.
5. Zager RA. Rhabdomyolysis and myohemoglobinuric acute renal failure. *Kidney Int* 1996;49(2):314-26.
6. Zager RA, Gamelin LM. Pathogenetic mechanisms in experimental hemoglobinuric acute renal failure. *Am J Physiol* 1989;256(3 Pt 2):F446-55.
7. Abassi ZA, Hoffman A, Better OS. Acute renal failure complicating muscle crush injury. *Semin Nephrol* 1998;18(5):558-65.
8. Paller MS. Hemoglobin- and myoglobin-induced acute renal failure in rats: role of iron in nephrotoxicity. *Am J Physiol* 1988;255(3 Pt 2):F539-44.
9. Paller MS, Hedlund BE. Role of iron in postischemic renal injury in the rat. *Kidney Int* 1988;34(4):474-80.
10. Emerit J, Beaumont C, Trivin F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomed Pharmacother* 2001;55(6):333-9.

11. Shah SV. Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in passive Heymann nephritis in rats. *Am J Physiol* 1988;254(3 Pt 2):F337-44.
12. Miwa S, Muller FL, Beckman KB. Oxidative stress in aging : from model systems to human diseases. In: Miwa S, Beckman KB, Muller FL, editors. *Aging medicine*. 1st ed. New York: Springer; 2008. p. xiii, 320 p.
13. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982;47(5):412-26.
14. Kayaalp O. Suda Çözünen Vitaminler. In: Kayaalp O, editor. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. 25 ed. Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti.; 2002. p. 1489-92.
15. Padh H. Cellular function of ascorbic acid. *Biochem Cell Biol* 1990;68:1166-73.
16. Cross JM, Donald AE, Nuttall SL, Deanfield JE, Woolfson RG, Macallister RJ. Vitamin C improves resistance but not conduit artery endothelial function in patients with chronic renal failure. *Kidney Int* 2003;63(4):1433-42.
17. Abraham P. Vitamin C may be beneficial in the prevention of paracetamol-induced renal damage. *Clin Exp Nephrol* 2005;9(1):24-30.
18. Kavutcu M, Canbolat O, Ozturk S, Olcay E, Ulutepe S, Ekinçi C, et al. Reduced enzymatic antioxidant defense mechanism in kidney tissues from gentamicin-treated guinea pigs: effects of vitamins E and C. *Nephron* 1996;72(2):269-74.
19. Singh S, Rana SV. Amelioration of arsenic toxicity by L-Ascorbic acid in laboratory rat. *J Environ Biol* 2007;28(2 Suppl):377-84.
20. Antunes LM, Darin JD, Bianchi MD. Protective effects of vitamin c against cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adult rats: a dose-dependent study. *Pharmacol Res* 2000;41(4):405-11.
21. Ocak S, Gorur S, Hakverdi S, Celik S, Erdogan S. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester, vitamin C, vitamin E and N-acetylcysteine on vancomycin-induced nephrotoxicity in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2007;100(5):328-33.
22. Ustundag S, Yalcin O, Sen S, Cukur Z, Ciftci S, Demirkan B. Experimental myoglobinuric acute renal failure: the effect of vitamin C. *Ren Fail* 2008;30(7):727-35.
23. Doherty C. Epidemiology of acute renal failure. In: Alex M. Davison JSC, Jean-Pierre Grunfeld, David N.S. Kerr, Eberhard Ritz, Christopher G. Winearls, editor. *Oxford Textbook of Clinical Nephrology*. 2nd ed: Cameron Grunfeld Davison By Oxford University Press; January 15, 1998. p. 3242-3.
24. Kaufman J, Dhakal M, Patel B, Hamburger R. Community-acquired acute renal failure. *Am J Kidney Dis* 1991;17(2):191-8.

