

1.GİRİŞ:

İzole tavşan böbreği vasküler yatağında Histamin'in H_1 reseptörleri aracılığıyla vazokonstriksiyona, H_2 reseptörleri aracılığıyla da vazodilatasyona neden olduğu bilinmektedir^[1,2]. H_1 reseptörlerin HA ile uyarılmasının, ikincil haberci sistem olarak inozitol 1,4,5 trifosfat (IP_3) ve diaçilgliserol (DAG) oluşumunu artırarak kalsiyum iyonu aracılığı ile konstriksiyon, H_2 reseptörlerin uyarılmasının ise adenilat siklaz aktivasyonu sonucu siklik AMP (cAMP) aracılığıyla^[3] dilatasyon yaptığı kabul edilmektedir.

Tavşan aort halkalarında HA ile elde edilen izometrik kasılma yanıtlarının bifazik olduğu, bu iki fazlı yanıtın, fazik kısmından hücre içi kalsiyum depolarından kalsiyum saliverilmesinin, tonik kısmından ise hücre dışı kalsiyum iyonunun eşzamanlı hareketinin sorumlu olabileceği bildirilmiştir^[4].

Serbest oksijen radikallerinin önemli bir özelliği de hücre içi kalsiyum seviyesini artırmalarıdır^[5]. İzole sıçan aort halkalarında yapılan bir çalışmada, anjiotensin II' nin bu dokuda hidrojen peroksit (H_2O_2) yapımını artırdığı ve katalazın da anjiotensin II ile oluşan kasılma yanıtlarını engellediği bildirilmiştir^[6]. H_2O_2 ' in izole sıçan aort halkalarında ve köpek serebral arterlerinde konsantrasyon bağımlı kasılmaya neden olduğu ve katalaz tarafından bu yanıtların inhibe edildiği bildirilmiş, H_2O_2 ile oluşan bu kasılma yanıtlarının kalsiyuma bağımlı olduğu ileri sürülmüştür^[7,8]. Bu bulgular, serbest oksijen radikallerinin vasküler tonusun regülasyonunda katkısı olabileceğini göstermektedir.

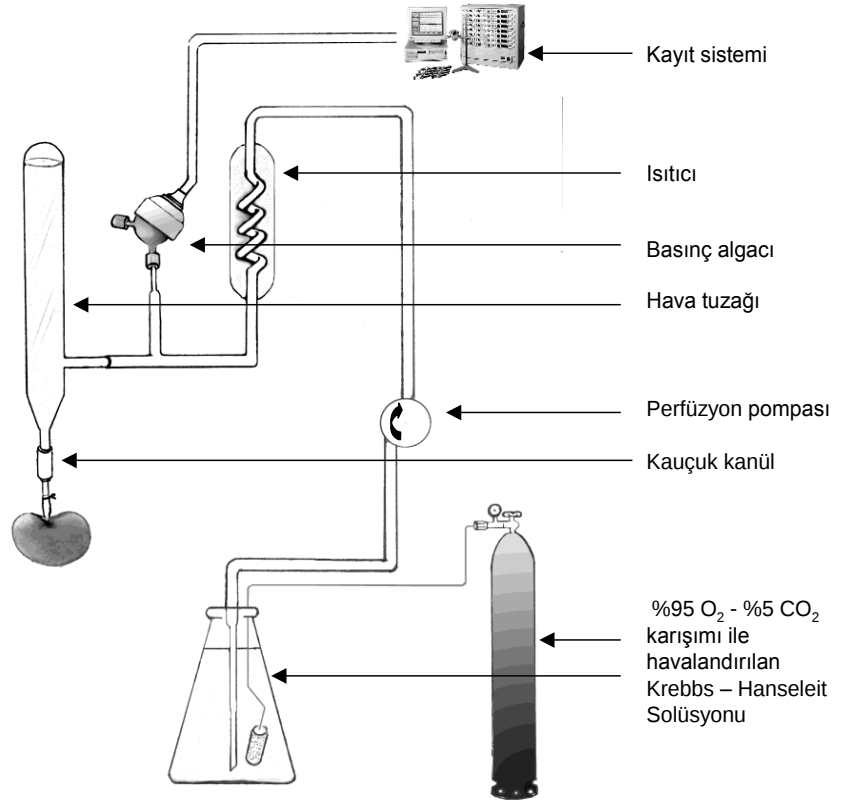
Bu çalışmada izole tavşan böbrek damar yatağında HA' in perfüzyon basıncını artırıcı etkisinin bifazik özelliği olup olmadığının incelenmesi, varsa niteliğinin araştırılması, ve bu yanıtlar üzerinde H_2O_2 , katalaz, allopurinol, hipoksi-reoksijenasyon işlemi ve L-NAME' in etkilerini incelemek amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İzole organ perfüzyon sistemi

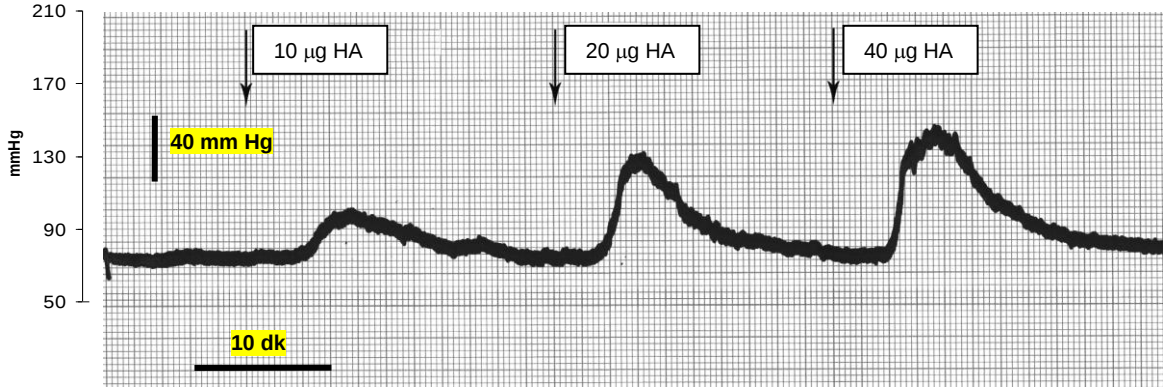
Canlı vücudundan izole edilen bir organın perfüze edilmesiyle ilgili bilinen ilk kayıtlar 1849 yılında Loebel'in yaptığı çalışmalara dayanır^[9]. 1895 yılında Oskar Langendorff ilk defa bu gün kendi adıyla anılan düzeneği kurmuştur^[10]. Bir çözelti rezervuarı ve izole organa bağlı bir sifon tüpünden ibaret olan bu düzenek, günümüzde peristaltik pompalar, basınç algaçları, izometrik gerim algaçları vb. aygıtlar kullanılarak daha karmaşık ve kalp, böbrek gibi perfüze edilebilen organlardan daha hassas bir kayıt yapmaya elverir bir hâle dönüşmüş (modifiye Langendorff düzeneği), fizyolojik, farmakolojik ve biyokimyasal çalışmalarda yararlı veriler sağlayan bir yöntem olarak kullanım alanı bulmuştur. İzole böbrek perfüzyon preparatını tasvir eden şematik gösterimden anlaşılacağı üzere (Şekil 1), canlıdan izole edilen organ, perfüzyon pompası yardımıyla önceden gazlandırılan çözeltiyle perfüze olurken, organ damar yatağında meydana gelen değişiklikler perfüzyon basıncında artma ve azalmalara yol açar ve bu değişiklikler basınç algacı tarafından tespit edilip elektrik sinyalleri haline dönüştürülür. Bu sinyaller ise bir kayıt sistemi tarafından yükseltilir ve kaydedilir. Uygulama pratiği açısından sisteme etken madde tatbik edilmesi gerektiğinde ana çözeltiye uygun derişimi sağlayacak miktarda madde konulması veya maddenin perfüzyon pompasının gerisinden ya da organı hava tuzağına bağlayan kauçuk kanülden "bolus enjeksiyon" tarzında verilmesi mümkündür. İlk uygulamada eklenen madde, perfüzyon devam ettikçe ortamda varlığını sürdürürken, ikinci uygulamada pompa ile organ arasında yer alan taşıyıcı

hortumun içerdği sıvı hacminde sulanarak organa erişir ve perfüzyon hızı ve arada kalan sıvı hacmine de bağlı olarak yaklaşık 20 – 30 dakikalık bir süre boyunca organa etki eder. Üçüncü uygulamada ise kanülden yapılan enjeksiyon sonrası etken madde derhal organa temas eder ve ardından gelen maddesiz perfüzyon çözeltisiyle hızla yıkanır.



Şekil 1: İzole perfüze organ düzeneğinin şematik gösterimi.

Bir Langendorff düzeneğinde, perfüze edilen izole tavşan böbreğine perfüzyon pompası gerisinden histamin (HA) uygulaması yapıldığında gözlenen net cevap perfüzyon basıncının artması yönündedir (Şekil 2). Bu cevap H_1 ve H_2 reseptörlerinin ayrı yöndeki etkilerinin toplam sonucudur ve normal şartlar altında H_1 reseptörleri ile ortaya çıkan etki hakim olduğu için renal vasküler yatakta meydana gelen vazokonstriksiyon sonucu perfüzyon basıncında bir artış kaydedilir. Ortamda H_2 reseptör antagonistlerinin varlığı halinde HA uygulamasıyla elde edilen cevaplarda bir artış gözlenirken, perfüzyon basıncının önceden başka bir agonist ile yükseltip H_1 reseptör antagonistlerinin kullanılması durumunda ise H_2 reseptörlerinin etkisi belirginleşerek, HA uygulaması sonucu elde edilen net cevabı perfüzyon basıncında azalma yönünde değiştirir^[1,2].



Şekil 2: İzole perfüze tavşan böbreğine perfüzyon pompası gerisinden HA uygulaması sonucu oluşan basınç değişiklikleri.

HA' in, belli hücrelerde, hücre içi serbest kalsiyum konsantrasyonunu iki fazlı bir biçimde artırdığını bildiren çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmaların bulgularına göre; HA' in düşük dozlarında hücre içi kalsiyum seviyelerinde dalgalanmalarla seyreden bir değişiklik söz konusuyken, daha yüksek dozlarda, hücre içi kalsiyum depolarından kalsiyum salıverilmesiyle oluşan hızlı ve çabuk sönen bir "birinci faz" ve hücre

membranından hücre içine kalsiyum hareketi ile oluşan ve hücre içi depoların doluluk durumu ile kontrol edildiği düşünölen, daha uzun süreli bir “ikinci faz” olmak kaydıyla iki fazlı bir cevap oluşmaktadır [11,12,13]. Bu çalışmaların genelinde kullanılan yöntemler, ağırlıkla hücre içi kalsiyum miktarının tespit edilmesine yönelik protokollerden oluşmaktayken, muhtelif dokularda HA ile sağlanan bifazik cevapları doku fonksiyonu açısından (Ör. düz kas kasılması) hedef alan çalışmalar sayıca azdır [14,15]. Watkins ve Davidson 1980 yılında yayınladıkları makalelerinde, tavşan aort halkalarında HA ile sağlanan izometrik kasılma yanıtlarının iki fazlı bir deseni olduğunu, bu iki fazlı cevabın fazik kısmının oluşmasında hücre içi kalsiyum depolarından kalsiyum salıverilmesinin rol oynayabileceğini ve tonik kısmının ise hücre dışı kalsiyum depolarından eşzamanlı bir kalsiyum hareketinin sonucu olabileceğini bildirmişlerdir [4] ancak, mevcut literatürde izole perfüze tavşan böbreğinde HA ile elde edilen cevaplarda 1. ve 2. fazın varlığını gösteren ve bu cevapların oluş mekanizmasını açıklayan bir çalışma bulunmamaktadır.

2.2. Histamin

Kimyasal olarak β -imidazoletilamin olan HA, vücutta belirli hücrelerde, histidinin dekarboksillenmesi suretiyle sentezlenir. Bir doku hormonu olan HA' in vücutta bulunuşu açısından yerleştiği yapılar 3 gruba ayrılabilir;

I) Mast Hücreleri: HA mast hücrelerinde ve periferik dolaşımda yer alan bazofil lökositlerde HA-heparin protein kompleksi olarak bulunur.

II) Nöronal yapılar: Merkezi sinir sistemi sinirleri ve muhtemelen bazı periferik sinirlerde sentez edilen HA, bu sinirlerin uçlarında depolanır. Yarılanma ömrü

mast hücrelerindeki HA' e göre çok daha kısa olan nöronal HA, yine mast hücrelerindeki farklı olarak, rezerpine duyarlıdır (rezerpin uygulamasıyla boşaltılabilir). En fazla hipotalamusta bulunan nöronal HA, beyin homojenatlarında sinaptozom fraksiyonunda yer alır. Bunların dışında beyin kapillerlerinin endotel hücrelerinde de HA bulunduğu gösterilmiştir^[16].

III) Diğer yapılar: Mide mukozasında enterokromafin benzeri hücrelerde sentezlenip depolanan HA, parakrin etkiyle pariyetal hücrelerden hidroklorik asit salgılanmasını düzenler. İmmünolojik uyarılar ve bazı ilaçlar tarafından dokuya salıverilen HA-heparin protein kompleksi, *histamin-n-metil transferaz* (HMT) tarafından N-metilasyona uğratarak ve *diamin oksidaz* (DAO, histaminaz) tarafından oksidatif deaminasyon yoluyla yıkılırken, yaklaşık % 2-3' lük bir kısmı da değişmemiş HA ve metabolitleri olarak idrarla itrâh edilir^[16].

Düz kas, salgı bezleri, myokardium ve sinir hücrelerinde yaygın olarak bulunan HA reseptörlerinden, klasik anti-histaminik ilaçlarla (Ör. difenhidramin) bloke edilenler H₁ reseptörlerini teşkil ederler. 1972 yılında Black ve ark. tarafından bulunan burimamid ve sonrasında sentezlenen simetidin, ranitidin vb. ilaçlar ise, H₂ reseptör tipini bloke ederler. 1987 yılında Arang ve diğer bazı araştırmacılarca bulunan (R) α -metil-histamin ve imetit, yukarıda anılan reseptör tiplerinden daha başka bir üçüncü reseptör tipi olan H₃ reseptörlerini bloke eden ajanlardır. İşaretleme çalışmaları sayesinde dağılımları incelenebilen H₃ reseptörlerinin, beyindeki histaminerjik sinir uçlarının pre-sinaptik bölgesinde ve bunun dışında periferik adrenerjik ve kolinerjik sinir uçlarında yer aldığı gösterilmiştir. Genel olarak H₁ ve H₂ reseptörlerinin uyarımı damar düz kasında gevşemeye yol açarken, bazı damar yataklarında ise H₁ aktivasyonunun

vazokonstriksiyona ve H_2 reseptör aktivasyonunun da vazodilatasyona yol açtığı bilinmektedir [16]. Bökesoy ve ark. 1974 yılında yayınladıkları çalışmalarında, HA' in izole tavşan böbreğinde perfüzyon basıncını artırdığını ve bu etkisinde H_1 reseptörlerinin rol oynadığını, H_2 reseptörleri ile de perfüzyon basıncının azaldığını bildirmişlerdir [17]. H_1 reseptörlerinin HA ile uyarılmasının, hücre membranına komşu olan fosfolipidlerin hidrolizi yoluyla IP_3 ve DAG oluşumunu sağladığı, bu ikincil habercilerden IP_3 ' in endoplazmik retikulumdan salıverilen kalsiyum iyonu aracılığı ile kalsiyum kalmodülin bağımlı protein kinazları ve fosfolipaz A_2 ' yi aktive ettiği, DAG' ün ise yine kalsiyum iyonu ile beraber protein kinaz C' yi aktive ettiği düşünülmektedir[3].

2.3. Serbest Oksijen Radikalleri

Reaktif oksijen metabolitleri, memeli hücresinde moleküler oksijenin (O_2) univale indirgenmesiyle oluşur. Hücre membranına bağlı halde bulunan NADPH-oksidaz enzim sistemi, O_2 ' i süperoksit anyonuna (O_2^-) indirger. Oldukça kararsız bir molekül olan süperoksit anyonu derhal hidrojen peroksite (H_2O_2) dönüşür. Hem O_2^- hem de H_2O_2 , çok daha kuvvetli oksidanların oluşumuna ön-madde teşkil eden moleküllerdir. O_2^- , nitrik oksit (NO) ile etkileşime girerek reaktif nitrojen metabolitlerini, H_2O_2 ise hücre içi demir iyonu ile etkileşime girerek hidroksil radikallerini (OH^-) oluştururlar[18]. Bununla beraber, serbest oksijen radikallerinin vasküler tonusun regülasyonuna katkısı olduğu ve bazı düz kas preparatlarında kasılmaya neden olduğu da çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir[19,20]. Serbest oksijen radikallerine atfedilen bir diğer özellik de hücre içi kalsiyum seviyelerini arttırmalarıdır. Oksidatif stres indükleyicisi tert-bütill hidroperoksidin izole sıçan böbreğinde vazokonstriktör yanıtlara neden olduğu gözlenmiş ve bu yanıtlardan, ekstraselüler kalsiyumun hücre içine girişinin ve O_2^- anyonları da dahil olmak üzere

serbest radikallerin artışının sorumlu olabileceği ifade edilmiştir^[5]. Benzer şekilde Yang ve ark., H_2O_2 ' in izole sıçan aort halkalarında ve köpek serebral arterlerinde doz bağımlı olarak kasılmaya neden olduğunu ve bu kasıcı etkilerin endoteli sağlam dokularda daha az ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Katalaz ile inhibe edilebilen bu kasıcı yanıtlarda hücre içi kalsiyumun anlamlı olarak arttığı, dolayısıyla H_2O_2 yanıtlarının kalsiyum bağımlı olabileceği ileri sürülmüştür^[7,8]. H_2O_2 ' in hücre içi kalsiyum seviyeleri üzerine olan bu etkisini hücre içi depolardan kalsiyum salıverilmesini artırarak^[21,22] ya da hücre membranından hücre içine kalsiyum girişini fasilite ederek^[23] gerçekleştirdiğine dair yayınlar mevcuttur.

