

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Fizyoloji Anabilim Dalı**

# **EGZERSİZ PROTEİNÜRİSİNE NEDEN OLAN OKSİDAN STRESİN OLASI KAYNAKLARI**

**Günnur KOÇER**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Antalya, 2006**

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Fizyoloji Anabilim Dalı**

# **EGZERSİZ PROTEİNÜRİSİNE NEDEN OLAN OKSİDAN STRESİN OLASI KAYNAKLARI**

**Günnur KOÇER**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Ümit Kemal ŞENTÜRK**

Bu Çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi  
Tarafından Desteklenmiştir (Proje No:2005.02.0122.001)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

**Antalya, 2006**

## Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma, jürimiz tarafından Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 25/07/2006

**Tez danışmanı:** Prof. Dr. Ümit Kemal ŞENTÜRK  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Fizyoloji Anabilim Dalı

**Üye:** Prof. Dr. Oğuz Kerim BAŞKURT  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Fizyoloji Anabilim Dalı

**Üye:** Prof. Dr. Aysel AĞAR  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Fizyoloji Anabilim Dalı

**Üye:** Prof. Dr. V. Nimet UYSAL  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Fizyoloji Anabilim Dalı

**Üye:** Doç. Dr. Murat TUNCER  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Nefroloji Bilim Dalı

### ONAY:

Bu tez, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun ...../...../2006 tarih ve ...../..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nurettin Oğuz  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

Egzersiz sırasında artan oksijen tüketimi, serbest oksijen radikallerinin üretimini de arttırmakta ve bazı istenmeyen etkilere neden olabilmektedir. Egzersiz sırasında ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri aracılığıyla oluşan oksidan stresin egzersiz proteinürisine neden olduğu bölümümüzde daha önce yapılan çalışmamızda, hem insanlarda hem de sıçanlarda gösterilmiştir.

Egzersiz proteinürisine neden olan olası kaynakları ortaya koymak için, NADPH oksidaz ve ksantin oksidaz enzim inhibitörlerinin etkisi iki farklı çalışma şeklinde incelendi. İlk gruba NADPH oksidaz inhibitörü olan difenileniyodonyum klorit (1.6mg/kg/gün) diğer gruba da ksantin oksidaz inhibitörü olan oksipurinol (40mg/kg/gün) verilmesini takiben, her iki grupta da sıçanlara koşu bandında tüketici egzersiz yaptırıldı. Egzersizden sonra hayvanlar, 24 saatlik idrarlarının toplanması için metabolik kafeslere alındı. 24 saatin sonrasında, toplanan idrarın yanında kan örnekleri ve böbrek dokusu da çıkarıldı. İlk grupta NADPH oksidaz aktivitesi ve lökosit aktivasyonu saptandı. İkinci grupta da ksantin oksidaz aktivitesi tayin edildi. Oksidan stresi değerlendirmek için her iki grupta eritrosit ve böbrek tiyobarbitürik asit türevlerine (TBARS), ve böbrek protein karbonilasyonuna bakıldı. Proteinüri değerlendirmesi ise total idrar protein,  $\beta_2$ -mikroglobulin ve albumin düzeyi ölçümleri ile yapıldı.

NADPH oksidaz çalışmasında, Egzersiz grubunda idrarda total protein atılımında ve albumin düzeyinde kontrol grubuna göre belirgin bir artış saptanırken inhibitör tedavisiyle Egzersiz-İnhibitör grubunda bu artış önlendi. Oksidan stres parametrelerinde de eritrosit TBARS hariç, böbrek TBARS ve böbrek protein karbonilasyon düzeyinde Egzersiz grubunda anlamlı bir artış tespit edilirken bu artış inhibitör tedavisiyle önlendi. İdrar ve oksidan stres parametreleriyle uyumlu olarak lökosit ve böbrek NADPH oksidaz aktivitesi ile lökosit aktivitesi de Egzersiz grubunda anlamlı bir şekilde arttı. İnhibitör tedavisiyle de bu artış Egzersiz-İnhibitör grubunda önlendi.

Ksantin oksidaz çalışmasında da, Egzersiz grubunda, idarda total protein atılımı ve albumin atılımı artarken bu artış inhibitör tedavisiyle Egzersiz-İnhibitör grubunda önlenemedi. Oksidan stres parametrelerinde de Egzersiz grubunda eritrosit TBARS hariç böbrek TBARS ve böbrek protein karbonilasyonunda anlamlı olan artış inhibitör tedavisiyle Egzersiz-İnhibitör grubunda önlendi. Plazma ve böbrek ksantin oksidaz enziminin aktivitesi egzersiz ile artış göstermedi, fakat inhibitör tedavisiyle hem İnhibitör hem de Egzersiz İnhibitör grubunda bu aktivite önlendi.

Bulgularımıza göre, egzersiz proteinürisi gelişiminde oksidan stres kaynağı ksantin oksidaz enziminin çok, NADPH oksidaz enziminin rolü olduğunu işaret etmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Egzersiz, proteinüri, NADPH oksidaz, ksantin oksidaz,

## ABSTRACT

The increase in oxygen consumption during exercise training leads to an elevation in free oxygen radicals and thus may cause some undesirable consequences. A previous study in our department showed that postexercise proteinuria is interrelated with the exercise induced oxidative stress in rats.

This project was planned to reveal the probable sources leading to exercise proteinuria. This investigation will be focused on effects of NADPH oxidase and xanthine oxidase inhibitors on exercise proteinuria. Our project is assembled as an investigation of two different studies. Two separate groups were exposed to exhaustive treadmill exercise after administration of NADPH oxidase and xanthine oxidase inhibitors as diphenyliodonium chloride (1.6mg/kg/day) and oxypurinol (40mg/kg/day) respectively. All rats were housed individually in metabolic cages for the next 24 hours after exercise to collect urine samples. Blood withdrawal and kidney tissue isolation were also performed beside urine samples. NADPH oxidase activity and leukocyte activation were determined in first study's groups while xanthine oxidase activity was evaluated in oxypurinol treated group. Blood and kidney thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), and protein carbonyl content were measured in approach to evaluate the oxidant status in both studies. Proteinuria was assessed by detecting total urine protein,  $\beta$ 2-microglobulin and albumin levels in urine samples.

In NADPH oxidase study total protein excretion and albumin levels in Exercise group significantly increased in comparison with Control while inhibitor treatment prevented this increase in Exercise-Inhibitor group. Except erythrocyte TBARS the other oxidant stress parameters, kidney TBARS and kidney protein carbonylation apparently increase in Exercise group and this increase was also prevented in inhibitor receiving Exercise-Inhibitor group. Leukocyte and kidney NADPH oxidase activities and leukocyte activity in Exercise group significantly increased. In accordance with urinary and oxidant stress parameters, this increase was similarly prevented by inhibitor administration.

Urinary total protein and albumin excretion was found to be increased in xanthine oxidase study, but this effect was not altered by inhibitor administration. However oxidant stress parameters except erythrocyte TBARS, the kidney TBARS and protein carbonylation exhibited significantly increase and this elevation was prevented by inhibitor administration. Exercise did not induce an increase in plasma and kidney xanthine oxidase activity but inhibitor treatment reduced the enzyme activity in both Inhibitor and Exercise Inhibitor groups.

Our findings indicate that NADPH oxidase enzyme, rather than xanthine oxidase, plays a role as a source of oxidant stress in occurrence of postexercise proteinuria.

**Key words:** Exercise, proteinuria, NADPH oxidase, xanthine oxidase

## TEŞEKKÜR

Tezimin gerekleŐmesinde bilgi birikimi ve tecrübesiyle yol gÖstererek, bana her aşamada destek olan hocam Prof. Dr. Ümit Kemal ŞENTÜRK'e, yüksek lisans ÖĐrenimim süresince bana emeği geçen Anabilim dalımızın diğer hocalarına, fikirleriyle yardımcı olan Doç. Dr. Filiz GÜNDÜZ'e, deneylerim esnasında yardımlarını esirgemeyen Deney Hayvanları Ünitesi alıŐanlarına, Akın BÜYÜKAKAR'a, AyŐegöl AYHAN'a, benden manevi desteğini esirgemeyerek benim yanımda olan, ailem ve Derya ARTUN'a; ayrıca, gÖsterdikleri iyi niyet için tüm asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
<b>ÖZET</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>v</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>vi</b>
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b>	<b>vii</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b>	<b>xi</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>xiii</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b>	<b>xv</b>
<b>GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>GENEL BİLGİLER</b>	<b>2</b>
<b>2.1.</b> Egzersiz Böbreklere Etkileri	<b>2</b>
<b>2.1.1.</b> Böbrek Kan Akımı ve Fonksiyonu Değişiklikleri	<b>2</b>
<b>2.1.1.1.</b> Hemodinamik Değişiklikler	<b>2</b>
<b>2.1.1.2.</b> İdrarla Elektrolit Atılımı ve İdrar Akım Hızı	<b>2</b>
<b>2.1.2.</b> Hematüri	<b>3</b>
<b>2.1.3.</b> Egzersiz ve Nefropati	<b>3</b>
<b>2.1.4.</b> Egzersiz Proteinürisi	<b>4</b>
<b>2.1.4.1.</b> Tanım ve Tarihçe	<b>4</b>
<b>2.1.4.2.</b> Görüldüğü Spor Dalları	<b>4</b>
<b>2.1.4.3.</b> Sıklığı ve Şiddeti	<b>4</b>
<b>2.1.4.4.</b> Bileşimi	<b>4</b>
<b>2.1.4.5.</b> Süresi	<b>5</b>
<b>2.1.5.</b> Egzersiz Proteinürisi Oluşumunda	
ileri Sürülen Mekanizmalar	<b>5</b>
<b>2.1.5.1.</b> Glomerüler Filtrasyon İle İlgili Faktörler	<b>6</b>
<b>2.1.5.2.</b> Tübüler Geri Emilimi Etkileyen Faktörler	<b>7</b>

2.1.5.3.	Egzersiz Proteinürisinde Reaktif Oksijen Ürünlerinin Rolü	7
2.1.6.	Proteinüri ve Oksidan Stres	7
2.1.6.1.	Reaktif Oksijen Türevleri	7
2.1.6.2.	Böbrekte ROS Kaynakları	8
2.1.6.3.	Reaktif Oksijen Ürünlerinin Proteinüri Oluşumundaki Rolünü Gösteren Çalışmalar	9
2.1.6.4.	ROS'un Glomerüler Hasar Oluşturma Mekanizmaları	10
2.1.6.5.	Egzersiz Proteinürisi Oluşumuna Oksidan Stresin Etkisi	11
2.2.	NADPH Oksidaz Sistemi	12
2.2.1.	Yapısı	12
2.2.2.	Tipleri	13
2.2.3.	Nötrofillerde NADPH Oksidaz Aktivasyonu	14
2.2.4.	NADPH Oksidaz ve Solunumsal Patlama	15
2.2.5.	NOX Ailesi ve ROS'un Diğer Etkileri	15
2.2.6.	NOX İnhibitörleri	16
2.2.7.	NOX ve Egzersiz	16
2.3.	Ksantin Oksidaz Sistemi	16
2.3.1.	Yapısı	16
2.3.2.	Görevleri	17
2.3.3.	Dağılımı	18
2.3.4.	Hücre İçi Dağılımı	18
2.3.5.	XOR ve Egzersiz	19
2.4.	Hipotez	19
<b>GEREÇ ve YÖNTEMLER</b>		<b>20</b>
3.1.	Gruplandırma, Egzersiz ve İnhibitörler İle Tedavi	20
3.1.1.	Gruplandırma	20
3.1.2.	Egzersiz Protokolü	20
3.1.3.	İnhibitörler İle Tedavi	21



3.2.	Deneysel İşlemler	21
3.2.1.	İdrarların Toplanması	21
3.2.2.	Deneyin Sonlandırılması	22
3.3.	İdrar Parametreleri	22
3.3.1.	İdrar Kreatinin Ölçümü	22
3.3.2.	İdrarda Total Protein Tayini	22
3.3.3.	İdrarda Albumin Tayini	23
3.3.4.	İdrarda $\beta_2$ -mikroglobulin Tayini	23
3.4.	Oksidan Stres Parametreleri	23
3.4.1.	Tiyobarbitürik Asit Reaktif Ürünlerinin (TBARS) Tayini	23
3.4.1.1.	Eritrosit TBARS Tayini	23
3.4.1.2.	Böbrek TBARS Tayini	24
3.4.2.	Böbrek Protein Karbonilasyon Tayini	25
3.5.	Enzim İnhibitörlerinin Etkinliğinin Değerlendirilmesi	26
3.5.1.	Böbrekte NADPH Oksidaz Aktivite Tayini	26
3.5.2.	Lökosit Aktivasyonu	27
3.5.3.	Ksantin Oksidaz Aktivite Tayini	27
3.5.3.1.	Plazmada Ksantin Oksidaz Aktivitesi	28
3.5.3.2.	Böbrekte Ksantin Oksidaz Aktivitesi	28
3.6.	İstatistiksel Analiz	28
<b>BULGULAR</b>		<b>29</b>
4.1.	NADPH Oksidaz Çalışması	29
4.1.1.	İdrar Parametreleri	29
4.1.1.1.	İdrarda Total Protein Düzeyi	29
4.1.1.2.	İdrarda Albumin Düzeyi	30
4.1.1.3.	İdrarda $\beta_2$ -mikroglobulin Düzeyi	30
4.1.2.	Oksidan Stres Parametreleri	31
4.1.2.1.	Eritrosit TBARS Düzeyi	31

4.1.2.2.	Doku TBARS Düzeyi	31
4.1.2.3.	Böbrekte Protein Karbonilasyon Düzeyi	32
4.1.3.	Enzim İnhibitörlerinin Etkinliğinin Değerlendirilmesi	32
4.1.3.1	Böbrek NADPH Oksidaz Aktivitesi	32
4.1.3.2.	Lökosit Aktivasyonu	33
4.2.	Ksantin Oksidaz Çalışması	34
4.2.1.	İdrar Parametreleri	34
4.2.1.1.	İdrarda Total Protein Düzeyi	34
4.2.1.2.	İdrarda Albumin Düzeyi	34
4.2.1.3.	İdrarda $\beta_2$ -mikroglobulin Düzeyi	35
4.2.2.	Oksidan Stres Parametreleri	35
4.2.2.1.	Eritrosit TBARS Düzeyi	35
4.2.2.2.	Doku TBARS Düzey	35
4.2.2.3.	Böbrekte Protein Karbonilasyon Düzeyi	36
4.2.3.	Enzim İnhibitörlerinin Etkinliğinin Değerlendirilmesi	36
4.2.3.1.	Ksantin Oksidaz Aktivitesi	36
<b>TARTIŞMA</b>		<b>40</b>
<b>KAYNAKLAR</b>		<b>45</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>		<b>55</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>ADH</b>	: Antidiüretik hormon
<b>AMP</b>	: Adenin mono fosfat
<b>ATP</b>	:Adenin tri fosfat
<b>DCF</b>	:2',7'-Dichloro-fluorescein Diacetate
<b>DNPH</b>	:2,4-Dinitrofenilhidrazin
<b>DPI</b>	:Difenileniyodonyum klorid
<b>E</b>	:Egzersiz grubu
<b>E-İ</b>	:Egzersiz İnhibitör grubu
<b>ETZ</b>	:Elektron transport zincirinde
<b>FF</b>	:Filtrasyon fraksiyonunun
<b>GBM</b>	:Glomerüler bazal membran
<b>GFR</b>	:Glomerüler filtrasyon hızı
<b>Hb</b>	:Hemoglobin
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	:Hidrojen peroksit molekülü
<b>HOCl•</b>	:Hipoklorik asit
<b>HO<sub>2</sub>•</b>	:Hidroperoksit
<b>İ</b>	:İnhibitör grubu
<b>K</b>	:Kontrol grubu
<b>NF-kB</b>	:Nükleer faktör kappa B
<b>NO</b>	:Nitrik Oksit
<b>NOX</b>	:NADPH oksidaz
<b>OH•</b>	:Hidroksil radikali
<b>•O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	:Süperoksit anyonu
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	:Tekil (siglet) oksijen
<b>O<sub>3</sub></b>	:Ozon
<b>ROS</b>	:Reaktif oksijen ürünleri
<b>SOD</b>	:Süperoksit dismutaz
<b>TBA</b>	:Tiyobarbitürik asit
<b>TCA</b>	:Trikloro asetik asit

<b>XO</b>	:Ksantin oksidaz
<b>XD</b>	:Ksantin Dehidrogenaz
<b>XOR</b>	:Ksantin oksidoredüktaz
<b>VO<sub>2max</sub></b>	:Maksimal oksijen tüketiminin
<b>ZAS</b>	:Zimozan ile aktive serum

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Monositlerde NADPH oksidaz aktivitesi	14
2.2. NADPH Oksidaz aracılı oluşan solunumsal patlama mekanizması	15
3.3. XD ve XO aracılığıyla hipoksantinden ürik asit oluşumu	17
3.4. XO'nun iskemi-reperfüzyondaki rolü	18
4.1. NADPH oksidaz çalışmasının total idrar protein değerlerinin karşılaştırılması	30
4.2. NADPH oksidaz çalışmasının idrar albumin değerlerinin karşılaştırılması	30
4.3. NADPH oksidaz çalışmasının eritrosit TBARS değerlerinin karşılaştırılması	31
4.4. NADPH oksidaz çalışmasının böbrek TBARS değerlerinin karşılaştırılması	31
4.5. NADPH oksidaz çalışmasının böbrek protein karbonilasyon değerlerinin karşılaştırılması	32
4.6. NADPH oksidaz çalışmasının böbrek NADPH oksidaz değerlerinin karşılaştırılması	33
4.7. NADPH oksidaz çalışmasının lökosit aktivasyonu değerlerinin karşılaştırılması	33
4.8. Ksantin Oksidaz çalışmasının idrar total protein	

değerlerinin karşılaştırılması	34
<b>4.9.</b> Ksantin Oksidaz çalışmasının idrar mikroalbumin değerlerinin karşılaştırılması	34
<b>4.10.</b> Ksantin Oksidaz çalışmasının Eritrosit TBARS değerlerinin karşılaştırılması	35
<b>4.11.</b> Ksantin Oksidaz çalışmasının böbrek TBARS değerlerinin karşılaştırılması	35
<b>4.12.</b> Ksantin Oksidaz çalışmasının böbrek protein karbonilasyonu değerlerinin karşılaştırılması	36
<b>4.13.</b> Ksantin Oksidaz çalışmasının plazma XO aktivitesi değerlerinin karşılaştırılması	36
<b>4.14.</b> Ksantin Oksidaz çalışmasının böbrek XO aktivitesi değerlerinin karşılaştırılması	37

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
2.1. Maraton öncesi ve sonrası idrarda çıkan proteinlerin miktarları	5
4.1. NADPH Oksidaz çalışması tüm sonuçları	38
4.2. Ksantin Oksidaz çalışması tüm sonuçları	39

## GİRİŞ

Egzersiz proteinürisi, fiziksel aktivite sonrasında idrarda protein atılımı ile karakterize bir durum olup, uzun yıllardan beri oldukça iyi bilinmektedir. Egzersize bağlı oluşan proteinürinin oluşum mekanizmalarını irdeleyen araştırmalar ise az sayıdadır ve egzersiz proteinürisinin mekanizmasına yönelik ileri sürülen açıklamalar da bu konuya tam olarak ışık tutamamaktadır. Egzersiz sırasında renal kan akımı kadar azalmayan glomerüler filtrasyon hızı, artmış filtrasyon fraksiyonu ile açıklanmakta ve proteinlere karşı glomerüler geçirgenliğin artması da buna bağlanmaktadır (1,2). Bunun yanında glomerüler membran üzerindeki anyonik yüklerin nötralizasyonu ve kaybı da ileri sürülen diğer nedenlerden biridir (1,2). Egzersiz proteinürisinde ileri sürülen bir başka mekanizma da glomerülden süzülen protein miktarının çok artarak tübüler emilim kapasitesinin aşılmasıdır (1,3,4,5). Fakat bu mekanizmalar egzersizden 24-48 saat sonra görülen egzersiz proteinürisini açıklamakta yetersiz kalmaktadır. Bu bilgilerden yola çıkarak ve egzersiz proteinürisi oluşumunda etkili olan mekanizmaları ortaya koymak adına, bölümümüzde gerçekleştirdiğimiz bir dizi çalışma sonucunda egzersiz sırasında oluşan oksidan stresin egzersiz proteinürisi oluşumundaki etkisi hem sıçanlarda (6) hem de insanlarda gösterilmiştir. Oksidan stresin birçok böbrek patolojisinde (7,8,9) veya doğrudan yapılan bir takım deneysel girişimlerle proteinüriye yol açtığı iyi bilinmektedir (10). Bu çalışmalarda oksidan stres kaynağı olarak lökosit aktivasyonu ve iskemi-reperfüzyon süreci ön planda tutulmaktadır. Bu iki mekanizma egzersiz sırasında aktive olabilmekte ve egzersiz bitiminden sonra oluşan oksidan stresi açıklamaktadır. Lökosit aktivasyonu ile oluşan hasarda NADPH oksidaz enzimi (11,12), iskemi reperfüzyon sürecinde ise ksantin oksidaz enzimi (13,14,15) rol oynamaktadır. Ancak egzersiz proteinürisine neden olan oksidan stresin kaynakları bilinmemektedir.

Bu çalışmanın amacı, egzersiz nedeniyle ortaya çıkan lökosit aktivasyonu ve iskemi reperfüzyon sürecinde oluşan oksidan stresin, egzersiz proteinürisine neden olup olmayacağını ortaya koymaktır. Bu amaçla, NADPH oksidaz ve ksantin oksidaz enzim sistemlerinin, egzersiz proteinürisine neden olan oksidan strese katkısı, bu enzimlerin inhibitörleri kullanılarak açığa çıkarılmaya çalışılmıştır.



## GENEL BİLGİLER

### 2.1. Egzersizin Böbreklere Etkileri

Egzersizde kalp ve iskelet kası dokusunun artan oksijen ihtiyacının karşılanması, aralarında böbreğin de bulunduğu, egzersize katkıda bulunmayan çeşitli organların kan akımlarının azalması yoluyla gerçekleşir. Öncelikle kan akımının azalmasından dolayı egzersiz sırasında ve/veya sonrasında böbreklerde çeşitli fizyolojik ve bazen de fizyopatolojik süreçler gelişir (16). Bu süreçlerden ön plana çıkanlar hemodinamik değişiklikler, hematüri, nefropati ve proteinüridir.

#### 2.1.1. Böbrek Kan Akımı Ve Fonksiyonu Değişikleri

##### 2.1.1.1. Hemodinamik Değişiklikler

Egzersiz sırasında böbrek kan akımında ki azalmanın egzersizin şiddetine göre değişiklik gösterdiği bilinmektedir (17,18,19,20). Maksimal oksijen tüketiminin ( $VO_{2max}$ ) % 50'si düzeyinde yapılan egzersizde renal plazma akımında % 30'luk bir azalma oluşurken,  $VO_{2max}$  % 65'e ulaştığında renal plazma akımındaki azalma % 75 düzeyine ulaşabilmektedir (17).

