

T1229

T. C  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**EGZERSİZ PROTEİNÜRİSİ OLUŞUMUNDA  
OKSİDAN STRESİN ROLÜ**

T1229/1-1

**UZMANLIK TEZİ**

**FİLİZ GÜNDÜZ**

**TEZ DANIŞMANI**

**DOÇ. DR. ÜMİT KEMAL ŞENTÜRK**

Bu araştırma Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 99. 01. 0103. 07

proje numarası ile desteklenmiştir.

Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir.

**ANTALYA, 2000**

**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
AKDENİZ  
Merkez kütüphanesi

## İÇİNDEKİLER

GİRİŞ	1-2
GENEL BİLGİLER	
PROTEİNÜRİ	3-31
EGZERSİZİN RENAL FİZYOLOJİ ÜZERİNE ETKİLERİ	32-41
EGZERSİZ VE OKSİDAN SİSTEM	42-48
GEREÇ VE YÖNTEMLER	49-67
BULGULAR	68-81
TARTIŞMA	82-96
ÖZET	97-98
İNGİLİZCE ÖZET	99-100
KAYNAKLAR	101-116

## GİRİŞ

Fiziksel egzersiz sonucu idrarda çıkan protein miktarının artmasıyla, geriye dönüşebilir, bening egzersiz proteinürisi oluşur (1,2,3,4,5). İnsanlarda olduğu gibi deney hayvanlarında da gösterilen egzersiz proteinürisi (6,7,8,9,10) orta şiddetli aktivitelerde glomerül kökenli iken ağır egzersizlerde hem glomerüler hem tübüler kökenli olur (1,11,12). Egzersiz proteinürisinin mekanizmasına yönelik ileri sürülen açıklamalar ise bu konuya tam olarak ışık tutamamaktadır. Egzersiz sırasında renal kan akımı kadar azalmayan glomerüler filtrasyon hızı, artmış filtrasyon fraksiyonu ile açıklanmakta ve glomerüler geçirgenliğin artması da buna bağlanmaktadır (2,11). Bunun yanında glomerüler membran üzerindeki anyonik yüklerin nötralizasyonu ve kaybı da ileri sürülen nedenlerden biridir (2,11). Egzersiz proteinürisinde ileri sürülen bir başka mekanizma da glomerülden süzülen protein miktarının çok artarak tübüler emilim kapasitesinin aşılmasıdır (2,3,4,12).

Antioksidan maddelerin (süperoksit dismutaz, katalaz, probukol, selenyum, vitamin E, vitamin C) proteinüriyi azalttığı, bir çok böbrek hastalığı modelinde gösterilmiştir (13,14,15,16,17,18,19). Ayrıca vitamin E eksikliğinin (20) ve renal artere  $H_2O_2$  verilmesinin doza bağlı proteinüri oluşturduğu (21) bilinen durumlardır. Bu bulgulardan dolayı, çeşitli yollarla oluşan reaktif oksijen ürünlerinin vasküler permeabiliteyi değiştirerek, glomerüler membran hasarı

oluşturarak veya glomerüler elektrostatik bariyeri bozarak proteinüri oluşturduğu ortaya konmuştur (14,15,22,23).

Egzersiz sırasında da, başta oksijen tüketiminin çok artması olmak üzere çeşitli nedenlerle oluşan serbest oksijen radikallerinin, kas yanında birçok dokuda oksidan stres oluşturduğu gösterilmiştir (24). Egzersizde oluşan oksidan hasarın, çeşitli dokularda antioksidan girişimlerle, hem insan hem hayvanda önlenemediği kanıtlanmıştır (24)

Şimdiye kadar yapılan araştırmalarda, egzersize bağlı oluşan oksidan stresin egzersiz proteinürisine neden olup olmayacağı incelenmemiştir. Bu mekanizmanın geçerliliğini kanıtlamak için, antioksidan vitaminler olan C ve E vitamini ile egzersizde oluşan oksidan hasarı baskılayarak, egzersiz sonrası proteinüri miktarını ve tipini ortaya koymayı amaçladık. Düzenli fiziksel egzersizler sonucu antrene hale gelmiş canlılarda bir çok metabolik uyumların oluşması yanında, oksidan stres ve antioksidan savunmada da farklılıklar görülür. Bundan dolayı egzersizdeki oksidan stresin proteinüriye etkisi hem sedanter hem de bir aylık koşu sonucu antrene hale getirilen sıçanlar üzerinde incelendi.

## GENEL BİLGİLER

### PROTEİNÜRİ

1960'lı yıllardan beri renal glomerülün fonksiyonu ve yapısı, özellikle de proteinüri ve ultrafiltrasyonun biyolojik temelini anlamaya yönelik çok fazla sayıda çalışma yapılmıştır. Ultrafiltrasyon kavramı ilk olarak Ludwig ve Bowman tarafından ortaya atıldıktan sonra 1960 ve 70'li yıllarda birçok araştırmacı bu kavramın morfolojik ve fizyolojik özelliklerini ortaya çıkarmak ve idrara protein sızıışına neden olan patojenik mekanizmaları tanımlamak için çalışmışlardır (25). Kapiller bir ağ tarafından oluşturulan glomerüllerdeki kan akımı kalp debisinin %20-25'ni alır ve bir kısmı Bowman aralığına geçerek ultrafiltratı oluşturur. Filtratın büyük kısmı tübüllerden geri emilirken sonuç olarak günde 1-1.5 litre idrar meydana gelir. Bu sürecin oluşumunda çeşitli hormonlar, hemodinamik değişiklikler, hücre içi ve dışı komponentlerin yapısal özellikleri gibi çeşitli faktörler önem taşır. Dolayısıyla tüm bu faktörler, çeşitli plazma proteinlerinin glomerüler geçişini ve tübüler geri alınımını düzenleyerek proteinlerin idrarla atılıp atılmaması üzerine etki eder (25).

## I) PROTEİNLERİN İDRARLA ATILIMININ ÖNLENMESİ

Proteinüri mekanizmalarının anlaşılabilmesi için öncelikle böbrekte proteinlerin idrara geçişini engelleyen veya etkileyen mekanizmalar üzerinde durmak gereklidir.

### A) GLOMERÜLER FİLTRASYON BARIYERİ

#### 1) Glomerüler Filtrenin Yapısı

Proteinlerin böbrekte korunmasının en kritik basamağı glomerüler filtrasyon basamağı olduğundan, fonksiyon gören sağlam bir glomerüler filtre önem taşır. Tek bir glomerül yaklaşık 0.19 mm<sup>2</sup> filtrasyon yüzeyine sahiptir (25) Küçük moleküller filtreyi serbestçe geçebilirler ve glomerüler kapiller lümeninden Bowman aralığına doğru hareket ederken sırasıyla şu yapılarla karşılaşır (25,26):

- Kapiller endotelial hücreler
- Glomerüler bazal membran
- Glomerüler epiteliyal hücreler

**a) Kapiller endotelial hücreler:** İleri derecede ince ve pencereci sitoplazmaları olan hücrelerdir. Pencereci geniş, zarsız, yuvarlak açıklıklar olup, bol miktarda plazmanın glomerüler bazal membrana ulaşmasını sağlarlar. Endotelial hücre membranı değişik tip sialoglikoproteinlerden ve heparan sülfat proteoglikandan (HS-PG) zengin olduğundan, endotelial hücrelerdeki elektronegativiteden sorumludur (25,26).

**b) Glomerüler bazal membran (GBM):** Yaklaşık 300-400 nm kalınlığında , üç tabakadan oluşan GBM, filtrenin en önemli komponentidir. Endotel ile komşu olan 20-50 nm kalınlığındaki kısım *lamina rara interna* adını alır; laminin, HS-PG, entaktin ve diğer yapısal proteinleri içeren gevşek fibrillerden örülmüştür. Ortada yer alan ve 50-100 nm kalınlığındaki *lamina densa* tabakası yapısal olarak lamina rara interna'ya benzer olmasına karşın, buradaki fibriller gevşek değil daha yoğun bir şekilde bir arada bulunurlar. Ayrıca lamina densa, GBM'nin stabilitesinden sorumlu olan tip IV kollajenden zengindir. *Lamina rara eksterna*, lamina densanın dış kısmında bulunur ve lamina rara interna ile benzer kalınlıkta ve yapıdadır (25,27) GBM'nin yapısında yoğun olarak bulunan anyonik sülfatlar ve karboksil radikal grupları, GBM'a güçlü bir elektronegativite özelliği verirler. Bundan dolayı GBM, boyut seçici özelliği yanında yük seçici özelliğe de sahiptir (25,26). Ayrıca proteoglikanların sülfat radikalleri suyu tutarak GBM'a hidrate jel matriks yapısını kazandırır, bu yapı plazma proteinlerinin geçişini önlerken sabit solüt akışının da sürekliliğini sağlar (25).

**c) Glomerüler epiteliyal hücreler (podositler):** Glomerüler filtrenin dış kısmı epiteliyal hücrelerden oluşur. Epiteliyal hücrelerin GBM'a doğru uzattıkları ayaklı çıkıntılar, bazal membrana sıkıca yapışırlar (25,26) ve zengin sialoglikoprotein içerikleri nedeniyle güçlü elektronegativiteye sahiptirler (25,28). Ayrıca ayaklı çıkıntılarının tabanında önemli miktarda bulunan aktin filamentleri de dinamik bir geometrinin sürdürülmesini sağlar. Komşu ayaklı çıkıntılarının arası 20-30 nm olup *slit diyafram* denen ince bir membran ile örtülüdür (25,28).

**d) Mezengial hücreler:** Bu hücreler filtrasyon bariyerinde bir katman olarak görev almasalar da, filtrasyon dinamiğinde çok önemli görevleri vardır. Mezenşim kökenli olan bu hücreler glomerüler yumağın interkapiller bölgesinde yer alır ve oluşturdukları Mezengial matriks içinde gömülü bulunurlar (25). Zengin aktomyozin filamentleri, artmış fagositik yetenekleri ve kontraktil özellikleri nedeniyle ultrafiltrasyon hemodinamiğini kontrol edebilirler. Bu hücrelerin ayrıca eritropoietin, prostaglandin (PG), ve renin sentezi yapabildikleri de bilinmektedir (25).

Glomerüler filtreye bir bütün olarak bakıldığında, glomerüllerde büyük moleküllerin çoğunun geçişini engelleyen en önemli yapının glomerüler bazal membran sıkı dokusu olduğu görülür (*boyut seçiciliği*). Ancak glomerüler filtrenin her katmanında yoğun olarak bulunan ve elektronegativiteden sorumlu olan anyonik yükler de bu süreçte oldukça önem taşımaktadır (*yük seçiciliği*) (25,26).

## **2) Moleküllerin Ultrafiltrata Geçişi**

Bir molekülün ultrafiltrata geçişini temel olarak moleküle ait ve hemodinamik olmak üzere iki faktör etkiler. Hemodinamik faktörlerden proteinüri mekanizmalarında söz edileceği için, bu başlık altında yalnızca moleküle ait faktörler incelenecektir.

Bir molekülün glomerüllerden filtre olabilirliğini belirleyen moleküle ait üç temel faktör vardır. Bunların başında molekülün büyüklüğü-molekül ağırlığı gelmektedir (26,27,29). Glomerüler kapiller duvar kabaca bir elek olarak düşünülürse, ancak belli büyüklükteki moleküller bu elekten geçebilir. Örneğin molekül ağırlığı 5000 dalton olan inülin serbestçe geçiş gösterirken, molekül



ağırlığı 68 000 dalton olan albumin geçemez. Bazı plazma proteinlerinin molekül ağırlığı, efektif moleküler yarıçapı ve renal tutulumu Tablo-1'de gösterilmiştir (27).

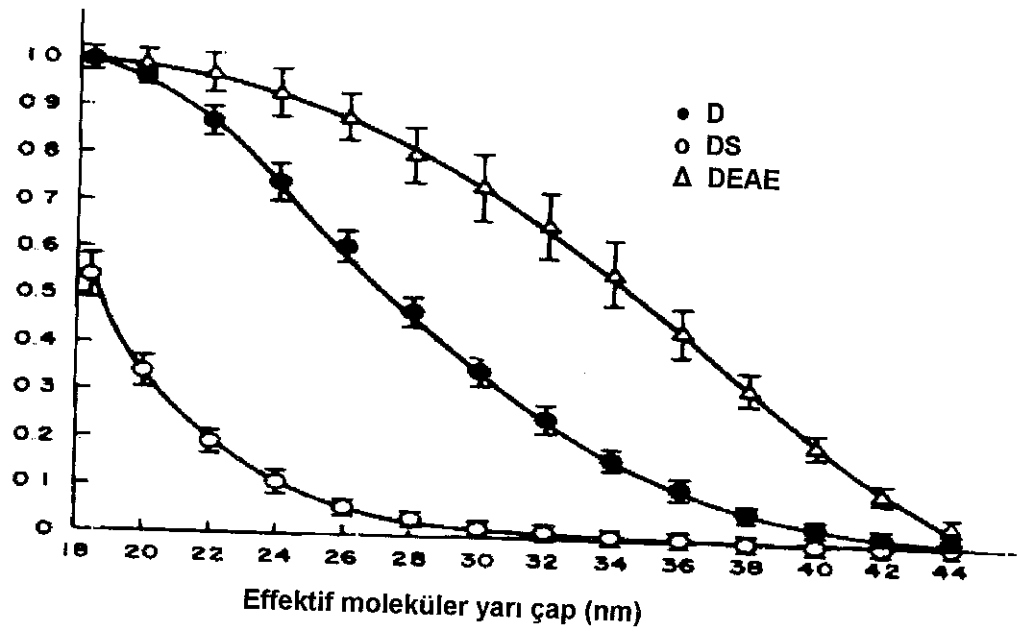
**Tablo-1: Plazma proteinlerinin renal tutulumu**

Protein	Molekül Ağırlığı (Dalton)	Effektif yarıçap (nm)	Glomerüler filtrat/plazma oranı
İnülin	5.200	1.4	1.0
İnsülin	6.000	1.6	0.9
Lizozim	14.000	1.9	0.75
Myoglobin	16.000	1.9	0.75
Albümin	69.000	3.6	0.02
Ferritin	480.000	6.1	0.02

Glomerüler filtrenin geçirgenliği ile ilgili olarak değişik büyüklükteki nötral dekstranlarla çok sayıda çalışma yapılmıştır (27,29,30). En küçük nötral dekstranın efektif moleküler çapı 1.8 nm den daha düşük olup inüline yakındır, yani serbestçe filtre olabilir. Nötral dekstranın molekül büyüklüğü arttıkça klirensi belirgin bir şekilde azalır (Şekil-1) ve bu azalış molekül büyüklüğü yaklaşık 4.2 nm oluncaya kadar sürer. Bunun üzerindeki büyüklüğe sahip moleküllerin geçişi ise glomerüler kapiller duvar tarafından tamamen engellenir. Araştırmalardan elde edilen sonuçlara göre fraksiyonel klirens ile makromoleküllerin çapı arasında doğrusal olmayan ters bir ilişkinin bulunduğu ve glomerüler por büyüklüğünün, çapı 4-5 nm nin altındaki moleküllerin geçişine izin verdiği ortaya çıkmıştır (27,30). Moleküllerin filtrasyonuna etki eden bir diğer faktör ise molekülün taşıdığı yüküdür. Daha önce bahsedilen ve glomerüler duvarın her katmanında yaygın olarak bulunan negatif yüklerden

dolayı molekülün üzerindeki negatif yükler makromoleküler filtrasyonun kısıtlanmasında önemli rol oynar (26,27,29) Bu konu ise değişik molekül büyüklüğüne sahip anyonik ve katyonik dekstranlarla çalışılmıştır. Nötral dekstranın fonksiyonel ekskresyonuna kıyasla, benzer moleküler büyüklükteki anyonik dekstran belirgin olarak daha az, katyonik dekstran ise belirgin olarak daha fazla ekskrete olur (Şekil-1) (27,30).

#### Fraksiyonel klirens



Şekil-1: Glomerüler kapillerden dekstranın filtre olabilirliğine elektriksel yükün ve molekül büyüklüğünün etkisi. D(nötral dekstran), DS(anyonik dekstran sülfat), DEAE(polikasyonik dekstran).

Böbreğe gelen makro moleküllerin büyük bölümünü albumin oluşturur. Albumin fizyolojik solüsyonlarda negatif yüklü polianyon olarak bulunduğu için, bazal membranın ve endotelial pencerelerin negatif yükü, dolaşan albumin moleküllerini iter. Ancak bazı moleküller, albuminden daha büyük oldukları halde eğer pozitif yük taşıyor iseler üriner aralığa geçebilirler. Örneğin anyonik ferritin molekülünün efektif moleküler çapı 6.1 nm, molekül ağırlığı ise 480.000

daltondur ve GBM tarafından filtrata geçişi engellenir. Oysa aynı boyuttaki katyonik ferritin molekülleri slit diyaframa kadar gelebilir (25,27).

Makro moleküllerin glomerüler duvardan fitrasyonunda, molekölün yapısı ve fleksibilitesi de önem taşımaktadır (29) Nötral dekstran lineer bir yapıdadır ve dallanmış fleksibl polimerleri ile sürüngenvari hareketler yaparak ilerler. Oysa albumin küresel ve rijit bir yapıya sahip olduğundan (25), daha önce bahsedilen GBM'nin jel matriks yapısı da göz önünde bulundurulacak olursa (25), glomerüler duvardan geçişte oldukça büyük bir dirençle karşılaşacağı açıktır (25,27).

## **B) TÜBÜLER REABSORPSİYON**

Normal yetişkin bir insanda glomerüler fitrasyon hızı günde ortalama 180 litre, idrar miktarı ise günde 1-1.5 litredir. Yani oluşan filtratın çok büyük bir kısmı organizmaya geri kazandırılır. Glomerüler filtrat böbrek tübüllerine girdiğinde idrar olarak atılmadan önce tübölün birbirini izleyen kısımları boyunca ilerler ve bu yol boyunca moleküllerin çoğu geri emilirken, bazıları ise kandan tüböl lümenine salgılanır (25,26,31).

Glomerüler fitrasyon bariyerindeki etkin korumaya karşı proteinlerin az bir kısmı (özellikle küçük molekül ağırlıklı olanlar) ultrafiltrata geçer. Günde yaklaşık 30 gram kadar protein glomerüler filtrata geçer (26). Böbrekler az miktardaki bu proteinlerin kaybını önlemek için proteinlerin geri emilimini sağlayan mekanizmalara sahiptir. Proteinlerin geri emilimi yalnızca proksimal tübölde gerçekleşir. Lüminal kısımlarında fırçamsı yüzeye sahip olan ve metabolik aktiviteleri fazla olan bu hücreler, proteinleri pinositoz yoluyla hücre içine alırlar. Pinositoz olayının başlangıcı için proteinlerin hücre yüzeyindeki

belirlenmiş bazı noktalara (reseptörler) bağlanması gerekmektedir (26). Hücre içine giren proteinler vakuoler-lizozomal sistem tarafından aminoasitlerine kadar hidrolize edilerek bazal taraftan kolaylaştırılmış diffüzyon yoluyla kana verilerek organizmaya geri kazandırılırlar (27,32)

Glukoz ve aminoasitlerin geri kazanımında olduğu gibi proteinlerin geri kazanımında da özelleşmiş sistemler kullanıldığından, bunların çalışma kapasitelerinin bir üst sınırı vardır. Maksimum tübüler transport (Tm) denilen bu üst sınır plazma proteinlerinin emilimi için 30mg/dk olarak kabul edilir (26). Eğer filtre olan protein miktarı Tm üzerine çıkarsa proksimal tübülde hepsi emilemeyeceği için idrara çıkar. Fizyolojik koşullarda Tm değeri ultrafiltrata geçen protein miktarının üzerindedir (27)

## II) ÜRİNER PROTEİNLERİN KOMPOZİSYONU

Filtrasyon bariyeri ile önlenmeseydi, günde 180 litre olarak oluşan ultrafiltrata tüm plazma proteinleri geçecek ve ultrafiltratın protein içeriği yaklaşık 11-14 kg düzeyinde olacaktı. Ancak normalde insan idrarında protein miktarının çok düşük düzeylerde olduğu bilinmektedir (27). Sağlıklı bir erişkinde idrarla atılan günlük protein miktarı  $80 \pm 24$  mg olup, normal yetişkinlerin %95'inden fazlasında günde 150 mg'ın altında seyredir. İdrarla protein ekskresyonu çocukluk ve ergenlik dönemlerinde artış gösterirken (çocuklar için  $140 \text{ mg/m}^2 / \text{gün}$ ) üst sınır 250 mg/gün olarak belirlenmiştir. Yine normal gebelerde de üriner protein ekskresyonu orta derecede yükselmiştir (33).

Normalde idrarda bulunabilen proteinlerin %50'si plazma proteinlerinden, %50'si de renal ve üriner traktus proteinlerinden kaynaklanmaktadır. İdrarda bulunan plazma proteinleri normalde glomerülden filtre olabilen ve proksimal tübül hücreleri tarafından reabsorbe edilmeden kaçan proteinlerdir ve temel olarak albüminden oluşur. Plazma dışından kaynaklanan proteinlerden ise renal kaynaklı olanlar ya tübüler hücre hasarı sonucunda idrara sızan ya da tübüler hücreler tarafından salgılanan renal doku proteinleri tarafından oluşur. Üriner traktus kaynaklı olanlar mesane, üretra ve bu yoldaki bezler tarafından salgılanan veya dokuların inflamasyonu sonucu idrara çıkan proteinlerdir. Renal-üriner doku proteinlerinin büyük kısmı Tamm-Horsfall proteini (üromodulin) adını alan Henle kulbunun çıkan kolundaki hücreler tarafından sentezlenen ve üriner taşların ana bileşenini oluşturan mukoprotein yapısındaki protein tarafından oluşturulur (33).

### III) ANORMAL PROTEİNÜRİNİN SINIFLANDIRILMASI

İdrarda eser miktarda görülmesi gereken proteinlerin daha fazla miktarda bulunması proteinüri olarak tanımlanır. Daha önce anlatıldığı gibi glomerüllere ulaşan proteinlerin idrara geçmesi, glomerüler kapiller boyunca protein hareketinin mekanik ve elektrokimyasal olarak kısıtlanması ve/veya glomerüler filtreyi geçebilen proteinlerin proksimal tübüler epitel hücreleri tarafından geri emilimi ile önlenir. Bu durumda, proteinlerin artmış üriner ekskresyonunun ya filtre edilen protein miktarının artışı veya tübüler

reabsorbsiyon işlemlerindeki bir bozukluğunun sonucu olduğu söylenebilir (27,33).

### **1) Glomerüler Proteinüri**

Plazma proteinlerine karşı normal glomerüler filtrasyon bariyerinden sorumlu faktörlerin bozulması sonucunda ortaya çıkar. Bu durumda idrara özellikle albumin, globülin gibi büyük molekül ağırlıklı proteinler sızar. İdrardaki protein miktarı hafifçe artabileceği gibi çok yüksek değerlere de çıkabilir (>40 gr/gün). 3.5 gr/gün/1.72m<sup>2</sup> 'nin üzerindeki değerler nefrotik proteinüri; altındaki değerler ise non-nefrotik proteinüri olarak isimlendirilir (33).

### **2) Tübüler Proteinüri**

Normalde glomerüler filtrasyona uğrayabilen proteinin yetersiz reabsorbsiyonu sonucunda ortaya çıkar. Tübüler proteinüride,  $\beta_2$  mikroglobulin,  $\gamma_1$  globulin,  $\gamma_2$  globulin gibi genellikle düşük molekül ağırlıklı proteinlerin idrara geçişi görülür. İdrara sızan protein miktarı geniş bir aralıkta seyredebilir ancak genel olarak 200 mg/gün arasında değişir (33).

### **3) Taşma (Overflow) Proteinüri**

Boyutlarından ötürü normalde glomerüler kapillerden filtre olabilen proteinlerin artmış plazma konsantrasyonları nedeniyle ya da bu proteinlerin biyokimyasal yapılarında değişiklik oluşmasıyla normal kapiller duvardan geçebilirliklerinin artması sonucu tübüler geri emilimlerinin yetersiz kalması nedeniyle ortaya çıkar. Hemoglobinüri, myoglobinüri gibi durumlar bu tip proteinüriye örnek oluşturur (33).

#### 4) Doku Proteinürisi

Genellikle üriner traktusun bazı inflamatuvar veya neoplastik anomalileri ile ilişkili olarak ortaya çıkan proteinüridir. Nadiren ağır proteinüriye neden olur. Günlük protein ekskresyon düzeyi genellikle 500 mg'ın altındadır. (33).

#### 5) Diğer Proteinüri Tipleri

Zaman ve postür ile ilişkili olarak ortaya çıkan çeşitli proteinüri tipleri tanımlanmıştır. Bunların tanısal değeri az olmakla birlikte bir miktar prognostik önem taşırlar.

**a) Geçici (transient) proteinüri:** Genellikle akut hastalıklar ile ilişkili olan ve geri dönüşümlü bir durumdur. Nadiren altta yatan ciddi bir renal lezyona işaret eder (33).

**b) Aralıklı (intermittent) proteinüri:** Zaman içinde dalgalanmalarla seyreden proteinüri tipidir. Ağır proteinüri epizodları daha fazla patolojik öneme sahiptir (27,33).

**c) Israrıcı (persistan) proteinüri:** Genellikle daha ciddi bir dizi bozukluğun habercisi olarak, ısrarcı bir şekilde ortaya çıkar. Tekrarlanan testlerle saptanabilir (27,33,34)

**d) Ortostatik proteinüri:** Pozisyonla ilişkili olarak, dik durumda (ayakta iken) ortaya çıkar. Bu hastaların %10-60'ında renal biyopsilerinde nonspesifik anormallikler saptanabilmesine rağmen genellikle uzun ve benign bir prognoza sahiptir. Eğer beraberinde hematüri gibi başka idrar sediment anormallikleri de varsa veya hipertansiyonla birlikte ise ağır seyredebilir. Hastaların %70-80 gibi büyük kısmı birkaç yıl içinde genellikle normale döner (27,33,34).

e) **Sürekli (constant) proteinüri:** Proteinüri, pozisyonla ilişkisiz olarak hem tüm gece yatar pozisyonda iken hem de ayakta iken mevcuttur. Patolojik açıdan ortostatik proteinüriye göre daha büyük anlam ve öneme sahiptir (33)

f) **İzole proteinüri:** Anormal protein ekskresyonu, idrardaki tek anormal bulgudur. Eritrosit ve diğer hücrelerin ekskresyonu normaldir (33)

g) **Asemptomatik proteinüri:** Böbrek veya üriner traktus ile ilgili herhangi bir hastalığı işaret edecek herhangi bir anormal hikaye, fiziksel veya laboratuvar bulgusu mevcut olmayan proteinüri tipidir (33).