Sıçan izole böbrek korteks dokusundan elde edilen glomerül ve tübüllerde yapılan bir çalışmada^[24], ksantin - ksantin oksidaz sisteminin glomerülde cAMP miktarını anlamlı olarak artırdığı, bu etkinin allopurinol ile inhibe edildiği gözlenmiş, tübüllerdeki cAMP ile glomerüldeki cGMP miktarının ksantin-ksantin oksidaz sistemi ile değişmediği saptanmıştır. Glomerülde cGMP miktarı sodyum nitro purisiyat (SNP) ile, tübüllerdeki cAMP miktarı ise parathormon ile artmıştır. Glomerüllerde cAMP miktarında gözlenen artışın, reaktif oksijen metabolitlerinin oluşumundaki artışa bağlı olduğu gösterilmiş, ortama H_2O_2 ilavesinin de glomerüllerde cAMP miktarını konsantrasyon – bağımlı olarak artırdığı belirtilmiştir.

H_2O_2 'in mezengial hücrelerde bifazik membran voltaj yanıtları oluşturduğu, buna bağlı olarak gelişen inisyel hiperpolarizasyonun potasyum (K^+) kanallarını aktive ettiği, depolarizasyonun ise protein kinaz C ile regüle edilen klorür (Cl^-) kondüktansını artırarak etki gösterdiği bildirilmektedir^[25].

Serbest oksijen radikalleri ile ilgili bir diğer husus da hipoksi - reoksijenasyon (H-R) sonrasında serbest radikal miktarlarında meydana gelen artıştır^[26,27,28]. İzole sıçan kalbinde iskemi – reperfüzyon hasarından sonra oluşan toksik oksijen metabolitlerinin HA miktarında artışa neden olduğu, dolayısıyla serbest radikallerin HA sentezini artırdığı belirlenmiştir^[29].

2.4. Katalaz

Reaktif oksijen metabolitlerinin zararlı etkileri, vücutta enzimatik olan ve olmayan anti-oksidan sistemler tarafından ortadan kaldırılır. Bahsi geçen enzim sisteminin bir üyesi olan katalazın, H_2O_2 ' i suya parçaladığı bilinmektedir^[18]. Katalazın, bu etkisiyle, hücreyi koruma fonksiyonu dışında, H_2O_2 aracılı gelişen bazı olayları da değiştirebileceği düşünülebilir. İzole sıçan glomerül ve tubüllerinde yapılmış bir çalışmada, reaktif oksijen metabolitlerinin sebep olduğu hücre içi cAMP artışının, katalaz ile önlenemediği^[24], sıçan aort halkalarında H_2O_2 aracılı oluşturulan kasılma yanıtlarının da yine katalaz tarafından geri çevrildiği bildirilmektedir^[7]. İzole sıçan aort halkalarında yapılan bir başka çalışmada ise, anjiotensin II' nin oluşturduğu kasılma yanıtlarının katalaz ile inhibe edildiği gözlenmiş, anjiotensin II' nin bu dokuda H_2O_2 yapımını artırdığı, oluşan H_2O_2 ' in de anjiotensin II' nin kasıcı etkisine katkıda bulunduğu ifade edilmiştir^[6]. Böbrek mezengial hücre kültürü kullanılarak yapılan bir çalışmada, endotelin-I ile tetiklenen hücre içi serbest kalsiyum ($[Ca^{2+}]_i$) artışının yüksek glukoz barındıran ortamda inhibe olduğu, bu inhibisyonun da, katalaz ile geri çevrildiği bulunmuştur^[30]. Benzer şekilde, mor ötesi (UV) ışınlarla maruziyetin, mitokondriyal membranda elektron transferini bloke ettiğini ve non-spesifik membran geçirgenliğini kalsiyum lehine bozduğunu, katalazın ise bahsedilen kalsiyum sızıntısını önleyebildiğini gösteren bir çalışma, Chavez ve ark. tarafından yayınlanmıştır^[31].

2.5. Allopurinol

Allopurinol, Hitchings ve Elion tarafından ilk sentezlendiği yıllarda antineoplastik bir ajan olarak takdim edilmişken, sonraları aslında antimetabolit aktivitesinin olmadığı ancak ksantin oksidaz enziminin inhibitör bir substratı olduğu anlaşılmıştır. Allopurinol, merkaptopürinin, ksantin oksidaz tarafından inaktivasyonunu geciktirerek ürik asitin renal ekskresyonunu azaltır ve plazma seviyelerini düşürür. Bu özellikleriyle allopurinol, gut hastalığına bağlı primer hiperüriseminin ve hematolojik hastalıklar ve kemoterapötik ajan kullanımına bağlı gelişen sekonder hiperürisemilerin tedavisinde kullanım alanı bulmuştur^[32]. Bununla birlikte, serbest oksijen radikallerinin HA salıverilmesine yol açabildiği ve allopurinolün de dahil olduğu bir grup anti-oksidan maddenin ise, HA aracılı oluşan etkilerin bazılarını engelleyebildiğine dair yayınlar mevcuttur^[33,34,35]. Diğer yandan, Till ve ark., HA uygulamasının da, *in vivo* ve *in vitro* şartlarda ksantin oksidaz aktivitesini arttırdığını, bir başka çalışmalarında ise kobra yılanının zehiri ile sağlanan ksantin oksidaz aktivite artışının, kromalin ile engellenebildiğini açıklamışlardır^[36,37]. İskemi veya hipoksi sonrası doku reperfüzyonunun, oksijen radikallerinin miktarını arttırdığı bilinmektedir. Artan reaktif oksijen metabolitlerinin HA salıverici etkisini gösteren yayınlar da mevcuttur^[38]. Bununla beraber, bu metabolitlerin etkilerini direkt olarak HA salıverilmesiyle ilişkilendirmek çok uygun olmayabilir. Ercan ve ark., izole kobay akciğerinde HA ve anjiotensin II ile elde edilen vazokonstriktör yanıtların hipoksik şartlarda azaldığını, bu azalmanın da, allopurinol ve süperoksit dismutaz (SOD) varlığında geri çevrildiğini bildirmişlerdir^[39]. Konuyla ilgili bir başka çalışmada ise, allopurinolün, histamin salıverilmesini engelleyen dozlarda oksijenaz metaboliti eikozanoidlerin sentezine etki etmediği ancak damar içi

yolla uygulanması ve daha yüksek konsantrasyonlara erişmesi halinde prostaglandin₂/Tromboksan A₂ oranını, prostaglandin I₂ lehine artırdığı gösterilmiştir^[40]. Benzer şekilde, Korthuis ve ark., köpek grasilis kasında iskemi ile indüklenen damar geçirgenliği artışının, difenhidramin ve simetidin ile önlenemediğini ancak allopurinol, SOD ve katalaz ile geri çevrildiğini gözlemlemişlerdir^[41].

3. GEREÇLER ve YÖNTEM

3.1. Organın hazırlanması ve perfüzyon basınçlarının kaydedilmesi

Deneylerin tamamı Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Deneylerde, her iki cinsiyetten, 2.5 – 3 kg ağırlığında albino Yeni Zelanda ırkı tavşanlardan elde edilen böbrekler kullanılmıştır. Deneyin yapıldığı güne kadar hayvanların yem ve suya kısıtsız erişimi sağlanmış, deney günü İ.V. yoldan yapılan sodyum pentobarital (30 mg/kg) enjeksiyonuyla derin anesteziye sokulan tavşanların karın bölgesinde orta hatta yapılan bir kesi ile böbreklere ulaşılmış, çevre dokuların dikkatlice temizlenmesinden sonra 4/0 kalınlığındaki cerrahi ipek iplikle renal arterlerinden bağlanan böbrekler, içerisinde O₂ (%95) ve CO₂ (%5) karışımıyla önceden gazlandırılmış oda sıcaklığındaki Krebs-Henseleit çözeltisi bulunan petri kaplarına nakledilmiştir. Daha sonra, renal arterin bağlı olduğu kısmın hemen altından ucu küt bir makasla yapılan ufak bir kesiden, polietilen tüpler vasıtasıyla kanüle edilen böbrekler, perfüzyon sistemine taşınmıştır. Sisteme takılan böbreklerin başlangıç basınçları kaydedildikten sonra böbrek kapsülü sıyrılarak uzaklaştırılmış ve dengelenmeye bırakılmıştır. 37° C 'ye ısıtılan ve O₂ (%95) - CO₂ (%5) karışımıyla gazlandırılmış Krebs-Henseleit çözeltisi ile 6-8 ml/dk sabit akım hızında perfüze edilen böbreklerin perfüzyon basınçları, kanüle bağlı bir basınç algacı (Statham p23) kullanılarak Grass marka kayıt sisteminde (Model 7E, Quincy, Mass.,A.B.D.) kaydedilmiştir.

3.2. Deney protokolü

3.2.1. İzole perfüze böbrek preparatında histamin cevaplarının alınması

Dengelenme periyodu sonunda, 10, 20 ve 40 µg HA, böbreği sisteme bağlayan kauçuk kanülden bolus tarzında enjekte edilmiştir. Bu işlem yapılırken düzeneğin basıncını fazla yükseltmemek için, enjekte edilecek HA çözeltileri 10, 20 ve 40 µg HA 0.1 ml' de olacak şekilde ayrı tüplerde hazırlanmış ve her uygulamada sisteme toplam 0.1 ml sıvı enjekte edilmiştir. İki enjeksiyon arasında 15 dakikalık aralar olacak şekilde yapılan bu alıştırmaya işlemi sonrasında böbrekler 30 dakika daha dengelenmeye bırakılmış, bu süre sonunda yine 10, 20 ve 40 µg HA enjeksiyonları yapılarak kontrol yanıtları alınmıştır. Kontrol yanıtlarının alınmasından sonra etkisini araştırmak istediğimiz maddeler Krebs-Henseleit çözeltisine ilave edilerek uygun derişim sağlanmış, maddeli Krebs çözeltisi organa eriştikten sonra 15 dk beklenerek perfüzyon basıncının değişip değişmediği kontrol edilmiş, sonrasında da HA enjeksiyonları tekrarlanarak cevaplar kaydedilmiştir.

Bir seri deneyde ise izole perfüze organ düzeneğine takılan böbreklerde 10, 20, 40 ve bazı deneylerde ayrıca 60 µg HA cevapları tekrarlayan uygulamalarla alınarak zamana bağlı cevap değişimi gözlenmiştir.

3.2.2. Katalaz' ın HA cevaplarına etkisinin araştırılması

Perfüzyon sistemine takılan böbreklerde kontrol cevapları alındıktan sonra perfüzyon ortamına 80 UI/ml derişimde olacak şekilde katalaz ilave edilmiştir. Katalaz içeren perfüzyon sıvısı sistemi kat edip böbreklere ulaştıktan sonra perfüzyon basıncına direkt etkisinin olup olmadığını anlamak için 15 dk beklenerek HA uygulamaları yapılmıştır. Kontrol yanıtlarının her üç dozda elde edilen 1. ve 2. faz değeri ölçülerek 100 kabul edilmiştir. Katalaz ilavesi sonrası alınan HA yanıtlarında da 1. ve 2. faz değeri ölçülerek kontrol cevaplarına göre % değışimleri tespit edilmiş ve daha sonra bu % değışim değeri her doz ve her iki faz için ayrı ayrı olmak üzere kendi kontrol değeriyle karşılaştırılmıştır. Grafik gösterimde, alınan cevaplar % değışim olarak ifade edilmiştir.

3.2.3. Allopurinol' ün HA cevaplarına etkisinin araştırılması

Kontrol cevapları kaydedildikten sonra perfüzyon ortamına allopurinol ilave edilmiştir (10^{-6} M). Allopurinol varlığında tekrarlanan HA enjeksiyonları sonrasında 1. ve 2. faz cevaplar ölçülmüş ve kontrollere göre % değışimleri hesaplanarak her doz ve her iki faz için ayrı ayrı olmak üzere, kendi kontrol değeriyle karşılaştırılmıştır. Grafik gösterimde, alınan cevaplar % değışim olarak ifade edilmiştir.

3.2.4. Hidrojen peroksitin HA cevaplarına etkisinin araştırılması

HA' in 10, 20 ve 40 µg dozları ile kontrol cevapları kaydedildikten sonra perfüzyon ortamına H₂O₂ ilave edilmiştir (10⁻⁷ M). HA uygulaması mutat dozlarda tekrarlandıktan sonra perfüzyon ortamı H₂O₂ derişimi 10⁻⁶ molara yükseltilmiştir. Benzer şekilde HA uygulaması yapıldıktan sonra H₂O₂' in 10⁻⁷ ve 10⁻⁶ M konsantrasyonlarında alınan cevapların 1. ve 2. faz değerleri ölçülmüş ve kontrol değerlerine göre % değişimleri hesaplanarak her doz ve her iki faz için ayrı ayrı olmak kaydıyla, kendi kontrol değerleriyle karşılaştırılmıştır.

3.2.5. Verapamilin HA cevaplarına etkisinin araştırılması

HA' in 10, 20 ve 40 µg dozları ile kontrol cevapları kaydedildikten sonra perfüzyon ortamına 10⁻⁶ M konsantrasyonunda verapamil ilave edilmiştir. HA uygulaması mutat dozlarda tekrarlandıktan sonra alınan cevaplarda 1. ve 2. faz değerleri ölçülerek kontrollere göre % değişimleri tespit edilmiş, bu değerler her doz ve her iki faz için ayrı ayrı olmak üzere kendi kontrol değerleriyle karşılaştırılmıştır.

3.2.6. Nitrik oksitin HA cevaplarına üzerine etkisinin araştırılması

HA' e ait kontrol cevapları kaydedildikten sonra perfüzyon ortamına 10⁻⁴ M konsantrasyonda L-NAME ilave edilmiştir. HA uygulaması 10, 20 ve 40 µg dozlarda tekrarlandıktan sonra alınan cevaplarda 1. ve 2. faz değerleri ölçülerek kontrollere göre % değişimleri tespit edilmiş ve bu değerler her doz ve her iki faz için ayrı ayrı olmak üzere kendi kontrol değerleriyle karşılaştırılmıştır.

3.2.7. Kalsiyumsuz ortamın HA cevaplarına etkisinin araştırılması

Kalsiyumsuz ortamda yürütülen deneylerde organ perfüzyon sistemine takıldıktan sonra dengelenmeye bırakılmıştır. Bu sürenin ardından 40 ve 60 µg HA enjeksiyonuyla alıştırma yanıtları alındıktan sonra ikinci dengelenme periyoduna geçilmiştir. Bu periyot sonunda, sabit dozda (60 µg) HA uygulaması ile kontrol yanıtları kaydedilmiş, ardından kalsiyumsuz ortama geçilerek 20 dakikalık aralıklarla tekrarlanan dört tane HA enjeksiyonu (60 µg) yapılmıştır. Son cevabın alınmasından 20 dakika sonra ortama yeniden kalsiyum ilave edilerek aynı dozda yapılan beşinci bir HA enjeksiyonuyla deney protokolü tamamlanmıştır. Ortamdan kalsiyum çekilmeden önce 60 µg HA ile alınan cevaplar 100 kabul edilerek kalsiyumsuz ortamda alınan cevaplarda 1. ve 2. faz değerleri ölçülmüş ve kontrollere göre % değişimleri hesaplanmıştır. Hesaplanan % değişim değerleri kendi kontrolleriyle karşılaştırılmış ve grafik gösterimde sunulmuştur.

3.2.8. Yükseltilmiş perfüzyon basıncında H₁ reseptör blokajı ile elde edilen HA' e ait azalma yanıtlarına katalaz ve H₂O₂' in katkılarının incelenmesi

Perfüzyon sistemine takılan böbreklerde dengelenme periyodunu takiben HA' in 10, 20 ve 40 µg dozlarıyla alıştırma cevapları alındıktan sonra perfüzyon ortamına 10⁻⁵ M konsantrasyonda fenilefrin ilave edilmiştir. Fenilefrin içeren perfüzyon sıvısı böbreklere eriştikten sonra perfüzyon basıncı artışı takip edilmiş, artan perfüzyon basıncı bir plato değerine eriştikten hemen sonra bu defa ortama difenhidramin (10⁻⁵ M) eklenmiştir. Eklenen difenhidraminin perfüzyon basıncında değişiklik yapıp yapmadığı kontrol edildikten sonra 10, 20 ve 40 µg HA enjeksiyonuyla meydana gelen düşüşler kaydedilmiş ve bu değerler perfüzyon basıncındaki % azalma cinsinden hesaplanarak

kontrol değerleri olarak kabul edilmiştir. Sonrasında maddesiz perfüzyon sıvısına geçilerek, perfüzyon basıncının taban seviyesine inmesi beklenmiş ve basınç başlangıç değerine erişince tekrar fenilefrin ve arkasından difenhidramin uygulaması yapılmıştır. Bu ajanların ilavesinden sonra ortama katalaz (80UI/ml) ve ayrı bir seride de sırasıyla 10^{-7} ve 10^{-6} M konsantrasyonlarda H_2O_2 eklenerek HA uygulamaları tekrarlanmış, alınan cevapların perfüzyon basıncında oluşturduğu azalmalar % olarak hesaplanarak kontrollerle karşılaştırılmış ve grafik gösterimde perfüzyon basıncı değişimi olarak sunulmuştur.