Egzersiz sırasında böbrek kan akımı önemli ölçüde değişmesine rağmen böbrekteki otoregülasyon mekanizması nedeni ile egzersiz şiddeti belirli bir düzeyin üstüne çıkmadıkça glomerüler filtrasyon hızı (GFR) değişmez. Maksimum şiddette egzersiz sırasında, GFR bazal düzeyinin % 60'ına kadar düşebilir. Egzersiz sırasında renal kan akımının azalmasına karşın, GFR'nin aynı oranda azalma göstermemesi filtrasyon fraksiyonunun (FF) artmasından kaynaklanır (2).

Egzersiz sırasında böbrek kan akımı, GFR, FF'unda ortaya çıkan bu değişiklikleri açıklayan en önemli mekanizma, egzersiz sırasında ortaya çıkan sempatik sistem aktivasyonudur. Egzersiz sırasında bir yandan renal sempatik sinir aktivitesindeki artış öte yandan dolaşımdaki adrenal düzeylerinin yükselmesi afferent ve efferent arteriyollerde gittikçe artan vazokonstriksiyona neden olur (21). Egzersizde artan sempatik aktivasyonun bir diğer etkisi renin salgılanmasını uyarmasıdır (22,23). Artan renin salgısı anjiyotensinin üretimine neden olur. Anjiyotensin II'nin böbrek hemodinamisi üzerine önemli etkileri vardır. Özellikle efferent arteriyolde vazokonstriksiyon oluşturarak FF'da artışa neden olur (23).

##### 2.1.1.2. İdrarla Elektrolit Atılımı ve İdrar Akım Hızı

Özellikle ağır egzersizde idrarla sodyum, klor, kalsiyum gibi elektrolitlerin atılımı azalırken potasyum atılımında değişiklik olmadığı gösterilmiştir

(17,20,24). Egzersizde düzeyi artan aldosteron idrarla sodyum atılımındaki düşüşten sorumlu tutulmaktadır.

Egzersizle idrar akımı ve idrarla su atılımı azalmaktadır. Egzersize bağlı idrar akım hızındaki değişiklikler, suyun tübüler geri emilimi, GFR, solütlerin sekresyonu ve antidiüretik hormon (ADH)'un dolaşımdaki seviyesi ile ilgili değişikliklere bağlıdır. ADH'nın egzersize verdiği yanıt egzersiz şiddeti ve süresine, ayrıca kişinin hidrasyon düzeyine bağlı olarak yükselir (17).

### **2.1.2. Hematüri**

Sporcularda sıklıkla ortaya çıkabilen ve eskiden beri bilinen bir durum olan mikroskobik veya makroskobik hematüri için görülme sıklığının % 55'ten % 80'e kadar olduğu bildirilmiştir (17,25). Tekrarlayabilme özelliğine rağmen spor hematürisi çoğunlukla bir iki gün içinde ortadan kalkar.

Bilindiği gibi böbrek kan akımı ve glomerüler filtrasyon hızı egzersiz şiddetiyle orantılı azalma sergiler. Bu azalma nedeniyle glomerüler geçirgenlik artışı, nefronda hipoksik hasar ve eritrositlerin idrara geçişi gözlenebilir. Aynı zamanda efferent glomerüler arteriyolde daha belirgin olan renal vazokonstriksiyon sebebiyle filtrasyon fraksiyonu yükselir ve glomerüler kapillerde meydana gelen sıkışma, eritrositlerin idrara geçişini kolaylaştırır (17).

Mesane kaynaklı hematüri travma sonucunda ortaya çıkar. Mesane hasarının ortaya çıkış mekanizması gevşek yapıdaki posterior kese duvarının, daha kalın ve sağlam yapıda olan ve trigonu da içine alan taban kısmına çarpmasıdır. Tek bir çarpmanın şiddeti küçük olsada uzun koşular boyunca bunun devamlı tekrarı travmaya sebep olabilmektedir (17).

Spor hematürisi gözlenen atletlerde ayırıcı tanıda yürüyüş (marş) hemoglobinürisi ve miyoglobinüri de değerlendirilmelidir (3). Marş hemoglobinürisi "*ayak darbesi hemolizi*" olarak da bilinir. Bunun açıklaması sert bir zeminde koşu sırasında ayak tabanından geçen eritrositlerin mekanik travmaya uğramasıdır (3,17). Aynı zamanda egzersiz sırasında intravasküler hemoliz pek çok nedenle oluşabilir ve eritrositler idrara geçebilir.

### **2.1.3. Egzersiz ve Nefropati**

Sık olmamasına rağmen egzersizin böbrek sistemi üzerindeki en ciddi yan etkisi akut böbrek yetmezliğidir (2,17). Yoğun egzersiz sırasında böbrekteki kan akımının önemli düzeyde azalmasıyla ortaya çıkan iskemi, sıvı kaybı sonucu dehidratasyon, miyoglobinüri, hemoglobinüri, vücut ısısı artışı, kas hasarı sonucu ortaya çıkan enzimlerin böbrekten süzülmesi gibi sebeplerle akut tübüler nekroz gelişebilir (2,17). Egzersiz ile oluşan akut böbrek yetmezliğinin seyri çoğunlukla iyidir. Bozuk böbrek fonksiyonu olan insanlarda böbrek yetmezliği gelişme riskinin daha yüksek olması

öngörülebilir. Çalışmalarla ortaya konan verilere göre diyabetik insanlarda böbrek yetmezliği riski normal populasyona göre 17 kat daha fazladır (2).

#### **2.1.4. Egzersiz Proteinürisi**

Araştırma konumuzun temelini oluşturduğu için yukarıda tartışılan faktörlere göre egzersize bağlı oluşan proteinüri etraflıca incelenecektir.

##### **2.1.4.1. Tanım ve Tarihçe**

Egzersiz proteinürisi sporcularda sık görülen ve egzersiz sonrası geçici olarak idrarda protein miktarının artmasıyla izlenen bir durumdur (1,3,4,5,26,27). İnsanlardan başka, domuz, köpek, sıçan gibi türlerde de ortaya konmuştur (6,28,29,30,31,32). 1878'de ilk olarak Von Leube tarafından "*Sağlıklı insanlarda egzersiz sonrasında idrarda protein bulunması*" şeklinde tanımlanmıştır (2,17). Gardener ise egzersiz proteinürisi için "*atletik pseudonefrit*" terimini kullanmış, bu durumda ortaya çıkan değişikliklerin nefrotik sendromdan farklı olarak iyi huylu ve geçici olduğuna dikkat çekmiştir (2,17).

##### **2.1.4.2. Görüldüğü Spor Dalları**

Proteinüri darbeye açık olan veya olmayan birçok spor dalında gözlenir (17,23). Koşu (19,27), bisiklet egzersizi (33,34), ritmik yürüyüş (24), dağ yürüyüşü (23), triatlon (35), futbol (1,36), basketbol-hentbol (36), atletizm, kürek (37), boks, lakros (1), yüzme (30) gibi bir çok spor dalında egzersiz proteinürisinin varlığı gösterilmiştir. Bu bulguların ışığında egzersiz proteinürisinin sık görülen ve hemen her tip egzersizde ortaya çıkan bir bulgu olduğu öngörülebilir.

##### **2.1.4.3. Sıklığı ve Şiddeti**

Oldukça sık görülen egzersiz proteinürisinin atletlerin % 70-80'sinde ortaya çıktığı saptanmıştır (17). İdrarla atılan protein düzeyleri, dinlenim ile karşılaştırıldığında, özellikle ağır ve kısa süreli egzersizde belirgin olarak arttığı gözlenmektedir. Yapılan çalışmalarla protein atılımındaki artışın 20-100 kat olabileceği gösterilmiştir (17,23,33,37). Egzersiz sonrası proteinürinin ortaya çıkmasında egzersiz süresinden çok egzersiz şiddetinin önemli olduğu ortaya konulmuştur (2,3,5,17,26,38). Bunun yanında egzersiz tipinin de proteinüri miktarının belirlenmesinde önemli olduğu gösterilmiştir; mesela bisiklet, yüzme ve kürek egzersizlerine kıyasla, koşu sonrasında ortaya çıkan proteinürinin daha belirgindir.

##### **2.1.4.4. Bileşimi**

Egzersiz sonrası proteinürinin bileşenleri normal sağlıklı kişi idrarında görülenden farklı olarak daha çok plazma proteinlerinden oluşur (17,23). Egzersiz sonrası idrarda albumin (33) gibi büyük molekül ağırlıklı ve/veya  $\beta_2$ -mikroglobulin (33),  $\alpha_1$ -mikroglobulin (39) gibi küçük molekül ağırlığına sahip proteinlerin miktarları da artmaktadır. Egzersiz proteinürisi hakkında yapılan çalışmalar, uygulanan egzersizin şiddeti ile idrara çıkan protein tipi arasında

bir bağlantının olduğuna işaret etmektedir (33). Araştırmacılara göre, albumin egzersiz sonrasında idrarda tespit edilen plazma proteinlerinin başında gelmektedir. Hafif veya orta şiddetli egzersizde, idrarda büyük molekül ağırlığına sahip proteinler çıkmakta, yani glomerüler tip proteinüri oluşmaktadır (33,36,39,40). Ağır ve kısa süreli egzersiz sonrasında albumin ile birlikte daha düşük molekül ağırlıklı proteinlerin de idrara çıkışı artmaktadır ki, bu tip proteinüriye miks tip proteinüri denir (2,5,17).

Maraton koşusu öncesinde ve sonrasında spesifik plazma proteinlerine karşı antiserum kullanılarak uygulanan immünodifüzyon tekniği ile idrar örneklerinden protein ölçümü yapılmış ve sonuçlar Tablo-2.1 de verilmiştir (1).

**Tablo-2.1.** Maraton öncesi ve sonrası idrarda çıkan proteinlerin miktarları.

<b>Proteinler</b>	<b>Dinlenimde (µg/dk)</b>	<b>Egzersizden 30 dk sonra (µg/dk)</b>
Triptofandan zengin prealbumin	0.03±0.01	0.26±0.31
Albumin	12.73±4.63	126.70±89.92
α <sub>1</sub> -Asit glikoprotein	0.41±0.14	11.83±10.22
α <sub>1</sub> -Antitripsin	0.31±0.13	2.04±2.02
Seruloplazmin	0.06±0.01	0.39±0.44
Haptoglobulin	0.18±0.18	0.79±0.69
α <sub>2</sub> -G <sub>c</sub> -globulin	0.03±0.01	0.37±0.37
HS- α <sub>2</sub> -glikoprotein	0.10±0.02	0.78±0.85
Zn- α <sub>2</sub> -glikoprotein	0.93±0.26	5.97±4.34
Hemopeksin	0.20±0.06	1.21±1.06
Transferrin	0.16±0.07	3.31±2.19
B <sub>2</sub> -glikoprotein	0.32±0.10	0.35±0.40
IgA-globulin	0.50±0.10	1.18±0.82
IgG-globulin	2.46±0.44	20.09±18.58
3S γ <sub>1</sub> -globulin	0.02±0.01	3.57±5.62

#### **2.1.4.5. Süresi**

Egzersiz bitiminden 20-30 dakika sonra idrarla protein çıkışı olur ve egzersizi izleyen 24-48 saat içinde de kaybolur. Hem total proteinin hem de albuminin idrarla atılımı egzersiz sonrasında logaritmik olarak azalmaktadır (2,5,17).

#### **2.1.5. Egzersiz Proteinürisi Oluşumunda ileri Sürülen Mekanizmalar**

Proteinlerin tübüler geri emiliminin doyumluğa ulaşması ve glomerüler geçirgenliklerinin artması egzersiz proteinürisinin ana mekanizmalarını oluşturmaktadır. Bunun yanında bölümümüzde yapılan çalışmalarda egzersiz proteinürisine, egzersiz sırasında artan oksidan stresin de neden olabileceği gösterilmiştir (2,3,17,23,26). Bu konular aşağıda ayrıntılı olarak tartışılmıştır.

### 2.1.5.1. Glomerüler Filtrasyon İle İlgili Faktörler

**Hemodinamik Faktörler:** Egzersiz şiddetine bağlı olarak renal kan akımı % 20 düzeylerine kadar düşebilmektedir (1). Fakat GFR bu düşüşe filtrasyon fraksiyonunun artması nedeni ile aynı oranda eşlik etmemektedir (1,2). Efferent arteriyol vazokonstrüksiyonu ile artan filtrasyon fraksiyonu, kendini glomerüler kan akımının yavaşlaması ile solütlerin yanında makro moleküllerin de ultrafiltrata geçişini kolaylaştırarak gösterir (1,2). Bilindiği gibi arteriyel kan basıncındaki belirgin değişikliklere karşın böbrek içi otoregülasyon mekanizmalarıyla böbrek kan akımı ve GFR büyük oranda sabit tutulur. Distal tübülde bulunan ve tübüler sıvıdaki sodyum ve klor konsantrasyonundaki değişikliklere hassas olan makula densa hücreleri, afferent ve efferent arteriyollerin juksta glomerüler hücrelerinden renin salgısını düzenleyerek otoregülasyon mekanizmasında temel rolü oynar. Bilinen otoregülasyon mekanizmalarına ek olarak kinin-kallikrein sisteminin ve prostaglandinlerin de renal kan akımı değişikliklerini etkileyerek egzersiz proteinürisinde rol oynayabileceği öne sürülmektedir (1,31).

Renal hemodinami birçok faktör tarafından kontrol edilmektedir. Fiziksel aktivite sırasında ise hemodinamiye etki eden faktörlerin sayısı daha da artmaktadır. Bu faktörlerden hangilerinin ön plana çıkıp hemodinamiyi değiştirerek egzersiz proteinürisine neden olduğunu gösteren iki çalışmamızda, nitrik oksit (NO) ve angiotensin-II'nin egzersiz proteinürisi üzerine etkileri incelendi (41,42). Dışarıdan NOS inhibitörü uygulanması yoluyla egzersiz sırasında NO üretiminin engellenmesi, egzersiz proteinürisinde önemli artış yaratırken, dışarıdan verilen NO donörünün proteinüriyi önemli ölçüde azaltması, NO'nun egzersiz sonrası oluşan proteinüri düzeyinin daha yüksek olmasını önlediğini düşündürmektedir (41). Diğer çalışmamızda ise egzersiz proteinürisi oluşumunda angiotensin-II ile kinin-kallikrein sistemlerinden hangisinin rolünün ön planda olduğunu göstermeyi amaçladık. Bu çalışmada ACE inhibitörü ve spesifik AT-1 reseptör blokörü kullanılarak egzersiz proteinürisi oluşumuna kinin-kallikrein sisteminden çok angiotensin-II'nin katkıda bulunduğu sonucuna varıldı (42).

**Yük Seçici Özelliğinin Kaybolması:** Hormonal ve kan akımındaki değişikliklerin yanında kapiller duvarın negatif yüklerinin kaybolmasının da egzersiz sonrası gelişen proteinüriye neden olabileceği öne sürülmektedir (1). Zambraski ve arkadaşlarının koşan köpeklerle yaptıkları çalışmaların sonuçları egzersizin glomerüler elektrostatik bariyeri azalttığını ve böylelikle makromoleküllerin glomerüllerden geçişinin arttığını bildirmişlerdir (1,2). Bu olayda glikozaminoglikan ve  $\alpha_1$ -asit glikoprotein gibi glomerüler bazal membranda yer alan moleküllerin idrarla kaybının etkili olabileceği düşünülmektedir (1). Bu maddelerin etkisi kapiller membran negatif yüklerini arttırarak anyonik moleküllerin glomerüler bariyeri geçişini engellemektedir, eksilmeleri ise tam tersi etkiyi yapmaktadır.

### 2.1.5.2. Tübüler Geri Emilimi Etkileyen Faktörler

Glomerüler filtrasyon membranından geçebilen proteinler proksimal tübül hücrelerince belirli bir maksimum tübüler reabsorpsiyon kapasitesi düzeyine kadar geri emilirler (1,43). Proksimal tübüle gelen protein yükü, kendi Tm değerinden fazla olacak olursa idrarla atılır. Düşük moleküler ağırlığa sahip proteinlerin Tm değerinin filtre edilen yükten biraz fazla olması, normal koşullarda tamamen geri emilmelerini sağlar. Fakat ağır egzersizde maksimal tübüler reabsorpsiyon düzeyine ulaşması nedeniyle albumin ile birlikte düşük molekül ağırlıklı proteinlerin de idrarla atılımı gerçekleşmektedir (1,3,4,5).

### 2.1.5.3. Egzersiz Proteinürisinde Reaktif Oksijen Ürünlerinin Rolü

Çeşitli nedenlerle oluşan reaktif oksijen ürünlerinin proteinüriye etkisi iyi bilinen bir durumdur. Egzersize bağlı oksidan hasarın, egzersiz proteinürisine neden olabileceği ise ilk defa bizim bölümümüzde gösterilmiştir (6). Bu konu araştırmamızın temelini teşkil ettiği için, proteinüri ve oksidan stres başlığı altında bir sonraki kısımda daha ayrıntılı olarak incelenecektir.

## 2.1.6. Proteinüri ve Oksidan Stres

### 2.1.6.1. Reaktif Oksijen Türevleri

Organizmada normal oksijen metabolizması sırasında oluşan reaktif oksijen ürünleri (*reactive oxygen species*, ROS), basitçe dış orbitallerinde eşleşmemiş elektron taşıyan moleküller olarak tanımlanır (44,45,46,47). Bu özellikleri nedeniyle de kimyasal olarak oldukça reaktif ürünlerdir. Bilinen en önemli serbest oksijen radikalleri; süperoksit anyonu ( $\cdot O_2^-$ ), hidroksil radikali ( $OH\cdot$ ), hidrojen peroksit molekülü ( $H_2O_2$ ), hidroperoksit ( $HO_2\cdot$ ), tekil (singlet) oksijen ( $^1O_2$ ), ozon ( $O_3$ ), nitrik oksit radikali ( $NO\cdot$ ) ve hipoklorik asit ( $HOCl\cdot$ )'dir (48,49). Çeşitli enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşabilen bu ürünlerin organizmadaki en önemli kaynağı elektronların mitokondrideki elektron transport zincirinde (ETZ) taşınması sırasında oluşan elektron kaçaklarıdır (46). ROS yapılarında taşıdıkları eşleşmemiş elektron nedeniyle oldukça kararsız yapıda olduklarından, kararlı duruma geçmek için çevrelerindeki her yapıyla reaksiyona girerek bunları hasarlayabilirler. Öncelikli hedefleri ise lipidler, nükleik asitler ve proteinlerdir (46).

Egzersiz serbest oksijen radikallerinin arttığı fizyolojik bir durumdur. Egzersizle birlikte tüketilen oksijen miktarı 100 kat artabilmekte ve buna bağlı olarak üretilen serbest oksijen radikal miktarı da artmaktadır (50). Dolayısıyla üretilen ROS miktarı yapılan egzersizin şiddetine, süresine ve türüne de bağlıdır. Egzersizle ortaya çıkan ROS artışının kaynağı olarak gösterilen en önemli yolak ETZ'de olan elektron kaçaklarıdır. Egzersiz sırasında, özellikle kas dokusunda artan oksijen tüketiminin doğal sonucu olarak mitokondriyal ETZ sisteminden elektron kaçakları artmakta ve sonuçta ROS üretiminde belirgin bir artış oluşmaktadır. Egzersizde ortaya çıkan ROS artışına neden olabilecek diğer bir sistem ksantin oksidaz enzim sistemidir. Ksantin oksidaz, iskemi-reperfüzyon hasarında artan ROS üretiminden sorumlu tutulan temel

enzim sistemini oluşturur. Egzersiz sırasında, egzersize katılan kasların kan akımında artış oluşmasına rağmen, kas kontraksiyonu esnasında ve izometrik türdeki egzersizler sırasında, kas kan akımı geçici olarak azalmaktadır. Ayrıca sindirim sistemi organları ve böbrekler de, egzersiz sırasında kan akımının azalma gösterdiği diğer dokulardır. Kan akımının azalması ve dokunun yeterince oksijenlenememesi ksantin oksidaz enzim aktivasyonuna yol açmakta, kanlanma yeniden sağlandığında dokuya ulaşan bol miktardaki oksijenin varlığında ise ksantin oksidazın katalize ettiği bir dizi reaksiyon sonucu bol miktarda ROS üretimi gerçekleşmektedir (13).

Egzersiz sırasında lökosit aktivasyonu ve inflamatuvar yanıtı benzer reaksiyonların oluştuğu bilinmektedir. Lökosit aktivasyonu sonucu, miyeloperoksidaz ve NADPH oksidaz enzimleri tarafından da üretilen ROS, egzersizde artan oksidan stresin bir diğer kaynağı olarak gösterilmektedir (13).

Yukarıda söz edilen ve ROS oluşumuna sebep olan temel mekanizmaların dışında; egzersiz sırasında ROS oluşumuna kaynaklık eden farklı mekanizmalar üzerinde de durulmaktadır. Egzersiz sırasında artan kan akımı nedeniyle iskelet kası ve damar endotelinde artan NO üretimi, yine egzersizde artan katekolaminlerin otooksidasyonu sonucu oluşan süperoksit radikali gösterilen kaynaklar arasındadır (13).

#### **2.1.6.2. Böbrekte ROS Kaynakları**

Böbrekleri de içeren birçok doku hasarında ROS'un, önemli rol oynadığını gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur (8,51). ROS'un akut böbrek yetmezliği, tübülointerstisyel hastalıklar, immün ve non-immün hasar patogeneziindeki rolü gösterilmiştir (52,53). Serbest radikallerin üretimi, prostaglandin sentezi, siklik nükleotid metabolizması gibi çeşitli metabolik yollara etki ederken, aynı zamanda, bazal membran hasarına ve vasküler yatağın geçirgenliğinde değişikliklere de neden olmaktadır (10,54).

Makrofaj ve nötrofiller böbrekte üretilen ROS için önemli bir kaynak oluştururlar. Bu hücrelerden büyük miktarda ROS üretimi, çeşitli immün reaktantlar tarafından tetiklenebilir. Solunumsal patlamaya neden olan immün reaktantlar arasında kompleman 3b reseptörü ve çeşitli kompleman komponentleri, immün kompleksler, anti-nötrofil otoantikorlar, zimozan sayılabilir. Proliferasyon ve eksüdasyon ile karakterize olan glomerülo nefrit gelişiminde önemli rol oynayan ROS kaynağı olarak aktive nötrofil ve makrofajlar gösterilmektedir (55,56). Lökositlerin ROS oluşturmasında temel rolü olan NADPH oksidaz enzimi daha ileride tartışılacaktır.