Bu tanımlanan proteinüri tipleri sabit olmak zorunda değildir, bir tipten diğerine sıçrama olabilir

#### IV) PROTEİNÜRİ MEKANİZMALARI

Birçok durumda birbiri içine geçse de idrarda protein çıkışını açıklamak üzere ileri sürülen dört mekanizma vardır.

##### A) HEMODİNAMİK DEĞİŞİKLİKLER

Proteinüriye neden olabilecek ultrafiltrasyon bariyerinin yapısındaki değişiklikleri incelemeden önce fonksiyonel bozuklukları incelemek gerekir. Bu konuda yapılan çalışmalar, hidrodinamik faktörlerin makro moleküllerin glomerüler transportunu belirleyen önemli bir etken olduğunu göstermektedir (25,30). Glomerüler kapiller akım normal veya yüksek iken albumin gibi büyük



molekül ağırlıklı moleküllerin klirensinin düşük olduğu, bu moleküllerin endotelial pencerelerden öteye penetre olamadıkları gösterilmiştir. Oysa glomerüler kapiller akım, renal arter klempi veya angiotensin (Ang) infüzyonu ile deneysel olarak azaltıldığında albumin ve büyük molekül ağırlıklı dekstranların klirensinin önemli ölçüde arttığı, albuminin GBM'ı geçerek üriner aralığa kaçtığı gösterilmiştir (27). Bu fonksiyonel bir etki olup akım normale döndüğünde, bu sızma olayı da hızla ortadan kalkmaktadır. Araştırmalarla ortaya konduğu gibi filtrasyon ünitesinde yapısal değişiklikler oluşmaksızın intraglomerüler hemodinamideki bozukluklar oluşturması üç şekilde açıklanmaktadır (25,27).

**a) Filtrasyon fraksiyonunun artışı:** Tübuloglomerüler feed-back teorisi gereğince böbrek kan akımı düştüğü zaman GFR'deki belirgin düşüşü önlemek için filtrasyon fraksiyonu artış gösterir. Bu durumda plazma akımının yüksek düzeylerinde, plazma içindeki makromoleküler solütlerin kapiller duvardan geçişi daha azken plazma akımı azaldığında makromoleküllerin filtrasyon fraksiyonları yani konsantrasyon gradyenti yönünde kapiller duvardan diffüzyonları ve üriner aralığa geçişleri artar (25,27)

**b) Porların sıkışması:** Yüksek akım sırasındaki yüksek intrakapiller basınç GBM'daki porları sıkıştırarak moleküler hareketi engeller (25,27).

**c) Heteroporoz membran teorisi:** Son zamanlarda tartışılan bu teoriye göre, bazı özel durumlarda bir grup geniş nonselektif porların oluşup proteinüriye neden olduğu düşünülmektedir (27). Endojen angiotensinin, artarak renal ven konstrüksiyonu oluşturduğu deneysel proteinüri modeli buna örnektir (27).

## **B) GLOMERÜLER FİLTRASYON BARIYERİNDE YAPISAL ANORMALLİKLER**

Glomerüler filtrasyon bariyerini oluşturan üç katmandan birinde oluşabilecek patoloji proteinüriye yol açabilir.

### **1) Glomerüler Epitelial Hücre Değişiklikleri**

Epitel ayaksa çıkıntılarının birbiriyle yakınlaşması veya birleşmesi, belirli alanlarda GBM ile birleşmesi ile ağır proteinüri arasında güçlü ilişki olduğu, diğer bir deyişle bu birleşme sonucunda transglomerüler protein geçişinde hızlanma olduğu gösterilmiştir (25,27,28). Bu patoloji, immun kökenli birçok nefritik proteinüri patogenezinde rol oynayan kompleman aktivasyonuna bağlı olarak ortaya çıkabilir (35). Ayrıca puromisin aminonükleosid (PAN) nefrozisi, adriamycin nefropatisi, anti HS-PG antikor nefrozu gibi deneysel hayvan modellerinde ayaksa çıkıntılarının siyaloglikoproteinlerini kaybederek birleştikleri gösterilmiştir (25,27,35).

Podositlerde sentez edilen ve ayaksa çıkıntılardaki negatif yüklerden sorumlu olan en önemli yapı 140 kDa molekül ağırlığında bir siyaloglikoprotein olan podokaliksindir. Deneysel veya klinik olarak organik (aminoglikozid grubu antibiyotikler, immun mekanizma sonucu ortaya çıkan katyonik maddeler, provitamin SO<sub>4</sub>) veya inorganik katyonların (ağır metaller) etkisiyle podokaliksinin sialik asit miktarında azalma olduğu gösterilmiştir. Bunun sonucunda ayaksa çıkıntılarda retraksiyon oluşup takiben slit membranın yeri değişir ve proteinüri gözlenir (28).

Proteinüriden sorumlu olabilen bir başka molekül de sıkı bağlantı (tight junction) proteinlerinden olan ZO-1'dir. Bu protein slit diagramlarda saptandığı için, slit diagramların bir sıkı bağlantı çeşidi olarak kabul edilir. Podositlerin negatif yüklerinin kaybı veya komşu hücreler arasındaki ilişkinin yeniden düzenlenmesi, slit diagramın sıkı bağlantı haline gelmesi sonucu idrarda gözlenen protein miktarı artar (28).

Visseral epitelde görülebilecek bir diğer morfolojik bozukluk, fokal epitelial soyulma olabilir. Bu lezyonda epitelial hücreler, fokal olarak glomerüler bazal membrandan ayrılmıştır ve bu bölgelerin plazma proteinlerine geçirgenliği fazladır (27,29). İnsanlarda minimal değişiklik hastalığı, fokal glomerülosklerozis ve membranöz nefropatide görülen fokal soyulma, deneysel olarak da böbreklerin nöraminidaz ile muamelesi sonucu gerçekleşebilir (27).

## **2) Endotelial Hücre Değişiklikleri**

Çok sık görülen bir durum olmamakla birlikte, deneysel nefrotoksik nefrit modelinde endotelial hücrelerin bazal membrandan ayrıldığı ve endotelial soyulmanın olduğu bu bölgeden bazal membran içine albumin girişinin olduğu gösterilmiştir. Bu deneysel modelde endotelial hücrelerin bazal membrandan araya giren mezangial hücrelerce ayrılması insanlarda görülen Goodpasture sendromunun da bir özelliğidir (27).

## **3) Glomerüler Bazal Membran Değişiklikleri**

GBM'in böbrekte proteinler ve makromoleküller için hem mekanik hem de elektrokimyasal bir engel oluşturduğu daha önce vurgulanmıştı (25,27). Bu mekanik veya elektrokimyasal bütünlüğü bozabilecek durumlar proteinüri ile sonuçlanabilir. Çeşitli maddelerin GBM'da birikmesiyle oluşan düzensiz

kalınlaşma sonucu, yalnızca albümini değil daha büyük olan globulinleri de içeren ağır bir proteinüri olabilir (27,35). Ayrıca GBM'da bol miktarda bulunan ve ona seçici geçirgenlik özelliğini kazandıran anyonik bölgeler nötralize edildiğinde de üriner protein atılımında artış olduğu gösterilmiştir. Bu nötralizasyona neden olabilen katyonik maddelerin organizmadaki kaynakları trombositler (PF-4), polimorf nüveli lökositler ve makrofajlar (lizozimler, peroksidazlar) olabilir. Katyonların anyonik sülfat radikallerine bağlanması sonucu proteoglikanların sülfatlı glikozaminoglikan zincirlerinde üç boyutlu yapısal değişiklikler meydana gelir. İnsanda ağır proteinüri ile seyreden kongenital nefrotik sendromda da anyonik bölgelerde azalma saptanmıştır (25).

### **C) İMMÜN MEKANİZMA**

Yapılan çok sayıdaki çalışmanın sonucunda, insan glomeulonefritlerinin çoğundan immün mekanizmanın sorumlu olduğu ortaya çıkmıştır (19,35,36). Bu şekilde glomerülde oluşan yapısal değişiklikler başlıca GBM'da ve/veya visseral epitelial hücrelerde meydana gelmektedir (27,35)

Hümmoral veya hümmresel immün sistemin tetiği çekmesiyle başlayan primer glomerüler hasarı takiben, sekonder inflamatuvar mediator mekanizması (polimorf nüveli lökositler, makrofajlar, kompleman proteinleri, trombositler) renal hasarın artarak devam etmesine neden olurlar (35).

#### **1) İmmün Mekanizmanın Oluşturduğu Primer Glomerüler Hasar**

GBM'ın normal yapısal komponentleri, antikolar için bir hedef oluşturur. Çeşitli patolojik durumlarda ortaya çıkan antijen-antikor kompleksleri öncelikle glomerül içinde stabilize olur ve glomerüler inflamasyonu indükleyen süreci

başlatırlar (35) Oluşan immün kompleksin boyutu ve yükü gibi değişkenlere bağlı olarak glomerül içinde immün kompleks birikimi meydana gelir. Bu birikim, mesangiumda ve/veya glomerüler kapiller duvarda subepitelial olarak görülebileceği gibi, subendotelial olarak da oluşabilir (35) Genellikle oluşan birikim miktarı ile proteinüri derecesi ilişkilidir (36). Dolaşımdan kaynaklanan bazı faktörler ise bu birikimlere müdahale ederek glomerüler hasarın ikinci fazını başlatırlar.

## 2) İmmün Mekanizmanın Oluşturduğu Sekonder Glomerüler Hasar

**a) Polimorf nüveli lökositler (PNL):** Glomerülonefrit patogenezinde önemli rolü olduğu herkesçe kabul edilen hücrelerdir (35,37). Genellikle hayvanlarda deneysel olarak oluşturulan nefrit modellerinde, glomerül içine PNL infiltrasyonu ile üriner protein ekskresyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunduğu (37) ve dolaşımdaki PNL'lerin monoklonal nötrofil antikoru ile tüketilmesi sonucunda glomerülerdeki hücre birikiminin ve proteinürinin azaldığı gösterilmiştir (35). PNL akışı sağlam bir kompleman kaskadını gerektirir ve C<sub>3</sub> ile C<sub>5</sub>'in kemotaktik etkilerine yanıt olarak gerçekleşir (35)

**b) Monositler:** Monositlerin, glomerülonefritlerdeki glomerüllerde hücre birikimine belirgin katkısının olduğu hem deneysel çalışmalarla hem de insan renal biyopsi çalışmalarında gösterilmiştir. Monositlerin glomerüllerde toplanmasından sorumlu faktörlerin başında lenfokinler, C5a'nın kemoatraktan etkisi, monositlerin yüzeyindeki Fc reseptörü ve bazı glomerüler yapılara ait reseptörler (laminin, fibronektin, kollagen reseptörleri) gelmektedir. Glomerüllerde biriken monositler kompleman sisteminin çeşitli üyeleri, platelet aktive edici faktör, angiogenesis faktör, katyonik proteinler, serbest radikaller,

kollagenaz, elastaz ve lizozomal enzimler gibi maddelerin sentez ve salınımında etkilidirler (35). Bu faktörlerden bazıları durumun daha da ağırlaşmasına katkıda bulunur

**c) Kompleman sistemi:** İnflamatuvar hücelere bağlı olarak ortaya çıkan glomerüler hasarda indirekt rol oynadığı düşünülen kompleman sisteminin inflamatuvar hücelerekinden bağımsız olarak aynı zamanda direkt etkilerinin de bulunduğu son yıllarda kanıtlanmıştır (35). Aktive olan kompleman sistemi dolaylı etkisini PNL'lerin kemotaksisi sonucu göstererek glomerüler hasar ve proteinüri oluşturabilir (38). Kompleman kaskadının klasik ve alternatif yollarının aktivasyonu sonucunda ortaya çıkan C5b-9 (membran attack complex)'un mekanizması tam bilinmemekle birlikte glomerüler filtrasyon bariyerini hasarladığı gösterilmiştir. C5b-9, kültür ortamında mesangial hücrelerde prostoglandin, IL-1 benzeri faktör ve serbest oksijen radikali sentezini stimüle ederek bu etkisini ortaya çıkarır (35)

**d) Trombositler:** İnflamatuvar glomerüler hasar sürecinde trombositlerden salgılanan bazı maddeler glomerüler hasara katkıda bulunabilirler. Bu maddelerden biri olan platelet aktive edici faktör (PAF) monosit, granülosit, aktive trombosit ve glomerüler hücrelerce salgılanarak kemotaktik etki, trombosit ve lökosit aktivasyonu, kompleman sistemini uyarması sonucu glomerüler hasar oluşturabilir Platelet faktör-4 (PF-4) katyonik etkisiyle filtredeki anyonları nötralize ederek;  $\beta$ -tromboglobulin, endotelial prostasiklin üretimini inhibe ederek; Platelet derived growth factor (PDGF) ise glomerüler, mesangial ve endotelial hücelere mitojenik etkisi ile zararlı etkilerini ortaya koyabilirler (35)

e) **Koagülasyon kaskadı:** İmmün kökenli glomerüler hasardaki rolü tartışmalı olmakla birlikte insan renal hastalıklarında koagülasyon kaskadının da katkısının bulunduğu dair indirekt kanıtlar vardır (35).

## D) PROTEİNÜRİDE REAKTİF OKSİJEN ÜRÜNLERİNİN ROLÜ

Reaktif oksijen ürünlerinin (reactive oxygen species, ROS) immün ve non-immün glomerüler hasar (39,40,41) akut renal yetmezlik (18,42) ve tübülointerstisyel hastalıklarda (42) rolü olduğu, ayrıca varolan kronik renal yetmezliğin ilerlemesinde de Haber-Weis reaksiyonu sonucu ortaya çıkan serbest radikallerin önemli etkide bulunduğu (43) belirtilmektedir. ROS'un proteinüri oluşturmadaki etkilerinden söz etmeden önce araştırmamızda önemli bir yer tuttuğu için bu moleküllerin özellikleri ve oluşturdukları oksidan hasardan, ayrıca bunlara karşı işlev gören antioksidan sistemden söz etmek gerekir.

### 1) Reaktif Oksijen Ürünleri ve Oksidan Hasar

Organizmada normal oksijen metabolizması sırasında oluşan 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 ( $O_2^-$ ), hidroksil radikali (OH), hidrojen peroksit molekülü ( $H_2O_2$ ), hidroperoksit ( $HO_2$ ), tekil (siglet) oksijen ( $^1O_2$ ), ozon ( $O_3$ ), nitrik oksit radikali (NO) ve hipoklorik asit (HOCl)'dir (48,49). Çeşitli enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşabilen bu ürünlerin organizmadaki en önemli kaynağı elektronların mitokondrideki elektron transport sisteminde taşınması sırasında oluşan

elektron kaçaklarıdır (46). ROS'lar yapılarında taşıdıkları eşleşmemiş elektron nedeniyle oldukça kararsız yapıda olduklarından, kararlı duruma geçmek için çevrelerindeki her yapıyı reaksiyona girerek hasarlayabilirler. Öncelikli hedefleri ise lipidler, nükleik asitler ve proteinlerdir (46).

**a) Memran lipidlerine etkileri:** ROS'lar ile lipidlerin reaksiyonu sonucu oluşan lipid peroksidasyonun (LPO) ilk basamağında, serbest radikaller hidrojen atomu elde edebilmek için poliansatüre yağ asitlerinin yan zincirinde bulunan karbonlara saldırırlar. Böylece karbon merkezli bir lipid radikal (L) oluşur ve bu da genellikle konjuge dien şekline dönüştükten sonra oksijenle reaksiyona girerek peroksil radikalini (LOO) oluşturur (50,51). LOO, membranda bulunan komşu yan zincirlerden hidrojen atomlarını çıkararak lipid hidroperoksitlerin (LOOH) ve yeni peroksi radikallerinin oluşmasına neden olur (50,51,52,53). Lipid hidroperoksitler'in yıkımı sonucu LO, LOO gibi radikaller ve malonildialdehit (MDA), 4-hidroksinonenal gibi aldehitler oluşur, serbest radikaller gibi aldehitler de oldukça toksik moleküllerdir. Hücre membran komponentlerine etki ederek iyon transportu, enzim aktivitesi, deformabilite gibi membran özelliklerini değiştirebilmeleri yanısıra, DNA'nın nitrojen bazları ile etkileşerek de mutajenik, karsinojenik, genotoksik etki gösterebilmektedirler (53,54,55,56). Demir ve bakır iyonları, bazı demir içeren proteinler (hem, hemoglobin, myoglobin), lipid hidroperoksitlerini bozarak peroksidasyonu sonlandırır ve son ürünler olarak etan, pentan gibi hidrokarbon gazları ve kısa zincirli yağ asitleri oluşur (50,53).

**b) Diğer yapılara etkileri:** ROS'nin etkilediği diğer yapıların başında proteinler ve nükleik asitler gelmektedir. Proteinleri oluşturan aminoasitlerin



oksidasyonu sonucu proteinlerde fragmantasyon, agregasyon ve proteolitik etkiye duyarlık gelişmektedir (57,58,59). Bu arada özellikle mitokondrial DNA'nın oksidan stresten zarar gördüğü bilinmektedir (49,60,61,62). Ayrıca alfa-hidroksialdehit yapısındaki karbonhidratların radikallerin etkisiyle ve metal iyonları varlığında ketoaldehid'lere dönüştüğü (49) ve birçok monosakkarit'in otooksidasyona uğrayabildiği de gösterilmiştir (49,63).

ROS üretimi, çeşitli hastalık durumlarında artabileceği gibi hastalık olmaksızın, yaşlılık, egzersiz, hiperbarik oksijen soluma gibi durumlarda da artarak oksidatif strese neden olabilir (46,64).

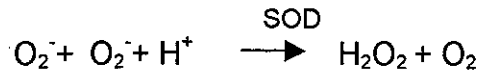
## **2) Antioksidan Sistem**

Antioksidan savunma sistemi, organizmayı serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı korur (49,65). Bu sistemin en önemli öğeleri antioksidan enzimler (süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidazlar) ve antioksidan biyomoleküller (vitamin E, vitamin C, vitamin A, glutatyon, ürik asit, bilirubin, glukoz, selenyum, transferrin, ferritin, sistein)'dir. Bu iki sistem beraberce primer defans mekanizmasını oluştururlar. Oksidan hasar sonucu oluşmuş bozuk yapıları ortadan kaldırmaya yarayan lipolitik enzimler (fosfolipazlar), proteolitik enzimler (proteaz ve peptidazlar) ve DNA tamir enzimleri (nükleazlar) ise sekonder defans mekanizmasını meydana getirirler (49,66,67,68). Sekonder defansın görevi oksidan hasardan zarar gören ve işlevi bozulmuş olan hücresel yapıları ortadan kaldırmaktır (49,69). Bu sistemi oluşturan bütün üyelerin birbirleriyle ilişkili olarak, koordine bir şekilde çalışıyor olması ROS'un zararlı etkilerinin ortaya çıkmasını engeller (49,70,71,72)

### a) Antioksidan enzimler

**Süperoksit Dismutaz (SOD):** Süperoksit anyonunun hidrojen perokside dismutasyonuna neden olan bir metalloenzim olan SOD, yapısında taşıdığı metal iyonuna göre üç tiptir (73).

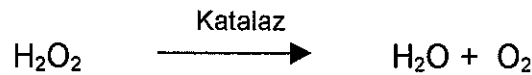
1) Bakır-çinko süperoksit dismutaz (Cu/Zn-SOD); herbiri 16.000 dalton ağırlığında olan iki polimerden oluşmuştur. Polimerlerin biri bakır diğeri çinko içerir. Ökaryotik hücrelerin sitozolünde ve eritrositlerde bulunur (67,68)



2) Mangan süperoksit dismutaz (Mn-SOD); tetramerik yapıda olup toplam molekül ağırlığı 80.000 daltondur Her bir alt birimi birer mangan içerir, mitokondri matriksinde lokalizedir (66,74).

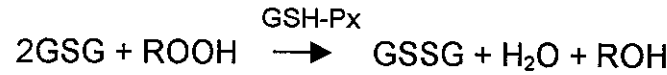
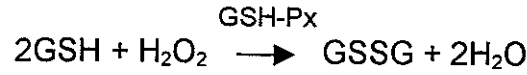
3-Demir süperoksit dismutaz (Fe-SOD); bazı bakterilerin (E coli) periplazmik bölgelerinde bulunduğu gösterilen Fe-SOD'ın dış kaynaklı süperoksit radikallerine karşı koruyucu etkisinin olduğu bildirilmektedir (49).

**Katalaz (CAT):** 240.000 dalton molekül ağırlığında, tetramerik yapıda olan ve aktif bölgesinde dört adet ferrihem grubu içeren bir enzimdir (49,75,76). Süperoksit anyonundan oluşan hidrojen peroksidi suya çevirir.

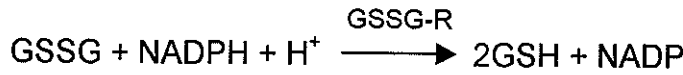


Bu reaksiyon glutatyon peroksidaz tarafından katalizlenir, fakat CAT'ın hidrojen perokside affinitesinin glutatyon peroksidazinkinden az olması nedeniyle bu enzim daha çok patolojik durumlarda önemlidir (64).

**Glutasyon Peroksidaz (GPx):** Hücre mitokondrial matriks ve sitozolünde bulunarak organik hidroperoksitlerin ve hidrojen peroksidin redüksiyonunu katalize eden GPx'in, selenyuma bağımlı ve selenyumdan bağımsız olarak çalışan iki tipi vardır (53,77,78).



**Glutasyon Redüktaz (GSSG-R):** Glutasyon peroksidazın substrat olarak redükte glutatyona (GSH) ihtiyacı vardır. Glutasyon redüktaz da okside glutasyonu (GSSG) redükte glutatyona dönüştüren ve NADPH'a bağımlı olarak çalışan reaksiyonu katalize eder (65,79,45,64).



#### b) Antioksidan biyomoleküller

Genellikle serbest radikallerle direkt kendileri etkileşerek onları zararsız formlara dönüştüren moleküllerdir. Bunlardan en önemlilerinin özellikleri ve etki şekilleri şöyle özetlenebilir :

**Vitamin E:** En önemli yağda çözünen zincir kırıcı antioksidandır. Çoğu mitokondri iç membranında olmak üzere tüm hücre lipid membranlarında bol miktarda bulunur (45,49,65,80).

**Vitamin C:** Hidrofilik yapıda olduğundan hücre içi ve dışı sıvılarda yaygın olarak bulunur. Antioksidan etkinliğini hem serbest radikallerle doğrudan

reaksiyona girerek hem de vitamin E redüksiyonuna katkıda bulunarak gösterir (44,81,82,83).

*Vitamin A:* Metabolik ön maddesi olan  $\beta$ -karoten serbest radikallerden özellikle peroksil radikalleri ile doğrudan etkileşerek onları söndürürler (84).

*Glutasyon (GSH):* Etkili bir reduktan olarak işlev görür. Bir yandan süperoksit anyonu, hidroksil radikali gibi serbest radikallerle reaksiyona girerken bir yandan da vitamin A gibi bazı antioksidanların okside formdan redükte forma geçmelerini sağlar.

### 3) Böbrekte ROS Kaynakları

Böbrekte serbest oksijen radikallerinin kaynakları buraya gelmiş olan nötrofiller, monosit-makrofajlar veya stimule mesangial hücreler olabilir (25,42). Kültüre rat mesangial hücrelerinin PAF, membran attack kompleks, immun kompleksler, opsonize zymosan ile stimule edilmesi sonucu ve  $O_2^-$ - $H_2O_2$  gibi ürünleri oluşturabildikleri gösterilmiştir (42). Diğer yandan glomerüllere filtre olan nötrofil ve makrofajlar aktive olduklarında bol miktarda ROS üretebilirler (39). Süperoksit anyonu oluşumu; xanthine oxidase, aldehid oxidase, NADPH dehidrogenaz/NADPH oksidaz gibi fagositik hücrelerin membranında lokalize olan ve çeşitli inflamasyon mediatörlerince aktive hale getirilen enzimler aracılığı ile katalizlenir (39). Diğer yandan, aktive nötrofillerden salınan myeloperoksidaz enzimi,  $H_2O_2$ 'den HOCl oluşumunu katalizler ki bu ürün GBM boyunca subepitelial bölgeye bağlanarak glomerüler yapıda halojenasyona neden olmaktadır (25,42). Çeşitli tip glomerülo nefritlerde, nötrofil ve monosit/makrofajların glomerüllere infiltre olduğu ve süperoksit anyonu oluşturarak proteinüriye yol açtıkları gösterilmiştir (85).

#### 4) ROS'un Glomerüler Hasar Oluşturma Mekanizmaları

Öncelikle hücre membranında ROS aracılığıyla oluşan lipid peroksidasyonu, GBM'da direkt hasar yapabilir (39,42). Ayrıca LPO aracılığıyla aktive olan metalloproteinaz ve gelatinaz gibi enzimler GBM'da hasar oluşturarak proteinüriye katkıda bulunabilirler (25,39,42). Deneysel olarak LPO aracılığıyla kollajen gen ekspresyonunun arttığı, sıçan mesangial hücrelerindeki tip I ve tip IV kollajen birikimi sonucu tübulointerstisyel fibrozis geliştiği saptanmıştır. Ayrıca antioksidanların diyetsetel eksikliğinin tübulointerstisyel infiltrasyonu induklediği gösterilmiştir (42)

Diğer yandan ROS'lar hücrelerin proletoolitik hasara yatkınlığını da artırır (25,42). 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 (42).