3.2.9. Hipoksi-reoksijenasyon işleminin HA cevapları üzerine olan etkisinin incelenmesi

Hazırlanıp izole perfüze organ düzeneğine takılan böbreklerde kontrol cevaplarının sonra, önceden N_2 (%95) - CO_2 (%5) karışımıyla ile gazlandırılmış perfüzyon çözeltisine geçilmiş ve organa ulaştığı andan itibaren 30 dakika boyunca böbrekler hipoksik perfüzyon sıvısı ile yıkanmıştır. Bu işlemin arkasından tekrar normoksik perfüzyon çözeltisine geçilerek böbreklerin bu çözelti ile temasından 15 dakika sonra HA dozları tekrarlanmıştır. Alınan cevaplarda 1. ve 2. faz değerleri ölçülerek kontrol değerlerine göre % değişimleri hesaplanmış, elde edilen değişim değerleri her doz ve her iki faz için ayrı ayrı olmak kaydıyla kontrollerle karşılaştırılmıştır. Sonuçlar grafik sunumda % değişim olarak ifade edilmiştir.

3.3. Kimyasallar

Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler; Histamin hidroklorür (SIGMA), Katalaz (SIGMA), Allopurinol (SIGMA), L-N-(G)-nitro-arjinin metil ester (L-NAME, SIGMA), H₂O₂ (Merck), Verapamil hidroklorür (SIGMA), Fenilefrin hidroklorür (SIGMA) ve Difenhidramin hidroklorür (SIGMA)' dır. Krebs-Henseleit çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan maddeler ise şunlardır; (mM): NaCl: 112, NaHCO₃: 25, KCl: 5, MgCl₂: 0,5, CaCl₂: 2,5, NaH₂PO₄: 1 ve dekstroz: 11,5. Kalsiyumsuz Krebs-Henseleit çözeltisini hazırlanmasında ise yukarıdaki maddeler kullanılmış ancak CaCl₂ katılmamıştır.

Kullanılan kimyasallardan HA, verapamil, H₂O₂, L-NAME, fenilefrin ve difenhidramin, distile suda çözülerek hazırlanmıştır. Allopurinol çözeltisi hazırlamak için 100 ml distile su 50°C' ye ısıtılarak 10⁻² M konsantrasyonda olacak şekilde allopurinol ilave edilmiş ve 20 dakika boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmıştır. Katalaz ise deneyler sırasında perfüzyon sıvısında çözülerek kullanılmıştır.

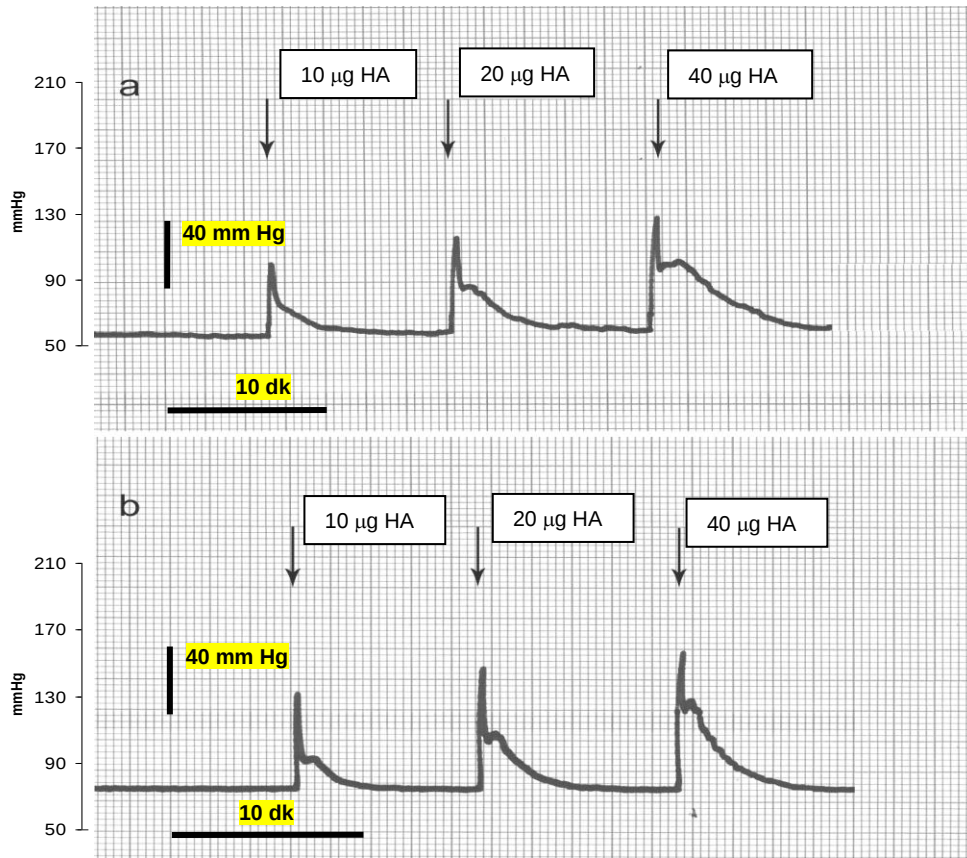
3.4. İstatistik analizler

Deney serileri sonunda elde edilen değerler, her bir deneyin kontrol cevapları 100 kabul edilerek, % değişim cinsinden hesaplanmıştır. Serilerin her birinde elde edilen kontrol değerleri ortalaması 100 olmak kaydıyla, uygulamalar sonrasında elde edilen (n) sayıda % değişim değerinin ortalamaları, $\pm$ standart hataları ile birlikte sunulmuştur. Gruplar arası farkı belirlemek için eşleştirmeli *Wilcoxon signed rank* testi uygulanmış, P değeri < 0.05 olduğu takdirde gruplar farklı kabul edilmiştir.

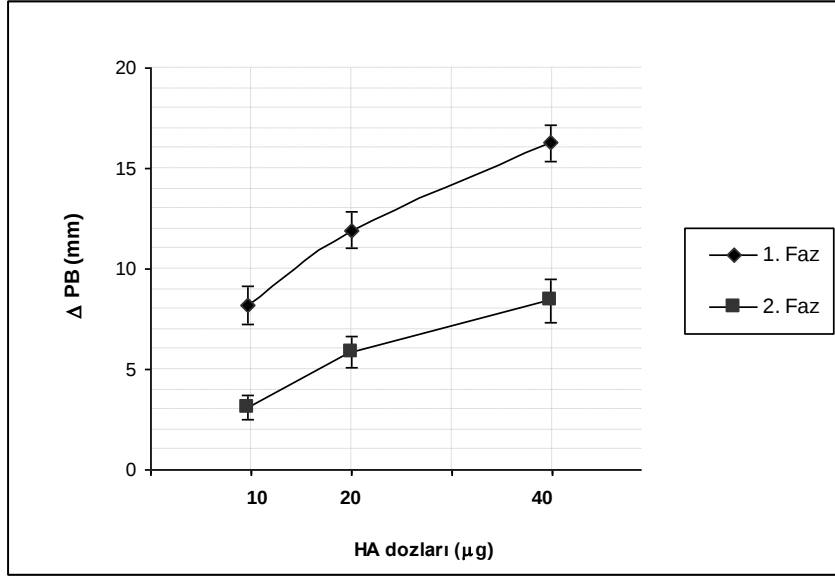
4. BULGULAR

4.1. Histamine bağılı bifazik cevaplar

İzole tavşan böbrek damar yatağında HA, doza-bağımlı olarak perfüzyon basıncını artırmıştır. HA uygulamasının perfüzyon pompasının gerisinden veya organı sisteme bağlayan kauçuk kanülden yapılması, alınan HA cevaplarının şeklinde değişiklikler oluşturmuştur. Şekil 3. a ve b' de görüldüğü üzere, HA, organı sisteme bağlayan kanülden uygulandığında; hızlı ortaya çıkan ve kısa süren bir başlangıç fazı ve onu takip eden, gecikmiş ancak daha uzun süren bir 2. faz olmak üzere, bifazik yanıtlar elde edilmiştir (Şekil 3.a ve 3.b).



Şekil 3: İzole perfüze tavşan böbreğinde HA uygulamasının organı düzeneğe bağlayan kanülden yapılması durumunda ortaya çıkan bifazik HA cevapları (a ve b).



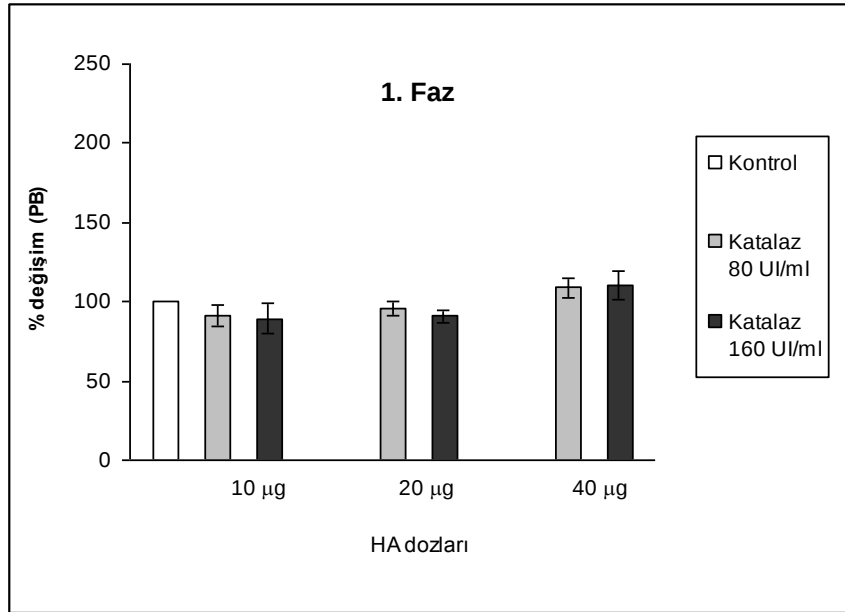
Şekil 4: 10, 20 ve 40 μg HA dozlarıyla kaydedilen 1. ve 2. faz cevapların perfüzyon basıncı değişikliği cinsinden gösterimi ($n=30$; Δ :değişim, **PB**:Perfüzyon basıncı).

Deneylerde kullanılan böbreklerin deney başlangıcında kaydedilen perfüzyon basınçları 70 ± 10 mmHg ($n=72$) olarak tespit edilmiştir. Zamana bağlı olarak perfüzyon basıncında meydana gelebilecek değişiklikleri saptamak amacıyla yapılan deneylerde, ilk 2 saatlik zaman dilimi sonunda perfüzyon basınçlarının başlangıç değerlerine göre yaklaşık % 5 oranında azaldığı ancak 4 saatlik uygulamalar sonunda ise % 5-10 oranında arttığı gözlenmiştir. Deneyler sırasında perfüzyon basıncı artma eğiliminde olan ve 2 saat sonunda, perfüzyon basınçları başlangıç değerinin yaklaşık % 30' u kadar artmış olan böbrekler hesaplamalarda kullanılmamıştır.

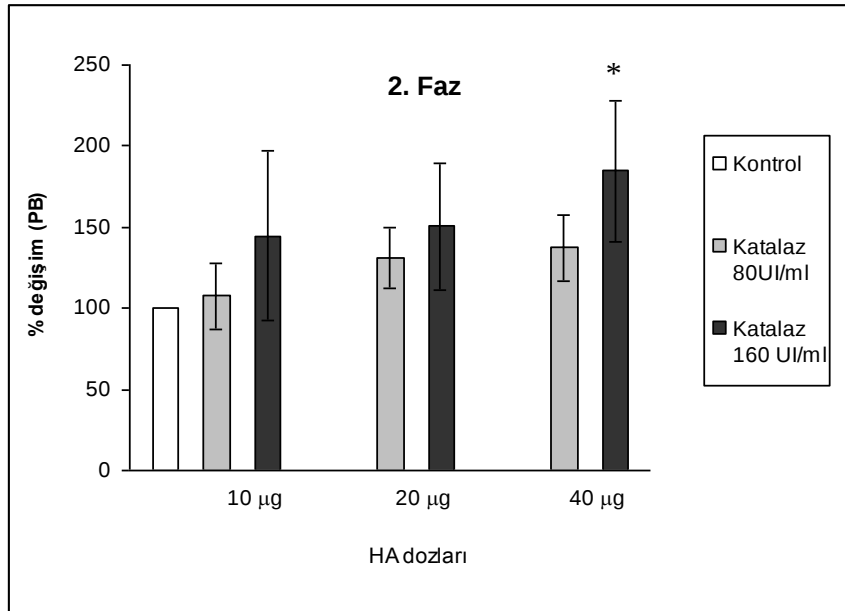
HA etkisi ile oluşan perfüzyon basıncı artışıında H₁ ve H₂ reseptörlerinin katkısının değerlendirildiği ön çalışmalarda; simetidin (10⁻⁶ M) varlığında HA cevaplarının 1. ve 2. fazları yaklaşık % 20 oranında artarken, perfüzyon ortamına 10⁻⁶ M difenhidramin ilave edilmesi bu cevapları yaklaşık % 50 oranında azaltmıştır. Ortamdaki difenhidramin konsantrasyonu 10⁻⁴ M olduğunda ise cevaplar tama yakın bloke olmuştur.

4.2. Katalaz' ın HA yanıtlarına etkisi

Katalazın, 80 UI/ml konsantrasyonundaki varlığında^[42,43] 1. faz cevaplarda bir fark gözlenmezken, 2. faz cevapların her üç HA dozunda da kontrolle göre daha yüksek olduğu, ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir. Benzer şekilde katalazın 160 UI/ml konsantrasyonunda yapılan deneylerde de 2. faz cevaplarda HA dozuna paralel bir artış gözlenmiş ancak yalnızca 40 µg HA ile alınan cevaplarda kontrollere göre istatistik olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir (şekil 5 ve şekil 6).



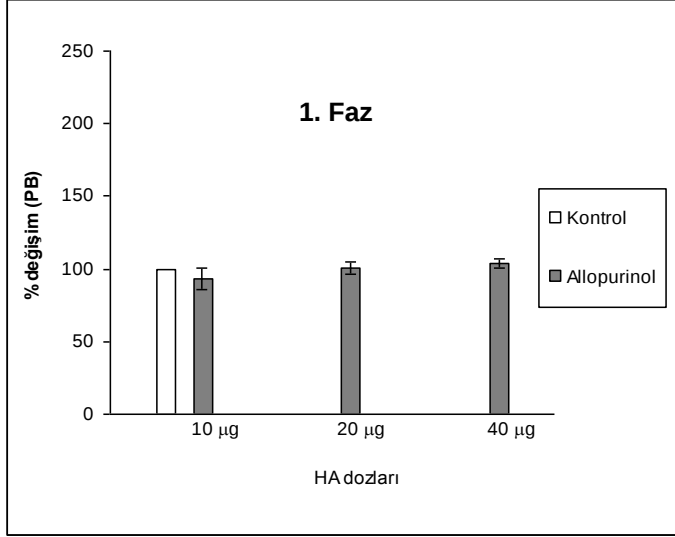
Şekil 5: Perfüzyon ortamına katalaz (80 ve 160 UI/ml) ilavesinden sonra 10, 20 ve 40 µg HA ile alınan 1. faz cevapların kontrol yanıtlarına göre % değişimi $\pm$ SEM ($n=6$; PB:Perfüzyon basıncı).



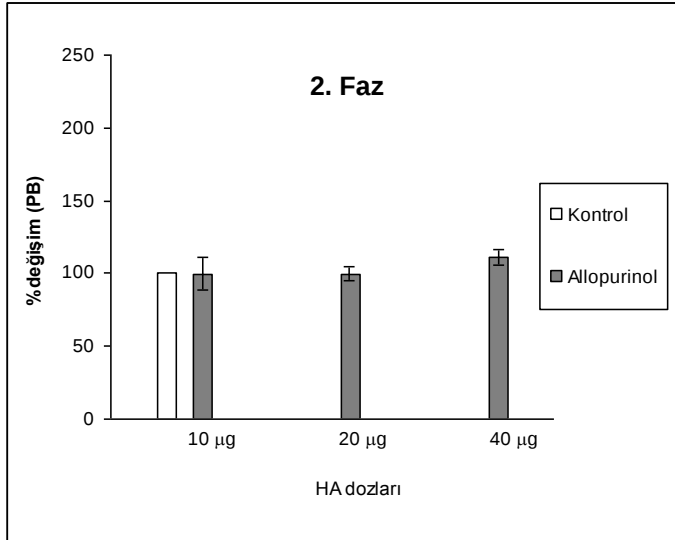
Şekil 6: Perfüzyon ortamına katalaz (80 ve 160 UI/ml) ilavesinden sonra 10, 20 ve 40 µg HA ile alınan 2. faz cevapların kontrol yanıtlarına göre % değişimi $\pm$ SEM ($n=6$; PB:Perfüzyon basıncı, *: $P<0,05$).

