



**T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARADA RENAL İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARININ  
AZALTILMASINDA FOSFODİESTERAZ TİP 5'İN (TADALAFİL) ROLÜ**

**Dr. Feyzul GASANOV**

**UZMANLIK TEZİ**

**BURSA-2010**



T.C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇANLARADA RENAL İSKEMİ–REPERFÜZYON HASARININ  
AZALTILMASINDA FOSFODİESTERAZ TİP 5'İN (TADALAFİL) ROLÜ

Dr. Feyzul GASANOV

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Doç. Dr. Hakan VURUŞKAN

BURSA–2010

## İÇİNDEKİLER

<b>Türkçe Özet.....</b>	<b>ii</b>
<b>İngilizce Özet.....</b>	<b>iii</b>
<b>Giriş.....</b>	<b>1</b>
<b>Gereç ve Yöntem.....</b>	<b>25</b>
<b>Bulgular.....</b>	<b>29</b>
<b>Tartışma ve Sonuç.....</b>	<b>33</b>
<b>Kaynaklar.....</b>	<b>37</b>
<b>Teşekkür.....</b>	<b>42</b>
<b>Özgeçmiş.....</b>	<b>43</b>

## ÖZET

Klinikte renal iskemi–reperfüzyon hasarı ile parsiyel nefrektomi, renal transplantasyon, şok ve travma durumlarında karşılaşılmaktadır. Bu çalışmada böbreğin iskemi–reperfüzyon hasarına karşı korunabilmesi amaçlandı. Serbest radikal giderici ve antiiskemik etkisi olan Tadalafil ile iskemi–reperfüzyon hasarı önlenmeye çalışıldı.

Ağırlıkları 250–300gr arasında değişen, randomize olarak 6 gruba ayrılan toplam 36 adet Spraque Dawley cinsi dişi rat kullanıldı. İskemi grubunda sağ böbreğe nefrektomi, sol böbreğe 45 dakika süreyle renal iskemi uygulandı ve nefrektomi yapıldı. İskemi–reperfüzyon grubunda sağ böbreğe nefrektomi, sol böbreğe 45 dakika süreyle renal iskemi ardından 1 saat süreyle reperfüzyon uygulandı ve nefrektomi yapıldı. Tadalafil + İskemi grubunda bütün ratlara anestezi öncesi 1ml olacak şekilde suda çözülmüş Tadalafil 1mg /kg dozunda oragastrik lavaj ile verildi, sağ nefrektomi yapıldı, sol böbreğe 45 dakika süreyle renal iskemi uygulandı ve nefrektomi yapıldı. Tadalafil + iskemi + reperfüzyon grubunda da bütün ratlara anestezi öncesi 1ml olacak şekilde suda çözülmüş Tadalafil 1mg /kg dozunda oragastrik lavaj ile verildi, sağ nefrektomi yapıldı, sol böbreğe 45 dakika süreyle renal iskemi ve 1 saat süreyle reperfüzyon uygulandıktan sonra nefrektomi yapıldı. Biyokimyasal incelemelerde lipid peroksidasyon ürünü olan Malonildialdehid (MDA), histopatolojik incelemede ise renal iskemik hasarda tübüler nekroz, tübüler atrofi, reaktif atipi, fırçamsı kenar hasarı, hidropik dejenerasyon, glomerüler skleroz, interstisiyel fibrozis, interstisiyel inflamasyon esas alındı.

Tadalafil iskemi–reperfüzyon sonrasında tübüler hasarını ve nekroz gelişimini engellemektedir. Bu etkinin Tadalafil verilen iskemi grubunda olmayıp Tadalafil verilen iskemi–reperfüzyon grubunda olması Tadalafilin reperfüzyon aşamasında etkin olduğu düşüncesini oluşturmaktadır. Tadalafil iskemi–reperfüzyon hasarını önlemede klasik tedavilere ek olarak verilebilir.

**Anahtar kelimeler:** Tadalafil, renal iskemi, reperfüzyon hasarı.

## SUMMARY

### **The Role of Phosphodiesterase Type 5 (Tadalafil) in Reducing Renal Ischemia–Reperfusion Injury in Rats**

In clinical practice; renal ischemia– reperfusion injury is met in partial nephrectomy, renal transplantation, shock and trauma cases. The aim was to increase the tolerance interval of kidneys to the ischemia and reperfusion injury. Tadalafil is used to reduce the effects of ischemia– reperfusion injury, for its free radical eliminating and antiischemic features.

Thirty six Sprague Dawley rats, which weight between 250–300 grams, were used. Rats were not fed for twelf hours before test. Rats were randomized into 6 groups. Control and Şam groups went under bilateral nephrectomy. In ischemia group, nephrectomy performed to the right kidney, left kidney was held in ischemia for 45 minutes and nephrectomy performed afterwards.

In Tadalafil–ischemia group; all rats were given 1 mg/kg Tadalafil by orogastric lavage before anesthesia, then right nephrectomy performed, left kidney was held in ischemia for 45 minutes and nephrectomy performed afterwards. In Tadalafil–ischemia–reperfusion group, all rats were given 1 ml Tadalafil that dissolved in water and 1 mg/kg Tadalafil by orogastric lavage, right nephrectomy performed, left kidney was held in ischemia for 45 minutes and applied reperfusion for 1 hour, and nephrectomy performed afterwards. Kidneys were taken under biochemical and histopathhological examination.

Biochemical examination based on malonildialdehyd (MDA) which is a product of lipid peroxidation; and histopathological examination based on tubuler necrosis, tubuler atrophy, reactive atypia, brush border injury, hydropic degeneration, glomeruler sclerosis, Bowman’s capsula dilatation, interstitial fibrosis and interstitial inflammation.

Tadalafil prevents kidneys from tubular injury and necrosis. This effect occurs only in Tadalafil receiving ischemia–reperfusion group, so it can be thought that Tadalafil is active in reperfusion phase. Tadalafil can be used as an additional therapy to the classical regimens in order to avoid ischemia–reperfusion injury.

**Key words:** Tadalafil, renal ischemia, reperfusion injury.

## GİRİŞ

Böbreğin birçok hastalığında iskemik hasar oluşabilmektedir. Bu hasarın önlenmesinde çeşitli kimyasallar kullanılmaktadır. Böbrek iskemisi; böbrek transplantasyonu, parsiyel nefrektomi, kardiyopulmoner bypass, sepsis, çeşitli ürolojik girişimler ve hidronefroz gibi çeşitli klinik durumlarda görülür. İskemiden sonra gelişen akut böbrek yetmezliği, glomerüler filtrasyon hızında azalma, tübüler nekroz ve böbrek damarlarında direnç artışıyla karakterizedir. İskemi ve reperfüzyon (I/R) sırasında hücresel enerjinin tükenmesine, hücre içinde sodyum, kalsiyum ve reaktif oksijen radikallerinin birikmesine, proteazları, nitrik oksit sentetazları, fosfolipazları ve endonükleazları içeren çok sayıda enzim sisteminin aktive olmasına yol açar; hücre hasarı ve ölümüyle sonuçlanır. İskemik organlara kan akımının yeniden sağlanması, hücre ölümünün önlenmesinde hayati önem taşır. Ancak; reperfüzyonun kendisi, aktive polimorfonükleer lökositlerin ve trombositlerin dokuyu infiltre etmeleri ile ortaya çıkan akut inflamatuvar yanıtı sekonder olarak lokal hasara yol açar. Doku hasarlanması; sitokinler, nitrik oksit (NO) seviyesindeki lokal dengesizlikler, endotel hücresi adhezyon molekülleri, trombosit aktive edici faktörler ve serbest radikaller aracılığıyla gerçekleşir (1, 2).

### 1. Böbrek Kan Akımı

Normal bir insanda her iki böbreğe giden kanın miktarı kalp debisinin %21'i kadardır. Renal arter hiluma girmeden önce anterior ve posterior olmak üzere ikiye; ardından 5 segmental artere dallanır. Segmental arterler lobar arterlere dallanır. Lobar arterler, renal piramitler arasında kortikomedullar kavşağına doğru akan 2–3 kadar interlobar artere dallanır. Kortikomedullar kavşakta bu arterler arkuat arterleri oluştururlar. Arkuat arterlerden interlobular arterler dallanarak kortekse ve kapsule doğru uzanır. Bu sırada her glomerul için afferent arteriollerini vererek dallanır. Afferent arterioller

interlobüler arterlerin kısa ve düz kollarıdır. Her biri glomerüldeki damar yumağını oluşturmak üzere pek çok kapiller kola ayrılır. Kapillerinin distal ucu, böbrek tübüllerini çevreleyen ve peritübüler kapiller denilen ikinci bir kapiller ağı oluşturan efferent arteriolü oluşturmak için bir araya gelirler. Bu nedenle, glomerüler ve tübüler sistem arasındaki arteriyel kısımlar teknik olarak bir portal sistemdir ve glomerüler kapillerler organizmada bir arteriyel sisteme boşalan tek kapiller damarlarıdır. Peritübüler kapillerler arterioller damarlara paralel seyreden venöz sistemin damarlarına boşalır ve bunlar da sırasıyla interlobüler ven, arkuat ven, interlobar ven ve nihayet böbreği renal artere komşu olarak terk eden böbrek venini oluştururlar (3–5).

Böbreğin medullasındaki kan akımı toplam böbrek kan akımının sadece %1–2'sini oluşturur. Böbrek medullasına giden kan, peritübüler kapiller sistemin özelleşmiş bir kısmı olan vazo rekta tarafından sağlanır. Bu damarlar medullada Henle kıvrımlarına paralel olarak derinlere ilerler ve sonra kortekse dönerek venöz sisteme dökülürler. Vazo rektalar böbreklerin konsantrasyonunda önemli rol oynarlar (4, 6, 7).

Böbrek kan akımının ve glomerüler filtrasyonun fizyolojik kontrolünde birçok faktör rol oynar. Tüm böbrek damarları özellikle sempatik sinir liflerinden zengindir. Böbrek sempatik sinirlerinin aktivasyonu böbrek arteriollerinin vazokonstriksiyonuna neden olur ve bunun sonucu olarak böbrek kan akımı ve glomerüler filtrasyon hızı (GFR) azalır. Endotelin ise, böbrek damarlarının hasar görmüş endotel hücrelerinden salınır, azalmış GFR ve arteriollerin vazokonstriksiyonuna katkıda bulunur. Güçlü bir vazokonstriktör olan Anjiotensin II efferent arteriollerin vazokonstriksiyonu üzerinden etkili olur. Endotelden kaynaklanan nitrik oksit, böbrek damar direncini azaltır ve GFR'yi artırır. PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> ve bradikinin vazodilatasyona neden olarak böbrek kan akımı ve GFR'ı artırır. Prostaglandinler afferent arteriollerin daralmasını önleyerek GFR ve renal kan akımında aşırı bir azalmayı engelleyebilir. Hacim azalması veya cerrahi girişim gibi stres koşullarında aspirin gibi PG sentez inhibitörü ilaçlar GFR'de önemli azalmaya neden olurlar (5–7). Arteriyel kan basıncında belirgin değişikliklere karşın böbrek içi geribildirim mekanizmaları böbrek kan akımını ve GFR'yi oldukça



sabit tutarlar. Bu otoregülasyon olarak adlandırılmaktadır. Bu sayede, kan basıncında 75 mmHg'ye varan düşmeler ve 160 mmHg'ye varan yükselmeler GFR'de sadece %1–2 oranında değişiklik yapar.

## **2. Glomerüler Filtrasyon, Tübüler Geri Emilim ve Tübüler Sekresyon**

İdrar oluşumu, protein içermeyen sıvının glomerüler kapillerden Bowman kapsülü içine filtrasyonu ile başlar. Proteinlerin dışındaki plazmadaki maddelerin çoğu serbestçe Bowman kapsülü içine filtre olduğu için, Bowman kapsülü içindeki glomerüler filtratta, bu maddelerin konsantrasyonları plazmadakine eşittir. Filtre olan sıvı Bowman kapsülünü terkedip tübüller boyunca ilerlerken içindeki spesifik solütlerin ve suyun geri emilerek kana geçmesi veya başka maddelerin peritübüler kapillerden tübül içine salgılanması nedeniyle değişikliğe uğrar (4, 8, 9). Değişik maddelerin idrardan atılma hızı böbrekteki glomerüler filtrasyon, böbrek tübüllerinden geri emilim ve böbrek tübüllerine sekresyonun toplamıdır.

Glomerüler filtrasyon hızı (GFR); kapiller membrana etki eden kolloid osmotik basınç ve hidrostatik basınç arasındaki denge ve kapillerin filtrasyon yapan yüzey ve geçirgenliğinin ölçütü olan kapiller filtrasyon sabiti tarafından tayin edilir. Normal yetişkin bir insanda GFR 125 ml/dakikadır. Glomerüler kapiller membran; kapiller endoteli, bazal membran ve bazal membranın dış yüzeyini çevreleyen epitelyal hücre (podosit) tabakasından oluşmaktadır. Bu tabakalar hep birlikte filtrasyon bariyerini oluşturur. Glomerüler kapiller membrandan filtrasyon hızı kısmen membranın kendine has özelliklerine bağlıdır. Kapiller endotelium pencereler ile çevrelenmiştir. Endoteli bir bazal membran çevreler. Arasından su ve küçük solitlerin geçebileceği genişlikte mesafe bulunan kollajen ve proteoglikan fibril ağından oluşan bazal membran su ve küçük maddeleri filtre edebilir. Bazal membranın plazma proteinlerinin geçişini etkin bir şekilde önlemesinin kısmen sebebi, proteoglikanların güçlü negatif elektrik yüküne sahip olmalarıdır. Glomerüler membranın son kısmını ayaksı çıkıntılara sahip olan epitelyal hücrelerdir (podositler) oluşturur. Bu

ayaksı çıkıntılar glomerüler filtratın geçtiği dar, por denen aralıklarla birbirinden ayrılmıştır. Her ne kadar epitelyal hücreler filtrata engel teşkil etseler de, plazma proteinlerine esas direnci bazal membran oluşturmaktadır (8–10).