Bunun yanında ROS'lar, glikozaminoglikanları hasarlamakla birlikte (39) izole perfüze böbrek modelinde dışarıdan verilen ROS'a yanıt olarak proteoglikanların de novo sentezinde de doz bağımlı azalma olduğu saptanmıştır (42).

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 makrofaj ve T hücre infiltrasyonu sonucu glomerüler hasar oluşturabilir (42).

### 5) Antioksidan Tedavinin Proteinüriye Etkisi

Yapılan çalışmalarda doku antioksidan sistemlerinin deneysel olarak güçlendirilmesi veya zayıflatılmasının, ROS nedeniyle gelişecek hasara yatkınlığı da değiştirdiğini göstermiştir (22). Ayrıca vitamin E ve selenyum gibi antioksidanların diyetsel eksikliğinde ROS'un ortadan kaldırılmasında yetersizlik ve zararlı etkilerinde artış olduğu saptanmıştır (20). Antioksidan tedaviyle ROS aracılı gen transkripsiyonu (42) önlenilmekte, ROS aracılı proteinüri ise azaltılabilmektedir (17,40,41,86).

## V) PROTEİNÜRİNİN NEFROTOKSİK ETKİSİ

Normal şartlarda yalnız düşük molekül ağırlıklı makromoleküller üriner aralığa geçebilir ve bunların büyük bir kısmı geriye kazanılırken idrara çıkan protein miktarı oldukça düşüktür. Fakat patolojik durumlarda oluşan proteinüri, patolojiyi daha da arttırabilir (43,87). Bu konuda yapılan araştırmalarda, bazı renal hastalıklarda proteinüri miktarı ile hastalığın progresyon düzeyinin ilişkili olduğu gösterilmiştir (87).

Proteinürinin nefrotoksik etkisi özellikle iki yapı üzerindedir:

### 1) Mesangial Hücre Toksisitesi

Serum proteinlerinin özellikle lipoproteinlerin mesangiuma akışı sonucunda mesangial hücreler aracılığıyla glomerüloskleroz oluşmaktadır. LDL'in mesangial hücreler üzerindeki reseptörleri ile etkileşimi sonucunda bu hücrelerde proliferasyon ve anjiogenez indüklenir (87). Ayrıca LDL, mesangial

hücrelerden monosit kemoatraktan protein-1(MCP-1), PDGF ekstrasellüler bir matriks proteini olan fibronektin üretimine ve ortama makrofaj akışına neden olur. Aynı zamanda LDL mezangiumda makrofaj ve mezangial hücreler tarafından okside edilerek daha toksik formu olan okside LDL haline de dönüştürülür (87). Bunun yanında okside LDL'nin, redoks sensitif bir enzim olan hemeoksigenaz'ın hem aktivitesini hem de ekspresyonunu arttırarak oksidatif strese neden olabileceği belirtilmektedir (88).

## 2) Proksimal Tübüler Hücre Disfonksiyonu

Daha önce de söz edildiği gibi normalde glomerüllerden filtre olan proteinler tübüler sıvıya geçerek proksimal tübül hücreleri tarafından geri emilirler. Ancak hem tübüler sıvıdaki artmış protein miktarı hem de normalde idrarda bulunmayan ancak glomerüler hasar sonrası idrara geçebilen biyolojik aktif proteinlerin etkisiyle tübüler toksisite gelişebilir (87)

Proteinüri sırasında oluşan tübüler toksisite mekanizmaları şu şekilde sıralanabilir:

a) Tübül sıvısına ulaşan protein yükü arttığında lizozomal yolağın aşırı kullanımına bağlı olarak lizozomlarda kabarılaşma-şişme ve bir noktada yırtılma ortaya çıkar. Sonuç olarak bu süreç hücre sitoplazmasına lizozomal enzimlerin çıkmasına ve dolayısıyla da hücre fonksiyonlarının zarar görmesiyle sonuçlanabilir (43,87,88,89).

b) Lipoproteinler glomerüllerden filtre edildikten sonra tübül hücresindeki spesifik membran reseptörüne bağlanarak sitoplazmaya geçerler ve toksik radikallere okside olabilirler. LDL okside olduğunda proksimal tübül hücresindeki oksidatif stresi indükler ve hücreye zarar verebilir (87,88).

c) Diğer bir mekanizma ise protein presipitasyonu sonucu túbül sıvısı akışında aksama ile túbulointerstisyel basınçta artış ve doku hasarının ilerlemesidir (43)

d) Proteinler, túbüler hücre fonksiyonlarını doğrudan değiştirebilirler (87,88). Proksimal túbüler hücreler, yüksek konsantrasyonda transferrin veya albumin ile karşılaştıklarında monosit ve/veya T lenfositler için kemotraktan olan MCP-1, osteopontin, kemotaktik lipid faktör üretiminde artış görülür (87,88,89). T lenfositlerin ve monositlerin ortama gelmesiyle hücre aracılı immun yanıt ortaya çıkar ve olay kronik túbulointerstisyel hasar, túbüler kayıp ve fibrozis ile sonuçlanabilir (89).

e) Glomerülo nefritli hastalarda üriner amonyum düzeyinin, túbüler hücrelere fazla miktarda ulaşan proteinlerin katabolizması sonucunda arttığı ve proteinüri düzeyi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Amonyak, kompleman sistemini alternatif yoldan aktive ederek olayları daha da ağırlaştırabilir (87).

f) Kompleman komponentleri de glomerüler bariyerden filtre olarak proksimal túbüler hücrelerin luminal kenarı boyunca depozitler oluşturabilirler (87,89). C3 ile C5b-9 túbüler hasarı ve interstisyel inflamasyonu, kemotaktik ve ROS oluşturuocu etkiyle gerçekleştirir. İnsan túbüler kültür hücrelerinde yapılan çalışmalarda C5b-9'un fibronektin ve kollagen sentezini uyarıcı etkisinin bulunduğu gösterilmiştir (89) Diğer yandan artmış protein yüküne yanıt olarak proksimal túbüler hücreler tarafından belirgin miktarda C3 sentezi de yapılmaktadır.

g) Proksimal túbüler hücrelerin albumin, transferrin ve IgG gibi proteinlerle normalden yüksek konsantrasyonlarda karşılaştıklarında Endotelin-



1 (ET-1) üretiminde bir artış olduğu ve bu artışın protein miktarı ile korelasyon gösterdiği saptanmıştır (88,89). ET-1, interstisyel fibroblast reseptörlerine spesifik olarak bağlanarak fibroblast proliferasyonunu ve ekstrasellüler matriks proteinlerinin sentezini artırır (89). Diğer yandan ET-1'in artmış sentezi, afferent-efferent arteriollerde tonus artışına ve dolayısıyla da interstisyel iskemi-fibrozise neden olabilir (88,89).

h) Proksimal tübüler hücreler, yüksek konsantrasyonda albumin ile inkübe edildiğinde bir transkripsiyon faktörü olan NF-kB'nin, DNA'ya bağlanma aktivitesinde doz bağımlı artış olduğu saptanmıştır. NF-kB yolağı kemokin genlerin upregülasyonunda önemli fonksiyonel etkiye sahiptir. Bu yolak aracılığı ile belirgin MCP-1 transkripsiyonu yanında interferon ve sitokinlerin de yapımında artış saptanmıştır (89).

ı) Transferrin, albuminden hafifçe büyük bir proteindir ve glomerüler proteinüride filtre edilebilir. Transferrinin yapısında bulunan demir, tübülün ilerleyen kısımlarında ortamın asiditesi artınca serbestleşir (43,87,90). Serbest demirin, kültüre tübüler hücrelerde peroksidatif hasar oluşturarak hücreSEL MDA düzeylerini ve LDH salınımını arttırdığı gösterilmiştir (87,90).

Bütün bunlardan yola çıkarak, antiproteinürik tedaviyle veya proteinürinin uyardığı yolaklar engellenerek en azından böbrek yetmezliğine gidişin önlenebileceği veya yavaşlatılabileceği düşünülebilir (87).

## EGZERSİZİN RENAL FİZYOLOJİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Egzersize verilen en belirgin yanıt kardiyovasküler sistemde, egzersizde artan oksijen gereksinimini karşılamak için kardiyak atım sayısı ve hacminin artışı ile kan dağılımının yeniden düzenlenmesi şeklinde ortaya çıkar. Kalp ve egzersiz yapan iskelet kaslarına olan kan akımı belirgin ölçüde artarken, deri, böbrekler ve splanknik organlardaki kan akımı azalır (91).

### 1) BÖBREK KAN AKIMI VE FONKSİYONU DEĞİŞİKLİKLERİ

**Kan akımı değişiklikleri:** Egzersiz, renal kan akımında egzersiz şiddetiyle orantılı olarak azalmaya neden olur (1,92,93,94). Maksimal oksijen tüketiminin ( $VO_{2max}$ ) %50'si düzeyinde yapılan egzersizde renal plazma akımında %30 azalma oluşurken  $VO_{2max}$  %65'te ise, %75 civarında azalma görülür (1). Kanın böbrek içindeki dağılımı ise hayvan deneylerinden elde edilen sonuçlara göre egzersiz ile değişmemektedir.

**GFR değişikliği:** Egzersiz sırasında aktif kaslar böbrek sirkülasyonundan geçen akımı değiştirebilirler ancak GFR, egzersiz şiddeti belirli bir düzeyin üstüne çıkmadıkça değişmez  $VO_{2max}$  %50'nin üzerine çıktığında GFR basamaklı bir şekilde azalır ve maksimum egzersiz şiddetinde bazal düzeyin % 60'ına kadar düşer (11)

**Filtrasyon fraksiyonu (FF) değişiklikleri:** Egzersizde GFR'daki düşüşün, renal plazma akımındakinden daha az olmasının nedeni egzersizin şiddetine bağlı olarak görülen GFR/RPF oranı olarak bilinen FF'deki artıştır

(1,2) FF, hafif egzersizde %15, ağır egzersizde ise %67 düzeylerinde artış gösterir (1) Söz edildiği gibi egzersizde kasların artan oksijen gereksinimini karşılamak için kan dağılımının yeniden böbrekler aleyhine düzenlenmesi ve böbreğin otoregülasyon mekanizmalarıyla, fonksiyonlarında ortaya çıkan ileri düzeydeki değişmelere karşı koymaya çalışması, değişik egzersiz şiddetlerinde etki eden humoral ve sinirsel faktörlerin etkinliğinin değişmesi ile açıklanır. Böbrek kan akımı, glomerüler filtrasyon hızı, filtrasyon fraksiyonu parametrelerine etki eden en önemli mekanizmalar şu şekilde özetlenebilir:

Bu konudaki en önemli mekanizma sempatik sistem aktivasyonudur. Egzersizde böbreklere etki eden sempatik sistem aktivasyonu iki şekilde olur. İlki renal sempatik sinir aktivitesinin (RSNA) artması (95) diğeri ise böbrek üstü bezinden salgılanan adrenal ve noradrenalinin dolaşımdaki seviyelerinin yükselmesidir (1,2) Sempatik sistem aktivasyonu nedeniyle artan adrenal-noradrenalin seviyeleri, afferent-efferent renal arterlerde ilerleyici vazokonstrüksiyona neden olur (1,12,92). Diğeri yandan, egzersizdeki sempatik aktivasyon sonucu oluşan  $\beta$  adrenerjik stimülasyon renin salınımını artar (96,97). Bunu izleyen Ang üretimi, bir yandan efferent glomerüler arter konstrüksiyonu ile transglomerüler basıncı ve FF'nu artırırken (97) diğeri yandan adrenal korteksten aldosteron sekresyonunu düzenler (1) Ayrıca egzersizde dopamin, nöropeptid Y gibi diğeri sempatik nörotransmitterlerin de artış gösterdiği ve egzersizde ortaya çıkan splanik ve renal vazokonstriksiyona aracılık edebilecekleri belirtilmektedir (91).

**Elektrolit atılımı:** Genel olarak ağır egzersizde sodyum, klor, kalsiyum ve fosfor gibi elektrolitlerin ekskresyonu inhibe olur. Potasyum ekskresyonu ise

egzersizden etkilenmemektedir (1,94,98). İdrar sodyum ekskresyonundaki düşüş, egzersizde düzeyi artan aldosterona bağlı olarak, sodyumun artmış tübüler reabsorbsiyonunun bir sonucudur (1).

**İdrar oluşum hızı:** İdrar akımı ve idrarla su atılımı egzersizle azalmaktadır. Ancak bu azalmanın oranı ve süresi önceden kestirilemez. Egzersizde idrar akım hızındaki değişiklikler GFR, suyun tübüler rearbsorbsiyonu, solütlerin sekresyonu ve antidiüretik hormon (ADH)'un dolaşımdaki düzeyine bağlıdır. ADH, aşırı sıvı kaybına karşı koruyucu olarak en önemli mekanizmayı oluşturmaktadır. Egzersize ADH yanıtı egzersizin şiddeti ve süresine, ayrıca kişinin hidrasyon derecesine bağlı olarak artar. Bu artış daha çok egzersiz sırasında organ kan akımının azalması sonucunda karaciğer ve renal metabolizmanın değişmesi ile ilişkilidir (1).

## II) EGZERSİZİN BÖBREK ÜZERİNE OLUMSUZ ETKİLERİ

Böbrekte egzersizde veya sonrasında başta kan akımı değişikliğine bağlı olmak üzere bir takım istenmeyen durumlar gözlenebilir. Bunların görülüş sıklığı az olmamakla birlikte genellikle iyi huylu ve kısa sürede geriye dönen durumlardır. Egzersize bağlı proteinüriye değinmeden önce, egzersiz nedeniyle böbrek üzerinde oluşabilecek bazı olumsuz etkileri kısaca özetlemek gerekir.

### A) HEMATÜRİ

Mikroskobik veya makroskobik hematürinin egzersiz ile ilişkisi, her düzey atlette karşımıza çıkan ve eskiden beri bilinen bir durum olup bildirilen

insidanslar %55'ten %80'e kadar değişmektedir (1,99). Spor hematürisi tekrarlayabilmesine rağmen genellikle 1-2 gün içinde kaybolur

Bilindiği gibi renal kan akımı ve glomerüler filtrasyon, egzersizin şiddetiyle orantılı olarak azalmaktadır. Bu azalış sonucunda nefronda hipoksik hasar, glomerüler permeabilite artışı ve eritrositlerin idrara geçişi söz konusu olabilir. Bu arada efferent glomerüler arteriolde daha belirgin olarak ortaya çıkan renal vazokonstriksiyon sonucunda filtrasyon fraksiyonu yükselir ve glomerüler kapillerde ortaya çıkan sıkışma idrara eritrosit geçişini kolaylaştırır (1)

Mesane kaynaklı hematüri, travma sonucunda ortaya çıkar. Mesane hasarının mekanizması gevşek yapıdaki posterior kese duvarının, daha kalın ve sağlam yapıda olan ve trigonu da içine alan taban kısmına çarpmasıdır. Her bir çarpışın şiddeti çok küçük olmasına rağmen, bunun uzun koşular boyunca tekrarlanması travmaya neden olabilmektedir (1)

Spor hematürisi olan atletlerde, ayırıcı tanıda myoglobinüri ve yürüyüş (marş) hemoglobinürisi düşünölmelidir. Yürüyüş hemoglobinürisi, aynı zamanda ayak darbesi hemolizi olarak da bilinir (3). Sert bir zeminde koşu sırasında ayak tabanından geçen eritrositlerin mekanik travmaya uğraması şeklinde açıklanmaktadır (1,3). Bunun yanında egzersiz sırasında bir çok nedene bağlı olarak intravasküler hemoliz oluşabilmekte ve idrara geçebilmektedir.

Myoglobin, ağır egzersiz sırasında kas liflerinin yıkımı sonucu açığa çıkarak, glomerülden kolayca filtre olarak idrara çıkabilir (1). Özellikle sıcak

ortamda yapılan ağır egzersiz sonucu myoglobinüri gelişebilir (25). Nadir olmakla birlikte mevcudiyetinde ağır kas hasarını gösterir (1).

## **B) EGZERSİZ VE NEFROPATİ**

Renal fonsiyonları normal olanlarda, sık olmamasına rağmen egzersizin renal sistem üzerine en ciddi yan etkisi akut renal yetmezliktir (1,11). Şiddetli egzersiz sırasında böbrek kan akımının önemli ölçüde azalmasıyla oluşan iskemi, sıvı kaybı sonucu dehidrasyon, myoglobinüri, hemoglobinüri, vücut ısı artışı, kas hasarı sonucu çıkan enzimlerin böbrekten süzülmesi gibi nedenler ile akut tübüler nekroz gelişebilir (1,11). Egzersizle oluşan akut renal yetmezliğin prognozu genellikle iyidir ve renal fonsiyonlar 21 günden kısa sürede normale döner (11)

Renal fonsiyonları bozuk olanlarda ise renal yetmezlik gelişme riskinin daha fazla olması öngörülebilir. Yapılan çalışmalarda diabetiklerdeki renal yetmezlik riskinin normal popülasyona göre 17 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (11). Ancak egzersizin, genç diyabetiklerde (11-18 yaş) potansiyel faydalı etkilerinin olduğu da bildirilmektedir. Yapılan hayvan deneylerinde kronik egzersizin renal hastalığın progresyonunu yavaşlatmada faydalı olabileceği gösterilmiştir (11).

## **C) RENAL TRAVMA**

Böbrekler arkasındaki kas tabakası, kostalar, posterior karın duvarı, destekleyici fasya ve diğer abdominal yapılarca iyi korunmasına rağmen egzersiz sırasında hasarlanabilir. Renal travma, futbol ve boksta olduğu gibi

direkt darbeye veya koşuda olduğu gibi böbrek sarsıntısıyla ortaya çıkabilir. Hem travmatik hem non-travmatik mekanizmalar aynı anda da etki edebilirler. Renal zedelenmeler renal kontüzyon, kortikal laserasyon, kaliks laserasyonu, tam renal fraktür ve vasküler hasar şeklinde gelişebilir (1).

## **D) EGZERSİZ PROTEİNÜRİSİ**

### **1) Tanım ve Tarihçe**

Egzersiz proteinürisi öncelikle insanlarda tanımlanmış, atletlerde sık görülen ve egzersiz sonrası geçici olarak idrarda protein miktarının artmasıyla izlenen bir durumdur (2,3,4,5,12,100). Daha sonra köpek, domuz, sıçan gibi türlerde de ortaya konmuştur (6,7,8,9,10). İlk olarak Von Leube tarafından 1878 yılında "sağlıklı kişilerde egzersiz sonrası idrarda protein bulunması" şeklinde tanımlanmıştır (1,2). 1956'da ise Gardener postegzersiz proteinürisi için "atletik pseudonefrit" terimini kullanarak, bu durumda ortaya çıkan değişikliklerin, nefrotik sendromdan farklı olarak, benign ve geçici olduğuna dikkat çekmiştir (1,2).

### **2) Görüldüğü Spor Dalları**

Hematüriye benzer şekilde proteinüri de darbeye açık olan veya olmayan bir çok spor dalında ortaya çıkmaktadır (1,97). Koşu (93,100), bisiklet egzersizi (101,102), ritmik yürüyüş (98), dağ yürüyüşü (23), triatlon (103), futbol (2,104), basketbol-hentbol (104), atletizm, kürek (105), boks, lakros (2) gibi bir çok spor dalında egzersiz proteinürisinin varlığı gösterilmiştir. Bu bulguların sonucunda egzersiz proteinürisinin sık görülen ve hemen her tip egzersizde ortaya çıkan bir bulgu olduğu saptanmıştır.

### 3) Sıklığı ve Şiddeti

Egzersiz proteinürisi nisbeten sık görülür, Alvea ve arkadaşları (1) yaptıkları çalışmada atletlerin %70-80'inde ortaya çıktığını saptamışlardır. Özellikle ağır ve kısa süreli egzersizde idrarla atılan protein düzeyi dinlenimdeki çok üzerine çıkabilmektedir. Bu konuda yapılan çalışmaların sonuçlarına göre ise bu artış 20 ile 100 kat arasında değişim gösterebilmektedir (1,97,101,105).

Yapılan çalışmalar postegzersiz proteinürisinin ortaya çıkışında egzersizin süresinden çok şiddetinin önemli olduğunu göstermektedir (1,3,11,5,12,106). Ayrıca egzersiz tipinin, proteinüri miktarının belirlenmesinde önemli olduğu, örneğin koşu sonrasında ortaya çıkan proteinürinin bisiklet, yüzme ve kürek egzersizleri sonrası ortaya çıkandan daha belirgin olduğu gösterilmiştir.

### 4) Kompozisyonu

Postegzersiz proteinürisinin komponentleri normal şartlarda idrarda görülen fizyolojik proteinlerden fark göstererek, ağırlıklı olarak plazma kaynaklı proteinlerden oluşmuştur (1,97). Örneğin bir maraton koşusu sonrasında idrara çıkan total proteinin yaklaşık %82'sinden plazma proteinlerinin ekskresyonu sorumlu iken normal dinlenimdeki bir kişide bu oran %57'dir (1). Egzersiz sonrası idrardaki miktarları artan proteinler, albumin gibi büyük molekül ağırlıklı (101) ve/veya  $\beta_2$  mikroglobulin (101),  $\alpha_1$  mikroglobulin (107) gibi küçük molekül ağırlıklı olabilirler. Yine yüzücülerde yapılan çalışmalarda yüzme sonrası idrarla atılan albumin ve  $\beta_2$  mikroglobulin düzeylerinde artış olduğu saptanmıştır (5). Bu konudaki çalışmalar, idrara çıkan protein tipinin egzersiz şiddeti ile ilişkili



olduğunu vurgulamaktadır (101). Araştırmacılara göre, egzersiz sonrası idrarda saptanan en büyük protein komponentini albumin oluşturmakta, ancak ağır ve kısa süreli egzersiz sonrasında albuminle birlikte düşük molekül ağırlıklı proteinlerin de idrarla ekskresyonu artmaktadır (101,104,107,108). Fakat sonuç olarak genellikle hafif veya orta dereceli egzersizde daha çok büyük molekül ağırlıklı proteinlerin idrarda görüldüğü glomerüler tipte proteinüri ortaya çıkarken, ağır egzersizde buna düşük molekül ağırlıklı proteinlerin de eklendiği miks (glomerülotübüler) tip proteinüri olduğu kabul edilir (1,11,12).

Bir maraton koşusu öncesinde ve sonrasında, spesifik plazma proteinlerine karşı antiserum kullanılarak uygulanan immünodiffüzyon tekniği ile, idrar örneklerinden protein ölçümü yapılmış ve sonuçlar Tablo-2'te verilmiştir.

**Tablo-2:** Maraton öncesi ve sonrası idrarda çıkan proteinlerin miktarları.

Proteinler	Dinlenimde ( $\mu\text{g}/\text{dk}$ )	Egzersizden 30 dk sonra ( $\mu\text{g}/\text{dk}$ )
Tryptofandan zengin prealbumin	0.03±0.01	0.26±0.31
Albumin	12.73±4.63	126.70±89.92
$\alpha_1$ -Acid glycoprotein	0.41±0.14	11.83±10.22
$\alpha_1$ -Antitrypsin	0.31±0.13	2.04±2.02
Ceruloplasmin	0.06±0.01	0.39±0.44
Haptoglobulin	0.18±0.18	0.79±0.69
$\alpha_2$ -G <sub>c</sub> -globulin	0.03±0.01	0.37±0.37
HS- $\alpha_2$ -glycoprotein	0.10±0.02	0.78±0.85
Zn- $\alpha_2$ -glycoprotein	0.93±0.26	5.97±4.34
Hemopexin	0.20±0.06	1.21±1.06
Transferrin	0.16±0.07	3.31±2.19
B <sub>2</sub> -glycoprotein	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 $\gamma_1$ -globulin	0.02±0.01	3.57±5.62

## 5) Süresi

İdrara protein çıkışı genellikle egzersiz bittikten sonraki 20-30 dakika içinde gerçekleşir ve egzersizi izleyen 24-48 saat içinde de kaybolur. Hem total proteinlerin hem de albuminin idrarla atılım oranları logaritmik olarak azalır, yarılanma ömrü yaklaşık bir saattir (1,11,12).

## 6) Oluşumunda İleri Sürülen Mekanizmalar

Artmış glomerüler permeabilite ve proteinlerin tübüler reabsorbsiyon işleminin doygunluğu nedeniyle yetersiz tübüler reabsorbsiyonları egzersiz sonrası proteinürinin temel mekanizmalarını oluşturmaktadır (1,3,5,11,97).

### a) Glomerüler filtrasyonu etkileyen faktörler

**Hemodinamik faktörler:** Renal kan akımının egzersiz şiddetine bağlı olmak üzere %20 düzeylerine kadar inmesine (2) rağmen GFR'de bu oranda düşme olmadığı bunun da nedeninin filtrasyon fraksiyonunun artması olduğu daha önce belirtilmişti (2,11). Efferent arteriol vazokonstriksiyonu ile artan filtrasyon fraksiyonu kendini glomerüler kan akımının yavaşlaması ve sıvı ile solütlerin yanında makromoleküllerin de ultrafiltrata geçmesini kolaylaştırarak gösterir (2,11). Bilinen otopregülasyon mekanizmaları yanında kinin-kallikrein sistemi ve prostoglandinlerin de renal hemodinamik değişikliklere etki ederek egzersize bağlı proteinüride rol oynadıkları ileri sürülmektedir (1,9)

**Yük seçici özelliğin kaybı:** Hemodinamik ve hormonal değişiklikler yanında kapiller duvarın sabit negatif yüklerinin kaybının da egzersiz proteinürisinden sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir (2) Zambraski ve ark koşan köpekler üzerinde yaptıkları araştırmalar sonucunda, egzersizin glomerüler elektrostatik bariyeri azalttığını ve bunun da makromoleküllerin

glomerüllerden artmış geçişini kısmen açıklayabileceğini bildirmişlerdir (2,11) Bunda etkili olan nedenlerin glikozaminoglikan ve  $\alpha_1$  asit glikoprotein gibi moleküllerin idrarla atılımının artması olduğu savunulmaktadır. Bu maddelerin etkisi muhtemelen kapiller membran negatif yüklerini artırarak anyonik moleküllerin glomerüler bariyeri geçişini engellemektir (11). Sağlıklı insanlarda 8,5 km koşu sonrasında idrarda glikozaminoglikan atılım oranında artış olması yanında, ağır egzersiz sonrası plazma düzeyleri değişmemesine rağmen  $\alpha_1$ -asit glikoproteininin üriner ekskresyonunun arttığı gösterilmiştir (11).