25. Domanovits H, Schillinger M, Mullner M, Thoennissen J, Sterz F, Zeiner A, et al. Acute renal failure after successful cardiopulmonary resuscitation. *Intensive Care Med* 2001;27(7):1194-9.
26. Brady HR, Brenner BM. Acute renal failure. In: Kasper DL BE, Fauci AS, Longo DL, Hauser SL, Jameson JL., editor. *Harrison's principles of internal medicine 16th ed.* ed. New York ; Toronto: McGraw-Hill, Medical Pub. Division; 2005. p. 1644-53.
27. Landoni G, Bove T, Crivellari M, Poli D, Fochi O, Marchetti C, et al. Acute renal failure after isolated CABG surgery: six years of experience. *Minerva Anesthesiol* 2007;73(11):559-65.
28. Chertow GM, Lazarus JM, Paganini EP, Allgren RL, Lafayette RA, Sayegh MH. Predictors of mortality and the provision of dialysis in patients with acute tubular necrosis. The Auriculin Anaritide Acute Renal Failure Study Group. *J Am Soc Nephrol* 1998;9(4):692-8.
29. Brivet FG, Kleinknecht DJ, Loirat P, Landais PJ. Acute renal failure in intensive care units--causes, outcome, and prognostic factors of hospital mortality; a prospective, multicenter study. French Study Group on Acute Renal Failure. *Crit Care Med* 1996;24(2):192-8.
30. Chertow GM, Christiansen CL, Cleary PD, Munro C, Lazarus JM. Prognostic stratification in critically ill patients with acute renal failure requiring dialysis. *Arch Intern Med* 1995;155(14):1505-11.
31. Liano F, Pascual J. Epidemiology of acute renal failure: a prospective, multicenter, community-based study. Madrid Acute Renal Failure Study Group. *Kidney Int* 1996;50(3):811-8.
32. Zanardo G, Michielon P, Paccagnella A, Rosi P, Calo M, Salandin V, et al. Acute renal failure in the patient undergoing cardiac operation. Prevalence, mortality rate, and main risk factors. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;107(6):1489-95.
33. Lameire N, Vanholder R. Pathophysiologic features and prevention of human and experimental acute tubular necrosis. *J Am Soc Nephrol* 2001;12 Suppl 17:S20-32.
34. Knochel JP. Rhabdomyolysis and myoglobinuria. *Annu Rev Med* 1982;33:435-43.
35. Zager RA. Studies of mechanisms and protective maneuvers in myoglobinuric acute renal injury. *Lab Invest* 1989;60(5):619-29.
36. Odeh M. The role of reperfusion-induced injury in the pathogenesis of the crush syndrome. *N Engl J Med* 1991;324(20):1417-22.
37. Grossman RA, Hamilton RW, Morse BM, Penn AS, Goldberg M. Nontraumatic rhabdomyolysis and acute renal failure. *N Engl J Med* 1974;291(16):807-11.
38. Bywaters EG, Delory GE, Rimington C, Smiles J. Myohaemoglobin in the urine of air raid casualties with crushing injury. *Biochem J* 1941;35(10-11):1164-8.