Böbrekler makula densadaki sodyum klorür yoğunluğu değişiklikleriyle renal arterioler direncin kontrolü arasında bağlantı kuran bir geribildirim mekanizmaya sahiptir. Bu geribildirim, distal tble oldukça sabit miktarda sodyum klorür gönderilmesini sağlar. Tbloglomerler geribildirim mekanizmanın iki komponenti afferent ve efferent arterioler geribildirimlerdir. Jukstaglomerüler kompleks distal tübülün başlangıcındaki makula densa hücreleri ile afferent ve efferent arteriollerin duvarlarındaki jukstaglomerüler hücrelerden oluşur. Makula densa distal tblde afferent ve efferent arteriollerle temas eden bir grup özelleşmiş epitel hücreleridir. Sodyum klorür yoğunluğundaki azalma makula densadan çıkan uyarı ile afferent arteriol direncini azaltarak glomerüler hidrostatik basıncı artırır ve GFR'nin normale dönmesine yardım eder(10, 11).

### **3. Renal İskemik Hasarın Patofizyolojisi ve Morfolojisi**

Böbreklerde iskemi sıklıkla transplantasyon, parsiyel nefrektomi, anatrofik nefrolitotomi gibi majör ürolojik cerrahilerde, kardiyopulmoner bypass gibi kardiyak cerrahilerde, yoğun bakım hastalarında ya da travma sonrası gelişen hipovolemide, ağır sepsis de olduğu gibi şiddetli hipotansiyonda ve yanık hastalarında görülmektedir.

Akut böbrek yetmezliğinin (ABY) oğunda asıl nedeni akut tübüler nekrozdur (ATN). ABY hastanede yatan hastaların %2–5'inde görülebilmekte ve cerrahi ya da dahili yoğun bakımlarda bu oran %20–30'u aşabilmektedir. Çeşitli nefrotoksik ajanlar artan bir sıklıkla ATN nedeni olabilmesine karşın, renal iskemi ve renal hipoperfüzyon akut tübüler nekrozun en sık sebebidir. Renal iskemide ana olay hücrelerin başlıca enerji kaynağı olan ATP azalmasıdır. ATP eksikliği plazma membran fonksiyonlarında ve intrasellüler ATPaz aktivitesinde bozulmaya yol açar (12, 13). ATPaz normal hücre

fonksiyonlarının yerine getirilmesi için gerekli olan bir enzimdir. Sodyum–Potasyum ( $K^+$ )–ATPaz aktivitesinin bozulması sitozol içindeki  $Na^+$  ve  $K^+$  konsantrasyonlarının değişmesi ile birlikte hücre şişmesine yol açar. Brady ve arkadaşlarına göre plazma membran  $Na^+-Ca^{+2}$ –ATPaz ve intrasellüler  $Ca^{+2}$ –ATPaz disfonksiyonu  $Ca^{+2}$ 'un intrasellüler miktarının yükselmesine neden olur (12, 13). İntrasellüler  $Ca^{+2}$  artışı hücre hasarı ile birlikte hücre iskeletinin bozulmasına,  $Ca^{+2}$  bağımlı fosfolipazların aktivasyonuna, ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza dönüşümünün (reperfüzyon hasarını artırır) hızlanmasına ve oksidatif fosforilasyonun çözülmesine yol açar. Fosfolipaz aktivasyonu plazma membranı ve mitokondri gibi hücre içi organellerin normal fonksiyonlarını sürdürmesine yardımcı olan lipid tabakasında hasara yol açar.

İskemi sonrası reperfüzyon boyunca oluşan oksidatif stres hücre hasarı ile birlikte. Yüksek intrasellüler  $Ca^{+2}$  düzeyi bir kalmodulin bağımlı proteazı aktive ederek ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza dönüşümünü sağlar. Edelstein ve arkadaşlarına göre reperfüzyon süresince hipoksantin ksantine dönüşümü süperoksidlerin ana kaynağıdır (20). Oluşan ksantin oksidaz ortamda biriken hipoksantini ürik aside dönüştürürken nikoatinamid adenin dinükleotid (NAD) yerine reperfüzyonla dokulara ulaşan oksijeni ( $O_2$ ) kullanırlar. Sonuçta ürik asitle birlikte  $O_2^-$  radikalini oluştururlar (14, 15). Bu olay  $OH^-$  iyonunun metabolizasyonu sonucu hücre hasarına neden olur. Özellikle membran fosfolipidlerindeki poliansatüre yağ asidi ile oksijen radikali lipid hidroperoksitlerini oluşturmak için reaksiyona girerler. Peroksidasyonun şiddeti lipidlerin doymamışlık derecesi ile orantılı olarak artar. Peroksi radikali zincir reaksiyonunun taşıyıcısıdır. Lipid peroksidasyonu membran yapısına zarar vererek membran geçirgenliğini bozar ve akışkanlığını şiddetli derecede etkiler (16).  $OH^-$  ve  $O_2^-$  radikali lipid peroksidasyonuna neden olan en önemli etken maddedir. Serbest radikal doymamış yağ asidinin bir metilen karbonuna bağlı bir  $H^-$  atomunu yerinden çıkartır ve lipid radikali oluşur. Tiobarbiturik asit lipid peroksidasyonunun gösteren en önemli ajanlardan olup dokularda ölçümü lipid peroksidasyonun indeks parametrelerindedir (17). Son olarak bir proteaz olan kalpain aktive olarak iskemik böbrek hasarının

oluşumuna yardımcı olur. Kalpın membran kanallarını düzenler, kinazları aktive eder ve hücre iskeletini sağlayan proteinler arasında etkileşimi sağlar.

İskemik ATN renal tübül hasarla karakterizedir. Renal iskemi sonrası histolojik olarak gösterilen hasarın majör tuttuğu alan proksimal tübüller olmakla birlikte, Henle kulpunun medüller çıkan kolunda ve distal tübülde de hasar olduğu tespit edilmiştir (18). Witzgall ve ark.'na (19) göre böbreklerin normal fonksiyonu sırasında oksijenin inen vaza rektadan çıkan vaza rektaya difüze olması nedeniyle medulla hipoksi eşiğinde görev yapar. Uzamış iskemi süresince medüller hipoksi yoğunlaşır ve dış medullada bulunan nefronlar yüksek orandaki metabolik ihtiyaçlarından dolayı hasara karşı en duyarlı hale gelirler. Proksimal tübülün S3 kısmı en ciddi hasarın olduğu bölgedir. Bu kısımda etkilenen diğer yapı metabolik olarak aktif olan yüksek oranda  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPaz aktivitesine ihtiyaç duyan medüller çıkan kalın koldur.

Molitorise ve ark. (20) tübül hücrelerindeki subletal hasarın bu hücrelerin iskelet yapısını bozduğunu göstermiştir. Lieberthal'e (21) göre hücre polaritesinde kayıp en belirgin olanıdır. Fırçalı hücre yapısı kaybolur, bazolateral  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPaz ve integrinlerin dağılımı değişir. Sonuçta su ve tuzun tübül hücre boyunca olan transportu bozulur ve renal epitelin elektrolit ve su kaybını önleyebilme yeteneği etkilenir. Sıkı bileşkelerin kaybı ATN'un en çarpıcı fizyopatolojik değişimi olan glomerüler filtratın geriye kaçmasına neden olur.

İskemik ATN'da renal kan akımı %50 ya da daha fazla oranda azalır ve perfüzyon defekti dış medullada daha belirgindir. Vazokonstriksiyon ve lökosit, eritrosit ile trombositlerin medüller vasküler yapılarda konjesyonu bu düşüşün predominant nedenleridir. İskemik renal hasarda intrarenal vazokonstriksiyon belirgindir. Vazokonstriksiyon endotelin ve endotel-derive nitrik oksit arasındaki dengesizlik nedeniyle ortaya çıkar. Endotelin reseptör blokerlerinin iskemik renal hasarı düzelttiği ve renal fonksiyonları iyileştirdiği gösterilmiştir. Lieberthal'e (21) göre ATN'daki endotel hasarı nitrik oksit sentetazı etkileyerek endotel-kaynaklı nitrik oksit üretimini azaltır. Azalmış endotel kaynaklı nitrik oksit direkt vazokonstriksiyona neden olurken endotelin üretiminin de artmasına yol açar.

Günümüzde yapılan çalışmalar, iskemik hasardan lökositlerdeki adezyon yapıcı molekülleri aktive eden inflamasyon meditörlerini ve bunların endotel üzerindeki reseptörlerinin artmasını sorumlu tutmaktadırlar. İskemi–reperfüzyon hasarında asıl rol oynayan faktörün nötrofillerin olduğunu öne süren çalışmalar mevcuttur (22, 23). Lökositler üzerindeki bu adezyon moleküllerine ve bunların endotelyal ligandlarına karşı oluşturulan antikolların, iskemik renal hasarı azalttığını ortaya koymaktadır. Miyeloperoksidaz (MPO) enzimi hidrojen peroksit ile tepkimeye girerek Cl oksidasyonunu katalize edip oldukça sitotoksik bir ajan olan hipoklorik asit (HOCl) üretimini gerçekleştirir (24). Bu reaksiyonu katalize eden MPO sadece nötrofillerde mevcuttur. Dokularda MPO aktivitesi nötrofil sayısı ile direkt orantılı olup nötrofil infiltrasyonunun güvenilir bir göstergesidir (25). Ayrıca nötrofillerde bulunan indirgenmiş nikoatinamid adenin dinükleotid fosfata (NADPH) bağımlı oksidaz sistemide süperoksit radikali oluşumunda önemli derecede etkili bir enzimdir (26).

### **3.1. İskemi, Reperfüzyon**

İskemik hasar, bir dokuyu besleyen arteriyel sistemin herhangi bir nedenle tıkanması sonucu ortaya çıkan doku harabiyetidir (27). Bir dokuda arteriyel sistemin geçici süre ile tıkanması halinde, bu süre belli bir zaman dilimini aşarsa, geri dönüşmeyen doku hasarı ortaya çıkar. Bu kritik zaman dilimi dokudan dokuya değişiklik gösterir (28). Böbrekte yapılan deneysel çalışmalarda bu kritik zaman dilimi 30 dakika olarak bulunmuştur (29, 30). İskemi oluşmuş dokunun kan akımının tekrar sağlanmasına reperfüzyon denir. Beklenenin tersine, doku kan akımının tekrar sağlandığında ortaya çıkan reperfüzyon hasarı tek başına iskeminin oluşturduğu doku hasarından daha şiddetlidir (27). Son yıllara kadar iskemik dokuda saptanan hasarın yalnızca iskemi tarafından oluşturulduğu düşünülüyordu ancak, artık bu hasarda reperfüzyonun da önemli rolü olduğu bilinmektedir (31, 32).

Oksijen serbest radikal artışına karşı oluşan lokal savunma cevabı hakkında bilgilerimiz halen kısıtlıdır (33). Oksijen serbest radikallerinin birçok normal biyolojik işlem sırasında da üretilmesi, hayatın oksijen toksisitesi yönünden ne kadar hassas bir denge içinde olduğunu gösterir. Diğer birçok

biyolojik sistemde olduğu gibi organizmanın inhibitörler, gidericiler ve benzer sistemlerden oluşan yeterli bir savunma sistemi vardır (34). Oksijen serbest radikalleri, normal biyolojik ortamlarda yer almalarına rağmen birçok patolojik olayda da rol oynarlar. Reperfüzyon iskemik dokunun geri dönüşümü için şart olsa da, bu ek bir hasara neden olabilir ve reperfüzyon hasarı gelişebilir (35–37).

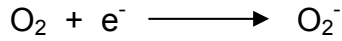
Serbest radikaller; lipit peroksidasyonu, protein veya nükleik asit moleküllerinin degradasyonu gibi birçok hücrel hasar olayını başlatabilirler (38, 39). Protein aktivitesindeki değişiklikler, taşıyıcı protein ve iyon kanallarının aktivasyonu veya inaktivasyonu yoluyla Na, K, Mg ve Ca gibi iyonların membran geçirgenliklerinde ani ve şiddetli değişikliklere yol açarlar (34).