#### **b) Tübüler reabsorpsiyonu etkileyen faktörler**

Glomerüler filtreden geçebilen proteinler proksimal tübül hücreleri tarafından , belirli bir maksimum tübüler reabsorpsiyon kapasitesi düzeyine kadar geri kazanılırlar (2,33) . Proksimal tübüle ulaşan protein yükü, kendisi için belirli olan Tm değerini aşacak olursa protein idrarla atılmaya başlar. Düşük molekül ağırlıklı proteinlerin Tm değerinin filtre edilen yükten bir miktar fazla olması normal şartlarda tamamen geri emilmelerini sağlar. Ancak ağır egzersiz sırasında maksimal tübüler reabsorpsiyon düzeyine ulaşılması, yani tübüler reabsorpsiyon kapasitesinin doygunluğa ulaşması sonucunda albumin ile birlikte düşük molekül ağırlıklı proteinlerin de idrara çıkması olasıdır (2,3,4,12)

## EGZERSİZ VE OKSİDAN SİSTEM

Egzersiz, serbest radikallerin üretimini arttırdığı fizyolojik durumlardan birisidir. Egzersizle oksidan sistem ilişkisi ilk olarak 1978 yılında ortaya konmuş (109) ve yapılan çalışmalar bu konudaki bilgilerin önemli ölçüde artmasını sağlamıştır. Egzersizin oksidan stres ve antioksidan sistem ile ilişkisi temel olarak akut ve kronik egzersizin etkisi olmak üzere iki kategoride incelenmelidir.

### 1) AKUT EGZERSİZİN ETKİSİ

#### A) AKUT EGZERSİZ VE OKSİDAN STRES

Akut egzersiz, tek egzersiz periodunun uygulanmasıyla, egzersiz sırasında veya sonrasında görülen kısa veya uzun süreli değişiklikleri kapsar. Bu etkiler genellikle düzenli antrenman yapmayan bireylerdeki farklılıkları ortaya koymaya yöneliktir.

Egzersiz sırasında oksijen tüketiminin artışına paralel olarak serbest radikal üretimi de artar ve bu artış egzersizin şiddeti ve/veya süresi ile doğrudan ilişki gösterir. Akut egzersiz ile oksidan stres ilişkisini ortaya koyan çok sayıda kanıt mevcuttur (45,46,47,64).

#### 1) Kanıtlar

a) **İndirekt kanıtlar:** Oksidan ürünlerin yarattığı hasarların ölçülmesine dayanır. Lipid peroksidasyonunun göstergeleri olan tiyobarbitürik asit reaktif

ürünleri (Thiobarbituric Acid Reactive Substance; TBARS), malonildialdehit (MDA), konjuge dien, lipid hidroperoksid ve hidrokarbon ölçümleri sonucu akut egzersiz sırasında veya sonrasında artış gösterdiği iyi bilinen bir durumdur (45,46,110,111).

Nükleik asit oksidasyonu, serbest radikallerin oluşturduğu bir diğer hasarlanma mekanizmasıdır Hücre içinde yeralan RNA hasarını yansıtan idrarla 8-hidroksiguanosine atılımının akut egzersizde artmasının yanısıra, şiddetli egzersiz sonrasında DNA oksidasyonuna bağlı olarak DNA'larda çapraz bağlanmalar ve kopmalar saptanmıştır (45,111).

**b) Direkt kanıtlar:** Elektron spin rezonans, paramagnetik rezonans ve ROS probu olan dikloroflorörens gibi daha ileri teknikler kullanılarak serbest radikallerin doğrudan ölçülmesine dayanır. Bu yöntemlerle yapılan ölçümler sonucunda hem deney hayvanlarında hem insanlarda egzersizle ROS artışı gösterilmiştir (45).

**c) Okside glutatyon/redükte glutatyon oranı:** GSH oksidan ürünlerle savaşırken okside olarak GSSG'e dönüşür ve düzeyi azalır. Bu nedenle GSSG/GSH oranı oksidatif stres belirleyicisi olarak kullanılmaktadır. GSSG'nin enzimatik olarak GSH'a dönüşmesiyle de yenilenir. Ancak egzersizde olduğu gibi oksidan stres artmış ise bu yenilenme yeterince GSH dönüşümü sağlayamaz ve GSSG/GSH oranı azalır Egzersiz sonrasında, GSSG/GSH oranının azalması yanında GSH düzeyi ile MDA düzeyi arasında negatif bir ilişkinin varlığı da saptanmıştır (64).

## 2) Akut Egzersizde Oksidan Stresin Artış Mekanizmaları

Egzersizde artan oksidan stres kas hücresi veya kas hücresi dışındaki nedenlerden kaynaklanabilir

**a) Kas hücresi içinde serbest radikal oluşumu:** Egzersiz sırasında tüketilen oksijen, egzersiz şiddeti maksimuma ulaştığında 100 katına kadar çıkabilir ve bu tüketilen oksijenden %2-5 düzeyinde serbest radikal oluşur. Kas hücresi içinde oluşan serbest radikallerin önemli bir kaynağı mitokondrilerdeki elektron transport zincirinden olan elektron kaçaklarıdır. Elektron transport zincirindeki kaçak daha çok kompleks I (NADH dehidrogenaz) ve kompleks II (ubiquinone c redüktaz) seviyelerinde olmaktadır (46).

Kas hücresi içinde üretilen serbest radikallerin bir diğer kaynağı ise endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) ve nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) tarafından yapılan nitrik oksit (NO)'tir. Bunlardan eNOS mitokondride yerleşmiş olup egzersiz gibi bir uyarı ile yapımı induklenmektedir. İndüklenen eNOS aracılığı ile oluşan NO, O<sub>2</sub> ile birlikte peroksinitritleri oluşturarak oksidan hasara katkıda bulunabilir (46).

**b) Kas hücresi dışında serbest radikal oluşumu:** Eksternal kaynaklı serbest radikallerin en önemli oluşum nedenlerinden biri, iskemi-reperfüzyon mekanizması sonucu oluşan ürünlerdir. Egzersiz sırasında egzersiz şiddetine bağlı olarak sindirim sistemi ve böbrekler gibi bazı sistemlerde kan akımı önemli ölçüde azalabilir (1,92,93). Egzersiz bitiminde ise bu bölgelerdeki kan akımı eski haline döner, hatta artış göstererek reaktif hiperemi ile sonuçlanabilir. Yine iskemi-reperfüzyon olayı, özellikle izometrik egzersiz sırasında oluşan güçlü kas kasılmaları kas içindeki bazı liflerin kan akımlarını

geçici olarak kesilip, gevşeme ile normale dönmesi sonucu oluşabilir (46,110,111). Her iki durumda da oksidan strese artış olmasının nedeni ksantin oksidaz sistemidir. Bu enzim normal şartlarda ksantin dehidrogenaz olarak, kalp ve kas vasküler endotelinde bol miktarda bulunur. Ancak egzersizde olduğu gibi serbest radikallere maruz kalma, iskemi ve kalsiyum artışı gibi induklenme durumlarında ksantin oksidaz şekline çevrilerek serbest radikal üretimine neden olur (46)

Akut egzersizdeki eksternal ROS kaynaklarından biri de hem deney hayvanlarında hem insanlarda egzersiz sonrası kas içi myeloperoksidaz aktivitesinde artışla ortaya koyulabilen nötrofil infiltrasyonu ve bununla birlikte ortaya çıkan inflamasyondur (46). Nötrofiller kaslarda biriktiğinde oluşan solunum patlamasıyla (respiratory burst) açığa çıkan  $O_2^-$  anyonu SOD ile  $H_2O_2$ 'ye indirgenir. Bu da egzersiz sırasında bol miktarda serbestlenen Fe ile reaksiyona girerek (Haber-Weiss reaksiyonu) oldukça saldırgan olduğu bilinen OH oluşumuna neden olur (46)

Kas içinde olduğu gibi kas dışında da NOS aracılığıyla oluşan NO oksidan strese neden olabilir. Laktik asit oluşumu, hemoglobin otooksidasyonu, hipertermi, prostanoit metabolizması ise bu konuda suçlanan diğer mekanizmalardır (46).

## **B) AKUT EGZERSİZ VE ANTIOKSİDAN SAVUNMA**

### **1) Enzimler**

Belirli bir zaman dilimini alan (dakika-saat) fiziksel aktiviteden kısa süre sonra enzim aktivitelerinde değişikliğin ortaya çıkması beklenmemesi gereken

bir durumdur. Fakat akut egzersiz sonrası yapılan analizlerde antioksidan enzimlerin bazılarında artış saptandığı belirtilmiştir (64,110,112). Enzim düzeyinde bir değişiklik olmadığını ileri süren çalışmalar da olmasına karşın, bu konuda kabul bulan görüş, akut egzersiz sonrası kas dokusunda, ayrıca kalp, karaciğer ve akciğerde SOD ve GPx enzimlerinin aktivitesinde artış olduğu yolundadır; ancak CAT aktivitesinin değişmediğini bildiren çalışmalar olduğu kadar arttığını ileri süren görüşler de vardır (45,64,113). Ancak egzersizden bir süre sonra toparlanma dönemi (recovery periyod) bittiğinde artan enzim aktiviteleri tekrar normal düzeylerine dönmektedir (112).

Enzim aktivitesindeki artışın mekanizmaları tam bilinmemekle birlikte posttranslasyonel modifikasyon olasılığından söz edilmektedir. Buna göre, ortamda fazla substrat bulunduğunda, enzimle allosterik ve kovalent modülasyonla etkileşerek enzimin katalitik aktivitesinde artışa neden olmaktadır (112).

## 2) Vitaminler

Genel olarak araştırmalar, akut egzersiz sonrası vitamin E ve C'nin kullanılmaya bağlı olarak tükendiği ve bu nedenle de kas, serum ve kalpteki konsantrasyonlarının azaldığı yönünde sonuçlar vermektedir (114).

## II) KRONİK EGZERSİZİN ETKİSİ

Gerek sağlıklı yaşam gerekse spor karşılaşmalarına katılmak için olsun düzenli fiziksel egzersiz yapan bireylerin organizmalarında çeşitli adaptasyonlar görülür ve kişi antrene hale gelir. Böylece bu kişilerin egzersize



verdikleri yanıtın farklı olmasının yanında istirahat koşullarında da fizyolojik fonksiyonları farklılık gösterebilir.

## **A) KRONİK EGZERSİZ VE OKSİDAN STRES**

Bu adaptasyonlardan biri de oksidan-antioksidan sistemde görülenlerdir. İstirahatte sedanter ile antrene birey arasında ölçülen lipid peroksidasyon düzeyleri açısından fikir birliği yokken, egzersizden hemen sonra antrene grupta TBARS düzeylerinde daha düşük bir artış saptanmıştır. Yapılan çalışmaların sonuçlarına göre, sporcularda hafif egzersizde MDA düzeyi azalırken orta şiddetli egzersizde düzeyi değişmemekte, ağır egzersizde ise artış göstermektedir (45,46,64,115)

Sporcularda oksidan stresin daha az oluşmasını açıklamaya yönelik nedenler olarak, kapiller dansitesinde, mitokondri sayısında ve içeriğindeki artış ileri sürülmektedir. Bu, elektron transport zincirindeki enzimlerin de artışıyla, sistemin etkinliği ve güvenilirliğinin artıp oluşan süperoksit anyonu miktarının azalmasıyla açıklanır (46).

## **B) KRONİK EGZERSİZ VE ANTIOKSİDAN SİSTEM**

### **1) Enzimler**

Araştırmaların sonuçlarına göre egzersize bağlı olarak özellikle tip I kas liflerinde (kırmızı lifler) Mn SOD ve GPx aktivitesi artmaktadır. Bu artış egzersizin şiddetinden çok süresi ile ilişkilidir ve istirahat dönemlerinde de sürmektedir. Kronik egzersizde CAT düzeylerinde değişiklik olmadığı veya arttığını ileri süren görüşler vardır (45,64,112,113).

## 2) Vitaminler

Bu konudaki görüşlerden biri, antrenman sırasında kullanılmaya bağı olarak vitamin E ve C düzeyinin azalmasına yöneliktir. Ancak tam tersine artış gösterdiğini ve bu artışın da antrenmanlar ile artan kalori alımına bağı olduğunu vurgulayanlar da vardır (45,114).

## 3) Glutasyon

Antrenman sonrasında karaciğer, akciğer ve kasta GSH artışı iyi bilinen bir durumdur. Bunun nedeni olarak hem hücresel üretimindeki artış, hem de hücreye girişindeki artış gösterilmektedir. Ayrıca GSSG'yi GSH'a dönüştüren glutasyon redüktazın aktivitesinin de antrenman ile arttığı bilinmektedir (46,110,112).

## GEREÇ VE YÖNTEM

### 1) GRUPLANDIRMA, EGZERSİZ VE ANTIOKSİDAN TEDAVİ

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları, Merkez Biyokimya Laboratuvarları ve Deney Hayvanları Ünitesinde gerçekleştirilen bu çalışmada 52 adet genç erişkin erkek Wistar sıçan kullanıldı. Çalışma boyunca, sıçanların bulunduğu ortam ısı  $23\pm 2^{\circ}$  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.

#### A) GRUPLANDIRMA

Sıçanlar çalışmanın başında rasgele, sedanter ve antrene olarak iki ana gruba ayrıldılar. Daha sonra yine rasgele olmak üzere her bir grup kendi içinde yeniden, aşağıda gösterildiği şekilde alt gruplara ayrıldı:

##### 1-Sedanter Grup

- a) Sedanter Kontrol Grubu (S-K, n=11)
- b) Sedanter Tükenme Grubu (S-Tk, n=10)
- c) Sedanter Tedavi Tükenme Grubu (S-TdTk, n=9)

## 2-Antrene Grup

- a) Antrene Kontrol Grubu (A-K, n=7)
- c) Antrene Tükenme Grubu (A-Tk, n=7)
- d) Antrene Tedavi Tükenme Grubu (A-TdTk, n=8)

## B) EGZERSİZ PROTOKOLÜ

Egzersiz işlemi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda, Deneysel Egzersiz Fizyolojisi 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, sıçanların daha aktif oldukları karanlık periyodu içerisinde ve bir haftalık alete alışma periyodunun ardından uygulandı.

### 1-)Antrenman Egzersizi

Antrene gruptaki sıçanların bir ay süresince, haftada 5 gün, günde 1 saat olmak üzere, sıçan koşu bandında %5 eğimde ve 20 m/dk hızda koşmaları sağlandı. Belirtilen bu hız ve süreye 1 hafta içerisinde kademeli olarak ulaşıldı.

### 2) Tüketici Egzersiz

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

### **C) ANTIOKSIDAN TEDAVİ**

Egzersiz nedeniyle oluşabilecek oksidan hasarı engelleyebilmek amacıyla S-TdTk ve A-TdTk gruplarına antioksidan tedavi uygulandı. Bu amaçla E vitamini ( $\alpha$ -tocopherol, Sigma, T-3001) ve C vitamini (L-Ascorbic Acid, Sigma, A-7506) kullanıldı. Alfa-tokoferol zeytinyağı, askorbik asit ise distile su içerisinde çözülerek, sırasıyla 20 mg/kg/gün ve 50 mg/kg/gün dozunda olmak üzere gastrik gavaj yoluyla sıçanlara verildi.

Antioksidan tedavi, S-TdTk grubundaki sıçanlara tükenme egzersizinden önceki 1 ay boyunca haftada 5 gün uygulanırken, A-TdTk grubundaki sıçanlara antrenman egzersizi ile birlikte başlamak üzere yine 1 ay süresince ve haftada 5 gün uygulandı.

## **II- DENEYSEL İŞLEMLER**

### **A) İDRARLARIN TOPLANMASI**

İdrar protein ve kreatinin düzeylerinin değerlendirilebilmesi amacıyla tüm sıçanlar metabolik kafeslere yerleştirilerek 24 saatlik idrarları elde edildi. S-Tk, S-TdTk, A-Tk ve A-TdTk grubundaki sıçanlar tükenme egzersizlerinin hemen ardından metabolik kafeslere alınırken, A-K grubundaki sıçanlar, egzersizin oluşabilecek akut etkilerinden kaçınabilmek amacıyla son antrenman koşularından en az 24 saat sonra metabolik kafeslere alındılar. 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 protein ve kreatinin tayini için kullanılırken, bir kısmı da, daha sonra yapılacak olan gel protein elektroforezi için derin dondurucuda  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı

## **B) DENEYİN SONLANDIRILMASI**

Metabolik kafeslerde 24 saatlik idrar toplama döneminin ardından eter anestezisi ile uyutulan sıçanların abdomenleri açıldı. Abdominal aortadan kanları heparinize (15 IU/ml) bir şekilde alındıktan sonra böbrek, m. soleus ve m. gastroknemius'ları çıkarıldı. Doku örnekleri alındıktan hemen sonra kara gömülerek kısa sürede soğumaları sağlandı. Hayvanlardan çıkarılan m. soleus Tip I kas liflerinin, m. gastraknemius ise Tip II kas liflerinin yoğunlukta olduğu kas gruplarını temsil ediyordu. Alınan kanlar hematokrit, serum kreatinin, eritrosit TBARS düzeyi, SOD aktivitesi, CAT aktivitesi ve GSH miktarının tayini için taze olarak kullanılırken, böbrek ve kaslar daha sonra yapılacak olan doku TBARS ve antioksidan enzim düzeyleri ile GSH ölçümü için  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de derin dondurucuda saklandı.

## **III) İDRAR PARAMETRELERİ**

### **A) İDRARDA PROTEİN TAYİNİ**

İdrar protein içeriği Lowry metoduna göre tayin edilmiştir.

**Prensip:** Alkali ortamda proteinlerin  $Cu^{+2}$  ile reaksiyona girerek oluşturdıkları bakır-peptid komplekslerinin, folin reaktifi varlığında tirozin ve triptofan kalıntıları ile birleşerek renkli bileşikler oluşturmaları ve bunların spektrofotometrik olarak saptanmasına dayanır (116).

**Reaktifler:**

- 1) Standart solüsyon: Bovin serum albümin (Albumin Bovine, Sigma, A-8022), 1 mg/ml'lik çözeltisi.
- 2) NaOH (Natriumhydroxide Platzchen, Merck, 6462) 1N.
- 3) D reaktifi:  $Na_2CO_3$  anhidr (Natrium carbonat Wasserfrei reinst, Merck, 6398) %2, 10ml;  $CuSO_4$  (Kupper (II)-sulfat-Pentahydrat, Merck, 2787) %1'lik, 0.1 ml; Natrium tartarat (di-Natrium tartrat, Merck, 6662) %2'lik, 0.1 ml.
- 4) Folin reaktifi (Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent, Sigma, F-9252).

**İşlemler:** 0.1 ml numune veya standart üzerine 0.1 ml NaOH ve 1 ml 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 absorbanları 500 nm dalga boyunda köre karşı okunarak değerlendirildi (Schimadzu UV 1600).

## B) İDRAR VE SERUM KREATİNİN ÖLÇÜMÜ

Jaffe metodu esas alınarak spektrofotometrik ölçümle değerlendirildi.

**Prensip:** Kreatinin alkali ortamda pikrik asitle birleşerek renk değişimine neden olur. Oluşan renk değişimi 500 nm dalga boyunda verdiği absorban değerlendirilir (117).

### **Reaktifler:**

- 1) Pikrik Asit (Picrinsaure, Merck, 623) 0.036 mol/lit.
- 2) NaOH (Natriumhydroxide Platzchen, Merck, 6462) 1.4 mol/lit.
- 3) Na-Wolframat (Natriumwolframat, Merck, 6672) %10'luk.
- 4) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Sulphuric acid 95-98%, Merck, 713) 2/3 N.
- 5) Kreatinin standart solüsyonu: 100 ml 0.1 mol/L HCl içinde 100 mg kreatinin (Creatinine, Merck, 5206) hazırlandı ve bundan 1/100 oranında dilüsyon ile elde edildi.

**İşlemler:** Kör, standart ve numune tüplerine 3.5 ml distile su, 0.5 ml 2/3 N HCl ve 0.5 ml Na-Wolframat beraberce konduktan sonra kör tübüne 0.5 ml distile su, standart tübüne 0.5 ml standart ve numune tübüne de 0.5 ml serum veya idrar örneği eklendi. Kullanılan serum örnekleri dilüe edilmezken idrar örnekleri kullanılmadan önce, distile su ile 1/50 oranında dilüe edilerek kullanıldı. Tüm tüpler 1500 g'de 10 dk santrifüje edildikten sonra süpernatantlarından 3 ml alınarak üzerlerine 1 ml pikrik asit ilave edildi ve 30 saniyelik bir bekleme periyodunun ardından 0.5 ml NaOH ilave edilerek oda ısısında 15 dk süreyle beklemeye bırakıldı. Bu sürenin sonunda tüm tüplerin absorbansı 500 nm dalga boyunda kör tübüne karşı okunarak değerlendirildi (Schimadzu UV 1600).

### **C) İDRAR PROTEİN ELEKTROFOREZİ**

İdrar protein elektroforezi Sebia Hydragel Proteinurie kiti ile yapılmıştır.

**Prensip:** Proteinler anyonik bir deterjan olan SDS buffer içerisinde SDS-protein kompleksleri oluştururlar. Bu kompleksler yüksek agaroz konsantrasyonuna sahip bir gel ortamında elektroforez yapıldığında, moleküler ağırlıklarına göre



ayrılırlar. Böylece mevcut olan proteinüri tipi (glomerüler, tübüler veya mixt) belirlenmiş olur.

#### **Hazır reaktifler:**

- 1) Agoros gel: Her biri 5 g/dL agoros, pH 7 nötral buffer, sodyum dodecyl sülfate (SDS) içeren kullanıma hazır gel.
- 2) SDS Buffer (Stok solüsyon – 100 ml): Her 100 ml'lik stok solüsyon distile su ile 1 L'ye tamamlanır.
- 3) Acid Violet: Gelleri boyamak için kullanılır. 75 ml'lik acid violet, 30 ml asetik asit ve 195 ml distile su ile 300 ml'ye tamamlanır.
- 4) Destaining Solüsyon: Stok solüsyonun 1/1000 oranında dilüe edilerek kullanılır.
- 5) Diluent: Kullanıma hazır olup PH 7 nötral buffer, SDS, bromofenol mavisi içerir. Optimum performans için kullanılır.
- 6) Filtre Kağıdı: Gel plakları üzerindeki fazla nemi almak için kullanılır.

#### **Hazırlanması gereken reaktifler:**

- 1) Storage solüsyon: %15'lik gliserin solüsyonu hazırlanır (Glycerol anhydrous extra pure, Merck, 4093). Gellerin kuruma basamağında yırtılmasını önlemek için kullanılır.
- 2) Salin Solüsyonu: 0.15 M NaCl (Natriumchlorid, Merck, 6400) solüsyonu hazırlanır. 0.2 g/dL'nin üzerinde protein içeren idrar örneklerinin dilüsyonu için kullanılır.

**İşlemler:** 80 µL idrar örneği 20 µL dilüent ile karıştırılarak 5 saniye vortekslendikten sonra, 0.2 g/dL protein içerecek şekilde serum fizyolojik ile

dilüe edildi. Gel plaklar üzerindeki fazla nem filtre kağıdı ile alınıp 5 µL idrar örneği her bir kuyucuğa uygulandı. İdrar örneklerinin gellerin içine diffüze olması için 10 dk'lık bir bekleme süresinin ardından gel plaklar SDS buffer ile doldurulan tank içerisine yüzüstü yerleştirildi. Geller, yürütücüde (Sebia K 20 chamber)  $10 \pm 2$ mA ve 60 volta, 60 dk bekletildikten sonra 80 dereceye kadar ısıtılmış olan kurutucu (Beckman Dryer) içerisinde 20 dk kurumaya bırakıldı. Kurumuş-soğumuş gellerin acid violet içerisinde 30 dk tutularak boyanması sağlandı. Daha sonra destaining solüsyon içerisine yerleştirilerek 45 dk bekletildi. Geller 15 dk da storage solüsyonda bekletildikten sonra 80 derecede tekrar kurutuldular.

Deney hayvanlarının idrarları elektroforez edilirken bazı kuyucuklara molekül ağırlığı belli olan standartlar (Sigma MW-SDS-280; 16 kDa, 32 kDa, 48 kDa, 64 kDa) uygulandı. Bu ağırlıklardan 64 kDa'luklar, idrarda çıkabilecek olan albümine, 16 kDa'luklar ise tübüler orijinli düşük molekül ağırlıklı proteinlere karşılık geliyordu.

#### IV) OKSİDAN STRES PARAMETRELERİ

##### A) TİYOBARBITÜRİK ASİT REAKTİF ÜRÜNLERİNİN (TBARS) TAYİNİ

**Prensip:** Lipid peroksidasyon ürünlerinin tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girerek oluşturduğu kompleksin 532 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermesi ve bu absorbansın ölçülmesi esasına dayanır (118,119,120).

## 1) Eritrosit TBARS Tayini

### Reaktifler:

- 1) Fosfat NaCl tamponu (pH 7.4): 0.5 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Potassium Phosphate monobasic anhydrous, Sigma, P-5379); 0.5 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Potassium Phosphate, Sigma, P-8281); 0.15 M NaCl (Natriumchlorid, Merck, 6400).
- 2) Triklorasetik asit (Trichloroacetic acid, Merck, 1.00810), %200'lük stok solüsyondan %30'lük olarak hazırlanır.
- 3) Tiyobarbiturik asit (2-Thiobarbituric Acid, Sigma, T-5500), 5 g TBA ve 25 ml 1N NaOH (Natriumhydroxide Platzchen, Merck, 6462), distile su ile 500 ml'e tamamlanır.
- 4) Standart solüsyonu: Tetraetoksipropan (1, 1, 3, 3-Tetraethoxy-propane, Sigma, T-9889) stok solüsyonundan distile su ile sulandırılarak hazırlanır.