39. Matsuki A. [New study on the history of anesthesiology--(12). A biography of Seigo Minami, the first to describe crush syndrome]. *Masui* 2006;55(2):222-8.
40. Slater MS, Mullins RJ. Rhabdomyolysis and myoglobinuric renal failure in trauma and surgical patients: a review. *J Am Coll Surg* 1998;186(6):693-716.
41. Sever MŞ. Doğal afetler sonrası oluşan Crush (ezilme) yaralanmaları: Marmara depremi deneyimi. *İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri* 2007(55):29-42.
42. Sever MS, Erek E, Vanholder R, Kantarci G, Yavuz M, Turkmen A, et al. Serum potassium in the crush syndrome victims of the Marmara disaster. *Clin Nephrol* 2003;59(5):326-33.
43. Sheng ZY. Medical support in the Tangshan earthquake: a review of the management of mass casualties and certain major injuries. *J Trauma* 1987;27(10):1130-5.
44. Oda J, Tanaka H, Yoshioka T, Iwai A, Yamamura H, Ishikawa K, et al. Analysis of 372 patients with Crush syndrome caused by the Hanshin-Awaji earthquake. *J Trauma* 1997;42(3):470-5; discussion 5-6.
45. Vanholder R, Sever MS, Erek E, Lameire N. Acute renal failure related to the crush syndrome: towards an era of seismo-nephrology? *Nephrol Dial Transplant* 2000;15(10):1517-21.
46. Ron D, Taitelman U, Michaelson M, Bar-Joseph G, Bursztein S, Better OS. Prevention of acute renal failure in traumatic rhabdomyolysis. *Arch Intern Med* 1984;144(2):277-80.
47. Better OS. The crush syndrome revisited (1940-1990). *Nephron* 1990;55(2):97-103.
48. Eknoyan G. Acute renal failure in the Armenian earthquake. *Ren Fail* 1992;14(3):241-4.
49. Collins AJ, Burzstein S. Renal failure in disasters. *Crit Care Clin* 1991;7(2):421-35.
50. Solez K, Bihari D, Collins AJ, Eknoyan G, Eliahou H, Fedorov VD, et al. International dialysis aid in earthquakes and other disasters. *Kidney Int* 1993;44(3):479-83.
51. Özmen B NM. Deprem Bölgeleri Haritası ile İlgili Bazı Bilgiler. *TMMOB Jeoloji Mühendisleri Odası Haber Bülteni* 1999;99(2-3):32-5.
52. Parsons T, Toda S, Stein RS, Barka A, Dieterich JH. Heightened odds of large earthquakes near istanbul: An interaction-based probability calculation. *Science* 2000;288(5466):661-5.
53. Giannoglou GD, Chatzizisis YS, Misirli G. The syndrome of rhabdomyolysis: Pathophysiology and diagnosis. *Eur J Intern Med* 2007;18(2):90-100.

54. Wrogemann K, Pena SD. Mitochondrial calcium overload: A general mechanism for cell-necrosis in muscle diseases. *Lancet* 1976;1(7961):672-4.
55. Bosch X, Poch E, Grau JM. Rhabdomyolysis and acute kidney injury. *N Engl J Med* 2009;361(1):62-72.
56. Vanholder R, Sever MS, Ereke E, Lameire N. Rhabdomyolysis. *J Am Soc Nephrol* 2000;11(8):1553-61.
57. Holt SG, Moore KP. Pathogenesis and treatment of renal dysfunction in rhabdomyolysis. *Intensive Care Med* 2001;27(5):803-11.
58. Reeder BJ, Wilson MT. Hemoglobin and myoglobin associated oxidative stress: from molecular mechanisms to disease States. *Curr Med Chem* 2005;12(23):2741-51.
59. Paller MS. Free radical scavengers in mercuric chloride-induced acute renal failure in the rat. *J Lab Clin Med* 1985;105(4):459-63.
60. Zager RA, Foerder CA. Effects of inorganic iron and myoglobin on in vitro proximal tubular lipid peroxidation and cytotoxicity. *J Clin Invest* 1992;89(3):989-95.
61. Smith JL. The pathological effects due to increase of oxygen tension in the air breathed. *J Physiol* 1899;24(1):19-35.
62. Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science* 1954;119(3097):623-6.
63. Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282(2):C227-41.
64. Commoner B, Townsend J, Pake GE. Free radicals in biological materials. *Nature* 1954;174(4432):689-91.
65. Stein G, Weiss J. Chemical effects of ionizing radiations. *Nature* 1948;161(4095):650.
66. Laranjinha J. Oxidative Stress: From the 1980's to Recent Update. In: R. Soares CC, editor. *Oxidative stress, inflammation and angiogenesis in the metabolic syndrome*. 1st ed. New York: Springer; 2009. p. 21-32.
67. Shah SV, Walker PD. Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in glycerol-induced acute renal failure. *Am J Physiol* 1988;255(3 Pt 2):F438-43.
68. Levinson RM, Shure D, Moser KM. Reperfusion pulmonary edema after pulmonary artery thromboendarterectomy. *Am Rev Respir Dis* 1986;134(6):1241-5.
69. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985;312(3):159-63.
70. Wolff SP, Dean RT. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem J* 1987;245(1):243-50.