Fagositlerin yanı sıra izole glomerül hücreleri ve mezengiyal kültür hücrelerinin çeşitli uyarılara yanıt olarak ROS üretebileceği de gösterilmiştir (52,54). Adriyamisin veya puromisin aminonükleosidi kullanılarak oluşturulan nefrotik sendrom modellerinde izole glomerül hücrelerinde ROS üretiminin

arttığı *in vitro* olarak tespit edilmiştir (57). Öte yandan normal glomerül hücrelerinin de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretebildiği *in vivo* olarak gösterilmiştir (10). Aynı zamanda glomerüler hücreler özellikle de mezengiyal hücreler, hücre membranları zarar gördüğünde yüksek düzeyde ROS üretimi yapabilirler. Mezengiyal hücrelerin opsonize zimosan, platelet aktive edici faktör ve immün kompleksleri içeren çeşitli uyarılara yanıt olarak büyük miktarda süper oksit radikali ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretebildiği gösterilmiştir (57).

Böbrekte süperoksit radikali üretimini katalizleyen bir diğer enzim sistemi de ksantin oksidazdır. Ksantin oksidaz enzimi, iskemi reperfüzyonda ROS üreten önemli bir kaynaktır. İskemi reperfüzyon sürecinde böbrekte ksantin oksidaz aktivitesinin arttığı ve inhibitörü olan allopurinol ile aktivitenin ve ROS üretiminin inhibe edildiği gösterilmiştir (58). Bu enzim ile ilgili olarak da ayrıntılı bilgi ileride verilecektir.

### **2.1.6.3. Reaktif Oksijen Ürünlerinin Proteinüri Oluşumundaki Rolünü Gösteren Çalışmalar**

Serbest oksijen radikallerinin çeşitli böbrek hastalıklarında rol aldığı artık çok iyi bilinen bir süreçtir. Böbrek hastalığı oluşuktan sonra veya henüz oluşmadan da proteinüriye neden olduğu onlarca çalışma ile kanıtlanmaya çalışılmıştır. Patogenezinde ROS'un rol oynadığı gösterilen böbrek hastalıkları arasında glomerüler hastalıklar (minimal değişim hastalığı, membranöz glomerülonefrit, nötrofil bağımlı hasar), iskemik veya toksik akut böbrek yetmezliği, obstrüktif nefropati, progressif renal yetmezlikler yer almaktadır (59). Fakat olaya proteinüri açısından bakılınca, ROS'un öncelikle böbrek hasarı oluşuktan sonra mı proteinüriye yol açtığı, yoksa çeşitli yollarla hastalık süreci oluşturmadan da proteinüri yapıp yapmayacağına insanlardaki çalışmalardan ulaşmak olası değildir.

Bundan dolayı ROS'un proteinüri oluşturmadaki rolü çeşitli hayvan modelleri ile açıklanmaya çalışılmıştır. Nötrofil bağımlı glomerüler hasar anti-GBM antikor modeli (60), membranöz nefropati ise pasif Heyman nefriti modeli (60,61) ile benzerlik gösterdiğinden daha mekanizmaya yönelik çalışmalar yapılabilmektedir. Bunların dışında klinik açıdan bir modeli yansıtmasa da sıçanlarda gentamisin (62), daunomisin (63), adriamisin (64), puromisin aminonükleozid (65) ve kobra zehiri faktörü (66) ile oluşturulan nefrotoksisite patogeneziinde oksidan stresin önemli ölçüde yer teşkil ettiği gösterilmiştir. Bu modellerde oluşan proteinüri büyük ölçüde ROS'a bağlanmıştır. Çeşitli nefrotoksisite modelleri yanında immün komplekslerle yaratılan modellerde de proteinüri ve ROS ilişkisinin üzerinde durulmuştur (67,68,69). Bu tartışılan modellerin çoğunda oluşan ROS'ların kaynağı olarak öncelikle lökositler gösterilmiş ve çeşitli faktörler sonucu aktive olmalarıyla proteinüri başta olmak üzere doku hasarını başlattıkları ifade edilmiştir (58,60,70,71).



Yukarıda sözü edilen çalışmalarda proteinüriye ROS artışının eşlik ettiğinin gösterilmesi, çalışmaların seyriyi oluşturan ROS'un antioksidanlarla ortadan kaldırılması ve proteinürideki değişikliklerin izlenmesi yönüne kaydırmıştır. İmmunolojik veya toksik maddeler aracılığıyla yaratılan hayvan modellerinde antioksidan enzim olan süperoksit dismutazın (SOD) ve/veya katalazın (63,64,71,72) verilmesi, vitamin E başta olmak üzere çeşitli antioksidan vitaminlerin verilmesi (60,67,68,74) ya da çeşitli radikal süpürücülerin kullanılması (60,61,63,66,69), proteinüriyi önemli şekilde azaltmıştır. Hayvanlarda diyetel olarak yaratılan antioksidan vitamin eksikliği de proteinüri miktarının artmasıyla sonuçlanmıştır (72).

ROS ve proteinüri arasındaki en güçlü bağlantı ise oksidan ürünlerin doğrudan uygulanması ile yapılan çalışmalar sonucu ortaya konmuştur. İzole glomerüllerin ksantin oksidaz enzimine maruz bırakılmasıyla oluşan ROS'un hızla albumin geçirgenliğini arttırdığı ve bunun SOD ile önlendiği gösterilmiştir (72). Yoshioka ve arkadaşları (10) ise sıçanlara renal arter yoluyla uyguladıkları H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin, doz bağımlı proteinüriye neden olduğunu ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verilmesinin kesilmesi ile kısa sürede normale döndüğünü göstermişlerdir (10). Akut ve kısa süreli ROS artışının, glomerül yapısında herhangi bir bozukluk yaratmadan, moleküllere karşı boyut seçiciliğinde artış neden olarak proteinüri oluşturduğu ifade edilmiştir.

Bu konuda yapılan detaylı çalışmaların sonucu hangi kaynaktan gelirse gelsin, ROS'un proteinüriye neden olduğu artık kabul gören bir görüştür.

#### **2.1.6.4. Reaktif Oksijen Radikallerinin Glomerüler Hasar Oluşturma Mekanizmaları**

ROS'un glomerüler hasar oluşturucu etkisi bir çok deneysel nefrit modelinde gösterilmiş, bunlardan ön plana çıkanlardan aşağıda söz edilmiştir.

1- ROS'un lipid peroksidasyonuna neden olarak doğrudan hücresel hasarlanmaya neden olabileceği bilinmektedir. Hücre membranında ROS'un oluşturduğu lipid peroksidasyonu, glomerüler bazal membranı direkt hasarlayabilir (57,60). Bunun yanında lipid peroksidasyonu ile aktive olan metalloproteinaz ve gelatinaz gibi enzimler GBM'da degradasyon yaparak proteinüriye katkıda bulunurlar (57,60,74). Oluşan degradasyon sonucu glikozaminoglikanların kaybı, GBM'nın negatif yüklerinin azalmasına dolayısıyla proteinlere geçirgenliğinin artmasına neden olur (57). Ayrıca deneysel olarak LPO aracılığıyla kollajen gen ekspresyonunun arttığı, sıçan mesangial hücrelerindeki tip I ve tip IV kollajen birikimi sonucu tübülointerstisyel fibrozis geliştiği tespit edilmiştir (60).

2- ROS'un, glomerüler hasar oluşturma mekanizmalarından bir diğeri, GBM bileşenlerinin proteolitik hasara yatkınlığını arttırmalarıdır (60,74). Bunu özellikle nötrofillerdeki elastazın primer düzenleyicisi olarak kabul edilen ve

$\alpha_1$ -proteinaz inhibitörü olarak işlev gören,  $\alpha_1$ -antitripsini inaktive ederek yaparlar. Böylece serbestleşen elastaz, ekstrasellüler matrikste daha kolay hasar oluşturur. Öte yandan proteoglikanların *de novo* sentezini de azaltarak hasarlanmanın devamına katkıda bulunurlar (60).

3-ROS, etkilerini gen transkripsiyonu üzerinden de gösterebilmektedirler. ROS'un gen transkripsiyonunda rol aldığı ve bunu nükleer faktör kappa B (NF-kB) üzerinden gerçekleştirdiği bilinmektedir. Bu faktörün aktivasyonu sonucu sentezlenen kemokinler ve inflamatuvar moleküller (monosit kemoatraktan protein-1, IL-6, GM-CSF, PDGF) aracılığıyla oluşan makrofaj ve T hücre infiltrasyonunun glomerüler hasar gelişimine katkıda bulunduğu savunulmaktadır (60).

4- ROS'un glomerüler hemodinamik süreçlere etkisi de üzerinde durulan bir konudur. Böbrek kan akımının sürdürülmesinde çok önemli görevleri olan prostaglandinler ve nitrik oksit ROS saldırılarından etkilenebilmektedir. ROS'un doz bağımlı olarak glomerüler PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> , TxB<sub>2</sub> oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir. Bu durum ROS'un kullanıma sunulan araşidonik asit miktarını arttırmasından kaynaklanmaktadır. Diğer yönden nitrik oksitin, serbest radikaller ile etkileşime girmesi, çok zararlı bir radikal olan peroksinitrit oluşumuna neden olmakta, aynı zamanda, NO'nun biyoyararlanımı da engellenmektedir (58).

#### **2.1.6.5. Egzersiz Proteinürisi Oluşumuna Oksidan Stresin Etkisi**

Serbest radikallerin protenüriye seyreden bir çok böbrek patolojisinde etkin rol oynadığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (57,61). Egzersiz ve oksidan stres arasında yakın bir ilişkinin olduğu da bilinmektedir (6,14,71,75). Egzersizle birlikte tüketilen oksijen miktarının çok artmasına bağlı olarak, üretilen serbest oksijen radikal miktarı da artmaktadır. Yüksek oksijen tüketimi nedeniyle mitokondriden kaynaklanan serbest radikallere ek olarak (75) iskemi-reperfüzyon süreci (14) ve lökosit aktivasyonu (76), egzersize bağlı artan ROS kaynaklarını oluşturmaktadır.

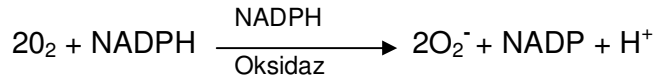
Egzersiz oksidan stresi arttırması ve çeşitli koşullarda oluşan oksidan stresin proteinüriye sebep olabilmesi gibi iki farklı taraftaki bilgi birikiminden yola çıkarak egzersizde oluşan oksidan stresin, egzersiz proteinürisine katkıda bulunabileceğini ileri süren ilk çalışmamızı sıçanlarda gerçekleştirdik (6). Sedanter sıçanlarda tek doz tüketici koşu egzersizinin proteinüriye neden olduğunu, egzersiz öncesi bir ay süreyle uygulanan antioksidan tedavinin ise egzersizin neden olduğu proteinürinin yanı sıra serum ve böbrekte meydana gelen oksidatif stresi de önlediğini gösterdik. Ancak insan ve sıçanın böbrek fonksiyonları (77,78) ve antioksidan savunma düzeyleri (79) arasında bazı önemli farklılıklar bulunmasından dolayı (77,78) elde edilen bu sonuçların insanlara atfedilmesi mümkün olmayabilir. Bundan dolayı, egzersiz sırasında oluşan serbest oksijen radikallerinin sedanter ve antrene insanlarda da egzersize bağlı proteinüri oluşumuna katkısını inceledik. Bu çalışmada sedanter ve antrene bireylerde egzersiz sonrası 30. dakika, 2, 4, 8 ve 24.

saatlerde alınan idrar örneklerinde protein düzeyleri ölçüldü. Literatürdeki bulgularla uyumlu olarak egzersiz sonrası 30. dakika idrar protein düzeyinde belirgin artış saptandı. Ara ölçümlerde proteinüri gözlenmemesine rağmen 24. saatte tekrar idrar protein atılımında yeni bir artış tespit edildi. 24. saatte oksidatif stres göstergeleri de proteinüriye eş zamanlı artışlar göstermesi, mekanizmanın insanlarda da geçerli olabileceğini ortaya koyması bakımından ilk sonuçları verdi. İnsan çalışmamızın ikinci aşamasında ise iki aylık antioksidan tedavi ile bireylerin antioksidan kapasiteleri güçlendirilip tekrar tüketici egzersiz protokolü uygulandı. Antioksidan vitamin tedavisi sedanter ve antrene grubun her ikisinde de hem oksidan stres hem de 24. saatte gözlenen proteinüri oluşumu engellendi. Bu sonuçlara göre egzersizden hemen sonra (30 dk içinde) görülen proteinürinin, literatürde de sıklıkla gösterildiği gibi hemodinamik mekanizmalara bağlı olduğu, fakat 24. saatte ortaya çıkan ikinci faz proteinürinin oksidan stresten kaynaklandığı ve bunun da antioksidan tedavi ile önlenemediğini gösterdik.

Hem sıçanlarda hem de insanlarda egzersiz sonucu oluşan oksidan stresin egzersiz proteinürisine neden olabileceğini göstermemizin yanında, bu çalışmalar, proteinüriye neden olan oksidan stresin hangi mekanizmalardan kaynaklandığını açıklayamamaktadır.

## 2.2. NADPH Oksidaz Sistemi

NADPH oksidaz (NOX), NADPH'ı kullanarak bir elektron indirgenmesi sonucu oksijenin  $O_2^-$  haline dönüşümünü sağlayan hücre zarında yer alan bir enzimdir. NADPH oksidaz enziminin katalizlediği reaksiyon şu şekildedir.



NADPH oksidaz, ROS üretiminden sorumludur. Fagositlerdeki NADPH oksidaz süperoksit anyonu ve diğer ROS türlerini üreterek mikrobiyal patojenlere karşı savunmada kilit rolü oynar. Bununla birlikte ROS salınımının artışı çevre dokulara da hasar vermektedir. Aktif NADPH oksidaz çeşitli alt birimlerden oluşur. Dinlenimde bu alt birimler ayrı ayrı iken enzim aktive olduğunda birleşerek membrana lokalize olurlar (56).

### 2.2.1. Yapısı

NADPH oksidaz membranöz veya sitozolik yerleşim gösteren altı alt birimden oluşur. Membranöz alt birimleri flavositokrom  $b_{558}$  olarak adlandırılan gp91phox ve p22phox'tur. Sitozolik alt birimler ise p47phox, p67phox, p40phox ve Rac1 veya Rac2'dir. Flavositokrom  $b_{558}$ , oksidazın merkezi membranöz birimidir. Glikozillenmiş 91-kDa altbirim (gp91phox) ve glikozillenmemiş 22-kDa (p22phox) alt birimlerinin 1:1 kompleksidir. P47phox, oksidaz aktivasyonunda sitozolik kompleksin sitozolden membrana transportundan sorumludur ve NADPH oksidaz alt birimlerinin

düzenleyicisidir. *In vivo* koşullarda p47phox fosforillenmeden bu olay gerçekleşmez (56).

### 2.2.2. Tipleri

NADPH oksidaz ailesi, fizyolojik rolleri reaktif oksijen ürünleri oluşturmak olan yegane enzim ailesidir. Şu an bilinen 7 üyesi vardır. NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 ve DUOX2'dir (80).

**NOX1**, en fazla kolonda olmak üzere uterus ve prostatda eksprese edilmektedir. Ayrıca damar düz kasında uyarılabildiği de belirtilmiştir (81). NOX1 fonksiyonu eksprese edildiği hücre tipine bağlıdır. Kolon bakterilere maruz kaldığından burada savunma fonksiyonu açıktır. Vasküler sistemde ise kan basıncı regülasyonunda rol aldığı ileri sürülmektedir. NOX1'in anjiyotensin aracılı indüksiyonu vasküler sistemde süperoksit radikali üretiminde artışa neden olmakta, bu durum NO'nun biyoyararlanımını azaltarak kan basıncında artış oluşturabilmektedir. Bu akut etkinin yanısıra süperoksitler, kas hücresi proliferasyonu uyararak uzun süreli etkiler de yaratmakta ve patolojik koşullar altında aterosklerozise yol açan olaylar dizisine katkıda bulunmaktadır (80).

**NOX2**, myeloid serinin beyaz kan hücrelerinde (nötrofil, monosit/makrofaj ve eozinofil) yer alır. NOX2, doğrudan veya myeloperoksidaz sistemi ile işbirliği sonucu, ROS oluşumunu sağlayarak mikroorganizmalara karşı savunmada yer alır. Kardiyovasküler hastalıklar, nörodejenarasyon (82), enfeksiyon gibi patolojik süreçlerde de NOX2 artmaktadır (80).

**NOX3**, iç kulaktaki işitsel ve vestibular sistemlerin duyuşal epitelyum ve gangliyonlarında yer alır (83). NOX3 yoksun farelerde otokonia oluşumu eksikliği ve sonradan gelişen denge problemleri bilinmektedir (84).

**NOX4**, böbrek korteksinde bol miktarda eksprese edildiğinden "*renox*" olarak ta bilinir. Şuana kadar tanımlanan NOX izoformları arasında en geniş ekspresyon alanına sahip olan tiptir. Böbreğin yanısıra, NOX4 ekspresyonu astrositler, fibroblastlar, osteoklastlar, testis, over, iskelet kası, plesenta, pankreas ve kalpte tanımlanmıştır (85,86).

**NOX5**, lenfoid dokular ve testislerde bulunmuştur. NOX5 mRNA'sı doku lenfositlerinde bol iken dolaşım kanındaki lenfositlerde hemen hemen yoktur. Doku lenfositlerinde ve testislerde Ca<sup>++</sup> bağımlı ROS üretimine aracılık eder. Bu dokularda Ca<sup>++</sup> bağımlı ROS üretiminin fizyolojik fonksiyonu tam olarak anlaşılmiş değildir (87).

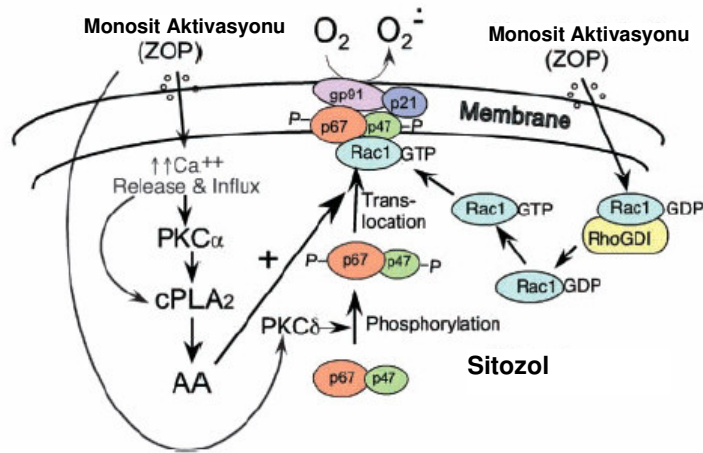
**DUOX1 ve DUOX2**'nin her ikisi de tiroid bezinde eksprese edilir. Tiroid oksidaz olarak da söz edilmektedir (88). Memelilerde DUOX enzimleri tiroid ile sınırlı değildir. DUOX1 solunum epitelyumunda, DUOX2 de tükürük bezleri

ve rektal bezlerin epitelinde çok miktarda eksprese edilir. Memelilerde DUOX1 ve DUOX2'nin tiroid hormon sentezinde görevli olduğu, solunum epitelinde ve gastrointestinal epitelde ise savunma mekanizmasında rol oynadığı düşünülmektedir (89).

### 2.2.3. Nötrofillerde NADPH Oksidaz Aktivasyonu

Nötrofillerin hücre membranında yer alan NADPH oksidaz enzimi, süperoksit radikali oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır ve normal koşullarda aktif değildir. Fagositlerde, opsonize bakteri, opsonize zimozan, lateks parikülleri, komplement C5a, FMLP, lökotrien B4, para amino hüppirik asit, diaçil gliserol, kalsiyum iyonoforları gibi formillenmiş peptidler ve porbolmiristat asetat gibi PKC aktivatörleri ile NADPH oksidaz aktivasyonunu uyarılmaktadır. Anjiyotensin II de vasküler düz kas hücrelerinde bu enzim aracılığıyla süperoksit üretimini uyarılmaktadır.

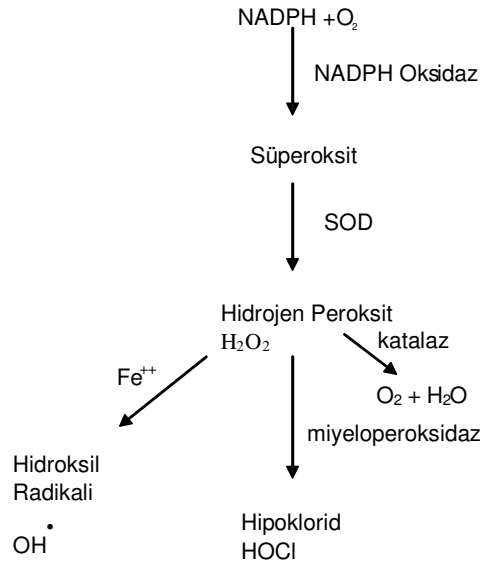
İki olay NADPH oksidaz aktivasyonuna eşlik eder: *i)* protein fosforilasyonu *ii)* sitozolik alt birimlerin membrana transloke olması. Çeşitli uyaranlarla sensitize olduğunda ilk olarak sitozolik alt birimlerden p47phox ve p67 phox fosforillenir. Fosforillenen alt birimler membrana göç ederek yerleşirler. Q Li ve arkadaşları (55), monosit aktivasyonunun iki yolla NADPH oksidaz aktivasyonuna neden olduğunu göstermiştir. Birincisi monosit aktivasyonunun protein kinaz C zeta aracılı etkisidir ve NADPH oksidazın sitozolik alt birimlerinin fosforilasyonuna neden olmaktadır. İkinci etkisi ise hücre içi kalsiyum artışı aracılı yaptığı etkidir; monosit aktivasyonu hem ekstraselüler ortamdan hem de hücre içi depolardan sitoplazmaya kalsiyum girişine neden olmaktadır. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonundaki artış protein kinaz C $\alpha$  aktivasyonuna ve ardından sitozolik fosfolipaz A2 aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu enzimin ürünü olan araşidonik asit, NADPH oksidazın fosforillenen sitoplazmik alt birimlerinin membrana translokasyonuna neden olmaktadır (55).