**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 dk sentrifüje edildikten sonra oluşan süpernatanttan ayrı bir tübe 3 ml alınarak üzerine 1 ml TBA solüsyonu eklendi ve zaman kaybetmeden 15 dk kaynatıldı. Kaynama işleminin ardından tüpler musluk suyu altında soğutulularak 532 nm dalga boyunda köre karşı okundular (Schimadzu UV 1600) 10 kez sulandırılmış olan paket eritrositlerden Drabkin yöntemine (172) göre Hb tayini yapılarak TBARS düzeyleri nmol/g Hb olarak ifade edildi.

### Hemoglobin ölçümü

**Prensip:** Alkali pH'da ve potasyum ferrosiyaniür varlığında hemoglobin ve sulfhemoglobin dışındaki hemoglobin deriveleri methemoglobine oksitlenir.

Methemoglobin ise potasyum siyanür ile birlikte siyanomethemoglobin bileşimini oluşturur. Bu son bileşimin maksimum absorbanans verdiği 546 nm dalga boyundaki renk şiddeti hemoglobin konsantrasyonu ile orantılıdır (121).

**Reaktifler:**

- 1) Drabkin ayıracı: 140 mg  $\text{KH}_2\text{HPO}_4$  (Potassium Phosphate monobasic anhydrous, Sigma, P-5379), 200 mg potasyum fericyanide (Potassium Ferricyanide, Sigma, P-8131), 50 mg potasyum cyanide (Kaliumcyanid 96-98%, Merck, 4965) ve %30'luk 2 ml triton X (Triton X-100, Sigma, Lot 31H0585) karışımı üzerine 1100 ml distile su eklenerek elde edildi.
- 2) Standart solüsyon: Hemoglobin standart solüsyonu hazırlandı (Hemoglobin, Sigma, H-7379).

**İşlemler:** 2.5 ml Drabkin ayıracı 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 absorbanansları 546 nm'de köre karşı okundu (Schimadzu UV 1600).

**2) Doku TBARS Tayini (118,119,120)**

**Reaktifler:**

- 1) Homojenizasyon sıvısı (pH 7.4):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Potassium Phosphate, Sigma, P-8281) 0.05 mol/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Potassium Phosphate monobasic anhydrous, Sigma, P-5379) 0.05 mol/L; KCl (Kalium chlorid, Merck, 4935) 150 mmol/L; EDTA (Ethylenediamine-Tetraacetic Acid, Tetrasodium salt, Sigma, ED4SS), 5 mmol/L; Triton X (Triton X-100, Sigma, Lot 31H0585) %0.8
- 2) Triklorasetik asit (Trichloroacetic acid, Merck, 1.00810), %200'lük stok solüsyondan % 30'lük solüsyon hazırlanır

3) Tiyobarbitürük asit (2-Thiobarbituric Acid, Sigma, T-5500), 5 g TBA ve 25 ml 1N NaOH (Natriumhydroxide Platzchen, Merck, 6462), distile su ile 500 ml'e tamamlanır.

4) Standart solüsyonu: Tetraetoksiopropan (1, 1, 3, 3-Tetraethoxy-propane, Sigma, T-9889) stok solüsyonundan distile su ile sulandırılarak hazırlanır.

**İşlemler:** Alınan böbrek, kırmızı ve beyaz kas dokuları 2 ml homojenizasyon sıvısı içerisinde, Tri-R Stir-R marka K43 model homojenizatörde 9500 rpm'de, böbrek dokusu 20 sn kas dokuları 30 sn olmak üzere homojenize edildiler. Homojenizasyon işlemi sırasında aşırı ısı artışını önlemek için kar kullanıldı. Homojenize edilen dokuların üzerine 6 ml daha homojenizasyon sıvısı eklendi. Oluşan 8 ml'lik çözeltilerden 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 soğutulularak absorbansları 532 nm'de köre karşı okundu (Schimadzu UV 1600). Dokular homojenize edildikten sonra elde edilen 8 ml'lik çözeltilerden Lowry (120) yöntemine göre protein düzeyleri ölçülerek doku TBARS düzeyleri nmol/g protein olarak ifade edildi.

### C) DOKU KONJUGE DİEN (KD)TAYİNİ

**Prensip:** Lipid peroksidasyonunun oldukça erken ürünlerinden olan konjuge dien'ler 215-250 nm arasındaki dalga boylarında yoğun absorbans göstermekle birlikte en yoğun absorbans pikini 233-234 nm'de vermektedirler (122).

### Reaktifler:

- 1) Kloroform (Chloroform extra pure, Merck, 2431)
- 2) Metanol (Methanol, Merck, 6008)
- 3) Nitrojen gazı (HABAŞ)
- 4) Sikloheksan (Cyclohexane, Fluka, 28)
- 5) Homojenizasyon sıvısı (pH 7.4):  $K_2HPO_4$  (Potassium Phosphate, Sigma, P-8281) 0.05 mol/L;  $KH_2PO_4$  (Potassium Phosphate monobasic anhydrous, Sigma, P-5379) 0.05 mol/L; KCl (Kalium chlorid, Merck, 4935) 150 mmol/L; EDTA (Ethylenediamine-Tetraacetic Acid, Tetrasodium salt, Sigma, ED4SS) 5 mmol/L; Triton X (Triton X-100, Sigma, Lot 31H0585) %0.8.

**İşlemler:** Böbrek ve kas dokuları aynen TBARS ölçümü sırasında uygulanan homojenizasyon işlemine tabi tutuldular. Elde edilen 8 ml'lik homojenattan alınan 0.5 ml numune üzerine 0.5 ml kloroform/metanol karışımı (2/1, v:v) eklendikten sonra oluşan lipid tabaka ayrı bir tübe alınarak, nitrojen gazı altında kloroform/metanol fazı uçuruldu. Tüpte kalan ekstrakt 2 ml sikloheksan içinde çözülerek absorbanları Shimadzu UV 1600 spektrofotometresinde, 234 nm dalga boyunda, sikloheksan körüne karşı okundu.

Sonuçlar  $\epsilon_{max} = 2.52 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  formülü kullanılarak nmol hidroperoksit/mg protein olarak hesaplandı.

## V) ANTIOKSİDAN SİSTEM PARAMETRELERİ

**A) SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD) TAYİNİ** Prensip: Epinefrinin otooksidasyonu sonucu ortaya çıkan adrenokrom oluşumu SOD ile inhibe

edildiğinden, adrenokromun maksimum absorbands verdiği 480 nm dalga boyundaki absorbands değişikliği SOD inhibisyonu ile ilişkilidir (123)

### 1) Eritrositte Cu/Zn-SOD Tayini

#### Reaktifler:

- 1) Fosfat NaCl tamponu (pH 7.4): 0.5 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , (Potassium Phosphate monobasic anhydrous, Sigma, P-5379); 0.5 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , (Potassium Phosphate, Sigma, P-8281); 0.15 M NaCl (Natriumchlorid, Merck, 6400).
- 2)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Natrium carbonat, Merck, 6398) /  $\text{NaHCO}_3$  (Natriumhydrogencarbonat, Merck, 6323) tamponu (0.3 M, pH 10.2)
- 3) EDTA (Ethylenediamine-Tetraacetic Acid, Tetrasodium salt, Sigma, ED4SS), 0.75 M
- 4) Epinefrin (Epinephrine Hydrochloride, Sigma, E-4642), 3.6 mM, pH 2; taze hazırlanır.

**İşlemler:** Plazması ayrıldıktan ve 3 kez fosfat NaCl tamponuyla yıkandıktan sonra elde edilen eritrosit paketinden distile su ile 1/5 oranında dilüsyon uygulanarak hemolizat hazırlandı. Hazırlanan bu hemolizat, bikarbonat tamponu ile 200 kez dilüe edilerek ölçümde kullanıldı. Kontrol ve numune tüplerine 550  $\mu\text{L}$  bikarbonat tamponu, 400  $\mu\text{L}$  EDTA, 750  $\mu\text{L}$  bikarbonat tamponu (kontrol) veya hemolizat (numune) konuldu.

Tüplere en son adrenalin eklenip karıştırıldıktan sonra 480 nm'de kontrol ve numune tüplerindeki absorbands değişimi 3 dk boyunca izlendi (Schimadzu UV 1600) Ölçüm yapılırken ortam ısı 30°C'ye ayarlandı.

**Aktivitenin hesaplanması:** Kontrol tübünde enzim olmadığından epinefrinin adrenokroma oksitlenmesi inhibe edilemez, yani kontrol tübündeki inhibisyon

yüzdesi sıfırdır. Numune tübündeki inhibisyon yüzdesi ise SOD konsantrasyonu ile orantılıdır. Numunenin % inhibisyon değeri, numuneden hazırlanan ilk hemolizatın gram hemoglobin değerine oranlanarak sonuçlar değerlendirildi.

## 2) Böbrek SOD Tayini (123)

### Reaktifler:

- 1) Fosfat tamponu (pH 7.4); 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Potassium Phosphate monobasic anhydrous, Sigma, P-5379); 50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Potassium Phosphate, Sigma, P-8281)
- 2)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Sodium carbonate anhydrous extra pure, Merck, 6398) /  $\text{NaHCO}_3$  tamponu (Natriumhydrogencarbonat, Merck, 6323), 0.3 M, pH 10.2
- 3) EDTA (Ethylenediamine-Tetraacetic Acid, Tetrasodium salt, Sigma, ED4SS), 0.75M.
- 4) Epinefrin (Epinephrine Hydrochloride, Sigma, E-4642), 3.6 mM, pH 2; taze hazırlanır.

**İşlemler:** Alınan böbrek dokuları 2 ml bifosfat tamponu içerisinde Tri-R Stir-R marka K43 model homojenizatörde 9500 rpm'de, 20 sn homojenize edildiler. Homojenizasyon işlemi sırasında aşırı ısı artışını önlemek için kar kullanıldı. Homojenize edilen dokuların üzerine 2 ml daha tampon eklenerek, 4ml doku homojenatı elde edildi. Bu homojenattan 1.5 ml alınarak 14.000 rpm'de, 4°C'de 30 dk santrifüje edildi. Oluşan süpernatanttan bikarbonat tamponu ile 1/150 oranında dilüsyon yapılarak elde edilen homojenat ölçüm için kullanıldı. Kontrol ve numune tüplerine 550 µL bikarbonat tamponu, 400 µL EDTA, 750 µL bikarbonat tamponu (kontrol tübüne) veya homojenat (numune tübüne) konuldu. Tüplere en son adrenalin eklenip karıştırıldıktan sonra 480 nm'de



kontrol ve numune tüplerindeki absorbans değişimi 3 dk boyunca izlendi (Schimadzu UV 1600). Ölçüm yapılırken ortam ısısı 30°C'ye ayarlandı.

İlk homojenattan Lowry yöntemiyle protein ölçümü yapılarak aktivite tayini eritrositteki gibi hesaplandı.

**B) KATALAZ TAYİNİ Prensip:**  $H_2O_2$ , katalazın etkisiyle  $O_2$  ve  $H_2O$ 'ya parçalanırken 240 nm'de, reaksiyon karışımındaki absorbansta azalma ortaya çıkmaktadır (124).

### 1- Eritrositte Katalaz Tayini

#### Reaktifler:

- 1) Fosfat NaCl tamponu (pH 7.4); 0.5 M  $KH_2PO_4$ , (Potassium Phosphate monobasic anhydrous, Sigma, P-5379); 0.5 M  $K_2HPO_4$ , (Potassium Phosphate, Sigma, P-8281); 0.15 M NaCl (Natriumchlorid, Merck, 6400) 0.15 M.
- 2) Fosfat tamponu (50mM/L, pH 7):  $KH_2PO_4$  (Potassium Phosphate monobasic anhydrous, Sigma, P-5379) 50 mM/L;  $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$  (di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, Merck, 6576) 50 mM/L
- 3)  $H_2O_2$  (Hydrogen peroxide solution 35%, Merck, 8600), 30 mM; fosfat tamponu içerisinde ve taze olarak hazırlanır.

**İşlemler:** Plazması ayrıldıktan ve 3 kez fosfat NaCl tamponuyla yıkandıktan sonra elde edilen eritrosit paketinden distile su ile 1/5 oranında dilüsyon uygulanarak hemolizat hazırlandı. Hazırlanan bu hemolizat, fosfat tamponu ile 1/500 oranında dilüe edilerek ölçümde kullanıldı. Bu son hemolizattan 1 ml alınarak üzerine 0.5 ml  $H_2O_2$  eklenir ve 240 nm'deki başlangıç absorbansı ile

15. saniyedeki absorbans değerleri kaydedildi (Schimadzu UV 1600) Ölçüm sırasında ortam ısısı 25°C 'de tutuldu.

**Aktivitenin hesaplanması:** Eritrositte katalaz tayini için birinci derece reaksiyon sabiti (k) kullanıldı.

$k = 2.3/\Delta t \times \log (A_0/A_{15})$  formülü üzerinden, başlangıçta yapılan dilüsyonlar (2500 kez) ve hemoglobin değeri de hesaba katılarak eritrosit katalazının aktivitesi k/g Hb olarak elde edildi.

## 2) Böbrekte Katalaz Tayini (124)

### Reaktifler:

- 1) Fosfat tamponu (pH 7.4): 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Potassium Phosphate monobasic anhydrous, Sigma, P-5379); 50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Potassium Phosphate, Sigma, P-8281)
- 2) Fosfat tamponu (50mM/L, pH:7);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Potassium Phosphate monobasic anhydrous, Sigma, P-5379) 50 mM/L;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, Merck, 6576) 50 mM/L.
- 3)  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Hydrogen peroxide solution 35%, Merck, 8600), 30mM; fosfat tamponu içerisinde ve taze olarak hazırlanır.

**İşlemler:** Alınan böbrek dokuları, daha önce böbrek SOD tayininde anlatıldığı şekilde homojenize edilerek elde edilen homojenatın 1.5 ml'si, 3000 rpm'de 4°C'de, 15 dakika santrifüje edildi. Oluşan süpernatanttan, fosfat tamponu ile 1/100 oranında dilüsyon yapılarak ölçüm için kullanıldı. Ölçüm şekli yukarıda eritrosit katalazı için anlatıldığı şekilde yapıldı. Böbrek katalaz düzeyi gram doku proteini başına ifade edileceğinden, Lowry metodu ile böbrek protein

düzeyi ölçüldü ve aktivite hesabı yukarıda anlatıldığı şekilde yapılarak sonuçlar k/g doku proteini şeklinde elde edildi.

## **D) REDÜKTE GLUTATYON (GSH) TAYİNİ**

**Prensip:** Bir disülfid kromojen olan 5, 5'-Dithiobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB)'in, redükte glutatyonun yapısında bulunan sülfidril grupları tarafından indirgenmesiyle oluşan koyu sarı renk değişikliğinin 412 nm dalga boyunda verdiği absorbansın ölçümüne dayanır (125).

### **1) Eritrositte GSH Tayini**

#### **Reaktifler:**

- 1) Presipite edici solüsyon: 1.67 g glasiel metafosforik asit (Metaphosphoric Acid, Sigma, M-5043), 0.20 g EDTA (Ethylenediamine-Tetraacetic Acid, Tetrasodium salt, Sigma, ED4SS), 30 g NaCl (Natriumchlorid, Merck, 6400) tartılarak distile su içerisinde çözülür ve volüm 100 ml'ye tamamlanır.
- 2) Fosfat solüsyonu:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Sodium Phosphate anhydrous, Sigma, S-0876), 0.3m/L
- 3) DTNB solüsyonu: 40 mg DTNB (5, 5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoik Acid), Sigma, P-8281) 1g/dL'lik sodyum sitrat (tri-Sodium citrate 5-5'-hydrat extra pure) ile çözülerek volüm 100 ml'ye tamamlanır.
- 4) GSH standardı: 100mg/dL'lik GSH (Glutathione Reduced Form, Sigma, G-4251) stok solüsyonundan hazırlanan dilüsyonlarla standart çalışması yapılır.

**İşlemler:** 200  $\mu\text{L}$  tam kan üzerine 1.8 ml distile su eklenerek oluşturulan hemolizatın üzerine 3 ml presipite edici solüsyon ilave edilerek oda ısısında 5

4 dk bekletildi ve filtre kağıdından süzüldü. Elde edilen filtrat ölçüm için kullanıldı. Numune tübüne 500 µL filtrat, kör tübüne 300 µL presipite edici solüsyon ve 200 µL distile su konulduktan sonra her iki tübe 2 ml fosfat solüsyonu eklendi. Tüplere en son DTNB eklenip karıştırılarak 4 dk içerisinde, 412 nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü (Schimadzu UV 1600).

**Hesaplama:** Daha önceden hazırlanmış olan 100 mg/dL'lik stok standart solüsyonundan 10, 20, 30, 40 ve 50 mg/dL'lik dilüsyonlar hazırlandı ve standart çalışması yapıldı. Elde edilen absorbans değerleri ile konsantrasyon değerleri arasında yapılan regresyon analizi sonucunda;

Konsantrasyon =  $(OD-0.0216)/0.000312$  şeklinde bir ilişki saptandı (korelasyon  $r=0.980$ ) ve buradan elde edilen sonuçlar gram Hb üzerinden, mg/g hb şeklinde ifade edildi.

## 2) Böbrek GSH Tayini (125)

Böbrek dokuları daha önce SOD ve CAT tayininde anlatıldığı şekilde homojenize edilerek elde edilen homojenat tam kan yerine kullanıldı ve eritrosit GSH tayinindeki işlemler aynen uygulandı.

**Hesaplama:** Böbrek dokusunda yapılan çalışma sonucunda elde edilen optik dansite değerleri daha düşük olduğundan, daha düşük konsantrasyondaki dilüsyonlarla yeniden bir standart çalışma yapıldı ve elde edilen absorbans değerleri ile konsantrasyon değerleri arasında yapılan regresyon analizi sonucunda;

Konsantrasyon =  $(OD+0.0048) / 0.0316$  şeklinde bir ilişki saptandı (korelasyon  $r=0.962$ ) Lowry yöntemine göre değerlendirilen doku protein

düzeyleri de hesaplanarak böbrek GSH konsantrasyonu, mg/g doku proteini olarak ifade edildi.

## VI) İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata olarak verildi. Sonuçların değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi kullanıldı ve gruplar arası değerlendirme Newman-Keuls testi ile yapıldı.  $p < 0.05$  üzeri değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

Deneyin başında ve sonunda sedanter ve antrene grupların vücut ağırlıkları ölçülerek aralarında fark olup olmadığı incelendi. Sedanter grupta deneyin başlangıcında (ilk) ve deneyin sonlandırılmasından hemen önce (son) ölçülen ortalama vücut ağırlıkları, gruplar arasında herhangi bir fark saptanmadı (Tablo-3).

Antrene grupta da yine sıçanların ortalama ilk ve son vücut ağırlıkları ölçülerek karşılaştırıldı. Vücut ağırlıkları açısından antrene gruplar arasında da fark olmadığı gösterildi. Ayrıca S-K grubu ile A-K grubu arasında da ortalama vücut ağırlıkları yönünden fark yoktu.

Tükenme egzersizi uygulanan grupların ortalama tükenme süreleri S-Tk grubunda  $44.5 \pm 5.0$  dk S-TdTk grubunda  $38.3 \pm 3.5$  dk A-Tk grubunda  $110.7 \pm 6.6$  dk ve A-TdTk grubunda  $88.6 \pm 10.7$  dk olarak belirlendi. Gruplar kendi içlerinde tükenme süreleri açısından fark göstermezken, antrene grupların tükenme sürelerinin sedanter gruplara kıyasla önemli olarak daha uzun olduğu gözlemlendi ( $p < 0.001$ ) (Tablo-3).

Sıçanlardan elde edilen kanlardan ölçülen hematokrit değerleri S-K grubunda  $40.2 \pm 0.5$ , S-Tk grubunda  $41.2 \pm 0.9$  ve S-TdTk grubunda  $42.7 \pm 1.4$  iken; A-K grubunda  $39.3 \pm 0.7$ , A-Tk grubunda  $40.0 \pm 0.2$  ve A-TdTk grubunda  $41.0 \pm 0.5$  olarak bulundu. Sedanter ve antrene gruplar kendi içlerinde karşılaştırıldıklarında

% htc değerleri açısından hiçbir grubun diğerinden farklı olmadığı saptandı. Ayrıca S-K grubu ile A-K grubu arasında da % htc değerleri açısından önemli fark yoktu (Tablo-3).

Deneyin sonlandırılmasının ardından tüm gruplarda ölçülen serum kreatinin düzeyleri S-K grubunda  $0.65 \pm 0.04$  mg/dL, S-Tk grubunda  $0.75 \pm 0.05$  mg/dL ve S-TdTk grubunda  $0.72 \pm 0.05$  mg/dL iken A-K grubunda  $0.85 \pm 0.06$  mg/dL, A-Tk grubunda  $0.78 \pm 0.06$  mg/dL ve A-TdTk grubunda  $0.76 \pm 0.04$  mg/dL olarak ölçüldü. Sedanter ve antrene grupların kendi içlerinde yapılan kıyaslamada istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunamadı. Yine S-K grubu ile A-K grubu arasında da fark gösterilemedi (Tablo-3).

**Tablo-3:** Sedanter ve antrene grupların ilk ve son ağırlık, tükenme süresi, hematokrit ve serum kreatinin değerleri (Ort±SH)

	SEDANTER		ANTRENE		
	Kontrol	Tükenme	Tedavi Tükenme	Kontrol Tükenme	Tedavi Tükenme
<b>İlk ağırlık</b> (gram)	247.8±9.9	236.0±16.9	238.6±9.5	241.4±5.1	210.8±2.3
<b>Son Ağırlık</b> (gram)	253.5±8.2	245.0±15.9	245.0±14.0	274.2±8.1	240.6±8
<b>Tükenme süresi</b> (dakika)	-	44.5±5.0	38.3±3.5	-	110.7±6.6*
<b>Hematokrit</b> (%)	40.2±0.5	41.2±0.9	42.7±1.4	39.3±0.7	40.0±0.2
<b>Serum kreatinin</b> (g/dL)	0.65±0.04	0.75±0.05	0.72±0.05	0.85±0.06	0.784±0.06
					0.76±0.04

\* p<0.001; Sedanter tükenme (S-Tk) ve Sedanter tedavi tükenme (S-TdTk) gruplarından Antrene tükenme (A-Tk) ve Antrene tedavi tükenme (A-TdTk) gruplarının farkı.



## 1) İDRAR PARAMETRELERİ

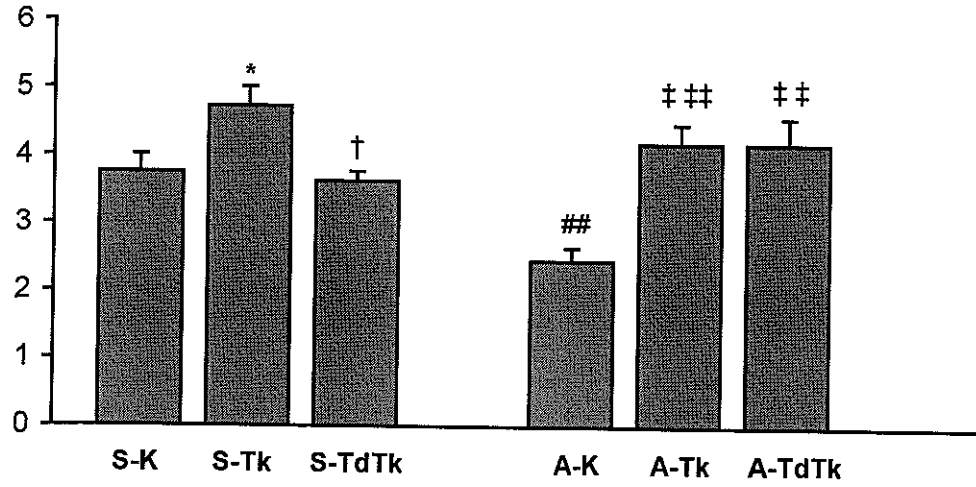
### 1) İdrar Protein Miktarı

İdrar proteini metabolik kafesler aracılığı ile toplanan idrarlarda değerlendirildi ve yine aynı idrarlardan ölçülen kreatinin değeri üzerinden, mg/mg kreatinin olarak ifade edildi (Şekil-2).

Sedanter grup incelendiğinde, idrar protein düzeyinin tüketici egzersiz sonucu S-Tk grubunda ( $4.70 \pm 0.32$  mg/mg kreatinin) S-K grubuna ( $3.73 \pm 0.30$  mg/mg kreatinin) kıyasla artış gösterdiği ve bu artışın istatistiksel açıdan önemli olduğu görüldü ( $p < 0.05$ ). Tükenme egzersizi ile artış gösteren idrar protein düzeyinin, antioksidan tedavi sonucu S-TdTk grubunda düşüş gösterdiği ( $3.60 \pm 0.14$  mg/mg kreatinin) ve bu düşüşün S-Tk grubuna kıyasla istatistiksel açıdan önemli olduğu saptandı ( $p < 0.05$ ). S-K grubu ile S-TdTk grubu arasında ise idrar protein düzeyi açısından fark bulunamadı.

A-K grubu ile S-K grubunun idrar protein düzeyleri karşılaştırıldığında, A-K grubunun idrar protein düzeyleri ( $2.40 \pm 0.20$  mg/mg kreatinin), S-K grubuna göre önemli derecede düşüktü ( $p < 0.01$ ). A-Tk grubunda tükenme egzersizi sonucu idrar protein düzeyinde ( $4.16 \pm 0.30$  mg/mg kreatinin) A-K grubuna kıyasla önemli bir artış olduğu ( $p < 0.001$ ) görüldü ve benzer şekilde önemli artış, A-TdTk grubunda da ( $4.10 \pm 0.20$  mg/mg kreatinin) saptandı ( $p < 0.01$ ).

**İdrar Protein Miktarı**  
(mg/mg kreatinin)



**Şekil-2:** Sedanter ve antrene grupların idrar protein değerlerinin karşılaştırılması.

\*  $p < 0.05$ ; Sedanter kontrol (S-K) grubundan sedanter tükenme (S-Tk) grubunun farkı.

†  $p < 0.05$ ; Sedanter tükenme (S-Tk) grubundan sedanter tedavi tükenme (S-TdTk) grubunun farkı.