4.3. Allopurinol' ün HA yanıtlarına etkisi

Allopurinol' ün 10^{-6} molar varlığında^[44,45] alınan HA cevapları kontrolleriyle karşılaştırıldığında; 1. ve 2. faz cevaplarda anlamlı bir fark belirlenememiştir (Şekil 7 ve Şekil 8).



Şekil 7: Perfüzyon ortamına allopurinol (10^{-6} M) ilavesinden sonra 10, 20 ve 40 µg HA ile alınan 1. faz cevapların kontrol yanıtlarına göre % değişimi $\pm$ SEM ($n=9$; **PB**:Perfüzyon basıncı).



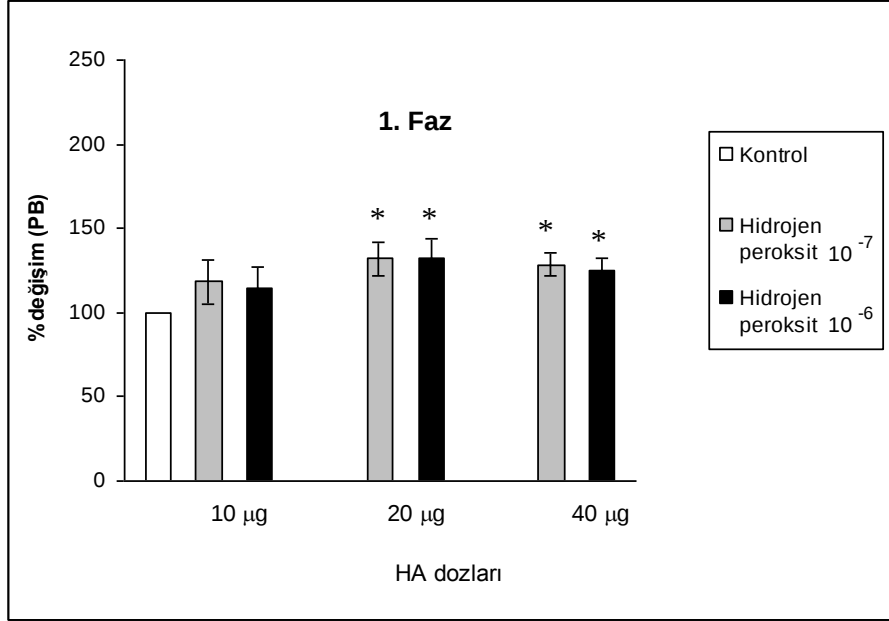
Şekil 8: Perfüzyon ortamına allopurinol (10^{-6} M) ilavesinden sonra 10, 20 ve 40 µg HA ile alınan 2. faz cevapların kontrol yanıtlarına göre % değişimi $\pm$ SEM ($n=9$; **PB**:Perfüzyon basıncı).

4.4. Hidrojen peroksitin HA cevaplarına etkisi

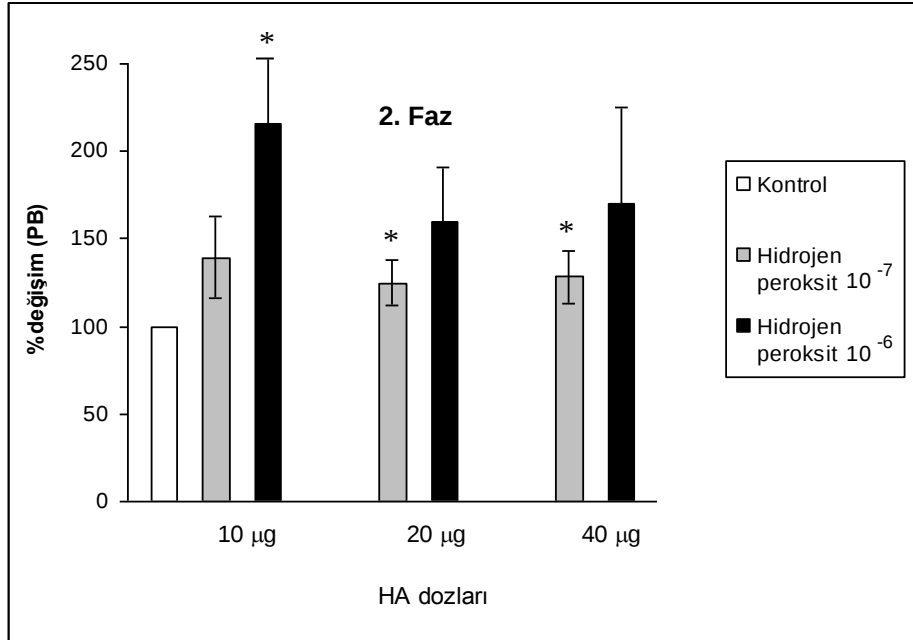
Perfüzyon ortamına 10^{-7} ve 10^{-6} M H_2O_2 ilavesi, HA ile elde edilen cevapların 1. ve 2. fazlarını artırmıştır (Şekil 9). 10^{-7} M H_2O_2 varlığında 10 μ g HA ile elde edilen cevapların 1. fazında % 20 oranında bir artış gözlenmiş ancak bu etki istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır. 20 ve 40 μ g HA ile elde edilen 1. faz yanıtları ise H_2O_2 'in 10^{-7} ve 10^{-6} M varlığında anlamlı olarak artmıştır ($P < 0.05$). 10^{-7} M H_2O_2 , HA ile sağlanan perfüzyon basıncı artışlarının 2. fazlarını bütün HA dozlarında artırmakla beraber sadece 20 ve 40 μ g HA ile elde edilen cevaplardaki artış anlamlı bulunmuştur ($P < 0.05$). 10^{-6} M H_2O_2 varlığında 2. faz cevapları her üç HA dozunda da artmışken, sadece 10 μ g HA ile elde edilen cevaplarda kontrollere göre istatistik olarak farklılık gözlenmiştir (Şekil 10 ve Şekil 11, $P < 0.05$).



Şekil 9: H_2O_2 'in iki farklı konsantrasyonunda, HA cevapları üzerine olan artırıcı etkisi.



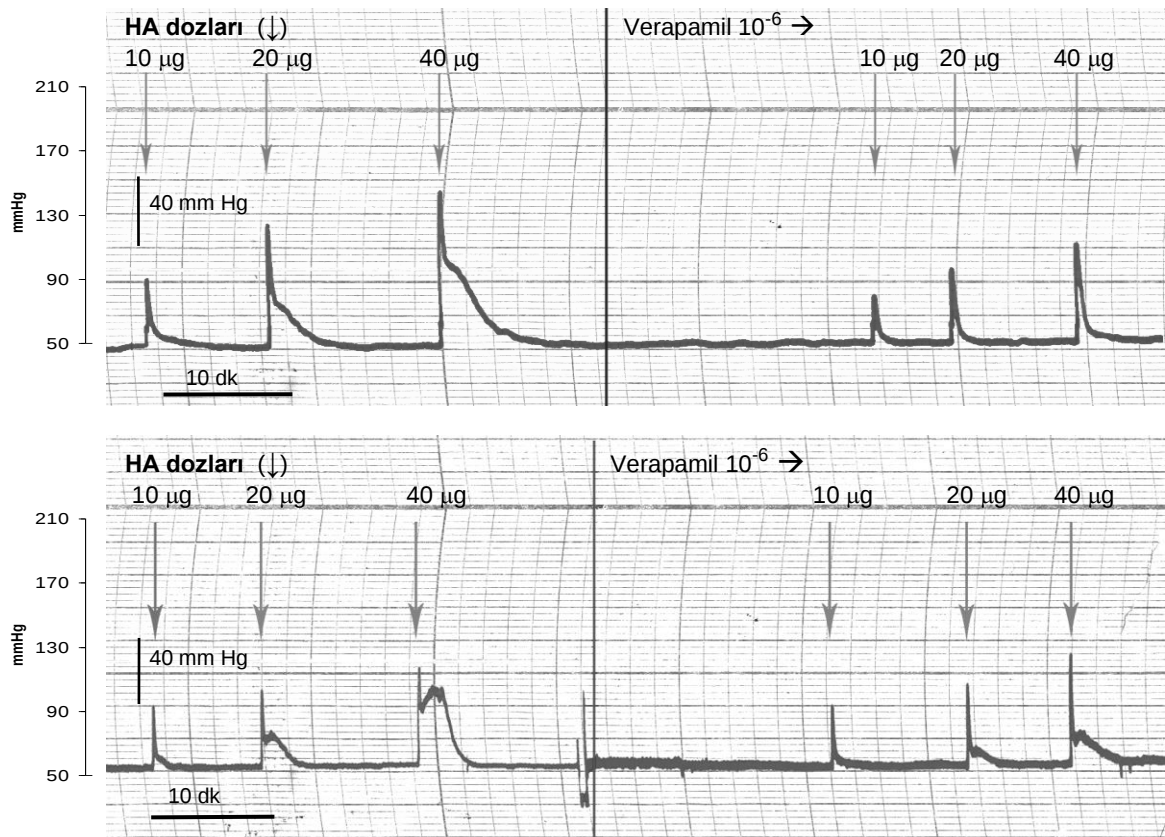
Şekil 10: Perfüzyon ortamına H₂O₂ (10⁻⁷ ve 10⁻⁶ M) ilavesinden sonra 10, 20 ve 40 µg HA ile alınan 1. faz cevapların kontrol yanıtlarına göre % değişimi ±SEM (n=10; PB:Perfüzyon basıncı, *: P<0,05).



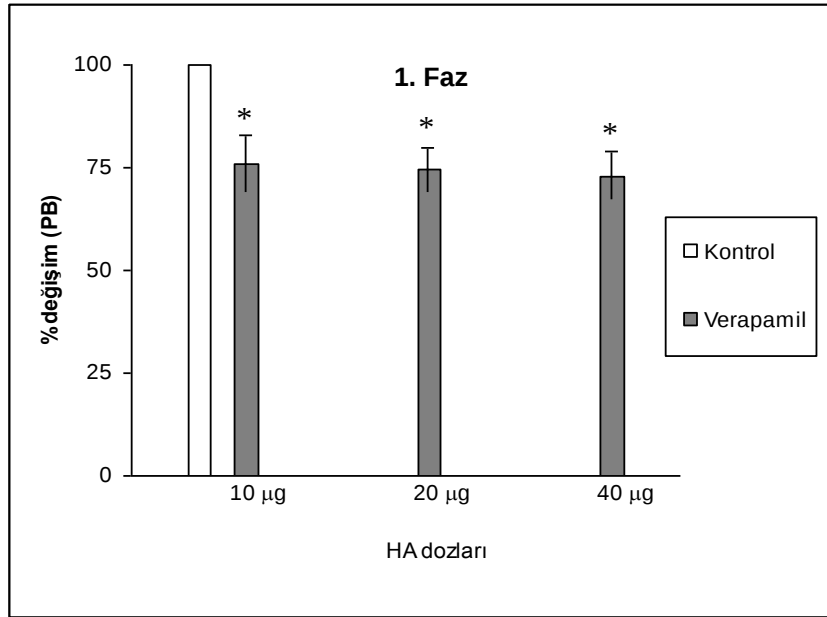
Şekil 11: Perfüzyon ortamına H₂O₂ (10⁻⁷ ve 10⁻⁶ M) ilavesinden sonra 10, 20 ve 40 µg HA ile alınan 2. faz cevapların kontrol yanıtlarına göre % değişimi ±SEM (n=10; PB:Perfüzyon basıncı, *: P<0,05).

4.5. L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanal blokörü verapamilin HA cevapları üzerine olan etkisi

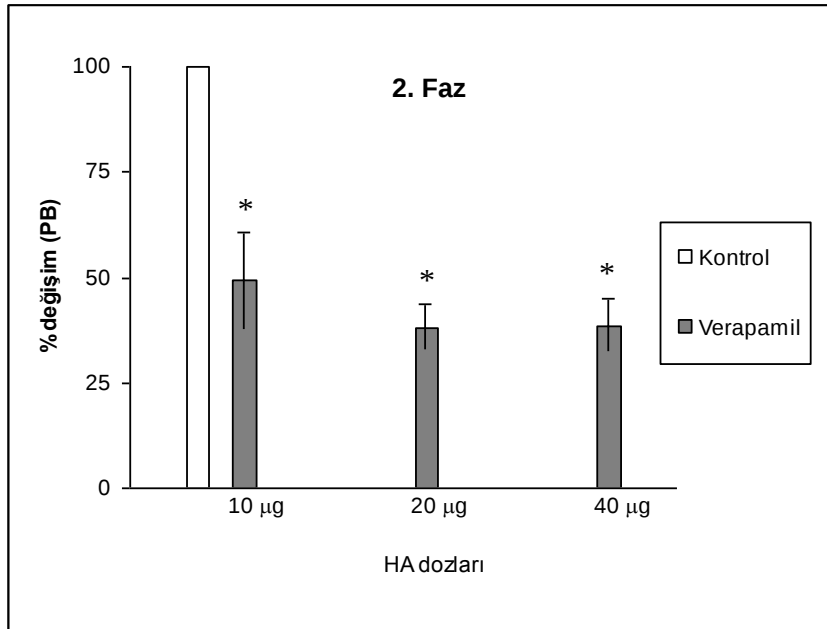
Perfüzyon sıvısında 10^{-6} molar konsantrasyonda bulunan verapamil, 10, 20 ve 40 μg HA ile elde edilen 1. ve 2. faz cevapları azaltmıştır (Şekil 12). Kontrol değerleriyle karşılaştırıldığında 1. faz cevaplarında yaklaşık % 25, 2. faz cevaplarında ise yaklaşık % 60' lık bir azalma kaydedilmiş (Şekil 13 ve Şekil 14), her iki cevap fazında da gözlenen bu fark, istatistik olarak anlamlı bulunmuştur.



Şekil 12: Verapamilin 10^{-6} molar konsantrasyonda özellikle 2. faz olmak üzere, HA cevaplarını azaltıcı etkisi.



Şekil 13: Perfüzyon ortamına verapamil (10^{-6} M) ilavesinden sonra 10, 20 ve 40 µg HA ile alınan 1. faz cevapların kontrol yanıtlarına göre % değişimi $\pm$ SEM ($n=10$; PB:Perfüzyon basıncı, *: $P<0,05$).



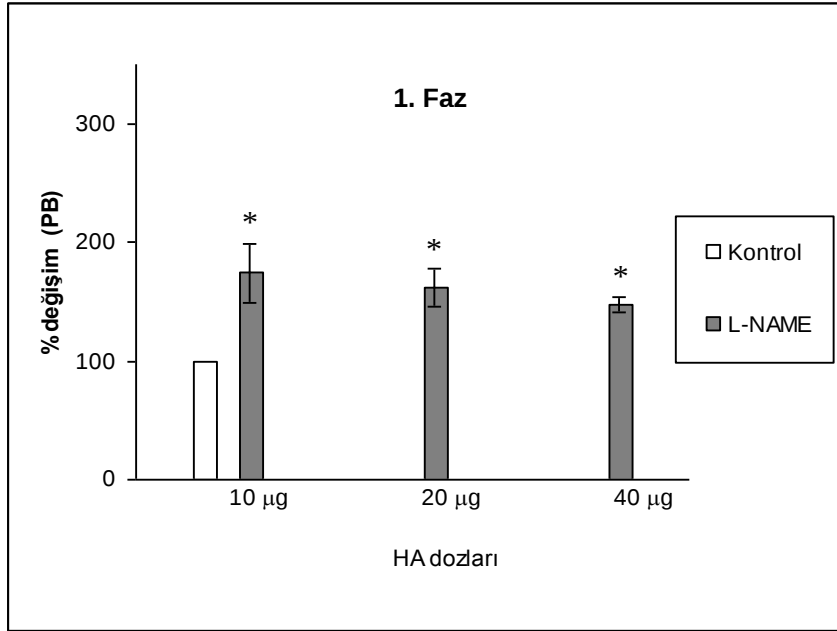
Şekil 14: Perfüzyon ortamına verapamil (10^{-6} M) ilavesinden sonra 10, 20 ve 40 µg HA ile alınan 2. faz cevapların kontrol yanıtlarına göre % değişimi $\pm$ SEM ($n=10$; PB:Perfüzyon basıncı *: $P<0,05$).