İskeminin başlamasıyla hipoksantin tarafından degrade edilen doku hücrel adenozin trifosfat (ATP) düzeyinde azalma ortaya çıkar (27). İskemi, dokunun normal hücrel fonksiyon ve iyon hemostazı için gerekli olan, yeterli miktardaki ATP'nin oluşmamasına neden olur. Dokuda geri dönüşümsüz hasarın ortaya çıkmasına kadar geçmesi gereken iskemi süresine tolerans zamanı denir. Eğer iskemi süresi tolerans zamanını aşarsa, hücre ölümü ve doku nekrozu gelişir. Geri dönüşümsüz hasar oluşmadan önce iskemik doku reperfüze edilirse doku hasarı gerileyebilir. Reperfüzyon sırasında iskemik doku, oluşan oksijen serbest radikallerine bağlı ek zedelenmeye de maruz kalır. İskemik dokunun reperfüzyonu ile oluşan hasar, oksijen serbest radikallerinin vasıtası ile gelişir (40). İskemik dokuda oluşan serbest oksijen radikallerinin ana kaynağının ksantin oksidaz olduğu kabul edilmektedir (41). Ksantin oksidaz iskemik dokuda hücrenin düşük enerji durumundan dolayı hücre içi Ca konsantrasyonunun artışı tarafından aktive edilen bir proteaz olan ve yaygın şekilde bulunan ksantin dehidrogenaz enziminden oluşur. İskemik dokunun reoksijenasyonu ile ksantin oksidaz, moleküler oksijen ve ATP'nin düşük enerji yıkım ürünü olan hipoksantin reaksiyonu süperoksit radikali ve hidrojenperoksit oluşumu için katalize eder (41).

### 3.2. Serbest Radikaller

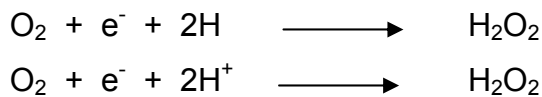
Serbest radikaller bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküllerdir. Bu tip moleküller ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftirler. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metallerinin iyonları ve hidroksil radikalidir. Bunlardan ilk dördünün çeşitli reaksiyonları ile sonuncusu meydana gelir (42).

**a) Süperoksit radikali:** Hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu serbest süperoksit radikal anyonu ( $O_2^-$ ) meydana gelir.

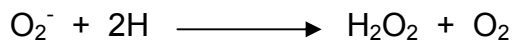


Süperoksit, bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direkt olarak fazla zarar vermez. Asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır (1).

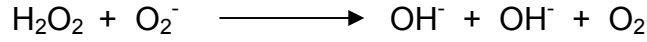
**b) Hidrojen peroksit:** Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü iki hidrojen molekülü ile birleşerek hidrojen peroksiti ( $H_2O_2$ ) meydana getirir (42-44).



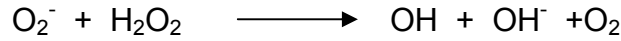
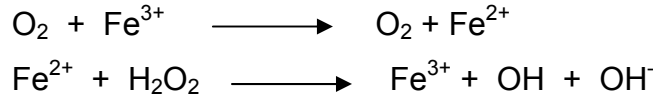
Ancak biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi süperoksidin dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar. Bu reaksiyon spontan oluşabileceği gibi süperoksit dismutaz enzimi ile katalizlenebilir ve radikal olmayan ürünler meydana gelir (42-44).



Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Süperoksit ile reaksiyona girerek, en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir (32, 41, 43).

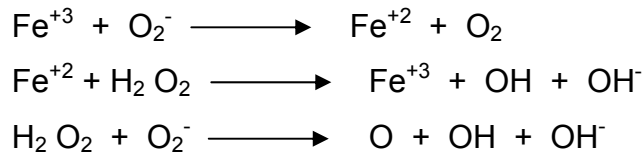


Bu reaksiyon demirle katalizlenir. Önce ferri demir süperoksit ( $\text{Fe}^{3+}$ ) tarafından ferro demire ( $\text{Fe}^{2+}$ ) indirgenir. Sonra bu ferro demir kullanılarak Feton reaksiyonu ile hidrojen peroksitten OH ve  $\text{OH}^-$  üretilir (42, 43).



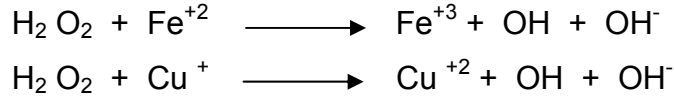
**c) Hidrojen radikali:** Bu radikal (OH), hidrojen peroksidin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesiyle meydana gelir (44). Son derece reaktif bir oksijen radikalidir. Yarılanma ömrü çok kısadır. Oluştığı yerde büyük hasara neden olur. Tioller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak yeni radikallerin oluşmasına neden olur (42, 43).

Doğal enzimler ve glutatyon yetersiz düzeyde ise hidrojen peroksit ve süperoksit ayrı ayrı ortamda serbestleşmiş halde bulunan  $\text{Fe}^{3+}$  veya  $\text{Cu}^{2+}$  ile reaksiyona girerek sonunda en güçlü radikal olan hidroksil molekülünün oluşacağı bir dizi reaksiyon oluştururlar (45, 46).





Hidrojen peroksitin güçlü bir oksidan olan demiroksijen kompleksi (Ferril) oluşturmak için ferroz demir ( $\text{Fe}^{+2}$ ) ile girdiği reaksiyona Fenton reaksiyonu denir. Oluşan Ferril, OH vermek üzere parçalanır. Hidrojen peroksit ferroz demirden daha hızlı olarak bakır ( $\text{Cu}^+$ ) tuzları ile reaksiyona girmektedir (46, 47).



**d) Singlet Oksijen:** Singlet oksijen ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmamasına rağmen çok reaktif olması, üretimi sırasında bazı radikal tepkimeleri oluşturması nedeniyle serbest radikal olarak sayılır. Bu radikalın DNA hasarı oluşturduğu ve mutajenik etkilerinin bulunduğu gösterilmiştir (48, 49).

**e) Nitrojen Oksidler:** Nitrik oksit, serbest radikal olan basit bir gazdır. Memelilerde bulunan en küçük otokoid ve haberci moleküldür. Çok küçük bir molekül olması ve lipofilik olma özelliği, hücre membranlarından kolaylıkla geçmesine izin vermektedir (48, 50). NO, protein fonksiyonlarını değiştirir ve hücre hasarına ya da hücrenin korunmasına aracılık eder.

### 3.3. Serbest Radikallerin Kaynakları

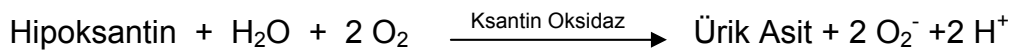
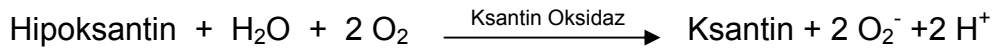
En büyük serbest radikal kaynağı elektron transport zincirinden (ETS) olan elektron sızıntısıdır. Normal oksijen basıncında radikal üretimi mitokondrial oksijen tüketiminin %1–2'si kadarken yüksek  $\text{O}_2$  basıncında bu oran artar. Serbest radikallerin kaynakları biyolojik ve hücre içi olarak ikiye ayrılır. Aktive olmuş fagositlerin, radyasyonun, bağımlılık yapan maddelerin (Alkol ve uyuşturucular), antineoplastik ajanların, çevresel ajanların (hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler, sigara, dumanı) ve stresin (katekolamin artışı ile) etkisi sonucunda oluşan serbest radikaller biyolojik olanlardır. Küçük maddelerin otooksidasyonu (Katekolaminler), enzimler ve proteinler (ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, hemoglobin), mitokondrial elektron transportu, endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri (Sitokrom P–450), peroksizomlar (oksidazlar), plazma membranı

(lipooksijenaz, prostoglandin sentetaz, fagositlerde nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz, lipid peroksidasyonu), oksidatif stres etkenleri (iskemi, travma) ile oluşanlar ise hücre içi kaynaklıdır (1–3).

#### a) Ksantin Oksidaz Sistemi

İskemi (hipoksi) sırasında ATP üretimi durur, ancak kullanımı devam eder. ATP, yüksek enerjili fosfat bağları yıkılarak adenozin monofosfata kadar yıkılıp daha sonra hücre dışına difüzyona uğrayarak burada inozin ve hipoksantine yıkılır. Normalde dokuların oksijene olduğu durumda hipoksantin, ürik aside ksantin dehidrogenaz tarafından metabolize edilir. Bu reaksiyonda NAD elektron alıcısı olarak görev alır (15).

İskemi esnasında hücre ATP düzeyindeki azalma ile birlikte iyon konsantrasyonlarındaki değişikliklerden en önemlisi hücre içi  $\text{Ca}^{2+}$  iyonunun derişiminin artmasıdır. Hücre içi  $\text{Ca}^{2+}$  'un yükselmesiyle Ca ile aktive olan proteazlar aktive olarak ksantin dehidrogenazı (D tip), ksantin oksidaz formuna (O tip) dönüştürürler. Oluşan ksantin oksidaz ortamda biriken hipoksantini ürik aside dönüştürürken NAD yerine reperfüzyonla dokulara ulaşan  $\text{O}_2$ 'yi kullanırlar. Sonuçta ürik asitle birlikte  $\text{O}_2^-$  radikalini oluştururlar (3, 51).



#### b) Fosfolipaz Sistemi

İskemi reperfüzyon hasarında iskemik dokunun reperfüze olmasından kısa bir süre sonra intrasellüler serbest  $\text{Ca}^{2+}$  miktarının hızlıca artması ile plazma membranlarında bulunan Fosfolipaz  $\text{A}_2$  aktive olur. Fosfolipaz  $\text{A}_2$  membran fosfolipidlerinden yağ asitlerini parçalayan hidrolitik bir enzimdir. Bu nedenle araşidonik asit ürünlerinin iskemik dokuda açığa çıkmasına ve nötrofillerden bağımsız olarak endotel hasarlanmasına sebep olur (3, 52, 47). Ayrıca reperfüzyon hasarında araşidonik asit ürünleri (Lökotrien  $\text{B}_4$  ve

tromboksan A<sub>2</sub>) nötrofilleri etkileyerek oluşan hasarı artırırlar. Bu üç mekanizma ile olur.

1- Güçlü birer kemoatraktan rolü oynayarak nötrofil akümülasyonunu sağlarlar ve endotele nötrofillerin adhezyonunu artırırlar. Lökotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) ve tromboksan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>)'nin oldukça potent kemoatraktanlar olduğu bilinmektedir (41). Yapılan çalışmalarda LTB<sub>4</sub> ve TxA<sub>2</sub> inhibisyonunun deneysel miyokard enfarktüsü ve ekstremiteye turnike uygulanması sonrasında, nötrofil diapedezini önemli oranda engellediği gösterilmiştir.

2- Araşidonik asit ürünleri, nötrofilleri aktive ederek daha fazla oranda oksijen radikali ve proteolitik enzim üretmelerine neden olurlar. LTB<sub>4</sub>'ün, nötrofillerden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve elastaz salgılamasında ve nötrofillerin in vitro ve in vivo olarak endotelial geçirgenliğini arttırmasında potent bir stimulatör olduğu gösterilmiştir (53, 54). TxA<sub>2</sub> ise, iskemi reperfüzyon sonrasında nötrofilleri aktive ederek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretmelerini stimüle eder.

3- Lökotrienler ve tromboksanlar, mikrovasküler yatağa doğrudan vazokonstrüktör etki ile reperfüzyon sonrasında bozuk kapiller akıma yol açarlar (47, 55).

#### c) Aktive Nötrofiller

İskemi sırasında ortaya çıkan birçok kemotaktik faktör dokularda anormal ve uygun olmayan nötrofil aktivasyonuna ve inflamatuvar enzimlerin salgılanmasına yol açar (51–56). İskemi- reperfüzyon akut inflamatuvar bir cevap oluşturur ve lipid mediatörlü kemotaktik peptitler ile kompleman sistemini aktive ederek nötrofil kemotaksisini uyarır. Arteriyel kan akımının %80 azaltılmasıyla oluşturulan iskemiden sonra kapiller çıkışında yer alan venüllerde lökosit birikiminin 4–10 kat arttığı, reperfüzyon ile bu oranın 35 katına çıktığı saptanmıştır. Ayrıca kan akış hızının azalması lökositlerin endotele adezyonunu kolaylaştıran önemli bir etkendir (57).

Nötrofiller iskemi sonrası doku hasarını gerek serbest oksijen radikalleriyle gerekse de sitotoksik enzimleri salgılayarak oluştururlar (58). Dolaşımdaki nötrofil aktivasyonunun ya da sayısının azaltılması ile iskemi-reperfüzyon hasarı ile oluşan doku hasarının azaltıldığı görülmüştür. Aynı şekilde lökositlerin endotele adezyonunun önlenmesinde hasarı azaltabilir

(59). Kalp, barsak, iskelet kası, beyin, akciğer ve böbrek gibi pek çok dokuda iskemi–reperfüzyon hasarının oluşumunda aktive lökositler sorumludur.

Lökositlerin oksijen radikallerini üretmek için kullandıkları reaksiyona solunum patlaması (respiratory burst) denir ve burada NADPH oksidaz rol alır. Enzimin aktive olması ile sitoplazmik NADPH'den alınan iki elektron iki molekül oksijene verilerek iki molekül süperoksit açığa çıkarılır.

Nötrofillerde aynı zamanda fagosite edilen mikroorganizmaların yok edilmesinde kullanılan lizozomal myeloperoksidaz sistemi de bulunmaktadır.  $H_2O_2$ , myeloperoksidaz enzimi ile Br, I ve Cl ile tepkimeye girerek HOCl, HOI, HOBr gibi güçlü asitleri oluşturur (23, 60).

Bunların dışında lökositler proteaz, katyonik proteaz, kollagenaz ve elastaz gibi enzimler salgılayarak endotelial hücre glikokaliksini ve bazal membranını harap ederek kapiller geçirgenliği artırır. Kapillerde biriken nötrofiller kapiller lümenin tıkanmasına neden olurlar.