##  $p < 0.01$ ; Sedanter kontrol (S-K) grubundan antrene kontrol (A-K) grubunun farkı.

‡‡  $p < 0.01$ , ‡‡‡  $p < 0.001$ ; Antrene kontrol (A-K) grubundan antrene tükenme (A-Tk) ve antrene tedavi tükenme (A-TdTk) gruplarının farkı.

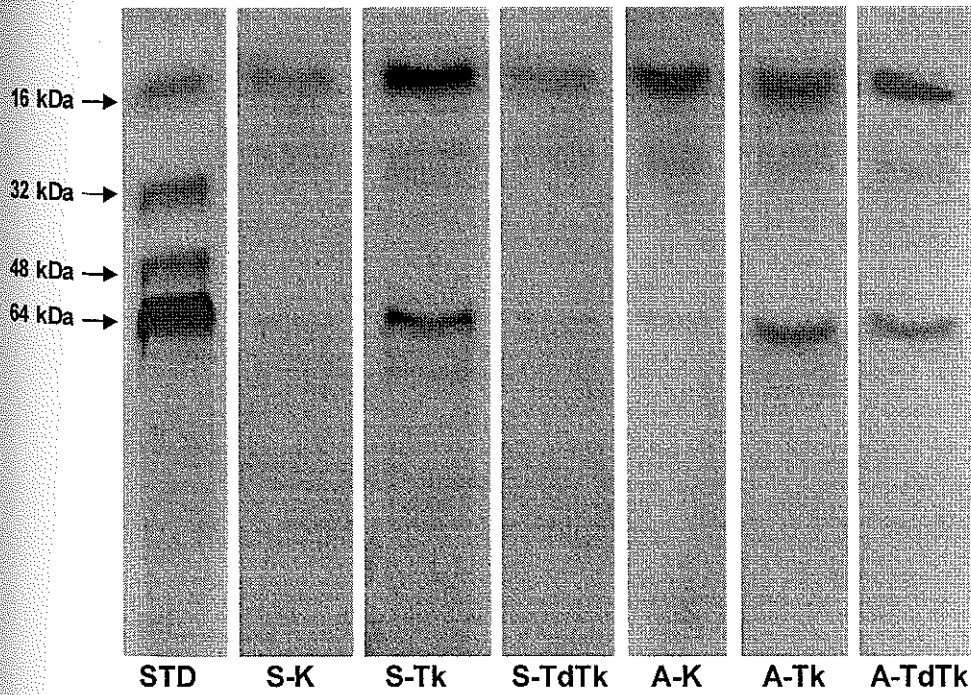
## 2) İdrar Protein Elektroforez Sonuçları

24 saat süresince kar altında toplanan idrarların protein elektroforezi ve molekül ağırlık standardının elektroforez sonuçları Şekil-3'te gösterildi.

S-K grubuna ait band incelendiğinde, albümin bandına uyan düzeyde (M.A: 64 kDa) çok silik bir birikim ve daha çok tübüler orijinli olduğu düşünülen düşük molekül ağırlıklı proteinler düzeyinde (M.A < 32 kDa) de yine silik bir birikim izlenmektedir. Tüketici egzersiz sonrası hemen metabolik kafeslere konup idrarları toplanan S-Tk grubunda ise her iki bantta belirgin derecede koyulaşma göze çarpmaktadır. Bunun yanı sıra S-Tk grubunda, molekül ağırlığı 64 kDa'dan yüksek olan ve yerleşim yeri olarak transferrin ile uyumlu görünen, ayrıca S-K grubunda bulunmayan silik bir band daha izlenmektedir. Bu görünümünden dolayı S-Tk grubunda görülen proteinüri miks tip proteinüri olarak

değerlendirildi. Tüketici egzersiz öncesi bir ay boyunca antioksidan vitamin tedavisi alan S-TdTk grubu, görünüm olarak S-K grubuna oldukça benzemektedir. Burada da yalnızca albümin (M A: 64 kDa) ve düşük molekül ağırlıklı protein (M.A<32 kDa) düzeyinde silik bantlar izlenmektedir.

Antrene kontrol (A-K) grubunun protein elektroforez sonuçları S-K grubuna oldukça benzemektedir. Fakat bu gruptaki hayvanların elektroforezlerinde en düşük molekül ağırlıklı proteinlerin (M A<32 kDa) bandında S-K grubuna göre bir miktar yoğunlaşma göze çarpmaktadır. A-Tk grubunda ise elektroforez görüntüsü S-Tk grubuna oldukça benzerdi. Albümin (M.A: 64 kDa) ve düşük molekül ağırlıklı protein (M.A<32 kDa) bandlarının birlikte yoğunlaşmasından dolayı bu grup da miks proteinüri olarak değerlendirildi. A-TdTk grubunun elektroforez görünümü de miks proteinüriye uymakla birlikte özellikle A-Tk grubuna göre albümin bandına uyan kısımda bir miktar azalma göze çarptı.



Şekil 3: Sedanter ve Antrene grupların idrar protein elektroforezi

## II) OKSİDAN STRES PARAMETRELERİ

Sedanter ve antrene grupların eritrosit ve doku TBARS ve konjuge dien değerleri Tablo-4'te gösterilmiştir.

### 1) Eritrosit TBARS Düzeyi

Sedanter grubun eritrosit TBARS düzeyleri incelendiğinde S-Tk grubunda, S-K grubuna kıyasla önemli bir artış olduğu dikkati çekti ( $p < 0.01$ ). Bu artış, S-TdTk grubunda bir miktar kontrol değerlerine geri çekildi ancak, S-K ve S-TdTk grupları arasında istatistiksel önem bulunamadı.

A-K grubu ile S-K grubu eritrosit TBARS düzeyleri açısından karşılaştırıldığında, aralarında önemli bir fark bulunmadığı gözlemlendi. Koşan gruplar incelendiğinde hiçbir antrene grubun, eritrosit TBARS düzeyleri açısından A-K grubundan farklı olmadığı görüldü.

### 2) Böbrek TBARS Düzeyi

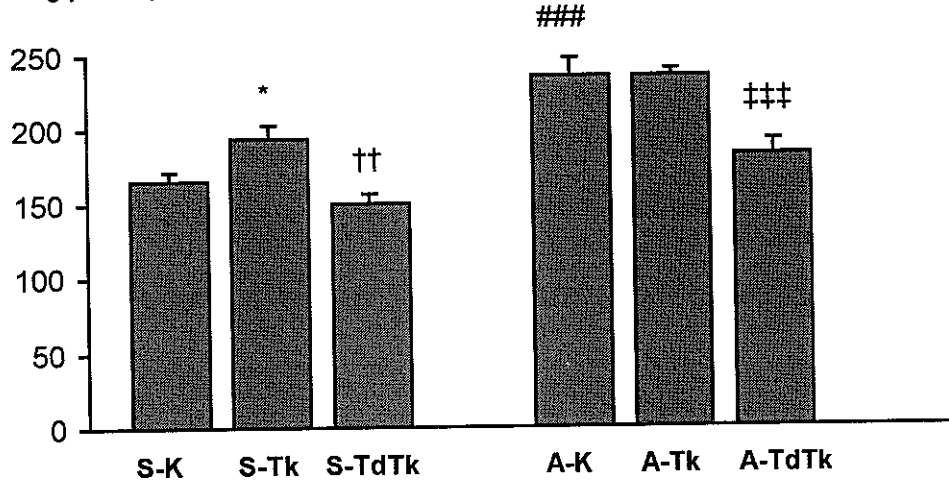
Sedanter ve antrene grupların böbrek TBARS değerleri Şekil-4'te grafik olarak verilmiştir.

S-Tk grubunda böbrek TBARS düzeyinin, S-K grubuna göre istatistiksel olarak önemli şekilde arttığı ( $p < 0.05$ ), S-TdTk grubunda ise bu artışın engellendiği ve bunun yanında S-TdTk ile S-Tk grupları arasındaki farkın anlamlı ( $p < 0.01$ ) olduğu saptandı.

A-K grubunun böbrek TBARS düzeyi S-K grubununkinden önemli olarak yüksek bulundu ( $p < 0.001$ ). Antrene grupta tüketici egzersiz uygulamanın (A-Tk grubu), böbrek TBARS düzeylerinde, A-K grubuna göre önemli bir değişiklik yapmadığı gözlemlendi. Fakat hem tüketici egzersiz uygulanan hem de antioksidan

tedavi alan A-TdTk grubundaki sıçanların böbrek TBARS değerleri A-K grubundakilere göre önemli düzeyde düşüş gösterdi ( $p < 0.001$ ).

**Böbrek TBARS**  
(nmol/g protein)



**Şekil 4:** Sedanter ve antrene grupların böbrek TBARS değerlerinin karşılaştırılması

\*  $p < 0.05$ ; Sedanter kontrol grubundan sedanter tükenme (S-Tk) grubunun farkı.  
††  $p < 0.01$ ; Sedanter tükenme (S-Tk) grubundan sedanter tedavi tükenme (S-TdTk) grubunun farkı.  
###  $p < 0.001$ ; Sedanter kontrol (S-K) grubundan antrene kontrol (A-K) grubunun farkı.  
†††  $p < 0.001$ ; Antrene kontrol (A-K) grubundan antrene tükenme (A-Tk) ve antrene tedavi tükenme (A-TdTk) gruplarının farkı

### 3) m. gastroknemius TBARS Düzeyi

m. gastroknemius TBARS düzeyinin S-Tk grubunda S-K grubuna kıyasla bir miktar yükseldiği ancak bunun anlamlı olmadığı, buna karşın antioksidan tedavi sonucu S-TdTk grubunda S-Tk grubuna göre anlamlı bir düşüş olduğu ( $p < 0.05$ ) gözlemlendi. S-TdTk grubunda m. gastroknemius TBARS düzeyinde saptanan bu azalış S-K grubuna kıyasla önemli değildi.

A-K grubu ile S-K grubu karşılaştırıldığında, A-K grubunun m. gastroknemius TBARS düzeyinin S-K grubuna göre belirgin olarak yüksek olduğu görüldü

( $p < 0.01$ ). A-Tk grubunda m. gastrocnemius TBARS düzeyinin A-K grubuna göre belirgin ölçüde artmış olduğu belirlendi ( $p < 0.05$ ). A-TdTk grubunun ise A-K grubundan farkı yoktu.

#### **4) m. soleus TBARS Düzeyi**

S-Tk grubunda S-K grubuna göre anlamlı artış gösteren m. soleus TBARS düzeyi ( $p < 0.01$ ), S-TdTk grubunda ise S-Tk grubuna kıyasla anlamlı düşüş gösterdi ( $p < 0.01$ ). S-TdTk grubundaki bu düşüş, S-K grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı değildi.

A-K grubunun m. soleus TBARS düzeyi S-K grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p < 0.05$ ). A-Tk ve A-TdTk gruplarından hiç birinin m. soleus TBARS düzeyi A-K grubunununkinden istatistiksel olarak farklı bulunmadı.

#### **5) Böbrek Konjuge Dien Düzeyi**

S-Tk grubunda böbrek KD seviyesi S-K grubuna göre artmış olmakla birlikte bu artış anlamlı değildi. S-TdTk grubunda, S-Tk grubuna göre böbrek KD seviyesinde saptanan azalış da benzer şekilde anlamsız bulundu.

A-K grubu ile S-K grubu arasında böbrek KD seviyesi yönünden anlamlı fark gösterilemedi. A-Tk ve A-TdTk gruplarının A-K grubu ile karşılaştırılması sonucunda da önemli bir istatistiksel sonuç elde edilemedi.

#### **6) m. gastrocnemius Konjuge Dien Düzeyi**

Yapılan inceleme sonucunda, S-Tk ve S-TdTk gruplarının m. gastrocnemius KD seviyelerinin S-K grubundan farksız olduğu görüldü. A-K grubu ile S-K grubu arasında da anlamlı bir fark saptanamadı. Benzer şekilde, A-Tk ve A-TdTk gruplarının m. gastrocnemius KD düzeylerinin A-K grubundan farklı olmadığı izlendi.

### 7) m. soleus Konjuge Dien Düzeyi

S-Tk grubunda saptanan m. soleus KD düzeyindeki artış S-K grubundakinden istatistiksel olarak farklı değildi. Benzer şekilde, S-TdTk grubunda S-Tk grubuna kıyasla m. soleus KD düzeyindeki azalma eğilimi de istatistiksel açıdan önemli bulunmadı. Ayrıca S-K grubu ile S-TdTk grubu arasında da anlamlı bir fark yoktu. A-K grubu ile S-K grubu arasında m. soleus KD düzeyleri açısından fark olmadığı görüldü. Antrene grupların hiç birisinin m. soleus KD düzeyi A-K grubunununkinden farklı olarak gözlenmedi.

Tablo-4: Sedanter ve antrene grupların eritrosit ve doku TBARS ve konjuge dien değerleri (Ort±SH)

	SEDANTER			ANTRENE		
	Kontrol	Tükenme	Tedavi Tükenme	Kontrol	Tükenme	Tedavi Tükenme
<b>TBARS</b>						
Eritrosit (nmol/g hb)	10.13±0.74	13.87±1.32 **	12.11±0.80	9.27±0.81	8.43±0.59	8.55±0.36
Böbrek (nmol/g protein)	165.1±6.5	193.6±10.3 *	149.9±5.8 ††	235.4±12.7 ###	235.5±10.80	182.7±7.6 †††
m. gastrokneumus (nmol/g protein)	64.61±4.20	81.86±5.29	50.97±2.80 †	110.9±6.03 ##	151.8±9.05 †	133.6±18.17
m. soleus (nmol/g protein)	48.23±3.25	67.64±6.36 **	41.01±3.50 ††	81.51±5.67 #	99.67±5.79	94.14±4.15
<b>Konjuge Dien</b>						
Böbrek (nmol/g protein)	16.84±1.25	20.10±1.90	16.64±1.13	14.63±0.81	15.95±0.60	16.84±1.66
m. gastrokneumus (nmol/g protein)	18.23±1.05	18.69±1.32	18.86±1.28	20.18±1.98	19.63±1.19	18.28±1.20
m. soleus (nmol/g protein)	23.52±1.83	26.17±2.30	18.74±1.94	29.20±2.34	26.10±1.36	24.29±2.89

\* p<0.05, \*\*p<0.01; Sedanter kontrol (S-K) grubundan sedanter tükenme (S-Tk) grubunun farkı.

† p<0.05, †† p<0.01; Sedanter tükenme (S-Tk) grubundan sedanter tedavi tükenme (S-TdTk) grubunun farkı.

# p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001; Sedanter kontrol (S-K) grubundan antrene kontrol (A-K) grubunun farkı.

†† p<0.05, ††† p<0.001; Antrene kontrol (A-K) grubundan antrene tükenme (A-Tk) ve antrene tedavi tükenme (A-TdTk) gruplarının farkı.



## II) ANTIOKSİDAN SİSTEM PARAMETRELERİ

Sedanter ve antrene grupların eritrosit ve böbrek dokusundaki SOD, CAT ve GSH değerleri Tablo-5'te gösterilmiştir

### 1) Eritrosit SOD Düzeyi

S-Tk grubuna ait eritrosit SOD düzeyi (% inhibisyon/g hb), S-K grubuna kıyasla istatistiksel açıdan önemli olarak artış gösterdi ( $p < 0.05$ ) S-TdTk grubu ile S-Tk grubu karşılaştırıldığında ise S-TdTk grubundaki azalmanın önemli olduğu bulundu ( $p < 0.01$ ). Ayrıca S-TdTk grubu ile S-K grubu arasında bir fark yoktu.

A-K grubu ile S-K grubu arasında önemli fark bulunamadı. A-Tk ve A-TdTk gruplarının hiçbirinin eritrosit SOD % inhibisyon düzeyleri A-K grubuna göre istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı bulunmadı.

### 2) Eritrosit CAT Düzeyi

S-K grubu ile S-Tk grubu eritrosit CAT düzeyleri açısından karşılaştırıldığında, S-Tk grubunda S-K grubuna göre önemli artış olduğu ( $p < 0.01$ ), S-TdTk grubunda ise eritrosit CAT seviyesinin S-K ve S-Tk grubundan önemli bir fark göstermediği saptandı.

A-K grubunda eritrosit CAT düzeyi S-K grubuna göre belirgin olarak yüksek bulundu ( $p < 0.01$ ). A-Tk ve A-TdTk gruplarının eritrosit CAT düzeyleri, A-K grubununki ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel olarak farklı bulunmadılar.

### 3) Eritrosit GSH Düzeyi

S-Tk ve S-TdTk grupları birbirleriyle ve S-K grubu ile kıyaslandıklarında eritrosit GSH düzeyleri açısından aralarında önemli bir fark olmadığı saptandı. A-K grubunda eritrosit GSH düzeyi S-K grubuna kıyasla hafif bir artış eğilimi

gösterse de bu artış önemli değildi. Antrene grupların tümünün eritrosit GSH düzeyleri A-K grubundan farklı bulunmadı.

#### **4) Böbrek SOD Düzeyi**

S-Tk grubunun böbrek SOD düzeyleri (% inhibisyon/g protein) S-K grubuna göre artmış olarak bulunsa da bu artış istatistiksel olarak önemli değildi. Ayrıca S-TdTk grubunun böbrek SOD değerleri de S-K ve S-Tk grubundan farklı bulunmadı.

A-K grubu ile S-K grubu arasında olduğu gibi, A-K grubu ile diğer antrene gruplar arasında da böbrek SOD inhibisyon düzeyleri açısından istatistiksel olarak önemli fark bulunamadı.

#### **5) Böbrek CAT Düzeyi**

Böbrek CAT düzeyleri açısından sedanter gruplar arasında önemli bir fark bulunmadı. A-K grubu ile S-K grubu arasında yapılan karşılaştırma sonucunda bu iki grup da birbirinden istatistiksel olarak farksız bulundu. Benzer şekilde, A-Tk ve A-TdTk gruplarının da böbrek CAT düzeyleri A-K grubundan farksızdı.

#### **6) Böbrek GSH Düzeyleri**

Sedanter ve antrene grupların kendi içlerinde değerlendirilmesiyle hiç birinin böbrek GSH düzeyi bir diğerine göre fark göstermedi. A-K grubuna kıyasla S-K grubu ve diğer antrene grupların da böbrek GSH düzeylerinde istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmadı.

**Tablo-5:** Sedanter ve antrene grupların eritrosit ve böbrek dokusundaki SOD, CAT ve GSH değerleri (Ort±SH)

	SEDANTER			ANTRENE		
	Kontrol	Tükenme	Tedavi Tükenme	Kontrol	Tükenme	Tedavi Tükenme
<b>Eritrosit</b>						
SOD (% inhibisyon/ g hb)	10.91±0.53	12.67±0.34 *	10.03±0.32 ††	9.68±0.45	10.96±0.64	10.99±0.78
CAT (k/g hb)	71.0±7.8	114.0±5.9 **	91.4±8.1	115.3±5.4 ##	81.3±4.9	91.4±8.2
GSH (mg/g hb)	15.33±1.07	15.05±0.47	17.69±0.63	18.97±2.23	21.34±1.25	23.02±1.13
<b>Böbrek</b>						
SOD (% inhibisyon/ g protein)	10.96±0.60	12.00±0.47	10.87±0.42	11.14±0.52	11.91±0.60	12.10±0.97
CAT (k/g protein)	46.22±5.73	52.16±5.53	41.66±3.80	49.16±5.57	44.27±7.90	42.16±6.92
GSH (mg/g protein)	48.07±2.73	46.62±3.64	48.26±2.27	41.57±2.80	32.81±2.48	45.93±5.25

\* p<0.05, \*\* p<0.01; Sedanter kontrol (S-K) grubundan sedanter tükenme (S-Tk) grubunun farkı.

†† p<0.01; Sedanter tükenme (S-Tk) grubundan sedanter tedavi tükenme (S-TdT) grubunun farkı.

## p<0.01; Sedanter kontrol (S-K) grubundan antrene kontrol (A-K) grubunun farkı.

## TARTIŞMA

Egzersize bağlı olarak idrarda protein atılımının artışı ilk kez 1878 yılında ortaya konmuş ve üzerinde çok sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen, nedeni hala net olarak ortaya konmuş değildir. Egzersize bağlı proteinürinin özellikleri ayrıntılı olarak ortaya konulmuş olsa da, mekanizmasına yönelik açıklamaların yetersiz olması, bu konuları insanlarda çalışmanın zorluğundan ziyade egzersize bağlı proteinürinin patolojik bir süreç olup olmadığı veya patolojik birtakım durumlara yol açıp açmadığı konusunda fikir birliğinin bulunmaması nedeniyledir. Her ne kadar diabetik hastalarda egzersiz sonrası proteinürinin çok belirgin olarak artması ilerideki bir renal hasarın göstergesi olarak kabul edilse de (126), sağlıklı kişilerde de tekrarlayan proteinüri bazı olumsuz durumlar yaratabilir. Proteinürinin özellikle mezengial hücreler ve proksimal tübüllerde oluşturabileceği hasar bilinen bir durumdur (88,89). Ayrıca proteinürinin, varolan hafif düzeydeki renal hasarı ilerletebileceği de belirtilmektedir (43,87,88).

Bu çalışmayı, egzersize bağlı proteinürinin oluşum mekanizması konusunda literatürdeki bilgi açığından dolayı tasarladık. Araştırmamızı temel olarak sedanter ve antrene olmak üzere iki farklı grup üzerinde planladık. Düzenli fiziksel aktiviteler sonucu antrene hale gelen hayvan ve insanlarda bir çok dokuda bir çok metabolik değişiklikler oluşur. Kaslar, solunum ve dolaşım

sistemi başta olmak üzere kemik dokusu, bağ dokusu, sempatik sinir sistemi, kan ve vücut bileşimindeki (özellikle kolesterol ve trigliserit açısından) değişimler bunların başlıcalarıdır (127). Bunların yanında serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve antioksidan savunma sistemi de egzersize uyum sağlamaktadır (45,46,64).

Egzersize bağlı proteinürinin mekanizmasına oksidan sistemin katkısını incelediğimiz araştırmamızda sedanter ve antrene gruplar farklı yanıtlar vermişlerdir. Bundan dolayı bu grupların sonuçlarının ayrı ayrı değerlendirilmesi daha doğru olacaktır.

### **Sedanter Grupların Egzersize Yanıtı**

İnsanlarda görülme sıklığının %70-80 olduğu belirtilen egzersiz proteinürisine travmatik sporlarda olduğu kadar non-travmatik egzersiz aktivitelerinde de oldukça sık rastlanır (2,23,98,101,102,103,104,105). Yalnızca insanlara özgü olmayan egzersiz proteinürisi köpek (6,7,8), domuz (9) ve sıçanlarda (10) da bildirilmiştir. Deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda egzersiz protokolü olarak yüzme ve en sıklıkla da treadmill aracılığı ile gerçekleştirilen koşu egzersizi kullanılmıştır (8,10) Biz de araştırmamızda, sıçanlara koşu bandı aracılığı ile egzersiz yaptırarak tüketici egzersiz uygulanan sedanter tükenme grubundaki (S-Tk) deney hayvanlarımızın tümünde idrar protein düzeyleri artış gösterdi ve bu artış kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemliydi ( $p < 0.05$ ). Deneklerimizde, tek doz tüketici egzersiz uygulaması ile ortaya çıkan proteinüri, literatürde de defalarca tekrar edilen bir sonuçtur (6,8,9). Fakat yapılan çalışmalara göz atıldığında idrardaki protein miktarının ifadesindeki farklılıklar dikkati çekmektedir. Proteinüri sonuçlarının

mg/dL veya mg/gün'den çok mg/mg kreatinin olarak verilmesi idrar toplanması sırasında oluşabilecek aksaklıkları (mesanede idrar kalması gibi) ekarte etmesinin yanında, idrardaki konsantrasyon veya dilüsyonunu daha iyi yansıtacağından, tavsiye edilmektedir (11). Ayrıca egzersiz sonrası görülen proteinürinin 24-48 saatte kaybolduğu belirtilmektedir (1,11,12), bundan dolayı deney hayvanlarımızın ilk 24 saatteki idrar numunelerini toplamayı uygun bulduk.

Egzersiz ile proteinüri arasında söz edilmesi gereken bir başka ilişki de egzersizin şiddetine göre proteinüri tipinin değişmesidir. Hafif ve orta dereceli egzersizlerde glomerüler proteinüri ön planda iken ağır-tüketici egzersizlerde mixt tip proteinüri olur (1,11,12) Protein elektroforezi sonuçlarımız tüketici egzersiz uyguladığımız S-Tk grubunda miks tip proteinüri olduğunu göstermektedir. S-Tk grubunun elektroforezinde hem glomerüllerden süzülmenin arttığını gösteren yüksek molekül ağırlıklı proteinlerin bandında yoğunlaşma (özellikle albümine uyan bölgede) vardır. Aynı zamanda, özellikle ağır egzersizde ve genellikle tübüler reabsorpsiyon kapasitesinin dolmasıyla ortaya çıktığı tahmin edilen hafif molekül ağırlıklı protein bandının koyulaşması da dikkati çekmektedir. Bu noktada da sonuçlarımızın şimdiye kadar bilinenlerle aynı yönde olduğunu görülmektedir. Sedanterlerin kontrol grubunda oldukça silik olan albümin bandının tükenme egzersizi sonrasında koyulaşması yanında kontrol grubunda olmayan ve albümin bandından daha önde yer alan silik bir band göze çarpmaktadır. Her ne kadar, hangi protein tipine karşılık geldiği tam olarak söylenemese de, kullandığımız elektroforez kitinde bu bandın transferrin ile uyumlu olduğu belirtilmektedir.

Bir çok araştırmada yüksek molekül ağırlıklı proteinlerin içinde albüminin yanında transferrinin de çıktığı gösterilmiştir (43,87,90). Diğer yüksek molekül ağırlıklı proteinlerin yanında, transferrinin proksimal tübülde yapacağı hasarın daha fazla olacağı bildirilmektedir. Transferrinin yapısındaki demirin serbestleşmesiyle hücrelerde önemli ölçüde peroksidatif hasar oluşabilmektedir. (87,90).