Şekil-2.1. Monositlerde NADPH oksidaz aktivitesi (55)

## 2.2.4. NADPH Oksidaz ve Solunumsal Patlama

ROS oluşturan pek çok mekanizma içinde NADPH oksidaz birçok hücrede süperoksit anyonu için major kaynaktır. Nötrofiller, monositler, makrofajlar ve eozinofiller çeşitli uyarılar ile sensitize olarak süperoksit radikali, hidroksil radikali, hidrojen peroksit ve hipokloroz asit gibi toksik oksijen metabolitleri üretirler. Hücre zarına bağlı ve normal koşullarda inaktif olan NADPH oksidaz çeşitli etkenlerle aktive olduğunda moleküler oksijenden süperoksit radikali ve hidrojen peroksit yapımını kısa sürede ve çok fazla miktarda katalizler. Bu olaya solunumsal patlama denir. Oluşan toksik oksijen ürünleri ve granüllerden salınan proteolitik enzimler nötrofiller için çok etkili bir öldürme silahı halini alır. Uyarılan fagosit oksidatif patlama süresince süperoksit üretimi  $10 \text{ nmol/dk}10^6$  nötrofil olarak belirlenmiştir (90).



Şekil 2.2. NADPH Oksidaz aracılı oluşan solunumsal patlama mekanizması

## 2.2.5. NOX Ailesi ve ROS'un Diğer Etkileri

Fagosit olmayan birçok hücrede de NOX aracılığı ile ROS üretimi tanımlanmıştır. Savunma fonksiyonu olmayan hücelerde üretilen ROS'un amacı konusu henüz tam olarak netleşmemiştir. Bu konuda ileri sürülen görüşler; NOX ile oluşan reaktif oksijen ürünlerinin, tiroid hormonunun sentezinde, fibroblastlarda protein sentezini ve hücre bölünmesini düzenleyen transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunda, damar düz kasında ise tonüsün düzenlenmesinde rol alabileceğidir (56).

## 2.2.6. NOX İnhibitörleri

Birçok NADPH oksidaz enzim inhibitörü tanımlanmıştır. Nitrik oksit (91), steroidler (92), adrenalin (93), interlökin-10 (94) ve interlökin-4 (95) NADPH oksidaz enzimini inhibe eden endojen biyolojik moleküllerdir. Aynı zamanda farmakolojik inhibitörü vardır. Bunlardan en çok bilineni diphenylene iodonium (DPI)'dur. DPI gp91phox ile elektron transportunu inhibe eder. Diğer farmakolojik inhibitörler arasında, apocynin, pheynlarsine oxide, 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride ve N- $\alpha$ -tosyl phenylalanine chloromethyl ketone bulunmaktadır (56).

## 2.2.7. Egzersiz ve NOX

Egzersiz sırasında ROS oluşumunu sağlayan mitokondriyal mekanizmalar dışında ön plana çıkan iki kaynaktan biri NOX ailesidir. Şiddetli fiziksel aktivite ile yüklenmelerin organizmada oluşturduğu reaksiyonlar bir çok yönden inflamasyona benzerlik gösterir. Burada kilit rolü egzersiz sırasında düzeyi artan interlökin-1'in oynadığı varsayılmaktadır. İnterlökin-1'in lökositleri aktive edici etkisi oldukça güçlüdür. Sonuç olarak egzersize bağlı gerçekleşen lökosit aktivasyonu, NOX enzimi aracılığıyla ROS üretimini gerçekleştirmektedir. Egzersiz sırasında aktif olmayan organlarda (beyin, karaciğer, böbrek gibi), egzersiz sonrasında lipid peroksidasyonunun artmış olmasının sebeplerinden biri aktive lökositlerin tüm organizmaya dağılarak NOX aracılığıyla çok miktarda ROS üretmeleridir. Diğer yönden egzersiz bitiminden sonra bile uzun süre ROS üretiminin devam etmesinden de NOX sorumlu tutulmaktadır. Bir çok çalışmada 24 saat sonra bile NOX aracılığıyla ROS oluşumunun devam ettiğinin gösterilmesinin yanında, bu etkinin 5 güne kadar uzadığını ifade edenler de vardır. Ayrıca yanıtın Vitamin E ile zayıflatıldığı da gösterilmiştir (13, 96,97).

## 2.3. Ksantin Oksidoredüktaz Sistemi

Ksantin oksidoredüktaz, pürin katabolizmasında görev yapan kompleks bir enzim olup. Hipoksantin/ksantinden ürik asit oluşumunu katalizler (98).

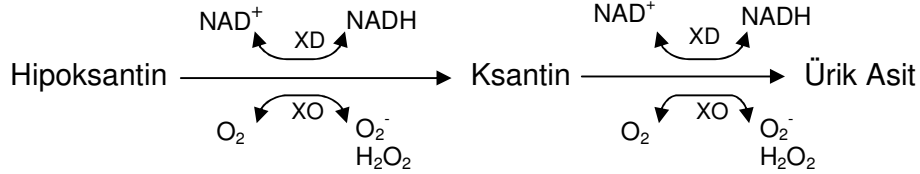
### 2.3.1. Yapısı

Ksantin oksidaz (XO) ve ksantin dehidrogenaz (XD) enzimlerinin her ikisi de molibdenyum hidroksilaz flavo protein ailesi üyesidir. Bu iki enzim formu ve reaksiyonlarından genellikle "*XOR aktivites*" olarak söz edilir. Ksantin oksidaz yaklaşık olarak 300 kDa ağırlığında olup homodimer yapıdadır. Her bir ünitesi molibdenyum kofaktör, flavin adenin dinükleotid (FAD) ve iki adet demir sülfür molekülü içerir (98).

Bakteriden insana kadar geniş bir dağılım gösteren (98) XOR'ın, katalitik özellikleri, kofaktörleri ve temel düzenlenmeleri rat, fare ve insanda yaklaşık olarak %90 oranında benzerlik göstermektedir (99,100). İnsanda XOR geni 22. kromozomun kısa kolunda bulunur ve yaklaşık olarak 60000 bp büyüklüğündedir (98).

### 2.3.2. Görevleri

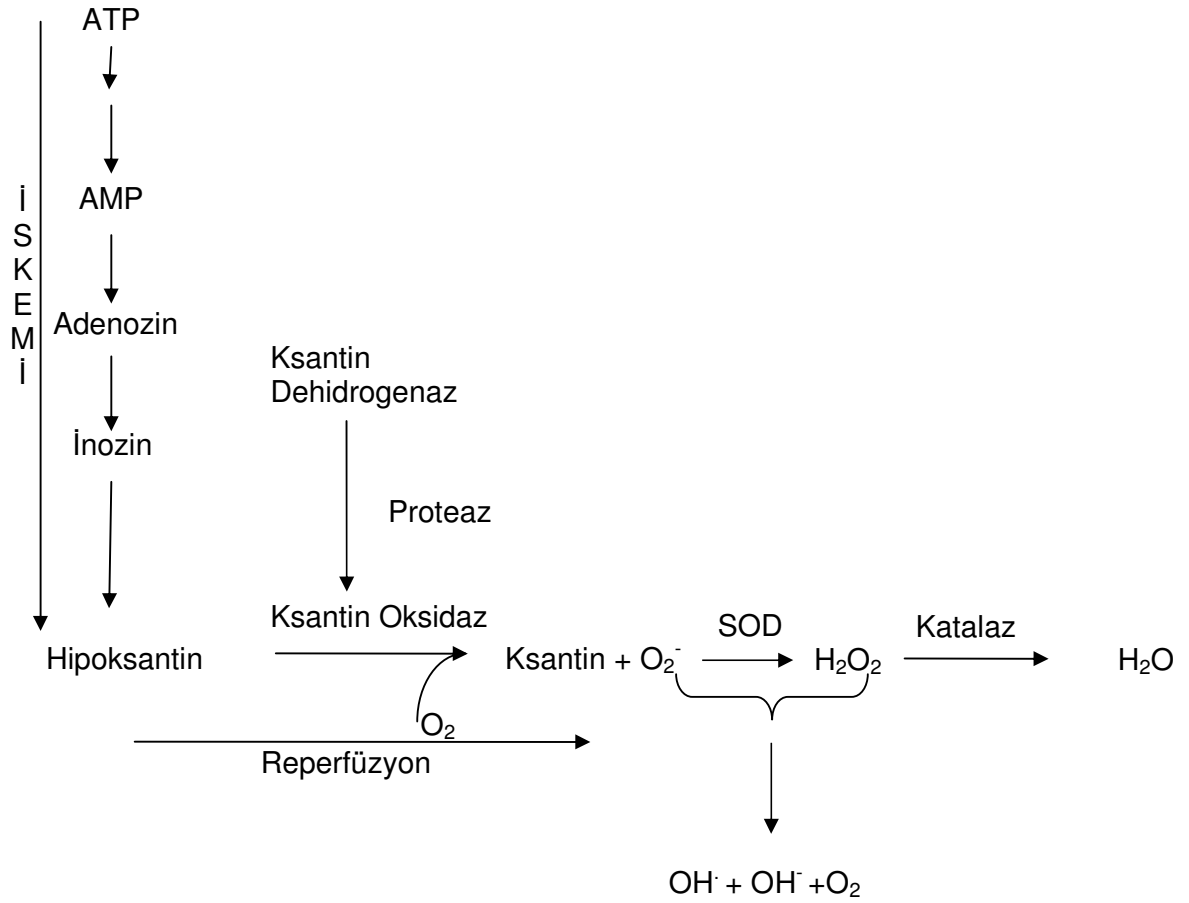
Fizyolojik koşullarda hücrede esas olarak enzimin XD formu bulunur. XD elektron alıcısı olarak  $\text{NAD}^+$  kullandığı için metabolitleri zararlı değildir. İskemik dokularda XD formu XO formuna dönüşür ki, XO formu elektron alıcısı olarak moleküler oksijeni kullanır. Bu reaksiyon sonucunda süperoksit ve hidrojen peroksit oluşur. Oluşan reaktif oksijen türleri ve süperoksit radikali hücre için zararlı olabilir.



Şekil 2.3: XD ve XO aracılığıyla hipoksantinden ürik asit oluşumu (98)

Granger ve arkadaşları XO'nun, iske mi-reperfüzyon patogene zinde kilit rol oynadığını belirtmektedirler (101). Dokulara kan akımının ATP oluşturamayacak kadar azalması sonucu trans-membran iyon gradiyenti yok olur. Bunun sonucunda, hücre içi kalsiyum konsantrasyonun artışı, XD formunun, XO formuna geri dönüşümsüz olarak çevrimine neden olan proteazları aktive eder (101). Ayrıca hücre içi ATP düzeylerinin azalması, AMP konsantrasyonunun artmasına neden olur. AMP, sırasıyla adenosin, inozin ve hipoksantine yıkılır. Sonuç olarak, iske mi sırasında ksantin oksidaz enzimi aktive olur ve enzimin substratı ortamda hazır hale gelir. Reperfüzyon sürecinde tekrar oksijene maruz kalınmasıyla XO ve hipoksantin birlikte süperoksit ve hidrojen peroksit üretir. Bu reaktif oksijen türevleri hidroksil radikalleri ile de etkileşerek serbest radikal oluşumuna katkıda bulunur (Şekil-2.4). Bir çok çalışmada barsak (101), böbrek (101) ve karaciğerde (101) iske mi reperfüzyon hasarında XO'nun rolü gösterilmiştir. XO, allopurinol veya oksipurinol gibi spesifik inhibitörlerle inhibe edildiğinde ise hasarda azalma olduğu ortaya konmuştur.





Şekil 2.4: XO'nun iskemi-reperfüzyondaki rolü (98)

### 2.3.3. Dağılımı

Yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda XO'a karşı oluşan antikolar ile bu enzimin hücresel lokalizasyonu saptanmaya çalışılmıştır. Bu çalışmaların sonucunda en yüksek XO konsantrasyonu barsak ve karaciğerde bulunmuştur. Eritrositlerde, jejunumun goblet hücrelerinde, meme bezinde, iskelet kasında, böbrek ve jejunumun kapiller endotel hücrelerinde XO aktivitesi tespit edilmiştir (101).

### 2.3.4. Hücre İçi Dağılımı

XO hücrede sitoplazmada yer almaktadır. Fakat poliklonal XO antikolarıyla yapılan çalışmaların sonucunda, XO'ın sadece sitoplazmada değil hücre membranının dış yüzeyinde de var olduğu gösterilmiştir. İnsanlarda, endotel ve epitel hücrelerde XO intraselüler veziküller içinde bulunmaktadır. Fonksiyonu tam olarak bilinmese de hücreden sekrete edilmek üzere depolandığı düşünülmektedir (101).

### **2.3.6. XOR ve Egzersiz**

XOR enzim sistemi, egzersiz sonrası mitokondri dışı kaynaklar aracılığıyla ROS oluşumuna katkıda bulunduğu kabul edilen diğer önemli mekanizmadır. XD'in egzersiz sonrasında kaslarda XO haline gelmesi özellikle izokinetik kasılmalar, hipoksik ortamda fiziksel aktivite veya kan akımının bir şekilde bozulması sonucu olmaktadır. Böylece iskemi-reperfüzyon benzeri bir süreç oluşmakta ve XO dönüşümü tetiklenmektedir. Ayrıca şiddetli fiziksel aktivite sırasında kan akımı oldukça azalan karaciğer, barsaklar, böbrek gibi organlarda da iskemi-reperfüzyon sonucu XO şekline dönüşüm olabileceği ifade edilmektedir (13).

### **2.4. Hipotez**

İnsanlarda olduğu gibi deney hayvanlarında da, fiziksel egzersiz sonucu idrarla çıkan protein miktarının artmasıyla, geriye dönüşebilir egzersiz proteinürisinin geliştiği gösterilmiştir. Egzersiz proteinürisi oluşumunda öne çıkan mekanizmalar, proteinlerin tübüler geri emiliminin doygunluğa ulaşması ve glomerüler geçirgenliğin artışıdır. Bunun yanında bölümümüzde yapılan çalışmalarda egzersiz proteinürisine, egzersiz sırasında artan oksidan stresin de neden olabileceği gösterilmiştir. Ancak egzersiz proteinürisine neden olan oksidan stresin kaynağı hakkında herhangi bir bilgi yoktur.

Bu bilgiler doğrultusunda araştırmamızı aşağıda verilmiş iki hipotezi test etmek için planladık.

1. NADPH oksidaz enzimi egzersize bağlı olarak aktive olup, egzersiz proteinürisine neden olur.
2. Ksantin oksidaz enzimi egzersize bağlı olarak aktive olup, egzersiz proteinürisine neden olur.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1.Gruplandırma, Egzersiz ve İnhibitörler İle Tedavi

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları, Merkez Biyokimya Laboratuvarları ve Deney Hayvanları Ünitesinde gerçekleştirilen bu çalışmada 73 adet genç erişkin dişi Wistar sıçan kullanıldı. Çalışma boyunca, sıçanların bulunduğu ortam ısısı  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de sabit tutularak 12 saat aydınlık 12 saat karanlık döngüsü uygulandı. Tüm hayvanlar deney süresince standart ticari sıçan yemi ile beslendiler ve musluk suyu içtiler.

#### 3.1.1 Gruplandırma

Sıçanlar araştırmannın başında rasgele, NADPH oksidaz çalışması ve XO çalışması için iki ana gruba ayrıldılar. Daha sonra yine rasgele olmak üzere her bir grup kendi içinde yeniden, aşağıda gösterildiği şekilde alt gruplara ayrıldı:

##### 1- NADPH Oksidaz Çalışması

- 1- Kontrol grubu (K) (n=10)
- 2- Egzersiz grubu (E) (n=10)
- 3- NADPH oksidaz inhibitörü verilen grup (İ) (n=7)
- 4- NADPH oksidaz inhibitörü verilen egzersiz grubu (E-İ) (n=7)

##### 2- XO Çalışması

- 1- Kontrol grubu (K) (n=9)
- 2- Egzersiz grubu (E) (n=9)
- 3- XO inhibitörü verilen grup (İ) (n=8)
- 4- XO inhibitörü verilen egzersiz grubu (E-İ) (n=8)

#### 3.1.2. Egzersiz Protokolü

Egzersiz işlemi Fizyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında bulunan, elektrikli motor sürücülüğünde dönen May marka (TME 9805, Ankara), beş yollu sıçan koşu bandında gerçekleştirildi. Koşu bandı, sıçanların koşmasını motive etmek için kullanılmak üzere elektrik şok sistemi ile donatılmıştı. Egzersiz

protokolü, iki günlük alete alışma periyodunun ardından tüketici koşu egzersizi olarak uygulandı.

Tüketici egzersiz uygulamasında koşu bandının eğimi ve hızı aşağıda gösterildiği şekilde kademeli olarak artırılarak sıçanların doğrulma (denge) refleksi kayboluncaya kadar koşmaları sağlandı.

- %5 eğim ve 20 m/dk hızda 5 dk
- %10 eğim ve 20 m/dk hızda 10 dk
- %15 eğim ve 20 m/dk hızda 15 dk
- %15 eğim ve 24 m/dk hızda tükeninceye kadar.

### 3.1.3. Enzim İnhibitörleri İle Tedavi

**NADPH Oksidaz İnhibitörü İle Tedavi:** NADPH oksidaz inhibitörü olan difenileniyodonyum klorid (DPI) 4 gün boyunca ratlara 1.6 mg/kg (102) dozunda intravenöz olarak kuyruktan uygulandı. DPI'in son dozu, egzersiz yapan hayvanlara egzersizden bir saat önce verildi. DPI, deneklere verilmeden önce 100 µl DMSO'da çözüldü. Çözgen olarak kullanılan DMSO'nun ölçülen parametrelere etkisinin olup olmadığı ek bir çözgen grubu (n=5) oluşturularak test edildi.

**Ksantin Oksidaz İnhibitörü İle Tedavi:** Ksantin oksidaz inhibitörü olan oksipurinol 3 gün boyunca ratlara 40 mg/kg (103) dozunda intraperitoneal olarak uygulandı. Oksipurinolün son dozu, egzersiz yapan hayvanlara egzersizden 1 saat önce verildi.

## 3.2. Deneysel İşlemler

### 3.2.1. İdrarların Toplanması

İdrar protein ve kreatinin düzeylerinin değerlendirilebilmesi amacıyla tüm sıçanlar metabolik kafeslere yerleştirilerek 24 saatlik idrarları elde edildi. Egzersiz grubundaki sıçanlar tükenme egzersizlerinin hemen ardından metabolik kafeslere alındı. Metabolik kafeste kalma süreleri boyunca sıçanların yem almaları engellenirken, su alımları serbest bırakıldı. İdrarlar, kar içine yerleştirilen ve olası buharlaşmayı engellemek amacıyla içlerine 2 ml gliserin ilave edilen tüpler içerisinde toplandı. İdrar toplama periyodu sırasında ortam ısısı  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de tutuldu. 24 saatin sonunda elde edilen idrarların bir kısmı taze olarak kreatinin tayini için kullanılırken, bir kısmı da, daha sonra yapılacak olan total protein, mikroalbumin ve  $\beta_2$ -mikroglobulin ölçümü için derin dondurucuda  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

### 3.2.2 Deneyin Sonlandırılması

Metabolik kafeslerde 24 saatlik idrar toplama döneminin ardından eter anestezisi ile uyutulan sıçanların abdomenleri açıldı. Abdominal aortadan kanları heparinize (15IU/ml) bir şekilde alındıktan sonra dokular, pH'sı 7.4 olarak ayarlanmış krebs solüsyonuyla perfüze edildi ve sonrasında böbrek dokusu çıkarıldı. Doku örnekleri alındıktan hemen sonra kara gömülerek kısa sürede soğumaları sağlandı. Alınan kanlar lökosit sayımı ve izolasyonu, eritrosit TBARS düzeyi, tayini için taze olarak kullanıldı. Böbrekler daha sonra yapılacak olan doku TBARS, ksantin oksidaz ve NADPH oksidaz enzim aktivitelerinin ölçümü ve protein karbonilasyon tayini için -80 °C 'de saklandı.

### 3.3. İdrar Proteini Parametreleri

#### 3.3.1. İdrar Kreatinin Ölçümü

**Prencip:** İdrar kreatin düzeyi, Jaffe yöntemi esas alınarak spektrofotometrik yolla ölçülmüştür. Kreatinin alkali ortamda pikrik asitle birleşmesi sonucu açığa çıkan renk değişiminin 500 nm dalga boyunda verdiği absorbans değerlendirildi (104).

#### **Reaktifler:**

- 1) Pikrik Asit: 0.036 mol/L.
- 2) NaOH: 1.4 mol/L
- 3) Kreatinin standart solüsyonu: 100 ml distile su içerisinde 10 mg kreatinin çözüldü ve bundan 1/10 oranında dilüsyon ile elde edildi.

**İşlemler:** İdrarlar 1/50 oranında distile su ile sulandırıldı. Pikrik asit ve NaOH eşit oranda karıştırılarak çalışma solüsyonu hazırlandı. 1ml çalışma solüsyonuna 100 µl idrar örneği eklenerek 37°C'de 500 nm dalga boyunda 30. ve 60. saniyelerdeki absorbanslar ölçüldü. Ölçüm için Shimadzu UV 1600 marka spektrofotometre kullanıldı ve sonuçlar mg kreatinin olarak hesaplandı.

#### 3.3.2. İdrar Total Protein Tayini

**Prencip:** İdrarda total protein miktarını saptamak için Randox marka total protein kiti kullanıldı. Alkalin ortamda bulunan bakır iyonları proteinin peptit bağları ile ilişkiye girerek renkli kompleksler oluşturur. Oluşan bu kompleksler 546 nm dalga boyunda absorbans verir.

**İşlemler:** 1 ml reaktif, 200 µl idrar ile karıştırılarak 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu sürenin sonunda numunelerin absorbansı 546 nm dalga boyunda spektrofotometrik (Shimadzu UV 1600) olarak ölçüldü. Aynı idrar numunelerinden taze olarak kreatinin ölçümleri yapıldı ve sonuçlar mg/mg kreatinin olarak ifade edildi.

### 3.3.3. İdrar Albumin Tayini

**Prensip:** İdrarda mikroalbumin miktarını saptamak için Randox marka imminoturbidimetrik ticari mikroalbumin kiti kullanıldı. Spesifik albumin antikoru içeren reaksiyon tamponu ile numune etkileşime girdiğinde, antijen antikör reaksiyonu sonucu oluşan turbid solüsyon 340nm'de absorbands verir.

**İşlemler:** Bir mililitre reaksiyon tamponu, 100 µl idrar numunesi ile karıştırılarak 340 nm'de distile su körüne karşı spektrofotometrede okundu ve bu absorbands  $A_1$  olarak kaydedildi. Hızlı bir şekilde 100 µl antikör ilave edilerek oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Bu sürenin sonunda tekrar 340nm dalga boyundaki absorbands okundu ve  $A_2$  olarak kaydedildi (Schimadzu UV 1600). Bu absorbandslar kullanılarak  $\Delta A = A_2 - A_1$  formülünden hesaplandı. Kit içeriğinde mevcut olan standart için de aynı işlemler uygulandı. Aynı idrar numunelerinin taze olarak kreatinin ölçümleri yapıldı ve sonuçlar mg/mg kreatinin olarak ifade edildi.