#### **4. Serbest Radikallerin Etkileri**

Serbest radikaller, hücrenin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzimleri gibi tüm önemli bileşiklerine etki edebilirler fakat, lipidler en hassas olanlarıdır (42). Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve dokuya çok zararlıdır. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür. Plazma membranı ve organel lipid peroksidasyonu serbest radikal kaynaklarının tümü ile stimüle edilebilir. Üç yada daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malonildialdehid (MDA) meydana gelir, oluşan MDA, membran bileşenlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olur, bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir. MDA ölçümü lipid peroksit seviyelerinin tespitinde sıklıkla kullanılır. MDA, lipid peroksidasyonunun spesifik bir

indikatörü değildir ancak, lipid peroksidasyonunun derecesi ile iyi bir korelasyon gösterir. (42, 43).

Proteinlerde doymamış bağ içeren moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksektir. Nitekim serum proteinlerinde, kataraktlı lens proteinlerinde ve enflamatuar eklem hastalığı olan kişilerin sinovial sıvılarındaki immunglobulin G (IgG)'lerinde serbest radikal hasarı saptanmıştır.

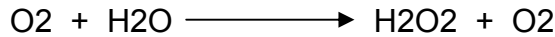
Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit, membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir (42).

#### 4.1. Antioksidan Savunma

Hücreler oksijen serbest radikallerini kontrol altına almak ve zararlarını önlemek için enzimatik ve enzimatik olmayan savunma yollarına sahiptir (60, 61).

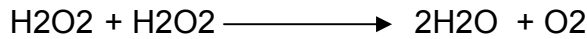
Enzimatik olanlar:

a) Süperoksit dismutaz

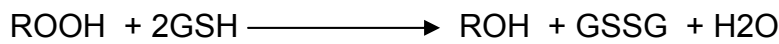


b) Katalaz

Katalaz %80 peroksisomlarda %20 ise sitoplazmada yer alan bir hem-enzimdir. Katalaz enzimi toksik etkileri nedeniyle radikal olmadığı halde reaktif bir molekül olan hidrojen peroksidin ( $H_2O_2$ ) doğrudan suya indirgenmesini katalize eder.



c) Glutatyon peroksidaz



Bu enzimler içinde en önemli olanı redükte glutatyon (GSH) fazlalığında hidrojen peroksidi ortamdaki uzaklaştıran glutatyon peroksidazdır.

Enzimatik olmayanlar: Bunlar direkt serbest radikal gidericilerdir (60).

-Vitamin E:lipid peroksidasyon zincirini kırar.

- Vitamin C: O<sub>2</sub> ve OH- radikali direkt tutar ve vitamin E'yi rejenere eder.
- Vitamin A: Peroksitlere etki eder.
- Seruloplazmin: Demiri okside eder.
- Albumin: Cu<sup>++</sup> bağlar.

## 5. Nitrik Oksit

Nitrik oksit çok sayıda hayati fonksiyonların kontrolünde görev alan bir molekül olup, hücre fonksiyonlarının denetiminde otokrin ve parakrin etkilere sahiptir. Nitrik oksit renksiz bir gaz olup, serbest radikal özelliğine sahip basit bir moleküldür. Diğer radikal türlerinin aksine nitrojen ve oksijen atomları üzerinde delokalize bir şekilde bulunur. Nitrik oksit radikalinin bu özelliği sayesinde kendi reaktivitesini baskılar, stabilitesini artırır ve biyolojik koşullarda sentezlendiği yerden daha uzak mesafelere difüzyonunu kolaylaştırır. Nitrik oksit sentezi için kullanılan öncül biyomolekül arjinin amino asididir. NOS enzimi 2 basamakta arjininden nitrik oksit sentezlerken bir molekülde sitrulin oluşur (50).

Nitrik oksit sentezini katalizleyen NOS enzimlerinin konstitütif (c NOS) ve indüklenebilir (iNOS) olmak üzere iki temel izoformu bulunur. Konstitütif enzimin ayrıca iki formu vardır. Bunlardan endotelial NOS (eNOS) (NOS III) olup, ağırlıklı olarak zarsal bir enzim olup, endotel kaynaklı gevşeme faktörünün sentezinden sorumludur. Konstitütif enzimin ikinci formu ise merkezi sinir sistemi ve nöronlarda haberci molekül olarak kullanılan nitrik oksitin üretiminden sorumlu olup, nöronal NOS (nNOS) (NOS I) olarak adlandırılır.

Konstitütif enzimlerin (eNOS ve nNOS) aktiviteleri mutlak olarak Ca<sup>2+</sup>/Kalmodülin bağımlıdır (50, 62, 63). NOS enzimlerinin indüklenebilir olan izoformu (iNOS, NOS II) ise alt birim olarak kalmoduline ihtiyaç duyar (50, 62). Aktivitesi için hücrede kalsiyum derişiminin artması gerekli değildir.

### 5.1. Nitrik Oksitin Biyolojik Sistemlerdeki Etkileri

Nitrik oksit çok yönlü bir biyolojik haberci molekül olup, farklı konsantrasyonlarda farklı biyolojik etkilere sahip olabilen bir moleküldür. Nitrik oksitin sinir sisteminde nöronal fonksiyonların modülasyonundan, damar düz kaslarının gevşemesine, lökositlerin endotel hücrelerine yapışması ve inflamatuvar dokuya göç etmesinden, trombosit agregasyonunun inhibisyonuna, damar geçirgenliğinin kontrolünden, penil ereksiyona, immün sistemin fonksiyonlarından, böbrekler ve barsaklarda tuz ve su emilimine kadar birçok fonksiyonu mevcuttur (50, 62).

Nitrik oksitin hücreleri sitotoksik etkilere karşı koruyucu özelliğide tanımlanmıştır. Başta oksijen radikalleri olmak üzere diğer atom merkezli radikallerle tepkimeye girerek, kendisinin ve tepkimeye girdiği radikalın reaktivitesini sonlandırır (50).

Sitoprotektif etkisi apoptozide ve diğer sitokinlerle oluşan doku hasarında, hipervalant metaloprotein bileşikleriyle reaksiyona girmesi ve hücre içine demir (Fe) salınımını kontrol etmesiyle de açıklanmaktadır (62). Yine nitrik oksitin lipid peroksitleriyle reaksiyona girerek sitoprotektif etki gösterdiği ortaya konmuştur. Nitrik oksit aynı zamanda lökositlerin hücre yüzeyine tutunmaları ve yapışmalarını inhibe ederek de sitoprotektif etki gösterir.

Nitrik oksitin regülatör ve koruyucu etkilerinin yanı sıra sitotoksik etkileri de mevcuttur. Nitrik oksit çeşitli inflamatuvar olaylar ve hastalıklarda sentezi artan ve sonuçta doku hasarına katkıda bulunan etkenlerden biridir. Artrit, ateroskleroz, doku enfarksiyonları, dejeneratif nöronal hastalıklar ve diyabette nitrik oksit sentezi artar ve üretilen nitrik oksit doku hasarına doğrudan katkıda bulunur (50).

Nitrik oksitin sitotoksik etkisi, demir içeren mitokondrial ve sitozolik enzimlere bağlanarak, sitokromal enzimler ile DNA'da yapısal değişikliğe yol açarak, peroksinitritlerden OH radikalının oluşumuna neden olarak ortaya çıkmaktadır. Nitrik oksit derişimi arttığıında  $O_2^-$  ile reaksiyona girerek peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) bileşimini oluşturur (62).

Nitrik oksitin sitotoksik etkilerinin glikoliz, sitrik asit döngüsü ve özellikle de mitokondri solunumunun inhibisyonundan kaynaklandığı kabul edilmektedir. Nitrik oksit, oksijenle yarışmalı olarak sitokrom oksidaza bağlanıp inhibe eder. Elektron transport sisteminin demir-sülfür (Fe-S) içeren merkezleri (kompleks I ve kompleks III) ve akonitaz enziminin Fe-S merkezleri NO-bağımlı S- nitrozilasyonuna uğrar, demir salınımı gerçekleşir. Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenazın ADP-ribozilasyonu da glikolitik yolun inhibisyonuna neden olur. Görüldüğü gibi NO sentezinin artışı, enerji metabolizmasının her üç yolu üzerinde de inhibitör etkilere sahiptir. Peroksinitrit ve N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> enerji metabolizmasında görev alan proteinlerde yapısal değişimlere neden oldukları gibi, akonitaz enziminin proteolitik yıkımını da hızlandırırlar. Peroksinitrit protonlanarak nitrat anyonu ve hidrojen katyonu oluşturmak üzere yıkıma uğrar. Nitrat anyonu ise hidroksi radikali vermek üzere yeniden yıkılır. Peroksinitritin ve bunun yıkım ürünlerinin demir (Fe) gerektirmeden de lipid peroksidasyonunu başlatabildiğini öne süren çalışmalarda mevcuttur (3).

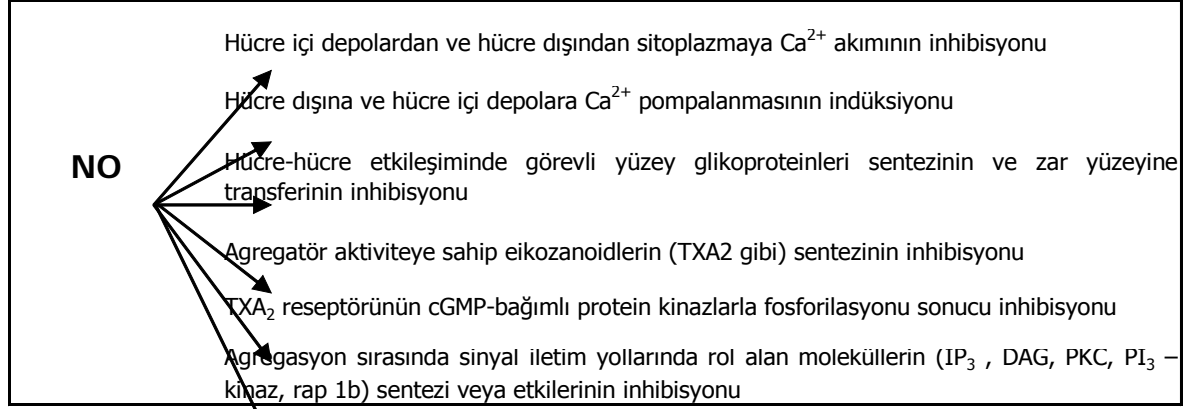
Fizyolojik derişiminin üzerinde NO sentezi her üç NOS izoformunda da görülür. Serebral iskemide kontrolsüz artan Ca<sup>2+</sup>, nNOS'ı aktive ederek beyinde toksik etkilere neden olabilir. Çeşitli anaflaktik reaksiyonlarda aktive olan eNOS vazoaaktif NO sentezini arttırabilir. Çok daha yaygın olarak artan NO sentezinin nedeni iNOS izoformudur. Çünkü bu izoform sentezlendikten sonra aktivitesi kontrol edilemez ve lokal olarak NO derişimini çok arttırabilir (10-100 µM'a kadar). iNOS'dan kaynaklanan NO, damar geçirgenliğini arttırır ve septik şokta olduğu gibi şiddetli hipotansiyona neden olur. Diyabet, romatoid artrit, inflamatuvar ve otoimmün hastalıklarda doku yıkımına yol açar (50).

## **5.2. Platelet Agregasyonunun NO Tarafından İnhibisyonu**

Nitrik oksit, platelet aktivasyonu ve agregasyonunun çeşitli basamaklarında etkili olarak birbirinden farklı mekanizmalarla agregasyonu inhibe eder. Bu etkilerini esas olarak hücre içinde siklik GMP (cGMP) derişimini ve cGMP-bağımlı protein kinazların aktivitelerini kontrol ederek gösterir. Guanilat siklaz inhibitörleri ve cGMP- bağımlı protein kinaz inhibitörleri nitrik oksitin antiplatelet etkilerini azaltırken; cGMP fosfodiesteraz



inhibitörleri, arjinin ya da NO vericileri nitrik oksit bağımlı antiplatelet etkilerini güçlendirirler (Şekil-1).



Şekil - 1: Nitrik oksitin antiplatelet etkilerinin mekanizması.