Denek seçimi, egzersiz tipi-şiddeti ve proteinürinin tipi açısından önceki bilgilerle uyumlu görülen araştırmamızdaki temel hedefimiz, egzersiz proteinürisi mekanizması konusuna katkıda bulunmaktır. Bugüne kadar ileri sürülen mekanizmalar arasında glomerüler ve/veya tübüler proteinüri için bazı açıklamalar vardır. Egzersize bağılı böbrek kan akımı azalışının, GFR'deki düşüştten daha fazla olması, egzersizde filtrasyon fraksiyonunun arttığını ve böylece makromoleküllerin filtrata geçişinin arttığı, ileri sürülen nedenlerden birisidir (2,11). Fakat hafif egzersiz sırasında böbrek kan akımı ve GFR pek değişmemesine rağmen proteinüri görülebilir (6). Ayrıca orta-ağır şiddetteki egzersiz sonrasında da renal hemodinamik değişiklikler ve GFR'deki azalış bir saat içinde geriye dönerken, proteinüri 48 saate kadar sürmektedir (11). Egzersizde renal hemodinamik değişikliklerden sorumlu tutulan böbrek sempatik aktivite değişikliği (2,95), angiotensin II (7,11,96,97) ve prostaglandinlerin (9) egzersiz proteinürisine etkisi konusunda da çelişkili sonuçlar alınmıştır. Bu konuda soru işareti doğuran bir başka nokta da köpeklerde gösterilmiştir. Egzersiz sırasında egzersizin şiddeti çok ağırlaşmadıkça renal kan akımı değişmemekte ama egzersiz proteinürisi izlenmektedir (6). Yine glomerül kökenli proteinüriye neden olduğu ileri sürülen

bir başka mekanizma da Zambraski ve ark'nın ileri sürdüğü, glomerüler filtrasyon bariyerindeki elektronegatif yüklerin kaybıdır (108). Kan laktat miktarı ile proteinüri arasında önemli ilişki olması negatif yük kaybı için yapılan açıklamalarda kullanılmıştır. Fakat egzersiz yapmadan, dışarıdan verilen laktat infüzyonunun proteinüriye neden olmaması başka faktörlerin varlığını akla getirmektedir (11,24,100,108). Ayrıca egzersizde görülen tübüler kökenli proteinüride genellikle proksimal tübülün emilim kapasitesinin aşılması neden olarak gösterilmekte (2,3,4,12) ve egzersize bağlı başka bir faktörün proksimal tübülü etkileyebileceğine dair bir fikir ileri sürülmemektedir.

Bizim araştırmamızın şimdiye kadar bilinenlere katkısı egzersize bağlı oluşan oksidan stresin, egzersiz sonucu oluşan proteinüriye etkisinin incelenmesidir. Bu konuda literatürde gösterilen bir bulgu yoktur. Bu konudaki dayanak noktamız, serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu oksidan stres ile egzersiz arasındaki sıkı ilişkidir. Egzersiz sırasında 100 kata kadar artan oksijen tüketimi sonucu mitokondrilerden oluşan elektron kaçakları ile serbest radikal oluşumu artmaktadır (46). Mitokondrilerden olan elektron kaçağı dışında egzersizde görülen oksidan stres için başka nedenler de ileri sürülmektedir. Hangi mekanizma ile oluşursa oluşsun, oksidan ürünler öncelikle kas dokusunda hücresel düzeyde hasarlanmalar yapmakta, bunun yanında diğer bir çok dokuda (kalp, karaciğer, akciğer, beyin, böbrek, eritrosit) da oksidan stres bulguları izlenmektedir (24).

Bizim çalışmamızda da sedanter grupta tek doz tüketici egzersiz sonucu hayvanların eritrosit ve dokularında oksidan stresin arttığına dair bulgular göze çarpmaktadır. Serbest oksijen radikallerinin, lipidlere saldırması sonucu oluşan



lipid peroksidasyonun göstergelerinden biri olan TBARS düzeyleri eritrositlerde, böbrek ve m. soleus'ta anlamlı bir şekilde arttı. İncelenen diğer kas olan m. gastrocnemiusta ise belirgin bir artış izlenmesine rağmen istatistiksel olarak önem saptanmadı. Özellikle fiziksel egzersizde yer almayan uzak organlardan olan böbrekteki artış bizim hipotezimiz açısından önemlidir. Lipid peroksidasyonun bir başka göstergesi olan konjuge dienlerin ölçümünde ise özellikle böbrek ve m. soleus dokularında artış olsa da istatistiksel olarak önemli değildi. Hayvanlarımızı, tüketici egzersiz sonrasında, idrar toplamak amacıyla 24 saat metabolik kafeslerde tuttuğumuz düşünülürse konjuge dienlerde TBARS'a göre daha az artışın saptanması normal bir durum olarak görülmektedir. Çünkü konjuge dienler lipid peroksidasyon sürecinin başında oluşan erken ürünlerdir ve bir süre sonra daha ileri basamaklarda yer alan ürünlere doğru kayarlar (128,129). TBARS değerinin m. gastrocnemiusta anlamlı çıkmaması ve konjuge dien değerinin de kontrol hayvanlarından farklı olmaması dikkati çekebilir. Fakat unutulmamalıdır ki, m. gastrocnemius, tip II yani anaerobik glikolitik metabolizmanın hakim olduğu liflerden zengindir. Bizim uyguladığımız egzersiz öncelikle aerobik mekanizmaların işlemesiyle sürdürülürken son dönemlere doğru anaerobik sistem de devreye girebilir. Ancak, m. gastrocnemiusun tip II kas liflerinden zengin olmasından dolayı serbest radikalleri oluşturacak oksidatif enzimlerinin çok gelişmediği akla gelmelidir.

Reaktif oksijen ürünleri, egzersizde oluşan hasar dışında birçok hastalıkta, hatta yaşlılık patogenezinde de suçlanmaktadır (47,130). Ateroskleroz, bazı kanser türleri, artrit, katarakt, iskemi-reperfüzyon hasarları,

obstrüktif akciğer hastalıkları ilk akla gelen durumlardır (46,130,131,132). Oksidan stres, çeşitli böbrek hastalıklarından da sorumlu tutulmakta ve bu hastalıklarda ortaya çıkan proteinürinin fizyopatolojik mekanizmalarından biri olarak kabul edilmektedir (14,15,17,19,37,38,41)

Serbest oksijen radikallerinin sorumlu olduğu ileri sürülen böbrek hastalıkları veya deneysel böbrek hastalığı modelleri arasında puromisin aminonükleosid nefriti (86), daunomisin nefropatisi (22), IgA nefropatisi (85), Heyman nefriti (40), Masugi nefriti (37), immün kompleks nefriti (19), adriamisin nefropatisi (17), kronik renal yetmezlik (18), anti-GBM antikor glomerülofriti (90) sayılmaktadır. Oksidan stres bu hastalıkların patogenezesinden sorumlu olmasının yanısıra, bu hastalıklardaki proteinüriye de neden olmaktadır. Serbest oksijen radikalleri ile proteinüri arasındaki ilişki,  $H_2O_2$ 'nin doğrudan renal artere verilmesiyle proteinüri miktarında doza bağımlı artışın gösterilmesi (21) ve diyetel olarak antioksidan vitamin eksikliği yaratılan hayvanlarda proteinüri saptanmasıyla (20) da ortaya konmuştur.

Yukarıda sözü edilen, egzersizde oksidan stres oluşumu ile oksidan stresin proteinüriye yol açtığı bilgileri bir arada düşünüldüğünde, bu reaktif ürünlerin egzersiz proteinürisinden sorumlu olabileceği varsayımı mantıklı bir çıkarımdır. Bir çok böbrek hastalığında proteinüriye neden olan serbest radikal oluşumu, antioksidan girişimlerle ortadan kaldırıldığında proteinüride de düzelmeler görülmektedir. Yukarıda adı geçen böbrek hastalığı modellerinde süperoksit dismutaz, dimetil tiyüüre (17,40,41,86), katalaz (14,38), probukol (15) ve bazı deneysel antioksidan moleküllerin (19) verilmesi sonucu idrarda çıkan proteinüri miktarlarında anlamlı azalmalar olmaktadır. Ayrıca kolaylıkla

bulunabilen ve verilebilen güçlü bir antioksidan olan E vitamini de bu çalışmalarda kullanılmıştır. Puromisin aminonükleosid nefrozisinde ve IgA nefropatisinde uygulanan E vitamini ise proteinüri değerlerinde düşüş yapmıştır (13,16). Ayrıca E ve C vitamininin birlikte verildiği deneysel böbrek hasarında ise proteinürinin %90'lar seviyesinde azaldığı gösterilmiştir (133).

Antioksidanlar böbrek hastalıklarında proteinüriyi azaltmanın yanında, egzersizde de çok sık kullanılmaktadır (110,112,114,130) Antioksidan girişimlerin egzersizde oluşan oksidan stresi hem insan hem de hayvanlarda, kas ve çeşitli dokularda önlediği bir çok çalışmada gösterilmiştir (45,111,112). Ayrıca vitamin E ve C bu tip uygulamalarda da en sık tercih edilen vitaminlerdir (45,112,114).

Biz de çalışmamızda egzersize bağlı oluşan oksidan stresi baskılamak için E ve C vitaminini seçtik ve uygulama yolu olarak, insandakine uygun olması amacıyla oral yolu tercih ettik. Tüketici egzersiz öncesi bir ay boyunca antioksidan tedavisi uyguladığımız S-TdTk grubunda, bu tedavinin egzersizle oluşan oksidan stresi baskıladığı açıkça görülmektedir. S-TdTk grubu eritrosit, böbrek, m. gastrocnemius ve m. soleus TBARS değerlerinin hiç biri sedanter kontrol grubundan farklı değilken, bu değerlerin tümü S-Tk grubuna göre önemli olarak düşük bulundu. Konjuge dien sonuçlarının hiç birinde istatistiksel olarak önemli değerler saptanmasa da, böbrek ve m. soleus dokularında S-Tk grubuna göre düşme eğilimi vardı. Antioksidan vitamin tedavisi sonucu görülen lipid peroksidasyonun baskılanması beklenen bir durumdur. Fakat antioksidan tedavi sonrası tüketici egzersiz yapan hayvanların idrar bulguları ilk defa gösterilen bir sonuçtur. S-TdTk grubunun idrar protein miktarı, S-Tk grubuna

göre anlamlı olarak düşüş gösterdi ve S-K grubu ile aralarında fark bulunmadı. İdrar elektroforez sonuçlarına bakıldığında ise, S-Tk grubunda miks tip olan proteinürinin ortadan kalktığı, çok silik bir albümin bandı ile yine silik bir düşük molekül ağırlıklı protein bandının varlığı izlenmektedir. Sedarter hayvanlarda hem idrar protein miktarı hem de idrar protein elektroforezi sonuçları egzersize bağlı oluşan oksidan stresin, egzersiz proteinürisinde rol oynadığını göstermektedir. Oksidan stresin baskılanmasıyla egzersizdeki proteinüri de önemli ölçüde baskılanmış oldu.

Genel bilgiler kısmında anlatıldığı gibi, reaktif oksijen ürünleri bir çok değişik etkiyle proteinüriye neden olmaktadır. Eikozanoidler üzerinden glomerüler permeabiliteyi değiştirmeleri bu etkilerden birisi olabilir (25,40). Ayrıca glikozaminoglikanları yıkarak oluşturdukları negatif yük kaybı egzersize bağlı proteinüri oluşumunda ön planda olabilir (25,39). Zambraski ve arkadaşları (108) egzersiz yapan köpeklerde proteinürinin artması yanında renal sialik asit içeriğinin azaldığını göstermişlerdir. Antioksidan tedavisi sonucu düşük molekül ağırlıklı protein bandındaki düzelleme ise glomerüler proteinürinin azalması sonucu tübüle gelen protein yükünün azalması ile açıklanabilir.

Çalışmamızda her ne kadar sedanterlerde egzersiz proteinürisinin, egzersizde oluşan oksidan stresten kaynaklandığı ortaya çıksa da, böbreği etkileyen serbest oksijen radikallerinin kaynağı konusunda bizim çalışmamızla ancak tahminde bulunabiliriz. Kas hücrelerinde oluşan serbest oksijen radikallerinin ömürlerinin çok kısa olması ve bunların oldukça reaktif ürünler olmaları nedeniyle, böbreğe ulaşip hasar oluşturmalarını beklemek pek olası

değildir. Öncelikle akla gelmesi gereken, lökositlerden açığa çıkan radikallerdir. Egzersize bağlı olarak özellikle tüketici egzersiz sonrası lökositlerin aktive olduğu iyi bilinir (134,135,136) Aktive lökositler gittikleri bir çok organda hasar oluşturabilseler de kan akımının yüksek olmasından dolayı bundan en fazla etkilenebilecek organlardan biri böbreklerdir. Deneysel böbrek hastalığının bazı modellerinde de lökositler ortadan kaldırıldığında veya aktiviteleri engellendiğinde proteinüride düzelme saptanmıştır (37,38,39,40,42,137) Ayrıca mesangial hücrelerin de bazı uyarılar sonucu reaktif oksijen radikallerini üretebileceği ortaya konulmuştur (40,42).

Lökosit ve mesangial hücreler dışında da iskemi-reperfüzyon mekanizmasının böbreklerde serbest radikal üretmesi söz konusu olabilir. Ağır egzersiz sırasında kan akımı çok azalan böbreğin, egzersiz sonrasında kan akımının normale dönmesi ksantin oksidaz enziminin aktivasyonu sonucu önemli ölçüde serbest oksijen radikali oluşturabilir (14,22,24) Oksidan stresin böbreklerdeki kaynağı konusunda son olarak söz edilmesi gereken yol da perokside metabolitlerin böbrekte tutulmasıdır. Her ne kadar reaktif oksijen ürünlerinin uzak organlarda oluşup böbreğe ulaşmaları söz konusu değilse de, bu ürünlerin oluşturduğu metabolitlerin karaciğer ve böbrekte biriktiği gösterilmiştir (24). Egzersiz proteinürisi oluşturmada etkili olduğunu gösterdiğimiz oksidan stresin kaynağı bundan sonraki araştırmalarda ortaya konulmalıdır.

Oksidan stres aracılığıyla oluşan egzersiz proteinürisi mekanizması diğer ileri sürülen mekanizmalardaki boşluğu kapatıyor gibi görünmektedir. Üzerinde en çok durulan mekanizma olan egzersizde filtrasyon fraksiyonu

artışı, egzersiz bitiminden sonra normale dönmekte ve 48 saate kadar devam eden proteinürüyi açıklamakta yetersiz kalmaktadır. Bu yolak egzersiz sırasında ve hemen sonrasındaki proteinüriden sorumlu olabilir. Fakat proteinüri cevabının daha uzun sürmesi, biraz önce saydığımız olası kaynaklardan açığa çıkan reaktif oksijen ürünleri ile oksidan stresin ortaya çıkması ve proteinürinin 24-48 saat kadar devam etmesini sağlayabilir.

Sedanter grubun antioksidan enzim ve GSH düzeylerinde yalnızca eritrositlerde istatistiksel olarak önemli değişiklikler saptandı. Eritrosit SOD ve CAT enzimlerinin aktiviteleri tükenme egzersizi sonucunda, kontrol grubuna göre artış gösterdi. Antioksidan enzimlerdeki bu yanıt sık rastlanan bir bulgudur ve yeni enzim sentezlenmesinden ziyade posttranslasyonel modifikasyon olarak yorumlanmaktadır (112). Gerçi akut tüketici egzersiz grubundan 24 saatlik idrar toplama periyodun sonrasında aldığımız doku örneklerinde, ani oksidan hasara karşı yeni enzim sentezlenmesi de olasıdır. Bu yanıt S-TdTk grubunda antioksidan tedavi ile oksidan stres baskılandığı için gözlenmiş olabilir. Böbrek dokusunda da SOD ve CAT enzimlerinde artış eğilimi görülse de aradaki fark anlamlı bulunmadı. Egzersiz sonrası antioksidan enzim değişiklikleri özellikle kas dokusunda sözkonusudur (45,64,112), böbrekte bu yanıtı tetikleyecek düzeyde uyarın sağlanmamış olabilir.

### **Antrene Grubun Egzersize Yanıtı**

Antrene ve sedanter hayvanlar arasındaki metabolik farklılıklardan ve oksidatif-antioksidatif sistemde olası değişikliklerden tartışmanın ilk kısmında söz edilmişti. Bizim sonuçlarımızda sedanter ve antrene grupları arasında

egzersiz proteinürisi bakımından ileri sürdüğümüz mekanizmanın geçerliliği açısından farklı yanıt gösterdi.

Antrene grupların bir ay suresince haftada 5 gün, günde bir saat egzersiz yapmaları hayvanlarda çeşitli uyumların gelişmesine neden oldu. Bunun en başında sıçanların dayanıklılıklarının artması gelmektedir. Kas hücrelerinde oluşan bir çok değişiklik hayvanların tüketici egzersize daha uzun süre dayanmasını sağlamış ve bu süre iki-üç kat daha uzun bulunmuştur.

Bizim hayvanlarımızda da bir aylık egzersiz sonucu sedanter kontrol grubuna göre doku lipid peroksidasyon değerlerinde artış saptandı. A-K grubunun böbrek, m. gastrocnemius, m. soleus TBARS değerleri S-K grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yükseldi. Konjuge dienler ise her iki kas dokusunda A-K grubunda daha yüksek olarak saptansa da, bu yükseliş anlamlı değildi. Fikir birliği olmamasına rağmen düzenli antrenmanlar sonucu bazı dokularda lipid peroksidasyonun arttığını bildiren çalışmalar da vardır (45,46,111,115).

Egzersiz proteinürisi bakımından sedanter ve antrene gruplar arası fark ilk olarak her iki kontrol grubu arasında göze çarpmaktadır. Her ne kadar idrar protein miktarı A-K grubunda anlamlı olarak düşük saptansa da ve idrar protein elektroforezinde düşük molekül ağırlıklı bantta biraz yoğunlaşma görülse de temel olarak S-K grubundan farklı değildi. A-K grubunda düzenli egzersizler oksidan strese yol açtığı halde (özellikle böbreklerde belirgin şekilde) egzersize bağlı proteinüri yanıtı gözlenmedi. Bu sonuç bizim ileri sürdüğümüz egzersize bağlı oksidan stresin, egzersiz proteinürisinde rol oynadığı hipotezimizin antrene hayvanlarda geçerli olmadığını ilk göstergesidir.

Antrene hayvanlara tükenme egzersizi uygulandığında ise zaten yükselmiş olan lipid peroksidasyonu çok belirgin olarak artmadı. Yalnızca m. gastrocnemius TBARS düzeylerinde anlamlı artış saptandı. A-Tk grubunun böbrek ve m. soleus TBARS değerleri artsa da anlamlı değildi. Fakat A-Tk grubunun TBARS değerleri, aralarında istatistiksel karşılaştırma yapılmamış olsa da, sedanter tükenme ve sedanter tedavi tükenme gruplarına göre oldukça yüksekti ( $p < 0.001$ ;  $p < 0.05$ ). Tüketici egzersiz uygulanan antrene gruptaki idrar parametreleri ise klasik olarak beklenen yanıtı verdi. A-Tk grubu idrar protein miktarı, A-K grubuna göre anlamlı olarak arttı. Bu grubun idrar protein elektroforezi sonucunda hem düşük hem de yüksek molekül ağırlıklı protein bantlarında belirgin yoğunlaşma sonucu mixt tip proteinüri saptandı. A-Tk grubu elektroforez görünümü S-Tk grubundan farklı değildi. Yapılan araştırmalarda da ağır egzersiz sonrası sedanterlerin yanında antrene deneklerde de glomerüler veya miks tip proteinüri saptanmıştır (23,93,103,104). A-Tk grubunda hem oksidan stresin hem de proteinüri yanıtının olması antrene hayvanlarda bizim ileri sürdüğümüz mekanizmanın geçerli olabileceğini akla getirebilir. Ancak egzersiz, antrene hayvanlarda oksidan strese yol açmasının yanında proteinüriye neden olmuştur. Fakat her ikisinin de egzersizde oluşabileceği ve aralarında sebep-sonuç ilişkisinin bu grupla ortaya konulamayacağı da bir gerçektir. Antrene hayvanlarda da egzersiz aracılığıyla oluşan oksidan stresin proteinüriye neden olup olmayacağı, sedanter gruplardaki gibi egzersize bağlı oksidan stresin baskılanmasıyla anlaşılabilir.



Bir ay süren antrenman koşuları sırasında antioksidan vitamin alan ve tükenme egzersizine tabi tutulan A-TdTk grubunda lipid peroksidasyon, S-TdTk grubundaki kadar olmasa da baskılandı. A-TdTk grubu böbrek TBARS değerleri, A-Tk ve A-K gruplarına göre anlamlı olarak düşüktü. Bunun yanında kas dokularında ölçülen TBARS değerleri, anlamlı olmasa da düşük olarak saptandı. Ancak özellikle böbrek TBARS değerinde azalma olmasına rağmen A-TdTk grubunun idrar sonuçları A-Tk grubundan farklı değildi. Bu grup hayvanların antioksidan vitamin tedavisine rağmen idrar protein miktarları A-K grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek kalmaya devam etti ve idrar protein elektroforez görünümünde de miks tip proteinüri saptandı. A-TdTk grubundan elde edilen bu sonuç ise ileri sürdüğümüz mekanizmanın antrene hayvanlarda geçerli olmadığını ikinci göstergesidir.

Antrene hayvanlarda egzersiz proteinürisinde egzersize bağlı oksidan stresin rolü yok gibi görünmektedir. Daha önce de üzerinde durulan, glomerüler bazal membrandan yük kaybı, antrene hayvanlarda ön plana geçmiş olabilir. Fakat gözden kaçmaması gereken bir durum da, antrene hayvanlarda uygulanan antioksidan tedavi dozunun yetmemiş olma olasılığıdır. Antrene bireylerde egzersiz sırasında vücut kan dağılımı değişmekte, ihtiyacın artmasına bağlı olarak kalp ve iskelet kaslarının kan akımı artarken karaciğer ve böbreklere giden kan miktarı iyice azalmaktadır (138). Bu yüzden iskemi-reperfüzyon hasarı sonucu daha fazla oksidan stres oluşabilir ve bu nedenle de vitamin dozu yetersiz kalmış olabilir.

Antrene hayvanların antioksidan enzim ve GSH değerleri incelendiğinde ise belirgin bir görünüm ve farklılık göze çarpmamaktadır. Yalnızca A-K

grubunun eritrosit CAT değerleri S-K grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Düzenli fiziksel aktiviteler, egzersizin Şiddetinden bağımsız olarak belirli bir sürenin üzerinde uygulandığında özellikle kas SOD ve GPx aktivitelerinde artışı genellikle 8-10 haftalık uygulamalardan sonra yapmaktadır (45). Antrene gruplara uyguladığımız egzersiz periyodunun dört haftadan daha uzun tutulmasıyla böbrek dokusundaki antioksidan enzim aktivitelerinin artması olasıdır.

*Sonuç olarak* araştırmamız, egzersize bağlı oluşan oksidan stresin sedanter hayvanlarda egzersiz proteinürisine yol açtığını ve bu durumun antioksidan vitamin tedavisiyle, oksidan stresin baskılanması sonucunda nlenebildiğini gösterdi. Fakat antrene hayvanlarda, A-K grubunda, özellikle böbrekte oksidan hasar gözlenirken proteinürinin olmaması ve A-TdTk grubunda da oksidan stres baskılandığı halde egzersiz proteinürisinin gözlenmesi, bu mekanizmanın antrene hayvanlarda geçerli olmadığını göstermiştir.

## ÖZET

Egzersize bağlı renal hemodinamik değişikliklerin yanında egzersiz sonrası geçici proteinürinin ortaya çıkması sık karşılaşılan bir bulgu olmasına rağmen, mekanizması hakkında ileri sürülen görüşler yetersizdir. Egzersiz sırasında ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri aracılığıyla oluşan oksidan stresin egzersiz proteinürisine neden olup olmadığını sedanter (S) ve bir ay boyunca treadmill egzersizi ile antrene (A) olan sıçanlarda araştırdık.

Her grup kendi içinde rasgele kontrol (S-K, A-K), tüketici egzersiz uygulanan (S-Tk, A-Tk) ve antioksidan vitamin (E ve C vitamini) verildikten sonra tüketici egzersiz uygulanan (S-TdTk, A-TdTk) gruplar olmak üzere üçe ayrıldı. Deneyin sonunda tüm hayvanların metabolik kafeslere alınmasıyla toplanan idrar örneklerinden protein miktarı ölçüldü ve idrar protein elektroforezi yapıldı. Her hayvanın eritrosit, böbrek, m. gastrocnemius ve m. soleus dokularından lipid peroksidasyon (LPO) ve antioksidan enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı.

Sedanter hayvanlarda tüketici egzersiz sonrası (S-Tk) idrar protein miktarında artış ve idrar protein elektroforezinde miks tip proteinüri saptanırken; eritrosit, böbrek ve kas dokularında da LPO'un anlamlı olarak arttığı gözlemlendi. Tüketici egzersiz öncesi antioksidan vitamin tedavisi verilen grupta ise (S-TdTk) LPO'un baskılandığı, idrar protein miktarının normale döndüğü ve idrar protein elektroforezinin kontrol grubundan farklı olmadığı

izlendi. S-Tk grubunun süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktiviteleri yüksek iken, S-TdTk grubunda kontrolden farklı değildi.

Anterene gruplar incelendiğinde ise, A-K grubunda böbrek ve kas dokularında LPO yüksek olduğu halde, idrar protein miktarı ve elektroforezinin S-K grubundan farklı olmadığı saptandı. Antrene gruba tüketici egzersiz uygulandığında (A-Tk), A-K grubuna göre belirgin bir LPO artışı olmamasına rağmen idrar protein miktarının arttığı ve elektroforezde miks tip proteinürinin ortaya çıktığı saptandı. A-TdTk grubunda E ve C vitaminleri ile LPO baskılanmasına rağmen, tüketici egzersiz sonucu idrar protein miktarı ve elektroforezi A-Tk grubundan farklı bulunmadı. Antioksidan enzimler açısından A-K grubunda eritrosit CAT aktivitesinin yüksek bulunması dışında herhangi bir farklılık saptanmadı.