### 3.3.4. İdrarda $\beta_2$ -Mikroglobulin Tayini

**Prensip:** İdrarda  $\beta_2$ -mikroglobulin düzeyi tayini Spinreact marka turbimetrik  $\beta_2$ -mikroglobulin kiti kullanılarak ölçüldü. Anti- $\beta_2$ -mikroglobulin ile kaplanan lateks partikülleri numune ile karıştırıldığında aglutine olur. Bu aglutinasyon,  $\beta_2$ -mikroglobulin içeriğine bağlı olarak 540 nm dalga boyunda absorbands değişikliğine neden olur.

**İşlemler:** 1ml reaktif solüsyonu 50 µl idrar numunesi ile karıştırılıp, 30°C ısı kontrollü spektrofotometrede 0. ve 3. dakikada 540 nm dalga boyunda absorbandslar okundu. Kit içerisinde mevcut olan standartlar kullanılarak idrar  $\beta_2$ -mikroglobulin düzeyi tespit edildi.

## 3.4. Oksidan Stres Parametreleri

### 3.4.1. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Ürünlerinin (TBARS) Tayini

**Prensip:** Stocks ve Dormandy yöntemi kullanılarak ölçüldü. Bu yöntem, lipid peroksidasyon ürünlerinin tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girerek oluşturduğu kompleksin 532 nm dalga boyunda maksimum absorbands vermesi ve bu absorbandsın ölçülmesi esasına dayanmaktadır (105).

#### 3.4.1.1. Eritrosit TBARS Tayini

##### Reaktifler:

- 1) Fosfat NaCl tamponu (pH 7.4): 0.5 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.15 M NaCl.
- 2) Trikloroasetik asit (TCA), distile su ile sulandırılarak %30'luk olarak hazırlandı.

- 3) Tiyobarbitürik asit, 5 g TBA ve 25 ml 1 N NaOH, distile su ile 500 ml'e tamamlandı.
- 4) Standart solüsyonu: Tetraetoksipropan stok solüsyonundan distile su ile sulandırılarak hazırlandı.

**İşlemler:** Plazması ayrılmış paket eritrositler 3 kez fosfat NaCl tamponu ile yıkandıktan sonra yine aynı tamponla 10 kez dilüe edildi ve 3 ml'si ayrı bir tübe alınarak üzerine 2 ml TCA solüsyonu eklendi. Bu karışım 4000 rpm'de 10 dakika satrifüje edildikten sonra, oluşan süpernatanttan ayrı bir tübe 3ml alınarak üzerine 1ml TBA solüsyonu eklendi ve zaman kaybetmeden 15dk kaynatıldı. Kaynama işleminin ardından tüpler musluk suyu altında soğutulduktan sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifuj edildi. Bu işlemin ardından 532 nm dalga boyunda verdikleri absorbaslar ölçüldü. (Schimadzu UV 1600). 10 kez sulandırılmış olan paket eritrositlerden Drabkin yöntemine göre hemoglobin tayini yapılarak TBARS düzeyleri nmol/mg Hb olarak ifade edildi.

### **Hemoglobin ölçümü**

**Prensip:** Alkali pH'da ve potasyum ferrosiyandır varlığında hemoglobin ve sulfhemoglobin dışındaki hemoglobin derivelere methemoglobine oksitlenir. Methemoglobin ise potasyum siyanür ile birlikte siyanomethemoglobin bileşimini oluşturur. Bu son bileşimin maksimum absorbans verdiği 546 nm dalga boyundaki renk şiddeti hemoglobin konsantrasyonu ile orantılıdır (106).

### **Reaktifler:**

**Drabkin ayırıcı:** 140 mg  $\text{KH}_2\text{HPO}_4$ , 200 mg potasyum fericyanide, 50 mg potasyum siyanit ve % 30'luk 2 ml Triton-X karışımı üzerine 1100 ml distile su eklenerek elde edildi.

**İşlemler:** 2.5 ml Drabkin ayırıcı üzerine, fosfat NaCl tamponu ile 10 kez sulandırılmış eritrosit paketinden 50  $\mu\text{L}$  eklenerek 15 dk oda ısısında ve karanlıkta bekletildi. Bu sürenin sonunda tüplerin absorbansları 546 nm'de köre karşı okundu (Schimadzu UV 1600).

### **3.4.1.2. Böbrek TBARS Tayini**

#### **Reaktifler:**

- 1) Homojenizasyon sıvısı (pH 7.4):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.05 M;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05 M; KCl 150 mM; EDTA, 5mM; Triton- X %0.8.
- 2) Trikloroasetik asit, distile su ile sulandırılarak %30'luk solüsyon hazırlandı.
- 3) Tiyobarbitürik asit, 5 g TBA ve 25 ml 1 N NaOH, distile su ile 500 ml'e tamamlandı.
- 4) Standart solüsyonu: Tetraetoksipropan stok solüsyonundan distile su ile sulandırılarak hazırlandı.

**İşlemler:** Alınan böbrek dokusu, 2 ml homojenizasyon sıvısı içerisinde, Tri-R Stir-R marka K43 model homojenizatörde 9500 rpm'de, 20 sn homojenize

edildi. Homojenizasyon işlemi sırasında aşırı ısı artışını önlemek için kar kullanıldı. Homojenize edilen dokuların üzerine 6ml daha homojenizasyon sıvısı eklendi. Oluşan 8 ml'lik çözülden 3 ml ayrı bir tübe alınarak üzerine 2 ml TCA solüsyonu eklendi ve 4000 rpm'de 10 dk santrifüje edildi. Elde edilen süpernatanttan 3 ml alınarak üzerine 1 ml TBA eklendi ve zaman kaybetmeden 15 dk kaynatıldı. Kaynama işleminin ardından tüpler musluk suyu altında soğutulduktan sonra 4000 rpm'de 10 dk santrifuj edildi. Bu işlemin ardından absorbansları 532 nm'de köre karşı okundu (Schimadzu UV 1600). Dokular homojenize edildikten sonra elde edilen 8 ml'lik çözülden Lowry yöntemine göre protein düzeyleri ölçülerek doku TBARS düzeyleri nmol/g protein olarak ifade edildi.

### **Doku Protein Tayini**

**Prensip:** Doku protein içeriği Lowry metoduna göre tayin edildi. Alkali ortamda proteinlerin  $\text{Cu}^{+2}$  ile reaksiyona girerek oluşturdukları bakır-peptid komplekslerinin, folin reaktifi varlığında tirozin ve triptofan kalıntıları ile birleşerek renkli bileşikler oluşturmaları ve bunların spektrofotometrik olarak saptanmasına dayanır (107).

#### **Reaktifler:**

- 1) Standart solüsyon: Bovin serum albümin, 1 mg/ml'lik çözeltisi hazırlandı.
- 2) NaOH, 1 N hazırlandı.
- 3) D reaktifi: 10 ml %2'lik  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anhidr; 0.1 ml %1'lik  $\text{CuSO}_4$ , 0.1 ml %2'lik Natrium tartarat.
- 4) Folin reaktifi: Folin ile distile su 1/1 oranında karıştırılarak hazırlandı.

**İşlemler:** 0.1 ml numune veya standart üzerine 0.1 ml NaOH ve 1ml D reaktifi eklenerek 20 dk oda ısısında ve karanlıkta bekletildi. Bu sürenin sonunda, tüm tüplere 1/1 oranında distile su ile dilüe edilmiş folin reaktifinden 0.1 ml eklendi ve yine karanlıkta ve oda ısısında olmak üzere 30 dk bekletildi. Daha sonra tüplerin üzerine 2 ml distile su eklenerek absorbansları 500 nm dalga boyunda köre karşı okunarak değerlendirildi (Schimadzu UV 1600).

### **3.4.2. Böbrek Protein Karbonilasyonu Tayini**

**Prensip:** Protein karbonil grupları, Levine ve arkadaşlarının spektrofotometrik yöntemine göre ölçüldü. 2,4-Dinitrofenilhidrazin (DNPH) proteinlerin karbonil gruplarıyla birleştiğinde renkli bir hidrazon bileşiği oluşturmaktadır. Oluşan bu hidrazonun 360 nm'de absorbansının okunması esasına dayanır (108).

#### **Reaktifler:**

- 1) Homojenizasyon sıvısı (pH 7.4):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.05 M;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05 M; KCl 150 mM; EDTA, 5 mM; Triton-X %0.8.
- 2) 2,4-Dinitrofenilhidrazin (DNPH): 10 mM DNPH 2 N HCl içinde  $+50^\circ\text{C}$ 'de hazırlandı.
- 3) Triklorasetik asit, distile su ile sulandırılarak %20'lik solüsyon hazırlandı.



- 4) Triklorasetik asit, distile su ile sulandırılarak %10'luk solüsyon hazırlandı.
- 5) 1 N NaOH hazırlandı.

**İşlemler:** Alınan böbrek dokusu, 2 ml homojenizasyon sıvısı içerisinde, Tri-R Stir-R marka K43 model homojenizatörde 9500rpm'de, 20 sn homojenize edildi. Homojenizasyon işlemi sırasında aşırı ısı artışını önlemek için kar kullanıldı. 250 µl homojenat 500 ml %20 TCA ile karıştırıldı. 14000 rpm'de 15 sn santrifüj edildikten sonra süpernatant döküldü. Pelet 500 µl 10 mM DNPH ile karıştırıldıktan sonra karanlıkta oda ısısında 1 saat bekletildi. Bu sırada 10dk aralarla vortekslenerek peletin DNPH ile karışması sağlandı. Bir saatin sonunda 500 µl %20 TCA ile karıştırıldıktan sonra 2-3 dk oda ısısında bekletildi. 14000 rpm'de 3dk santrifüj edildikten sonra süpernatant döküldü ve aynı işlem %10 TCA ile 3 kez tekrarlandı. Presipitat 2 ml NaOH içinde 37°C'de 30 dk bekletilerek çözüldü. Numunenin absorbansı NaOH körüne karşı 360 nm'de okundu. Böbrek homojenatlarından Lowry yöntemine göre doku proteini tayini yapılarak sonuçlar µmol/mg protein olarak ifade edildi.

### 3.5. Enzim İnhibitörlerinin Etkinliğinin Değerlendirilmesi

#### 3.5.1. Böbrek NADPH Oksidaz Aktivitesinin Tayini

**Prencip:** Weihuan Fang ve arkadaşlarının yöntemi modifiye edilerek kullanıldı. Fagositik hücrelerin uyarılması, oksidatif patlamaya neden olur ki nötrofillerde bu olay NADPH oksidaz enzimi aracılığıyla gerçekleşir. Bu enzim NADPH'ı elektron vericisi olarak kullanır ve bu sırada moleküler oksijeni indirger. Ortama elektron alıcısı olarak davranan resazurin eklenecek olursa moleküler oksijenle yarışmaya girerek indirgenir ve floresan veren formu olan **resorfine** dönüşür. **Resorfunin** oluşum hızı NADPH oksidaz aktivitesinin hızı ile paralellik gösterir (109).

#### **Reaktifler:**

- 1) Zymosan A
- 2) Resazurin
- 3) RPMI-1640 Medium
- 4) Homojenizasyon tamponu: 0.1 M  $K_2HPO_4$ , 0.001 M phenylmethylsulfonyl floride (PMSF), %0.2 Triton-X 100 şeklinde hazırlandı.

**Zimozan ile aktive serum (ZAS) hazırlanması:** Sıçanlardan alınan kan örnekleri 2000 rpm'de +4°C 15 dk santrifuj edildi ve serumları ayrıldı. Serum havuzunun içerisine 5mg/ml olacak şekilde zimozan-A ilave edilecek. 1 saat 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra +4°C 15 dk santrifuj edildi ve zimozan çöktürüldü. Üstteki aktive serum küçük ependorf tüplerine ayrılarak -20°C'de saklandı. Deney günü 0.5 mg/ml olacak şekilde sulandırıldı.

**İşlemler:** Böbrek dokusu, 2 ml homojenizasyon tamponu kullanılarak Tri-R Stir-R marka K43 model homojenizatörde 9500 rpm'de, homojenize edildi.

+4°C 15000 rpm'de 30 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant ayrıldı. 300 µl supernatant, 50 µl ZAS, 50 µl resazurin ve 100 µl NADPH ilave edildi. Fluorimetrik olarak eksitasyon dalga boyu 544 nm, emisyon dalga boyu 584 nm olacak şekilde 37°C'de inkübe edilerek 0, 30 ve 60. dakikalarda ölçümler yapıldı. Böbrek homojenatlarından Lowry yöntemiyle protein tayini yapıldı ve sonuçlar floresan yoğunluk/protein olarak verildi.

### 3.5.2. Lökosit Aktivasyonu

**Prensip:** Lökosit aktivasyonu, Thomas C. Hofstra ve arkadaşlarının yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir. 2',7'-dichloro-fluorescein diacetate (DCF) normal şartlarda floresan bir madde değildir. Lökositlerin aktivasyonuna bağlı olarak gelişen solunumsal patlama sonucunda DCF, yüksek miktarda floresans yayan dichloro-fluorescein'e okside olur. Dichloro-fluoresceinin floresans yoğunluğunun spektrofloreometrede 485 nm eksitasyon 510 nm emisyon dalga boyunda tespit edilmesi esasına dayanır (110).

#### Reaktifler:

- 1) Histopaque- 1119
- 2) İzotonik Fosfat Tamponu: 124 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 16 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 mmol/L glukoz olarak hazırlandı.
- 3) Kreb's Fosfat Tamponu: 120 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 16 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1mmol/L CaCl<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O, 1mmol/L MgSO<sub>4</sub>, 5 mmol/L glukoz karıştırılıp hazırlandı.
- 4) 2',7'-dichloro-fluorescein diacetate

**İşlemler:** Granülositler, histopaque-1119 kullanılarak eritrositlerden ve diğer lökositlerden ayrıldı. İzole edilen granülositler üç kez izotonik fosfat tamponu ile yıkandıktan sonra hücre sayısı 2.5x10<sup>6</sup> hücre/ml olacak şekilde ayarlanıp 10<sup>-6</sup> mol/L 2',7'-dichloro-fluorescein diacetate ile karanlıkta 37°C'de 25 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler izotonik fosfat tamponu ile yıkandıktan hemen sonra Krebs fosfat tamponunda hücre sayısı mililitrede 10<sup>6</sup>/hücre olacak şekilde ayarlandı. Bu işlemde sonra DCF'nin ortalama floresansı spektrofloreometrede 485 nm eksitasyon 510 nm emisyon dalga boyunda ölçüldü. Sonuçlar floresan yoğunluk olarak verildi. İşlemler sırasında lökosit ölçümleri ABX micros marka kan sayım cihazı kullanılarak yapıldı.

### 3.5.3. Ksantin Oksidaz Aktivite Tayini

**Prensip:** Ksantin oksidaz aktivitesi Molecular Probes marka Amplex Red Xanthine/Xanthine oxidase assay kiti kullanılarak ölçüldü. Reaksiyon karışımında, süperoksit spontan olarak hidrojenperokside yıkılır, horseradish peroksidase (HRP) varlığında hidrojenperoksit, Amplex red reagent ile reaksiyona girerek resorufin oluşturur ve oluşan resorufin 560 nm dalga boyunda absorbans verir.

### 3.5.3.1. Plazmada Ksantin Oksidaz Aktivitesi

#### Reaksiyon Karışımı:

- 1) 50 µl Amplex Red reagent solüsyonu
- 2) 20 µl HRP solüsyonu
- 3) 50 µl ksantine
- 4) 4.88 ml reaksiyon tamponu

**İşlemler:** 96 kuyucuklu tablaya 50 µl reaksiyon karışımı 50 µl plazma veya standart ilave edilerek 30dk 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 560 nm dalga boyunda spektrofometrede okundu. Sonuçlar mU/ml olarak verildi.

### 3.5.3.2. Böbrekte Ksantin Oksidaz Aktivitesi

#### Reaktifler:

- 1) Fosfat tamponu: 50 nM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ile 50 nM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> uygun oranlarda karıştırılarak pH 7.5'e ayarlandı.
- 2) 50 µl Amplex Red reagent solüsyonu
- 3) 20 µl HRP solüsyonu
- 4) 50 µl ksantine
- 5) 4.88 ml reaksiyon tamponu

**İşlemler:** Böbrek dokusu, 2 ml homojenizasyon tamponu kullanılarak Tri-R Stir-R marka K43 model homojenizatörde 9500 rpm'de, homojenize edildi. +4°C 11000rpm'de 15 dk santrifüj edilerek süpernatant ayrıldı. 96 kuyucuklu tablaya 50µl reaksiyon karışımı 50 µl süpernatant veya standart ilave edilerek, 30 dk 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 560 nm dalga boyunda spektrofometrede okundu. Doku homojenatından Lowry yöntemiyle doku protein düzeyi tayini yapıldı ve sonuçlar mU/mg protein olarak ifade edildi.

## 3.6. İstatistiksel Analiz

Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verildi. İstatistiksel analiz GraphPad software programı kullanılarak yapıldı. Sonuçların değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi kullanıldı ve gruplar arası değerlendirme Newman-Keuls testi ile yapıldı. p<0.05 üzeri değerler istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

## BULGULAR

Deneye alınan hayvanlarda genel olarak sağlık ve görünüm açısından herhangi bir farklılık izlenmemiştir.

Çalışmamız, XO ve NADPH oksidaz olmak üzere iki farklı protokol şeklinde planlandığı için sonuçlarımız da her bir protokol için ayrı ayrı incelenecektir.

### 4.1. NADPH Oksidaz Çalışması

İnhibitör uyguladığımız gruplarda DPI, DMSO içerisinde çözülmüştür. DMSO'nun parametrelerimiz üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığı ayrı bir grup oluşturularak incelenmiştir. Bu gruptaki hayvanlara DPI çözücüsü olarak kullanılan DMSO'nun tek başına uygulanması, ölçtüğümüz hiçbir parametrede kontrol grubuna kıyasla herhangi bir farklılığa neden olmamıştır.

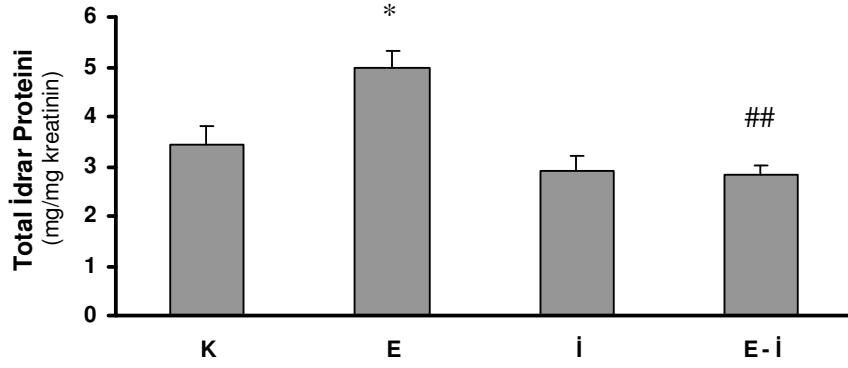
Tükenme egzersizi uygulanan gruplar olan E ve E-İ gruplarının ortalama tükenme sürelerinde farklılık saptanmamıştır.

### 4.1.1. İdrar Parametreleri

#### 4.1.1.1. Total İdrar Protein Düzeyi

Total idrar protein düzeyi, Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Total idrar proteini, metabolik kafesler aracılığı ile toplanan 24 saatlik idrarlarda değerlendirilmiştir ve yine aynı idrarlardan ölçülen kreatinin değeri üzerinden, mg/mg kreatinin olarak ifade edilmiştir.

Total idrar protein düzeyi, tüketici egzersiz sonucu E grubunda, K grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bir artış göstermiştir ( $p<0.05$ ). Tüketici egzersiz sonucunda artış gösteren idrar protein düzeyleri, inhibitör uygulaması sonucu E-İ grubunda E grubuna göre önemli olarak azalmıştır ( $p<0.01$ ).

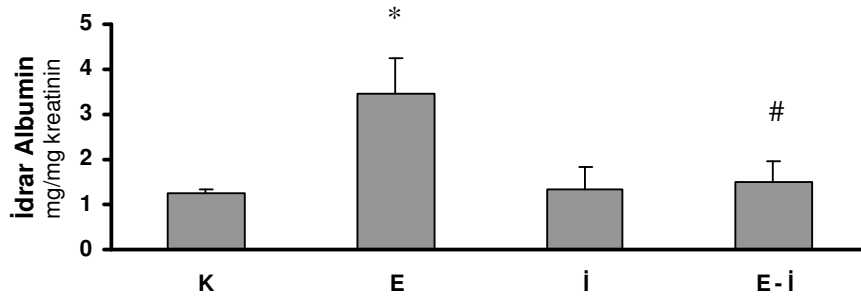


**Şekil 4.1.** NADPH oksidaz çalışmasında idrar total protein değerlerinin karşılaştırılması  
 \*p<0.05; Kontrol (K) grubundan Egzersiz (E) grubunun farkı  
 ##p<0.01 Egzersiz (E) grubundan Egzersiz İnhibitör (E-İ) grubunun farkı

#### 4.1.1.2. İdrarda Albumin Düzeyi

Toplanan 24 saatlik idrarlarda ölçülen mikroalbumin düzeyleri, Şekil 4.2'te gösterilmiştir. İdrar mikroalbumin düzeyi metabolik kafeste toplanan 24'lik idrarlarda ölçülmüştür. Sonuçlar, deney günü taze olarak ölçülen kreatinin değerleri üzerinden mg/mg kreatinin olarak ifade edilmiştir.

İdrar albumin düzeyinin, tüketici egzersiz uygulanan E grubunda K grubuna göre önemli olarak artış gösterdiği saptanmıştır (p<0.05). İnhibitör uygulanan E-İ grubunun idrar mikroalbumin düzeylerinde E grubuna kıyasla önemli bir azalma tespit edilmiştir (p<0.05).



**Şekil 4.2.** NADPH oksidaz çalışmasında idrar albumin değerlerinin karşılaştırılması  
 \*p<0.05; Kontrol (K) grubundan Egzersiz (E) grubunun farkı  
 #p<0.05 Egzersiz (E) grubundan Egzersiz İnhibitör (E-İ) grubunun farkı

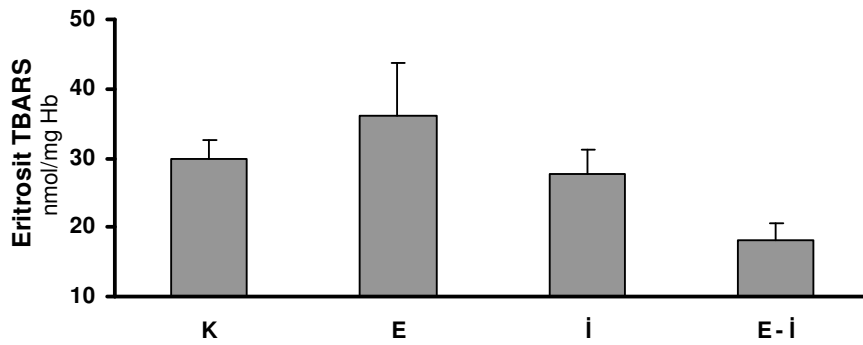
#### 4.1.1.3. İdrarda $\beta_2$ -Mikroglobulin Düzeyi

İdrarda  $\beta_2$ -mikroglobulin düzeyi kitin ölçüm aralığından daha düşük olduğu için tespit edilememiştir. Numune olarak kullanılan idrar miktarının artırılması veya idrarların bir miktar konsantre edilmesi de bu sorunu giderememiştir. Kitin çalışıp çalışmadığı sıçanların serumunda  $\beta_2$ -mikroglobulin ölçülerek test edilmiş ve serum  $\beta_2$ -mikroglobulin düzeyi beklendiği gibi 5  $\mu\text{g/ml}$  civarında saptanmıştır.