## 6. cGMP

Çeşitli hormonlar, otokoidler, ilaçlar ve toksinler fizyolojik etkilerinde mesajcı molekül olarak cGMP kullanırlar. GTP'den cGMP sentezini katalizleyen Guanilat Siklaz enzimi sitoplazmik (çözünür) yada zarsal (partikül fraksiyonda) enzim şeklindedir. Nitrik oksit sitoplazmik Guanilat Siklaz (sGC) enzimini aktive ederken peptid hormonları ise zarsal (particulate) Guanilat Siklaz (pGC) enzimini uyarırlar. sGC enzimi yapısında heme ve bakır içerir. Nitrik oksit heme kısmı ile etkileşerek enzim aktivitesini artırır(64). Artan cGMP'de protein kinaz G enzimini aktive ederek intrasitoplazmik  $Ca^{2+}$  düzeyini azaltır (64-67). pGC enzimi ise tek bir polipeptid zincirinden oluşur ve natriüretik peptidlerin membran reseptörleri ile etkileşimi sonucu aktive olur. Üç majör natriüretik peptid vardır: atrial natriüretik peptid (ANP), beyin natriüretik peptid (BNP) ve C-tipi natriüretik (CNP) peptid (64). cGMP'nin etkisine aracılık eden başlıca sistemler:

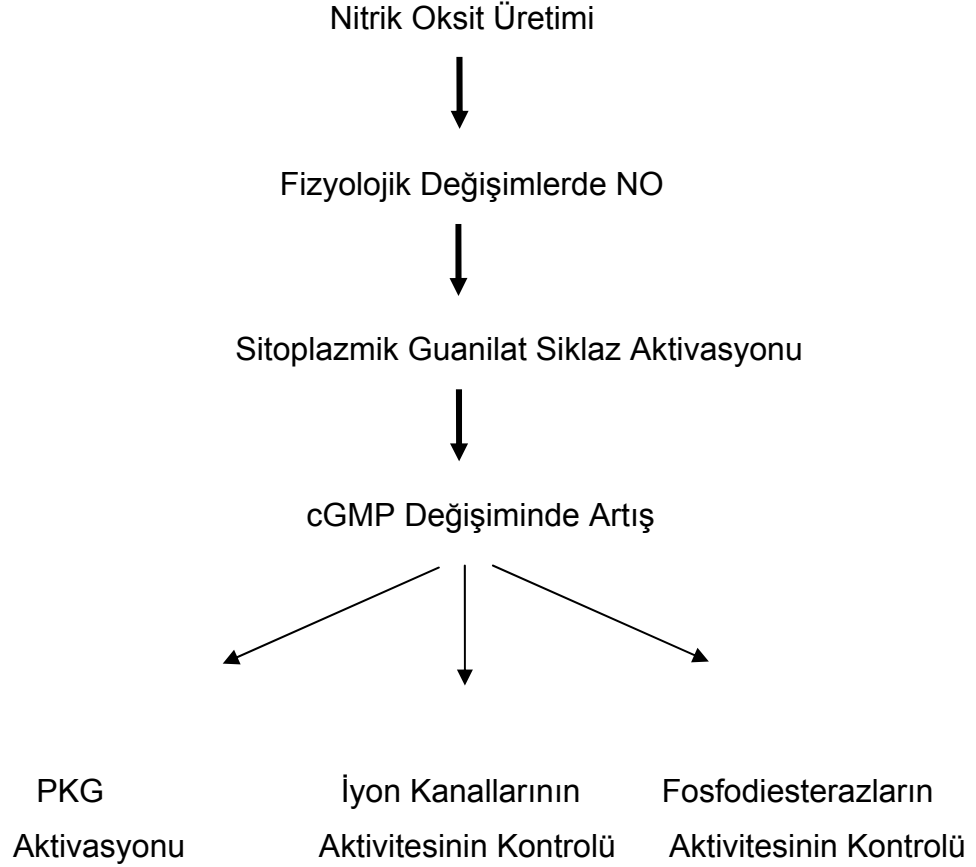
a) cGMP ile kontrol edilen iyon kanalları,

b) cGMP ile kontrol edilen fosfodiesterazlar ve

c) cGMP bağımlı protein kinazlardır (Şekil-2). Retinal rodların ışığa

cevabı, kokuların algılanması, steroidogenez, platelet agregasyonu, böbrek

ve barsaklarda iyon transportu, kardiyak ve düz kasların kasılması cGMP ile kontrol edilen önemli fizyolojik olaylardır (50).



**Şekil-2:** Nitrik Oksit–cGMP aracılığı ile hücrede sinyal iletimi. Bu etkiler özgül olup, fizyolojik derişimlerdeki NO ve cGMP tarafından kontrol edilir.

## 7. Dokuda Oksijen Radikallerinin Oluşumu

Normal metabolizmadaki reaktif oksijen ana kaynaklarından biri mitokondrial respirasyondur (68). Mitokondrial respiratuar zincirin son basamağı moleküler oksijenin tek adımda tetravalent redüksiyonudur. Mitokondrial dış membranda bulunan NADPH oksidaz yardımı ile süperoksit ortama çıkar (60). Reaktif oksijenin mitokondrial üretimi ile iskemi ve reperfüzyonda artış gösterir (69, 70). Peroksizomal beta oksidasyon, yağ asidi oksidasyonunun önemli bir bölümünü oluşturur ve bu nedenle sabit bir hidrojen peroksit kaynağıdır (71). Siklooksijenaz ve lipooksijenaz yoluyla oluşan prostaglandin ve lökotrienlerin

oluşumunda lipid peroksitler aracı olarak rol alırlar (60). Bu yollar serbest araşidonik asit, süperoksit, hidrojen peroksit ve lipid peroksitler tarafından stimüle edilirler ve bu yolların reaktif oksijen çeşitlerini oluşturdukları gösterilmiştir (72, 73). Buna ek olarak, iskemi serbest araşidonik asidin artışına neden olur ve reperfüzyon sırasında bu yolları oksijen radikal kaynağı gibi kullanır (73, 74).

Reperfüzyon sırasında açığa çıkan noradrenalin radikal oluşumuna katkıda bulunur (60). Katekolaminlerin otooksidasyonu süperoksit açığa çıkarır (75). Endotel kaynaklı nitrik oksit de bir radikaldir ve süperoksitle reaksiyona girer. Nitrik oksit ve süperoksit arasındaki reaksiyon, peroksinitrit oluşumuna neden olur ve bu da endotel zedelenmesini başlatabilen hidroksil benzeri radikale dönüşür (76). İnvivo olarak granülosit aktivasyonunun oksijen tüketiminde ani bir artışa neden olduğu gösterilmiştir. Oksijen tüketiminin %90'ı, aktive NAD(P)H oksidaz tarafından süperokside dönüştürülür. Süperoksit ise hidrojen perokside dönüşür. Hidrojen peroksit ise, bakterilere toksik olduğundan bakterileri öldüren hipoklorous asid oluşumunda kullanılır (60).

## **8. Renal İskemi ve Reperfüzyonun Neden Olduğu Histopatolojik Değişiklikler**

Reperfüze edilen dokular birçok deneysel modelde süperoksit veya hidroksil radikallerinin oluşumu allopurinol veya ksantin oksidazın diğer inhibitörleri ile korunabilmektedir (77, 78). Renal korteks kan akımı, postiskemik renal kortekste 24 saatte reperfüzyon ile kontrole göre %12 oranında azalmaktadır. Bu düşüş;

1-Tubuloglomerüler arterioler vazokonstriksiyon

2-Hücre sel şişme, tübüler obstrüksiyon, interstisyel ödeme bağlı intrarenal basınç artışı

3-Lökosit tıkaçları ve kırmızı hücrelerin dış medulladan sızmasına bağlı vasküler obstrüksiyona bağlı olabilir (79).

Kan akımında düzensiz dağılım söz konusudur. Kan akışı bazı kapillerlerde azalma ile kalmaz, tamamen durur. Etkilenen proksimal tübüller

reperfüzyon sırasında sıcak iskemi nedeniyle hasarlanırlar ki bu da renal fonksiyonun düzelmesinde yavaşlamaya neden olur. Reperfüzyon sırasında tübüler lümen çapı artar, proksimal tübüllerden ortaya çıkan döküntüler tübülleri tıkayarak Henle kulpu ve proksimal tübüllerde sıvı alımına direnç oluşturur, sellüler hasar nedeniyle tübüler su reabsorpsiyonu bozulur, kapiller dilatasyon dış medulla toplayıcı tüplerine basıyla intratübüler basıncı artırır. Bunların sonucunda kan akımı %12 azalırken glomerüler filtrasyon hızı %90 azalır (79).

## 9. Tadalafil

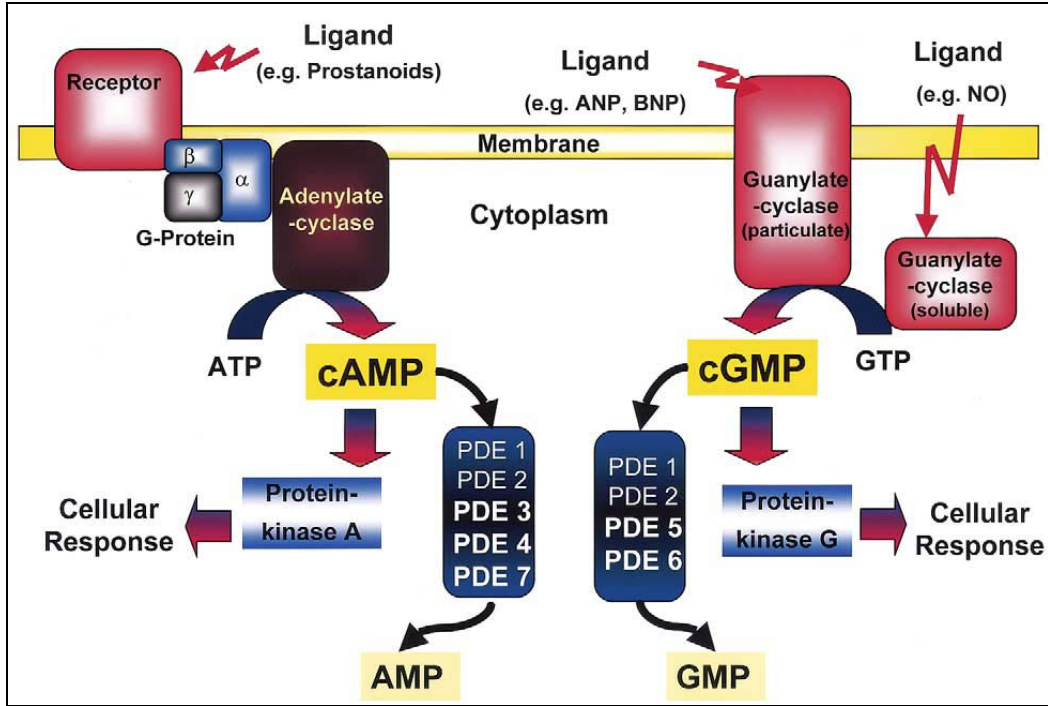
PDE; 50 yıl önce, ikincil haberci siklik adenozin 3',5'-monofosfat (cAMP)'in aktivitesini bloke etmek için hayvan modellerinde keşfedilen bir enzimdir. PDE üst familyası, 21 tek gen üzerindeki PDE1'den PDE11'e kadar olan 11 familyayı içerir. Bunlar; öncelikle vasküler, visseral ve pulmoner düz kas olmak üzere çeşitli dokulara dağılmışlardır ve birçok organ sisteminin fizyolojik fonksiyonlarını düzenlerler. cGMP yıkımını önlemeleri sayesinde, PDE5 inhibitörleri, cGMP'nin bioyararlanımında artış yaratırlar. Her ikisi de, düz kasın stimülasyon ile NO aracılı relaksasyonunu kolaylaştırır ve potansiyelize eder. Kafein ve teofilin, PDE enzimini inhibe ettiği onlarca yıl önce bulunmuş ilk ilaçlardandır. Geçen 30 yıl süresince, çeşitli PDE ailelerinin inhibitörleri bir grup hastalığın tedavisi için geliştirilmiştir. Bunlardan, PDE3 inhibitörü olan milrinone ve amrinone kalp yetmezliği için, PDE4 inhibitörü olan cilostazol klodikasyon için geliştirilmiştir; anti-platelet etkisi olan dipiridamol de PDE8, PDE9 ve PDE5'i inhibe eder (Şekil-3).

Başlangıçta anjina pectoris tedavisi için araştırılan ilk oral PDE5 inhibitörü sildenafilin, çalışmada yer alanlarda ereksiyona yol açtığı rastlantı eseri bulunmuştur. Sonrasında sildenafil 1998'de erektil disfonksiyonun ilk oral tedavisi olarak piyasaya çıkarılmış ve 2003'te yine PDE5 inhibitörü olan iki ilaçla, vardenafil ve tadalafil, takip etmiştir (80).

Tadalafilin moleküler yapısı, yapıları birbirine benzer olan sildenafil ve vardenafilten farklıdır. Her üçü de heterosiklik nitrojen-içeren çift halkalı sisteme ve santral halkaya sahiptir. Bu santral halka cGMP analogudur ve

ilaçların PDE5'in katalitik bölgesine yarışmalı bağlanmasını sağlar. Tadalafil bir  $\beta$ -carboline-type PDE5 inhibitörü olarak farklılık gösterir, sildenafilin yapısındaki hidantoin halkasının modifiye bir formu olan piperazinedione halkasına sahiptir.

Vasküler sistemdeki bir grup fizyolojik süreç NO/cGMP sinyal yolları ile kontrol edilir. Endotelde lokal olarak üretilen NO, cGMP sentezi ile sonuçlanacak olan çözülebilir guanilil siklaz (sGC) stimülasyonu ile vasküler tonusu düzenler. Sonuç olarak meydana gelen intraselüler cGMP konsantrasyonlarındaki artış; kalsiyum iyon kanal modülasyonu yapma ve vasküler düz kas kontraktıl proteinlerinin kalsiyum duyarlılıklarını azaltma yoluyla vazodilatasyon sağlayacak olan cGMP bağımlı protein kinazları aktive eder. İntraselüler cGMP, siklik nükleotid fosfodiesterazlarının (PDE'ler) aktivitesi ile hızla GMP'ye inaktive edilir. Bu nedenle, düz kas hücreindeki cGMP konsantrasyonu temel olarak; bu ikincil haberci için eşsiz bir yıkım yolağı olan; sGC tarafından yapılan üretim ile PDE'ler tarafından yapılan yıkım arasındaki dengeye bağlıdır. Fosfodiesteraz tip 5 (PDE5) selektif olarak; cAMP'yi değil; cGMP'yi yıkar ve PDE5 aktivitesi vasküler tonus regülasyonu ile güçlü biçimde ortaya çıkar. Bundan dolayı PDE5 aktivitesinin farmakolojik modülasyonu, bu kontrolü elde edebilmek için etkin bir araç olur. Kulkarini ve arkadaşları revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu ile fosfodiesteraz tip 5 enziminin renal dokuda mevcudiyetini göstermişlerdir (80, 81).