Sonuç olarak egzersize bağlı oksidan stresin sedanter hayvanlarda egzersiz proteinürisi oluşturmada etkili olduğu, antrene hayvanlarda ise bu yolun geçerli olmadığı görüldü.

## SUMMARY

The renal hemodynamic changes and postexercise proteinuria are common cosequence of exercise. However the mechanism of postexercise proteinuria is not clear. Reactive oxygen species that are produced in exhaustive exercise may result in postexercise proteinuria. We investigated whether oxygen free radicals generated during exhaustive exercise play role in postexercise proteinuria in untrained and trained rats.

Untrained and trained rats are randomly divided into groups as control, exhaustive exercise and antioxidant therapy plus exhaustive exercise groups. 24 hour urine samples were collected in metabolic cages and used for protein analysis. Lipid peroxidation (LPO) and antioxidant enzyme activities were determine in erythrocyte, kidney and muscle tissues.

Exhaustive exercise in untrained rats, increased the urinary protein excretion and this proteinuria was identified as mixed type by electrophoresis. Erythrocyte and tissue LPO levels were significantly elevated in this group. In the trained group, tissue LPO levels of control animals were significantly elevated compared to untrained control animals. However their urinary protein levels and urinary protein electrophoresis were not different from untrained-control group. Exhaustive exercise in trained rats, resulted mixed proteinuria although there was no significant increase in the LPO levels. Antioxidant therapy

decreased the LPO but did not affect urinary protein levels. These findings of trained-antioxidant therapy plus exhaustive exercise group, were not different from trained-exhaustive exercise group. Erythrocytes catalase activity was significantly increased in trained-control group compared other trained groups.

In conclusion, oxidant stress related to exhaustive exercise may contribute to postexercise proteinuria in untrained rats. However this mechanism may not be responsible for the proteinuria in trained rats.

## REFERANSLAR

- 1) Cianflocco AJ: Renal complications of exercise. *Clinics in Sports Medicine*. 11 (2): 437-451, 1992.
- 2) Poortmans J. R: Postexercise proteinuria in humans. *JAMA*. 253: 236-240, 1985.
- 3) Poortmans J. R, Henrist A.: The influence of air-cushion shoes on post-exercise proteinuria. *J. Sports Med*. 29: 213-217, 1989.
- 4) Poortmans J. R: Evidence of increased glomerular permeability to proteins during exercise in healthy men. *Contr Nephrol*. 68: 136-140, 1988.
- 5) J R. Poortmans, M.-F. Engels, M Sellier, R Leclercq *Med. Sci. Sports Exerc*. 23 (7): 831-835, 1990.
- 6) Epstein J. B, Zambraski E: Proteinuria in exercise dog. *Med. Sci. Sports*. 11(4): 348-350, 1979
- 7) Joles J. A, 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.
- 8) Joles J. A, 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.

- 9) O'hagan K. P, Hora D. F, Zambraski E: Indomethacin attenuates exercise-induced proteinuria in hypertensive miniature swine. *Am. J. Physiol.* 263(32): R954-R961, 1992.
- 10) Bergamaschi C. T, Boim M. A, Moura L. A, Piçarro I. C, Schor N: Effects on long-term training on the progression of choronic renal failure in rats. *Med. Sci. Sports Exer* 29(2): 169-174, 1997.
- 11) Poortmans J. R, Vanderstraeten J: Kidney function during ezercise in heathy and diseased humans. *Sports Med.* 18 (6): 419-437, 1994.
- 12) Poortmans J. R, Blommaert E, Baptista M, Broe M. E, Nouwen E. J.:Evidence of differantial renal dysfunctions during exercise in men. *Eur. J. Appl: Physiol.* 76: 88-91,1997.
- 13) Lee H. S, Jeong J. Y, Kim B. C, Kim Y. S, Zhang Y. Z, Chung H. K: Dietary antioxidant inhibits lipoprotein oxidation and renal injury in experimental focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney International* 51: 1151-59, 1997.
- 14) Tay M, Comper W. D, Vassiliou P, Glaskow E. F, Baker M. S, Pratt L: The inhibitory action of oxygen radical scavengers on proteinuria and glomerular heparan sulphate loss in the isolated perfused kidney. *Biochemistry International.* 20(4): 767-778, 1990.
- 15) Neale T. J, Ojha P. P, Exner M, Poczewski H, Rüger B, Witztim J. L, davis P, Kerjaschki D: Proteinuria in passiveHeymann nephritis is associated with lipid peroxidation and fprmation of adducts on type IV kollagen. *J. Clin Invest.* 94: 1577-84, 1994.



- 16) Kuemmerle N B, Chan W, Krieg R. J, Norkus E. P, Trachtman H, Chan J. C. M: Effect of fish oil and  $\alpha$ -tocopherol in immunoglobulin A nephropathy in the rat. *Pediatric Research*. 43(6): 791-7, 1998.
- 17) 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: 199-203, 1992
- 18) Trachtman H, Wilson D, Rao P S: The role of oxygen free radicals in the development of chronic renal failure. *Life Sciences*. 50: 1877-1883, 1992.
- 19) Sanaka T, Nakano Y, Nishimura H, Shinobe M, Higuchi C, Omato M, Nihei H, Sugino N: Therapeutic effect of a newly developed antioxidative agent (OPC-15161) on experimental immune complex nephritis. *Nephron*. 76: 315-322, 1997.
- 20) Nath K A, Salahudeen A. K: Induction of renal growth and injury in the intact rat kidney by dietary deficiency of antioxidants. *J. Clin. Invest.* 86: 1179-1192, 1990.
- 21) Yoshioka T, Ichikawa I, Fogo A: Reactive oxygen metabolites cause massive, reversible proteinuria and glomerular sieving defect without apparent ultrastructural abnormality. *J Am Soc Nephrol*. 2: 902-912, 1991.
- 22) Kawamura T, Yoshioka T, Bills T, Fogo A, Ichikawa I: Glucocorticoid activates antioxidant enzymes and protects glomeruli from oxidant injuries. *Kidney International*. 40: 291-301, 1991.
- 23) Estivi P, Urbino R, Tetta C, Pagano G, Cavallo-Perin P: Urinary protein excretion induced by exercise: effect of a mountain agonistic footrace in healthy subjects. *Sports Med. Phys. Fitness*. 32: 196-200, 1992.

- 24)** Radak Z, Asano K, Inoue M, Kizaki T, Oh-Ishi S, Suzuki K, Taniguchi N, Ohno H: Superoxide dismutase derivative prevents oxidative damage in liver and kidney of rats induced by exhausting exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 72: 189-194, 1996.
- 25)** Kanwar Y. S, Liu Z. Z, Kashihara N, Wallner E. I: Current status of the structural and functional basis of glomerular filtration and proteinuria. *Seminars in Nephrology* 11(4): 390-413, 1991.
- 26)** Formation of Urine by the Kidney: I-Renal Blood Flow, Glomerular Filtration, and Their control; II- Processing of the Filtrate in the Tubules. In Guyton, *Textbook of Medical Physiology*, Guyton A. C. Philadelphia, W. B. Saunders Company, pp: 286-307, 1991
- 27)** Carlson J. A, Harrington J. T: Laboratory Evaluation of Renal Function. In *Diseases of the Kidney*, Schirer R. W, Gottschalk C. W, Volume 1, Boston/Toronto/London, Little, Brown and Company, pp. 361-405, 1988
- 28)** Pavenstadt H: The charge for going by foot: modifying the surface of podocytes. *Exp. Nephrol.* 6: 98-103, 1998.
- 29)** Oberbauer R, Haas M, Mayer G: Proteinuria as a consequence of altered glomerular permselectivity. *Clinical Nephrology.* 46(6): 357-361, 1996.
- 30)** Cameron J. S: The patient with proteinuria and/or haematuria. In *Clinical Nephrology*, Davison A. M, Cameron J. S, Grünfeld J. P, Kerr David N. S, Ritz E, Winearls C. G, Volume 1, China, Latimer Trend Company, pp. 441-459, 1998.
- 31)** Formation and Excretion of Urine. In *Ganong, Medical Physiology*. Ganong W. F. Stamford, Connecticut; Appleton&Lange. pp: 653-691, 1997.

- 32) Larson T. S, Jamison R. L: Renal Handling of Organic Compounds. In Textbook of Nephrology, Messry S. G, Glassock R. J, Volume 2, Baltimore/USA, Williams&Wilkins, pp. 85-102, 1989.
- 33) Glassock R. J: Proteinuria. In Textbook of Nephrology, Messry S. G, Glassock R. J, Volume 1, Baltimore/USA, Williams&Wilkins, pp. 530-534, 1989.
- 34) Schaeffer A. J, Del Greco F: Other Renal Diseases of Urologic Significance. In Campbell's Urology, Walsh, Retic, Stamey, Vaughan, Volume 2, Philadelphia/Pennsylvania, W. B. Saunders Company, pp. 2072-2075, 1992.
- 35) Eddy A. A, Michael A. F: Immunopathogenetic mechanisms of Glomerular Injury. In Renal Pathology, Tisher C. C; Brenner B. M, Volume 1, Philadelphia, J. B. Lippincott Company, pp. 111-155, 1989.
- 36) Lillehoj E. P, Poulik M. D: Normal and abnormal aspects of proteinuria. Exp. Pathol. 29: 1-28, 1986.
- 37) 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: 444-448, 1992.
- 38) Rehan A, Wiggins R. C, Kunkel R. G, Till G. O, Johnson K. J: Glomerular injury and proteinuria in rats after intrarenal injection of cobra venom factor. Am. J. Pathol. 123: 57-66, 1986.
- 39) Iwasaki K: Reactive oxygen and glomerular dysfunction. Xenobiotica. 20 (9): 909-914, 1990.

- 40) Shah S. V: Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in passive Heymann nephritis in rats. *Am. J. Physiol.* 254 (23): F337-F344, 1988.
- 41) Beaman M, Birtwistle R, Howie A J, Michael J, Adu D: The role of superoxide anion and hydrogen peroxide in glomerular injury induced by puromycin aminonucleoside in rats. *Clinical Science.* 73: 329-332, 1987.
- 42) Klahr S: Oxygen radicals and renal diseases. *Miner. Electrolyte Metab.* 23: 140-143, 1997.
- 43) Alfrey A. C: Role of iron and oxygen radicals in the progression of chronic renal failure. *Am. J. Kidney Diseases.* 23 (2): 183-187, 1994.
- 44) Halliwell B, Gutteridge J. M. C, Cross C. E: Free radicals, antioxidants and human diseases: Where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* 19(6): 598-620, 1992.
- 45) Sen C. K: Oxidants and antioxidants in exercise. *J. Appl. Physiol.* 79: 675-686, 1995.
- 46) Lawler J. M, Powers S. K: Oxidative stress, antioxidant status, and the contracting diaphragm. *Can. J. Appl. Physiol.* 23(1): 23-55, 1998.
- 47) Jenkins R. R, Goldfarb A: Introduction: oxidant stress, aging, and exercise. *Med Sci. Sports Exerc.* 25(2): 210-212, 1993.
- 48) Cadanas E: Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 79-110, 1989.
- 49) Pal Y. B: Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74(1): 139-162, 1994.
- 50) Gutteridge J. M, Halliwell B: The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends. Biochem. Sci.* 15(4): 129-135, 1990.

- 51) Koster J. F, Biemond P, Stam H: Lipid peroxidation and myocardial ischaemic damage: cause or consequence? *Basic. Res. Cardiol* 82 Suppl 1: 253-60, 1987.
- 52) Clemens M R, Waller H. D: Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chem. Phys. Lipids*. 45(2-4): 251-68, 1987
- 53) Freeman B. A, Crapo JD: Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 47(5): 412-26, 1982.
- 54) Frank L, Massaro D: Oxygen toxicity. *Am. J. Med.* 69: 117-126, 1980.
- 55) Garner M. H, Spector A: Selective oxidation of cysteine and methionine in normal and senile cataractous lenses. *Proc. Natl. Acat. Sci USA* 77(3): 1274-7
- 56) Winyard P, Lunec J, Brailsford S, Blake D: Action of free radical generating systems upon the biological and immunological properties of caeruloplasmin. *Int. J. Biochem.* 16(12): 1273-8, 1984.
- 57) Marx G, Chevion M: Site-specific modification of albumin by free radicals Reaction with copper (II) and ascorbate. *Biochem. J.* 236(2): 397-400, 1986.
- 58) Wolff S. P, Dean RT: Fragmentation of proteins by free radicals and its effect on their susceptibility to enzymic hydrolysis. *Biochem. J* 234(2): 399-403, 1986.
- 59) Zoppini G, Targher G, Monaune T, Faccini G, Pasqualini E, Martinelli C, Zenari M, Muggeo M: Increase in circulating products of lipid peroxidation in smokers with IDDM. *Diabetes Care.* 19(11): 1233-36, 1996.
- 60) Auroma O I, Halliwell B, Gajewski E, Dizdaroğlu M: Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem. J* 273 (Pt 3): 601-4, 1991.

- 61) Kasai H, Crain P. F, Kuchino Y, Nishimura S, Dotsuyama A, Tanooka H: Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis*. 7(11): 1849-51, 1986.
- 62) Kasai H, Nishimura S, Kurokawa Y, Hayashi Y: Oral administration of the renal carcinogen, potassium bromate, specifically produces 8-hydroxydeoxyguanosine in rat target organ DNA. *Carcinogenesis*. 8(12): 1959-61, 1987.
- 63) Sagone A. L, Greenwald J, Kraut E. H, Bianchine J, Sing D: Glucose: a role as a free radical scavenger in biological systems. *J. Lab. Clin. Med.* 101(97): 97-104, 1983.
- 64) Powers S. K, Leeuwenburgh C: Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med. Sci. Sport Exerc.* 31(7): 987-997, 1999.
- 65) Ji L. L, Stratman F. W, Lardy H. A: Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. Influences of selenium deficiency, chronic training, and acute exercise. *Arch Biochem. Biophys.* 263(1) 150-60, 1988
- 66) Collins A. R, Dusinska M, Gedik C. M, Stetina R: Oxidative damage to DNA: Do we have a reliable biomarker? *Environ. Health. Perspec.*
- 67) Davies K. J, Goldberg A. L: Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells *J. Biol. Chem.* 262(17): 8227-34, 1987.

- 68) Davies K. J, Goldberg A. L: Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 262(17): 8220-6, 1987.
- 69) Rivett A. J: high molecular mass intracellular proteases. *Biochem. J.* 263(3): 625-33, 1989.
- 70) Lawrence R. A, Pakhill L. K, Burk R. F: Hepatic cytosolic non selenium-dependent glutathione peroxidase activity: its nature and the effect of selenium deficiency. *J. Nutr.* 108(6): 981-7, 1978
- 71) Leung H. W, Morrow P. E: Interaction of glutathione and ascorbic acid in guinea pig lungs exposed to nitrogen dioxide. *Res Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 31(1): 111-8, 1981.
- 72) Leung H. W, Vang M. J, Mavis R. D: The cooperative interaction between vitamin E and Vitamin C in suppression of peroxidation of membrane phospholipids. *Biochem Biophys. Acta.* 664(2): 266-72, 1981.
- 73) Butler J, Koppenol W. H, Margoliash E: Kinetics and mechanism of the reduction of ferric cytochrome C by the superoxide anion. *J. Biol. Chem.* 257(18): 10747-50, 1982.
- 74) Hassan H. M, Fridovich I: Chemistry and biochemistry of superoxide dismutases. *Eur. J. Rheumatol. Inflamm.* 4(2): 160-72, 1981.
- 75) Cheng L, Kellogg E. W, Packer L: Photoinactivation of catalase. *Photochem. Photobiol.* 34(1): 125-9, 1981.
- 76) Thomas C. E, Aust S. D: Rat liver microsomal NADPH dependent release of iron from ferritin and lipid peroxidation. *J. Free Radic. Biol. Med.* 1(4): 293-300, 1985.

- 77)** Wendel A, Cikryt P: The level and half-life of glutathione in human plasma  
FEBS-Lett. 120(2): 209-11, 1980.
- 78)** Kandel E. R, Schwarts J. H, Jessell T. M: Part 5, central visual pathway.  
Principles of Neural Science 1991
- 79)** Lopez T. M, Perez C. R, Fernandez A, Barba C, Barja Q. G: Brain glutathione reductase induction increases early survival and decreases lipofuscin accumulation in aging frogs. J. Neurosci Res. 34(2): 233-42, 1993.
- 80)** Burton G. W, Joyce A, Ingold K. U: First proof that vitamin E is a major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma (letter).  
Lancet. 2(8293): 327, 1987.
- 81)** Bendich A, D'Apollito P, Gabriel E, Machlin L. J: Interaction of dietary vitamin C and vitamin E on guinea pig immun responses to mitogens. J Nutr. 114(9): 1588-93, 1984
- 82)** Buettner G. R: Ascorbate autoxidation in the presence of iron and copper chelates. Free. Radic. Res. Commun. 1(16): 349-53, 1986.
- 83)** Machlin L. J, Bendich A: Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. FASEB. J. 1(6): 441-5, 1987.
- 84)** Krinsky N. I, Deneke S. M: Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoids. J. Natl. Cancer. Inst. 69(1): 205-10, 1982.
- 85)** Kashem A, Endoh M, Nomoto Y, Sakai H, Nakazawa H: Monocyte superoxide generation and its IgA-receptor in IgA nephropathy. Clinical Nephrology. 45 (1): 1-9, 1996.



- 86) Othake T, Kimura M, Nishimura M, Hishida A: Roles of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in murine daunomycin- induced nephropathy. *J. Lab. Clin. Med.* 129: 81-8, 1997
- 87) Burton C, Harris K. P. G: The role of proteinuria in the progression of chronic renal failure. *Am. J. Kidney Diseases.* 27(6): 765-775, 1996.
- 88) Bruzzi I, Benigni A, Remuzzi G: Role of increased glomerular protein traffic in the progression of renal failure. *Kidney International.* 52(62): S29-S31, 1997.
- 89) Abbate M, Benigni A, Bertani T, Remuzzi G: Nephrotoxicity of increased glomerular protein traffic. *Nephrol Dial Transplant.* 14: 304-312, 1999
- 90) Chen L, Wang Y, Tay YC, Harris DCH: Proteinuria and tubulointerstitial injury. *Kidney International.* 52(61): S60-S62, 1997.
- 91) McAllister RM: Adaptations in control of blood flow with training: splanchnic and renal blood flows. *Med. Sci. Sports Exerc.* 30 (3): 375-381, 1998.
- 92) Middlekauff HR, Nitzsche EU, Nguyen AH, Hoh CK, Gibbs GG: Modulation of renal cortical blood flow during static exercise in humans. *Circ. Res.* 80:62-68, 1997
- 93) Irving RA, Noakes TD, Irving GA, Van Zyl-Smit R: The immediate and delayed effects of marathon running on renal function. *The Journal of Urology.* 136: 1176-1180, 1986.
- 94) Poortmans J. R: Exercise and renal function. *Sports Med.* Mar-Apr; 1 (2): 125-53, 1984.
- 95) 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.

- 96) 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.
- 97) Esnault V. L. M, Potiron-Josse M, Testa A, Ginet J. D, Carrer D. L, Guenel J: Captopril but Not Acebutolol, Prazosin or Indomethacin Decreases Postexercise Proteinuria. *Nephron.* 58: 437-442, 1991.
- 98) Kachadorian W. A, Johnson R. E: Athletic Pseudonephritis in Relation to Rate of Exercise. *The Lancet.* 28: 472, 1970.
- 99) Concha Alvarez, Judit MIR, Silvia Obaya, Mirian Frago. *The American Journal of Sports Medicine.* 15 (6): 609-611, 1987.
- 100) Poortmans J. R, 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.
- 101) Poortmans J. R, 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): F277-F283, 1988.
- 102) Poortmans J. R, Rampaer L, Wolfs J. C : Renal protein excretion after exercise in man. *Eur. J. Appl. Physiol.* 58: 476-480, 1989
- 103) Edes T. E, Shah J. H, Thornton W, H: Spontaneous Decline in exercise-induced proteinuria during a 100-mile triathlon. *Southern Medical Journal.* 83 (9):  
healthy and diseased humans *Sports Med* 18 (6): 419-437, 1994

- 104)** 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
- 105)** Poortmans J. R, Jourdain M: Postexercise proteinuria in rowers. *Can J. Spt. Sci.* 15 (2): 126-130, 1990.
- 106)** Poortmans J. R, Labilloy D: The influence of work intensity on postexercise proteinuria. *Eur J. Appl: Physiol.* 57: 260-263, 1988.
- 107)** Robertshaw M, Cheung C. K, Fairly I, Swaminathan R: Protein excretion after prolonged exercise. *Ann Clin. Biochem.* 30: 34-37, 1993.
- 108)** Zambraski E. J, Bober M. C, Goldstein J. E, Lakas C. S, Shepard M. D: Changes in renal cortical sialic acids and colloidal iron staining associated with exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 13(4): 229-232, 1981
- 109)** Dillard C. J, Litov R. E, Savin W. M, Dumelin E. E, Tappel A. L: Effects of exercise, vitamin E, ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J. Appl. Physiol.* 45: 927-932, 1978.
- 110)** Ji L. L: Exercise, oxidative stress, and antioxidants. *Am. J. Sports Med.* 24(6): S20-S24, 1996.
- 111)** Alessio H. M: Exercise-induced oxidative stress. *Med. Sci. Sports Exerc.* 25 (2): 218-224, 1993.
- 112)** Ji L. L: Exercise and oxidative stress: role of cellular antioxidant systems. *Exerc. Sport. Sci.* 23: 135-66, 1995.
- 113)** Dekkers C, Doornen L. J. P, Kemper H. C. G: The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sports Med.* 21 (3): 213-238, 1996

- 114) Goldfarb A. H: antioxidants: role of supplementation to prevent exercise-induced oxidative stress. *Med. Sci. Sports Exerc.* 25 (2): 232-236, 1993.
- 115) Venditti P, Meo s D: Effect of training on antioxidant capacity, tissue damage, and endurance of adult male rats. *Int. J. Sports Med.* 18: 497-502, 1997.
- 116) Lowry O. H, Rosenbrough N. J, Far A L, Randel R J: Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
- 117) 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.
- 118) Stocks J., Dormandy TL: The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *Br J. Hematol.*, 20:95-111, 1971.
- 119) Stone R. C, Cotton W, Frayer A. A, Jones P, Bell J, Hume R: Lipid peroxidation and expression of copper-zinc and manganese superoxide dismutase in lungs of premature infants with hyaline membrane disease and bronchopulmonary dysplasia. *Clin. Lab. Med.* 116: 666-773, 1990.
- 120) Rao N, Fernandez M. A, Cid L. L, Romero J. L, Sevanian A: Retinal lipid peroxidation in experimental uveitis. *Arch. Ophtalmol.* 105: 1712-1716, 1987.
- 121) Tietz N. V: Chapter 15, Biochemical aspects of hematology. In *Textbook of Clinical Chemistry* pp: 1532-1534, 1986.
- 122) Recknagel R. O, Ginde E. A: Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. In *Methods in Enzymology*, Packer L. New York, academic Press 105: 331-337, 1984.

- 123)** Misra H. P, Fridovich I: The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247: 3170-75, 1972
- 124)** Aebi H: Catalase of Enzymatic Analysis. Volume III Enzyme 1: Oxidoreductases, Transferases. Bergmeyer H U, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim. 273-285, 1987
- 125)** Fairbanks V. F, Klee G. G: Biochemical Aspects of Hematology. In *Textbook of Clinical Chemistry*. Tietz N. W, Philadelphia, Saunders Company, pp: 1498-1535, 1986.
- 126)** Inserra F, Daccordi H, Ippolito J. L, Romano L, Zelechower H, Ferder L: Decrease of exercise-induced microalbuminuria in patients with type I diabetes by means of an angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Am. J. Kidney Diseases.* 27(1): 26-33, 1996.
- 127)** Fox E, Bowers R.W, Foss M, L: The physiological basis of physical education and athletics. W. B Saunders Company, fourth edition, pp: 269-312, 1988.
- 128)** Wills E. D: Evaluation of Lipid Peroxidation in Lipids and Biological Membranes. In *Biochemical Toxicology*, Snell K, Mullock B. Oxford, IRL Press Limited, pp. 127-151, 1987.
- 129)** Gutteridge J. M. C: Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.* 41(12): 1819-28, 1995.
- 130)** Packer L: Protective role of Vitamin E in biological systems. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 1050S-5S, 1991.

- 131)** Meydani M, Meisler J. G: A closer look at vitamin E. *Postgraduate Med.* 102 (2): 199-207, 1997.
- 132)** Meydani M: Vitamin E. *the Lancet* 345: 170-175, 1995.
- 133)** Ricardo S. D, Bertram J. F, Ryan G. B: Antioxidants protect podocyte foot processes in puromycin aminonucleosid-treated rats. *J. Am. Soc. Nephrol* 4: 1974-86, 1994.
- 134)** Woods J. A, Davis J. M, Smith J. A, Nieman D. C: Exercise and cellular immune function. *Med. Sci. Sports Exerc.* 31 (1): 57-66, 1999
- 135)** Gamus G, Deby-Dupont G, Duchateau J, Deby C, Pincemail J, Lamy M: Are similar inflammatory factors involved in strenuous exercise and sepsis? *Intensive Care Med.* 20 (8): 602-10, 1994.
- 136)** Suzuki K, Sato H, Kikuchi T, Abe T, Nakaji S, Sugawara K, Totsuka M, Sato K, Yamaya K: Capacity of circulating neutrophils to produce reactive oxygen species after exhaustive exercise. *J. Appl. Physiol.* 81 (3): 1213-1222, 1996.
- 137)** Zi Li J, Sharma R, Dileepan K. N, Savin V. J: Polymorphonuclear leukocytes increase glomerular albumin permeability via hypohalous acid. *Kidney Int.* 46: 1025-1030, 1994.
- 138)** Stephard R. J, Pyley M. J: Peripheral Circulation and Endurance. In *Endurance in Sport (The Encyclopaedia of Sport Medicine, Volume II)*, Stephard R. J, Astrand P. O, Oxford, Blackwel Scientific Publications, pp. 80-95, 1992.