## 4.2.2. Oksidan Stres Parametreleri

### 4.2.2.1. Eritrosit TBARS Düzeyi

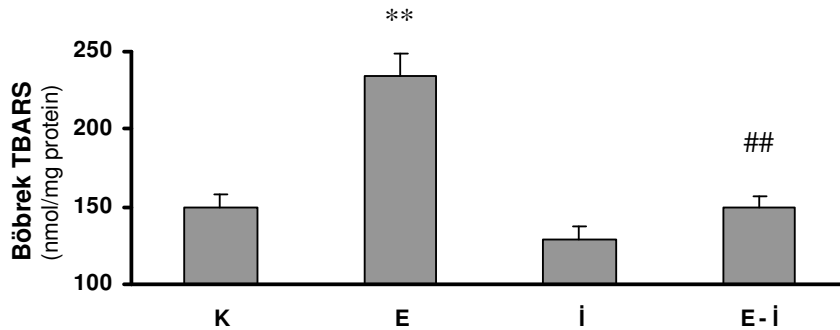
Eritrosit TBARS düzeyleri, Şekil 4.3'te gösterilmiş olup nmol/mg hb olarak ifade edilmiştir. Eritrosit TBARS düzeylerinin E grubunda kontrol grubuna göre arttığı gözlenirse de bu artış istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. İnhibitör uygulanan E-İ grubu ile E grubu karşılaştırıldığında, TBARS düzeyinde E-İ grubunda bir azalma gözlenmiş, fakat istatistiksel olarak farklılık saptanmamıştır.



Şekil 4.3. NADPH oksidaz çalışmasında eritrosit TBARS değerlerinin karşılaştırılması

### 4.1.2.2. Böbrek TBARS Düzeyi

Böbrek TBARS düzeyleri, Şekil 4.4'te gösterilmiş olup nmol/mg protein olarak sunulmuştur. Böbrek TBARS düzeyinin, E grubunda K grubuna göre istatistiksel olarak önemli şekilde arttığı ( $p < 0.01$ ) gözlenmiştir. İnhibitör uygulanan E-İ grubunda ölçülen TBARS düzeyleri, E grubuna kıyasla önemli ölçüde düşük bulunmuştur ( $p < 0.01$ ).



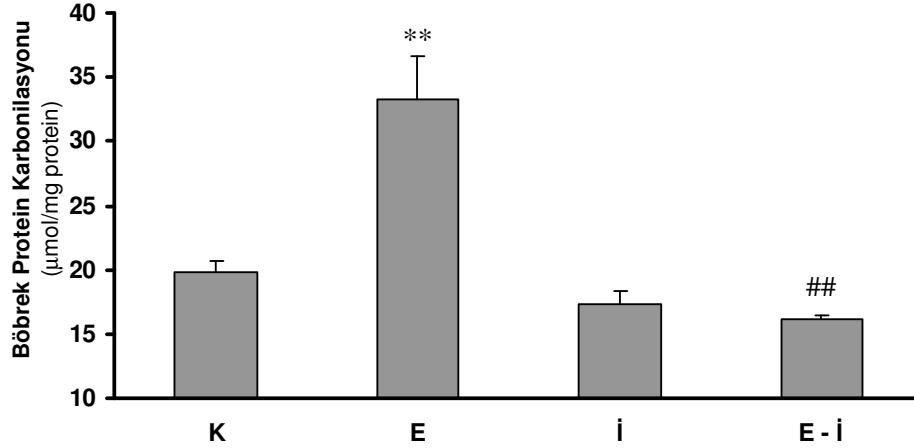
Şekil 4.4. NADPH oksidaz çalışmasında böbrek TBARS değerlerinin karşılaştırılması

\*  $p < 0.01$ ; Kontrol (K) grubundan Egzersiz (E) grubunun farkı

#  $p < 0.01$ ; Egzersiz (E) grubundan Egzersiz İnhibitör (E-İ) grubunun farkı

#### 4.1.2.3. Böbrek Protein Karbonilasyon Tayini

Böbrek protein karbonilasyon düzeyi  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein şeklinde ifade edilmiş ve Şekil 4.5'te gösterilmiştir. Tüketici egzersiz uygulanan E grubunda K grubuna kıyasla böbrek protein karbonilasyonunun önemli olarak arttığı gözlenmiştir ( $p<0.01$ ). İnhibitör uygulanan E-İ grubunda ise E grubuna göre önemli azalma tespit edilmiştir ( $p<0.01$ ).



Şekil 4.5. NADPH oksidaz çalışmasında böbrek protein karbonilasyon değerlerinin karşılaştırılması

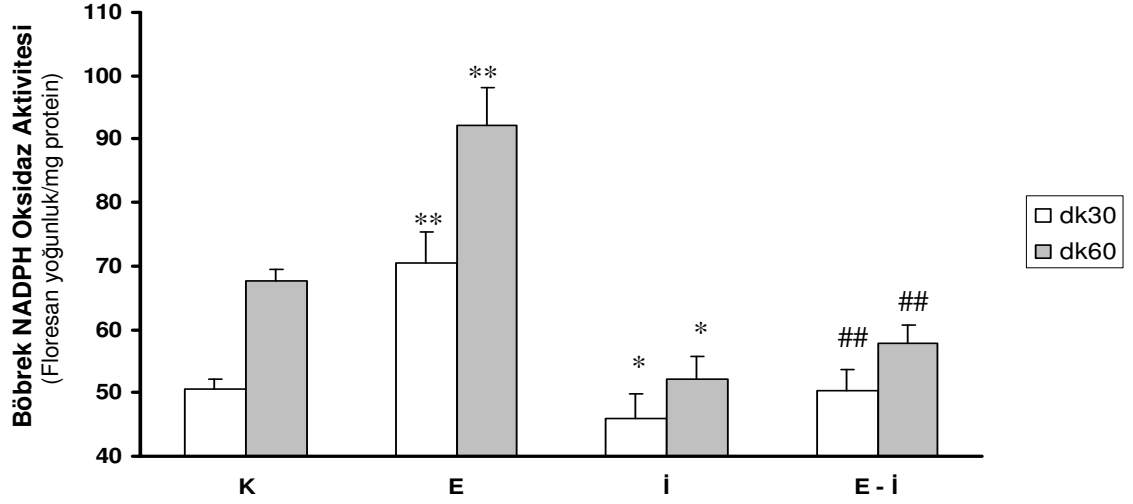
\*\* $p<0.01$ ; Kontrol (K) grubundan Egzersiz (E) grubunun farkı

## $p<0.01$ ; Egzersiz (E) grubundan Egzersiz İnhibitör (E-İ) grubunun farkı

#### 4.1.3. Enzim İnhibitörlerinin Etkinliğinin Değerlendirilmesi

##### 4.1.3.1. Böbrek NADPH Oksidaz Aktivitesi

Böbrek NADPH oksidaz aktivitesi ölçüm sonuçları Şekil 4.6'de gösterilmiş olup sonuçlar floresan yoğunluk olarak ifade edilmiştir. Böbrek NADPH oksidaz aktivitesi, E grubunda kontrol grubuna göre hem 30. dakikada hem de 60. dakikada önemli bir artış göstermiştir ( $p<0.01$ ). Egzersiz öncesinde inhibitör uygulanan E-İ grubunda da E grubuna kıyasla hem 30. dakikada hem de 60. dakikada önemli bir azalış görülmüştür ( $p<0.01$ ). Yalnızca inhibitör uygulanan İ grubunun değerleri, K grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli ölçüde düşük bulundu ( $p<0.05$ ).



**Şekil 4.6.** NADPH oksidaz çalışmasının böbrek NADPH oksidaz değerlerinin karşılaştırılması

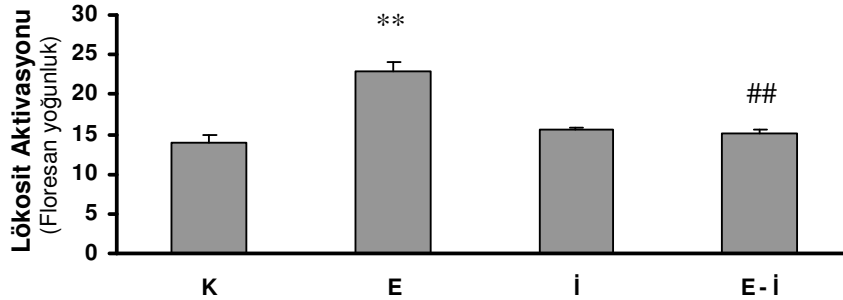
\* $p < 0.05$ ; Kontrol (K) grubundan Egzersiz (E) veya inhibitör (İ) grubunun farkı

\*\*  $p < 0.01$ ; Kontrol (K) grubundan Egzersiz (E) grubunun farkı

##  $p < 0.01$ ; Egzersiz (E) grubundan egzersiz inhibitör (E-İ) grubunun farkı

#### 4.1.3.2. Lökosit Aktivasyonu

Lökosit aktivasyon düzeyi Şekil 4.7’de gösterilmiş ve sonuçları floresan yoğunluk olarak sunulmuştur. Lökosit aktivasyonu, E grubunda K grubuna göre önemli olarak artış göstermiştir ( $p < 0.01$ ). Egzersiz öncesi inhibitör uygulanan E-İ grubunda ise E grubuna kıyasla önemli bir azalış saptanmıştır ( $p < 0.01$ ).



**Şekil 4.7.** NADPH oksidaz çalışmasında lökosit aktivasyonu değerlerinin karşılaştırılması

\*\*  $p < 0.01$ ; Kontrol (K) grubundan Egzersiz (E) grubunun farkı

##  $p < 0.01$ ; Egzersiz (E) grubundan Egzersiz İnhibitör (E-İ) grubunun farkı



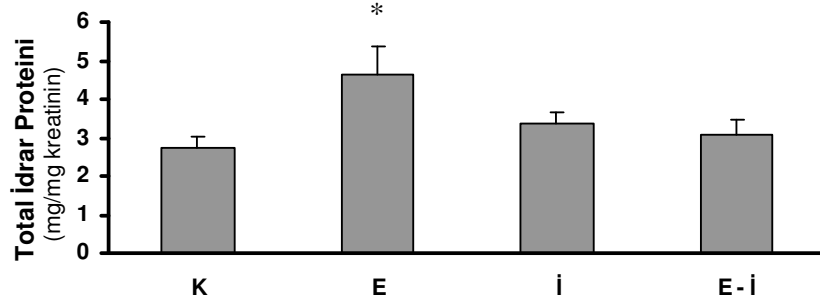
## 4.2. Ksantin Oksidaz Çalışması

Tükenme egzersizi uygulanan gruplar olan E ve E-İ gruplarının ortalama tükenme sürelerinde farklılık yoktur.

### 4.2.1. İdrar Parametreleri

#### 4.2.1.1. İdrar Total Protein Düzeyi

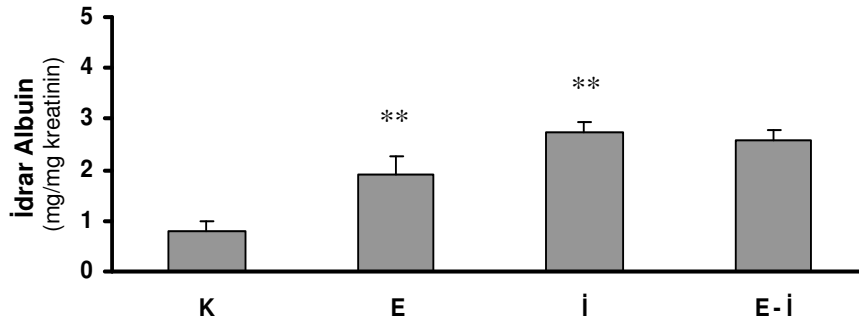
İdrar total protein düzeyleri Şekil 4.8'de gösterilmiştir ve sonuçları mg/mg kreatinin olarak ifade edilmiştir. İdrar total protein düzeyi, E grubunda K grubuna kıyasla önemli olarak artış gösterirken ( $p<0.05$ ), E-İ grubunda ölçülen idrar protein değerleri E grubundan farklı bulunmamıştır.



Şekil 4.8. Ksantin Oksidaz çalışmasında idrar total protein değerlerinin karşılaştırılması  
\*  $p<0.05$ ; Kontrol (K) grubundan Egzersiz (E) grubunun farkı

#### 4.2.1.2. İdrar Albumin Düzeyi

İdrar albumin düzeyleri, Şekil 4.9'da gösterilmiş olup sonuçları mg/mg kreatinin olarak verilmiştir. İdrar albumin düzeyleri açısından karşılaştırıldığında E grubunda, K grubuna göre önemli bir artış gözlenmesine rağmen ( $p<0.01$ ), E-İ grubu ile E grubu arasında fark saptanmamıştır. Ancak İ grubunda K grubuna kıyasla önemli bir artış gözlenmiştir ( $p<0.01$ ).



Şekil 4.9. Ksantin Oksidaz çalışmasında idrar mikroalbumin değerlerinin karşılaştırılması  
\*\*  $p<0.01$ ; Kontrol (K) grubundan Egzersiz (E) veya İnhibitör (İ) grubunun farkı

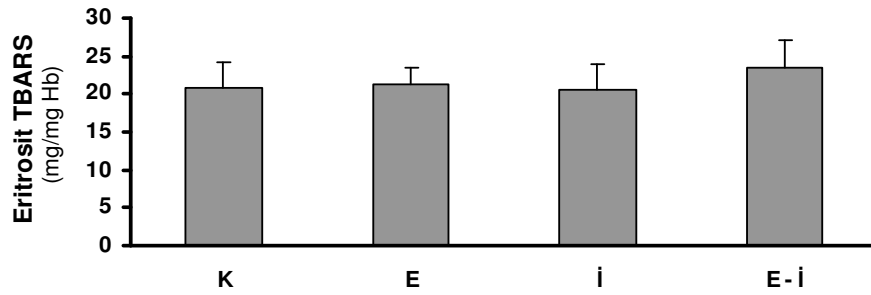
#### 4.2.1.3. İdrarda $\beta_2$ -Mikroglobulin Düzeyi

Alınan idrar örneklerindeki  $\beta_2$ -mikroglobulin düzeyleri, kitin ölçüm aralığından daha düşük olduğu için bu ölçüm yapılamamıştır.

#### 4.2.2. Oksidan Stres Parametreleri

##### 4.2.2.1. Eritrosit TBARS Düzeyi

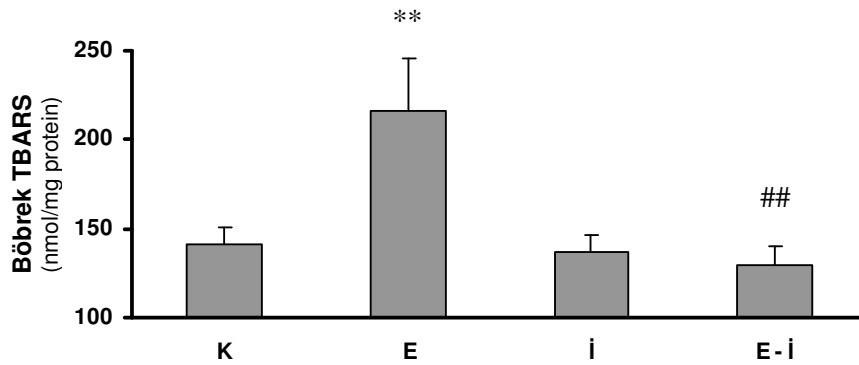
Eritrosit TBARS düzeyleri, Şekil 4.10'da gösterilmiştir ve sonuçları nmol/mg protein olarak ifade edilmiştir. Eritrosit TBARS düzeyleri açısından gruplar arasında farklılık tespit edilememiştir.



Şekil 4.10. Ksantin Oksidaz çalışmasında Eritrosit TBARS değerlerinin karşılaştırılması

##### 4.2.2.2. Böbrek TBARS Düzeyi

Böbrek TBARS düzeyleri, Şekil 4.11'de gösterilmiş olup sonuçları nmol/mg protein olarak ifade edilmiştir. Böbrek TBARS düzeyleri E grubunda, K grubuyla karşılaştırıldığında önemli olarak artış gösterilmiştir ( $p<0.01$ ). İnhibitör uygulanan E-İ grubunda ise E grubuna kıyasla önemli azalma saptanmıştır ( $p<0.01$ ).



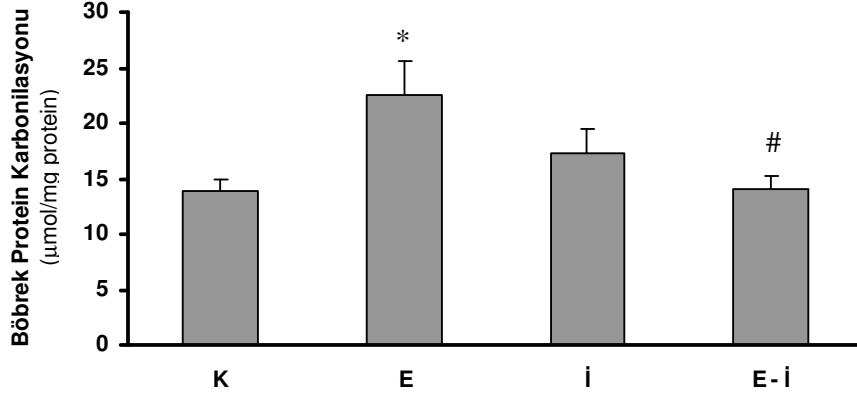
Şekil 4.11. Ksantin Oksidaz çalışmasında böbrek TBARS değerlerinin karşılaştırılması

\*\*  $p<0.01$ ; Kontrol (K) grubundan Egzersiz (E) grubunun farkı

## $p<0.01$ ; Egzersiz (E) grubundan Egzersiz İnhibitör (E-İ) grubunun farkı

### 4.2.2.3. Böbrek Protein Karbonilasyonu

Böbrek protein karbonilasyon düzeyi, Şekil 4.12’de gösterilmiştir. Böbrek protein karbonilasyon düzeyi, E grubunda K grubuna kıyasla önemli olarak artmıştır ( $p<0.05$ ). E-İ grubunda, E grubuna göre önemli bir azalış saptanmıştır ( $p<0.05$ ).



Şekil 4.12. Ksantin Oksidaz çalışmasında böbrek protein karbonilasyonu değerlerinin karşılaştırılması

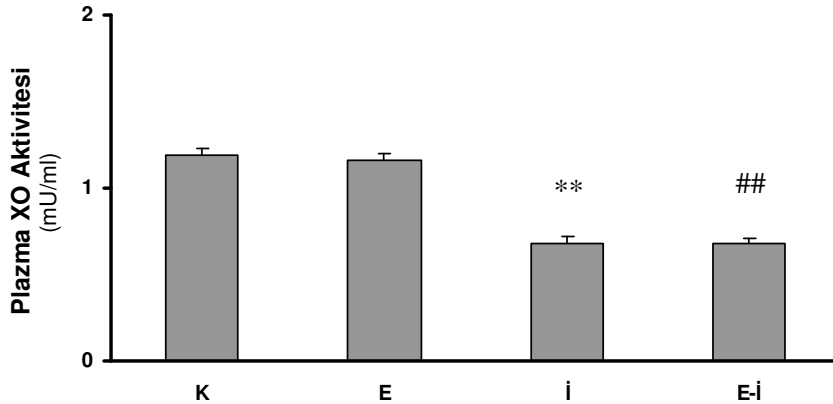
\*  $p<0.05$ ; Kontrol (K) grubundan Egzersiz (E) grubunun farkı

# $p<0.05$ ; Egzersiz (E) grubundan Egzersiz İnhibitör (E-İ) grubunun farkı

### 4.2.3. Enzim İnhibitörlerinin Etkinliğinin Değerlendirilmesi

#### 4.2.3.1. Ksantin Oksidaz aktivitesi Tayini

**Plazma Ksantin Oksidaz aktivitesi:** Plazma XO aktivitesi Şekil 4.13’de gösterilmiş olup sonuçlar mU/ml olarak ifade edilmiştir. Plazma XO aktivitesi açısından E grubu ile K grubu arasında önemli bir fark olmamasına karşın, E-İ grubunda E grubuna göre ( $p<0.01$ ) ve İ grubunda da K grubuna göre önemli düzeyde farklılık saptanmıştır ( $p<0.01$ )

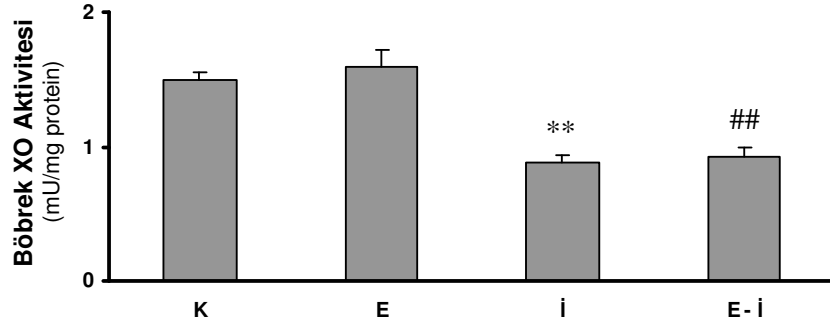


Şekil 4.13. Ksantin Oksidaz çalışmasında plazma ksantin oksidaz aktivitesi değerlerinin karşılaştırılması

\*\*  $p<0.01$ ; Kontrol (K) grubundan inhibitör (İ) grubunun farkı

## $p<0,01$ ; Egzersiz (E) grubundan egzersiz inhibitör (E-İ) grubunun farkı

**Böbrek Ksantin Oksidaz aktivitesi:** Böbrek XO aktivitesi Şekil 4.14'de gösterilmiş ve sonuçlar mU/mg protein şeklinde ifade edilmiştir. Böbrek XO aktivitesi E grubu ile K grubu arasında önemli bir farklılık göstermezken, inhibitör uygulanan İ ve E-İ gruplarında sırasıyla K ve E gruplarına kıyasla önemli azalma saptanmıştır ( $p<0.01$ ;  $p<0.01$ ).