4.6. Nitrik oksit sentez inhibitörü L- NAME' in HA cevaplarına etkisi

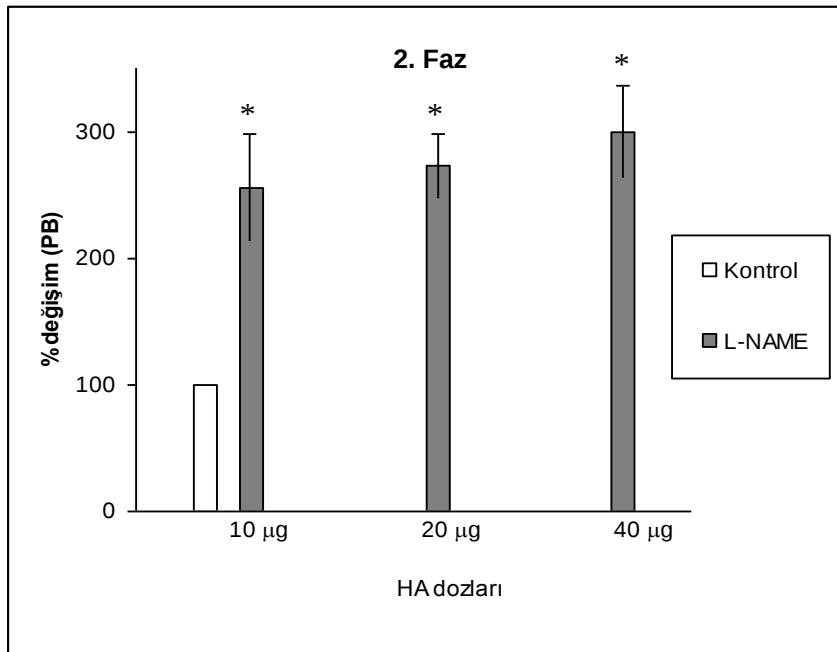
L-NAME, NO sentezini tamamen bloke etmesi için gerekli olan 10^{-4} molar konsantrasyonda perfüzyon ortamına ilave edilmiştir. L-NAME' in bu konsantrasyondaki varlığı, bazal perfüzyon basıncını değiştirmeden 1. ve 2. faz cevapları her üç HA dozunda da artırmıştır (Şekil 15). L-NAME varlığında alınan HA cevapları % değişim yönünden kontrollerle karşılaştırıldığında her 3 dozda ve her iki cevap fazında gözlenen artış istatistik olarak anlamlı bulunmuş, L-NAME' in sağladığı bu artış özellikle 2. faz cevaplarda %100' ün üzerinde gözlenmiştir (Şekil 16 ve Şekil 17).



Şekil 15: Nitrik oksit sentez inhibitörü L-NAME' in (10^{-4} M), 1. ve 2. faz HA cevapları üzerine olan arttırıcı etkisi.



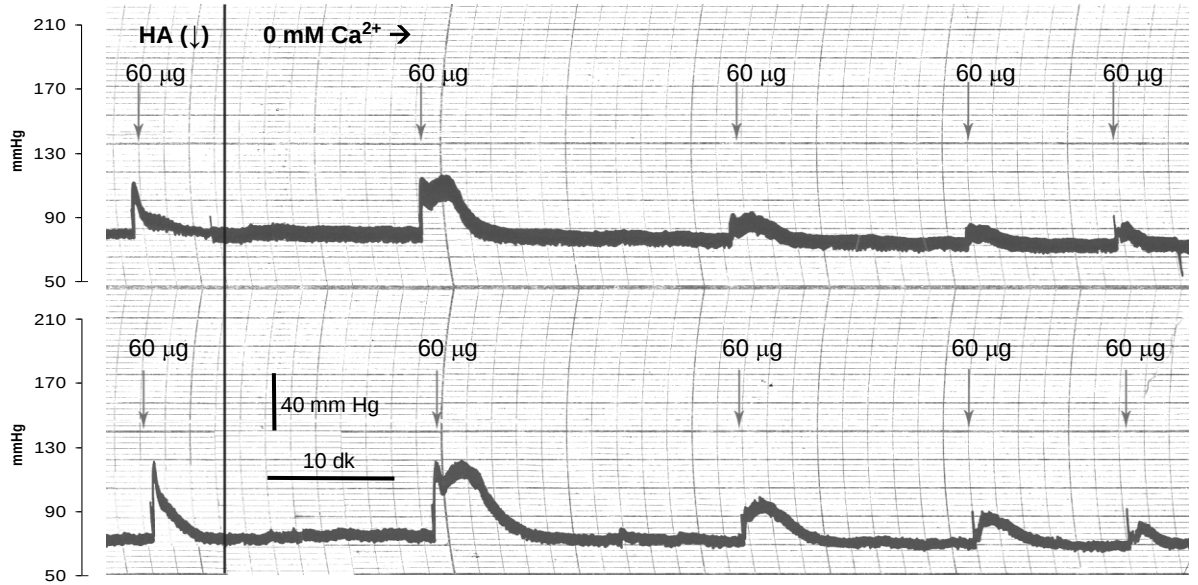
Şekil 16: Perfüzyon ortamına L-NAME (10^{-4} M) ilavesinden sonra 10, 20 ve 40 µg HA ile alınan 1. faz cevapların kontrol yanıtlarına göre % değişimi $\pm$ SEM ($n=10$; **PB**:Perfüzyon basıncı, *: $P<0,05$).



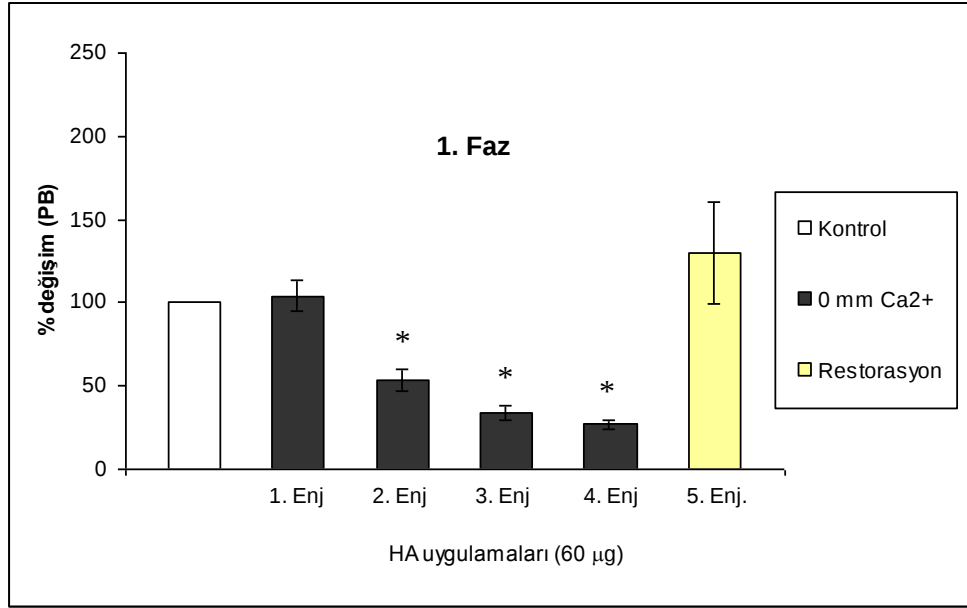
Şekil 17: Perfüzyon ortamına L-NAME (10^{-4} M) ilavesinden sonra 10, 20 ve 40 µg HA ile alınan 2. faz cevapların kontrol yanıtlarına göre % değişimi $\pm$ SEM ($n=10$; **PB**:Perfüzyon basıncı, *: $P<0,05$).

4.7. Kalsiyumsuz ortamın HA cevaplarına etkisi

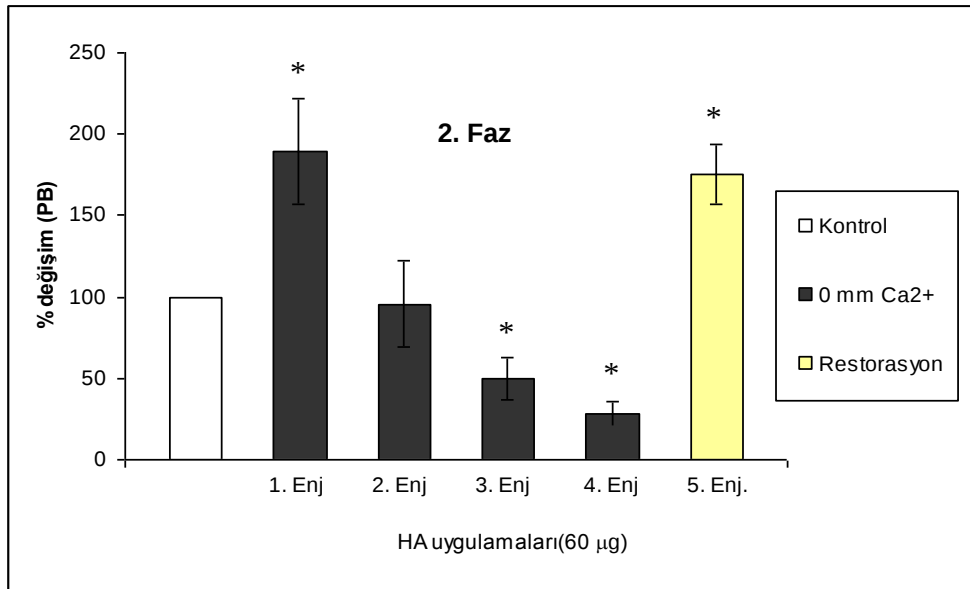
Böbrekler normal Krebs çözeltisinden kalsiyumsuz çözeltiye geçirildikten sonra sabit dozda yapılan (60 µg) HA uygulamalarında, birinci ve ikinci faz cevaplar tedricen azalmıştır. Kontrol değerlerine göre % değişim yönünden 1. faz cevaplar, 2. faz cevaplara göre daha hızlı bir azalma göstermiştir. Kalsiyumsuz ortama geçildikten sonra yapılan ilk HA enjeksiyonlarında alınan 2. faz cevaplar, kontrol değerlerine göre yaklaşık iki kat ve istatistik olarak anlamlı bir artış göstermiş (Şekil 18), aynı durum 1. faz cevaplarda da gözlenmekle beraber bu artış kontrol değerinin % 5' inin altında kalmıştır. Kalsiyumsuz ortamda alınan dört HA cevabından sonra tekrar normal Krebs çözeltisine geçildiğinde yapılan ilk HA enjeksiyonu ile hem 1. hem de 2. faz cevaplarda kontrol değerlerine göre sırasıyla yaklaşık % 10 ve % 60 oranında daha yüksek değerler elde edilmiştir (Şekil 19 ve Şekil 20). 2. faz cevaba ait olan restorasyon değerleri kontrollere göre istatistik olarak farklı bulunmuştur.



Şekil 18: Kalsiyumlu ve kalsiyumsuz ortamda alınan 60 µg HA cevapları.



Şekil 19: Perfüzyon ortamından kalsiyumun çekilmesinden sonra 60 µg HA ile alınan dört ardışık cevap ve tekrar kalsiyum ilavesinden sonra alınan restorasyon cevaplarında 1. fazın kontrol yanıtlarına göre % değişimi $\pm$ SEM ($n=10$; **PB**:Perfüzyon basıncı, *: $P<0,05$).



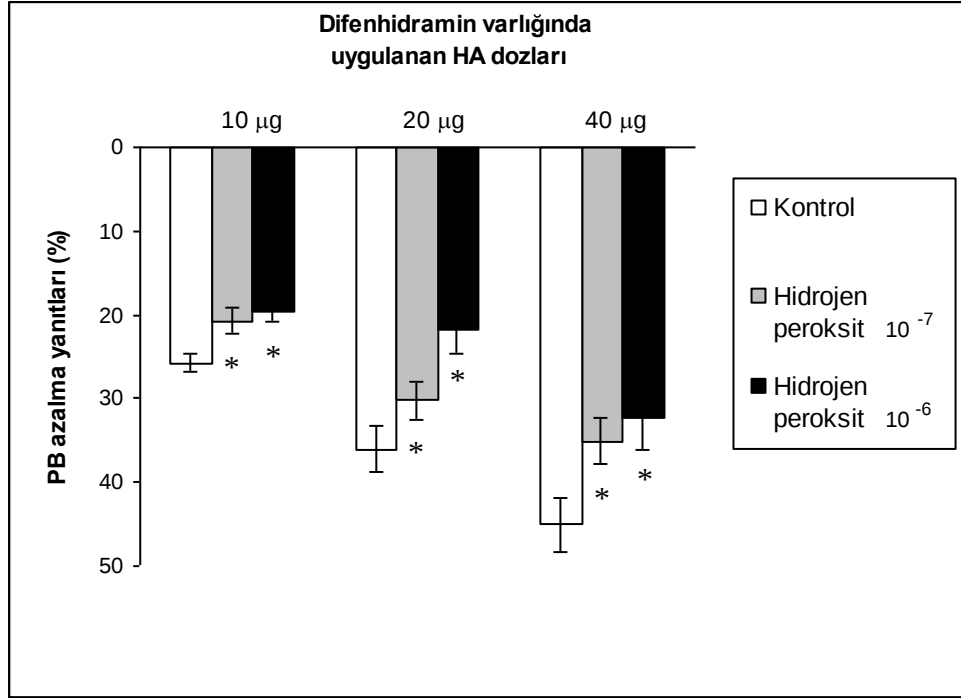
Şekil 20: Perfüzyon ortamından kalsiyumun çekilmesinden sonra 60 µg HA ile alınan dört ardışık cevap ve tekrar kalsiyum ilavesinden sonra alınan restorasyon cevaplarında 2. fazın kontrol yanıtlarına göre % değişimi $\pm$ SEM ($n=10$; **PB**:Perfüzyon basıncı, *: $P<0,05$).

4.8. Yükseltilmiş perfüzyon basıncında H_1 reseptör blokajı ile elde edilen HA' e ait perfüzyon basıncı azalma yanıtlarına H_2O_2 ' in katkısı

Ortama 10^{-5} molar fenilefrin katılmasıyla perfüzyon basınçları yükseltilen ve 10^{-5} molar difenhidramin ile H_1 reseptör blokajı sağlanan böbreklerde, 10, 20 ve 40 μ g HA uygulamaları ile perfüzyon basıncında H_2 reseptör aracılı azalmalar kaydedilmiştir. Bu uygulamalar da organı perfüzyon sistemine bağlayan kauçuk kanülden yapılmakla birlikte, elde edilen cevaplar daha çok monofazik görünümde ortaya çıkmıştır (Şekil 21). Ortama 10^{-7} ve 10^{-6} molar konsantrasyonda H_2O_2 katılmasıyla, HA' in perfüzyon basıncını düşüren yanıtlarında bir azalma görülmüş, kontrollerle karşılaştırıldığında meydana gelen azalmalar her iki H_2O_2 konsantrasyonunda da istatistik olarak anlamlı farklılık göstermiştir. (Şekil 22).



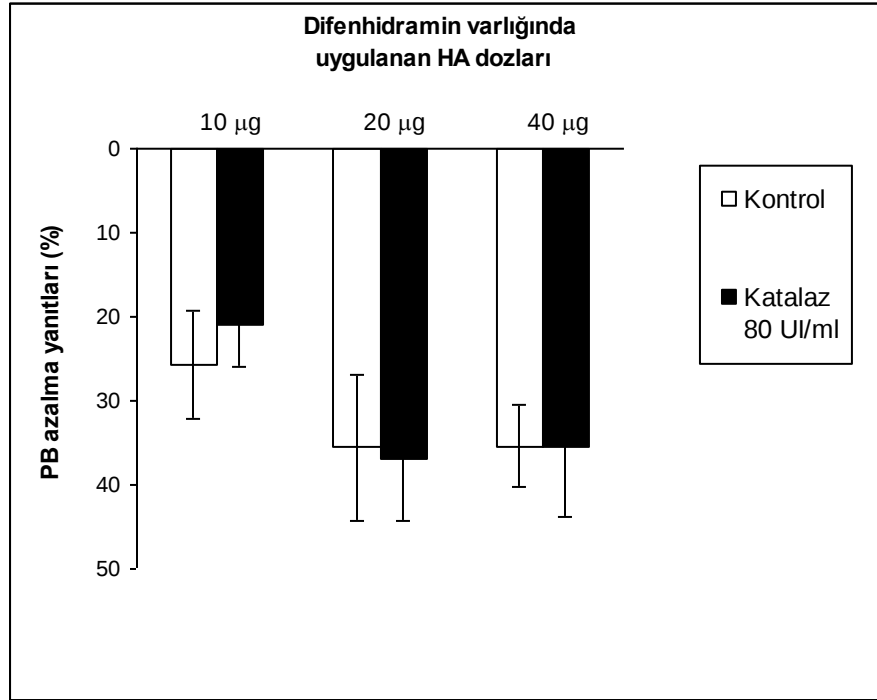
Şekil 21: Fenilefrin (10^{-5} M) ile perfüzyon basıncı yükseltilen ve difenhidramin (10^{-5} M) ile H_1 reseptör blokajı sağlanan böbreklerde HA ile elde edilen PB azalma yanıtları ve H_2O_2 ' in 10^{-6} molar konsantrasyonda bu cevaplara olan azaltıcı etkisi.



Şekil 22: Fenilefrin (10^{-5} M) ile perfüzyon basıncı yükseltile ve difenhidramin (10^{-5} M) ile H_1 reseptör blokajı sağlanan böbreklerde; 10^{-7} ve 10^{-6} molar konsantrasyonda H_2O_2 varlığında HA ile elde edilen PB azalma yanıtlarının kontrollere göre değişimi $\pm$ SEM ($n=6$; **PB**:Perfüzyon basıncı, *: $P<0,05$).