71. Salahudeen AK. Free radicals in kidney disease and transplantation. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 1999;10(2):137-43.
72. Çavdar C SA, Çamsarı T. Reaktif Oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi/Office Journal of the Turkish Nephrology* 1997;3-4:92-5.
73. Dormandy TL. Free-radical reaction in biological systems. *Ann R Coll Surg Engl* 1980;62(3):188-94.
74. Halliwell B. Drug antioxidant effects. A basis for drug selection? *Drugs* 1991;42(4):569-605.
75. Baliga R, Ueda N, Walker PD, Shah SV. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *Am J Kidney Dis* 1997;29(3):465-77.
76. Basaga HS. Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol* 1990;68(7-8):989-98.
77. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998;78(2):547-81.
78. Şimşek F. Serbest Oksijen radikalleri, antioksidanlar ve lipid peroksidasyonu. *Türkiye Klinikleri Pediatri* 1999;8:42-7.
79. Bulkley GB. Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review. *Br J Cancer Suppl* 1987;8:66-73.
80. Kavas GÖ. Reaktif Oksijen metabolitlerine fizyopatolojik yaklaşım. *Ankara Tıp Mecmuası (The Journal Of The Faculty Of Medicine)* 1993;47:579-92.
81. Delibaş N, Özçankaya R. Serbest Radikaller. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 1995;2(3):11-7.
82. Gutteridge JM, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci* 1990;15(4):129-35.
83. Aydın S, Aricioglu A, Turkozkan N, Bingol F, Aydın C. Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity of rabbit kidney cortex membranes in ischemia and reperfusion. *Acta Biochim Pol* 1993;40(4):545-7.
84. Kannan K, Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 2000;7(3):153-63.
85. McGowan A J FRS, Samali A, Cotter T G. Antioxidants and apoptosis. *Biochem Soc Trans* 24 1996:229-67.
86. Nagata S. Fas-mediated apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 1996;406:119-24.

87. Bonegio R, Lieberthal W. Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002;11(3):301-8.
88. Wong VY, Keller PM, Nuttall ME, Kikly K, DeWolf WE, Jr., Lee D, et al. Role of caspases in human renal proximal tubular epithelial cell apoptosis. *Eur J Pharmacol* 2001;433(2-3):135-40.
89. Bamri-Ezzine S, Ao ZJ, Londono I, Gingras D, Bendayan M. Apoptosis of tubular epithelial cells in glycogen nephrosis during diabetes. *Lab Invest* 2003;83(7):1069-80.
90. Homsy E, Janino P, de Faria JB. Role of caspases on cell death, inflammation, and cell cycle in glycerol-induced acute renal failure. *Kidney Int* 2006;69(8):1385-92.
91. Perez-Cruz I, Carcamo JM, Golde DW. Caspase-8 dependent TRAIL-induced apoptosis in cancer cell lines is inhibited by vitamin C and catalase. *Apoptosis* 2007;12(1):225-34.
92. Perez-Cruz I, Carcamo JM, Golde DW. Vitamin C inhibits FAS-induced apoptosis in monocytes and U937 cells. *Blood* 2003;102(1):336-43.
93. Loots DT, Mienie LJ, Bergh JJ, Van der Schyf CJ. Acetyl-L-carnitine prevents total body hydroxyl free radical and uric acid production induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the rat. *Life Sci* 2004;75(10):1243-53.
94. Rebouche CJ. Ascorbic acid and carnitine biosynthesis. *Am J Clin Nutr* 1991;54(6 Suppl):1147S-52S.
95. Galaris D, Korantzopoulos P. On the molecular mechanism of metmyoglobin-catalyzed reduction of hydrogen peroxide by ascorbate. *Free Radic Biol Med* 1997;22(4):657-67.
96. Kanner J, Harel S. Initiation of membranal lipid peroxidation by activated metmyoglobin and methemoglobin. *Arch Biochem Biophys* 1985;237(2):314-21.
97. Ustundag S, Sen S, Yalcin O, Ciftci S, Demirkan B, Ture M. L-Carnitine ameliorates glycerol-induced myoglobinuric acute renal failure in rats. *Ren Fail* 2009;31(2):124-33.
98. Akimau P, Yoshiya K, Hosotsubo H, Takakuwa T, Tanaka H, Sugimoto H. New experimental model of crush injury of the hindlimbs in rats. *J Trauma* 2005;58(1):51-8.
99. Merrick MA. Secondary Injury After Musculoskeletal Trauma: A Review and Update. *J Athl Train* 2002;37(2):209-17.
100. Rubinstein I, Abassi Z, Coleman R, Milman F, Winaver J, Better OS. Involvement of nitric oxide system in experimental muscle crush injury. *J Clin Invest* 1998;101(6):1325-33.