**Şekil-3:** Nitrik oksit (NO), prostanoid, ve natriüretik peptitlerin intraselüler sinyal iletiminde fosfodiesterazların (PDE) rolü.

NO, çeşitli fizyolojik ve patolojik durumlara dahil olan bir anahtar moleküldür. NO'nun hücre fonksiyonları üzerinde düzenleyici, koruyucu ve zararlı etkileri olduğunun anlaşılmasından bu yana, NO donörleri ve antagonistleri, çok sayıda çalışmada I/R hasarının önlenmesinde test edilmiştir. NO'nun çeşitli ikincil mesajcı kaskadları üzerinden etki ettiği gösterilmiştir; ancak etkilerinin çoğu siklik guanozin monofosfat (cGMP) aracılığıyla meydana gelir. NO, cGMP üretimini, sadece vasküler yapılarda değil, aynı zamanda proksimal tübüllerde, çıkan kalın kolda ve toplayıcı duktuslarda da stimüle eder. cGMP, I/R hasarı sırasında intraselüler kalsiyum düzeylerinin regülasyonunda ve trombosit fonksiyonlarının modülasyonunda önemli bir rol oynar. Birbiriyle bağlantılı olaylar dizisi olan I/R hasarına birçok faktör katılsa da, biz fosfodiesteraz tip 5 (PDE5) inhibitörleri ile indirgenmenin engellenmesi sonucu artan cGMP değerlerinin I/R hasarını azaltıp azaltamayacağını sorguladık. Bu hipotezi ortaya koymak için, renal I/R hasarında, bir PDE5 inhibitörü olan Tadalafilin etkilerini histopatolojik ve biyokimyasal parametreler kullanarak ortaya koymayı hedefledik (1, 2).

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Deney Hayvanları

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında yetiştirilen ağırlıkları 250–300gr arasında değişen toplam 36 adet Spraque Dawley cinsi dişi rat kullanıldı. Deney öncesi 12 saatlik süreçte yem verilmedi.

### Deney Protokolü

Bütün deneklere anestezi amacıyla ketamin ve kas gevşetici olarak xylazin intramusküler olarak verildi. Cerrahi uygulanan hayvanlara orta hat abdominal insizyonla laparotomi yapıldı. Hayvanların vücut ısılarının korunması amacıyla eksternal ısıtma sağlandı. Deney sonunda bütün ratlar yüksek doz anesteziyle sakrifiye edildi.

### Denek Grupları

Ratlar her bir grupta 6 adet hayvan olmak üzere toplam 6 gruba ayrıldı. Anestezi sağlanması sonrası orta hat abdominal insizyonla laparotomi yapıldı ve tüm ratlarda sağ nefrektomi uygulandı (Tablo–1).

**Tablo–1:** Denek grupları.

GRUP 1	Kontrol grubu
GRUP 2	Sham grubu
GRUP 3	İskemi grubu
GRUP 4	İskemi–reperfüzyon grubu
GRUP 5	Tadalafil verilen iskemi grubu
GRUP 6	Tadalafil verilen iskemi–reperfüzyon grubu

### **1. Kontrol Grubu**

Anestezi sağlanması sonrası orta hat abdominal insizyonla laparotomi yapıldı. Sağ renal pedikül eksplore edilip sağ nefrektomi yapıldı. Alınan spesimen kontrol grubu olarak ayrıldı.

### **2. Sham Grubu**

Anestezi sağlanması sonrası orta hat abdominal insizyonla laparotomi yapıldı. Sağ renal pedikül eksplore edilip sağ nefrektomi yapıldı. Takiben sol renal vasküler pedikül izole edilip diğer gruplardaki kadar sürenin geçmesi beklendi (105 dakika) ve sol nefrektomi yapıldı. Alınan spesimen sham olarak ayrıldı.

### **3. İskemi Grubu**

Anestezi sağlanması sonrası orta hat abdominal insizyonla laparotomi ve sağ nefrektomi yapıldı. Sol renal vasküler pedikül izole edilip vasküler bulldog ile klempe edilip böbrek kan akımı engellendi. 45 dakika iskemi süresi beklenilip süre sonunda klempe kaldırılmadan nefrektomi yapıldı.

### **4. İskemi – Reperfüzyon Grubu**

Anestezi sağlanması sonrası orta hat abdominal insizyonla laparotomi ve sağ nefrektomi yapıldı. Sol renal vasküler pedikül izole edilip vasküler bulldog ile klempe edilerek böbrek kan akımı engellendi. 45 dakika iskemi süresi beklenilip süre sonunda klempe kaldırılarak böbreğin 1 saat kanlanması sağlandı. Süre sonunda sol nefrektomi yapıldı.

### **5. Tadalafil + İskemi Grubu**

Bütün ratlara anestezi öncesi 1ml olacak şekilde suda çözülmüş Tadalafil 1mg /kg dozunda oragastrik lavaj ile verildi. Anestezi sağlanması sonrası orta hat abdominal insizyonla laparotomi ve sağ nefrektomi yapıldı. Sol renal vasküler pedikül izole edilip vasküler bulldog ile klempe edilip böbrek kan akımı engellendi. 45 dakika iskemi süresi beklenilip süre sonunda klempe kaldırılmadan nefrektomi yapıldı.

### **6. Tadalafil + İskemi – Reperfüzyon Grubu**

Bütün ratlara anestezi öncesi 1ml olacak şekilde suda çözülmüş Tadalafil 1mg /kg dozunda oragastrik lavaj ile verildi. Anestezi sağlanması sonrası orta hat abdominal insizyonla laparotomi ve sağ nefrektomi yapıldı.



Sol renal vasküler pedikül izole edilip vasküler buldog ile klempe edilip böbrek kan akımı engellendi. 45 dakika iskemi süresi beklenilip süre sonunda klempe kaldırılarak böbreğin 1 saat kanlanması sağlandı. Süre sonunda sol nefrektomi yapıldı.

Alınan tüm böbrek dokuları orta hattan geçecek şekilde 2 parçaya ayrıldı. Biyokimyasal inceleme öncesi tüm dokular dondurulup -85°C de saklandı.

### **Histopatolojik Değerlendirme**

Böbrekler %10 formalin solüsyonu ile tespit edildi. Böbrekler rutin takip işlemine alınarak parafine gömüldü, parafin bloklardan 3 mikron kalınlıkta hazırlanan kesitler hematoxilen eozin (HE) ile boyanarak ışık mikroskobu ile Tablo-2'deki histolojik sınıflama esas alınarak değerlendirildi.

**Tablo-2:** Histolojik skorum.

<b>Histolojik bulgu</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
Tübüler nekroz	yok	Hafif	Orta	Şiddetli
Tübüler atrofi	yok	Hafif	Orta	Şiddetli
Reaktif atipi	yok	Hafif	Orta	Şiddetli
Fırçamsı kenar kaybı	yok	Hafif	Orta	Şiddetli
Hidropik dejenerasyon	yok	Hafif	Orta	Şiddetli
Glomeruler skleroz	yok	Hafif	Orta	Şiddetli
Bowman kapsül genişlemesi	yok	Hafif	Orta	Şiddetli
İnterstisyel fibrozis	yok	Hafif	Orta	Şiddetli
İnterstisyel inflamasyon	yok	Hafif	Orta	Şiddetli

### **Biyokimyasal İnceleme**

#### **Dokuda Lipid Peroksidasyon (MDA) Ölçüm Yöntemi**

**Prensip:** Dokudaki Lipid Peroksitlerin TBA ile asit pH'da 100C'de oluşturduğu kromojenin n-bütanol ile ekstrakte edildi ve oluşan renk şiddeti 532 nm'de spektrofotometride okundu. Ayıraçlar olarak: %1.15 KCL, %8.1

SDS (sodyum dosesil sülfat ), %20 Asetik asit ( pH 3.5.NaOH), %0.8 TBA, N–Bütanol / Piridin ( 15:1 volum) ve Standart TEP kullanıldı.

**Doku Hazırlama:** 250 mg doku dereceli tüpe konuldu, 2.5ml' KCL ile tamamlandıktan ve homojenize edildikten sonra 0.2 ml homojenata 3 ml %1 lik fosforik asit ve 1 ml %0.67 lik TBA eklenerek karıştırıldı. Tüpler kaynayan suda 45 dakika bekletilip soğuması sonrası TBARS n–bütanol yardımı ile kırmızı ışığın 532 nm deki absorpsiyonuna göre ölçüldü. Dokulardaki lipid peroksidasyonu seviyesi nanomole/gram yaş doku olarak belirlendi (79 ).

### **İstatistiksel Analiz**

MDA tayini ve histopatolojik değişkenlerin 6 grup arası karşılaştırmalarda Kruskal–Wallis testi kullanıldı. Farklılık çıkan değişkenlerin 2 grup karşılaştırmalarında Mann–Whitney U testi kullanıldı. Anlamlı farklılıkların hangi gruplar için söz konusu olduğu tespit edildi. İstatistiksel analizler bilgisayar ortamında SPSS–11 yazılım programıyla yapıldı. Grup değerleri ortalama +/- standart deviasyon (SD) olarak gösterilirken, gruplar arası karşılaştırmada p değeri 0.05'in altında olan durumlar anlamlı farklılık olarak kabul edildi.

## BULGULAR

### Histopatolojik Değerlendirme

**Kontrol** ve **Sham** grupları arasında túbúler histopatoloji ve nekroz açısından anlamlı fark bulunmadı. **Kontrol** ve **İskemi** grupları arasında túbúler nekrozun ( $p = 0.026$ ), reaktif atipinin ( $p = 0.015$ ) ve fırçamsı kenar hasarının ( $p = 0.015$ ) önemli farklılık gösterdiği görüldü. **Kontrol** ve **İskemi Reperfüzyon** gruplar arasında túbúler histopatoloji açısından anlamlı fark bulundu ve bu gruplarda túbúler nekrozun önemli farklılık gösterdiği görüldü ( $p=0,004$ ). **Kontrol** ve **Tadalafil** verilen **İskemi** grupları túbúler nekroz ( $p = 0.002$ ), reaktif atipi ( $p= 0.002$ ), fırçamsı kenar hasarı ( $p = 0.004$ ) ve hidropik dejenerasyon ( $p = 0.004$ ) açısından karşılaştırıldığında anlamlı fark bulundu. **Kontrol** ve **Tadalafil** verilen **İskemi Reperfüzyon** gruplar arasında túbúler histopatoloji ve nekroz açısından karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmadı.

**Sham** ve **İskemi** grupları arasında túbúler nekrozun ( $p = 0.015$ ), reaktif atipinin ( $p = 0.009$ ) ve fırçamsı kenar hasarının ( $p = 0.015$ ) önemli farklılık gösterdiği görüldü. **Sham** ve **İskemi Reperfüzyon** grupları arasında túbúler nekrozun ( $p = 0.015$ ), reaktif atipinin ( $p = 0.041$ ) ve fırçamsı kenar hasarının ( $p = 0.004$ ) önemli farklılık gösterdiği görüldü. **Sham** ve **Tadalafil** verilen **İskemi** grupları arasında túbúler nekrozun ( $p = 0.002$ ), reaktif atipinin ( $p = 0.002$ ), fırçamsı kenar hasarın ( $p = 0.004$ ) önemli farklılık gösterdiği görüldü. **Sham** ve **Tadalafil** verilen **İskemi Reperfüzyon** grupları arasında túbúler nekrozun ( $p = 0.015$ ) ve fırçamsı kenar hasarının ( $p = 0.041$ ) anlamlı farklı olduğu görüldü.

**İskemi–İskemi Reperfüzyon** grupları ve iskemi–**Tadalafil** verilen **İskemi** grupları arasında túbúler histopatoloji ve nekroz açısından anlamlı fark bulunamadı. **İskemi** ve **Tadalafil** verilen **İskemi Reperfüzyon** gruplar arasında fırçamsı kenar hasarı açısından anlamlı fark görüldü ( $p = 0.015$ ).

**İskemi Reperfüzyon–Tadalafil** verilen **İskemi** grupları ve **iskemi Reperfüzyon–Tadalafil** verilen **İskemi Reperfüzyon** grupları arasında tübüler histopatoloji ve nekroz açısından karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunamadı. **Tadalafil** verilen **İskemi** ve **Tadalafil** verilen **İskemi Reperfüzyon** grupları arasında tübüler nekroz ( $p = 0.009$ ) ve fırçamsı kenar hasarının anlamlı farklı olduğu görüldü ( $p = 0.002$ ) (Tablo 3 – 5).