**Şekil 4.14.** Ksantin Oksidaz çalışmasında böbrek ksantin oksidaz aktivitesi değerlerinin karşılaştırılması

\*\*  $p<0.01$ ; Kontrol (K) grubundan İnhibitör (İ) grubunun farkı

##  $p<0.01$ ; Egzersiz (E) grubundan Egzersiz İnhibitör (E-İ) grubunun farkı

**Tablo.4.1:** NADPH Oksidaz çalışması tüm sonuçlar

	<b>KONTROL</b>	<b>EGZERSİZ</b>	<b>İNHİBİTÖR</b>	<b>EGZERSİZ + İNHİBİTÖR</b>
<b>Total İdrar Proteini (mg / mg Kreatinin)</b>	3.42 ± 0,3841	4.97 ± 0,36 *	2.908 ± 0,31	2.82 ± 0.40 ##
<b>İdrar MikroalbuminDüzeyi (mg / mg Kreatinin)</b>	1.25 ± 0.09	3.47 ± 0.80 *	1,35 ± 0.48	1.50 ± 0.44 #
<b>Eritrosit TBARS (nmol / mg hemoglobin)</b>	29.93 ± 2.54	36.22 ± 7.51	27.57 ± 3.69	18.10 ± 2.44
<b>Böbrek TBARS (nmol / mg protein)</b>	150.1 ± 8.29	234.5 ± 14.38 **	128.5 ± 9.0	149.0 ± 7.85 ##
<b>Böbrek Protein Karbonilasyonu (µmol/mg protein)</b>	19.74 ± 0.90	33.24 ± 0.46 **	17.39 ± 0.95	16.13 ± 0.99 ##
<b>Böbrek NADPH Oksidaz Aktivitesi 30. Dakika (floresan yoğunluk)</b>	50.68 ± 1.40	70.59 ± 4.82 **	46.06 ± 3.72	50.45 ± 3.12 ##
<b>Böbrek NADPH Oksidaz Aktivitesi 60. Dakika (floresan yoğunluk)</b>	67.58 ± 1.80	92.21 ± 5.58 **	52.13 ± 3.73	57.80 ± 2.96 ##

\*P<0.05 Egzersiz Grubunun Kontrol Grubundan farkı

\*\* p<0.01 Egzersiz Grubunun Kontrol Grubundan farkı

# p<0.05 Egzersiz İnhibitör Grubunun Egzersiz Grubundan farkı

## p<0.01 Egzersiz İnhibitör Grubunun Egzersiz Grubundan farkı

**Tablo.4.2:** Ksantin Oksidaz çalışması tüm sonuçları

	<b>KONTROL</b>	<b>EGZERSİZ</b>	<b>İNHİBİTÖR</b>	<b>EGZERSİZ + İNHİBİTÖR</b>
<b>Total İdrar Proteini (mg / mg kreatinin)</b>	2.75 ± 0.29	4.63 ± 0.76 *	3.37 ± 0.27	3.08 ± 0.39
<b>İdrar Mikro Albumin mg/mg kreatinin</b>	0.78 ± 0.21	1.91 ± 0.34 **	2.72 ± 0.23 **	2.58 ± 0.24
<b>Eritrosit TBARS (nmol / mg hemoglobin)</b>	20.87 ± 3.26	21.21 ± 2.28	20.56 ± 3.45	23.55 ± 3.52
<b>Böbrek TBARS (nmol / mg protein)</b>	141.6 ± 9.02	216.1 ± 29.42 **	137.2 ± 9.55	129.9 ± 10.33 ##
<b>Böbrek Protein Karbonilasyonu (µmol / mg protein)</b>	13.97 ± 0.95	22.62 ± 2.0 *	17.30 ± 2.27	14.11 ± 1.14 #
<b>Plazma XO Aktivitesi (mU / ml)</b>	1.19 ± 0.03	1.16 ± 0.04	0.68 ± 0.03 **	0.68 ± 0.03 ##
<b>Böbrek XO Aktivitesi (mU / mg protein)</b>	1.49 ± 0.06	1.59 ± 0.13	0.89 ± 0.05 **	0.92 ± 0.07 ##

\*P&lt;0.05 Egzersiz Grubunun Kontrol Grubundan farkı

\*\* p&lt;0.01 Egzersiz Grubunun veya İnhibitör Grubunun Kontrol Grubundan farkı

# p&lt;0.05 Egzersiz İnhibitör Grubunun Egzersiz Grubundan farkı

## p&lt;0.01 Egzersiz İnhibitör Grubunun Egzersiz Grubundan farkı

## TARTIŞMA

Fiziksel aktiviteler sonucu idrarda protein atılımının arttığı 100 yıldan fazladır bilinen bir durumdur. Egzersize bağlı oluşan proteinürinin çeşitli özellikleri (şiddeti, süresi, tekrarlaması, kompozisyonu, görüldüğü spor dalları) ayrıntılı olarak bilinse de, oluşum mekanizmalarını irdeleyen araştırmalar daha az sayıdadır. Bunun nedeni egzersiz proteinürisine patolojik bir süreç olarak bakılmaması veya çeşitli olumsuz durumlara yol açıp açamayacağı konusunda fikir birliğinin bulunmaması ile açıklanabilir. Tekrarlayan proteinürinin var olan hafif düzeydeki renal patolojileri daha da ileri götürebileceği gibi (43,112,113) normal şartlarda da mezengiyal hücrelerde ve proksimal tübül hücrelerinde toksisite yaratabileceği belirtilmektedir (112, 113).

Egzersiz proteinürisinin oluşum mekanizmasına katkıda bulunmak için bölümümüzde yapılan bir seri çalışma sonucu (6,41,42) ortaya çıkan bulguları bir adım daha ileri götürebilmek için bu araştırmayı planladık. Egzersiz proteinürisini açıklamak için öne sürülen iki temel yaklaşımdan ön plana çıkan egzersizde oluşan hemodinamik değişikliklere bağlı olarak glomerüler geçirgenliğin artmasıdır (1,2). Diğerleri ise filtre edilen makro moleküllerin fazlalığından dolayı tübüler geri emilim kapasitesinin aşılmasıdır (1,3,5,12). Bizim ise bunlara ek olarak daha önceki çalışmalarımızla ortaya koyduğumuz mekanizma, hem sıçanlarda (6) hem de insanlarda geçerli olmak üzere, egzersiz sırasında oluşan oksidan stresin egzersiz proteinürisi oluşumuna katkıda bulunabileceğidir.

Diğer yönden egzersiz ile oksidan stres arasındaki ilişki çok detaylı olarak bilinmektedir (6,14,71,75). Egzersiz sırasında kaslarda artan oksijen tüketimi sonucu, mitokondrilerden oluşan elektron kaçakları ile serbest radikal oluşumu artmaktadır. Bu yol, egzersizde oluşan oksidan stresin ana kaynağıdır (13). Fakat bunun yanında egzersiz sırasında ve özellikle sonrasında kas ve kan dışında birçok dokuda da oksidan stres bulgularının olması, egzersize bağlı olarak aktive olan başka mekanizmaların varlığını göstermektedir (14). Böbrek egzersiz sırasında aktif olmayan bir organ olduğu için, egzersize bağlı oksidan stresten etkilenmesi, mitokondrilerden oluşan elektron kaçağı ile açıklanamamaktadır. Egzersize bağlı oksidan stres oluşumunu açıklamak için, mitokondrilerden oluşan elektron kaçağı dışında, en fazla üzerinde durulan süreçler lökositlerin aktivasyonu (11,12) ve iskemi-reperfüzyon (13,14,15) mekanizmalarıdır.

Yukarıda sözü edilen iki süreçte lökositlerin aktivasyonu ile oluşan oksidan hasarda NADPH oksidaz enzimi (11,12), iskemi-reperfüzyon da ise

ksantin oksidaz enzimi (13,14,15) rol oynamaktadır. Lökosit aktivasyonu ve iskemi-reperfüzyon süreçlerinin egzersiz sırasında oksidan stres oluşumunu uyararak egzersiz proteinürisine neden olup olmadıklarını ortaya koymak, diğer bir değişle egzersiz proteinürisine neden olan oksidan stresin olası kaynağını araştırmak için araştırmamızı iki kısım halinde düzenledik. Lökosit aktivasyonu aracılığıyla oluşan oksidan stresin etkisi NADPH oksidaz enzim inhibitörü verilerek, iskemi-reperfüzyon mekanizmasının etkisi ise ksantin oksidaz inhibitörü verilerek test edilmeye çalışılmıştır. Araştırmamızın bu dizaynından ötürü tartışmanın da iki başlık altında yapılması, sonuçların daha iyi irdelenmesini sağlayacaktır.

### **NADPH Oksidaz Çalışması**

İnsanlarda görülme sıklığı %70-80'lere varan egzersiz proteinürisi hayvanlarda da gözlenen bir durumdur (17). Köpek (28,29,30), domuz (31), sıçanların (6,32) denek olarak kullanıldığı araştırmalarda yüzme veya koşu bandı egzersizi sonucu proteinüri oluşumu gösterilmiştir. Biz de bu çalışmamızda sıçanlara, koşu bandında tüketici egzersiz modelini uyguladık. Egzersiz sonucu tükenen hayvanlarda idrar total protein düzeyi önemli olarak arttı. Proteinürinin belirgin olarak artmasının yanında tipini saptamak için iki ölçüm daha yapıldı. İdrar albumin ölçümü ile proteinürinin glomerüler kökeni,  $\beta_2$ -mikroglobulin ölçümü ile de tübüler kökeni araştırıldı. Total proteinin yanında idrarda ölçülen albumin düzeyi de benzer şekilde, tüketici egzersiz sonucu istatistiksel olarak önemli artış gösterdi. Fakat bunun yanında idrarda yapılan  $\beta_2$ -mikroglobulin ölçümlerinden bir sonuç elde edilemedi. Başta kitin çalışmadığı düşünülse de serumdan yapılan ölçümlerle sonuç alınması bu olasılığı uzaklaştırdı. İdrarda  $\beta_2$ -mikroglobulin saptanamaması öncelikle tübüler komponentinin olmadığını akla getirmektedir. Bunun yanında insanlarda tübüler proteinüriyi göstermek için iyi bir gösterge olan  $\beta_2$  mikroglobulin'in sıçanlarda etkinliği konusunda herhangi bir literatür bilgisine ulaşamadık. Bundan dolayı Egzersiz Grubu (E) sıçanlarda oluşan proteinürinin glomerüler tip olduğu kanısına vardık.

Daha önce de söz edildiği gibi egzersiz ve oksidan stres arasındaki yakın ilişki bu çalışmamızda da göze çarpmaktaydı. NADPH oksidaz grubunun eritrositlerinde ölçülen TBARS sonuçlarında her ne kadar E grubu değeri, Kontrole göre yüksek olsa da istatistiksel olarak önemli bir farka rastlanmadı. Egzersiz sırasında oluşan oksidan stresin önemli bir kısmının kaslardaki mitokondrilerden kaynaklandığı belirtilmişti. Bu süreç egzersiz kesildikten bir süre sonra durmaktadır. Egzersiz sonrası kanda saptanan oksidan stres bulgularının önemli bir kısmının kaslardan kaynaklandığı düşünülürse, bizim çalışmamızda egzersizden 24 saat sonra ölçülen kan TBARS'inde çok belirgin bir artış görmememiz açıklanabilir. Nitekim bir çok çalışmada da egzersizden 24 saat sonra oksidan stres bulgularının normale döndüğü gözlenmiştir (111,114)



Böbrek dokusundaki oksidan stres bulguları incelendiğinde ise, lipidlerin oksidan hasarını gösteren böbrek TBARS'ın, ve proteinlerin hasarlanmasına işaret eden böbrek protein karbonilasyonu parametrelerinin ikisi de, egzersizden 24 saat sonra kontrol grubuna göre egzersiz grubunda istatistiksel olarak önemli ölçüde yüksek bulunmuştur. Bu iki parametre böbreğin egzersize bağlı oksidan stresten etkilendiğini ve bu sürecin 24 saat sonraya kadar devam ettiğini göstermesi bakımından önemlidir. Araştırmamızda şimdiye kadar tartıştığımız bulgular olan egzersiz sonucu oluşan proteinüri ile böbreklerde oksidan stres bulgularının paralel olması, literatüre katkıda bulunacak orijinal sonuçlar değildir. Bundan sonraki aşamada NADPH oksidaz enzim inhibitörü kullanılarak elde edilen sonuçları incelemek gerekmektedir.

Egzersiz inflamasyon benzeri yanıtı yol açarak lökosit aktivasyonu yaptığı ve bunun sonucunda oluşan solunumsal patlama ile oksidan stres oluşabileceği gösterilmiştir (96). Bu süreçte önemli rol oynayan NADPH oksidaz'ın doğrudan akut egzersizden etkilendiği de ortaya konmuştur (96). Tüketici egzersiz sonucu bu mekanizma bizim deneklerimizde de harekete geçti. Lökosit aktivasyonunun yanında E grubunun böbrek dokusundaki NADPH oksidazın yüksek olması, lökositlerin böbreklere de filtre olduğunu ve burada oksidan strese neden olabileceğini göstermektedir. Nitekim böbrekteki oksidan stres parametreleri az önce tartışıldığı gibi yüksek bulunmuştur.

Biz bu çalışmamızda bu süreci önlemek için NADPH oksidaz inhibitörü olan DPI'yi kullandık. DPI, dimetil sülfoksit (DMSO)'de çözülerek verildiğinden öncelikle 5 deneklik bir grupta DMSO'nun etkilerini inceledik. DMSO'nun ölçtüğümüz hiçbir parametreye etki etmemesi, Kontrol grubuna benzer sonuçlar vermesi, bundan sonra tartışılacak etkilerin hepsinin DPI'ya bağlı olduğunu göstermektedir.

NADPH oksidaz inhibitörünün verildiği I grubunda, lökosit aktivasyonu ve enzimin aktivitesi açısından kontrol grubuna kıyasla herhangi bir fark saptanmadı. Buna benzer sonuçlar egzersizle birlikte inhibitörün verildiği E-I grubunda da saptandı. Başka bir deyişle egzersizde oluşan lökosit aktivasyonu ve NADPH oksidaz aktivite artışı, DPI verilmesi ile önlendi. Egzersize bağlı olarak lökositlerin aktivitesinin veya NADPH oksidaz aktivitesindeki artışının önlenmesi, etkisini oksidan stres parametrelerinde de gösterdi. E-I grubunun böbrek dokusunun TBARS ve protein karbonilasyonu değerleri, E grubuna göre önemli olarak düşük bulundu.

Birçok araştırmada lökositlerin etkisi ortadan kaldırıldığında proteinürinin de düzeldiği ortaya konmuştur (57,115). Bizim araştırmamızda da egzersiz ile aktive olan NADPH oksidaz enzimi inhibe edildiğinde idrar protein düzeyinde ortaya çıkan değişimler çalışmamızın orijinal bulgularını göstermektedir. Enzim inhibisyonu E-I grubunda gözlenen egzersiz proteinürisini

engellemiştir. Bu bulgu, hem total idrar protein hem de idrar albumin düzeylerinin, E1 grubunda E grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli ölçüde düşük bulunmasıyla izlenmektedir.

NADPH oksidaz çalışması sonuçlarımıza göre, egzersiz sırasında artan lökosit aktivasyonu ve aktive lökositlerin böbrek dokusuna infiltrasyonu, egzersiz proteinürisinin oluşumunda etkili olan oksidan stresin kaynağı olarak önem taşımaktadır. Aktive lökositlerdeki NADPH oksidaz enzimi ise bu süreçte kilit rol oynamaktadır.

### **Ksantin Oksidaz Çalışması**

Organizmada egzersize verilen en belirgin yanıt kardiyovasküler sistemde gerçekleşmekte ve egzersize bağlı artmış oksijen gereksinimini karşılamak için kalp debisinin artışının yanında vücut kan dağılımı da düzenlenmektedir. İskelet kaslarına yollanan kan miktarı çok fazla artarken deri, splanik organların yanında böbreklere gönderilen kan miktarı hatırı sayılır ölçüde azalmaktadır (16).

Böbrek kan akımı egzersizin şiddetine bağlı olarak azalma gösterir (17).  $VO_{2max}$ 'ın %50'si düzeyinde yapılan egzersizde renal plazma akımında %30'luk bir azalma olurken, %65  $VO_{2max}$ 'ta %75 civarında azalma olmaktadır (17,18,19,20). Ağır egzersizde ise böbrek kan akımı istirahat düzeyinin 1/5'leri seviyesine düşmektedir. Egzersizin kesilmesiyle kısa sürede normal düzeyine dönen kan akımının iskemi-reperfüzyon benzeri bir süreci tetikleyebileceği daha önceki çalışmalarda da gösterilmiştir (116,117). İskemi-reperfüzyon sonrası oluşan hasardan sorumlu enzim ksantin oksidaz olduğu için, egzersize bağlı oluşan oksidan stres kaynağı olarak araştırmamızın ikinci kısmında bu enzim üzerine odaklanılmıştır.

Ksantin oksidaz çalışmasında da yalnızca tüketici egzersiz yaptırılan E grubunda total idrar proteini ve idrarda saptanan albumin düzeyi kontrole göre istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek bulunmuştur. Ayrıca bunun yanında E grubunun böbrek TBARS ve protein karbonilasyon değerlerinin yüksek olması da egzersize bağlı olarak oksidan strese de artış olduğunu göstermiştir. Diğer çalışmamızdaki gibi ksantin oksidaz çalışmasında da kan TBARS değerleri önemli bir değişiklik sergilememişlerdir.

Egzersize bağlı oksidan stresin oluşması, egzersiz sonrası protein atılımının artması gibi beklenen bulguların bu çalışmada da izlenmesinden sonra ksantin oksidaz inhibitörü ile tedavinin etkisi araştırıldı. Tüketici egzersiz bizim çalışmamızda E grubunda, kontrole göre hem plazmada hem de böbrekte, ksantin oksidaz enziminin aktivitesini değiştirmedi. Daha önce de söz edildiği gibi egzersiz sonucu özellikle kanda ksantin oksidaz enziminin aktivitesinin arttığı gösterilmesine rağmen (15), biz bu sonucu çalışmamızda gözlemedik. Bunun nedeni olarak öncelikle, egzersiz sonucu böbrekte oluşan iskemi ve reperfüzyon dönemlerinin yeterli olmadığı, başka bir deyişle böbrek

kan akımındaki azalmanın iskemi düzeyine varmadığı akla gelebilir. Nitekim Radak ve arkadaşları, tüketici egzersiz uyguladıkları sıçanlarda yaptıkları çalışmada karaciğer dokusunda ksantin oksidaz enziminin arttığını gösterirlerken, böbrek dokusunda saptayamamışlardır (14). Ayrıca bizim deneyimizde enzim aktivitesi egzersizden 24 saat sonra ölçülmüştür ki bu süreç, enzimin aktivitesi artsa da normal düzeyine dönmesi için yeterli bir süre sağlamış olabilir. Ksantin oksidaz inhibitörü olarak oksipurinol kullandığımız gruplarda ise enzim inhibisyonu etkin bir şekilde gerçekleşmiştir. Hem plazma hem de böbrek dokusunda enzim aktivitesinde kontrole göre istatistiksel olarak düşüş saptanmıştır.

Ksantin oksidaz çalışmamızın idrar protein sonuçları incelendiğinde ise umulan profil gözlenmemiş, inhibitör verilmesi egzersize bağlı proteinüriyi önlememiştir. E-İ grubunda hem total idrar proteininde hem de mikroalbumin düzeyinde egzersiz grubundan farklılık saptanamamıştır. Bu çalışmada dikkati çeken bir nokta da yalnızca oksipurinol verilen İ grubunun idrar albumin düzeyinin, kontrolden önemli olarak yüksek bulunmasıdır. Bu bulgunun, oksipurinolün doğrudan etkisi sonucu gelişmiş olabileceği akla gelse de literatürde böyle bir bilgiye rastlanmamıştır. Tersine bazı çalışmalarda ksantin oksidaz inhibitörleri nefrozisli ratlarda proteinüriyi azaltıcı etki göstermiştir (118,119).

Yalnızca iskeminin böbreklere etkisi göz önüne alındığında gelişen patolojik olayların daha çok tubulusları etkilediği gözlenmektedir. Tubuler epitel hücreleri anoksiye daha duyarlıdır. İskemi sonucunda bu hücrelerde çeşitli yapısal değişiklikler oluşabilmektedir. Deneysel olarak oluşturulan iskemi modellerinde de tubullerde belirgin dilatasyon vakuolar formasyon ve nekroza kadar varan sonuçlar elde edilmiştir. Fakat glomerüllerde herhangi bir hasar saptanamamıştır (120). Bunun nedeni olarak tubullerin bazı bölümlerinin (proksimal ve çıkan kalın henle) çok yüksek enerji tüketimi olduğu vurgulanmaktadır (121).

Bu bilgilerin ışığında tekrar proteinüri sonuçlarımıza bakarsak, egzersize bağlı proteinürinin öncelikle glomerüler kökenli olduğunu söyleyebiliriz. İskemi-reperfüzyon süreci sonucu aktive olan olayların tubullerde odaklanması ve glomerüllerin bu süreçten korunması, egzersiz proteinürisinin ksantin oksidaz inhibitörleri ile önlenememesini açıklamaya yardımcı olmaktadır. Egzersiz sırasında böbrekte oluşan iskemiden, öncelikle tubullerin etkilenmesi, glomerüler geçirgenliğin ise etkilenmiyor olması muhtemeldir. Bizim sonuçlarımıza göre ksantin oksidaz enzimi ile oluşan oksidan stresin egzersiz proteinürisinin oluşumuna katkısı yoktur.

## KAYNAKLAR

1. Poortmans JR: Postexercise proteinuria in humans. *JAMA*. 253: 236-240, 1985.
2. Poortmans JR, Vanderstraeten J: Kidney function during exercise in healthy and diseased humans. *Sports Med*. 18 (6): 419-437, 1994.
3. Poortmans JR, Henrist A: The influence of air-cushion shoes on post-exercise proteinuria. *J. Sports Med*. 29: 213-217, 1989.
4. Poortmans JR: Evidence of increased glomerular permeability to proteins during exercise in healthy men. *Contr. Nephrol*. 68: 136-140, 1988.
5. Poortmans JR, Blommaert E, Baptista M, Broe ME, Nouwen EJ: Evidence of differential renal dysfunctions during exercise in men. *Eur. J. Appl. Physiol*. 76: 88-91, 1997.
6. Gunduz F, Senturk UK: The effect of reactive oxidant generation in acute exercise-induced proteinuria in trained and untrained rats. *Eur. J. Appl. Physiol*. 90(5-6): 526-32, 2003.
7. Senturk UK, Kuru O, Gunduz F, Kocer G: Biphasic pattern of exercise-induced proteinuria in sedentary and trained men. *Nefron*da inceleniyor.
8. Diamond JR: The role of reactive oxygen species in animal models of glomerular disease. *Am. J. Kidney Dis*. 19: 292-300, 1992.
9. Ricardo SD, Bertram JF, Ryan GB: Antioxidants protect podocyte foot process in puromycin aminonucleoside-treated rats. *J. Am. Soc. Nephrol*. 14: 1974-1996, 1994.
10. Yoshioka T, Ichikawa I, Fogo A: Reactive oxygen metabolites cause massive, reversible proteinuria and glomerular sieving defect without ultrastructural abnormality. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2: 902-912, 1991.