4.9. Yükseltilmiş perfüzyon basıncında H₁ reseptör blokajı ile elde edilen HA' e ait PB azalma yanıtlarına katalaz' ın katkısı

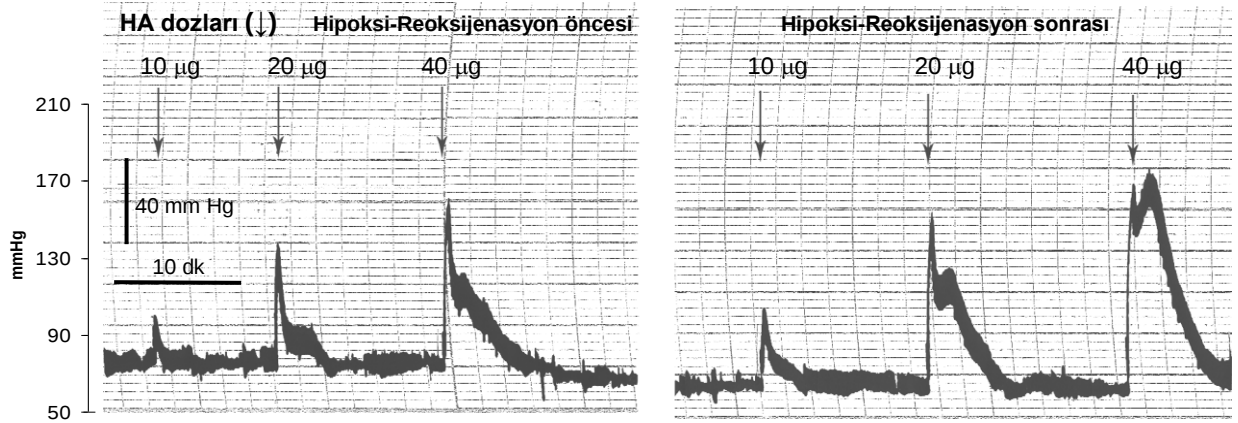
Benzer şekilde, aynı deney protokolünde katalazın 80 UI/ml'lik konsantrasyonu denendiğinde, 10 µg ile alınan HA cevaplarında bir azalma gözlenmekle beraber elde edilen cevapların hiç birinde kontrollere göre anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir (Şekil 23).



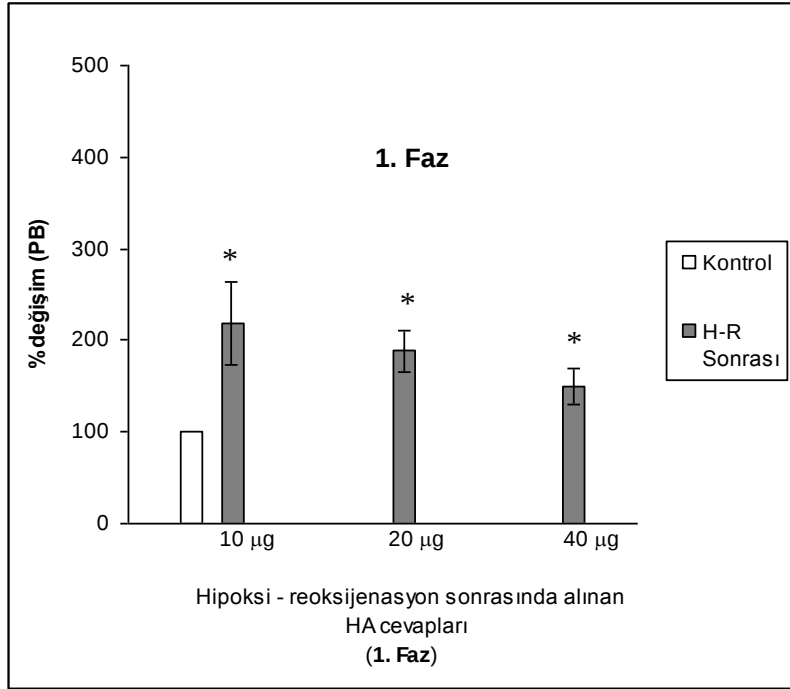
Şekil 23: Fenilefrin (10^{-5} M) ile perfüzyon basıncı yükseltilen ve difenhidramin (10^{-5} M) ile H₁ reseptör blokajı sağlanan böbreklerde; 80 UI/ml konsantrasyonda katalaz varlığında HA ile elde edilen PB azalma yanıtlarının kontrollere göre değişimi $\pm$ SEM ($n=5$; PB:Perfüzyon basıncı).

4.10. Hipoksi-reoksijenasyon işleminin HA cevapları üzerine olan etkisi

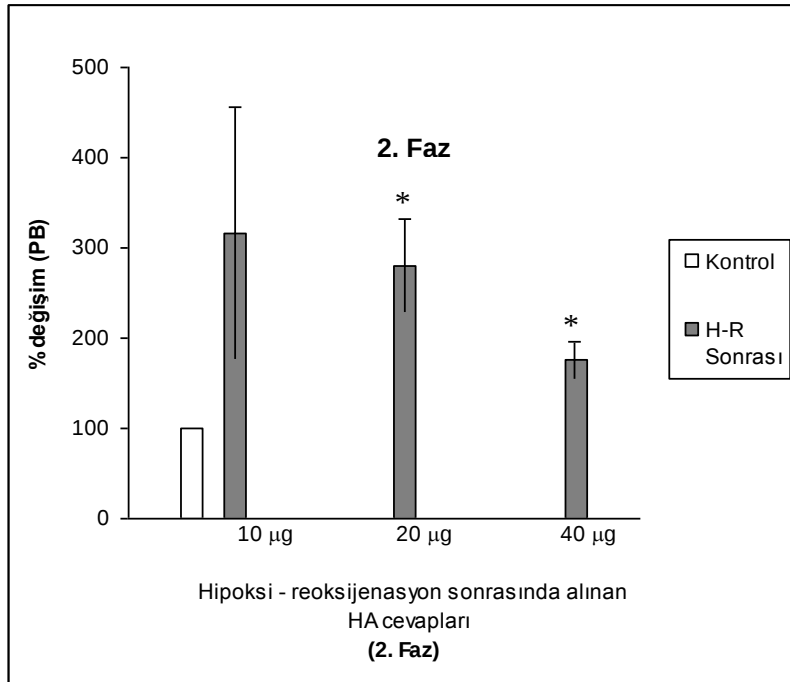
Hipoksi-reoksijenasyon (H-R) işlemi öncesinde ve sonrasında 10, 20 ve 40 µg HA uygulamaları ile alınan cevaplar karşılaştırıldığında, H-R işlemi sonrasında 1. ve 2. faz cevaplarda bir artış kaydedilmiştir (Şekil 24). HA cevaplarında ortaya çıkan bu artışlar, özellikle 2. faz cevaplarda, iki kata varan anlamlı değerlere ulaşmıştır (Şekil 25 ve Şekil 26).



Şekil 24: Hipoksi-reoksijenasyon öncesi ve sonrası alınan HA cevapları.



Şekil 25: Hipoksi – reoksijenasyon işlemi sonrası 10, 20 ve 40 µg HA ile alınan 1. faz cevapların kontrollere göre % değişimi $\pm$ SEM ($n=6$; **PB**:Perfüzyon basıncı, *: $P<0,05$).



Şekil 26: Hipoksi – reoksijenasyon işlemi sonrası 10, 20 ve 40 µg HA ile alınan 2. faz cevapların kontrolle göre % değişimi $\pm$ SEM ($n=6$; **PB**:Perfüzyon basıncı, *: $P<0,05$).

5. TARTIŞMA

İzole perfüze tavşan böbreği preparatı üzerinde ölçülen perfüzyon basıncı değişiklikleri organın vasküler yatağının bütünsel bir fonksiyonudur ve çeşitli agonist veya antagonistlere karşı böbrek hemodinamiğinde oluşan cevapları gözlemleyebilmek için kullanışlı veriler sağlamaktadır^[46,47]. Daha önce yapılan çalışmalarda izole böbrek perfüzyon sisteminde HA uygulaması ile bifazik cevaplar alınabildiği bildirilmemiştir. Bu çalışmada HA uygulaması perfüzyon pompasının gerisinden yapıldığı zaman elde edilen cevaplar monofazik bir görünümde ortaya çıkarken, ilaç uygulaması organı sisteme bağlayan kanülden yapıldığında cevap deseni bifazik şekle dönüşmüştür. Bu uygulama şekli ile maddenin pompa gerisinden verildiği uygulama şekli arasında bazı farkları vardır. Öncelikle ilaç uygulaması organı sisteme bağlayan kanülden yapıldığı zaman verilen ilacın organla teması çok daha çabuk gerçekleşmekte ve geriden gelen maddesiz perfüzyon çözeltisiyle hızla yıkanarak uzaklaştırılmaktadır. Oysa pompa gerisinden yapılan uygulamalarda, uygulanan madde – pompa ile organ arasında kalan boru sisteminin uzunluğu, perfüzyon hızı ve bu alanda bulunan çözelti hacmine de bağlı olmak kaydıyla – organa erişmesinden itibaren yaklaşık 20-30 dakika daha ortamda varlığını ve dolayısıyla organla olan temasını sürdürmektedir. İkinci olarak ilk uygulama şeklinde verilen ilaç, yoğunluğu fazla değişmeden organa ulaşırken, pompa gerisinden yapılan uygulamada yukarıda bahsedilen aralıkta yer alan sıvı hacminde seyrelerek organa erişmektedir. Jung ve ark.^[13], agonist uygulama süresinin, indüklenen cevapların deseninde farklılıklar meydana getirebileceğini ve monofazik, bifazik veya salınımlar şeklinde cevaplar oluşturabileceğini ifade etmişlerdir. Bu anlamda HA uygulamasının kanülden yapılması, bu süreyi kısaltarak elde edilen cevapların şeklinin değişmesine yol açmış olabilir.

HA' in izole perfüze tavşan böbreğinde oluşturduğu etkilerle ilgili mevcut literatürde, bu agonistin böbrek vasküler yatağında meydana getirdiği değişikliklere yönelik önerilen temel olgu, H₁ reseptörleri aracılığıyla meydana gelen vazokonstriksiyon ve H₂ reseptörleri üzerinden ortaya çıkan vazodilatasyonun net sonucunun damarsal dinamiği belirlediği yönündedir. Nitekim, H₂ reseptör antagonistlerinin (ör. simetidin) perfüzyon ortamına katılması alınan HA cevaplarında bir artışa yol açarken^[17,2], Perfüzyon basıncının yükseltilip H₁ reseptör antagonistlerinin (ör. difenhidramin) kullanıldığı durumlarda ise H₂ reseptörlerinin etkisi belirginleşerek net cevabı perfüzyon basıncında azalma yönünde değiştirmektedir.

HA' in H₁ reseptörleri üzerinden meydana getirdiği etkilerden sorumlu olan ikincil mediatör, IP₃' tır. Bu molekül aracılığı ile gelişen olaylar zincirinin önemli bir halkasını teşkil eden kalsiyum ise bu anlamda H₁ reseptör aktivasyonu ile meydana gelen değişikliklerin temel aracısı sayılabilir^[48]. HA' in uyarılabilir olmayan hücre tiplerinde (parotid asiner hücreler, adrenal kromafin hücreleri vb.) hücre içi kalsiyum miktarını iki fazlı bir şekilde arttırdığı çeşitli çalışmalarda bildirilmektedir. Putney ve ark. tarafından yürütülen bir çok çalışmada, HA uygulamasının önce hücre içi kalsiyum depolarından IP₃ aracılı kalsiyum salıverilmesine neden olarak hücre içi kalsiyum miktarını arttırdığı, bu artışın kısa süreli bir artış olduğu, hücre içi depoların boşalmasının sonucu olarak hücre dışından hücre içine bir kalsiyum hareketinin başladığı ve bu hareketin de hücre içi kalsiyum miktarında gözlenen ikinci artış fazını meydana getirdiği bildirilmektedir. “Kapasitatif kalsiyum girişi” olarak tanımlanan bu olayla ilgili olarak hücre içi depoların doluluk durumunun, hücre dışı kaynaktan hücre içine kalsiyum hareketini kontrol ettiği, bu depolar kalsiyum yüklenmeden de hücre membranındaki giriş kanalının kapanmadığı öne sürülmektedir^[11,12,49]. Bu çalışmada, kalsiyumun perfüzyon ortamından çekilmesi sonucunda, 1. ve 2. faz cevaplar tekrarlayan HA uygulamaları sonucunda giderek

azalmış ve dört enjeksiyon sonrasında taban seviyelerine yakın değerlere ulaşmıştır. Alınan cevapların kontrollerine göre % değişimi yönünden incelendiğinde, 1. faz cevapların 2. faz cevaplara göre daha çabuk söndüğü gözlenmiştir. Bu durum izole perfüze tavşan böbrek preparatında HA ile elde edilen cevapların oluşumunda kalsiyumun gerekli olduğunu göstermekle beraber yukarıda bahsedilen mekanizmayla uyuşmamaktadır. Kalsiyumsuz ortamda 1. faz cevapların daha hızlı ortadan kalkması bu cevapların kaynağının hücre dışı kalsiyum olduğunu düşündürmüştür. Buna ek olarak kalsiyumsuz ortama geçildikten sonra yapılan ilk HA uygulamasının 2. faz cevaplarda iki katlık bir artışa sebep olması da bu cevap tipinin kaynağının hücre dışı kalsiyumdan bağımsız olması gerektiğini telkin etmektedir. Machen ve Negulescu' nun çalışmalarında^[50], hücre içi depolardan salıverilen kalsiyumun tamamen hücreden ihraç edilmeden agonist uyarımının ortadan kalkması durumunda, sitozoldeki serbest kalsiyumun tekrar depolara çekilebileceği ifade edilmektedir. Jung ve ark. ise ^[13], agonist uygulamasının süresinin, HA ile indüklenen cevapları monofazik, bifazik veya salınımlar şeklinde değiştirebileceğini ifade etmişlerdir. Bu çalışmada HA' in uygulanış şekli, agonist ile organın temasının kısa süreli olmasına imkan sağlamaktadır. Bu haliyle, HA dokudan yeterince hızlı uzaklaştığı takdirde hücre içine salıverilen kalsiyumun bir kısmı tekrar depolara çekilebileceği için kalsiyumsuz ortamda 2. faz cevapların nispeten daha uzun ömürlü olmasının sebebi, bu geri alım mekanizması olabilir.

Kalsiyumsuz ortamda yapılan ilk HA uygulamasında elde edilen cevapların özellikle 2. fazında görülen artışla ilgili olası bir açıklama, hücrede kalsiyum-kalmodülin-bağımlı endotelial NOS (eNOS) tarafından gerçekleştirilen NO sentezinin, hücre dışından giren kalsiyuma gerek duyuyor olması^[51,52] olabilir. Nitrik oksidin, hücre içine kalsiyum girişi ve hücre içi depolardan kalsiyum salıverilmesi üzerine inhibitör bir etkisi olduğuna dair yayınlar mevcuttur^[53,54,55,56]. Bu bilgiler ışığında; kalsiyumsuz perfüzyon ortamında hücre dışından hücre içine kalsiyum girişinin olmaması, NO

sentezini sekteye uğratmış ve dolayısıyla nitrik oksidin kalsiyum saliverilmesi üzerindeki inhibitör etkisinin ortadan kalkmasına ve HA ile alınan ilk cevapların 2. fazında görülen ani artışın ortaya çıkmasına sebep olmuş olabilir. Aynı şekilde nitrik oksidin hücre içine kalsiyum girişini engelleyen etkisi de ortadan kalkmış olmakla beraber perfüzyon ortamında kalsiyumun olmaması, bu artışın neden sadece 2. faz cevaplarda görüldüğü sorusuna cevap getirebilir. Öte yandan, kalsiyumun yerine konmasını takiben yapılan ilk HA uygulamasında (5. enjeksiyon) alınan cevapların kontrol değerlerine göre artmış olması da, NO' in yetersiz miktarları ile ilişkilendirilebilir.

Bu çalışmada 10^{-4} molar konsantrasyonda uygulanan NO sentez inhibitörü L-NAME, her üç HA dozunda 1. faz cevaplarda % 100, 2. faz cevaplarda ise % 150' nin üzerinde bir artış sağlamıştır. Bu artışlar, L-NAME' in böbrek damar yatağında bazal NO sentezi ve vazodilatasyonu ortadan kaldırması ile açıklanabilir. Ancak L-NAME' in dokuya ulaşmasından sonra tek başına bazal perfüzyon basıncını yükseltmemesine rağmen HA uygulaması ile indüklenen cevapları potansiyelize etmiş olması, HA reseptörleri aracılığı ile gelişen olaylar zincirinde NO' in rol oynadığını göstermektedir. Bu durumda HA cevaplarındaki artış NO' in, hücre içi kalsiyum depolarından kalsiyum saliverilmesi ve/veya hücre dışından hücre içine kalsiyum girişi üzerindeki inhibitör etkisinin ortadan kalkmasıyla bağlantılı olabilir.

Son yıllarda elde edilen veriler, muhtelif dokularda reseptörle aktive olan, kalsiyuma ve bazı diğer divalent katyonlara geçirgen, non-selektif katyon kanallarının varlığına işaret etmektedirler. TRPC (Canonical Transient Receptor Potential Channels) adı verilen bu yeni sınıf katyon kanallarının IP_3 veya DAG ile aktive edilmesinin hücre içine bir kalsiyum akımı başlattığı^[57] ifade edilmektedir. Trebak ve ark., çeşitli agonistlerle yaptıkları çalışmalar sonucunda, hücre içi depolardan kalsiyum saliverilmesini sağlayacak

düzeyde IP_3 sentezlenmesine yetmeyecek miktarda düşük agonist dozlarının, TRPC kanallarını harekete geçirdiğini göstermişlerdir ^[58]. Facemire ve ark. ise, sıçanlardan izole edilmiş böbrek arteriol ve glomerüllerinde, TRPC' ye ait mRNA ve proteinlerin varlığını bildirmişlerdir^[59]. Bu çalışmada, L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanal blokörü verapamil, 10^{-6} molar konsantrasyonda ortamda bulunduğunda, HA ile elde edilen cevapların 1. ve 2. fazlarında sırasıyla, yaklaşık % 25 ve % 60' lık bir azalma oluşturmuştur. Mevcut literatürde, hücre dışından hücre içine HA ile indüklenen kalsiyum girişinin, voltaj bağımlı kalsiyum kanallarından farklı bir kanal tipi üzerinden meydana geldiği (Receptor Activated Calcium Channels, RACC) ve voltaj bağımlı kalsiyum kanal blokörlerinin bu kanal tipine etki etmediği^[60,61,62,63] ifade edilmekle birlikte Zhu ve ark.^[64] insan embriyonik böbrek hücrelerinde (HEK-293), karbakolle indüklenen ve *trp3* kanalları üzerinden meydana gelen kalsiyum hareketinin verapamil ile engellendiğini göstermişlerdir. Bu bilgi esas alındığında, bizim çalışmamızda verapamilin 1. faz cevaplarda oluşturduğu azalma, bahsedilen -varsa- reseptör tiplerinin inhibisyonu ile ortaya çıkmış olabilir. Schöfl ve ark.^[65], hamster pankreatik β hücrelerinde tapsigargin ile indüklenen hücre içi kalsiyum artışının verapamil ile % 50 azaldığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde Ohmasa ve Saito^[66] muskarin ile sağlanan hücre içi kalsiyum artışının, ekstraselüler kalsiyum varlığında ve yokluğunda verapamil tarafından engellendiğini açıklamışlardır. Bu çalışmada, verapamil (10^{-6} M) ile 2. faz cevaplarda % 60 civarında bir azalma kaydedilmiştir. Verapamilin HA cevaplarına olan bu etkisi kalsiyumsuz ortamda yapılan ön çalışmalarımızda da ortaya çıkmıştır. Bu durumda, bahsedilen etkinin verapamilin hücre içi kalsiyum depoları üzerine olan direkt etkisinden kaynaklandığı düşünülebilir.

Perfüzyon ortamına H_2O_2 ' in 10^{-7} ve 10^{-6} molar konsantrasyonlarda katılması 1. ve 2. faz cevapları arttırmıştır. 1.faz cevaplar 10^{-7} ve 10^{-6} molar H_2O_2 konsantrasyonlarında yakın oranlarda artmışken (yaklaşık % 30), 2. faz cevaplar, 10^{-7} molar H_2O_2 konsantrasyonunda yaklaşık % 30, 10^{-6} molar H_2O_2 konsantrasyonunda ise yaklaşık % 60 oranında anlamlı artış göstermiştir. Bu bulgular, H_2O_2 ' in hücre içi kalsiyum seviyelerini artırdığı ve bu yolla veya bundan bağımsız şekilde, düz kaslarda kasılma yanıtları oluşturduğu bilgisiyle uyumludur. Benzer şekilde fenilefrin ile perfüzyon basıncı artırılmış böbreklerde difenhidramin ile sağlanan H_1 reseptör blokajından sonra HA uygulamasıyla elde edilen H_2 reseptör aracılı perfüzyon basıncı azalma yanıtları da, H_2O_2 ' in 10^{-7} ve 10^{-6} molar konsantrasyonlarında anlamlı olarak azalmıştır. Mevcut bulgular ışığında, H_2O_2 ' in böbrek damar yatağında HA ile elde vazomotor yanıtlara katkı sağladığını söylemek mümkündür. H_2O_2 ' in bu katkısını hücre içi kalsiyum seviyelerinde meydana getirdiği artışla yapması oldukça muhtemeldir. Bahsedilen artışın kaynağı hücre içi kalsiyum depolarından kalsiyum saliverilmesi veya hücre dışından hücre içine bir kalsiyum hareketi olabilir^[22,23]. Nam ve ark., H_2O_2 ' in hücre içine difüze olabildiğini ve hücre içi depolardan kalsiyum saliverilmesini indüklediğini göstermişlerdir^[21]. Bu bilgi esas alındığında, H_2O_2 ile HA yanıtlarında sağlanan artışın 2. faz cevaplarda daha fazla ortaya çıkması, bu cevapların kaynağının hücre içi kalsiyum olduğuna dair görüşümüzü destekler mahiyettedir. Diğer yandan, reaktif oksijen metabolitlerinin dokularda HA sentezini-saliverilmesini artırdığı da yine mevcut yayınlarda bildirilmektedir^[38]. Dolayısıyla HA' e ait cevaplarda H_2O_2 ' in meydana getirdiği artışların ortaya çıkmasında bu faktör de rol oynayabilir. Ne var ki, H_2O_2 ' in perfüzyon ortamına 10^{-7} ve 10^{-6} molar konsantrasyonda ilavesinden sonra maddeli Krebs çözeltisinin organa ulaşmasını takiben bazal perfüzyon basıncında bir artış kaydedilmemiştir. Bu durum göz önüne alındığında H_2O_2 uygulamasının HA ile alınan cevapları fasilite ettiği söylenebilir.

Bu yaklaşımla ilgili olarak, H_2O_2 ' i parçalayan katalazın 80 UI/ml konsantrasyonda minimal, 160 UI/ml konsantrasyonda ise -istatistik olarak her dozda anlamlı olmamakla beraber- biraz daha belirgin olmak üzere HA cevaplarını artırmış olması bir çelişki doğurmaktadır. Shah,^[24] izole sıçan glomerül ve tubüllerinde yapılmış bir çalışmada, reaktif oksijen metabolitlerinin sebep olduğu hücre içi cAMP artışının, katalaz ile önlenemediğini bildirmektedir. Bu çalışmada da, HA uygulaması sonucu H_2 reseptörleri aracılığıyla tetiklenen cAMP artışı, katalaz varlığında azalmış, dolayısıyla H_2 reseptör etkinliğini zayıflatarak HA uygulaması ile alınan yanıtların artmasına sebep olmuş olabilir. Konuyla ilgili olarak öne sürülebilecek bir başka görüş de katalazın fizyolojik ve patolojik durumlarda etkisinin farklı şekillerde ortaya çıkabileceğidir. Örneğin reaktif oksijen metabolitlerinin miktarını artıracak patolojik koşullar altında, katalazın HA ile alınan cevapları nasıl etkilediğinin araştırılması konuya yeni açılımlar sağlayabilir.

Mevcut literatürde, serbest oksijen radikallerini artırdığı bilinen hipoksi-reoksijenasyon sürecinin dokularda HA salıverilmesine yol açtığına dair çalışmalar yer almaktayken^[38,67,68], bu işlemin HA ile elde edilen yanıtlara olan etkisini gösteren bir yayın bulunamamıştır. Bu çalışmada, H-R sonrası HA ile alınan cevapların hem 1. ve hem de 2. fazlarında kontrollere göre sırasıyla, ortalama % 100 ve % 200 oranlarında anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Uygulanan H-R işleminin bazal perfüzyon basıncını hemen hiç değiştirmedeği göz önüne alındığında, bu artışların, doku HA miktarlarında oluşabilecek artmalardan daha ziyade HA cevaplarının fasilitasyonu ile ilgili olduğu söylenebilir. Bu çalışmanın temel hedefi hipoksi-reoksijenasyon hasarının HA cevapları üzerine olan etkisinin incelenmesi olmamakla beraber, bulgularımızda bahsedilen değişikliklerin mekanizmasını araştırarak deney serilerinin düzenlenmesi, hipoksi ve iskemi gibi patolojik olaylar sonrasında, reaktif oksijen metabolitlerinin organ fonksiyonu üzerine olan etkilerinin aydınlatılmasında yarar sağlayacaktır.

Fenilefrin ile yükseltileen perfüzyon basıncını difenhidramin varlığında H₂ reseptörleri aracılı düşüren HA' e ait yanıtlar, katalazın 80 UI/ml konsantrasyondaki varlığında kontrollere göre farklı bulunmamıştır. Bu durum, kullanılan katalaz dozunun yeterli olmamasından kaynaklanabilir. Buna karşın H₂O₂' in 10⁻⁷ ve özellikle 10⁻⁶ molar konsantrasyonlarda bu cevapları azaltmış olması, diğer serilerimizde elde edilen H₂O₂' in HA cevaplarını artırıcı etkisiyle paralellik göstermektedir. Yükseltilemiş perfüzyon basıncını, difenhidramin ile sağlanan H₁ reseptör blokajı altında düşüren HA uygulamaları da organı sisteme bağlayan kanülden yapılmış olmakla beraber, bu uygulamada elde edilen cevaplar monofazik bir desende ortaya çıkmıştır. Bu durum bifazik cevapların oluşmasında H₁ reseptörlerinin baskın rolü olduğu düşüncesini doğurmaktadır.

Allopurinolün 10⁻⁶ molar konsantrasyonda perfüzyon ortamında bulunması, alınan cevapların 1. veya 2. fazlarında bir değışiklik meydana getirmemiştir. Bu durum allopurinolün beklenen etkisinin dışında bir sonuçtur. Sipahi ve ark. tarafından yürütölen bir çalışmada deneysel olarak akut renal yetmezlik geliştirilmiş tavşanlardan izole edilen böbreklerde, asetilkolinin perfüzyon basıncını düşüren yanıtlarında bir azalma meydana geldiğı, bu azalmanın da allopurinol ön-tedavisi ile restore olduğu bildirilirken^[69], Sercombe ve ark. nın çalışmasında, yüksek glukoz içeren ortamda tavşan serebral arterlerinde asetilkolin ile sağlanan gevşeme yanıtlarında ortaya çıkan azalmanın NAD(P)H oksidaz inhibitörleri difenileneiodonyum ve aposinin ile geri döndüğü ancak allopurinolün etki göstermediğı ileri sürölmüştür^[70]. Bu bilgiler ışığında, allopurinolün *in vivo* koşullarda etkili olurken *in vitro* koşullarda etkisiz kalabileceğini düşünmek mümkündür. Daha sonraki aşamalarda, allopurinol ile ön tedavi protokolü içeren deney serilerinin düzenlenmesi, izole perfüze tavşan böbreğinde ksantin-ksantin oksidaz enzim sisteminin HA ile alınan cevaplar üzerine olan etkilerini inceleme olanağı verebilir.

Sonuç olarak; HA, izole perfüze tavşan böbreğinde, uygulama yoluna bağlı olmak kaydıyla perfüzyon basıncını bifazik olarak artırmaktadır. Eldeki bulgularımız, bu cevap deseninin 1. fazının kaynağının hücre dışı kalsiyumun hücre içine hareketi, 2. fazının kaynağının ise hücre içi depolardan kalsiyum saliverilmesi olduğunu düşündürmüştür. Kalsiyumun perfüzyon ortamından çekilmesiyle birlikte 1. ve 2. faz cevaplar tekrar eden HA dozlarında giderek azalmış ve taban seviyelerine yakın değerlere ulaşmıştır. HA yanıtlarında gözlenen bu azalma 1. faz cevaplarında göreceli olarak daha hızlı ortaya çıkarken kalsiyumsuz ortamda alınan ilk HA yanıtlarında 2. faz cevaplar kontrol değerlerine göre yaklaşık iki kat ve istatistik olarak anlamlı bir artış göstermiştir. Bir serbest oksijen radikali olan H_2O_2 , HA uygulaması ile elde edilen cevapların her iki fazında da artış meydana getirmiştir. L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanal blokörü olan verapamil, bifazik cevap desenini değiştirerek hem 1. ve hem de 2. faz cevapları azaltmış, bu azalma özellikle 2. faz cevaplarında çok daha fazla ortaya çıkmıştır. NO sentez inhibitörü L-NAME, alınan HA yanıtlarının her iki fazını da artırmış, bu artış özellikle 2. faz cevaplarında % 200 seviyelerine ulaşmıştır. Anti-oksidan etkinliği bilinen katalazın artan dozlarında 2. faz cevaplarında bir artış gözlenmekle beraber, bu değişiklik istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır. Ksantin-ksantin oksidaz inhibitörü allopurinol ise, HA ile elde edilen cevaplarda bir değişiklik meydana getirmemiştir. Fenilefrin ile perfüzyon basıncının yükseltilmesi sonrasında difenhidramin varlığında alınan HA' e ait perfüzyon basıncı azalma yanıtları, katalazın 80 UI/ml konsantrasyonundaki varlığında değişmezken, H_2O_2 ' in ortamda 10^{-7} ve 10^{-6} molar konsantrasyonda bulunmasıyla istatistik olarak anlamlı bir azalma göstermiştir. Böbreklere uygulanan hipoksi-reoksijenasyon işlemi sonrasında alınan HA yanıtlarının 1. ve 2. fazlarında kontrollere göre sırasıyla yaklaşık % 100 ve % 200 oranlarında bir artış tespit edilmiş, her iki fazda gözlenen bu artış, istatistik olarak da anlamlı bulunmuştur.

Bu çalışmanın; HA ile böbrek hemodinamiğinde oluşan değişikliklerin, reaktif oksijen metabolitlerinin organ fonksiyonu üzerine olan etkilerinin ve böbrek vasküler yatağında patolojik koşullar altında meydana gelen olayların mekanizmalarının aydınlatılmasına yardımcı olacak ipuçları sağlaması umulmaktadır. Yukarıda tartışılmaya çalışılan mekanizmaların, HA reseptörlerinin farklı tipleri ile ne yönde etkilendiğinin anlaşılması açısından, uygulanmış deney protokollerinin selektif H₂ reseptör antagonistleri ile tekrarlanmasının, çalışmada elde edilen bulguların kalsiyum ile olan ilişkilerini daha iyi aydınlatabilmek üzere, hücre içi kalsiyum hareketlerine etki eden ajanların ve farklı kalsiyum kanal blokörlerinin denenmesinin, buna ilaveten, *in vivo* şartlarda etkinliği gösterilmiş allopurinolün, HA yanıtları üzerine olan etkilerini ortaya koyabilecek şekilde tasarlanmış deney serilerinin düzenlenmesinin yararlı veriler sağlayacağı düşünülmektedir.

ÖZET

Dileköz E., İzole Perfüze Tavşan Böbreğinde Histamin Yanıtlarına Katalaz ve Allopurinol'un Etkisi. Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Ankara, 2005. Bir otakoid olan histaminin çeşitli dokularda iki fazlı bir kasılma deseni oluşturduğu, hücre içi kalsiyum düzeyini de iki fazlı bir biçimde değiştirebildiği ayrı çalışmalarda bildirilmektedir. İzole perfüze tavşan böbreğinde histamin ile elde edilen cevapların niteliğini tanımlayan yayınlar olmakla beraber, bu preparatta histaminin bifazik cevaplar oluşturduğunu bildiren bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, histamin, izole perfüze tavşan böbreğinde, uygulama yoluna bağlı olmak kaydıyla bifazik cevaplar oluşturmuştur. Bulgularımız bu cevapların 1. fazının kaynağının hücre dışı kalsiyumun hücre içine hareketi, 2. fazının kaynağının ise hücre içi depolardan kalsiyum saliverilmesi olduğu düşündürmüştür. Kalsiyumsuz ortamda 1. ve 2. faz cevaplar tekrar eden histamin uygulamalarıyla taban seviyelerine yakın değerlere kadar azalmış, bu azalma 1. faz cevaplarında göreceli olarak daha hızlı ortaya çıkarken kalsiyumsuz ortamda alınan ilk histamin yanıtlarında 2. faz cevaplar kontrol değerlerinin yaklaşık iki katı ve anlamlı bir artış göstermiştir. Hidrojen peroksit, histamin ile elde edilen cevapların her iki fazında da artış meydana getirmiştir. L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanal blokörü verapamil HA cevaplarında azalmaya sebep olmuştur. Nitrik oksit sentez inhibitörü L-NAME, özellikle 2. faz olmak üzere alınan histamin yanıtlarını artırmıştır. Anti-oksidan özelliği olan katalaz artan konsantrasyonlarda histamin yanıtlarını artırmakla beraber, bu artış istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır. Ksantin-ksantin oksidaz enziminin inhibitörü olan allopurinol, histamin cevaplarında bir değişiklik meydana getirmemiştir. Fenilefrin ile perfüzyon basıncının yükseltilmesi ve difenhidramin uygulamasıyla alınan histamine ait monofazik perfüzyon basıncı azalma yanıtları, katalaz varlığında değişmezken, hidrojen peroksit ile anlamlı biçimde azalmıştır. Böbreklere uygulanan hipoksi-reoksijenasyon işleminin histamin yanıtlarının 1. ve 2. fazlarında kontrollere göre sırasıyla yaklaşık % 100 ve % 200 oranlarında bir artış yaptığı ilk defa gösterilmiş, her iki fazda gözlenen bu artış, istatistik olarak anlamlı bulunmuştur.