101. Hayrapetyan HL, Khachatryan HF, Mardanyan SS, Kevorkian GA. Activity of enzymes of adenyline compounds metabolism during crush and decompression of muscle tissue. Part I. Adenylate deaminase activity at experimental crush syndrome. *Med Sci Monit* 2000;6(5):845-52.
102. Hayrapetyan HL, Khachatryan HF, Mardanyan SS, Sargisova YG, Kevorkyan GA. Activity of enzymes of adenyline compounds metabolism during crush and decompression of muscle tissue. Part II. Adenosine deaminase activity at experimental crush syndrome. *Med Sci Monit* 2000;6(6):1068-76.
103. Lieberthal W, Nigam SK. Acute renal failure. II. Experimental models of acute renal failure: imperfect but indispensable. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;278(1):F1-F12.
104. Frei B, Stocker R, England L, Ames BN. Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. *Adv Exp Med Biol* 1990;264:155-63.
105. Bielski H. Chemistry of ascorbic acid radicals. *Ascorbic acid: Chemistry, metabolism, and uses. Adv Chem Ser* 1979;200:81-100.
106. Bodannes RS, Chan PC. Ascorbic acid as a scavenger of singlet oxygen. *FEBS Lett* 1979;105(2):195-6.
107. Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986;250(5 Pt 2):H822-7.
108. Valdivielso JM, Lopez-Novoa JM, Eleno N, Perez Barriocanal F. Role of glomerular nitric oxide in glycerol-induced acute renal failure. *Can J Physiol Pharmacol* 2000;78(6):476-82.
109. Meister A. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J Biol Chem* 1994;269(13):9397-400.
110. Stoyanovsky DA, Goldman R, Darrow RM, Organisciak DT, Kagan VE. Endogenous ascorbate regenerates vitamin E in the retina directly and in combination with exogenous dihydrolipoic acid. *Curr Eye Res* 1995;14(3):181-9.
111. Di Lisa F BR, Manebo R, Siliprandi N. Carnitine and carnitine esters in mitochondrial metabolism and function. In: De Jong JW FR, editor. *The carnitine system A new therapeutical approach to cardiovascular diseases*: Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1995. p. 21-38.
112. Mayes P. Lipids of physiologic significance. In: Muray RK GD, Mayes PA, Rodwell VW, editor. *Harper's Biochemistry*: Appleton and Lange: Stamford; 2000. p. 160-71.
113. Mashour S, Turner JF, Jr., Merrell R. Acute renal failure, oxalosis, and vitamin C supplementation: a case report and review of the literature. *Chest* 2000;118(2):561-3.
114. B Halliwell JMCG. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts: *Arch Biochem Biophys*; 1996.

115. Berger TM, Polidori MC, Dabbagh A, Evans PJ, Halliwell B, Morrow JD, et al. Antioxidant activity of vitamin C in iron-overloaded human plasma. *J Biol Chem* 1997;272(25):15656-60.
116. Retsky KL, Freeman MW, Frei B. Ascorbic acid oxidation product(s) protect human low density lipoprotein against atherogenic modification. Anti- rather than prooxidant activity of vitamin C in the presence of transition metal ions. *J Biol Chem* 1993;268(2):1304-9.
117. Chen K, Suh J, Carr AC, Morrow JD, Zeind J, Frei B. Vitamin C suppresses oxidative lipid damage in vivo, even in the presence of iron overload. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;279(6):E1406-12.
118. Bulduk E, Gonul B, Ozer C. Effects of vitamin C on muscle glycogen and oxidative events in experimental diabetes. *Mol Cell Biochem* 2006;292(1-2):131-7.

EKLER

Ek 1