11. Wang JS, Lee T, Chow SE: Role of exercise intensities in oxidized-low density lipoprotein- mediated redox status of monocyte in men. *J. Appl. Physiol.* Doi. 10.1152, 2006.
12. Part JY, Ferrel RE, Park JJ, Hagberg JM, Phares DA, Jones JM, Brown MD: NADPH oxidase p22phox gene variants are associated with systemic oxidative biomarker response to exercise training. *J. Appl. Physiol.* 99: 1905-1911, 2005.
13. Ji LL. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *PSEBM.* 222: 283-292, 1999.
14. Radak Z, Asano K, Inoue M, Kizaki T, Ishi SO, Suzuki K, Taniguchi N, Ohno H: Superoxide dismutase derivate prevents oxidative damage in liver and kidney of rats induced by exhausting exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 72: 189-194, 1996.
15. Vina J, Gimeno A, Sastre J, Desco C, Asensi M, Pallardo FV, Cuesta A, Ferrero JA, Terada LS, Repine JE: Mechanism of free radical production in exhaustive exercise in humans and rats; role of xanthine oxidase and protection by allopurinol. *IUBMB Life.* 49: 539-544, 2000.
16. McAllister RM: Adaptations in control of blood flow with training: splanchnic and renal blood flows. *Med. Sci. Sports Exerc.* 30(3): 375-381, 1998.
17. Cianflocco AJ: Renal complications of exercise. *Cli. Sports Med.* 11 (2): 437-451, 1992.
18. Middlekauff HR, Nitzche EU, Nguyen AH, Hoh CK, Gibbs GG: Modulation of renal cortical blood flow during static exercise in humans. *Circ. Res.* 80: 62-68, 1997.
19. Irving RA, Noakes TD, Irving GA, Van Zyl-Smit R: The immediate and delayed effects of marathon running on renal function. *J. Urol.* 136: 1176-1180, 1986.
20. Poortmans JR: Exercise and renal function. *Sports Med.* 1 (2): 125-53, 1984.
21. O'Hagan K. P, Casey S. M, Clifford P. S: Muscle chemoreflex increases renal sympathetic nerve activity during exercise. *J. Appl. Physiol.* 82 (6): 1818-1825, 1997.
22. Csenzi A, Carraro M, Sacerdote A, Franca G, Piemotesi A, Bocin E, Faccini L, Bellini G: Involvement of the renin

angiotensin system in the pathogenesis of postexercise proteinuria. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 27: 301-304, 1993.

23. Esnault VLM, Potiron-Josse M, Testa A, Ginet JD, Carrer DL, Guenel J: Captopril but not acebutolol, prazosin or indomethacin decreases postexercise proteinuria. *Nephron.* 58: 437-442, 1991.
24. Kachadorian WA, Johnson RE: Athletic pseudonephritis in relation to rate of exercise. *Lancet.* 28: 472, 1970.
25. Alvarez C, MIR J, Obaya S, Fragoso M: Hematuria and microalbuminuria after a 100 kilometer race. *Am. J. Sports. Med.* 15 (6): 609-611, 1987.
26. Poortmans JR, Engels MF, Sellier M, Leclercq R: Urine protein excretion and swimming events. *Med. Sci. Sports Exerc.* 23 (7): 831-835, 1991.
27. Poortmans JR, Mathieu N, De Plaen P: Influence of running different distances on renal glomerular and tubular impairment in humans. *Eur. J. Appl. Physiol.* 72: 522-527, 1996.
28. Epstein JB, Zambraski E: Proteinuria in exercise dog. *Med. Sci. Sports.* 11(4): 348-350, 1979.
29. Joles JA, Nicaise E, Sanders M, Schot A: Effects of NaHCO<sub>3</sub>,  $\alpha$ -, and  $\beta$ -adrenergic blockade on albuminuria after swimming in splenectomized dogs. *Int. J. Sports Med.* 5 (6): 306-310, 1984.
30. Joles JA, Sanders M, Velthuisen J, Den Hertog J.M, Van Dijk C: Proteinuria in intact and splenectomized dogs after running and swimming. *Int. J. Sports Med.* 5: 311-6, 1984.
31. O'hagan K. P, Hora D. F, Zambraski E: Indomethacin attenuates exercise-induced proteinuria in hypertensive miniature swine. *Am. J. Physiol.* 263(32): 954-961, 1992.
32. Bergamaschi CT, Boim MA, Moura LA, Picarro IC, Schor N: Effects on long-term training on the progression of chronic renal failure in rats. *Med. Sci. Sports Exerc.* 29(2): 169-174, 1997.
33. Poortmans JR, Brauman H, Staroukine M, Verniory A, Decaestecker C, Leclercq R. Indirect evidence of

glomerular/tubular mixed type postexercise proteinuria in healthy humans. *Am. J. Physiol.* 254(23): 277-283, 1988.

34. Poortmans JR, Rampaer L, Wolfs JC: Renal protein excretion after exercise in man. *Eur. J. Appl. Physiol.* 58: 476-480, 1989.
35. Edes TE, Shah JH, Thornton WH: Spontaneous decline in exercise-induced proteinuria during a 100-mile triathlon. *South. Med. J.* 83(9): 1044-1052, 1990.
36. Clerico A, Giammattei C, Cecchini L, Kucchetti A, Cruschelli L, Penno G, Gregori G, Giampietro O: Exercise-induced proteinuria in well-trained athletes. *Clin. Chem.* 36(3): 562-564, 1990
37. Poortmans JR, Jourdain M: Postexercise proteinuria in rowers. *Can. J. Spt. Sci.* 15(2): 126-130, 1990.
38. Poortmans JR, Labilloy D: The influence of work intensity on postexercise proteinuria. *Eur. J. Appl. Physiol.* 57: 260-263, 1988.
39. Robertshaw M, Cheung C. K, Fairly I, Swaminathan R: Protein excretion after prolonged exercise. *Ann. Clin. Biochem.* 30: 34-37, 1993.
40. Zambraski EJ, Bober MC, Goldstein JE, Lakas CS, Shepard MD: Changes in renal cortical sialic acids and colloidal iron staining associated with exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 13(4): 229-232, 1981.
41. Gunduz F, Kuru O, Senturk UK. Effect of nitric oxide on exercise-induced proteinuria in rats. *J. Appl. Physiol.* 95: 1867-1872, 2003.
42. Gunduz F, Kuru O, Senturk UK. Angiotensin II inhibition attenuates postexercise proteinuria in rats. *Int J Sports Med.* 26: 710-713, 2005.
43. Glasscock RJ: Proteinuria. In *Textbook of Nephrology*, Massry SG, Glasscock RJ, Volume 1, Baltimore/USA, Williams&Wilkins, 1989. pp. 530-534.
44. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE: Free radicals, antioxidants and human diseases: Where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* 19(6): 598-620, 1992.

45. Sen CK: Oxidants and antioxidants in exercise. *J. Appl. Physiol.* 79: 675-686, 1995.
46. Lawler JM, Powers SK: Oxidative stress, antioxidant status, and the contracting diaphragm. *Can. J. Appl. Physiol.* 23(1): 23-55, 1998.
47. Jenkins RR, Goldfarb A: Introduction: oxidant stress, aging, and exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 25(2): 210-212, 1993.
48. Cadenas E: Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 79-110, 1989.
49. Byung PY: Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74(1): 139-162, 1994.
50. Dillard CJ, Litov RE, Savin WM, Dumelin EE, Tappel AL: Effects of exercise, vitamin E, ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J. Appl. Physiol.* 45: 927-932, 1978.
51. Shah SV, Walker PD, Ueda N, Nath KA: Reactive oxygen metabolites in toxic acute renal failure. In Gonick HC (ed): *Current Nephrology* St Louis, Mosby, 1995. Vol 18, pp 75-95.
52. Shah S: Oxidant mechanisms in glomerulonephritis. *Semin Nephrol.* 11: 320-326, 1991.
53. Li JZ, Sharma R, Dileepan KN, Savin VJ: Polymorphonuclear leukocytes increase glomerular albumin permeability via hypochlorous acid. *Kidney Int.* 46(4):1025-30, 1994.
54. Donovan KL, Davies M, Coles GA, Williams JD: Relative roles of elastase and reactive oxygen species in the degradation of human glomerular basement membrane by intact human neutrophils. *Kidney Int.* 45: 1555-1561, 1994.
55. Cathcart MK: Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages contributions to atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24: 23-28, 2004.
56. Benna JE, Dang PMC, Pocardalo MAG, Elbim C: Phagocyte NADPH oxidase a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp.* 53: 199-206, 2005.
57. Iwasaki K: Reactive oxygen and glomerular dysfunction. *Xenobiotica.* 20(9): 909-914, 1990.



58. Baud L, Ardaillou R: Involment of reactive oxygen species in kidney damage. *Brit. Med. Bull.* 49(3): 621-629, 1993.
59. Editorial Review: Renal antioxidant enzymes: Their regulation and function. *Kidney Int.* 45: 1-9, 1994.
60. Klahr S: Oxygen radicals and renal diseases. *Miner. Electrolyte Metab.* 23: 140-143, 1997.
61. Shah SV: Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in passive Heyman nephritis in rats. *Am. J. Physiol.* 254(23): 337-344, 1988.
62. Shibasaki IOT, Nakano H, Matsuda H, Matsumoto H, Misava T, Ishimoto F, Sakai O: Effect of Sairei-to on gentamicin nephroroxicity in rats. *Arch. Toxicol.* 67: 145-147, 1993.
63. Othake T, Kimura M, Nisimura M, Hishida A: Roles of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in murine daunomycin-induced nephropathy. *J. Lab. Clin. Med.* 129: 81-88, 1997.
64. Okasora T, Takikawa T, Utsunomiya Y, Senoh I, Hayashibara H, Shiraki K, Kasagi T, Shimizu F: Suppressive effect of superoxide dismutase on adriamycin nephropathy. *Nephron.* 60(2): 199-203, 1992.
65. Rehan A, Wiggins RC, Kunkel RG, Till GO, Johnson KJ: Glomerular injury and proteinuria in rats after intrarenal injection of cobra venom factor. Evidence for the role of neutrophil-derived oxygen free radicals. *Am. J. Pathol.* 123(1): 57-66, 1986.
66. Kuemmerle NB, Chan W, Krieg RJ Jr, Norkus EP, Trachtman H, Chan JC: Effects of fish oil and alpha-tocopherol in immunoglobulin A nephropathy in the rat. *Pediatr. Res.* 43(6): 791-7, 1998.
67. Trachtman H, Chan JC, Chan W, Valderrama E, Brandt R, Wakely P, Futterweit S, Maesaka J, Ma C: Vitamin E ameliorates renal injury in an experimental model of immunoglobulin A nephropathy. *Pediatr. Res.* 40(4): 620-6, 1996.
68. Sanaka T, Nakano Y, Nishimura H, Shinobe M, Higuchi C, Omata M, Nihei H, Sugino N: Therapeutic effect of a newly

developed antioxidative agent (OPC-15161) on experimental immune complex nephritis. *Nephron*. 76(3): 315-22, 1997.

69. Yaguchi Y, Tomino Y, Ozaki T, Okumura K, Sendo F, Koide H: Correlation between reduction of polymorphonuclear leucocytes in glomeruli injected with a newly developed monoclonal antineutrophil antibody and proteinuria in Masugi nephritis. *Nephron*. 62(4): 444-448, 1992.
70. Couser WG, Stilmant MM, Jermanovich NB: Complement-independent nephrotoxic nephritis in the guinea pig. *Kidney Int*. 11(3):170-80, 1977.
71. Kawamura T, Yoshioka T, Bills T, Fogo A, Ichikawa I: Glucocorticoid activates glomerular antioxidant enzymes and protects glomeruli from oxidant injuries. *Kidney Int*. 40(2):291-301, 1991.
72. Dileepan KN, Sharma R, Stechschulte DJ, Savin VJ: Effect of superoxide exposure on albumin permeability of isolated rat glomeruli. *J. Lab. Clin. Med*. 121(6):797-804, 1993.
73. Nath KA, Salahudeen AK: Induction of renal growth and injury in the intact rat kidney by dietary deficiency of antioxidants. *J. Clin. Invest*. 86(4): 1179-92, 1990.
74. Kanwar YS, Liu ZZ, Kashihara N, Wallner EI: Current status of the structural and functional basis of glomerular filtration and proteinuria. *Semin. Nephrol*. 11(4): 390-413, 1991.
75. Lawler JM, and SK. Powers. Oxidative stress, antioxidant status, and the contracting diaphragm. *Can. J. Appl. Physiol*. 23:23-55, 1998.
76. Suzuki, K., H. Sato, T. Kikuchi, T. Abe, S. Nakaji, K. Sugawara, M. Totsuka, K. Sato, and K. Yamaya. Capacity of circulating neutrophils to produce reactive oxygen species after exhaustive exercise. *J. Appl. Physiol*. 81: 1213-1222, 1996.
77. Oken DE: An analysis of glomerular dynamics in rat, dog, and man. *Kidney Int*. 22: 136-45, 1982.
78. Iimura O, Ura N, Nakagawa M. Comparative hypertensionology-renal dopaminergic activity experimental hypertensive rats. *Clin. Exp. Hypertens*. 19:117-130, 1997.

79. Alessio HM, Blasi ER. Physical activity as a natural antioxidant booster and its effect on a healthy life span. *Res. Q. Exerc. Sport.* 68: 292-302, 1997.
80. Krause KH: Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57: 28-29, 2004.
81. Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK, Lambeth JD: Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature.* 401(6748):79-82, 1999.
82. Zekry D, Epperson TK, Krause KH: A role for NOX NADPH oxidases in Alzheimer's disease and other types of dementia? *IUBMB Life.* 55(6):307-313, 2003.
83. Banfi B, Malgrange B, Knisz J, Steger K, Dubois-Dauphin M, Krause KH: NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J. Biol. Chem.* 279(44): 46065-46072, 2004.
84. Paffenholz R, Bergstrom RA, Pasutto F, Wabnitz P, Munroe RJ, Jagla W, Heinzmann U, Marquardt A, Bareiss A, Laufs J, Russ A, Stumm G, Schimenti JC, Bergstrom DE: Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxidase. *Genes. Dev.* 18(5): 486-491, 2004.
85. Geiszt M, Kopp JB, Varnai P, Leto TL: Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* 97(14): 8010-8014, 2000.
86. Shiose A, Kuroda J, Tsuruya K, Hirai M, Hirakata H, Naito S, Hattori M, Sakaki Y, Sumimoto H: A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. *J. Biol. Chem.* 276(2): 1417-1423, 2001.
87. Banfi B, Molnar G, Maturana A, Steger K, Hegedus B, Demarex N, Krause KH: A Ca<sup>2+</sup>-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J. Biol. Chem.* 276(40): 37594-37601, 2001.
88. De Deken X, Wang D, Many MC, Costagliola S, Libert F, Vassart G, Dumont JE, Miot F: Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J. Biol. Chem.* 275(30): 23227-23233, 2000.

- 89.** Geiszt M, Witta J, Baffi J, Lekstrom K, Leto TL: Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense. *FASEB J.* 17(11): 1502-1504, 2003.
- 90.** Lassegue B, Clempus RE: Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285(2): 277-297, 2003.
- 91.** Clancy RM, Leszczynska-Piziak J, Abramson SB: Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. *J. Clin. Invest.* 90(3): 1116-1121, 1992.
- 92.** Laufs U, Adam O, Strehlow K, Wassmann S, Konkol C, Laufs K, Schmidt W, Bohm M, Nickenig G: Down-regulation of Rac-1 GTPase by Estrogen. *J. Biol. Chem.* 278(8): 5956-5962, 2003.
- 93.** O'Dowd YM, El-Benna J, Perianin A, Newsholme P: Inhibition of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-stimulated respiratory burst in human neutrophils by adrenaline: inhibition of Phospholipase A2 activity but not p47phox phosphorylation and translocation. *Biochem. Pharmacol.* 1;67(1): 183-190, 2004.
- 94.** Elbim C, Reglier H, Fay M, Delarche C, Andrieu V, El Benna J, Gougerot-Pocidalo MA: Intracellular pool of IL-10 receptors in specific granules of human neutrophils: differential mobilization by proinflammatory mediators. *J. Immunol.* 15;166(8): 5201-5207, 2001.
- 95.** Zhou Y, Lin G, Murtaugh MP: Interleukin-4 suppresses the expression of macrophage NADPH oxidase heavy chain subunit (gp91-phox). *Biochim. Biophys. Acta.* 16;1265(1): 40-48, 1995.
- 96.** Park JY, Ferrell RE, Park JJ, Hagberg JM, Phares DA, Jones JM, Brown MD: NADPH oxidase p22phox gene variants are associated with systemic oxidative stress biomarker responses to exercise training. *J. Appl. Physiol.* 99(5): 1905-1911, 2005.
- 97.** Lagranha CJ, de Lima TM, Senna SM, Doi SQ, Curi R, Pithon-Curi TC: The effect of glutamine supplementation on the function of neutrophils from exercised rats. *Cell Biochem. Funct.* 23(2): 101-107, 2005.

- 98.** Parks DA, Granger DN: Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta. Physiol. Scand. Suppl.* 548:87-99, 1986.
- 99.** Hille R, Nishino T: Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *FASEB J.* 9(11): 995-1003, 1995.
- 100.** Amaya Y, Yamazaki K, Sato M, Noda K, Nishino T, Nishino T: Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase from the NAD-dependent type to the O<sub>2</sub>-dependent type. Amino acid sequence of rat liver xanthine dehydrogenase and identification of the cleavage sites of the enzyme protein during irreversible conversion by trypsin. *J. Biol. Chem.* 265(24): 14170-14175, 1990.
- 101.** Harrison R: Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic. Biol. Med.* 15;33(6): 774-797, 2002.
- 102.** Delbosc S, Cristol JP, Patel NS, Cuzzocrea S, Thiernemann C: Inhibitors of NADPH oxidase reduce the organ injury in hemorrhagic shock. *Shock.* 2005. 23(2):107-14, 2005.
- 103.** Lenda DM, Boegehold MA: Effect of a high-salt diet on oxidant enzyme activity in skeletal muscle microcirculation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 282(2): 395-402, 2002
- 104.** Newman D. J, Price C: P: Renal Function and Nitrogen Metabolites. In *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, Ed. Burtis C. A, Ashwood E. R. Pennsylvania, W. B. Saunders Company. pp. 1204-1270, 1999
- 105.** Stocks J., Dormandy TL: The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *Br J. Hematol.*, 20: 95-111, 1971.
- 106.** Tietz N. V: Chapter 15, Biochemical aspects of hematology. In *Textbook of Clinical Chemistry* pp: 1532-1534, 1986.
- 107.** Lowry OH, Rosenbrough NJ, Far AL, Randel RJ: Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.

- 108.** Levine RC, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climert I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadman ER: Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods of Enzymol.* 186: 464-478, 1990
- 109.** Fang W, Myllys V, Sandholm M: Resazurin reduction as a function of respiratory burst in bovine neutrophils. *Am. J. Vet. Res.* 58(6): 601-607, 1997.
- 110.** Hofstra TC, Kalra VK, Meiselman HJ, Coates TD: Sickle erythrocytes adhere to polymorphonuclear neutrophils and activate the neutrophil respiratory burst. *Blood.* 15;87(10): 4440-4447, 1996
- 111.** Rabl H, Khoschsorur G, Colombo T, Petritsch P, Rauchenwald M, Koltringer P, Tatzber F, Esterbauer H: A multivitamin infusion prevents lipid peroxidation and improves transplantation performance. *Kidney Int.* 43(4): 912-917, 1993
- 112.** Burton C, Harris KPG: The role of proteinuria in the progression of chronic renal failure. *Am. J. Kidney Dis.* 27(6): 765-775, 1996
- 113.** Bruzzi I, Benigni A, Remuzzi G: Role of increased glomerular protein traffic in the progression of renal failure. *Kidney Int.* 52(62): 29-31, 1997.
- 114.** Groussard C, Rannou-Bekono F, Machefer G, Chevanne M, Vincent S, Sergent O, Cillard J, Gratas-Delamarche A: Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol.* 89(1):14-20, 2003.
- 115.** Rehan A, Wiggins RC, Kunkel RG, Till GO, Johnson KJ: Glomerular injury and proteinuria in rats after intrarenal injection of cobra venom factor. Evidence for the role of neutrophil-derived oxygen free radicals. *Am. J. Pathol.* 123(1): 57-66, 1986.
- 116.** Linas SL, Whittenburg D, Repine JE: Role of xanthine oxidase in ischemia/reperfusion injury. *Am. J. Physiol.* 258(3 Pt 2): 711-716, 1990.
- 117.** Bakris GL, Lass N, Gaber AO, Jones JD, Burnett JC Jr: Radiocontrast medium-induced declines in renal function: a role for oxygen free radicals. *Am. J. Physiol.* 258(1 Pt 2): 115-120, 1990.

- 118.** Plevraki K, Koutinas AF, Kaldrimidou H, Roumpies N, Papazzoglou LG, Saridomichelakis MN, Leomdides L: Effects of allopurinol treatment on the progression of chronic nephritis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *J. Vet. Intern. Med.* 20(2): 228-233, 2006.
- 119.** Carvalho MF, Viero RM, Soares VA: Effect of allopurinol in the course of adriamycin induced nephropathy. *Ren. Fail.* 21(2): 147-154, 1999.
- 120.** Erdogan H, Fadillioglu E, Yagmurca M, Ucar M, Irmak MK: Protein oxidation and lipid peroxidation after renal ischemia-reperfusion injury: protective effects of erdosteine and N-acetylcysteine. *Urol. Res.* 34(1):41-46, 2006.
- 121.** Robbins SL, Cotran RS, Kumar V: Pathologic basis of disease. WB Saunders Company. 4th Edition; 1989. p.1048-1051.

## ÖZGEÇMİŞ

22.04.1980 tarihinde Muğla-Marmaris'te dünyaya gelen Günnur KOÇER, ilk, ve orta öğrenimini Marmaris'te tamamladı. Marmaris Sabancı Süper Lisesinden 1998 yılında mezun oldu ve aynı yıl Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde üniversite öğrenimine başladı. 2002 yılında lisans diploması almaya hak kazandı. 2003 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalında 2006 yılına kadar devam eden Fizyoloji yüksek lisans programına başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizce'dir.