SUMMARY

Dilekoz E., The Effects Of Catalase And Allopurinol On Histamine Induced Responses In Isolated Perfused Rabbit Kidney Preparation. Gazi University Health Sciences Institute, Department of Pharmacology, Ph.D. thesis in Pharmacology, Ankara, 2005. Histamine, an autacoid, is known to induce a biphasic contraction pattern in various tissues and similarly to increase the intracellular calcium content of some certain cells in a biphasic manner. Although there are publications defining the histamine induced responses in isolated perfused rabbit kidney, it is unknown if this agent induces biphasic responses in this preparation. In this study, histamine, depending on the application route, caused biphasic responses in isolated perfused rabbit kidneys. While the initial phase appeared to be raised from the influx of extracellular calcium into the cell, the sustained phase seemed to be due to calcium release from internal stores. In calcium-free medium, both initial and sustained phases declined to base-line values by successive histamine injections. This decline appeared to be relatively faster in initial phase responses. The first application of histamine in calcium-free medium caused a two-fold and significant increase in sustained phase responses. Hydrogen peroxide increased both initial and sustained phases of histamine induced responses. Verapamil, an L-type voltage gated calcium channel blocker, reduced HA responses. Nitric oxide synthesis inhibitor L-NAME caused an increase particularly in the sustained phase responses. Anti-oxidant catalase augmented the histamine responses; however, this increase was found to be non-significant. Xhantine-Xhantine oxidase inhibitor allopurinol did not change the responses obtained by histamine application. In phenylephrine and diphenhydramine treated kidneys, histamine application caused a reduction in elevated perfusion pressure levels in a monophasic manner. While catalase had no effect, addition of hydrogen peroxide, decreased histamine induced reductions. Hypoxia-reperfusion process is reported for the first time in this study to cause a significant increase in histamine responses by about 100% and 200% in both initial and sustained phases respectively.

KAYNAKLAR:

- 1- Bokesoy TA, Turker RK.: The presence of histamine H₂-receptors in rabbit kidney. Arch Int Pharmacodyn Ther. May;209(1):144-9. (1974)
- 2- Ercan ZS, Turker RK.: Alternation by histamine receptor agonists of the release of adrenergic transmitter in the isolated perfused rabbit kidney. Arch Int Pharmacodyn Ther. Feb;249(2):203-12. (1981)
- 3- Kenneth S, Jr. Babe, Serafin WE.: histamine, bradykinin, and their antagonists. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics Ninth Ed., New York, McGraw-Hill, 586 pp. (1996)
- 4- Watkins RW, Davidson IW.: Action of histamine on phasic and tonic components of vascular smooth muscle contraction. Experientia May 15;36(5):582-4. (1980)
- 5- Awe SO, Adeagbo AS.: Analysis of tert-butyl-hydroperoxide induced contractions of perfused vascular beds in vitro. Life Sci. 2;71(11): 1255-1266. (2002)
- 6- Torrecillas G, Boyano-Adanez MC, Medina J, Parra T, Grieria M, Lopez-Ongil S, Arilla E, Rodriguez-Puyol M, Rodriguez-Puyol D.: The role of hydrogen peroxide in the contractile response to Angiotensin II. Mol. Pharmacol. 59: 104-112. (2001)

- 7- Yang ZW, Zheng T, Wang J, Zhang A, Altura BT, Altura BM.: Hydrogen peroxide induces contraction and raises $[Ca^{2+}]_i$ in canine cerebral arterial smooth muscle: participation of cellular signaling pathways. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* Dec;360(6):646-53. (1999)
- 8- Yang ZW, Zheng T, Zhang A, Altura BM: Mechanism of hydrogen peroxide-induced contraction of rat aorta. *Eur J Pharmacol.* 5; 344 (2-3): 169-181. (1988)
- 9- Hoffman A, Berger C, and Persky L.: Extracorporeal Renal Storage. Cleveland, OH: Williams and Wilkins. (1965)
- 10- Langendorff O.: Untersuchungen am Überlebenden Säugetierherzen. *Pflügers Arch.* 1, 291. (1895)
- 11- Putney JW Jr.: A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium.* Feb;7(1):1-12. (1986)
- 12- Putney JW Jr.: Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium.* Nov-Dec;11(10):611-24. (1990)
- 13- Jung S, Pfeiffer F, Deitmer JW.: histamine-induced calcium entry in rat cerebellar astrocytes: evidence for capacitative and non-capacitative mechanisms. *J Physiol.* Sep 15;527 Pt 3:549-61. (2000)

- 14- Nguyen DH.: Role of adenosine-triphosphate-sensitive potassium channels in the mechanical responses of agonist-stimulated isolated porcine coronary arteries. *Arzneimittelforschung*. Dec;47(12):1351-8. (1997)
- 15- Kitamura Y, Okamura T, Kani K, Toda N.: histamine actions in dog retinal central arteries as compared to those in middle cerebral and temporal arteries. *J Ocul Pharmacol Ther*. Summer;11(2):167-76. (1995)
- 16- S.Oğuz KAYAALP: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 3. Cilt 7. Baskı, shf.: 2736-39. (1997)
- 17- Bökesoy TA, Türker RK.: The presence of H₂ receptors in rabbit kidney. *Arch. Int. Pharmacodyn*. 209: 140-149. (1974)
- 18- Locatelli F, Canaud B, Eckardt KU, Stenvinkel P, Wanner C, Zoccali C.: Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant*. Jul; 18(7):1272-80. (2003)
- 19- Li J, Li W, Liu W, Altura BT, Altura BM.: Mechanisms of hydroxyl radical-induced contraction of rat aorta. *Eur J Pharmacol*. Sep 19;499(1-2):171-8. (2004)
- 20- Xiao ZL, Andrada MJ, Biancani P, Behar J.: Reactive oxygen species (H₂O₂): effects on the gallbladder muscle of guinea pigs. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. Feb; 282 (2):G300-6. (2002)

- 21- Nam SH, Jung SY, Yoo CM, et al.: H₂O₂ enhances Ca²⁺ release from osteoblast internal stores. Yonsei Medical Journal. 43(2):229-235. (2002)

- 22- Hu Q, Yu ZX, Ferrans VJ, et al.: Critical role of NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in generating Ca²⁺ oscillations in human aortic endothelial cells stimulated by histamine. J Biol Chem. Sep 6;277(36):32546-51. (2002)

- 23- Smith MA, Herson PS, Lee K, et al.: Hydrogen-peroxide-induced toxicity of rat striatal neurones involves activation of a non-selective cation channel. J Physiol. Mar 1;547(Pt 2):417-25. (2003)

- 24- Shah V.: Effect of enzymatically generated reactive oxygen metabolites on the cyclic nucleotide content in isolated rat glomeruli. J Clin Invest. Aug; 74(2): 393-401. (1984)

- 25- Gloy J, Fischer K-G, Meyer TN, Schollmeyer P, Greger R, Pavenstädt H.: Hydrogen peroxide activates ion currents in rat mesangial cells. Kidney International. Vol: 56(1) : 181. (1999)

- 26- Zulueta JJ, Sawhney R, Yu FS, Cote CC, Hassoun PM.: Intracellular generation of reactive oxygen species in endothelial cells exposed to anoxia-reoxygenation. Am J Physiol. May;272 (5 Pt 1): L897-902. (1997)

- 27- Kim KS, Takeda K, Sethi R, Pracyk JB, Tanaka K, Zhou YF, Yu ZX, Ferrans VJ, Bruder JT, Kovesdi I, Irani K, Goldschmidt-Clermont P, Finkel T.: Protection from reoxygenation injury by inhibition of rac1. *J Clin Invest.* May 1;101(9):1821-6. (1998)

- 28- Sharikabad MN, Hagelin EM, Hagberg IA, Lyberg T, Brors O.: Effect of calcium on reactive oxygen species in isolated rat cardiomyocytes during hypoxia and reoxygenation. *J Mol Cell Cardiol.* Mar;32(3):441-52. (2000)

- 29- Valen G, Kaszaki J, Szabo I, Nagy S, Vaage J.: Toxic oxygen metabolites and ischemia – reperfusion increase histamine synthesis and release in the isolated rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 25(1): 31-40. (1993)

- 30- Hua H, Munk S, Goldberg H, Fantus IG, Whiteside CI.: High glucose-suppressed endothelin-1 Ca²⁺ signaling via NADPH oxidase and diacylglycerol-sensitive protein kinase C isozymes in mesangial cells. *J Biol Chem.* Sep 5;278(36):33951-62. Epub 2003 Jun 23. (2003)

- 31- Chavez E, Zazueta C, Cuellar A, Reyes-Vivas H, Garcia N.: Oxygen free-radicals mediate the damaging effect of ultraviolet light on membrane mitochondria. *Biochem Mol Biol Int.* Sep;46(1):207-14. (1998)

- 32- Paul A Insel: Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of Gout. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics Ninth Ed.*, New York, McGraw-Hill, 649, 650 pp. (1996)

- 33- Luk HH, Ko JK, Fung HS, Cho CH.: Delineation of the protective action of zinc sulfate on ulcerative colitis in rats. *Eur J Pharmacol.* May 17;443 (1-3):197-204.(2002)

- 34- Shimizu S, Tanaka H, Sakaki S, Yukioka T, Matsuda H, Shimazaki S.: Burn depth affects dermal interstitial fluid pressure, free radical production, and serum histamine levels in rats. *J Trauma.* Apr;52(4):683-7. (2002)

- 35- Dinda PK, Kossev P, Beck IT, Buell MG.: Role of xanthine oxidase-derived oxidants and leukocytes in ethanol-induced jejunal mucosal injury. *Dig Dis Sci.* Dec;41(12):2461-70. (1996)

- 36- Friedl HP, Till GO, Trentz O, Ward PA.: Roles of histamine, complement and xanthine oxidase in thermal injury of skin. *Am J Pathol.* Jul;135(1):203-17.(1989)

- 37- Till GO, Friedl HP, Ward PA.: Lung injury and complement activation: role of neutrophils and xanthine oxidase. *Free Radic Biol Med.* 10(6):379-86. (1991)

- 38- Masini E, Giannella E, Bianchi S, Palmerani B, Pistelli A, Mannaioni PF.: Histamine release in acute coronary occlusion-reperfusion in isolated guinea-pig heart. *Agents Actions.* Apr;23(3-4):266-9. (1988)

- 39- Ercan ZS, Ilhan M, Oguz A, Turker RK.: Superoxide dismutase and allopurinol prevent the pressor effects of angiotensin II and histamine in the guinea-pig isolated perfused lung exposed to hypoxia. *Gen Pharmacol.* Nov;23(6):1149-51. (1992)

- 40- Boros M, Bako L, Nagy S.: Effect of antioxidant therapy on cyclooxygenase-derived eicosanoid release during intestinal ischemia-reperfusion. *Eur Surg Res.*;23(3-4):141-50. (1991)

- 41- Korthuis RJ, Granger DN, Townsley MI, Taylor AE.: The role of oxygen-derived free radicals in ischemia-induced increases in canine skeletal muscle vascular permeability. *Circ Res.* Oct;57(4):599-609. (1985)

- 42- Al-Ghamdi SS, Chatterjee PK, Raftery MJ, Thiernemann C, Yaqoob MM.: Role of cytochrome P4502E1 activation in proximal tubular cell injury induced by hydrogen peroxide. *Ren Fail.* Mar;26(2):103-10. (2004)

- 43- Chatterjee PK, Cuzzocrea S, Thiernemann C.: Inhibitors of poly (ADP-ribose) synthetase protect rat proximal tubular cells against oxidant stress. *Kidney Int.* Sep;56(3):973-84. (1999)

- 44- Muindi JF, Stevens YW, Warrell RP Jr, Young CW.: In vitro differential metabolism of merbarone by xanthine oxidase and microsomal flavoenzymes. The role of reactive oxygen species. *Drug Metab Dispos.* May-Jun;21(3):410-4. (1993)

- 45- Konya L, Bencsath P, Szenasi G, Feher J.: Lack of effect of antioxidant therapy during renal ischemia and reperfusion in dogs. *Experientia*. Mar 15;49(3):235-7. (1993)

- 46- Turker RK, Demirel E, Ercan ZS.: Iloprost preserves kidney functions against anoxia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. Jan;31(1):45-52. (1988)

- 47- Li DM, Bentley GA.: Localisation of receptors that initiate reflex vascular responses to vasoactive substances. *Pflugers Arch*. 325(3):199-219. (1971)

- 48- Berridge MJ.: Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*. Jan 28;361(6410):315-25. (1993)

- 49- Shuttleworth TJ, Thompson JL.: Evidence for a non-capacitative Ca^{2+} entry during $[\text{Ca}^{2+}]$ oscillations. *Biochem J*. Jun 15;316 (Pt 3):819-24. (1996)

- 50- Negulescu PA, Machen TE.: Release and reloading of intracellular Ca stores after cholinergic stimulation of the parietal cell. *Am J Physiol*. Apr;254(4 Pt 1):C498-504. (1988)

- 51- Malek AM, Jiang L, Lee I, et al.: Induction of nitric oxide synthase mRNA by shear stress requires intracellular calcium and G-protein signals and is modulated by PI3 kinase, *Biochem Biophys Res Commun*. Jan 8;254(1):231-42. Erratum in: *Biochem Biophys Res Commun* 1999 Mar 5;256(1):255 (1999)

- 52- Lin S, Fagan KA, Li KX, et al.: Sustained endothelial nitric-oxide synthase activation requires capacitative Ca^{2+} entry. *J Biol Chem.* Jun 16;275(24):17979-85. (2000)

- 53- Dedkova EN, Blatter LA.: Nitric oxide inhibits capacitative Ca^{2+} entry and enhances endoplasmic reticulum Ca^{2+} uptake in bovine vascular endothelial cells. *J Physiol.* Feb 15;539(Pt 1):77-91. (2002)

- 54- Thyagarajan B, Malli R, Schmidt K, et al.: Nitric oxide inhibits capacitative Ca^{2+} entry by suppression of mitochondrial Ca^{2+} handling. *Br J Pharmacol.* Nov;137(6):821-30. (2002)

- 55- Trepakova ES, Cohen RA, Bolotina VM.: Nitric oxide inhibits capacitative cation influx in human platelets by promoting sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase-dependent refilling of Ca^{2+} stores. *Circ Res.* Feb 5;84(2):201-9. (1999)

- 56- Yuan XJ, Bright RT, Aldinger AM, Rubin LJ.: Nitric oxide inhibits serotonin-induced calcium release in pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol.* Jan;272(1 Pt 1):L44-50. (1997)

- 57- Wedel BJ, Vazquez G, McKay RR, et al.: A calmodulin/inositol 1,4,5 trisphosphate (IP_3) receptor-binding region targets TRPC3 to the plasma membrane in a calmodulin/ IP_3 receptor-independent process. *J Biol Chem.* Jul 11;278(28):25758-65. (2003)

- 58- Trebak M, St J Bird G, McKay RR, et al.: Signaling mechanism for receptor-activated canonical transient receptor potential 3 (TRPC3) channels. *J Biol Chem.* May 2;278(18):16244-52. (2003)

- 59- Facemire CS, Mohler PJ, Arendshorst WJ.: Expression and relative abundance of short transient receptor potential channels in the rat renal microcirculation. *Am J Physiol Renal Physiol.* Mar;286(3):F546-51. (2004)

- 60- Putney JW Jr.: Pharmacology of capacitative calcium entry. *Mol Interv.* Jun;1(2):84-94. (2001)

- 61- Lee KC, Tseng LL, Chen YC, Wang JW, Lu CH, Cheng JS, Wang JL, Lo YK, Jan CR.: Mechanisms of histamine-induced intracellular Ca^{2+} release and extracellular Ca^{2+} entry in MG63 human osteosarcoma cells. *Biochem Pharmacol.* Jun 15;61(12):1537-41. (2001)

- 62- Xiao XH, Bevan JA.: Pharmacological evidence that flow- and potassium-induced contraction of rabbit facial vein may involve the same calcium entry pathway. *J Pharmacol Exp Ther.* Jan;268(1):25-31. (1994)

- 63- Nilius B, Droogmans G.: Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol Rev.* Oct;81(4):1415-59. (2001)

- 64- Zhu X, Jiang M, Birnbaumer L.: Receptor-activated Ca^{2+} influx via human Trp3 stably expressed in human embryonic kidney (HEK)293 cells. Evidence for a non-capacitative Ca^{2+} entry. J Biol Chem. Jan 2;273(1):133-42. (1998)

- 65- Schofl C, Rossig L, Leitolf H, et al.: Generation of repetitive Ca^{2+} transients by bombesin requires intracellular release and influx of Ca^{2+} through voltage-dependent and voltage independent channels in single HIT cells. Cell Calcium Jun;19(6):485-93. (1996)

- 66- Ohmasa M, Saito T.: Muscarinic calcium mobilization in the regenerating retina of adult newt. Brain Res Dev Brain Res. Oct 10;145(1):61-9. (2003)

- 67- Akagi M, Hamada K, Nishioka E, Fukuishi N, Akagi R.: Role of histamine H_3 receptor on hypoxia-reoxygenation-induced cardiac dysfunction in guinea pigs. Methods Find Exp Clin Pharmacol. Nov;17 Suppl C:30-5. (1995)

- 68- Tucker A, Weir EK, Reeves JT, Grover RF.: Failure of histamine antagonists to prevent hypoxic pulmonary vasoconstriction in dogs. J Appl Physiol. Apr;40(4):496-500. (1976)

- 69- Sipahi EY, Keskil ZA, Erdinc M, Nergis Y, Turker RK, Ercan ZS.: Effect of glycerol on endothelium-derived factors in the vasculature of the rabbit kidney. Clin Exp Pharmacol Physiol. Aug;29(8):679-83. (2002)

- 70- Sercombe R, Vicaud E, Oudart N, Sercombe C, Girard P.: Acetylcholine-induced relaxation of rabbit basilar artery in vitro is rapidly reduced by reactive oxygen species in acute hyperglycemia: role of NADPH oxidase. J Cardiovasc Pharmacol. Oct;44(4):507-16. (2004)