**Tablo–3:** Tübüler nekroz açısından her bir grup için ortalama, ortanca ve standart deviasyon değerleri.

<b>GRUPLAR</b>	<b>n</b>	<b>Ortalama</b>	<b>Standart Deviasyon</b>	<b>Ortanca</b>
Kontrol	6	0,5000	0,54772	0,5000
Sham	6	0,0000	0,00000	0,0000
İskemi	6	2,0000	0,98319	1,8333
İskemi+Reperfüzyon	6	2,0000	1,03280	1,6667
İskemi+Tadalafil	6	2,0000	0,51640	2,3333
Tadalafil+İskemi+ Reperfüzyon	6	1,0000	0,63246	1,0000

**Tablo–4:** Reaktif atipi açısından her bir grup için ortalama, ortanca ve standart deviasyon değerleri.

<b>GRUPLAR</b>	<b>n</b>	<b>Ortalama</b>	<b>Standart Deviasyon</b>	<b>Ortanca</b>
Kontrol	6	1,0000	0,63246	1,0000
Sham	6	1,0000	0,40825	0,8333
İskemi	6	3,0000	0,81650	2,6667
İskemi+Reperfüzyon	6	2,5000	1,16905	2,1667
İskemi+Tadalafil	6	3,0000	0,40825	2,8333
Tadalafil+İskemi+ Reperfüzyon	6	1,0000	0,40825	1,1667

**Tablo–5:** Fırçamsı kenar hasarı açısından her bir grup için ortalama, ortanca ve standart deviasyon değerleri.

<b>GRUPLAR</b>	<b>n</b>	<b>Ortalama</b>	<b>Standart Deviasyon</b>	<b>Ortanca</b>
Kontrol	6	0,0000	0,40825	0,1667
Sham	6	0,0000	0,40825	0,1667
İskemi	6	2,0000	0,98319	1,8333
İskemi+Reperfüzyon	6	2,0000	0,75277	1,8333
İskemi+Tadalafil	6	2,0000	0,89443	2,0000
Tadalafil+İskemi+ Reperfüzyon	6	1,0000	1,03701	1,1944

### **Biyokimyasal Bulgular**

#### **Lipid Peroksidasyonu**

**Kontrol ve Sham, Kontrol ve İskemi, Kontrol ve Tadalafil verilen İskemi, Sham ve İskemi, Sham ve Tadalafil verilen İskemi, İskemi Reperfüzyon ve Tadalafil verilen İskemi Reperfüzyon** gruplar arasında lipid peroksidasyonu açısından  $p>0,05$  düzeyinde anlamlı fark bulunmadı.

**Kontrol ve İskemi Reperfüzyon** ( $p=0,004$ ), **Kontrol ve Tadalafil verilen İskemi Reperfüzyon** ( $p=0.004$ ), **Sham ve İskemi Reperfüzyon** ( $p=0.002$ ), **Sham ve Tadalafil verilen İskemi Reperfüzyon** ( $p=0.002$ ), **İskemi ve İskemi Reperfüzyon** ( $p=0.002$ ), **İskemi ve Tadalafil verilen İskemi** ( $p=0.041$ ), **İskemi ve Tadalafil verilen İskemi Reperfüzyon** ( $p=0.002$ ), **İskemi Reperfüzyon ve Tadalafil verilen İskemi** ( $p=0.002$ ), **Tadalafil verilen İskemi ve Tadalafil verilen İskemi Reperfüzyon** ( $p=0.002$ ) gruplar arasında lipid peroksidasyonu açısından anlamlı fark bulundu (Tablo–6).

**Tablo-6:** Lipid peroksidaz enzim aktivitesi açısından her bir grup için ortalama, ortanca ve standart deviasyon değerleri.

<b>GRUPLAR</b>	<b>n</b>	<b>Ortalama</b>	<b>Standart Deviasyon</b>	<b>Ortanca</b>
Kontrol	6	445,3500	100,84878	416,3933
Sham	6	439,7650	46,05859	443,1017
İskemi	6	427,9100	99,60371	467,1567
İskemi+Reperfüzyon	6	194,1900	27,25484	195,7383
İskemi+Tadalafil	6	296,5100	156,94403	352,3250
Tadalafil+İskemi+ Reperfüzyon	6	160,4650	64,67750	182,5567

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Belirli bir süreden uzun süren renal iskemi, etkilenen hücrelerin ölümü ile sonuçlanır. Başlangıçta etkilenen hücreler, geri dönüşebilen doku hasarı fazına girer. Bu fazdaki hücrelerin reperfüzyonla normale dönme şansları vardır. Ancak iskemi süresi arttıkça hücrelerin geri dönüşümsüz doku hasarı fazına girmeleri kaçınılmaz olur. Bu hücreler reperfüze edilseler bile doku hasarı kalıcılık gösterir (30). Geçici iskemi sonrası ortaya çıkan doku hasarı ve fonksiyonel kayıplar, bazı fizyopatolojik mekanizmaların birlikte ve çoğu zaman da birbiri ile ilişkili ortaya çıkmasına bağlıdır. Bunlar; enerjiye gereksinim gösteren taşıma sistemdeki bozulmalar, iskemi sırasında uyarıcı aminoasitlerin açığa çıkması hücre içi kalsiyumun artması ve buna bağlı olarak kalsiyum tarafından yürütülen bazı süreçlerin bozulması gibi mekanizmaları içermektedir (42, 45). Bütün bunların yanında iskeminin dokuya verdiği hasarın geri dönüşebilmesi için, reoksijenasyon gereklidir fakat reperfüzyonla iskemik dokudaki hasara ek bir hasar eşlik etmekte ve bu hasarın tümüne iskemi–reperfüzyon hasarı denilmektedir (32, 41). Yapılan çalışmalarda, böbreğin iskemik hasarında serbest radikallerin rol oynadığı ve bu hasarın farmakolojik ajanlarla geri çevirebileceği gösterilmiştir (13, 19). Serbest radikaller, yüksek oksijen kapasitelerinden dolayı şiddetli doku hasarına yol açabilirler. Hücre membranında lipid peroksidasyonu, protein ve nükleik asit modifikasyonu ve hücre kalsiyum hemostazında değişiklik yapar (42).

İskemik dokunun reperfüze edilmesi, doku canlılığı için zorunlu olsa da reperfüzyonun ek bir hasara yol açması kaçınılmazdır (11, 26, 35). Serbest radikaller; lipid peroksidasyonu, protein veya nükleik asit moleküllerin çapraz bağlarının degradasyonuna yol açarak hücreye birçok zarar veriler (17).

Protein aktivitesindeki değişiklikler hücre membranları iyon kanallarında ve taşıyıcı proteinlerinde ani aktivasyon ve deaktivasyonlara yol açar. Na, K, Ca, Mg gibi iyonların geçirgenliğinde ani değişiklikler oluşturular. İskemi süresince geri dönüşebilen hücre hasarı fazında olan dokular,

reperfüzyonla nekrotik hale gelebilmektedir (51). Doku hasarında reperfüzyonun bu etkisi, son yıllarda birçok çalışma ile gösterilmiştir (16, 19, 61). Bizde bu çalışmada 45 dakika iskemi ve 1 saat reperfüzyon oluşturup; iskemi–reperfüzyon hasarı ve bu hasarın Tadalafil ile ne kadar önlenebildiğini lipid peroksidasyon ve histopatolojik açıdan araştırdık. Reperfüzyon hasar mekanizması halen tam olarak açıklanamamakla birlikte serbest radikaller ve iyon hemostazındaki değişiklikler sorumlu tutulmaktadır. Hücre ölümünün ana nedenlerinden biri Ca'un aşırı derecede birikimi olabilir. İskemi–reperfüzyon sonrası serbest radikaller membran hasarına yol açıp, hücre Ca'da artışa neden olabilir (51). Yapılan çalışmalarda iskemi–reperfüzyon hasarı hücre içi Ca artışı ile açıklanmış Ca kanal blokörleriyle hasarın azaltabilmesi buna örnek gösterilmiştir (46, 27).

Dokuların iskemiye dayanma süreleri birbirinden farklıdır (38). Böbrek için bu süre 30 dakika olarak bildirilmiştir (23, 57). Bu çalışmada böbrek dokusunun iskemiye dayanma süresinin Tadalafil profilaktik uygulaması ile artırmayı amaçladık. Bu nedenle geri dönüşümsüz hasar oluşma sınırının üzerinde olan 45 dakikalık iskemi süresini uyguladık. İskemi–reperfüzyonun dokusunda oluşturduğu hasarı önlemek için Süperoksit Dismutaz, Katalaz (14), Nitrik Oksit (33), Trimetazidin (40, 19), Vitamin E (54), Allopürinol (16) gibi birçok ajan denenmiş ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Serbest radikallerin direk ölçümü oldukça zor teknikler gerektirir (42).

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan LooH ve konjuge dienler; daha sonra alkalen aldehit, hidroksialkallen aldehid, malonildialdehid (MDA) ve uçucu hidrokarbon gibi çok sayıda ürünleri oluşturmak üzere parçalanırlar (1). Bu çalışmada lipid peroksidasyonu ürünü olan MDA ölçülerek lipid peroksidasyonu indirekt olarak gösterilmiştir.

Çalışmada böbrek dokusunun MDA düzeyleri değerlendirildiğinde, kontrol grubuna göre plasebo uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek sonuçlar elde edilmiştir. Tadalafil grubunda ise, kontrol grubuna göre yüksek sonuçlar elde edilmesine karşın, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tadalafil grubu plasebo grubuyla karşılaştırdığında, plasebo grubunun MDA düzeyleri istastiksel olarak anlamlı



derecede yüksek olarak izlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, Tadalafilin iskemi–reperfüzyona maruz kalan böbreklerde lipid peroksidasyonunu anlamlı derecede önlediği düşünülmüştür. Serbest radikallerin, lipid peroksidasyonu gibi mekanizmalarla membran geçirgenliği ve bütünlüğünü bozarak şiddetli membran hasrasına yol açtığı bilinmektedir (38).

İskemik durumlarda, dokuda hücre fonksiyonlarının yürütülmesi ve membran bütünlüğünün korunması için gerekli olan mitokondrial ATP üretiminde bir zamanla ortaya çıkmaktadır (32). Tadalafilin enerji kaynakların birisi olan yağ asitlerinin kullanıma girmesini sağlayarak, mitokondrial ATP üretiminde bir artışa neden olup membran fonksiyonlarının korunmasıyla lipid peroksidasyonunu önlediğini düşünmekteyiz. Lipid peroksidasyonundan serbest radikallerin sorumlu olduğu düşünülürse Tadalafil bu etkiyi direkt serbest radikal giderici fonksiyon ile de sağlamış olabilir. Süperoksit dismutaz'ın renal hasarı önlemedeki yararlı etkileri bu ajanın serbest radikal giderme ve nötrofil migrasyonunu önleme yetenekleri ile açıklanmaktadır (14).

İskemik dokuda ATP üretimindeki azalmanın hücre membranında ATP bağımlı iyon taşıma sistemlerini etkileyeceği açıktır. Her ne kadar Na taşınmasının çoğu pasif difüzyonla elektrokimyasal gradient sağlıyor olsa da enerji gereksinimini gösteren diğer iyon, taşıma sistemlerindeki bozuklukların hücre elektrokimyasal gradientini değiştirip, Na hemostazını etkileyecektir. Tadalafil, hücre ATP seviyesini artırarak enerji bağımlı çalışan iyon kanallarının fonksiyonlarını koruyup, hücre iyon hemostazında bozulmayı önleyerek ödem oluşumunu azalttığını düşünmekteyiz. Hücre iyon hemostazının düzenli yürümesi için membran bütünlüğü gerekmektedir. Serbest radikaller, proteinleri de olumsuz etkilendiği bilindiğinden (28), hücre membranında bulunan taşıyıcı protein kanallarının da iskemi–reperfüzyondan etkilenebileceği ve hücre iyon hemostazının bozulabileceği düşünülür. Bu durumda, Tadalafilin direkt serbest radikal giderici etkisinin bu hasarın ortadan kaldırılmasında rol aldığı düşünülebilir.

Bu çalışmada Tadalafil verilen iskemi grubunda tübüler hasar ve nekroz açısından iskemi grubundan farklılık görülmedi. Tadalafil verilen

iskemi–reperfüzyon grubunda da iskemi–reperfüzyon grubundan farklılık görülmedi. Tadalafil verilen iskemi grubunda ve Tadalafil verilen iskemi–reperfüzyon grubunda göre tübüler hasar ve nekroz açısından farklılık görüldü.

Sonuç olarak Tadalafil iskemi–reperfüzyon sonrasında tübüler hasarı, nekroz gelişimini engellemektedir. Bu etkinin Tadalafil verilen iskemi grubunda olmayıp Tadalafil verilen iskemi–reperfüzyon grubunda olması Tadalafilin reperfüzyon aşamasında etkin olduğu düşüncesini oluşturmaktadır. Oksidatif hasarı gösteren diğer parametrelerde de değişiklik olması oksidatif mekanizmanın etkisini gösterdiği yargısına neden olmaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Ozgür O, Kubilay I, Fazil TA, Dilara Z, Sevda FM. Sildenafil attenuates renal ischemia reperfusion injury by decreasing leukocyte. *Acta Histochem* 2009;10: 10–6.
2. Ergün O, Ulman C, Kılıçalp AS. Carnitine as a agent in experimental renal ischemia–reperfusion Injury. *J Urol Res* 2001; 29: 186–9.
3. Grace PA. Ischemia–reperfusion injury. *Br J Surg* 1994;81: 637–47.
4. Guyton AC. The kidneys and body fluids. In: *Textbook of Medical Physiology*. 9th edition. Philadelphia: WB Saunders Company; 1996. 297–313.
5. Ganong WF. Tıbbi Fizyoloji. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği (Çeviri editörü). İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi; 2002. 21: 679–91.
6. Schmiedt CW, Mercurio AD, Glassman MM, McAnulty JF, Brown CA, Brown SA. Effects of renal autograft ischemia and reperfusion associated with renal transplantation on arterial blood pressure variables in clinically normal cats. *Am J Vet Res*. 2009 (11):1426-32.
7. Navar LG. Glomerular permeability a never–ending saga. *Am J Physiol Renal* 2009;296:269–78.
8. Madox DA, Brenner BM. Glomerular ultrafiltration. In: Brenner BM (eds). *10 The Kidney*. Philadelphia: WB Saunders Company; 1996. 286–334 .
9. Kon V, Ichikawa I. Glomerular filtration. In: Massry SG, Glasscock RJ (eds). *Text book of nephrology*. Baltimore: Williams and Wilkins; 1995. 54-60.
10. Navar LG. Renal autoregulation. Perspectives from whole kidney and single nephron studies. *Am J Physiol Renal* 1978; 234:F357.
11. Braam B, Mitchell KD, Koomans HA, Navar LG. Relevance of the tubuloglomerular feedback mechanism in pathophysiology. *J Am Soc Nephrol* 1993;4:1274-75.
12. Myers BD, Moran SM. Hemodynamically mediated acute renal failure. *New Engl J Med* 1986; 314: 97–105.
13. Garcia FJ, Eleno N. Protective effect of exogenous nitric oxide on the renal function and inflammatory response in a model of ischemia–reperfusion. *Am J Transplant* 1998;66: 982–90.
14. Edelstein CL, Ling H, Schrier RW. The nature of renal cell injury. *Kidney Int* 1997;51: 1341–51.
15. Nalini S, Mathan MM, Balasubramanian KA. Oxygen free radical induced damage intestinal ischemia reperfusion in normal and xanthine oxidase deficient rats. *Mol Cell Biochem* 1993;124: 59–66.
16. Wolff SP, Garner A, Dean RT. Free Radicals. Lipids and Protein Degredasyon. Elsevier Science Publishers. 1986; 11: 27–31.
17. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*.1977; 86: 271–8.

18. Guyton AC. The kidneys and body fluids. Textbook of Medical Physiology. 9th edition. Philadelphia: WB Saunders Company; 1996. 315-421.
19. Witzgall R, Brown D, Schwarz C. Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogeneous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells. *J Clin Invest* 1994; 93: 2175–88.
20. Molitoris BA. Ischemia-induced loss of epithelial polarity. Potential role of the actin cytoskeleton. *Am J Physiol Renal* 1991;260:F769–78.
21. Kadkhodae M, Zahmatkesh M, Sadeghipour HR, Eslamifar A, Taeb J . Proteinuria is reduced by inhibition of inducible nitric oxide synthase in rat renal ischemia-reperfusion injury. *Transpl P*. 2009;41(7);2907-9.
22. Weight SC, Furnes PN, Nicholson ML. Biphasic role for nitric oxide in experimental warm ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1999;86: 1039–46.
23. Klebanoff SJ. Oxygen metabolism and toxic properties of phagocytes. *Ann Intern Med* 1980;93:480-9.
24. Haas A, Goebel W. Microbial strategies to prevent oxygen-dependent killing by phagocytes. *Free Radic Res* 1992;16: 137–57.
25. Kubes P, Hunter J, Grander N. Effects of cyclosporine A and FK506 on ischemia/reperfusion-induced neutrophil infiltration in the cat. *Dig Dis Sci* 1991;36:1469–72.
26. Çetinkale O, Şengül R, Bilgiç L, Bolayırlı M, Burçak G. Involvement of neutrophils in ischemic injury. Biochemical and histopathological investigation of the effect of FK506 on dorsal skin flaps in rats. *Ann Plast Surg* 1997;39: 505–15.
27. Barry MC, Kelly CJ. Glyceryl trinitrate prevents neutrophil activation but not thromboxane release following ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1996;83:1095-100.
28. Ophir A, Berenshtein E, Kitrossky N, Averbukh E. Protection of the transiently ischemic cat retina by zinc-desferrioxamine. *Invest Ophthalm Vis Sci* 1994; 35: 1212–22.
29. Islam CF, Mathie RT, Dinneen MD, Kiely EA, Peters AM, Grace PA. Ischemia-reperfusion injury in the rat kidney the effect of preconditioning. *Br J Urol* 1997;6:842–7.
30. Vande Plassche G, Hermans C, Thone F, Borgers M. Mitochondrial hydrogen peroxide generation by NADH oxidase activity following regional myocardial ischemia in the dog. *J Mol Cell Cardiol* 1989;21: 383–92.
31. Bolli R, Jeroudi MO, Palet BS. Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by anti-oxidative therapy begun at the time of reperfusion. Evidence that myocardial ‘stunning’ is a manifestation of reperfusion injury. *Circ Res* 1989;65:607–22.
32. McCord JM. Oxygen derived free radicals in post-ischemic tissue injury. *New Engl J Med*1985;312:159–63.

33. Bron AM, Maupoil V, Garcher C, Guyonnet G, Chelgi EH, Rochette L. Modification of vitamin E during ischemia–reperfusion in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:1084–7.
34. Szabo ME, Droy–Lefaix MT, Doly M, Braquet P. Modification of ischemia/reperfusion–induced ion shifts by free radical scavengers in the rat retina. *Ophthalmol Res* 1993;25:1–9.
35. Hayreh SS, Podhajsky P. Ocular neovascularization with retinal vascular occlusion. II. Occurrence in central and branch retinal artery occlusion. *Arch Ophthalmol* 1982;100:1585–96.
36. Hearse DJ. Reperfusion–induced injury. A possible role of oxidant stress and its manipulation. *Cardiovasc Drugs Ther* 1991;5:225–36.
37. Tosaki A, Blasig IE, Pali T, Ebert B. Heart protection and radical trapping by DMPO during reperfusion in isolated working rat hearts. *Free Radical Biol Med* 1990;8:363–72.
38. Doly M, Braquet P, Bonhomme B, Meyniel G. Effect of lipid peroxidation on the isolated rat retina. *Ophthalmol Res* 1984;16: 292–6.
39. Shug A, Paulson D, Subramanian R, Regitz V. Protective effects of propionyl–L–carnitine during ischemia and reperfusion. *Cardiovasc Drugs Ther* 1991;5:77–84.
40. Faberowsky N, Stefannsson E, Davidson R.C. Local hypothermia protects the retina from ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30:230–9.
41. Granger DN, Rutili G, McCord JM. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Am J Gastroenterol* 1981;81:22–9.
42. Akkuş I, Kalak S, Vural H. Leukocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and serum and leukocyte vitamin C levels of patients with type II diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 1996; 244:221–7.
43. Cadanas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* 1989; 58:79–110.
44. Slatter T. Free radicals and tissue injury: Fact and the fiction. *Br J Cancer* 1987;55:5–10.
45. Hinder RA, Stein HJ. Oxygen derived free radicals. *Arch Surg* 1991;126:104–5.
46. McCord JM. Human disease, free radicals and the oxidant–antioxidant balance. *Clin Biochem* 1993;26:351–7.
47. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source Biochemistry and role in human disease. *Am J Med* 1991;91:14–22.
48. Garcia FJ, Eleno N. Protective effect of exogenous nitric oxide on the renal function and inflammatory response in a model of ischemia–reperfusion. *Am J Transplant* 1998;66:982–90.
49. James TW. Pharmacologic approaches to reperfusion injury. *Br J Pharmacol* 1997;9:291–313.
50. Kiliç K, Topaloğlu S, Abbasoğlu O. Antiapoptotic and protective effects of roscovitine on ischemia-reperfusion injury of the rat liver. *Liver Int* 2003;23:300–7.
51. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surg Clin North Am.* 1992;72:65–83.

52. Weinberg JM. The cell biology of ischemic renal injury. *Kidney Int* 1991;39:476–500.
53. Welbourn CRB, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D. Pathophysiology of ischemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg* 1991;78:651–5.
54. Carden DL, Smith JK, Korthuis RJ. Neutrophil-mediated microvascular dysfunction in pastischemic canine skeletal muscle. *Circ Res* 1990;66:1436–40.
55. Koji H. Activated protein c reduces the ischemia/reperfusion: Induced spinal cord injury in rats by inhibiting neutrophil activation. *Annu Rev Biochem* 2000;232:272–80.
56. Lee C, Kerrigan CL. Neutrophil localization following reperfusion of ischemic skin flaps. *Plast Reconstr Surg* 1992;89:910–6.
57. Sewing KF. Pharmacokinetics, dosing principles and blood level monitoring of FK506. *Transpl Proc* 1994;26:3267–9.
58. Susman MS, Bulkey GB. Oxygen-derived free radicals in reperfusion injury. *Method Enzymol* 1990;186:711–23.
59. Hayashi T, Nagasue N, Kohno H. Beneficial effects of cyclosporinepretreatment in preventing ischemic damage to the liver in dogs. *Am J Transplant* 1988;46:92-3.
60. Lieberthal W. Biology of ischemic and toxic renal tubular cell injury: Role of nitric oxide and the inflammatory response. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998;7:289–95.
61. Sies H. Oxidative stress: From basic research to clinical application. *Am J Med* 1993;91:315–85.
62. Wink DA, Mitchell JB. Chemical Biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic and cytoprotective mechanism of nitric oxide. *Free Radic Bio Med* 1998;25:434–56.
63. Lowenstein J, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide a physiologic Messenger. *Ann Intern Med* 1994;120:227–37.
64. Tefler JF, Itoh H, Thomson AJ, Norman JE, Poston L. Activity and expression of soluble and particulate guanylate cyclases in myometrium from nonpregnant and pregnant women: down-regulation of soluble guanylate cyclase at term. *J Clin Endocr Metab* 2001;86: 5934–43.
65. Moreland RB, Goldstein I, Tarish A. Sildenafil a novel inhibitor of phosphodiesterase type 5 in human corpus cavernosum smooth muscle cells. *Life Sci* 1998;62:309–18.
66. Lee MR. Cyclic GMP causes  $Ca^{2+}$  desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. *J Biol Chem* 1997;272:5063–8.
67. Christ GJ: The penis as a vascular organ. The importance of corporal smoothmuscle tone in the control of erection. *Urol Clin North Am* 1995;22:727–45.
68. Boveris A. Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. *B Exp Med Biol* 1977;78:67–82.

69. Otani H, Tanaka H, Inoue T. In vitro study on contribution of oxidative metabolism of isolated rabbit heart mitochondria to myocardial reperfusion injury. *Circ Res* 1984;55:168–75.
70. Vande Plassche G, Hermans C, Thone F, Borgers M. Mitochondrial hydrogen peroxide generation by NADH oxidase activity following regional myocardial ischemia in the dog. *J Mol Cell Cardiol* 1989;21:383–92.
71. Hull FE, Radloff JF, Sweeley CC. Fatty acid oxidation by ischemic myocardium. *Rec Adv Stud Card Struct Metab* 1975; 8: 153–65.
72. Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML, Ellis EF. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res* 1986;59:612–9.
73. Lands WEM. Interaction of lipid hydroperoxides with eicosanoid biosynthesis. *Free Rad Bio Med* 1985;1:97–101.
74. Karmazyn M, Moffat MP. Toxic properties of arachidonic acid on normal ischemic and reperfused hearts. Indirect evidence for free radical involvement. *Prostag Leukotr Ess* 1985;17: 251-64.
75. Singal PK, Kapur N, Dhillon KS, Beamish RE, Dhalla NS. Role of free radicals in catecholamine-induced cardiomyopathy. *Can J Physiol Pharmacol* 1982;60:1390–7.
76. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci* 1990;87:620–4.
77. Maxwell S. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* 1995;49;3:345-61.
78. Rosati R, Stortoni F, Fillingeri V, Svegliati F, Cervelli V, Casciani CV. Allopurinol and superoxide dismutase administration in prevention of rat kidney ischemic injury. *Am J Transplant* 1988;20:5:928–30.
79. Yin M, Kurvers HA, Tangelder GJ, Booster MH, Daemen JH, Kootstra G. Intravital microscope studies of the ischemically injured rat kidney during the early phase of reperfusion. *Transpl P* 1995;27:2847–8.
80. Cowart RM, Carson CC. Tadalafil in the treatment of erectile dysfunction. *J Ther Clin Risk Manag* 2008;4:1315–30.
81. Teixeira CE, Privieo FB, Webb RC. Differential Effects of the Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors Sildenafil, Vardenafil, and Tadalafil in Rat Aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316: 654-61.

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince klinik bilgi, beceri ve deneyimlerini aktararak mesleki gelişimime büyük katkılar sağlayan başta Uludağ Üniversitesi Tıp Fakóltesi Üroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Bülent OKTAY olmak üzere, Prof. Dr. İsmet YAVAŐÇAOĐLU'na, Prof. Dr. Hakan Kılıçarslan'a, her ihtiyaç duyduğumda bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen tez danışmanım Doç.Dr. Hakan VURUŞKAN'a, Uzm. Dr. Yakup KORDAN'a, Uzm. Dr. Serkan DOĐAN'a ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Dr. Feyzul Gasanov



## ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Rusya Federasyonu, Kuzey Kafkasya Kabardino–Balkariya Cumhuriyeti, Nalçik şehrinde doğdum. İlkokulu, ortaokulu ve lise öğrenimimi Nalçik şehrinde tamamladıktan sonra 1997 yılında Kabardino–Balkariya Cumhuriyeti Üniversitesi Tıp Fakültesi'ni kazandım. Temmuz 2002'de mezun oldum. 2003–2004 yıllar arası İzmir Ege Üniversitesinde TÖMER'de eğitim gördüm ve Aralık 2004'te Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladım.