

T-1578

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

PROKSİMAL TÜBÜL AMONYAK SEKRESYONUNDA NİTRİK OKSİDİN ROLÜ

Selma CİRRİK

1578

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı
Doç. Dr. İbrahim BİLGİN

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
MERKEZ KÜTÜPHANESİ

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu
tarafından desteklenmiştir (Proje no: 21 01.0122.06)

"Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir"

Antalya, 2003

Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından Fizyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 18/02/2003

Tez Danışmanı: Doç. Dr. İbrahim BİLGEN*
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı

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

Üye Prof. Dr. Gülsen ÖNER
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı

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

Üye Prof. Dr. Fevzi ERSOY
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Üye Prof. Dr. Umit Kemal ŞENTÜRK
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı

ONAY: Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun 18/2/2003 tarih ve 4/37 sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ramazan DEMİR
Enstitü Müdürü



* Öğrencinin tez danışmanı Doç. Dr. İbrahim BİLGEN sınav öncesinde ani bir rahatsızlık sonucu vefat etmiştir.

ÖZET

Böbrek korteks dilimlerinde, amonyak yapımı üzerine nitrik oksidin etkisini incelemek amacıyla düzenlenen bu çalışmada 250-300 g ağırlığında, erkek Wistar sıçanların böbrekleri kullanılmıştır. Böbrek korteks dilimleri iki saat boyunca 37 °C, pH 7.4 olan krebs tamponu içinde, 95% O₂ ve 5% CO₂ ile gazlandırılan ortamda inkübe edilmiştir. Glutaminsiz ve 1mM glutamin eklenen ortamda korteks dilimlerinin amonyak yapım ve sekresyonu ve nitrik oksit ve angiotensin II'nin etkisi çalışılmıştır.

İki saat boyunca krebs tamponu içinde inkübe edilen böbrek korteks dilimlerinden ortama salgılanan amonyak miktarı $31.98 \pm 1.76 \mu\text{M/g}$ protein iken, amonyak öncül maddesi glutaminin inkübasyon ortamına eklenmesi ile amonyak salgısı $64.11 \pm 2.6 \mu\text{M/g}$ protein değerine yükselmiştir ($p < 0.001$). 10^{-4} M L-NAME'in inkübasyon ortamına eklenmesi ile de amonyak salgısı önemli düzeyde artmıştır ($99.14 \pm 16.02 \mu\text{M/g}$ protein $p < 0.01$). 10^{-7} M Angiotensin II ortam ve doku amonyağında önemli bir artışa neden olmuştur. Angiotensin II aracılı amonyak yapımındaki artış; L-NAME ve 10^{-4} M L-Canavanin ile endojen nitrik oksit üretiminin engellenmesinden ya da nitrik oksit donörünün (10^{-5} M SNAP) ortama eklenmesinden etkilenmemiştir.

Kortek dilimlerinin kullandığı glutamin miktarları gruplar arasında önemli değişim göstermemiştir. Ancak glutaminin amonyağa dönüşüm oranı, ortama L-NAME ilavesi ile 0.87 ± 0.08 (mol/mol)'den 1.03 ± 0.04 ' e, Angiotensin II ilavesi ile de 0.98 ± 0.04 'e yükselmiştir. Inkübasyon sonu ortam protein miktarı 1 mM glutamin varlığında anlamlı olarak yükselmiştir. Protein salgısında glutaminin neden olduğu bu artış, L-NAME ve Angiotensin II ile tamamen ortadan kalkmıştır. Angiotensin II ve L-NAME'in yaptığı inhibisyon, SNAP ilavesi ile ortadan kalkmış ve ortam protein miktarı kontrol seviyesine dönmüştür.

Sonuç olarak bulgularımız:

- 1- Angiotensin II'nin sıçan böbrek korteks dilimlerinde hem amonyak yapımını hem de sekresyonunu stimüle ettiğini göstermektedir.
- 2- Amonyak salgılanmasında inhibitör bir etkiye sahip olan endojen nitrik oksitin angiotensin II aracılı amonyak yapımında rolünün olmadığını göstermektedir.
- 3- L-NAME ve angiotensin II varlığında amonyak/glutamin oranındaki önemli artış ve ortam protein miktarındaki azalış; bu iki ajanın amonyak metabolizması üzerine etkilerini glutamat dehidrogenaz yolağı üzerinden yaptıklarını göstermektedir.

ABSTRACT

In order to study the effect of nitric oxide on ammoniagenesis, the renal cortical slices obtained from, 250-300 g male Wistar rats were used in this experiment. The ammonia production and secretion were studied in the cortical slices incubated in krebs buffer with and without 1 mM glutamin for 2 h at 37° C, pH7.4 under 95% O₂ and 5% CO₂.

The ammonia secretion into the medium from the cortical slices incubated with krebs buffer for 2 h was $31.98 \pm 1.76 \mu\text{M/g}$ protein and the addition of 1 mM glutamin, an ammonia precursor into incubation medium increased the ammonia secretion to $64.11 \pm 2.6 \mu\text{M/g}$ protein ($p < 0.001$). Presence of 10^{-4} M L-NAME in the incubation medium significantly increased the ammonia secretion ($99.14 \pm 16.02 \mu\text{M/g}$ protein, $p < 0.01$). 10^{-7} M Angiotensin II also caused a significant increase in the medium and tissue ammonia. Neither prevention of endogenous nitric oxide production with L-NAME and 10^{-4} M L-Canavanin nor addition of 10^{-5} M SNAP, a nitric oxide donor, to the medium influenced the angiotensin II mediated increase in ammoniagenesis.

Glutamine utilisation by the cortical slices in all groups were the same however the conversion of glutamine to ammonia increased significantly to 1.03 ± 0.04 and 0.98 ± 0.04 from 0.87 ± 0.08 (mol/mol) in the slices subjected to L-NAME and Angiotensin II respectively. The protein content of the incubation medium significantly increased in the cortical slices subjected to 1 mM glutamine for 2 h. L-NAME and Angiotensin II completely prevented glutamine mediated protein secretion but addition of SNAP overcame the Angiotensin and L-NAME dependent suppression and the protein content of the medium returned to the control level.

As a result our findings demonstrated that:

- 1- Angiotensin II stimulated both the production and secretion of ammonia in the renal cortical slices of rats.
- 2- Endogenous nitric oxide which has an inhibitory effect on ammoniagenesis is not involved, angiotensin II mediated ammoniagenesis.
- 3- The significant increase in the ratio of ammonia to glutamine and decrease in medium protein contents in the presence of L-NAME and Angiotensin II indicate that these two agents prefer the Glutamate dehydrogenase pathway for their effect on ammoniagenesis.

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA</u>
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Böbrekler	3
2.1.1. Böbrek Anatomisi	3
2.1.2. Böbrek Fonksiyonları	5
2.2. İdrar Oluşumu	6
2.2.1. Glomerüler filtrasyon	6
2.2.2. Tübüler Geri emilim ve Sekresyon	7
2.2.3. İdrar Oluşumunda Proksimal Tübülün Yeri	7
2.2.4. Proksimal Tübül Fonksiyonları	8
2.2.4.1. Geri Emilim	8
2.2.4.2. Sekresyon	8
2.3. Proksimal Tübül Metabolik Fonksiyonları ve Amonyak Yapımı	11
2.3.1. Amonyak Yapımına Etkili Faktörler	14
2.3.2. Angiotensin II	14
2.3.3. Angiotensin II ve Nitrik oksid ilişkisi	15
2.3.3.1. NOS İzofomları	16
2.3.3.2. NOS İzofomlarının Böbrekte Dağılımı	17
2.4. Böbrek Fonksiyonları ve Nitrik Oksid	19
2.4.1. NO ve Renal Hemodinami	19

2.4.2. NO ve renin sekresyonu	20
2.4.3. NO ve Tübüloglomerüler Feedback Cevap	20
2.4.4. NO ve Eritropoietin üretimi	21
2.4.5. NO ve Tübüler Transport	21
2.5. Amaç	23
MATERYAL VE METOD	24
3.1. Nitrit Tayini	26
3.2. Nitrat Tayini	27
3.3. L-Glutamin Tayini	29
3.4. Amonyak Tayini	30
3.5. Protein Tayini	31
3.6. İstatistik	32
BULGULAR	33
4.1. Ön Çalışma Bulguları	33
4.1.1. Normal Oksijenasyonun Sağlanması	33
4.1.2. Hücre Canlılığının Test Edilmesi	33
4.1.3. Kullanılacak A-II Dozunun Saptanması	33
4.1.4. Deney Düzenineğinin Amaca Uygunluğunun Testi	33
4.2. Amonyak Bulguları	35
4.3. Nitrit ve Nitrat Bulguları	42
4.4. Glutamin Bulguları	44
4.5. Amonyak/Glutamin Oranı (mol/mol)	45
4.6. Ortama Salınan Protein Değerleri	46
4.7. Korelasyon Bulguları	48
TARTIŞMA	50
SONUÇLAR	56
KAYNAKLAR	58
ÖZGEÇMİŞ	69

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACE	Angiotensin Dönüştürücü Enzim
A-II	Angiotensin II
ALT	Alanin Amino Transferaz
ANP	Atrial Natriüretik Peptit
AT	Angiotansin Reseptör Tipi
ATP	Adenozin Trifosfat
BH ₄	Tetrahidrobiopterin
CaM	Kalmodulin
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
cGMP	Siklik Guanozin Monofosfat
eNOS	Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
FAD	Flavin Adenin Dinükleotid
FMN	Flavin Mononükleotid
GFR	Glomerüler Filtrasyon Hızı
H ⁺	Hidrojen İyonu
HCO ₃ ⁻	Bikarbonat İyonu
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
L-Can	L-canavanin
LDH	Laktat Dehidrogenaz
LMS	L-methionin sulfoximine
L-NAME	N ^ω -nitro-L-arginin metil ester
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
NADP	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NADPH	İndirgenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NH ₃	Amonyak
NH ₄ ⁺	Amonyum İyonu
NHE	Sodyum/Hidrojen değiştiricisi
NHNO ₂	Nitröz Asit

nNOS	Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
NO	Nitrik Oksit
NO₂⁻	Nitrit
NO₃	Nitrat
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
NOx	Nitrit ve Nitrat
PDG	Fosfat Bağımlı Glutaminaz
PIG ve γ-GT	Fosfat Bağımsız Glutaminaz
PTH	Paratroid Hormon
sGC	Çözünebilir (soluble) Guanilat Siklaz
SNAP	S-nitroso-N-acetylpenicillanine
SNP	Sodyum Nitropurisid
TGF	Tübüloglomerüler Feedback

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
Şekil 2.1.	Nefronun Tübüler ve Vasküler Segmentleri	4
Şekil 2.2.	Proksimal Tübülde Amonyak ve Hidrojen Sekresyonu	10
Şekil 2.3.	Proksimal Tübül Hücresinde Glutamin Metabolizması	13
Şekil 2.4.	L-Arginin'den NO Oluşumu	16
Şekil 3.1.	Nitrat'ın Zamana Bağlı Nitrite İndirgenmesi	28
Şekil 4.1.	A-II Varlığında Ortam Amonyakındaki % Değişimler	34
Şekil 4.2.	İnsülin Varlığında Amonyak Yapımı	34
Şekil 4.3.	İnkübasyon Sonu Ortam Amonyakı	35
Şekil 4.4.	İnkübasyon Sonu Doku Amonyakı	36
Şekil 4.5.	İnkübasyon Sonu Total Amonyak	37
Şekil 4.6.	15, 60 Ve 120. dk Ortam Amonyak Değerleri	38
Şekil 4.7.	Amonyak Yapım Hızı (Krebs, Glutamin, L-NAME ve A-II Gruplarında)	39
Şekil 4.8.	Amonyak Yapım Hızı (A-II, A-II+L-NAME, A-II+L-Can ve A-II+L-NAME+SNAP Gruplarında)	40
Şekil 4.9.	Toplam Nitrit Değerleri	42
Şekil 4.10.	Toplam Nitrat Değerleri	42
Şekil 4.11.	Nitrit ve Nitrat Düzeyleri	43
Şekil 4.12.	Kullanılan Glutamin Miktarları	44
Şekil 4.13.	Üretilen Amonyak/Kullanılan Glutamin Oranı	45
Şekil 4.14.	Ortam Proteini	46
Şekil 4.15.	Üretilen Amonyak ile Kullanılan Glutamin Arasındaki Korelasyon	48
Şekil 4.16.	Kullanılan Glutamin ile Ortam Proteini Arasındaki Korelasyon	48
Şekil 4.17.	Bütün Gruplarda Kullanılan Glutamin İle Ortam Proteini Arasındaki Korelasyon	49

TABLULAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
Tablo 2.1.	Böbrekte NOS İzofomlarının Dağılımı	18
Tablo 2.2.	NO'nun Taşıyıcı Proteinler Etkileri	22
Tablo 3.1.	Deney Grupları	24
Tablo 4.1.	Tüm Gruplarda Ortam ve Doku Amonyak Değerleri ile AmonyakYapım Hızları	41
Tablo 4.2.	Nitrit ve Nitrat Düzeyleri	43
Tablo 4.3.	Tüm Gruplarda Kullanılan Glutamin, Amonyak / glutamin Oranı ve Ortam Protein Değerleri	47

GİRİŞ

Dokularda ve özellikle kas dokusunda aşırı aktivite veya katabolizma artışı durumlarında aminoasitlerin deaminasyona bağlı amonyak üretimi de artmaktadır. Vücut iç dengesinin korunmasında en önemli problemlerden birisi, dokularda oluşan amonyak gibi toksik bir maddenin beyine zarar vermeden toplanıp, toksik olmayan hale dönüştürülerek vücuttan dışarı atılmasıdır. Amonyakın kan dolaşımında en zararsız taşınma şekli glutamin yapısındaki halidir (25-27) ve bu yapı içinde karaciğer ve böbreğe taşınmaktadır. Karaciğerde glutamin deaminasyona uğrayarak üreye çevrilmekte ve vücuttan atılmaktadır. Böbreğe gelen glutamin ise bir taraftan glukoneogenez için substrat oluşturup glukozu dönüştürülürken diğer taraftan da vücut asit baz dengesinde önemli olan amonyak ve bikarbonat üretimine katılmaktadır (1-3, 5, 6).

Böbreğin metabolik fonksiyonlarından amoniagenezis gibi glukoneogenezis de proksimal tübül hücresinde gerçekleşmektedir (11,19-24, 84, 85, 114, 115). Proksimal tübül böbrekte en fazla geri emilim ve sekresyonun olduğu nefron kısmıdır ve buradaki hücreler bu işlevi yapacak şekilde yapısal farklılaşma gösterirler. Bu tübül segmenti aynı zamanda başta hidrojen iyonu ve amonyak olmak üzere organizma için tehlikeli pek çok maddenin lümene salgılandığı kısımdır. Hidrojen iyonunun salgılanması, lümene amonyum salgılanmasından da sorumlu olan Na^+/H^+ eş-değiştiricisi (NHE) ile gerçekleşmektedir. Hidrojen ve amonyumun yanı sıra, safra tuzları, okzalit, urat, katekolaminler gibi organik asit ve bazların da lümene salgılandığı yer yine proksimal tübüldür. Proksimal tübül H^+ iyon salgısı ile, metabolizma sonucu oluşan hidrojen iyonunu uzaklaştırırken, aynı zamanda ultrafiltrata geçen bikarbonat iyonunu (rezerv alkali) geri kazanmaktadır. Bu nedenle hidrojen sekresyonu vücut asit-baz dengesi açısından çok önemlidir (1-3).

Amonyak yapım ve salınımını, lüminal pH ve K^+ , plazma ve hücre içi pH, lüminal akım hızı, ayrıca angiotensin II, insülin, paratroid hormon ve tiroid hormon gibi pek çok faktör değiştirmektedir. Bunlardan angiotensin II AT_1 reseptörleri üzerinden yaptığı bu etkisini, sekresyonda rol alan apikal NHE ve bazolateral Na^+/K^+ - ATPaz aracılığı ile gerçekleştirmektedir ve bu etkinin doza bağlı bifazik özellik taşıdığı gösterilmiştir (14, 21, 22, 24, 28, 29, 41, 44, 54, 117).

Son yıllarda böbreğin büyük bir nitrik oksid üretme kapasitesine sahip olduğu ve üretilen NO'nun pek çok böbrek fonksiyonlarına etki ettiği gösterilmiştir. Böbreğin metabolik ve tübüler fonksiyonlarının büyük

bölümünü üstlenmiş olan proksimal tübülde, NO sentazın varlığı ve üretilen NO'nun tübül fonksiyonlarına etkileri gösterilmiştir. Sonuçlar NO'nun tübül transportu değiştirdiğini göstermekte ve genel görüş olarak endojen NO'nun inhibitör etki yaptığı kabul edilmektedir (39, 45-48, 50, 110)

Yukarıda belirtildiği gibi, vücut asid-baz dengesinin korunması ve amonyak itrahında çok önemli olan hidrojen iyonu ve amonyak sekresyonunda Na^+/K^+ -ATPaz ve Na^+/H^+ eş-değiştiricisi görev almaktadır. insülin, PTH gibi pek çok faktörün bu taşıyıcı proteinler üzerinden amonyak yapım ve salgısını etkiledikleri gösterilmesine rağmen, bu taşıyıcılar üzerine inhibitör etkileri saptanan nitrik oksidin proksimal tübül amonyak sekresyonu üzerine etkisini gösteren literatür bilgisine rastlanmamıştır.

Son zamanlarda artan nitrik oksid prekürsörlerinin kullanımı göz önüne alındığında, nitrik oksidin proksimal tübüldeki amonyak sekresyonu üzerine etkisini bilmek klinik açıdan önem taşımaktadır. Böbrekte amonyak yapımından sorumlu bölge proksimal tübül olduğundan ve bu bölgede iNOS ağırlıklı olmak üzere NO üretimi gösterildiğinden, bu çalışmada NO'nun proksimal tübül amonyak sekresyonuna etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Böbrekler

2.1.1. Böbrek Anatomisi

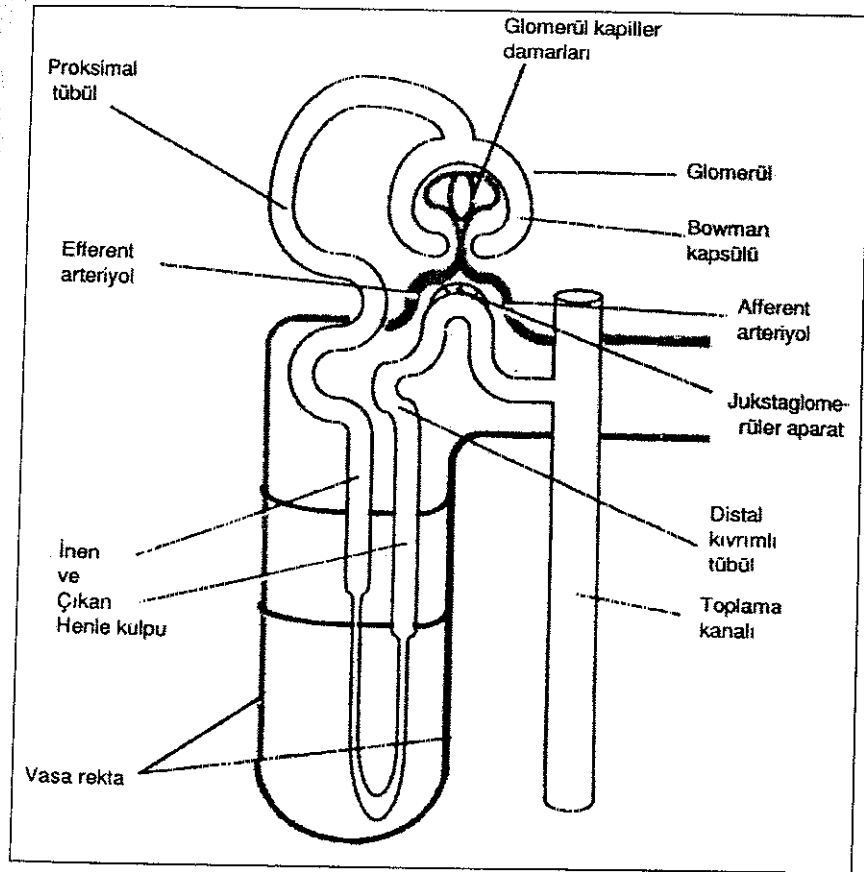
Karın arka duvarında retroperitoneal olarak yerleşmiş ve kendisini çevreleyen yağ dokusu tarafından korunan böbrekler, total vücut ağırlığının yaklaşık % 0.5'i kadardır. Böbrek, konkav bir yüzeye sahiptir ve ortasında kan damarları, sinirler, lenfatikler ve üreterin girip çıktığı "hilus" olarak adlandırılan çukur bir kısım vardır. Tüm böbrek fibröz bir kapsül ile kuşatılmıştır.

Uzunlamasına ikiye bölünen böbrekte, dışta "korteks" ve içte "medulla" olarak isimlendirilen iki bölge ayırt edilmektedir. Dış ve iç medulla olarak iki bölgeye ayrılan medulla çok sayıda koni şeklinde ve "böbrek pramidleri" denen yapılar içermektedir. İnsan böbreğinde 4-14 adet böbrek piramidi bulunmaktadır (3). Piramidlerin tabanı, korteks ile medulla arasındaki sınırdan başlamakta ve üreterin huni biçimli üst ucunun devamından oluşan "böbrek pelvisine" doğru uzanan papillada son bulmaktadır. Sıçan, tavşan gibi bazı hayvanlarda böbrek sadece bir piramide sahip olup "tek-papillalı" olarak adlandırılırken, köpek ve insan gibi türlerde çok sayıda piramide sahip olup "çok-papillalı" olarak adlandırılmaktadır.

Böbreğin en küçük fonksiyonel birimi olarak adlandırılan "nefron" vasküler ve tübüler olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır (Şekil 2.1). Nefronun vasküler kısmını glomerüler kapiller yumak oluşturmaktadır. Diğer kapiller ağlar ile karşılaştırıldığında daha yüksek permeabilite ve hidrostatik basınca (60 mmHg) sahip, birbirine paralel 50 kadar kapiller damardan oluşan "glomerüler kapiller yatak" ve bu yapıyı saran "Bowman kapsülü"ne "Malpighi cisimciği" denmektedir ve burası filtrasyonun yapıldığı kısımdır. Glomerüler kapillerlerden filtre olan sıvı, Bowman kapsülü içine geçmekte ve sonra nefronun tübüler kısmı içinde ilerlemektedir. Bowman kapsülünden itibaren başlayan ve korteks medulla sınırına kadar uzanan tübül bölgesine "proksimal tübül" denilmekte ve bu segmenti inen Henle, çıkan Henle ve ardından distal tübül segmentleri izlemektedir (Şekil 2.1) (1-3).

Tüm nefronların glomerulusları böbrek korteksinde yer almakta ve glomerüler yumağın bulunduğu yere göre nefronlar "superficial", "subcortical" ve "juxtamedüller" olarak isimlendirilmektedir. Değişik hayvan türlerinde böbreğin büyüklüğü içerdiği nefron sayısından etkilenmektedir. İnsanda her bir böbrekte yaklaşık 1.2 milyon nefron bulunmaktadır. İdrar oluşumu

nefronlarda gerçekleşmektedir. Glomerüllerden filtre olan sıvı, Malpighi cisimciği gibi böbrek korteksinde yerleşmiş olan proksimal tübül içine girerek Henle kıvrımı içinde medullanın derinliklerine doğru ilerlemektedir. Henle kıvrımının medullaya inen kolu daha sonra kortekse doğru dönüş yapmaktadır (Şekil 2.1) Henle'nin inen kolu ve çıkan kolun alt ucunda Henle'nin çapı çok ince iken, kortekse doğru çıktığında çapın giderek kalınlaştığı görülmektedir. Bu nedenle Henle'nin çıkan kolu; "çıkan ince segment" ve "çıkan kalın segment" olarak iki kısımda incelenmektedir. Çıkan kalın kolu glomerül yumağına ulaşmakta ve afferent ve efferent arteriollere yakın sayretmektedir. Bu bölgede afferent arteriol duvarını döşeyen hücreler renin salgılayan "jukstaglomerüler hücreler" şekline, tübüler epitel hücreleri de değişikliğe uğrayarak "macula densa" hücrelerine dönüşmüştür. Jukstaglomerüler hücreler, macula densa hücreleri ve bunlara yakın olan bağlantı hücreleri (laci) hepsi birden nefron fonksiyonlarının kontrolünde önemli yere sahip olan "jukstaglomerüler aparat"ı oluşturmaktadır. Tübül içinde ilerleyen sıvı, macula densadan sonra, kortekste yerleşmiş olan distal tübül içine girmekte ve hem birleştirici hem de kortikal toplayıcı tübülde ilerleyerek medüller toplayıcı kanallara, buradan da papillanın tepesi aracılığıyla böbrek pelvisine ulaşmaktadır.



Şekil 2.1: Nefronun vasküler ve tübüler segmentleri (128)

2.1.2. Böbrek Fonksiyonları

A. Ekskresyon Görevi: Kan hacmi ve bileşiminin sabit tutulmasında önemli bir yere sahip olan böbrek bu amaçla (1-4);

1. **Kan hacmini ayarlar:** Kan hacmindeki değişimi algılayan sensörler düşük basınç ve yüksek basınç sensörleri ile böbrek sensörü olarak görev yapan jukstaglomerüler aparatır. Angiotensin II, aldosteron ve atrial natriüretik peptid gibi hormonlar, böbrek üzerinden ekstraselüler sıvı hacminin normal sınırlar içinde tutulmasını sağlarlar.
2. **Elektrolit düzeyini ayarlar:** Vücut ozmolalitesi, total sodyum ve potasyumun total su hacmine oranıyla direkt olarak bağlantılıdır. Plazma ozmotik basıncındaki değişim vazopressin, aldosteron, angiotensin II gibi hormonların böbrek üzerine selektif etkileri aracılığıyla normal düzeye getirilmektedir.
3. **Kan basıncını düzenler:** Böbrek vücut sıvılarının hacmini ve elektrolit dengesini düzenleyerek ozmolaritenin ve kan basıncının normal sınırlar içinde tutulmasını sağlamaktadır.
4. **Metabolik atıkları itrah eder:** Kandaki metabolik atık ve yabancı maddelerin idrarla atılımları böbrek tarafından gerçekleştirilmektedir. Oksalik asit, ürik asit, kreatinin, üre gibi metabolizma son ürünleri ile penisilin, salisilik asit, morfin, atropin gibi ilaç veya ekzojen maddeler özellikle proksimal tübül segmentinden sekrete edilmekte ve idrarla atılmaktadır.
5. **Asit-baz dengesini düzenler:** Plazma bikarbonat konsantrasyonunu düzenleyen böbrek bu fonksiyonu ile pH düzenlenmesinde önemli bir yere sahiptir. Hidrojen iyon sekresyonu sırasında bikarbonat geri emilimi olmakta ve böylece vücutta rezerv alkali korunmaktadır.

B. Endokrin Görevi: Böbrekler bir endokrin organ gibi hareket ederek; eritropoietin, renin, kalsitriol, endotelin, prostaglandin E₂ ve F_{2α} ile nitrik oksid gibi hormonların sentezine katkıda bulunurlar

1. Vücutta üretilen eritropoietin'in %90'ı böbrek, %10'u karaciğer kaynaklıdır. Eritropoietin glikoprotein yapıda bir hormondur ve böbrek korteksindeki epitel ve endotel dışı hücreler tarafından üretilmektedir (1-6). Kemik iliğinde eritrosit yapımını uyarın bu hormonun yapımı hipoksik koşullarda artmaktadır. Kronik böbrek yetmezliğinde eritropoietin yokluğundan dolayı anemi ortaya çıkmaktadır (1-3).

2. Böbrekte jukstamedüller hücrelerden salınan renin, bir aspartil proteaz olup karaciğerde yapılan angiotensinojen'i dolaşımında angiotensin I'e dönüştürmektedir. Renin'in önemli rol oynadığı renin-angiotensin-aldosteron sistemi kan hacminin ve bileşiminin kontrolünde önemli bir yere sahiptir (1-3).
3. Kalsiyum ve fosfat metabolizmasında önemli rol oynayan vitamin D₃ (calsitriol)'ün aktifleşmesi böbrekte proksimal tübül hücrelerinde gerçekleşmektedir. Karaciğerde 25'inci pozisyonu hidroksillenerek kan aracılığı ile proksimal tübüle ulaşan 25 hidroksikolekalsiferol, burada 1-alfa hidroksilaz aktivitesiyle 1'inci pozisyonundan da hidroksillenmekte ve 1,25 dihidroksi kolekalsiferol veya calcitriol denen aktif D vitamini şekline dönüşmektedir (1-3).

C. Metabolik Görevi: Son yıllarda glukoneogenesis yetisine sahip olan böbreğin metabolik fonksiyonu üzerinde de durulmaya başlanmıştır (1-3, 5, 6, 19, 40, 41, 55). Normalde karaciğer glukoneogenesisin %90'ından sorumluyken böbreklerin payı %10 dur. Ancak uzun süreli açlıkta böbreklerdeki glukoneogenesisin payı artmaktadır (4, 6)

Böbreğin metabolik fonksiyonlarından sorumlu olan nefron segmenti proksimal tübül olduğundan ve konumuz olan amonyak yapımı da burada gerçekleştiğinden, bilgi akışı proksimal tübül ağırlıklı olarak verilmiştir.

2.2 İdrar Oluşumu

2.2.1. Glomerüler Filtrasyon

İdrar oluşumu nefronun glomerüler kısmında başlamaktadır. Hidrostatik basıncın yüksek olduğu glomerüler kapiller yatak; 70-90 nm çapında porlara sahip pencereci endotel hücreleriyle döşenmiştir ve permeabilitesi çok yüksektir. Glomerüler kapiller yataktan plazmanın %20'si filtrasyona uğrayarak Bowman boşluğu içine, oradan da proksimal tübüle geçmektedir. Ultrafiltratın bileşimini filtrasyon bariyerinin özellikleri belirlemektedir. Plazmadaki çapı 8 nm'den büyük moleküllerin hiçbiri filtrasyon bariyerini geçemezken, çapı 4 nm'dan küçük suda eriyebilen tüm moleküller bariyeri geçerek ultrafiltrasyona uğramaktadırlar. Çapı 4 ile 8 nm arasında olan moleküller ise yükleri ile ilişkili olarak filtrasyona uğramaktadırlar. Membran komponentlerinden olan bazal membranın içerdiği negatif yüklü proteoglikan gruplarından dolayı, plazmadaki negatif yüklü moleküller ile geçirgenlik arasında ters ilişki vardır. Ultrafiltrasyona uğrayan sıvı plazma ile karşılaştırıldığında, proteinsiz ve %5 daha fazla anyon içeren bir sıvıdır. Glomerüler filtrasyonu etkileyen kuvvetler, kanın onkotik ve hidrostatik basıncı ile Bowman içi sıvının hidrostatik basıncı ve protein içeriğidir. Kf ile belirlenen glomerüler membran alanı, glomerüler filtrasyon hızını belirleyen bir diğer önemli etkendir. Bu nedenle Kf'i etkileyen ANP, A-II,

vazopressin ve NO gibi pek çok vazoaaktif madde glomerüler filtrasyonun hızında söz sahibidir (1-3)

2.2.2. Tübüler Geri Emilim ve Sekresyon

Bowman kapsülü içine geçen glomerüler ultrafiltrat, tübüler yapı içinde ilerlerken, içeriğindeki bazı maddeler selektif olarak kana geri emilmekte ve kandaki bazı maddeler de tübül içine özel olarak salgılanmaktadır. Sonuçta, oluşan idrardaki bütün maddeler glomerüler filtrasyon, tübüler geri emilim ve tübüler sekresyondan oluşan üç büyük işlemin toplamını temsil etmektedir.

Nefronun glomerüler parçası plazma filtrasyonu yaparken, tübüler parçası ultrafiltrat hacmini azaltıp, içeriğini değiştirerek idrarı oluşturmaktadır. Proteinler ve proteinlere bağlı olan maddeler dışında, suda çözülen maddelerin hepsi glomerulustan filtre olurken, tübüllerin yaptığı geri emilim seçici özellik göstermektedir. Glukoz ve aminoasitler gibi bazı maddelerin tamamı tübüllerden hem de tübülün ilk kısmı olan proksimalden geri emilime uğramaktadırlar. Plazmadaki sodyum, klorür ve bikarbonat gibi iyonların geri emilimleri ise oldukça yüksek olup, vücudun ihtiyacına göre geri emilim ve idrarla atılım hızları değişebilmektedir. Üre ve kreatinin gibi bazı yıkım ürünleri ise tübüllerden çok az emildiklerinden idrarla atılma hızları çok yüksektir. Oluşan idrar, vücut sıvılarını normal hacmi ve kompozisyonunun korunması için atılması gereken bileşenlerden oluşmaktadır. Glomerüllerden filtre olan plazma miktarı 125 ml/dk veya 180 L/gün iken, günlük idrar miktarının 1.8 L olması ultrafiltrat hacminin %99'unun tübüllerden geri emildiğini göstermektedir (1-3)

2.2.3. İdrar Oluşumunda Proksimal Tübül'ün Yeri

Glomerülde oluşan ultrafiltratın ilk olarak değişime uğradığı yer olan proksimal tübül, Bowman kapsülü ile inen Henle arasındaki kortikal kısımda yerleşmiş, yaklaşık 15 nm uzunluğunda ve 55 µm çapında tübüler yapıdır. Proksimal tübülün korteksteki parçasına genel olarak "proksimal kıvrımlı tübül" ve yine kortekste olup medullaya yönelmiş olan parçasına "proksimalin düz kısmı"(pars recta) adı verilmekle beraber son zamanlarda proksimal kıvrımlı tübül iki alt segmentte (S1 ve S2) incelenmeye başlanmıştır. Böylece, proksimal tübül pars recta ile birlikte S1, S2 ve S3 olmak üzere üç alt segmentten oluşmaktadır (1-3).

Proksimal tübülü döşeyen kübik epitel hücrelerin lüminal yüzeyi mikrovillusler ile donatılmış olup "firçamsı kenar" olarak tanımlanmaktadır. Oldukça büyük olan hücre çekirdeği bazal membrana yakın yerleşmiştir. Metabolik aktiviteleri çok yüksek olan bu hücreler, bol miktarda mitokondri içerirler ve birbirlerine apikalde sızdırıcı özellikte bağlantı bölgeleri ile tutunmuşlardır. Bağlantı bölgelerinin sızdırıcı niteliği proksimal tübülün suya tamamen geçirgen olmasını sağlamaktadır. Proksimal tübül epitel hücresi, bazal membranın yaptığı girinti çıkıntılar ve apikal membranın firça kenarlı

yüzeyi ile birlikte oldukça geniş, aynı zamanda taşıyıcı proteinler ile yüklü bir yüzeye sahiptir. Tübülün bu kısmını çevreleyen peritübüler kapiller yatak, düşük hidrostatik ve yüksek onkotik basınçlı, emici gücü yüksek bir kapiller yataktır ve bu özelliği ile proksimal tübülde gerçekleşen geri emilim ve sekresyonda büyük öneme sahiptir (1-3).

2.2.4. Proksimal Tübül Fonksiyonları

Proksimal tübül fonksiyonlarını geri emilim, sekresyon ve metabolik olmak üzere üç ana başlıkta toplamak mümkündür:

2.2.4.1. Geri emilim

Filtre olan su ve sodyumun büyük bir kısmı proksimal tübülde geri emilmektedir. Glomerüler kapiller yataktaki net filtrasyon basıncı ile peritübüler kapiller yataktaki net geri emilim basıncı arasındaki dengeden (glomerülotübüler denge) dolayı ultrafiltratın yaklaşık % 65-70'i geri emilmektedir. Ayrıca hem apikal hem de bazolateral membrandaki taşıyıcı proteinler aracılığı ile kolaylaştırılmış transport ve sekonder aktif transport ile elektrolitlerin geri emilimi gerçekleşmektedir. Tübül içindeki glukoz ve amino asitlerin tamamı sodyumla birlikte, kaçak proteinler ise endositoz yoluyla hücre içine alınıp dolaşıma geri verilmektedir (1-3).

Filtre olan sodyumun %67'si proksimal tübülde geri emilirken bunun üçte ikisi transselüler, üçte biri paraselüler yoldan gerçekleşmektedir. Geri emilen sodyuma bikarbonat ve klor anyonları eşlik ederek elektriksel nötralizasyon sağlanmaktadır (3). Proksimal tübülde herhangi bir solütün geri emilmesi ozmotik basınç farkı doğrultusunda suyun da geri emilmesine neden olacağından, sodyum ve sodyumla birlikte diğer anyonların geri emilimi eşzamanlı olarak su geri emilimi ile sonuçlanmaktadır (1-3).

2.2.4.2. Sekresyon

Safra tuzları, oksalat, urat, katekolaminler gibi önemli miktarda organik asit ve bazı sekresyonu (pH düzenleme ve amonyak yapımı) proksimal tübülde gerçekleşmektedir. Buradan salgılanan maddelerin çoğu metabolizma son ürünleri olup, çabuk bir şekilde vücuttan uzaklaştırılmaları gerektiğinden, glomerüler kapillerlerden filtrasyonlarına ilaveten proksimal tübül içine de salgılanmaları ve tübül sisteminin hiçbir yerinde geri emilmemeleri idrarla çabuk atılmalarını sağlamaktadır. Proksimal tübülün suya geçirgen yapısı, geri emilim ve sekresyon işlemlerinden sonra bile tübüler sıvının tonisitesinin değişmeyip izotonik olarak Henle'ye ulaşmasının sebebidir.

Proksimal tübülde yapıp lümene salgılanan maddelerin başında hidrojen iyonu gelmektedir. Proksimal tübül hücresi içinde ve fırçası kenarda bol miktarda bulunan karbonik anhidraz enzimi, hem su ve

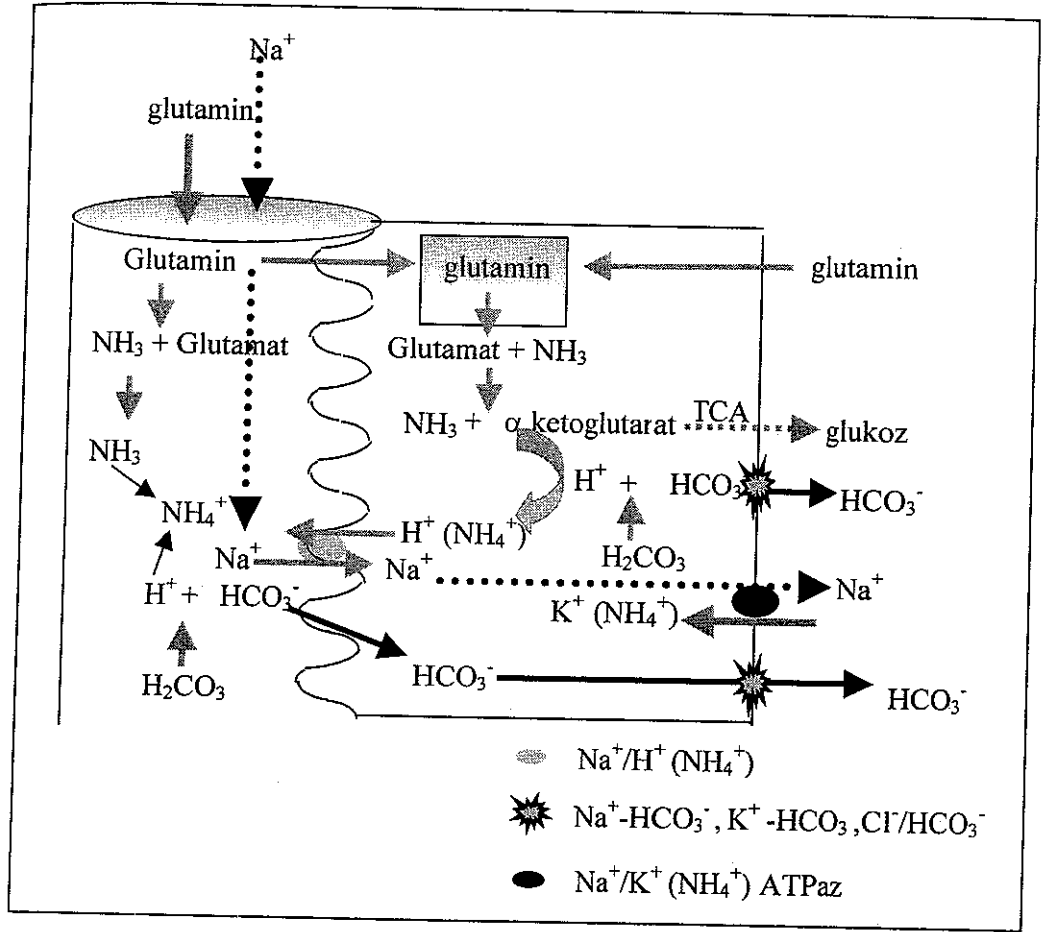
karbondioksitten karbonik asit (H_2CO_3) yapımını hem de karbonik asitin su ve karbondioksit ayrışmasını katalize etmektedir. Hücre içinde karbonik anhidraz aktivitesi ile oluşan H_2CO_3 kararsız bir asit olup, hemen hidrojen (H^+) ve bikarbonat (HCO_3^-) iyonuna ayrışmaktadır. Oluşan H^+ , hücrenin apikal membranında bol miktarda bulunan Na^+/H^+ değiştiricisi ile lümene atılırken her defasında bir Na^+ da hücre içine taşınmakta ve oluşan HCO_3^- ile birlikte bazolateral membrandan kana verilmektedir (Şekil 2 2)

Lümene atılan hidrojen iyonunun, ultrafiltratta bulunan HCO_3^- ile birleşip karbondioksit ve suya dönüşümünde de karbonik anhidraz enzimi rol almaktadır. Böylece lümene atılan her H^+ nötralize edilirken HCO_3^- da karbondioksit olarak hücreye kazandırılmaktadır. Hücre içine difüze olan karbondioksit, bikarbonat oluşturmak üzere hidroksillenmektedir. Bu "yeni" bikarbonat bazolateral membrandaki $Na^+-HCO_3^-$, $K^+-HCO_3^-$ eş taşıyıcıları ve $Cl^-HCO_3^-$ eş-değiştirici aracılığı ile kana geri emilmektedir. Proksimal tübülde Na^+/H^+ değiştirici ve $Na^+-HCO_3^-$ eş taşıyıcı aktivitesi asid-baz dengesindeki dalgalanmaların düzenlenmesi için uygun şekilde değişmektedir. Bu taşıyıcıların aktivitesi ve ekspresyonu paralel düzenlenmektedir (1-3).

Proksimal tübülde Na^+ aracılı olan emilim ve sekresyon işlemleri için gerekli enerji, bazolateral membrandaki Na^+/K^+ -ATPaz tarafından oluşturulan elektrokimyasal gradient tarafından sağlanmaktadır. Na^+/K^+ -ATPaz'ın oluşturduğu elektrokimyasal gradient doğrultusunda, Na^+/H^+ eş-değiştirici (NHE) aracılığı ile hücre içindeki bir hidrojen iyonu ile lümendeki bir sodyum iyonu yer değiştirmektedir. Proksimal tübülde NHE'in üç izoformu olduğu gösterilmiş olup, bunlar NHE1, NHE2 ve NHE3 olarak adlandırılmaktadırlar. Memelilerin pek çok dokusunda olduğu gibi böbreğin de hemen her yerinde gösterilen NHE1 izoformu, proksimal tübülün bazolateral membranında bulunurken (7, 102), NHE2 ve NHE3 izoformları apikal membranda yerleşmiştir (7). Son çalışmalar, proksimal tübül epitel hücresinin apikal membranında, NHE aktivitesinin büyük bölümünden NHE3 izoformunun sorumlu olduğunu göstermektedir (7-10, 118, 124, 127).

Proksimal tübülden salgılanan hidrojen iyonunun önemli bir kısmı (yaklaşık %70) NHE aracılı iken (1-3), bir kısmının salgılanmasında H^+ -ATPaz aktivitesinin rolü olduğunu bildiren yayınlar da vardır (74, 75, 127).

Lümene salgılanan hidrojen iyonunun lüminal sıvı pH'sını etkilememesi için başvuru yöntemlerden birisi, yukarıda belirtildiği gibi H^+ 'in HCO_3^- ile CO_2 ve H_2O 'ya çevrilmesidir. Bu sayede ultrafiltrata geçen yedek alkali tamamen geri kazanılmış olur (1-3)



Şekil 2.2: Proksimal tübülde hidrojen ve amonyum iyon sekresyonu

Salgılanan hidrojen iyonunun nötralizasyonunda ikinci yol, lümendeki amonyak (NH_3) ile hidrojen iyonunun birleşerek amonyum iyonunu (NH_4^+) oluşturmasıdır. Kan yoluyla bazolateralde proksimal tübül epitel hücreğine giren ve ultrafiltrasyon sunucu lümenal sıvıya geçen glutamin aminoasitinin, hem lümen içinde hem de hücre içinde glutaminaz enzimi aracılı deaminasyonu sırasında oluşan NH_3 , hidrojenin bağlanmasında önemli rol sahibidir. Amonyanın yağda eriyebilme özelliğinden dolayı, hücre içinde oluşan amonyak difüzyon ile lümeneye kolayca geçebilmektedir. Amonyanın bir kısmı lümeneye difüze olurken bir kısmı da hücre içinde H^+ ile NH_4^+ oluşturmak üzere protonlanmaktadır (1-3). Na^+/K^+ -ATPaz'ın potasyum bağlama bölgesi, aynı zamanda NH_4^+ tarafından da kullanılabilir olduğundan, bazolateral membrandan direkt olarak hücre içine NH_4^+ alınabilmektedir (11, 17, 107, 108). NH_3 gibi rahatça difüze olamayan NH_4^+ 'ün lümeneye sekresyonu, $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ değiştiricisiyle -ki bu aynı zamanda Na^+/H^+ değiştiricisidir- gerçekleşmektedir (11-18, 24, 107) (Şekil 2.2).

Lümene salgılanan hidrojen iyonu, üçüncü olarak, filtre olan dibazik fosfat ve sulfatları (HPO_4^{2-} , HSO_4^{-}) monobazik fosfata (H_2PO_4^- , H_2SO_4^-) ve sulfata dönüştürmek üzere titre etmektedir (1-3).

2.3. Proksimal Tübül Metabolik Fonksiyonları ve Amonyak Yapımı

Böbreğin metabolik fonksiyonlarından amonyagenezis gibi glukoneogenezis de proksimal tübül hücresinde gerçekleşmektedir (11,19-24, 84, 85, 114, 115). Böbreğin glukoneogenezis aktivitesi, ileri açlık ve pH düşmesi hallerinde, karaciğerin yetersiz kaldığı koşullarda artmakta ve bu yolla önemli düzeyde glukoz yapıp kana vermektedir. Böbrek bu şekilde, karaciğerdeki glukoneogenezis yetersizliğinden kaynaklanan glukoz açığını kapatmaktadır (5, 6).

Dokularda ve özellikle kas dokusunda aşırı aktivite veya katabolizma artışı durumlarında aminoasidlerin deaminasyonuna bağlı amonyak üretimi de artmaktadır. Bu durumda en önemli problemlerden birisi, amonyak gibi toksik bir maddenin beyine zarar vermeden çevre dokulardan toplanıp toksik olmayan hale dönüştürülerek vücuttan dışarı atılmasıdır (1-3). Amonyakın kan dolaşımında en zararsız taşınma şekli glutamin yapısındaki halidir (1-6, 25-27). Dokularda oluşan amonyak "glutamin sentaz" aracılığıyla glutamat ile birleşerek glutamini oluşturmakta ve glutamin yapısı içinde dolaşıma verilmektedir. Bu nedenle amonyak taşıyıcısı olarak kabul edilen glutaminin kandaki konsantrasyonu diğer amino asidlerden fazladır (27).

Tüm dokularda sentezlenen glutamin, kan yoluyla karaciğere ve böbreğe taşınmakta ve bu dokularda bulunan "glutaminaz" aracılığıyla tekrar glutamat ve amonyum iyonuna (NH_4^+) ayrışmaktadır. Karaciğerde oluşan amonyak üreye çevrilerek vücut dışına atılırken, böbreğe gelen glutamin bir taraftan glukoneogenez için substrat oluşturup glukozla dönüştürülürken, diğer taraftan da vücut asid baz dengesinde önemli olan amonyak ve bikarbonat üretimine katılmaktadır (1-3, 5, 6). Ayrıca glutamin ile matriks proteinlerinin yapımı arasında yakın ilişki de gösterilmiştir (51).

Yukarıda belirtildiği gibi glutamin böbrekte, proksimal tübül hücresine hem ultrafiltrat yoluyla apikal taraftan hem de kan yoluyla bazolateral taraftan, sodyuma bağımlı amino asid taşıyıcıları ile alınmaktadır (14, 21-23, 27-29, 31-32, 77, 79, 116). Glutaminin deaminasyonu hücre içinde iç mitokondriyel membranda yerleşmiş olan "fosfat bağımlı glutaminaz" (PDG) aracılığı ile olabileceği gibi, hücre dışında; apikal ve bazolateral membranda yerleşmiş olan "fosfat bağımsız glutaminaz" (PIG, γ -GT) aracılığı ile de olabilmektedir (23, 25-27, 31-33, 79, 84, 85, 116). PDG aktivitesinin ürünleri olan glutamat ve NH_4^+ direk olarak sitosolik kompartmana salınmaktadır. Mitokondri iç membranındaki bu enzimin aktivitesi sitozolde bulunan glutamat tarafından inhibe edilmektedir. Çünkü glutamat enzimin reaktif bölgesi için glutamin ile yarışmaktadır (25).

Gerek hücre dışında PIG aracılı oluşup hücre içine apikal membrandan "Excitatory Amino Acid Carrier" (EAAC1;) ve bazolateral membrandan glutamat taşıyıcısı olan GLT-1 (27, 31, 32, 34) ile taşınan ve gerekse hücre içinde PDG aracılı oluşan glutamat, proksimal tübül hücresinde üç farklı yoldan birisine girmektedir (33, 25) (Şekil 2.3)

Bunlardan transaminasyon yolağı "alanin amino transferaz" (ALT) tarafından katalizlenmekte ve sonuçta bir mol glutamattan bir mol α -ketoglutarat ve bir mol alanin oluşmaktadır. Glutaminin deaminasyonu ile oluşan glutamat ikinci olarak mitokondriyel "glutamat dehidrogenaz" tarafından katalizlenen deaminasyon yolağına (GDH) girebilmektedir. Bu yolağın sonunda mitokondri matriksinde bir mol α -ketoglutarat ve bir mol amonyak oluşmaktadır. Deaminasyon reaksiyonu mitokondri matriksinde gerçekleşirken, transaminasyon reaksiyonu hem sitosolde hem de mitokondri içinde gerçekleşmektedir (20, 25, 33, 38, 88).

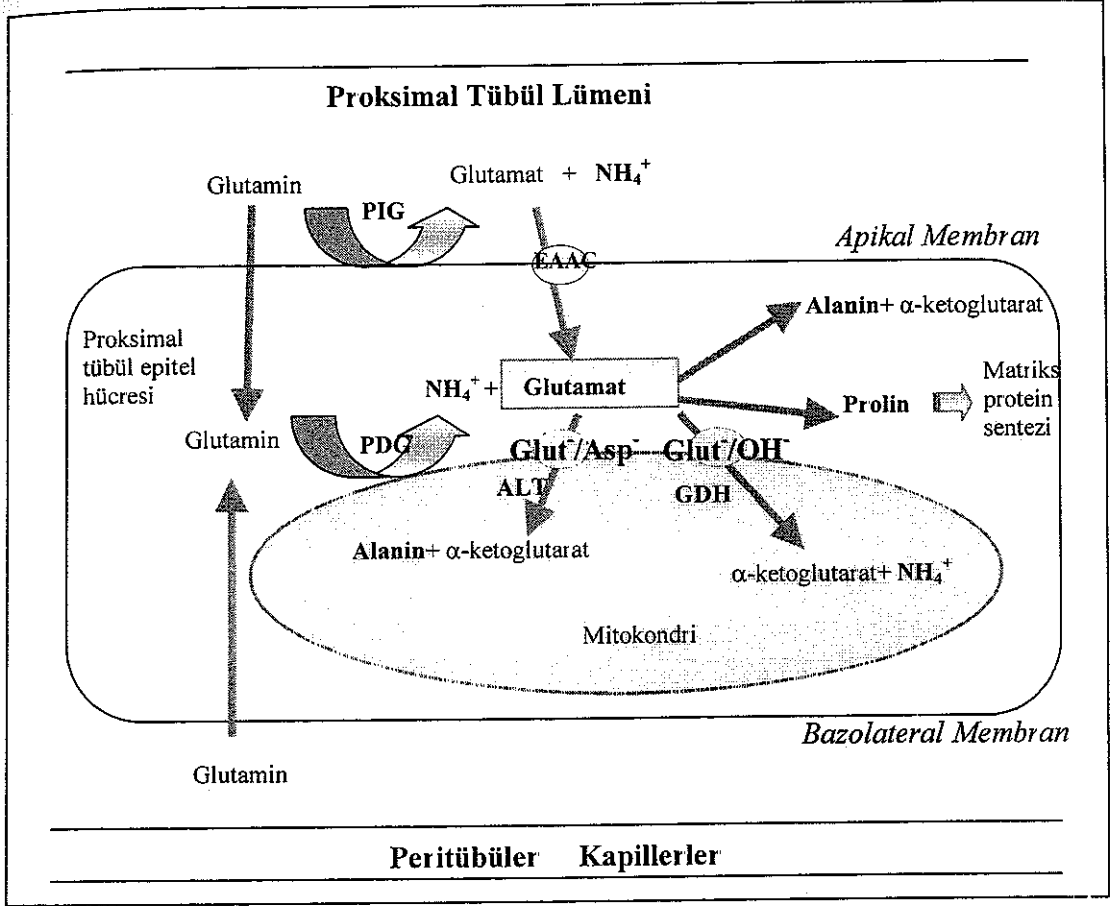
Sitozoldeki glutamat, hücre dışındaki glutamatla eş düzeyde olacak şekilde plazma membran sistemi ile muhtemelen nötral amino asit taşıyıcılar ile hücre dışına da taşınmaktadır (25, 33, 38).

Sitoplazmadaki glutamatın mitokondriyel matriks içine transportu iç membrandaki iki glutamat taşıyıcısı ile olmaktadır. Glutamat dehidrogenaz (GDH) ile birleşmiş olan Glu^-/OH^- ve alanin amino transferaz (ALT) ile birleşmiş olan $\text{Glu}^-/\text{Asp}^-$ taşıyıcıları glutamata matriks içine almakta (27, 36) ve bu sırada alfa ketoglutarat ve NH_4^+ veya alanin oluşmaktadır. Normalde bu yollardan ALT yolağı GDH yolağından çok daha aktiftir ve bir mol glutaminden bir mol amonyak oluşmaktadır. (27, 38, 88). ALT yolağının inhibisyonu ile bir mol glutaminden iki mol amonyak oluşmaktadır (38). Hücre içi pH azalışı da sitosolik glutamatın mitokondriyel GDH yolağına kaymasına ve amonyak üretiminde artışa neden olmaktadır (20, 32, 38).

Sitozolik ALT yolağı, ALT enzim aktivitesine olduğu kadar, glutamat, piruvat ve H^+ varlığına da bağlıdır (27, 125). Mitokondriyel GDH yolağı ise iç membrandaki glutamat/ H^+ taşıyıcısına, sitoplazmadaki H^+ ve glutamata ve GDH aktivitesine bağlıdır. PDG protein miktarını etkileyen faktörler arasında sitoplazmadaki glutamat konsantrasyonuna ek olarak, asid-baz durumu ve growth faktörler vardır (27).

Böbrek proksimal tübül hücreleri vücut sıvısındaki yedek alkali azalışına glutamin kullanımı ve glutaminaz enzim aktivitesinde artış ile cevap vermektedir (20, 23, 32, 35, 37). Özellikle, intramitokondriyel GDH yolağındaki aktivite artışı sonucunda, glutaminden iki molekül NH_4^+ ve α -ketoglutaratın tamamen oksidasyonu ile iki molekül bikarbonat (HCO_3^-) meydana gelmektedir. Amid ve amino nitrojenler, NH_4^+ olarak hücrenin apikal

yüzeyindeki Na^+/H^+ (NH_4^+) eş-değiştirici aracılığı ile tübüle salgılanmakta ve idrarla atılmaktadırlar (11-18, 24, 102, 107)



Şekil 2.3: Proksimal tübül epitel hücresinde glutamin metabolizması

Glutamat üçüncü olarak kollajen sentezi için gerekli bir amino asid olan prolin sentezine katılmaktadır (Şekil 2.3). Glutamatın halka yapısındaki bir türevi olan prolin sentezinin ilk aşamasında, glutamatın γ -karboksi grubunun ATP ile reaksiyonu sonucu γ -glutamilfosfat oluşmaktadır. Bunun NADPH ile indirgenmesi sonucu oluşan glutamat γ -semialdehit, kendiliğinden halkasal yapı kazanmakta ve ardından indirgenerek kollajenin yapı taşı olan proline dönüşmektedir (5, 6). Bu nedenle glutamin mevcudiyetinde proksimal tübülden matriks proteinlerinin sentezi artmaktadır (27).

Glutamatın transaminasyonu ve/veya deaminasyonu sonucu oluşan α -ketoglutarat, sitrik asid döngüsü üzerinden fosfoenolpirüvata çevrilmekte ve glukoneogenezise katılmaktadır (Şekil 2.2) (5, 6, 19, 20, 27). Böbrekler sistemik dolaşımdaki glutaminin $\%18.3 \pm 2.9$ 'u kandan almakta, diğer taraftan kana kendi sentezledikleri glutamini de vermektedir. Dolaşımdaki glutaminin $\%5.2 \pm 0.6$ 'sı böbrek kaynaklıdır. Dolaşımdaki glukozun $\%4.2 \pm 0.2$ 'ini ise

böbrekler tarafından, glutaminden glukoneogenez ile sentezlenmiş olan glukoz oluşturur (55).

2.3.1. Amonyak Yapımına Etkili Faktörler

Angiotensin II (14, 21, 22, 28, 29), insülin (9, 87, 109), paratiroid hormon (8, 42), büyüme hormonu (8, 35), tiroid hormon (9), glukokortikoidler (9), norepinefrin (8, 42), dopamin (8), ve prostaglandin F_{2α} (91) gibi çok değişik faktörlerin proksimal tübülde amonyak yapımını etkilediği bildirilmiştir. Bunlar arasında en fazla çalışılmış olan angiotensin II (A-II)' dir. Bu hormonun proksimal tübüldeki konsantrasyonunun (30 nMol) plazmaya göre (30 pMol) 1000 misli fazla oluşu (43, 29, 30), hem apikal hem de bazolateral membranda reseptörlerinin bulunuşu (28, 22) amonyak üretiminde A-II'nin rolünün çok fazla incelenmiş olmasının nedenleri arasındadır. Proksimal tübüle Na⁺ girişi ile glutamin alınması arasında paralelizim, proksimal tübülden Na⁺ geri emilimini etkileyen A-II'nin (14, 22, 29, 54, 94) amonyak yapımına etkisinin çok incelenmiş olmasının bir başka nedenidir.

2.3.2. Angiotensin II

Böbrekte bir volüm sensörü olarak işlev gören jukstaglomerüler aparatın granüler hücrelerinden, kan basıncındaki azalmaya ve tübüler sıvıdaki sodyum konsantrasyonunun azalmasına cevaben salınan renin, daha önce de belirtildiği gibi angiotensinojen'i bir dekapeptid olan angiotensin I'e dönüştürmektedir. Angiotensin I ise Angiotensin Converting Enzim (ACE) tarafından angiotensin II'ye dönüştürülmektedir. Dolaşımda pikomolar konsantrasyonlarda bulunan A-II, hipotalamustan ADH ve adrenal korteksten aldosteron salınımını uyaran, ayrıca, arterioler ve venüler düz kasta kasılmaya neden olan bir oktapeptittir. Böylece, doğrudan ve dolaylı olarak böbrek fonksiyonlarının en büyük düzenleyicilerinden birisidir (1-3)

A-II'nin böbrek fonksiyonları üzerine etkileri; renal vasküler dirençte artış (89, 90) ve buna bağlı medüller kan akımında azalış (89), mezengial hücre kasılması ve TGF modülasyonu (1-3, 89, 104), mezengial hücre ve proksimal tübül epitel hücresinde ekstraselüler matriks proteinlerinin yapımı (41, 51, 54, 92), proksimal tübülde sodyum ve bikarbonat geri emiliminde artış (14, 22, 29, 54, 94), prostaglandin sentezinde artış (52, 119), glukoneogenesis ve amonyagenesiste artış (14, 21, 22, 24, 28, 29, 41, 44, 54, 117) şeklinde özetlenebilir.

Kortikal nefron segmentlerinde, özellikle, proksimal kıvrımlı tübülde A-II için yüksek bağlanma afiniteli bölgeler gösterilmiştir (52). Tübül epitel hücrelerinde A-II hem lüminal hem de bazolateral yüzeye bağlanmaktadır (22, 28). Son yapılan çalışmalarda dolaşımdaki A-II'ye ilaveten, bölgesel A-II üretimi için gerekli olan faktörlerin hepsinin böbrekte mevcut olduğu ve çeşitli değişimlere cevaben plazmadaki seviyesinden bağımsız olarak böbrek A-II üretiminin değişebildiği gösterilmiştir (22, 30, 43). Histokimyasal çalışmalarda

proksimal tübül epitel hücrelerde renin mRNA'sının, angiotensinojen mRNA'sının ve angiotensinojenin varlığı gösterilmiş, ayrıca endotel hücrelerinde olduğu gibi proksimal tübül hücrelerinin yüzeyinde de ACE'nin olduğu gösterilmiştir (43). Proksimal lümenal kompartmanda A-II'nin üretimi ve konsantrasyonunun yüksek (29-30, 43) olduğunu gösteren çalışmalarla birlikte, A-II reseptörlerinin bazolateralde olduğu kadar, lümenal membranda da olduğunu gösteren yayınlar proksimal tübül transport fonksiyonlarının düzenlenmesinde tübül içi A-II'nin rolü olduğu görüşüyle uyum içindedir.

Proksimal tübülde A-II, apikal ve bazolateral membranda yerleşmiş olan AT_{1A} ve/veya AT_{1B} reseptörleri aracılığı ile sodyum geri emilimine doğrudan etkide bulunmaktadır (52). Reseptörüne bağlanan A-II, Adenilat siklaz inhibisyonu ve ardından hücre içi cAMP miktarında azalış ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonunda bir artış meydana getirmektedir (8, 28, 42, 49, 53, 90). Sitozolik cAMP, hücrenin apikal membranındaki NHE için inhibitör etkili olduğundan (22, 28, 42, 52, 53, 87, 104) A-II'nin yaptığı cAMP azalışı ile bu taşıyıcı proteinin aktivitesi artmaktadır. Bazolateral membrandaki Na^+/K^+ ATPaz aktivitesini de arttıran A-II (14, 29, 49, 92, 94, 120), bu şekilde tübül Na geri emilim ile birlikte tübül hidrojen iyon sekresyonu da arttırmaktadır. Ancak yapılan çalışmalar A-II'nin doza bağlı, bifazik etkilere sahip olduğunu, düşük dozlarda (nanomolar ve pikomolar) sıvı geri emilimini arttırırken yüksek dozlarda (>nanomolar) zıt etki yaptığını ortaya çıkarmıştır (22, 52, 54).

Proksimal tübülde amonyagenesisini stimüle ettiği bilinen A-II, hem total amonyak yapımını hem de lümen içine amonyak salgısını da arttırmaktadır (14, 21, 22, 24, 28, 29, 44). Asidozda renin-A-II aktivasyonu ve bu koşulda A-II'nin amonyak yapımına uyarıcı etkisi, amiloride duyarlı NHE üzerindedir (14, 21-23, 27-29, 118). A-II'nin amonyak salgısına yaptığı artış ile hücre içi kalsiyum konsantrasyonunda yaptığı artış arasında büyük bir korelasyon saptanmıştır (14). Ancak bazal amonyak yapımına A-II'nin etkisi olmadığı da söylenmektedir (55). Proksimal tübül segmentlerinde yapılan pek çok çalışmada A-II'nin 10^{-12} - 10^{-9} M konsantrasyonlarda, AT_1 reseptör aracılığı ile amonyak yapım ve salgısını arttırdığı 10^{-7} - 10^{-6} M dozlarda ise azalttığı belirtilmektedir (22, 52, 54, 55).

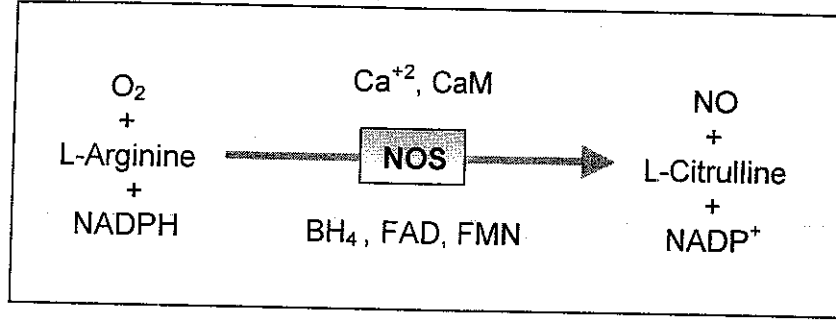
2.3.3. A-II ve Nitrik Oksid (NO) İlişkisi

A-II'nin böbrek vasküler ve tübül yapıları üzerine etkilerinde, nitrik oksid (NO)'in rolü olduğuna ilişkin çalışmalar vardır. A-II'nin böbrekte NO üretimini arttırdığı (90, 98, 99), ayrıca endojen NO yokluğunda A-II etkilerinde artış olduğu saptanmıştır. Bu nedenle, A-II aracılı etkilerde NO'nun bir negatif feedback (geri bildirim) mekanizması oluşturup, bu etkileri azalttığı belirtilmektedir (39, 48, 49, 56-59, 61, 63, 64, 69, 90, 92, 120).

1980'de Furchgott ve Zawadski tarafından endotelyum kökenli gevşetici faktörün keşfinden ve daha sonra Palmer ve arkadaşları ile Ignarro

ve arkadaşlarının bu faktörü nitrik oksid (NO) olarak tanımlamalarından sonra, NO'nun organizmada çeşitli fonksiyonların düzenlenmesinde bir otokoid olarak rol oynadığı gösterilmiştir (39, 48, 56-59). Kan basıncının kontrolü, merkezi sinir sisteminde nörotransmision, makrofaj aktivitesi, trombozis ve hemostasis, böbreğin tübüler ve metabolik aktivitesi NO tarafından kontrol edilen fonksiyonlar arasında yer almaktadır (47, 50, 58, 60-62, 66, 92, 93)

NO, L-arginin amino asidinin terminal guanidino nitrojen atomundan gelmektedir L-arginin; nitrik oksid sentaz (NOS) aracılığı ile L-citrulline ve NO'ya dönüşmektedir (39, 48, 56-59). İnsanlarda günlük alınan L-argininin yaklaşık %1'i bu yolda metabolize olmaktadır. Bu amino asit aynı zamanda poliaminler, L-prolin ve agmatin sentezi için de bir moleküler substrattır (60). İnsan ve sıçanlarda plazma L-arginin düzeyi $100\mu\text{M}$ 'dir (92). Vücudun başlıca arginin kaynağı böbrektir ve renal arginin sentezinin büyük bir kısmı proksimal tubülde gerçekleşmektedir (92)



Şekil 2.4: L-Arginin'den NO oluşumu

Nitrik oksid sentaz (NOS), cytochrome P450 benzeri bir hemoprotein'dir ve NO üretimi için kofaktörlere ihtiyacı vardır. Flavin adenine dinucleotide (FAD), flavin mono nucleotide (FMN), tetrahydrobiopterin (BH₄) ve calmodulin NOS aktivitesi için gerekli olan kofaktörlerdir (Şekil 2.4) (39, 48, 56-59)

2.3.3.1. NOS İzofomları

Kemiriciler ve insanlardan saflaştırılan üç NOS izoformu vardır. Bunlar tip I, tip II, tip III NOS olarak isimlendirilmektedir (39, 50, 59, 63-67, 92)

Tip I NOS (nNOS, NOS-1) nöronlarda bulunan 168 kDa ağırlığında bir proteindir. Kalmodulin bağımlı NO sentezi yapan bu enzim spinal kordun belirli bölümlerinde, nonadrenerjik nonkolinerjik periferik nöronlarda, solunum yolu, akciğer, uterus ve midenin epitel hücrelerinde, pankreas adacık

hücrelerinde, iskelet kası hücrelerinde ve böbrekte ağırlıklı olarak macula densa hücrelerinde bulunmaktadır. Pek çok nöronda NOS 1 nörotransmitterlerle birlikte bulunmaktadır (63, 96, 97).

Tip II NOS (iNOS, NOS-2) bakteriyel endotoksin veya inflamatuvar sitokinlere cevaben indüklenen, kalsiyum bağımsız, 130 kDa ağırlığında bir proteindir. Makrofajlarda, nötrofillerde ve böbreğin değişik nefron segmentleri dahil pek çok hücrede bulunmaktadır (97) Bu izoform calmodulin ile sıkı bir bağlantı içinde olduğundan NO üretiminin uyarılmasında kalsiyuma bağıllık göstermez. Konstitütif olarak tanımlanan eNOS ve nNOS izoformlarına göre daha büyük bir NO üretme yeteneğine sahiptir (97, 63, 100).

Tip III NOS (eNOS, NOS-3) endotelyum kökenli, 135 kDa ağırlığında bir proteindir. Fizyolojik sınırlar içinde hücre içi kalsiyum konsantrasyonundaki artış ile aktive olmaktadır. Bu izoform hücre membranında lokalize olan tek NOS izoformudur ve bir N-myristolation bölge içerir (59, 63-67). Endotelyumda asetilkolin ve bradikinin gibi agonistler fosfoinositid ikinci haberci sisteminin aktivasyonu ile hücre içi inositol (1,4,5)-triphosphate (IP₃) üretimini stimüle etmektedir. IP₃, endoplazmik retikulumdaki reseptörlerine bağlanarak intraselüler depolardan kalsiyum salınımına yol açmakta ve böylece kalsiyum-kalmodulin bağımlı NOS aktivasyonu yapmaktadır (63).

Üretilen NO, yağda eriyebilen bir gaz olduğundan, hücre membranından hızlı bir şekilde difüze olur ve bitişikteki hücrelerin iç kompartmanlarına ulaşır. Örneğin endotel hücrelerinde üretilen NO, hemen altındaki düz kas hücrelerine difüze olarak düz kasta gevşemeye neden olmaktadır (95). Difüzyon uzaklığı 100-200 µm olmasına karşın, hemoglobin ve süperoksit anyonu gibi NO-süpürücü moleküller, NO'nun yarı ömrünü ve böylece difüzyonunu azaltmaktadır (63). NO'nun biyolojik dokularda yarı ömrü, 1-5 saniye olarak tahmin edilmektedir (39).

NO hücre içi çeşitli ferroporphyrin proteinlerle reaksiyona girmektedir. En önemli reaksiyonlarından birisi sitosolik guanilat siklaz ile olanıdır. Bu reaksiyonun sonunda nitrosyl-heme-enzyme üçlü kompleksi oluşur, ki bu kompleks çözünebilir guanilat siklazın (sGC; soluble guanylate cyclase) aktive olmuş halidir. sGC aktivasyonu ile hücrede siklik guanozin 3', 5'-monofosfat (cGMP)'in üretiminde artış olmaktadır (65, 67, 100). NO için hücrede ikinci haberci rolünde olan cGMP, NO'nun neden olduğu etkilere aracılık etmektedir (39, 45, 59).

2.3.3.2. NOS izoformlarının Böbrekte Dağılımı

Vücutta NOS substratı olan L-arginin'in esas kaynağı böbreklerdir ve böbrek büyük bir NO sentez kapasitesine sahiptir (92). Genel olarak böbrekte

üretilen NO'nun otokrin veya parakrin olarak renal tübüler ve vasküler fonksiyonları etkilediği kabul edilmektedir (56, 57, 59)

Tablo 2.1: Böbrekte NOS izoformlarının dağılımı ve cGMP miktarları

Lokalizasyon	eNOS, nNOS	iNOS	cGMP
Preglomerüler damarlar	+		
Glomerulus	+	++	+++
Proksimal kıvrımlı tübül		++	++++
Proksimal düz tübül		++	++++
İç medüller kalın henle	+		Eser miktarda
Medüller kalın henle		++	Eser miktarda
Makula densa	++++		
Distal tübül		++	
Kortikal toplayıcı kanal	+	++	++
Dış medüller toplayıcı kanal	+	++	++
İç medüller toplayıcı kanal	++++	++	+
Medüller interstisyel hücreler		+	

Çeşitli çalışmalarda böbrekte nNOS, iNOS ve eNOS enzimatik aktivitesi ve mRNA ekspresyonu olduğu gösterilmiştir. Bunlardan nNOS; makula densa, iç ve dış medüller toplayıcı kanallar, glomerüler visceral epitelyum ve efferent arteriolün epitel hücrelerinde ve perivasküler konnektif dokunun renal sinirlerinde lokalize olmuştur (56, 57, 59, 68). Glomerüler kapillerlerin, afferent ve efferent arteriollerin, intrarenal arterlerin ve medüller vasa recta'nın endotelyumunda eNOS varlığı saptanmıştır (56, 62, 69). Sitokinlere cevaben tüm vücutta ekspresyonu artan iNOS ise normal fizyolojik koşullarda böbreğin çıkan kalın henlesinde, S3 proksimal segmentinde, toplayıcı kanallarında ve arkuat arterlerde eksprese edilmektedir (39, 50, 59, 63-67, 100).

Biyokimyasal çalışmalar sonucunda renal medullanın renal korteksten daha büyük bir NO üretim kapasitesi olduğu (66) ve bazal medüller NOS aktivitesinin renal korteksten üç kat fazla olduğu gösterilmiştir (39)

Böbrekte NOS aktivitesinin segmental dağılımını saptamak amacıyla, izole renal tübüler ve vasküler segmentlerde NOS aktivitesinin analizleri yapılmış ve iç medüller toplayıcı kanalların en fazla NOS aktivitesine sahip segment olduğu görülmüştür. Vasa recta ve glomerulus, iç medüller toplayıcı kanallardan sonra en yüksek NOS aktivitesine sahip segmentlerdir. Böbrek nefron segmentlerinin farklı bölgelerinde guanilat siklaz ve NOS'un lokalizasyonu Tablo-2 1 de gösterilmektedir (66).

2.4. Böbrek Fonksiyonları ve Nitrik Oksid

Bir serbest radikal olan NO; böbrekte sıvı ve sodyum geri emilimi, renal hemodinami, renin sekresyonu ve tübüloglomerüler feedback cevap gibi çeşitli fonksiyonlar üzerine etkilidir (59, 60, 65, 66, 70, 71). Ayrıca böbrekte Cyclooxygenase-1 ve 2 aktivasyonu yaparak prostaglandinlerin üretiminde artışa neden olmaktadır (50, 63, 69). Difüzyon yeteneğinden dolayı renal damarlarda ya da herhangi bir nefron segmentinde üretilen NO, çevre yapılarıdaki fonksiyonları etkileyebilmektedir (39, 47, 71). İzole proksimal tübüllerde NOS aktivitesi 4-5 nmol L-³H]citrulline.mg protein⁻¹ saat⁻¹ olarak bildirilmiştir (67).

2.4.1. NO ve Renal Hemodinami

Endotelyum, renal hemodinaminin, sodyum geri emiliminin, natriürezisin ve ekskresyon fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Normal endotelyumun vazodilatör ve vazokonstriktör mediatörler arasındaki dengeyi sağlaması ve hemostasise etkisi renal fonksiyonların kontrolünde önemli bir yere sahiptir. NO afferent arterioller tonüsün yerel düzenlenmesindeki ve mesangiumun gevşemesindeki rolünden dolayı glomerüler perfüzyonda büyük bir öneme sahiptir (100, 111, 112, 121). Ayrıca NO'nun antiplatelet ve antitrombotik etkileri glomerüler kapillerler içinde trombozisi engellemektedir. Glomerulusta NO sentez ve/veya salınımındaki bir azalış, glomerüler trombozisin artmasına ve hücrel proliferasyona neden olmaktadır (95).

Farklı türlerde yapılan çeşitli deneyler, NOS blokasyonunun, sistemik kan basıncını artırdığını ve renal fonksiyonlarda değişime neden olduğunu göstermiştir. Sistemik kan basıncında bir değişim olmaksızın intrarenal NOS aktivitesi inhibe edildiğinde afferent arterioller direncinde artış, Kf'de ve tek nefron GFR'de azalış gözlenmektedir (50, 64, 100).

Yapılan çalışmalar, afferent arteriolde A-II'nin neden olduğu vazokonstriksiyonu önlemede NO'nun önemli rol adığını göstermekte, bu nedenle NOS inhibisyonuna bağlanan etkilerin bir kısmının A-II aracılı vazokonstriksiyonun güçlenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (72, 39, 56, 57, 92). Renal damarlarda A-II'nin neden olduğu vazokonstriksiyona karşı NO'nun bu koruyucu etkiyi nasıl yaptığı tartışma konusudur. Üzerinde durulan açıklamaya göre A-II, NO üretimini arttırmakta ve bu şekilde kendi

vazokonstriktör etkisini azaltmaktadır (90, 98, 99). Deng ve arkadaşları (98) akut A-II infüzyonunun üriner NO metabolitlerini (nitrit ve nitrat) arttırdığını yani NO üretiminde artışa neden olduğunu göstermişlerdir. Hennington ve arkadaşları (99) ise A-II infüzyonunun renal eNOS mRNA üretiminde artışa neden olduğunu ve uzun dönemde eNOS protein sentezinin arttığını göstermiş ve A-II'nin kronik olarak böbrekte NO üretimini arttırdığını belirtmişlerdir

2.4.2. NO ve Renin Sekresyonu

Renin sentez ve sekresyonu; baroreseptörler, sempatik sinirler (β -adrenerjik), prostaglandinler ve distal tübül ile macula densadaki sıvı kompozisyonu gibi faktörler ile kontrol edilmektedir (1-3). Tübüler makula densa hücrelerinde, sodyum transport aktivitesine cevaben oluşan "makula densa sinyali", Jukstaglomerüler granüler hücrelere gelerek renin sentez ve sekresyonunu inhibe etmektedir (59). Tübüler sıvıdaki sodyum klorür konsantrasyonundaki artış macula densa sinyalinin doğmasına ve renin sekresyonunun azalmasına neden olur (56, 59). Böbrek ontogenezi sırasında NO oluşumu ve renin ekspresyonu ard arda meydana gelmektedir. Bu bulgu renin sisteminin kontrolünde NO'nun katkısını destekleyen bir bulgu olarak değerlendirilmektedir (59). Bulguların çoğuna göre; in vivo akut veya subakut NOS inhibisyonu bazal renin sekresyonunu azaltmaktadır. Kronik NOS inhibisyonunda ise renin sekresyonu artmaktadır. İzole perfüze böbrek deneyleri in vivo deneylerle uyumlu olup, NO'nun renin sekresyonunu arttırdığını göstermektedir (101). Ancak, farklı deney düzeneklerinde yapılan çalışmalar, NO'nun renin sekresyonu üzerine etkileri hakkında çelişkili bulguların ortaya çıkmasına neden olmuştur (56, 59, 62, 68, 106, 123).

2.4.3. NO ve Tübüloglomerüler Feedback (TGF) Cevap

Macula densada, mesengiumda ve glomerüler arteriolde üretilen NO, TGF cevabın duyarlılığını doğrudan etkilemektedir. Tübüler sistemde ve peritübüler kapillerlerde üretilen NO'nun, hem tübüler transportu değiştirdiği hem de macula densa'ya gelerek TGF cevabı etkilediğine dair çalışmalar olsa da (56, 59), TGF modülasyonunu yapan NO'nun macula densada nNOS aracılı üretilen NO olduğunu belirten çalışmalar çoğunluktadır (39, 47, 57, 59, 63, 66). NOS inhibisyonunun TGF cevapta bir artışa yol açtığı bu nedenle, endojen NO'nun TGF cevabı aşağıya çektiği belirtilmektedir (57, 69). Spesifik nNOS inhibitörlerinin ve nonspesifik NOS inhibitörlerinin her ikisinin de aynı düzeyde TGF cevap artışına yol açtığını gösteren çalışmalar, TGF modülasyonunu yapan NO'nun macula densadaki nNOS tarafından üretilen NO havuzundan geldiği görüşünü desteklemektedir (56, 59, 100). NO'nun yaptığı TGF modülasyonu; macula densada sodyum transportuna, ekstraplomerüler mezengiuma etkisi veya glomerüler mikrodamarlara etkisi yoluyla olabilir (39, 47, 59, 63, 66)

2.4.4. NO ve Eritropoietin Üretimi

Eritrosit yapımında önemli bir faktör olan eritropoietin'in böbrekte yapımı hipoksik koşullarda artmaktadır (1-3). Böbreğin bu fonksiyonuna NO'nun etkisi kesinlik kazanmamakla birlikte, hipoksik koşullarda meydana gelen eritropoietin sentez artışının non spesifik NOS inhibisyonu ile azaldığı ve NO'nun cGMP aracılı olarak bu stimülasyonda rol aldığı belirtilmektedir (76, 126).

2.4.5. NO ve Tübüler Transport

NO'nun tuz ve sodyum atılımındaki rolü gösterilmiştir. NOS inhibitörlerinin renal arterden infüzyonu sodyum atılımında bir inhibisyona neden olmaktadır (48, 50, 57, 72, 92, 110, 122) NO'nun neden olduğu natriürezis, muhtemelen, A-II'nin proksimal tübülde sodyum geri emilimine olan etkisinin antagonize olmasına sekonder olarak, ve kortikal toplayıcı kanallarda sodyum geri emiliminin inhibisyonu ile ortaya çıkmaktadır (48, 57, 120). NOS inhibitörleri ile sodyum atılımında meydana gelen azalma cyclooxygenase inhibitörleri ile daha da artmaktadır. Bu nedenle intrarenal prostaglandinler ile NO arasında bir ilişkiden söz edilmektedir. Yüksek tuz diyeti uygulanan sıçanlarda NO metabolitlerinin üriner atılımında bir artış olması tuz-duyarlı hipertansiyonda değişen NO üretiminin rolünü göstermektedir (72, 95).

Son 10 yıldır yapılan çalışmalar ile NO'nun nefron transportunun düzenlenmesindeki önemi ortaya koyulmuştur (47). Nefron boyunca NO'nun etkilediği taşıyıcılar Tablo-2.2'de özetlenmiştir.

Proksimal tübüler transport mekanizmalarına NO'nun etkisini göstermek için düzenlenen in vitro izole proksimal tübül ve hücre kültür çalışmalarından elde edilen sonuçlar çelişkilidir. McKee ve arkadaşları, ekzojen ve endojen NO'nun, renal medulla dilimlerinde Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesini inhibe ettiği göstermişlerdir. Guzman ve arkadaşları da medüller kortikal tübüllerde hem lipopolisakkarit stimülasyonu ile artan endojen NO'nun, hem de SNP (0.4 mM) kaynaklı ekzojen NO'nun Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesini yaklaşık %30 azalttığını bulmuşlardır (46). OK (opossum kidney) hücrelerde yapılan çalışmalarda da benzer bulgu saptanmış ve NO'nun bu inhibisyonu genel mediatörü cGMP aracılığıyla yaptığı gösterilmiştir (39, 45, 47, 50).

Proksimal tübül epitel hücresinin apikal membranında yerleşmiş olan Na^+/H^+ exchanger aktivitesinin de NO tarafından (10^{-3} M SNP) %30 azaltıldığı ve bu inhibisyonun L-NAME ile ortadan kalktığı, fakat cGMP analoglarıyla (10^{-3} M 8-Br-cGMP) tekrar gözlemlendiği gösterilmiştir. Yani NO, NHE aktivitesini de cGMP aracılı bir mekanizmayla inhibe etmektedir (39, 45-48, 50, 110)

Tablo 2.2: Farklı nefron segmentlerinde taşıyıcı proteinler üzerine NO'nun etkisi

Taşıyıcı	Nefron Segmenti	Etki
Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz	Proksimal tübül	Inhibisyon
Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz	Çıkan kalın henle	Etkisiz
Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz	Kortikal toplayıcı kanallar	Etkisiz
NHE3	Proksimal tübül	Inhibisyon
NHE3	Çıkan kalın henle	Inhibisyon
NKCC2	Çıkan kalın henle	Inhibisyon
EnaC	Kortikal toplayıcı kanallar	Inhibisyon
H ⁺ -ATPaz	İç medüller toplayıcı kanallar	Stimülasyon
K ⁺ -kanalları	Çıkan kalın henle	Etkisiz, Stimülasyon
K ⁺ -kanalları	Kortikal toplayıcı kanallar	Stimülasyon, Inhibisyon

Diğer taraftan, sıçan böbreklerinde yapılan mikroperfüzyon çalışmalarında, proksimal tübüler sodyum ve bikarbonat transportunda NO'nun bifazik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (47, 66) 1 μ M sodyumnitroprussid (SNP) lüminal perfüzyon solüsyonuna eklendiğinde, proksimal tübüler sıvı ve bikarbonat geri emiliminin %50-70 oranında arttığı saptanmıştır. Bu artışın cGMP bağımlı olduğu ve bu olaya Na⁺/H⁺ eş-değiştirici stimülasyonunun aracılık ettiği gösterilmiştir (47). 1mM SNP eklendiği zaman ise proksimal tübüler sıvı ve bikarbonat geri emiliminin %50-70 azaldığı gösterilmiştir. Bu verilere dayanarak NO'nun düşük dozlarda proksimal tübüler geri emilimi stimüle ettiği, yüksek dozlarda ise inhibe ettiği söylenebilir (67). Ancak tüm in vivo çalışmalar genel olarak NO'nun proksimal tübüler transportu azalttığını göstermektedir (47). Böbrek korteksinde endojen NO miktarının yaklaşık 90 nM olduğu dikkate alınırsa (121) mevcut NO nun fizyolojik koşullarda sodyum emilimini en azından inhibe etmemesi gerekir.

2.5. Amaç

Yukarıda özetlenen çalışmaların sonuçları gelişmekle birlikte, NO nun hidrojen iyonu taşınmasında rolü olduğu hepsinin ortak göstergesidir. Hidrojen iyonu sekresyonu ile amonyak yapım ve salgısı arasında paralellik vardır. A-II, insülin, PTH gibi Na⁺/H⁺ eş-değiştirici ve Na⁺/K⁺-ATPaz üzerine etkili pek çok faktörün amonyak yapım ve sekresyonunu etkiledikleri

etkili pek çok faktörün amonyak yapım ve sekresyonunu etkiledikleri gösterilmiştir. Ancak, aynı taşıyıcılara inhibitör etkisi olduğu bildirilen nitrik oksidin amonyak yapım ve salgısını nasıl etkilediği konusunda literatür bilgisine rastlanmamıştır.

AT_{1A} reseptör aracılı olarak A-II proksimal tübülden amonyak yapımını stimüle ederken aynı zamanda NO yapımını da arttırmaktadır (49). Na⁺/H⁺ eş-değiştirici ve Na⁺/K⁺-ATPaz 'ı aktive ederek amonyak salgısını arttıran A-II nin aynı zamanda bu proteinleri inhibe eden NO'yu da salgılatması, A-II nin amonyak yaptırıcı gücünün dengelenmesinde nitrik oksidin önemli olabileceğini düşündürmektedir. Bir başka ifade ile, A-II kendi amonyak yaptırıcı etkisini, salgılattığı nitrik oksid aracılığı ile düzenliyor olabilir. Ancak literatürde nitrik oksidin amonyak yapım ve salgısına doğrudan etkisini gösteren bir çalışma mevcut olmadığından bu olasılık açık değildir.

Bu nedenle, nitrik oksidin proksimal tübülden amonyak yapımına doğrudan etkisinin incelenmesi gerekmektedir. Bu konuya açıklık getirmek amacı ile bu çalışmada, sıçan böbrek korteks dilimlerinde amonyak yapımına nitrik oksidin doğrudan etkisi olup olmadığı araştırılmak istenmiştir.

MATERYAL VE METOD

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilen bu deneysel çalışmada 2-3 aylık, 250-300 g, erişkin, erkek Wistar sıçanlar kullanıldı. Deney öncesinde herhangi bir özel işleme tabi tutulmayan sıçanlar eter anestezisi ile bayıldıktan sonra, kansızlaştırma işlemi ile öldürüldü. Göğüs kafesleri açılarak, torasik aortadan verilen soğuk krebs ile kandan arındırılan her iki böbrek, daha sonra soğuk krebs içine konuldular. Soğutulmuş cam plak üzerinde böbreklerin dışındaki yağ dokusu ve zar temizlendi. Boyuna ikiye bölünerek medulla uzaklaştırıldı ve kalan korteks dilimlendi. Her defasında iki denek çalışmaya alındı ve dört böbrekten elde edilen korteks dilimleri birleştirilerek bir havuz elde edildi.

Tablo 3.1: Deney grupları

GRUPLAR	RENAL KORTEKS	ORTAM	STİMÜLAN	İNHİBİTÖR	SÜRE
GRUP 1 (Krebs)	150 mg	LMS (0.5mM) 3 ml Krebs	YOK	YOK	120 dk
GRUP 2 (Glut)	150 mg	L-glutamin (1 Mm) LMS (0.5mM) 3 ml krebs	YOK	YOK	120 dk
GRUP 3 (L-NM)	150 mg	L-glutamin (1 Mm) LMS (0.5mM) 3 ml krebs	YOK	L-NAME (10^{-4} M)	120 dk
GRUP 4 (A-II)	150 mg	L-glutamin (1 Mm) LMS (0.5mM) 3 ml krebs	A-II (10^{-7} M)	YOK	120 dk
GRUP 5 (A-II+L-NM)	150 mg	L-glutamin (1 Mm) LMS (0.5mM) 3 ml krebs	A-II (10^{-7} M)	L-NAME (10^{-4} M)	120 dk
GRUP 6 (A-II+L-CAN)	150 mg	L-glutamin (1 Mm) LMS (0.5mM) 3 ml krebs	A-II (10^{-7} M)	L-CAN (10^{-5} M)	120 dk
GRUP 7 (A-II+L-NM+S)	150 mg	L-glutamin (1 Mm) LMS (0.5mM) 3 ml krebs	A-II (10^{-7} M)	L-NAME (10^{-4} M) SNAP (10^{-5} M)	120 dk

Deneyleerde;

- 1 mM Glutamin (Sigma, G-3146) amonyak yapımında substrat olarak
- 10^{-4} M N ω -nitro-L-arginin metil ester (L-NAME, Sigma, N-5751), non spesifik NOS inhibitörü olarak
- 10^{-5} M L-Canavanin (Sigma, C-1625) spesifik iNOS inhibitörü olarak
- 10^{-5} M S-nitroso-N-acetyl-penicillamine (SNAP, Sigma, N-3398) NO donörü olarak
- 10^{-7} M Angiotensin II (Sigma, A-9525) proksimal tübül amonyak üretiminde uyarıcı ajan olarak kullanılmıştır.

Tablo 3.1'de belirtilen protokole göre hazırlanmış ve içinde 3 ml, glutaminli veya glutaminsiz, 18 saat %95 O₂ %5 CO₂ ile gazlandırılmış krebs içeren erlenlere 100-150 mg renal korteks dilimleri eklendi. Dokulardaki glutamatin endojen "glutamin sentaz" ile glutamine dönüşümünü engellemek (108) amacı ile Glutamin sentaz inhibitörü "L-methionin sulfoksimine" (LMS, 0.5 mM, Sigma, M-5379) her tüpe eklendi ve çalışmalar duplicate olarak yapıldı.

İnkübasyon ortamı (krebs tamponu): pH 7.4

- 17 mM sodyum klorür (Sodium chloride, NaCl, Sigma, S-7653)
- 4.7 mM potasyum klorür (Potassium chloride, KCl, Merck, 4935),
- 25 mM sodyum bikarbonat (Sodium bicarbonate, NaHCO₃, Merck, 6323)
- 1.6 mM monosodyum fosfat (Monosodium phosphate; NaH₂PO₄, Sigma, S-8282),
- 11 mM glukoz (Glucose, Sigma, S-7528),
- 2.4 mM kalsiyum klorür (Calcium chloride, CaCl₂, Merck, 2380),
- 0.6 mM magnezyum klorür (Magnesium chloride (hexahydrate) MgCl₂.6H₂O, Merck, 5832)

Korteks dilimleri 37 °C'de, ortamda 120 dakika süre ile inkübe edildi ve bu esnada ortama %95 O₂ %5 CO₂ ile gazlandırılmaya devam edildi. İnkübasyon ortamından 15, 60 ve 120 dakikalarda amonyak tayini için örnek alınıp yerine eşit hacimde krebs eklendi. 120 dakikanın sonunda erlenler buz içine alınarak reaksiyon durduruldu. Doku ve ortam ayrı tüplere aktarıldı. Ortamdaki ve doku homojenatlarındaki amonyak ile nitrit ölçümü deney günü yapılırken, diğer parametreler için ayrılan örnekler -80 °C'de çalışılıncaya kadar saklandılar.

Homojenizasyon Tamponu (pH: 7.2) (34):

- 0.44 M Sukroz (Sucrose, S-8501),
- 5 mM MgCl₂ (Magnesium chloride (hexahydrate) MgCl₂ 6H₂O, Merck, 5832),
- 10 mM Tris (AnalaR Biochemical, 10315) (pH:7.2)

Homojenizasyon tüpüne alınan doku üzerine 3 ml soğuk tampon eklenerek teflon uçlu doku homojenizatörü (TRI-R STIR-R, Model K43) ile dokular 9500 rpm'de 20 saniye homojenize edildiler. İşlem sırasında homojenizasyon tüpü sürekli buz içinde tutuldu. Elde edilen doku homojenatı buz içinde saklanan ayrı bir tüpe aktarıldı. Lowry ile protein tayini için homojenat örneği saklandıktan sonra kalan homojenatlar 10 dakika, 11000 rpm de santrifüj edilip oluşan süpernetanları; nitrit, nitrat, amonyak ve glutamin tayinleri için kullanıldı.

3.1. Nitrit Tayini

Böbrek dokusunda ve inkübasyon ortamında yapılan nitrit ölçümleri spektrofotometrik Griess metodu ile yapılmıştır (111, 112). Sonuçlar nM/g protein olarak verilmiştir.

Prensip: Asidik ortamda nitrit (NO₂⁻); nitroz aside (NHNO₂) dönüşür ve Griess A reaktifindeki sulfonilamidi diazotize eder. Bu sulfonilamid-diazonium tuzu Griess B reaktifindeki naftiletilendiamin ile reaksiyona girerek, spektrofotometrik olarak 540 nm dalga boyunda ölçülebilen eflatun renkli bir kromofor oluşturur.

Reaktifler ve kimyasallar:

1. C₂H₅OH (% 99.5'lik Absolü alkol)
2. CH₃Cl₃ (Chloroform, Merck, 2431)
3. NaNO₂ (Sodyum nitrite, Sigma, S-2252)

4. Griess A reaktifi: %5'lik (v/v) Fosforik asitteki (H_3PO_4 ortho-Phosphoric acid %85, Merck, 563) %1'lik (w/v) Sulfonilamide ($C_6H_8N_2O_2S$, Sigma, S-9251)
5. Griess B reaktifi: %0.1'lik (w/v) $C_{14}H_{14}N_2 \cdot 2HCl$ (N-(1-Naphtyl) Ethylendiamine Dihydrochloride, Sigma, N-9125)

İşlemler: 2 ml kör, standart ve numune (böbrek homojenatının santrifüjünden elde edilen süpernetant ve inkübasyon ortamından alınan örnekler) konulan tüplerin üzerine 3.5 ml buzda bekletilen bidistile su ilave edildi. 1 ml etanol ve 0.6 ml kloroform eklendikten sonra 20 saniyelik vorteks işlemi uygulandı. Ardından tüpler 4500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Bu şekilde presipitasyonla proteinleri uzaklaştırılan (deproteinize) süpernetandan nitrit tayini için 1 ml alınarak küçük tüplere aktarıldı. Üzerine 0.25 ml Griess A reaktifi ilave edildikten 5 dakika sonra 0.25 ml Griess B reaktifi eklendi ve 5 dakikalık beklemeyi takiben tüm tüplerin 540 nm dalga boyundaki absorpsiyon değerleri, köre karşı spektrofotometrede (Shimadzu UV 1600) okundu.

3.2. Nitrat Tayini

120 dk'lık inkübasyon süresi sonunda, bir kısmı nitrat şeklinde oksitlenmiş olan nitritin miktarını belirlemek amacıyla, nitritin yanı sıra, Bories'in yöntemine göre (86) nitrat tayini de yapılmıştır. Bu yöntemde nitrat düzeyi, tek basamaklı end-point enzimatik yöntem ile ölçülmüştür. Sonuçlar nM/g protein olarak verilmiştir.

Prensip: Numunelerdeki nitrat düzeylerinin "nitrat redüktaz" ile nitrite indirildiği reaksiyonda, β -NADPH'nin oksidasyonu sonucu 340 nm de absorpsiyondaki düşüş ile değerlendirildi. Ortama FAD elektron taşıyıcısı olarak eklendi.

Reaktifler:

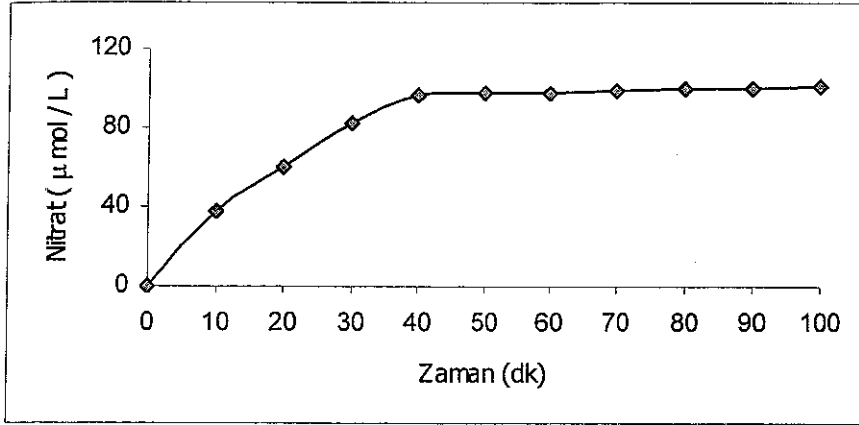
1. Nitrat redüktaz (*Aspergillus*) (500 U/L), (Sigma, N-7265)
2. Flavin adenin dinükleotid (0.2 mmol/L), (FAD Sigma, F-6625)
3. Redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (12 mmol/L), (β -NADPH, Sigma, N-1630)
4. Sodyum nitrat (sodium nitrate, $NaNO_3$, Sigma, S-8170)
5. Fosfat tamponu (100 mmol/L; KH_2PO_4 ve K_2HPO_4) (pH: 7.5)

İşlemler: İçerisinde 250 μ L potasyum fosfat tamponu, 50 μ L distile su, 50 μ L FAD, 10 μ L β -NADPH ve 100 μ L numune bulunan tüpler 25 °C de dengeye getirildi. Enzimatik reaksiyonu başlatmak için 40 μ L Nitrat Redüktaz

eklendi. FAD nin fotolabilitesinden dolayı reaksiyon karanlık ortamda gerçekleştirildi 45 dakika sonra numunelerin absorpsansı 340 nm de ölçüldü.

Numune körü: Her bir numune için numune körü, 40 µL nitrat redüktaz yerine 40 µL distile su kullanılarak hazırlandı.

Reaktif körü: 250 µL potasyum fosfat tamponu, 50 µL distile su, 50 µL FAD, 10 µL β-NADPH ve 150 µL distile suya ilaveten 40 µL nitrat redüktazın varlığında ve yokluğunda ölçüldü.



Şekil 3.1: Nitratın zamana bağlı nitrite indirgenmesi.

Hesaplama: Numunelerdeki nitrat konsantrasyonu aşağıdaki formül ile hesaplandı.

$$C = \Delta A \times \text{faktör}$$

$$\Delta A = A_{\text{numune körü}} - A_{\text{numune}} - A_{\text{reaktif körü}}$$

$$\text{Faktör} = V_T / V_N \times 1 / l \times 1 / \epsilon_{340} = 0.8$$

$$V_T = \text{Reaksiyon total hacmi (500 µL)}$$

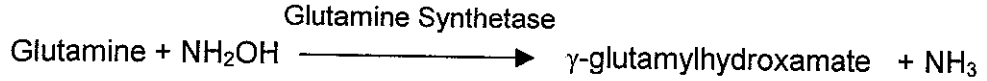
$$V_N = \text{Numune hacmi (100 µL)}$$

$$l = \text{Işık yolu (1 cm)}$$

$$\epsilon_{340} = \beta\text{-NADPH in 340 nm de milimolar absorptivitesi (6.22 mmol}^{-1}\text{.cm}^{-1}\text{)}$$

3.3. L-Glutamin Tayini

Prensip: "Glutamin sentaz" enzimi, glutamat ve amonyaktan glutamin oluşumunu geri dönüşümü olarak katalizlemektedir. Enzim aynı zamanda glutaminin arsenolizini de katalizlemektedir. Bu sırada glutamin ve hidroksilaminden gama- glutamylhydroxamat oluşmaktadır. Reaksiyonda ATP veya ADP'den katalitik miktarda olması gereklidir. Reaksiyonun bir ürünü olan gama- glutamylhydroxamate'ın Fe^{3+} ile oluşturduğu kompleksin renkli olması yöntemin temelini oluşturmaktadır (113).



Reaktif ve kimyasallar:

1. Tris tamponu (0.8 mol/l, pH 7.7); 800 ml distile su içinde 97 g Tris (AnalaR Biochemical, 10315) eritilir, konsantre HCl ile pH 7.7'ye getirilir, distile su ile son hacim 1000 ml'ye getirilir.
2. Arsenat solüsyonu (0.2 mol/l): 6.2 g: disodyum hidrojen arsenat (Disodium hydrogen arsenate, $Na_2HASO_4 \cdot 7H_2O$, Sigma, A6756) 100 ml distile su içinde eritilir.
3. Manganez solüsyonu (0.2 mol/l): 3.4 g manganez sülfat (Manganase sulfate, $MnSO_4 \cdot H_2O$, Merck, 5959) 100 ml distile su içinde eritilir.
4. Ferric chloride/TCA reaktifi; 5 g demir (III)-klorür (Iron (III) chloride, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, Merck, 3946) ve 10 g trikloroasetik asit (trichloroacetic acid, Sigma, T-9159) bir miktar distile su içinde eritilir. 25 ml konsantre HCl eklenir, son hacim distile su ile 300 ml'ye getirilir.
5. Glutamin sentaz (Glutamine synthetase, Sigma, G-3144; 1 mg protein/ml; 20 kU/ml); stok solüsyon 0.1 mol/l, pH7.7 olan tris tamponu ile sulandırılarak kullanılır.
6. Ölçüm karışımı (10 numune için);
 - 139 mg $NH_2OH \cdot HCl$,
 - 13 mg ADP- Na_3 (Adenosine 5-diphosphate, Sigma, A-2754),
 - 5 ml tris tamponu,
 - 1 ml arsenat solüsyonu,
 - 0.05 ml manganez solüsyonu
 - 1 ml NaOH (2 mol/l) karıştırılarak hazırlanır.

İşlemler: 1.20 ml numune (inkübasyon ortamı veya homojenat süpernetantı) üzerine 0.7 ml ölçüm karışımı ve 0.1 ml glutamin synthetase eklenir. 30 dk boyunca 37 °C'de inkübe edilir. Inkübe edilen karışıma 2 ml ferric chloride/TCA reaktifi eklenir, karıştırılır, santrifüj edilir, süpernetant alınır. Reaktif eklendikten yarım saat sonra 500 nm dalga boyunda, köre karşı ölçüm yapılır (113).

Glutamin analizinin spesifikliğinin saptanması: Glutamin tayin metodunun diğer amino asitlerle reaksiyona girip girmediğini saptamak amacı ile 100 µM L-arginine ve 100 µM L-citrulline içeren krebeste glutamin analizi yapıldı ve absorbanstın negatif olduğu saptandı. Yöntemin hassasiyeti 500 nM glutamin olarak ölçüldü.

Doku ve ortam glutamin miktarı µM/g protein olarak verilmiştir. Dokunun kullandığı glutamin miktarını hesaplarken; krebs grubunun (ortama glutamin eklenmedi) doku ve ortam glutamin değerlerinin toplamı (µM/g protein) bazal glutamin olarak kabul edildi. Diğer gruplarda ise ortama eklenen 1 mM glutaminin µM/g protein değeri hesaplandı. Bazal glutamin ile eklenen glutaminin toplamından, inkübasyon sonu ortam ve dokuda bulunan total glutamin (µM/g protein) değeri çıkarılarak dokunun kullandığı glutamin miktarı (µM/g protein) hesaplandı.

3.4. Amonyak Tayini

Prensip: Inkübasyon ortamından 15, 60 ve 120 dakikalarda alınan örneklerde ve doku homojenatının süpernetantında amonyak tayini Berthelot reaksiyonuna dayalı kolorimetrik bir yöntem ile yapıldı (82). Bu reaksiyonda amonyak alkali ortamda, fenol ve sodyum hipobromür veya sodyum hipoklorür varsa mavi bir renk oluşturmaktadır.

Reaktif ve kimyasallar:

1. Phenol-peatacyonitrosyloferate solüsyonu ;70 g %88'lik fenol (Phenol, C₆H₆O, Riedel-de Haen, 16017) ve 0.25 g Sodyum nitropurisit (Sodium nitroprusside, Na₂Fe(CN)₅NO, Sigma, S-0501) 1 litre distile su içinde eritilerek hazırlanır.
2. Alkalin hipoklorit solüsyonu; 20 g NaOH ve 43 ml %5.25'lik sodyum hipoklorit (Sodium hypochlorite, NaOCl, Sigma; 42,504-4) 1 litre distile su içinde eritilir.

İşlemler: 15 ml'lik test tüpü içine 0.2 ml numune konulur. Numunelerin üzerine 1 ml Phenol-peatacyonitrosyloferate solüsyonu eklenir. Tüpler vorteksleme işlemiyle karıştırılıp 5 dakika beklemeyi takiben tüplere 1 ml Alkalin hipoklorit solüsyonu eklenir. Butün tüpler 40 dakika boyunca, 37°C' de

su banyosunda bekletilir. İnkübasyon bitiminde tüplere 10 ml distile su eklenir. 625 nm'de köre karşı okunur (82)

Amonyak sonuçlarının ifade edilmesi: 15, 60 ve 120 dakikalarda ortama salınan amonyak ile 2 saatin sonundaki doku amonyağı $\mu\text{M/g}$ protein (total protein) olarak hesaplanmıştır. Total amonyak ise 120 dakikada ortama salınan amonyak ($\mu\text{M/g}$ protein) ile doku amonyağının ($\mu\text{M/g}$ protein) toplanması sonucu elde edilmiştir ($\mu\text{M/g}$ protein).

NH_3 /glutamin oranı: Her tüpte kullanılan glutamin miktarına (mol olarak) isabet eden amonyak miktarı (mol olarak) orantılanmıştır. 1 mol glutamin en fazla 2 mol amonyak yapacağı için bu oran 0-2 arasında değişmektedir.

3.5. Protein Tayini

Doku homojenatından alınan örneklerde ve inkübasyon ortamında Lowry metoduna göre (73) protein analizi yapılmıştır

Prensip: Bazik ortamda proteinlerin Cu^{+2} (bakır) ile reaksiyona girerek oluşturdukları bakır-peptid komplekslerinin, Folin reaktifi varlığında tirozin ve triptofan kalıntıları ile birleşmesiyle oluşan renkli bileşiklerin spektrofotometrik olarak saptanmasına dayanmaktadır.

Reaktif ve Kimyasallar:

- 1- Sığır albumini (Albumine Bovine, Sigma, A-8022) 1 mg/ml'lik standart
- 2- NaOH (Sodium hydroxide, Merck, 6462) 1 N
- 3- D reaktifi: aşağıda belirtilen çözeltilerden taze olarak hazırlanmıştır.
10 ml, %2'lik Na_2CO_3 (sodium carbonate, anhydrous, Merck, 6398),
0.1 ml % 1'lik CuSO_4 (Copper (II) sulfate, Merck, 2787)
0.1 ml %2'lik $\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_6$ (di-Sodium tartarate, Merck, 6662)
- 4- Folin reaktifi (Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent, Sigma, F-9252)

İşlemler: 0.1 ml numune veya standart üzerine 0.1 ml NaOH ve 1 ml D reaktifi eklendi oda sıcaklığında dengeye getirildi. Ardından bütün tüplere 1:1 oranında sulandırılmış Folin reaktifinden 0.1 ml eklenerek oda ısısında ve karanlıkta 30 dakika bekletildi. Sürenin bitiminde tüplere 2 ml distile su eklenerek 750 nm dalga boyunda köre karşı spektrofotometrede (Shimadzu UV 1600) okuma yapıldı. Elde edilen standart grafiğinden sonuçlar mg/ml protein olarak hesaplandı.

120 dakikalık inkübasyonun sonunda, hem dokuda hem de inkübasyon ortamında protein miktarlarına bakılmış ve bu değerlerin toplamı (total protein) amonyak, glutamin, nitrit ve nitrat düzeylerinin ifadesinde kullanılmıştır. Ortama salınan protein ise total proteinin yüzdesi olarak hesaplanmıştır

3.6. İstatistik

Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. Gruplar arası farklar t-testi, One-way ANOVA ve post hoc test olarak Newman-Keuls kullanılarak değerlendirilmiştir. $p < 0.05$ üzeri değerler istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

BULGULAR

4.1.Ön Çalışma Bulguları

4.1.1. Normal Oksijenasyonun Sağlanması

Bir gece boyunca içinden %95 O₂ ve %5 CO₂ geçirilen krebs (pH 7.4) pO₂ değeri 37 °C'de 120 dakika inkübe edildikten sonra ölçüldü ve bu değer 170 ± 2.5 mmHg olarak bulundu. Bu sonuç deney esnasında renal korteks dilimlerinin hipoksiye maruz kalmayacağını kanıtı olarak kabul edildi.

4.1.2. Hücre Canlılığının (viabilite) Test Edilmesi

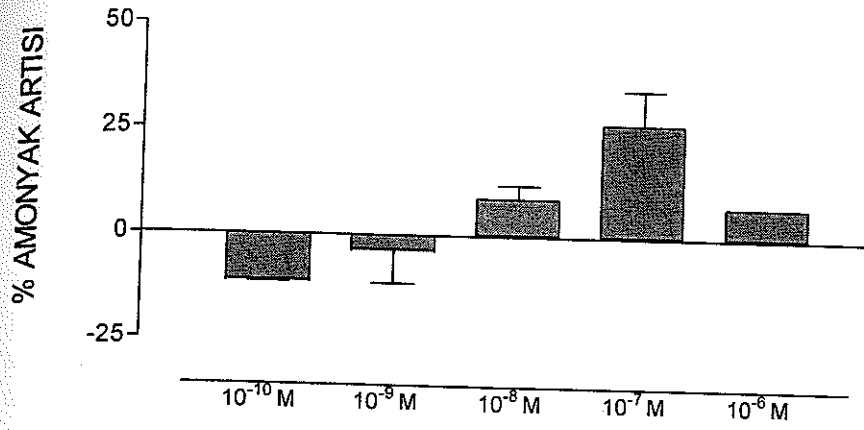
Hücre canlılığını test etmek amacı ile ortama konan korteks dilimlerindeki başlangıç total LDH (Laktat dehidrogenaz) enzimi saptanmış ve 120 dakika sonunda ortama bu miktarın % 36'sının (71.5 ± 4.1 U/mg protein) salgılandığı bulunmuştur. Bu değer benzeri deney modeli ile glukoneogenez çalışması yapan ve çalışmalarını güvenilir bulan Gstraunthaler ve arkadaşlarının (19) bildirdiği 108 mU/mg protein LDH miktarından oldukça düşüktür.

4.1.3. Deneyde Kullanılacak Angiotensin II Dozunun Saptanması

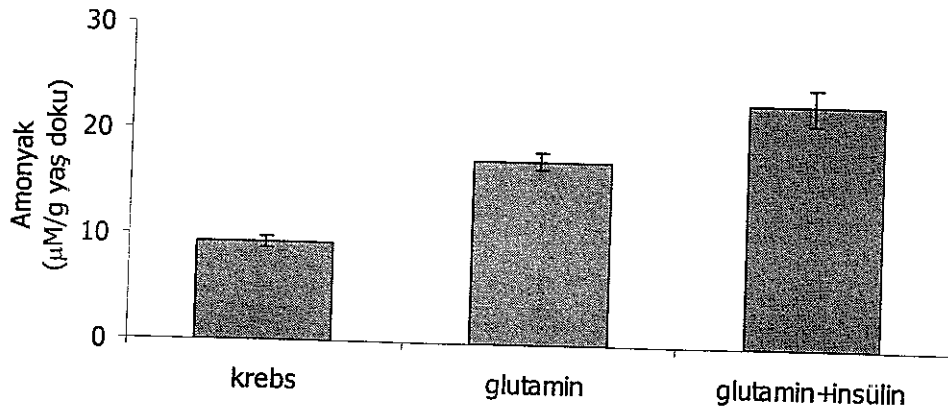
Kullanılacak A-II'nin dozunu saptamak amacıyla; 10⁻¹⁰ – 10⁻⁶ M A-II varlığında, 120 dakika inkübasyondan sonra böbrek korteksinden ortama salınan amonyak miktarı ölçüldü. A-II'nin yaptığı etki, A-II'siz ortamla karşılaştırıp yüzde değişimler olarak hesaplandı (Şekil 3.6). Sonuçta en fazla artış 10⁻⁷ M A-II dozunda (% 26.77 ± 8.1) gözlemlendi. Literatürde 10⁻⁹ M A-II dozu kullanılmasına karşın, bizim çalışmamız için en uygun dozun 10⁻⁷ M A-II olduğu bulundu.

4.1.4. Kullanılan Deney Modelinin Amaca Uygunluğunun Test Edilmesi

Deney modelinin ve inkübasyon süresinin amaca uygunluğunu test etmek amacıyla düzenlenen bu ön çalışmada, böbrekte amonyak yapım ve sekresyonunu arttırdığı bilinen bir hormon olan İnsülin kullanılmıştır. Sonuçlarımız 10⁻⁷ M insülinin 22.69 ± 1.7'lik bir artış yaptığını göstermektedir. Literatür ile uyumlu (9, 87, 109) olan bu sonucumuz, deney modelinin ve inkübasyon süresinin amaca uygun olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.1: 10^{-10} - 10^{-6} M A-II varlığında ortam amonyağındaki % değişimler.

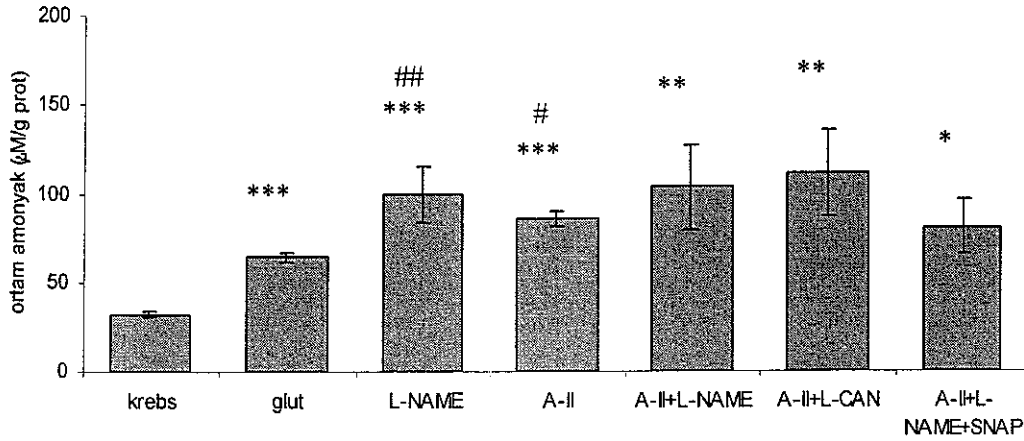


Şekil 4.2: 1mM glutamin ve 10^{-7} M insülin varlığında amonyak yapımı

4.2. Amonyak Bulguları

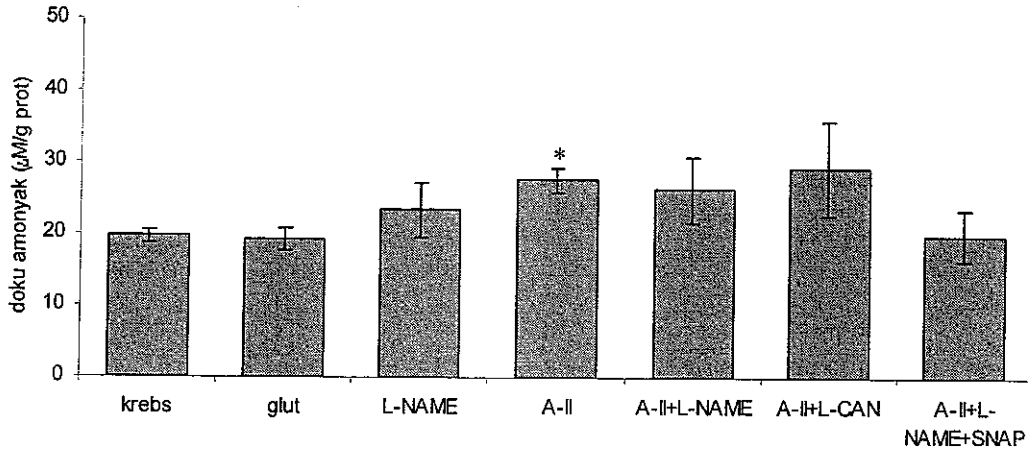
İki saat süre ile 37 °C' de %5 CO₂ %95 O₂ karışımı altında, Krebs fosfat tamponu içinde inkübe edilen sıçan böbrek korteks dilimlerinin ortama salgıladığı amonyak miktarı $31.98 \pm 1.76 \mu\text{M/g}$ protein (Şekil 4.3) ve dokunun amonyak içeriği $19.64 \pm 0.87 \mu\text{M/g}$ protein (Şekil 4.4) ve total amonyak değeri $52.91 \pm 2.72 \mu\text{M.g protein}^{-1}$ (Şekil 4.5) olarak saptanmıştır. Şekil 4.6 ve 4.7'de görüldüğü gibi krebs içinde 120 dakika inkübe edilen korteks dilimlerinden ortama salgılanan amonyak miktarı, zamana bağımlı bir azalış göstermiştir. İnkübasyonun 15. dakikasında dilimlerden amonyak salgılama hızı $1.25 \pm 0.12 \mu\text{M.g protein}^{-1}.\text{dk}^{-1}$ iken, 60 dakikada 0.49 ± 0.04 ve 120. dakikada $0.27 \pm 0.01 \mu\text{M.g protein}^{-1}.\text{dk}^{-1}$ değerine düşmüş ve zamana bağlı bu azalış istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Tablo 4.1, $p < 0.001$).

Ortama amonyak öncül maddesi olarak 1 mM glutamin eklenmesi amonyak yapımında çok önemli artışa neden olmuştur ($p < 0.001$) 120. dakikada ortam amonyağı $64.11 \pm 2.60 \mu\text{M.g protein}^{-1}$, doku amonyak miktarı ise $19.32 \pm 1.57 \mu\text{M.g protein}^{-1}$ olarak saptanmıştır (Şekil 4.3 ve 4.4). Total amonyak $84.38 \pm 3.8 \mu\text{M.g protein}^{-1}$ (Şekil 4.5 ve Tablo 1) olarak bulunmuştur. Zamana bağlı amonyak salgı azalışının glutamin içeren tüplerde de devam ettiği gözlenmiştir (Tablo 4.1). Glutaminli ortamda 15. dakikada amonyak yapım hızı $1.81 \pm 0.21 \mu\text{M.g protein}^{-1}.\text{dk}^{-1}$ iken bu değer 60. dakikada $0.84 \pm 0.07 \mu\text{M.g protein}^{-1}.\text{dk}^{-1}$ ve 120. dakikada $0.55 \pm 0.02 \mu\text{M.g protein}^{-1}.\text{dk}^{-1}$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.6 ve 4.7).

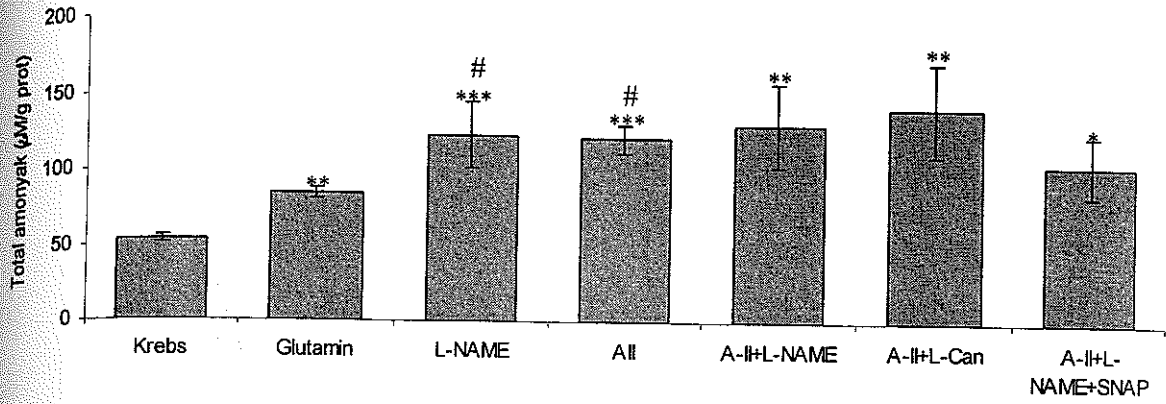


Şekil 4.3: İnkübasyon sonu ortam amonyak miktarları
Krebs grubu ile diğer gruplarının karşılaştırılması * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$
Glutamin grubu ile diğer gruplarının karşılaştırılması # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$

Endojen nitrik oksidin amonyak yapımına etkisini incelemek için ortama eklenen 10^{-4} M non selektif NO sentaz (NOS) inhibitörü (L-NAME), böbrek korteks dilimlerinden salgılanan amonyak miktarlarını istatistiksel olarak önemli düzeyde arttırmıştır ($p < 0.01$). L-NAME varlığında 120. dakikanın sonunda doku amonyak içeriğindeki artış ($23.29 \pm 3.93 \mu\text{M/g}$ protein) istatistiksel önem göstermemiştir (Şekil 4.4). Ancak 120 dakikanın sonunda ortama salınan amonyak miktarı $99.14 \pm 16.02 \mu\text{M/g}$ protein değerine ve total amonyak içeriği $122.65 \pm 21.56 \mu\text{M g protein}^{-1}$ değerine yükselmiştir (Şekil 4.3, 4.5 ve Tablo 4.1). Ortam ve total amonyak değerlerindeki bu değişiklikler glutaminli tüplerle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli farklılık göstermiştir (sırasıyla, $p < 0.01$ ve $p < 0.05$). NOS inhibitörünün, zamana bağlı amonyak yapımına da önemli etkisi gözlenmiştir L-NAME mevcudiyetinde yapım hızı, 15 dakikada ($2.99 \pm 0.56 \mu\text{M.g protein}^{-1}.\text{dk}^{-1}$) glutamin grubundan önemli ölçüde yüksek iken ($p < 0.01$), giderek azalmış; 60 dakikada $1.35 \pm 0.27 \mu\text{M.g protein}^{-1}.\text{dk}^{-1}$ ve 120. dakikada $0.83 \pm 0.16 \mu\text{M.g protein}^{-1}.\text{dk}^{-1}$ düzeylerine indiği saptanmıştır (Tablo 4.1). L-NAME'in neden olduğu zamana bağlı bu azalış glutamin grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (15.dk'da $p < 0.01$, 60 ve 120.dk'da $p < 0.05$) (Şekil 4.6 ve 4.7).

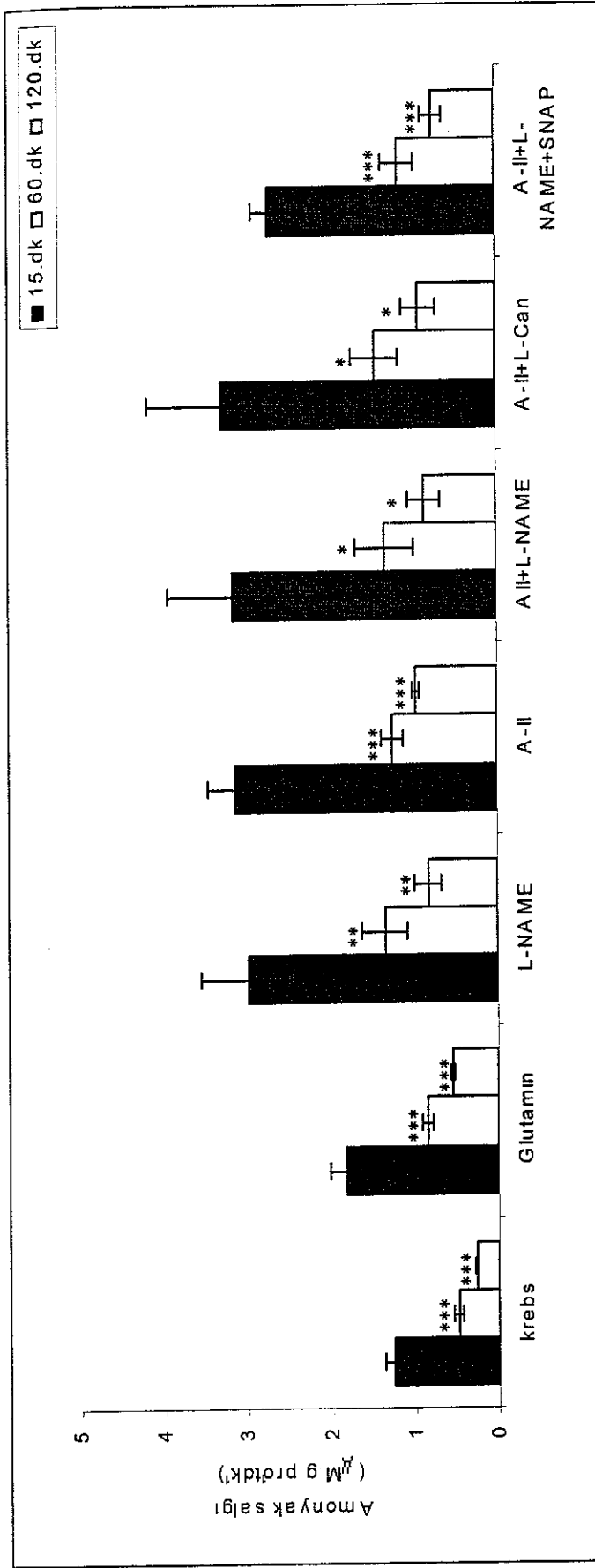


Şekil 4.4: İnkübasyon sonu doku amonyak miktarları
Glutamin grubu ile diğer grupların karşılaştırılması * $p < 0,05$



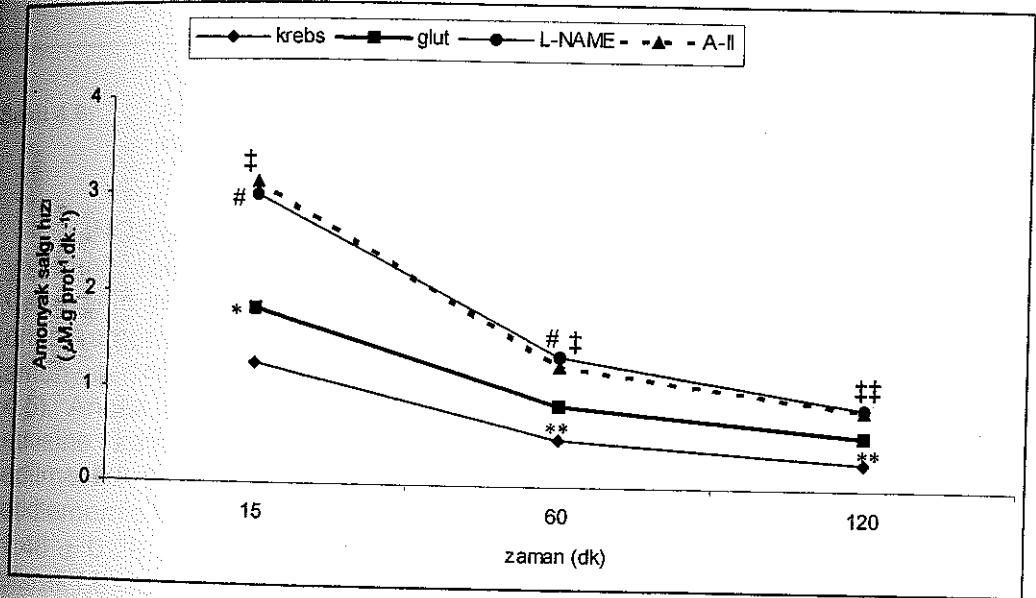
Şekil 4.5: İnkübasyon sonu total amonyak değerleri (ortam ve doku toplamı) Krebs grubu ile diğer grupların karşılaştırılması; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 Glutamin grubu ile diğer grupların karşılaştırılması # p<0.05

Glutamin içeren ortama 10^{-7} M A-II eklenmesi hem ortama salınan amonyak miktarında ($p<0.05$) hem de doku amonyak içeriğinde ($p<0.05$) önemli artışa neden olmuştur (Tablo 4.1) A-II ile 120 dakika inkübasyondan sonra ortamda amonyak miktarı 85.93 ± 4.10 $\mu\text{M/g}$ protein (Şekil 4.3), doku amonyak miktarı 27.51 ± 1.62 $\mu\text{M/g}$ protein olarak ölçülmüş (Şekil 4.4) ve total amonyak miktarı 120.59 ± 9.19 $\mu\text{M/g}$ protein olarak (Şekil 4.5) hesaplanmıştır. A-II ile stimülasyonun 15. dakikasında amonyak yapım hızı glutamin içeren tüplerdeki ile karşılaştırıldığında önemli artmıştır (3.13 ± 0.33 $\mu\text{M g protein}^{-1} \text{dk}^{-1}$, $p<0.01$) Bu değer 60 ve 120 inci dakikalarda azalarak sırası ile 1.25 ± 0.13 ve 0.81 ± 0.09 $\mu\text{M.g protein}^{-1} \text{dk}^{-1}$ düzeylerine düşmüş ise de (Şekil 4.6 ve 4.7) glutaminin sebep olduğu amonyak yapım hızından istatistiksel olarak önemli daha yüksektir (60 dk $p<0.05$ ve 120.dk $p<0.01$).



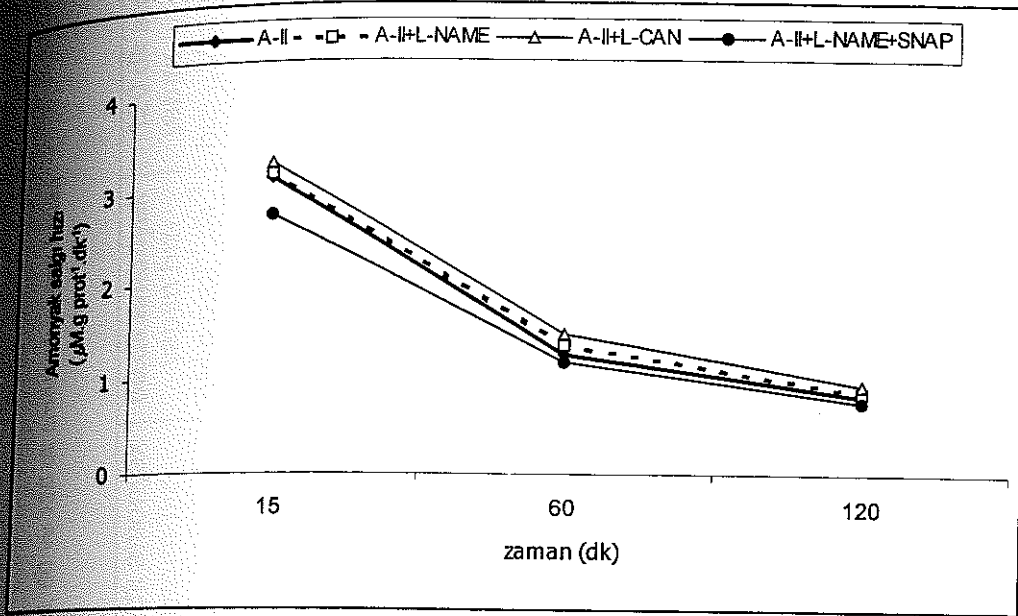
Şekil 4.6: İnkübasyonun 15, 60 ve 120 dakikalarında amonyak salgı hızları 15.dk ile 60 ve 120.dk değerlerinin karşılaştırılması * p<0,05, ** p<0,01, *** p< ,001

İnkübasyon ortamına 10^{-4} M L-NAME ve 10^{-7} M A-II'nin birlikte eklenmesinin, böbrek korteks dilimlerinde A-II'nin sebep olduğu amonyak yapımına ilave etkisi istatistiksel önem göstermemiştir. 120 inci dakikada ortam amonyak miktarı 103.50 ± 23.84 , doku amonyağı 26.24 ± 4.53 ve total amonyak $129.78 \pm 27.28 \mu\text{M.g protein}^{-1}$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.3, 4.4 ve 4.5). Yapım hızındaki zamana bağlı azalış bu grupta da devam etmiş ve değerler 15.dk'da $3.17 \pm 0.78 \mu\text{M.g protein}^{-1} \text{dk}^{-1}$, 60 dk'da $1.34 \pm 0.35 \mu\text{M.g protein}^{-1} \text{dk}^{-1}$, 120.dk'da ise $0.86 \pm 0.20 \mu\text{M.g protein}^{-1} \text{dk}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. L-NAME ilavesi zamana bağlı azalışta tek başına A-II'nin yaptığı etkiyi değiştirmemiş ve istatistiksel olarak fark gözlenmemiştir (Şekil 4.6 ve 4.8, Tablo 4.1).



Şekil 4.7:

Krebs, glutamin, L-NAME ve A-II gruplarında amonyak salgı hızı
 Krebs grubu ile glutamin gruplarının karşılaştırılması; * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$
 Glutamin ile L-NAME gruplarının karşılaştırılması; # $p < 0,05$
 Glutamin ile A-II gruplarının karşılaştırılması; † $p < 0,05$, ‡ $p < 0,01$



Şekil 4.8: A-II, A-II+L-NAME, A-II+L-Can, A-II+L-NAME+SNAP gruplarında amonyak salgı hızı

iNOS'un inhibe edildiği 1 mM glutaminli ortamda A-II'nin amonyak yapımına etkisini saptamak amacı ile böbrek korteks dilimleri 10^{-5} M L-Canavanin ve 10^{-7} M A-II' ile 120 dakika inkübe edilmiştir. 120 dakika sonra ortam amonyağı 111.02 ± 24.77 , doku amonyağı 29.15 ± 6.53 ve total amonyak 140.18 ± 29.8 $\mu\text{M.g protein}^{-1}$ olarak saptanmıştır (Şekil 4.3, 4.4 ve 4.5). Ancak iNOS'un inhibe edilmesinin A-II nin amonyak yapımını artırıcı etkisine katkısı istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır. iNOS'un inhibe edilmesi A-II ye cevap olarak artan amonyak yapım hızını önemli düzeyde etkilememiş ve yapım hızı 15.dak'da 3.28 ± 0.89 $\mu\text{M.g protein}^{-1}.\text{dk}^{-1}$, 60.dk'da 1.46 ± 0.28 $\mu\text{M.g protein}^{-1}.\text{dk}^{-1}$ ve 120.dk'da 0.93 ± 0.21 $\mu\text{M.g protein}^{-1}.\text{dk}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.6 ve 4.8, Tablo 4.1).

L-NAME ve A-II içeren glutaminli ortama 10^{-5} M SNAP (NO donörü) eklenmesi ortama salınan amonyak miktarında istatistiksel önem göstermeyen bir azalışa neden olmuş (80.71 ± 15.07 $\mu\text{M.g protein}^{-1}$) (Şekil 4.3) ve doku amonyak miktarını tamamen glutamin grubunun değerlerine indirmiştir (19.85 ± 3.54 $\mu\text{M.g protein}^{-1}$) (Şekil 4.4). Total amonyak değeri ise 103.94 ± 19.72 $\mu\text{M.g protein}^{-1}$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.5). Ortama eklenen 10^{-5} M ekzojen NO, böbrek kortikal dilimlerinde A-II + L-NAME'in yol açtığı amonyak salgı hızını değiştirmemiştir (Şekil 4.8, Tablo 4.1). Gram protein başına 15. dakikada 2.73 ± 0.49 $\mu\text{M/dk}$ olan amonyak salınım hızı, 60. dakikada 1.17 ± 0.20 $\mu\text{M/dk}$ ve 120. dakikada ise 0.76 ± 0.14 $\mu\text{M/dk}$ olarak saptanmıştır (Şekil 4.6 ve 4.8).

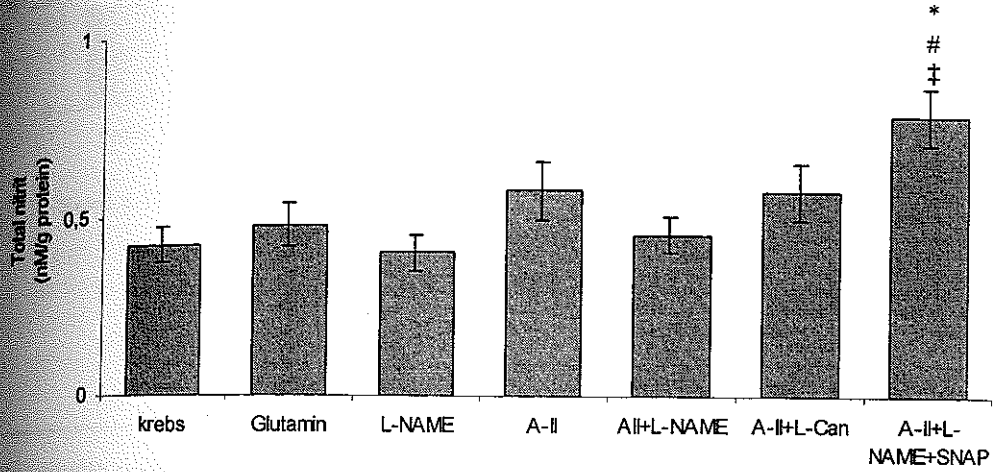
Tablo 4.1: Tüm gruplarda ortam, doku ve total amonyak değerleri ile 15, 60 ve 120 dk amonyak yapım hızları

	Ortam amonyak μM/g protein	Doku amonyak μM/g protein	Total amonyak μM/g protein	15 dk amonyak yapım hızı μM.g prot ⁻¹ .dk ⁻¹	60 dk amonyak yapım hızı μM.g prot ⁻¹ .dk ⁻¹	120 dk amonyak yapım hızı μM.g prot ⁻¹ .dk ⁻¹
Krebs	31.98±1.76 (n=12)	19.64±0.87 (n=12)	52.91±2.72 (n=13)	1.25±0.12 (n=12)	0.49±0.04 (n=12)	0.27±0.01 (n=12)
Glutamin	64.11±2.60 (n=13) ***	19.32±1.57 (n=13)	84.38±3.8 (n=14) **	1.81±0.21 (n=14) *	0.84±0.07 (n=14) *	0.55±0.02 (n=14) **
L-NAME	99.14±16.02 (n=7) ***##	23.29±3.93 (n=7)	122.65±21.56 (n=7) ***#	2.99±0.56 (n=7) ***##	1.35±0.27 (n=7) ***###	0.83±0.16 (n=7) **#
A-II	85.93±4.10 (n=8) ***#	27.51±1.62 (n=8) *#	120.59±9.19 (n=9) ***#	3.14±0.33 (n=8) ***##	1.25±0.13 (n=8) ***###	0.81±0.09 (n=8) ***##
A-II+L-NAME	103.50±23.84 (n=7) **	26.24±4.53 (n=7)	129.78±27.28 (n=7) **	3.17±0.78 (n=7) *	1.34±0.35 (n=7) *	0.86±0.20 (n=7) **
A-II+L-CAN	111.02±24.77 (n=7) **	29.15±6.53 (n=7)	140.18±29.8 (n=7) **	3.28±0.89 (n=7) *	1.46±0.28 (n=7) **	0.93±0.21 (n=7) **
A-II+L-NAME + SNAP	80.71±15.07 (n=7) *	19.85±3.54 (n=7)	103.94±19.72 (n=7) *	2.73±0.49 (n=7)	1.17±0.20 (n=7) *	0.76±0.14 (n=7) *

Krebs grubu ile diğer gruplarının karşılaştırılması * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001
Glutamin grubu ile diğer gruplarının karşılaştırılması # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001

4.3. Nitrit ve Nitrat Bulguları

Böbrek korteks dilimlerinin nitrit ve nitrat düzeyleri ortama eklenen glutamin, L-NAME, A-II ve L-canavanin'den etkilenmemiştir. 10^{-5} M SNAP eklenen tüplerdeki nitrit ve nitrat artışı ise eksojen olarak eklenen NO nedeni ile istatistiksel olarak önemli bir fark göstermiştir (Tablo 4.2, Şekil 4.9, 4.10, 4.11).



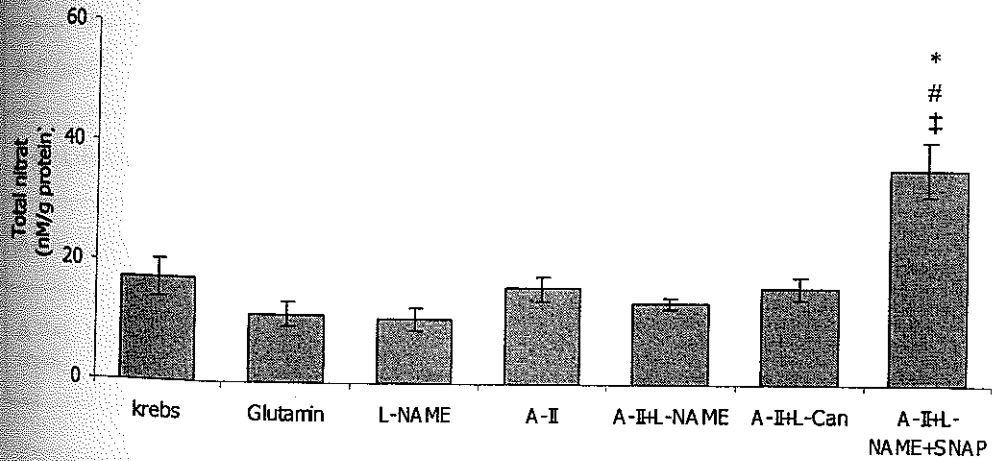
Şekil 4.9:

Total nitrit değerleri

Krebs ile diğer grupların karşılaştırılması * $p < 0,01$

Glutamin ile diğer grupların karşılaştırılması # $p < 0,05$

A-II+L-NAME ile diğer grupların karşılaştırılması ‡ $p < 0,01$



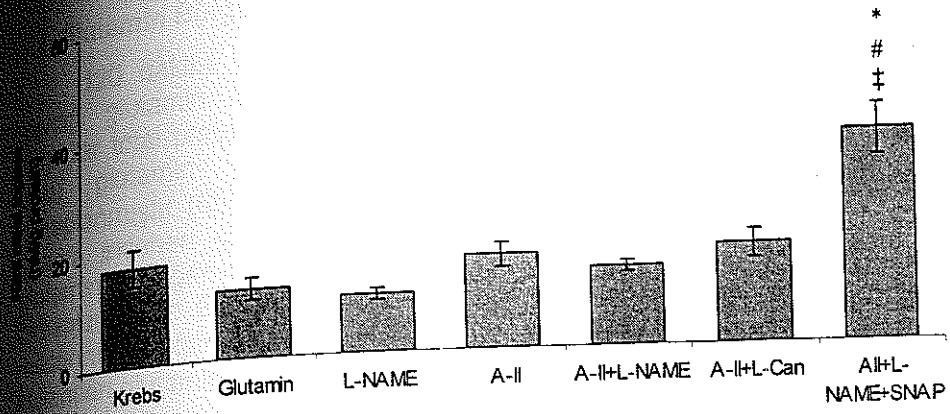
Şekil 4.10:

Total nitrat değerleri

Krebs ile diğer grupların karşılaştırılması * $p < 0,001$

Glutamin ile diğer grupların karşılaştırılması # $p < 0,001$

A-II+L-NAME ile diğer grupların karşılaştırılması ‡ $p < 0,001$



Şekil 4.11: Nitrit ve nitrat (NOx) değerleri
 Krebs ile diğer grupların karşılaştırılması * p<0,001
 Glutamin ile diğer grupların karşılaştırılması # p<0,001
 A-II+L-NAME ile diğer grupların karşılaştırılması ‡ p<0,001

Tablo 4.2: Total nitrit, nitrat ve NOx değerleri

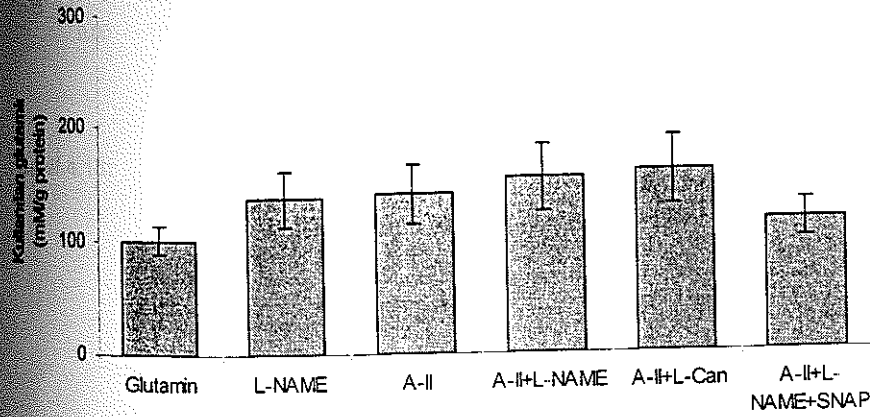
Nanomol/g protein	Total Nitrit	Total Nitrat	Nitrit ve Nitrat
Krebs (n=6)	0.42 ± 0.05	17.25 ± 3.19	17.58 ± 3.23
Glutamin (n=6)	0.47 ± 0.06	11.32 ± 1.97	12.07 ± 1.92
L-NAME (n=6)	0.40 ± 0.05	10.54 ± 1.90	10.05 ± 1.06
A-II (n=6)	0.57 ± 0.08	15.87 ± 2.02	16.23 ± 2.19
A-II+L-NAME (n=6)	0.45 ± 0.05	13.37 ± 1.01	13.79 ± 0.95
A-II+L-CAN (n=6)	0.57 ± 0.08	16.00 ± 1.80	17.13 ± 2.50
A-II+L-NAME+SNAP (n=6)	0.78 ± 0.08 * # ‡	35.76 ± 4.50 * # ‡	36.41 ± 4.45 * # ‡

Krebs ile diğer grupların karşılaştırılması * p<0.001
 Glutamin ile diğer grupların karşılaştırılması # p<0.001
 A-II+L-NAME ile diğer grupların karşılaştırılması ‡ p<0.001

4.2. Glutamin Bulguları

120 dakika krebs içinde inkübe edilen böbrek korteks dilimlerinin kullandığı glutamin miktarı ve ortamdaki glutamin miktarına bakılmış ve sonuçlar total protein üzerinden hesaplanmıştır. Krebs grubundaki ortam ve doku glutamin değerlerinin toplanmasıyla bazal glutamin değeri hesaplanmıştır ($651.60 \pm 69.40 \mu\text{M/g}$ protein). Glutamin eklenen gruplarda; ortama eklenen glutamin, total protein üzerinden hesaplanmış ve bazal glutamin değeriyle toplanarak olması gereken glutamin değeri hesaplanmıştır. Bu gruplarda inkübasyon sonunda ortam ve doku glutamin miktarının toplamı ($\mu\text{M/g}$ protein) olması gereken miktardan çıkarılarak kullanılan glutamin ($\mu\text{M/g}$ protein) miktarı hesaplanmıştır. Buna göre;

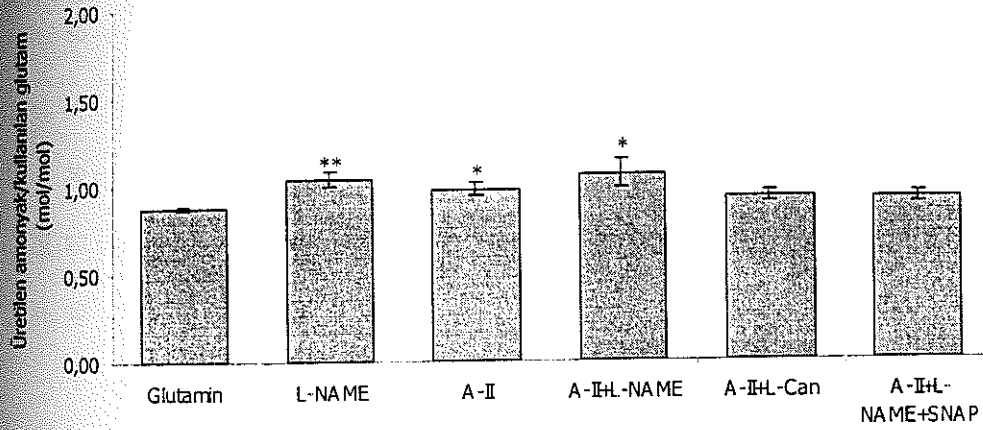
1 mM glutamin varlığında renal korteks dilimlerinin 120 dakikada kullandığı glutamin $100.12 \pm 14.00 \mu\text{M/g}$ protein'dir. Şekil 4.12 ve Tablo 4.3'te görüldüğü gibi L-NAME varlığında böbrek korteks dilimlerinin kullandığı glutamin miktarı $135.90 \pm 26.10 \mu\text{M/g}$ protein değerine yükselmiştir. A-II ile bu değer $138.90 \pm 28.90 \mu\text{M/g}$ protein olarak bulunmuştur. A-II ve L-NAME'in birlikte kullanılması esnasında dokunun tükettiği glutamin miktarı $152.30 \pm 31.30 \mu\text{M/g}$ protein olarak hesaplanmıştır. iNOS inhibitörü L-Canavanin (10^{-5} M) varlığında dokunun kullandığı glutamin $156.90 \pm 32.70 \mu\text{M/g}$ protein değerine yükselmiştir. 10^{-5} M SNAP ve A-II + L-NAME varlığındaki glutamin tüketimi $114.47 \pm 18.15 \mu\text{M/g}$ protein'dir. Ancak glutamin kullanımında saptanan bu değişikliklerde istatistiksel olarak önemli farklılık gözlenmemiştir.



Şekil 4.12: Kullanılan glutamin değerleri

4.5. Amonyak/ Glutamin Oranı (Mol/Mol)

120 dakikalık inkübasyonun sonunda, total amonyak (ortam ve doku amonyak miktarlarının toplamı) değerinin, kullanılan glutamin değerine oranına bakılmış ve sonuçlar Şekil 4.13 ile Tablo 4.2'de gösterilmiştir. Inkübasyonun sonunda, 1 mMol glutamin eklenen ortamdaki dokularda, glutaminin amonyağa dönüş oranı 0.87 ± 0.08 olarak hesaplanmıştır. Endojen NOS aktivitesinin inhibe edildiği L-NAME grubunda, molar glutamin başına üretilen amonyağa dönüş oranı 1.03 ± 0.04 'e çıkmıştır ($p < 0.01$). 10^{-7} M A-II inkübasyonu ile bu değer 0.97 ± 0.04 olarak bulunmuştur ($p < 0.05$). L-NAME + A-II'nin etkisi ile 1 mol glutaminin amonyağa dönüşümü 1.06 ± 0.08 olarak hesaplanmıştır. iNOS inhibitörü L-Canavanin ve A-II varlığında glutaminin amonyağa dönüşüm oranı (0.93 ± 0.03) glutaminli gruptakinden fark göstermemiştir. NO donörü SNAP'ın ortama eklenmesi ile bu değer 0.92 ± 0.03 olarak hesaplanmıştır.

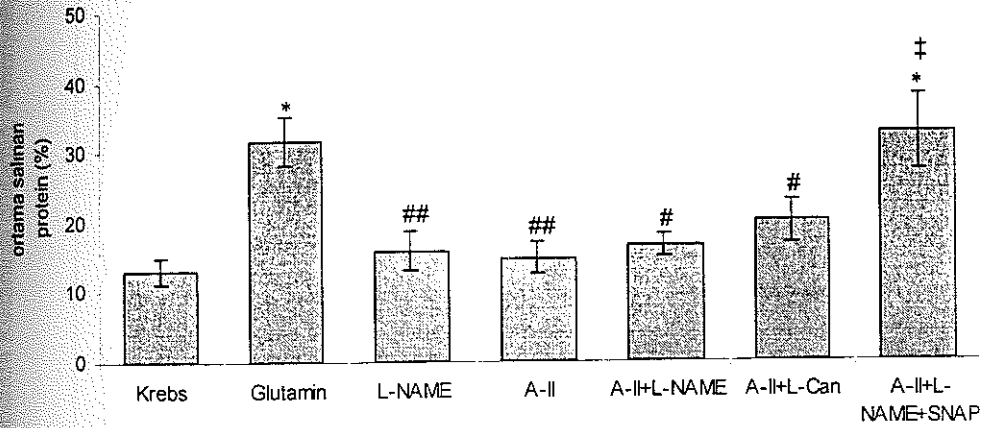


Şekil 4.13: Üretilen amonyak miktarlarının kullanılan glutamin miktarlarına oranı (mol/mol) Glutamin grubu ile diğer grupların karşılaştırılması * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

4.6. Ortama Salınan Protein (% Total Protein)

Inkübasyon sonunda, ortam ve doku protein miktarlarının toplanmasıyla total protein elde edilmiş ve ortama salınan protein total proteinin yüzdesi olarak hesaplanmıştır.

Bazal koşullarda 120 dakikalık inkübasyonun sonunda total proteinin %13.06 ± 1.90'ı ortama salınırken, 1 mM glutamin mevcudiyetinde bu değer %31.35 ± 4.48'e yükselmiştir (p<0.01). L-NAME varlığında glutaminin sebep olduğu protein salgısında bir azalış olduğu gözlenmiştir (%15.79 ± 2.73, p<0.01). A-II ile inkübasyonda ortama salınan protein %14.76 ± 2.29 değerine düşmüştür (p<0.01) A-II ve L-NAME ile A-II ve L-canavanin varlığında bu değerler değişmemiştir; sırasıyla %16.52 ± 1.57 ve %19.89 ± 2.98. A-II ve L-NAME'nin protein salınımını azaltıcı etkisi ortama eklenen 10⁻⁵ M SNAP ile tamamen engellenmiştir (%32.44 ± 6.29, p<0.05) (Şekil 4.14 ve Tablo 4.3).



Şekil 4.14:

Ortam proteini (total proteinin yüzdesi olarak)

Krebs grubu ile diğer gruplarının karşılaştırılması * p<0.01

Glutamin grubu ile diğer gruplarının karşılaştırılması # p<0.05, ## p<0.01

A-II+L-NAME ile A-II+L-NAME+SNAP gruplarının karşılaştırılması; ‡ p<0.05

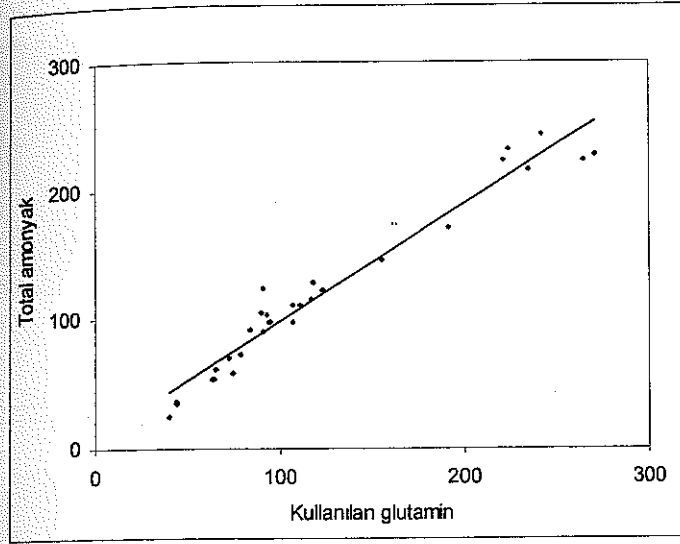
Tablo 4.3: Tüm gruplarda Kullanılan glutamin, Amonyak/glutamin oranı ve ortama salınan protein değerleri

	Kullanılan glutamin µM/g protein	Üretilen amonyağın kullanılan glutamine oranı (mol/mol)	Ortama salınan protein (%)
Krebs	Glutamin yok	Glutamin yok	13.06±1.90 (n=6)
Glutamin	100.12±14.00 (n=6)	0.87±0.08 (n=7)	31.35±4.48 * (n=6)
L-NAME	135.87±26.10 (n=7)	1.03±0.04 ## (n=6)	15.79±2.73 ## (n=6)
A-II	138.90±28.90 (n=7)	0.98±0.04 # (n=7)	14.76±2.29 ## (n=6)
A-II+L-NAME	152.30±31.30 (n=7)	1.07±0.08 # (n=6)	16.52±1.50 # (n=6)
A-II+L-CAN	156.90±32.70 (n=6)	0.93±0.03 (n=7)	19.85±2.98 # (n=6)
A-II+L-NAME + SNAP	114.40±18.15 (n=6)	0.92±0.03 (n=7)	32.44±6.29 * ‡ (n=6)

Krebs grubu ile diğer grupların karşılaştırılması * p<0.01
Glutamin grubu ile diğer grupların karşılaştırılması # p<0.05 ## p<0.01
A-II+L-NM ile A-II+L-NM+SNAP gruplarının karşılaştırılması; ‡ p<0.05

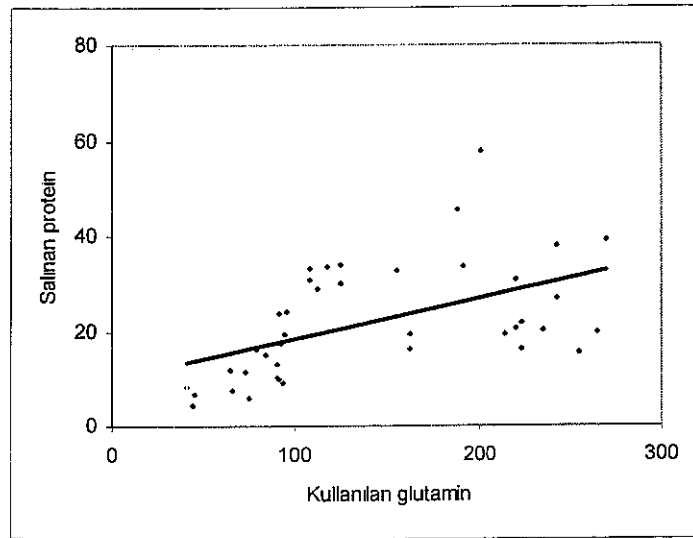
4.7. Korelasyon Bulguları

Tüm gruplarda üretilen amonyak (doku amonyak ve 120. dk amonyak değerlerinin toplamı) ile kullanılan glutamin değerleri arasında istatistiksel olarak önemli bir korelasyon saptanmıştır ($R^2=0.94$, $p<0.0001$), (Şekil 4.15)

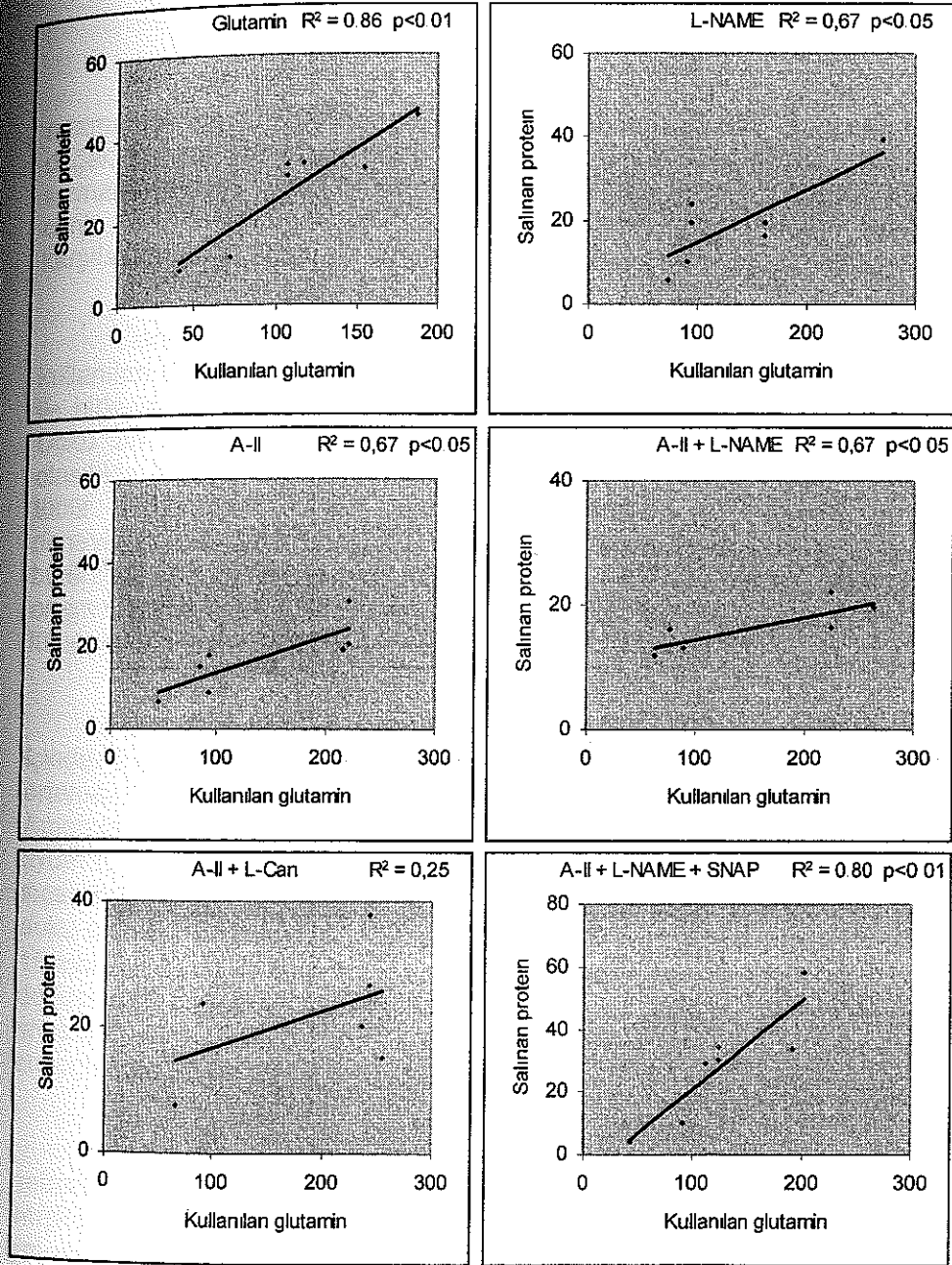


Şekil 4.15: Üretilen amonyak ile kullanılan glutamin arasındaki korelasyon; $R^2=0.94$, $p<0.0001$

Tüm gruplarda 120 dk. İnkübasyon sonunda ortama salınan protein değerleri ile kullanılan glutamin değerleri arasında istatistiksel olarak önemli bir korelasyon saptanmıştır ($p=0.0008$, Şekil 4.16). Her grubun bireysel verileri dikkate alındığında saptanan R^2 değerleri ve istatistiksel önemlilikleri farklı olup Şekil 4.17'de gösterilmiştir.



Şekil 4.16: Kullanılan glutamin ile ortama salınan protein arasındaki korelasyon $R^2=0.24$, $p<0.0008$



Şekil 4.17: Glutamin, L-NAME, A-II- AII + L-NAME, A-II + L-Can ve A-II+ L-NAME + SNAP gruplarında kullanılan glutamin ile ortama salınan protein değerleri arasındaki korelasyon

TARTIŞMA

Ön çalışma bulguları 120 dakika süresince böbrek korteks dilimlerden ortama salınan LDH miktarının totalin %36'sı kadar olduğunu göstermiştir. Bu değer, benzer metodolojiyi kullanan diğer çalışmalarda (19, 105) saptanan sızmanın oldukça altında bir değer olduğundan, deney süresince hücrelerin canlı ve bulgularımızın literatürdeki benzeri çalışmaların sonuçları ile karşılaştırılabilir nitelikte olduğu kanısına ulaşılmıştır.

Deneylerimizde ölçülen ortam amonyak değeri, bu çalışmada kullanılan 0.5 mM LMS (Glutamin sentaz inhibitörü) ile amonyağın glutamat ile birleşmesi engellendiğinden doğrudan salınan amonyağı göstermektedir. Doku amonyak miktarı ise yapıldıktan sonra sitozolde kalan ve çok az olasılıkla da hücreden lümenine salındığı halde bir şekilde ortama çıkamayıp tübül lümeninde kalmış olan amonyağı temsil etmektedir. Ancak deneylerimizde renal kortikal dilimler kullanılması nedeni ile proksimal tübül bütünlüğü bozulmuştur ve tübül lümenine salınan maddelerin doğrudan ortama geçme şansı arttırılmıştır. Bu nedenle deneylerimizde ortam sıvısının lümen sıvısını temsil ettiği varsayılmıştır.

Böbrek korteks dilimlerinin 37 °C de pH sı 7.4 olan krebs tamponu içinde, 2 saat inkübe edilmesi esnasında ortama salınan amonyak miktarı, ortama 1 mM Glutamin eklendiğinde çok anlamlı bir artış göstermiştir. Amonyak öncül maddesi olan Glutamin'e bağlı bu artış, literatür bilgileri ile uyum içindedir (78, 80-82, 84, 107). Welbourne ve ark (77) 15 inci dakikada sıçan böbrek dilimlerinden ortama salınan amonyak miktarını 2.02 $\mu\text{M/g}$ yaş doku olarak bildirmişlerdir. Bizim deneyimizde 1 g böbrek korteks dilimlerinin 15 inci dakikada ürettiği $5.69 \pm 0.34 \mu\text{M/g}$ yaş doku amonyak değeri, böbrek dokusunun yaklaşık 1/3 ünün korteksten oluştuğu (1) ve glutaminden amonyak üretiminin kortekste gerçekleştiği dikkate alınır, Welbourne'un sonuçları ile tamamen uyumlu bir bulgudur.

Böbrek amonyak yapımı ile ilgili bulguların çoğu İzole perfüze nefronlar ile yapılan çalışmalardan elde edilmiştir ve geniş bir sapma sergilemektedir. Welbourne ve ark (79) 1.3 mM glutamin mevcudiyetinde amonyak yapımını $954 \pm 119 \text{ nMol/dakika}$ olarak saptamış iken aynı deney modelinde çalışan Sastrasin ve ark (80) bu değeri $510 \pm 50 \text{ nMol/dk}$ olarak, Dubose ve arkadaşları (81) ise $1.54 \pm 0.22 \mu\text{M/dk}$ olarak bulmuşlardır. Proksimal tübül hücre kültürlerinde çalışan Welbourne ve ark (25) Glutamin varlığında 18 saatte ortama salınan amonyak miktarını $5261 \pm 813 \text{ nMol/mg}$ protein olarak belirlemişlerdir ki bu değer 2 saate indirildiğinde $584 \mu\text{Mol/g}$ protein olarak bulunur. Meade ve arkadaşları (26) yine proksimal tübül hücre

kültüründe yaptıkları bir çalışmada 1.8 mM glutamin varlığında amonyak yapım hızını $0.144 \text{ nMol mg protein}^{-1} \text{ dk}^{-1}$ olarak bulmuşlardır. Bu değerler proksimal tübülden salınan amonyak miktarının deney modeli ve koşullarına bağlı olarak çok büyük değişiklikler gösterdiğini göstermektedir. Tek izole nefron çalışmalarının sonuçları bile birbirini tutmaz iken, hücre kültürü veya renal korteks dilimlerinden elde edilen bulguların kantitatif olarak karşılaştırılması beklenemez ise de çalışmamızda, 120 dakika süresince kortikal dilimlerden ortama salınan amonyak ($549 \pm 20 \text{ nMol g protein}^{-1} \text{ dk}^{-1}$) değeri izole nefron çalışma sonuçları olan $954 \pm 119 \text{ nMol/dk}$ (79) ve $510 \pm 50 \text{ nMol /dk}$ değerlerine oldukça yakındır.

Çalışmamızda amonyak yapım hızı, daha önceki çalışmaları destekler şekilde inkübasyon süresi ile ters ilişki sergilemiştir (82, 84). Bazal olarak tanımladığımız glutaminsiz ortamda ve amonyak yapımı için substrat olarak glutamin eklediğimiz ortamda, amonyak salgı hızının 15 inci dakikada maksimum değere ulaştığı, 60 inci dakikada azaldığı ve 120 inci dakikada minimuma indiği gözlenmiştir. Amonyak yapım hızı (11, 12, 15, 85) ve amonyak salgısında çok önemli bir yere sahip olan NHE3 aktivitesinin (11-13, 83) ortam pH değeri yakın ilişki içinde olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda, böbrek korteks dilimlerinin 2 saatlik inkübasyonu sonunda ortam pH'sinin 7.4'ten 7.2 ± 0.02 'ye düştüğü gözlenmiştir. Azalan pH, NHE3 aktivitesini azaltarak amonyak yapımını kısıtlamaktadır ki bu bizim deneylerimizde saptadığımız amonyak yapım hızındaki düşmeyi açıklamaktadır.

Proksimal tübül hücresinden amonyak yapımına pek çok faktörün etkisi bilinmektedir. Bunlar arasında angiotensin II (14, 21, 22, 28, 29), insülin (9, 87, 109), norepinefrin (8, 42), paratroid hormon (8), dopamin (8), hippurat (88), atrial natriüretik peptid (53) ve troid hormonu (9, 41) sayılabilir. A-II'nin proksimal tübülde amonyagenesisini stimüle ettiği, hem total amonyak yapımını hem de lümen içine amonyak sekresyonunu arttırdığı bildirilmiştir (14, 21, 22, 24, 28, 29, 44). Literatürdeki bu çalışmalara dayanarak, bizim deneyimizde A-II amonyak yapımını stimüle edici ajan olarak kullanılmıştır.

Proksimal tübül segmentlerinde yapılan pek çok çalışmada, A-II'nin düşük (10^{-12} - 10^{-9} M) konsantrasyonlarda, AT1 reseptör aracılığı ile amonyak yapım ve sekresyonunu arttırdığı yüksek (10^{-7} - 10^{-6} M) dozlarda ise azalttığı belirtilmektedir (22, 52, 54, 55). İzole perfüze nefron çalışmalarında amonyak yapımı için kullanılacak optimal A-II dozu 10^{-9} M olarak bildirilmiş ise de, kortikal dilimler kullanılarak yapılacak çalışmamız için kullanılması gereken en uygun dozun, ön deneylerde 10^{-7} M olması gerektiği bulunmuştur. Bu dozda A-II, literatürle uyumlu olarak doku amonyak miktarını ve ortama salgılanan amonyağı önemli olarak arttırmış, ayrıca dokunun ortamdan aldığı glutamin miktarı da %38 oranında artmıştır. Ön çalışmalar sırasında kullandığımız protein yapılı bir hormon olan insülinin 10^{-7} M dozunda kortikal dilimlerden amonyak yapımını arttırması literatür ile uyumlu bir bulgudur (9, 87, 109).

Proksimal tübülde A-II, apikal ve bazolateral membranda lokalize olan Na^+/K^+ ATPaz ve/veya $AT1_A$ ve/veya $AT1_B$ reseptörleri aracılığı ile sodyum geri emilimine direkt etkide bulunmaktadır (52). A-II, hücre içi cAMP azalışı yaparak, NHE3 aktivitesini ve bazolateral membrandaki Na^+/K^+ ATPase aktivitesini stimüle etmekte ve bu şekilde tübül Na geri emilimi ile birlikte tübül hidrojen iyon sekresyonu da arttırmaktadır (14, 29, 49, 92-94, 120). Proksimal tübül hücresinde glutaminin deaminasyonu sonucu oluşan amonyağın bir kısmı lümene difüze olurken bir kısmı da hücre içinde H^+ ile NH_4^+ oluşturmak üzere protonlanmaktadır. NH_4^+ 'ün lümene sekresyonu NHE aracılı gerçekleşmektedir (11-18, 24, 107) A-II'nin NHE3 taşıyıcısını stimüle edici etkisi ve taşıyıcı aktivitesi ile hücre içine glutamin alınımı arasındaki paralellik (14, 27-29, 21-23, 31, 32, 79) A-II varlığında, hem glutamin tüketiminde hem de amonyak yapımında artış olduğunu gösteren bulgularımız ile uyumaktadır. A-II içeren tüplerde amonyak yapım hızındaki zamana bağlı anlamlı azalışın devam etmesi, ortam amonyağının, A-II' ye göre NHE3 aktivitesinde daha baskın rolü olduğunu düşündürmektedir.

Endojen NO'nun proksimal tübülde Na^+/K^+ -ATPaz ve NHE3 aktivitesini inhibe ettiği ve Na^+ atılımında hızlandırıcı bir etkiye sahip olduğu pek çok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (39, 45, 47-48, 50). Guzman ve arkadaşları (46) endojen ve ekzojen NO'nun proksimal tübülde Na^+/K^+ -ATPaz ve NHE3 aktivitesini inhibe edici etkisini yaklaşık %30 olarak saptamışlardır. Amonyak sekresyonunda Na^+/K^+ -ATPaz ve NHE'in önemli rolleri ve NO'nun bu taşıyıcı proteinlere olan inhibitör etkisi göz önüne alındığında, endojen NO'nun amonyak sekresyonunu inhibe etmesi beklenir. Nitekim bizim L-NAME kullanarak endojen NO üretimini baskıladığımız deneylerimizde de amonyak sekresyonunda anlamlı artış saptanmış olması bu beklentinin doğrulandığını göstermektedir. NO varlığının göstergesi olarak kullandığımız nitrit nitrat düzeyleri, L-NAME ile anlamlı olarak değişmemesine rağmen bir azalışın olduğu gözlenmiş ve literatürdeki "endojen NO NHE aktivitesini %30 azaltır" bilgisiyle uyumlu olarak L-NAME grubumuzda amonyak sekresyonu yaklaşık %35 artmıştır.

A-II ile NO arasındaki ilişkiye işaret eden ve A-II'nin NO-cGMP yolağını aktive ettiğini belirten pek çok çalışma vardır. A-II'nin böbrek vasküler ve tübül fonksiyonları üzerine etkilerinde NO'nun bir negatif feedback mekanizması oluşturarak, bu etkileri azalttığı belirtilmektedir (39, 48-49, 56-59, 61, 63, 64, 69, 90, 92, 93, 120). Ancak, A-II'nin amonyak yapımını arttırıcı etkisinde, A-II aracılı proksimal tübül kaynaklı NO'nun rolü hakkında bilgi mevcut değildir. Bununla birlikte bilinenler dikkate alındığında, NO ve A-II'nin NHE3 ve Na^+/K^+ -ATPaz üzerine olan etkileri zıt yönlü olduğundan, L-NAME ve A-II'yi içeren tüplerdeki amonyak yapımının sadece A-II ile stimüle edilen tüplerdeki amonyaktan daha fazla olması beklenir. İstatistiksel anlamlılık gözlenmese de elde edilen ortam ve doku amonyak değerleri bu beklentiye destekler şekildedir. Ayrıca, A-II içeren tüplerde nitrit nitrat seviyesinde gözlenen hafif artış ve L-NAME ilavesinin bu artışı ortadan

...dirması amonyak sonuçları ile uyumlu olup, A-II aracılı bir NO üretiminin ...bileceğini düşündürmektedir.

Böbreklerde her 3 NOS izoformunun da bulunduğu (39, 50, 59, 63-67), endotelde eNOS hakim iken, Macula Densa ve Principal hücrelerde nNOS, Proksimal tübül, Çıkan Kalın Henle ve Distal kıvrımlı tübülde ise iNOS'un NO yapımından sorumlu tutulduğu bildirilmiştir (39, 50, 59, 63-67). Bazal koşullarda proksimal tübülde iNOS, eNOS ve nNOS mRNA'sına rastlanmadığı ve NO nun fonksiyonel önemi olamayacağı ileri sürülse de (70) stimülasyona cevaben proksimal tübülde iNOS aracılı NO'nun arttığı Markewitz ve ark tarafından gösterilmiştir (46). Bu bulgu Proksimal tübül epitel hücresinde iNOS ekspresyonu ve iNOS kökenli NO'nun tübül transportu inhibe edici etkisini bulan Kone ve ark (39) tarafından desteklenmiştir.

Proksimal tübülde A-II aracılı olan ve amonyak sekresyonunu inhibe eden NO'nun iNOS kökenli olup olmadığı kesinlik kazanmadığından bunu test etmek için çalışmamızda spesifik iNOS inhibitörü L-canavanin (10^{-5} M) kullanılmıştır. Non spesifik olarak NOS'un L-NAME ile inhibisyonu sırasında A-II'ye cevap olan amonyak yapımı ile L-canavanin varlığındaki A-II'ye amonyak cevaplarının benzer oluşu bizim deney koşullarımızda amonyak yapımını etkileyen NO'nun iNOS aracılı olduğunu düşündürmektedir. Ancak, iNOS un kalsiyum bağımsız özelliği, A-II'nin hücre içi kalsiyum artışına dayalı NOS aktivasyonu ile NO'yu arttırdığını gösteren (39, 49) çalışmalar ile çelişmektedir. Ayrıca, A-II varlığında, nitrit nitrat seviyesinde L-NAME ilavesiyle gözlediğimiz hafif azalışın L-canavanin grubunda olmaması da bu düşüncemiz ile çelişmektedir.

Welbourne (81) ultrafiltrata geçen glutaminin proksimal tübül epitel hücresinde Na-bağımlı amino asid taşıyıcı proteinler ile hücre içine alındığını, hücresel glutamin kullanımının hücre içi glutaminaz (PDG) aktivitesine olduğu kadar, transmembran sodyum farkına da bağlı olduğunu göstermiş ve bu nedenle sodyum gradientinin sağlanmasında görev alan Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesini değiştiren faktörlerin hücre içine glutamin alımını da değiştirebileceğini belirtmiştir. Daha sonraki çalışmalar bu bulguyu desteklemiştir (23, 27, 31, 32). Çalışmamızda 120 dakikalık inkübasyondan sonra L-NAME ve A-II gruplarının Glutamin kullanımında istatistiksel anlama sahip olmamakla birlikte yaptığı artış A-II'nin Na^+/K^+ -ATPaz ve NHE aktivitesini arttırıcı ve bazal NO'nun ise bunları azaltıcı etkisi üzerinden Na gradienti yaratarak glutamin alımındaki artışı işaret eden çalışmaların sonuçları ile uyumludur (22, 29, 34, 39, 44-49).

Proksimal tübül hücresi ortamdaki aldığı her mol glutamini, Şekil 2.3'te görüldüğü gibi tamamen amonyak ve α -ketoglutarata dönüştürebileceği gibi, bir kısmını alanin amino asidi ve matriks proteinlerinin yapımında (27, 86) veya glukoz (87) yapımında da kullanabilir. Bu nedenle proksimal tübül

hücrelerinin ortamdaki aldığı her mol glutamin için üretecekleri amonyak miktarı 0 ile 2 mol arasında değişebilecektir. Kollajen ve laminin gibi ekstraselüler matriks proteinlerinin sentezi için ortamda yeterli öncül amino asidin olması gerekmektedir. Proksimal tübülde bu kaynak glutaminin amino nitrojeni ve glutamin transaminasyon yolağı (ALT) ile birleşmiş olan protein sentezidir (27). Glutamin varlığında matriks proteinlerinin yapımı stimüle olmaktadır (8, 27). Glutaminin matriks sentezinde gerekli öncül amino asit olabilmesi için Şekil 2.3' te gösterilen yolaklardan ALT yolağının, deaminasyon yolağından (GDH yolağı) daha aktif olması gerekmektedir. Sığan ve köpek proksimal tübülünde normal koşullarda bu yolaklardan ALT yolağı GDH yolağından çok daha aktiftir (25, 27). Ancak hücre içi pH düşmesi veya başka stimülasyonların varlığında GDH yolağı ön plana geçmektedir (27, 36). Bu nedenle bazal koşullarda, ALT yolağı inhibe edilmediği takdirde, 1 Mol glutaminden 1 molen fazla amonyak yapılmaz (88).

Çalışmamızda 1 mM glutamin mevcudiyetinde ortamdaki alınan glutaminin amonyağa dönüşüm oranı ortalama 0.87 ± 0.08 iken ortama salınan protein miktarı artmıştır. Böbrek korteks dilimlerinden ortama salınan protein -eğer matriks proteinlerini temsil ediyorsa- glutamin varlığında 120 dakikanın sonunda çok önemli artış göstermiştir ve kullanılan glutamin ile paralellik sergilemiştir ($r^2=0.85$ $p<0.003$). Proksimal tübül hücrelerinin ekstraselüler matriks protein sentezindeki rolü ile uyum içinde olan bu bulgu ve amonyak/glutamin oranının birin altında olması, fizyolojik koşullarda görülmesi gereken ALT yolağının bizim deney koşullarımızda da aktif olduğunu düşündürmektedir. Ancak inkübasyon ortamına eklenen A-II, L-NAME ve L-CAN gibi maddelerin bu denge halini bozduğu ve glutaminden daha çok amonyak yapımına neden olan GDH yolağının aktive edildiği dikkati çekmektedir. Bu deneylerde amonyak/glutamin oranının anlamlı olarak artması ve kullanılan glutamin ile ortama salınan protein arasındaki ilişkinin zayıflaması da GDH yolağının ön plana geçtiğini göstermektedir. SNAP eklenmesi ile bazal NO'nun yerine konulması sonucu ortama salınan protein miktarının artmış olması hücrede tekrar ALT yolağının hakim olduğunun göstergesi olarak alınabilir ($r^2=0.80$ $p<0.006$).

Literatürde A-II'nin veya NO'nun hücre içi yolaklara etkisini gösteren bir bulguya rastlanmamıştır. A-II'nin amonyak yapımını artırıcı etkisi, daha çok taşıyıcı proteinler üzerinden açıklanmaktadır (14, 21-22, 28-29). Sonuçlarımız ise GDH yolağında A-II'nin stimülatör, endojen NO'nun ise inhibitör bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmüştür.

Sonuç olarak;

1. L-NAME varlığında total amonyak miktarının ve amonyak salgı hızının arttığını gösteren bulgularımız; bazal NO'nun proksimal tübül hücrelerindeki amonyak metabolizmasına inhibitör etki yaptığını, hem amonyak yapımını hem de amonyak salgı hızını baskıladığını göstermektedir.

A-II varlığında total amonyak miktarlarının ve amonyak sekresyon hızının artması literatürü destekler nitelikte olup, A-II'nin amonyak yapım ve salgısı için stimülatör bir ajan olduğunu göstermektedir.

Bazal NO yokluğunda, A-II bağımlı amonyak üretimindeki artışın daha fazla oluşu ve ekzojen NO ilavesiyle bu artışın ortadan kalkması NO'nun amonyak sekresyonunu azaltıcı etkisi ile açıklanabilir. A-II varlığında spesifik olmayan NOS inhibisyonu ve spesifik iNOS inhibisyonu'nun benzer sonuçlar doğurması bu etkilerin iNOS'a ait olabileceğini düşündürdüyse de A-II'nin sebep olduğu amonyak yapımının önemli olarak devam etmesi NO'nun bu etkiden sorumlu olamayacağını göstermektedir.

A-II ve L-NAME varlığında amonyak/glutamin oranının önemli artması ve ortama salınan protein miktarlarının anlamlı azalması; A-II ve NO'nun amonyak metabolizmasına olan etkilerini hücre içi GDH yolu üzerinden yaptıklarını düşündürmektedir.

SONUÇLAR

1. Glutamin varlığında amonyak yapımında istatistiksel olarak önemli bir artış gözlenmiştir. Amonyak sekresyon hızında zamana bağlı bir azalış saptanmıştır. Sekresyon hızının 15 dakikada maksimum hızda olduğu ve giderek azalan bir profil çizdiği gözlenmiştir.
2. L-NAME ve A-II varlığında amonyak salgı hızında ve total amonyak miktarında glutamin grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir artış gözlenmiştir. Amonyak salgı hızındaki zaman bağlı azalış bu iki grupta da devam etmiş, ancak salgı hızlarının glutamin grubuna göre daha yüksek olduğu saptanmıştır.
3. A-II varlığında ortama L-NAME, L-Canavanin ve L-NAME ile birlikte SNAP ilavesinin, amonyak salgı hızında ve total amonyak miktarında A-II'nin etkisine ilave bir katkısının olmadığı gözlenmiştir.
4. İnkübasyon sonu nitrit ve nitrat düzeylerinde, ekzojen nitrik oksit ilavesinin yapıldığı A-II+L-NAME+SNAP grubu hariç, istatistiksel olarak önemli bir değişim saptanmamıştır.
5. Kullanılan glutamin düzeylerine bakıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmemiştir.
6. Üretilen amonyağın kullanılan glutamine oranının, L-NAME, A-II ve A-II+L-NAME gruplarında glutamin grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı gözlenmiştir.
7. Tüm gruplarda glutamin kullanımı ile total amonyak miktarları arasında istatistiksel olarak önemli bir korelasyon saptanmıştır.
8. İnkübasyon sonu ortama salınan protein (total proteinin yüzdesi olarak) miktarının glutamin grubunda istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı gözlenmiştir. Ancak, ortama L-NAME, A-II, A-II varlığında L-NAME ve A-II varlığında L-Canavanin eklenmesiyle bu artışın ortadan kalktığı saptanmıştır. İnkübasyon ortamına A-II ve L-NAME ile birlikte SNAP ilavesinin ise ortama salınan protein miktarının glutamin grubunun değerlerine yükselmesine neden olmuştur.

Ortama salınan protein miktarları ile glutamin kullanımı arasında glutamin grubunda gözlenen korelasyonun ortama L-NAME, A-II ve L-Caranvanin gibi ajanların eklenmesiyle bozulduğu ancak, A-II ve L-NAME ile birlikte SNAP ilavesinin, korelasyonun glutamin grubu düzeyine çevirdiği gözlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Ganong WF, İdrar yapım ve itrahi, In:Tıbbi Fizyoloji, 17.baskı, Barış Kitabevi/Appleton & Lange, Ankara, pp:857-907, 1996
2. Guyton AC, JE Hall: Böbrekler ve vücut sıvıları, In: Tıbbi Fizyoloji, 9.baskı, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti, Ankara, pp:297-424, 1991
3. Laiken ND and Fanestil DD: Body fluids and renal function. In: Best and Taylor's Physiological Basis of Medical Practice, Eleventh edition, West J, Williams & Wilkins, London, pp: 478-567, 1985.
4. Cogan M: Acid-base homeostasis & disorders: Acidosis & alkalosis. In: Fluid & Electrolytes Physiology & Pathophysiology, First edition; Appleton & Lange, San Francisco, pp: 175-197, 1991
5. Emerk K, Bilsel S, Gümüştaş K, İşlekel H; Su ve elektrolit metabolizması. In: İnsan biyokimyası; Onat T, Emerk K, Sözman E; Palme Yayıncılık, Ankara, pp:21-57, 2002
6. Gözükara E: Amino asitlerin oksidasyonu. In: Biyokimya, 3.baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara, pp:1009-1047, 1997
7. Choi JY, Shah M: Novel amiloride-sensitive sodium-dependent proton secretion in the mouse proximal convoluted tubule; J Clin Invest; 105, 1141-1146, 2000
8. Gesek F, Schollwerth A: Hormonal interactions with proximal Na⁺-H⁺ exchanger; Am J Physiol, 258: F514-F521, 1990
9. Klisic J, Chang Hu M, Nief V, Reyes L: Insulin activates Na⁺/H⁺ exchanger 3: biphasic response and glucocorticoid dependence; Am J Physiol, 283: F532-F539, 2002
10. Wang T, Yang CL, Abbiati T, Shull GE, Giebisch G, Aranson PS: Essential role of NHE3 in facilitating formate-dependent NaCl absorption in the proximal tubule; Am J Physiol, 281: F288-F292, 2001

11. Simon E, Fry B, Hering-Smith K, Hamm L: Ammonia loss from rat proximal tubule in vivo: effect of luminal pH and flow rate; *Am J Physiol*, 255: F861-F867, 1988
12. Nagami GT: Luminal secretion of ammonia in the mouse proximal tubule perfused in vitro; *J. Clin Invest*, 81: 159-164, 1988
13. Nagami GT: Ammonia production and secretion by the proximal tubule; *Am J Kidney Dis*; XIV, 258-261, 1989
14. Nagami GT: Effect of Angiotensin II on ammonia production and secretion by mouse proximal tubules perfused in vitro; *J. Clin Invest*; 89, 925-931, 1992
15. Simon EE, Merli C, Herndon J, Cragoe EJ, Hamm LL: Determinants of ammonia entry along the rat proximal tubule during chronic metabolic acidosis; *Am J Physiol*, 256: F1104-F1110, 1989
16. Preisig PA and Alpern RJ: Pathways for apical and basolateral membrane NH_3 and NH_4^+ movement in rat proximal tubule; *Am J Physiol*, 259: F587-F593, 1990
17. Weinstein AM: Ammonia transport in a mathematical model of rat proximal tubule; *Am J Physiol*, 267: F237-F248, 1994
18. Hamm LL, Simon EE: Roles and mechanisms of urinary buffer excretion; *Am J Physiol*, 253: F595-F605, 1987
19. Gstraunthaler G and Handler JS: Isolation, growth, and characterization of a gluconeogenic strain of renal cells; *Am J Physiol*, 252: C232-C238, 1987
20. Shai A, Laughrey E and Tannen R: Relationship between intracellular pH and ammonia metabolism in LLC-PK₁ cells; *Am J Physiol*, 258: F103-F108, 1990
21. Nagami GT: Enhanced ammonia secretion by proximal tubules from mice receiving NH_4Cl : role of angiotensin II; *Am J Physiol*, 282: F472-F477, 2002
22. Nagami GT: Effect of luminal angiotensin II on ammonia production and secretion by mouse proximal tubules; *Am J Physiol*, 269: F86-F92, 1995

23. Nissim I: Newer aspects of glutamine/glutamate metabolism: the role of acute pH changes; *Am J Physiol*, 277: F493-F497, 1999
24. Völkl H and Lang F: Electrophysiology of ammonia transport in renal straight proximal tubules; *Kidney International*, 40, 1082-1089, 1991
25. Welbourne TC, Mu X: Extrasellular glutamate flux regulates intracellular glutaminase activity in LLC-PK₁-F⁺ cells; *Am J Physiol*, 268: C1418-C1424, 1995
26. Meade D, Chess C, Welbourne TC: Glutamate transport and cellular glutamine metabolism: regulation in LLC-PK₁ vs. LLC-PK₁-F⁺ cell lines; *Am J Physiol*, 274: C1616-C1624, 1998
27. Welbourne TC, Routh R, Yudkoff M, Nissim I: The glutamine/glutamate couplet and cellular function; *News Physiol Sci*; 16, 157-160, 2001
28. Thekkumkara T, Linas S: Role of internalization in AT_{1A} receptor function in proximal tubule epithelium; *Am J Physiol*, 282: F623-F629, 2002
29. Schuster VL, Kokko JP, Jacobson HR: Angiotensin II directly stimulates sodium transport in rabbit proximal convoluted tubules; *J Clin Invest*; 73, 507-515, 1984
30. Reams G, Villarreal D, and Bauer JH: Intrarenal metabolism of angiotensin II; *Am J Physiol*, 258: F1510-F1515, 1990
31. Welbourne TC, Matthews JC: Glutamate transport and renal function; *Am J Physiol*, 277: F501-F505, 1999
32. Hediger MA, Welbourne TC: Introduction: glutamate transport, metabolism and physiological responses; *Am J Physiol*, 277: F477-F480, 1999
33. Welbourne TC and Chevalier: Glutamate transport and not cellular content modulates paracellular permeability in LLC-PK₁-F⁺ cells; *Am J Physiol*, 272: E367-E370, 1997
34. Carter P and Welbourne TC: Glutamate transport regulation of renal glutaminase flux in vivo; *Am J Physiol*, 273: E521-E527, 1997

35. Welbourne TC, Fuseler J: Growth hormone-enhanced acid production and glutamate and glutamine utilization in LLC-PK₁-F⁺ cells; *Am J Physiol*, 265: E874-E879, 1993
36. Welbourne TC, Nissim I: Regulation of mitochondrial glutamine/glutamate metabolism by glutamate transport: studies with ¹⁵N; *Am J Physiol*, 280: C1151-C1159, 2001
37. Carter P and Welbourne TC: Glutamate transport asymmetry in renal glutamine metabolism; *Am J Physiol*, 274: E877-E884, 1998
38. Gstraunthaler G, Landauer F and Pfaller W: Ammoniogenesis in LLC-PK₁ cultures: role of transamination; *Am J Physiol*, 263: C47-C54, 1992
39. Kone BC and Baylis C: Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney; *Am J Physiol*, 272: F561-F578, 1997
40. Coates G, Nissim I, Batterbee H, Welbourne T: Glitazones regulate glutamine metabolism by inducing a cellular acidosis in MDCK cells. *Am J Physiol*, 283:E729-37, 2002
41. Wolf G: Angiotensin as a renal growth promoting factor; *Adv. Exp. Med. Biol*; 377:225-236, 1995
42. Clark JD, Cragoe RJ, Limbird LE: α_2 -Adrenergic receptors regulate Na⁺-H⁺ exchange via a cAMP-dependent mechanism; *Am J Physiol*, 259: F977-F985, 1990
43. Branko B, Mitchell KD, Fox J, Navar LG: Proximal tubular secretion of angiotensin II in rats; *Am J Physiol*, 264: F891-F898, 1993
44. Saccomani G, Mitchell KD, Navar LG: Angiotensin II stimulation of Na⁺-H⁺ exchange in proximal tubule cells; *Am J Physiol*, 258: F1188-F1195, 1990
45. Roczniac A, Burns KD: Nitric oxide stimulates guanylate cyclase and regulates sodium transport in rabbit proximal tubule; *Am J Physiol*, 270: F106-F115, 1996
46. Liang M, Knox FG: Production and functional roles of nitric oxide in the proximal tubule; *Am J Physiol*, 278: R1117-R1124, 2000
47. Ortiz PA, Garvin JL: Role of nitric oxide in the regulation of nephron transport; *Am J Physiol*, 282: F777-F784, 2002

48. Eitle E, Hiranyachattada S, Wang H, Herris PJ: Inhibition of proximal tubular fluid absorption by nitric oxide and atrial natriuretic peptide in rat kidney; *Am J Physiol*, 274: C1075-C1080, 1998
49. Zhang C and Mayeux PR: Angiotensin II signaling activates the NO-cGMP pathway in rat proximal tubules; *Life Sciences*, 63: 75-80, 1998
50. Kone BC: Nitric oxide in renal health and disease; *Am J Kidney Diseases*, 30: 311-333, 1997
51. Zhang SL, To C, Chen X, Filep JG, Thang SS: Effect of renin-angiotensin system blockade on the expression of the angiotensinogen gene and induction of hypertrophy in rat kidney proximal tubular cells; *Exp Nephrol*, 9: 109-117, 2001
52. Green DJ: Angiotensin receptor subtypes of the kidney cortex; *Am J Physiol*, 253: F1-F7, 1987
53. Garcia N, Garvin J: ANF and angiotensin II interact via kinases in the proximal straight tubule; *Am J Physiol*, 268: F730-F735, 1995
54. Harris PJ: Regulation of proximal tubule function by angiotensin; *Clin Exp Pharmacol Physiol*; 19: 213-222, 1992
55. Stumvoll M, Meyer C, Perriello G, Kreider M, Welle S, Gerich J: Human kidney and liver gluconeogenesis: evidence for organ substrate selectivity; *Am J Physiol*, 274: E817-E826, 1998
56. Braam B: Renal endothelial and macula densa NOS: integrated response to changes in extracellular fluid volume; *Am J Physiol*, 276: R1551-R1561, 1999
57. Braam B, Tutkstra E, Koomans HA: Coordinated actions of renal endothelial and macula densa NO systems in the maintenance of extracellular fluid volume; *Acta Physiol Scand*, 168, 125-132; 2000
58. Gabbai B, Blantz RC: Role of nitric oxide in renal hemodynamics; *Seminars in Nephrology*, 19: 242-250, 1999
59. Kurtz A and Wagner C: Role of nitric oxide in the control of renin secretion; *Am J Physiol*, 275: F849-F862, 1998

60. Blantz RC, Satriano J, Gabbai F and Kelly C: Biological effects of arginine metabolites; *Acta Physiol Scand*; 168, 21-25, 2000
61. Gabbai FB: Effects of nitric oxide synthase blockers on renal function; *Nephrol Dial Transplant*; 16, 10-13, 2001
62. Persson AEG, Gutierrez A, Pittner J, Ring A, Ollerstam A, Brown R, Liu R and Thorup C: Renal NO production and the development of hypertension; *Acta Physiol Scand*; 168, 169-174, 2000
63. Welch WJ, Wilcox CS, Thomson SC: NO and TGF; *Seminars in Nephrology*; 19: 251-262, 1999
64. Gabbai FB, Garcia GE, Blantz RC, Luca de Nicola: Role of nitric oxide in glomerular physiology and pathophysiology; *Advances in Nephrology*; 24: 3-18, 1995
65. Millar TM, Kanczler JM, Bodamyali T, Stevens C, Nitric oxide. Its generation, reactions and role in physiology.; *Free radicals, Nitric oxide, and Inflammation: Molecular, Biochemical, and Clinical Aspects*; Advanced Course, Antalya, 2001
66. Mattson DL, Wu F: Control of arterial blood pressure and renal sodium excretion by nitric oxide synthase in the renal medulla; *Acta Physiol Scand*, 168, 149-154, 2000
67. Wang T: Nitric oxide regulates HCO_3^- and Na^+ transport by a cGMP-mediated mechanism in the kidney proximal tubule; *Am J Physiol*, 272: F242-F248, 1997
68. Beierwaltes WH: Selective nitric oxide synthase inhibition blocks furosemide-stimulated renin secretion in vivo; *Am J Physiol*, 269: F134-F139, 1995
69. Navar LG: Integrating multiple paracrine regulators of renal microvascular dynamics; *Am J Physiol*, 274: F433-F444, 1998
70. Wu XC, Harris PJ and Johns EJ: Nitric oxide and renal nerve-mediated proximal tubular reabsorption in normotensive and hypertensive rats; *Am J Physiol*, 277: F560-F566, 1999
71. Raij L, Baylis C: Glomerular actions of nitric oxide; *Kidney International*, 48: 20-32, 1995

72. Granger JP, Alexander BT: Abnormal pressure-natriuresis in hypertension; *Acta Physiol Scand*, 168, 161-168, 2000
73. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randell RJ: Protein measurement with folin-phenol reagent; *J Biol Chem*, 193: 265-275, 1951
74. Preisig PA, Ives HE, Cragoe EJ, Alpern RJ and Rector FC: Role of the Na^+/H^+ antiporter in rat proximal tubule bicarbonate absorption; *J Clin Invest*; 80:970-978, 1987
75. Gluck SL, Underhill DM, Physiology and biochemistry of the kidney vacuolar H^+ -ATPase; *Annu Rev Physiol* ; 58:427-45 , 1996,
76. Yoshioka K and Fisher JW: Nitric oxide enhancement of erythropoietin production in the isolated perfused rat kidney; *Am J Physiol*, 269: C917-C922, 1995
77. Welbourne W.C, Francoeur D, Thornley-Brown G, Welbourne C.J: Ammonia production and pathways of glutamine utilization in rat kidney slices. *Biochim. Biophys Acta* 444: 644-652, 1976
78. Yamada H, Sacktor B, Kinsella J: Age-associated changes in ammoniogenesis in isolated rat renal tubule segments; *Am J Physiol*, 262: F600-F605, 1992
79. Welbourne TC: Hormonal and Na^+ effect on renal glutamine uptake; *Am J Physiol*, 256: F1027-F1033, 1989
80. Sastrasingh S, Tannen R: Effect of potassium on renal NH_3 production; *Am J Physiol*, 244: F383-F391, 1983
81. Dubose T, Good D: Effect of chronic hyperkalemia on renal production and proximal tubule transport of ammonium in rats; *Am J Physiol*, 260: F680-F687, 1991
82. Babül A, Bor NM: Böbrek amonyak yapımına histaminin etkisi; *Tıp*: 4: 10-15, 1980
83. Aranson P: Mechanisms of active H^+ secretion in the proximal tubule; *Am J Physiol*, 245: F647-F659, 1983

84. DiGiovanni S, Madsen KM, Luther AD, Knepper MA: Dissociation of ammoniagenic enzyme adaptation in rat S1 proximal tubules and ammonium excretion response; *Am J Physiol*, 267: F407-F414, 1994
85. Hortelano P, Lupianez JA, Barnswell J, Sanchez-Pozo A: Renal ammoniagenesis in rats made acutely acidotic by swimming; *Horm Met Res*; 16: 370-373, 1984
86. Bories PN, Bories C: Nitrate determination in biological fluids by an enzymatic one-step assay with Nitrate Reductase; *Clin Chem*, 41/6: 904-907, 1995.
87. Gesek F, Schollwerth A: Insulin increases $\text{Na}^+\text{-H}^+$ exchange activity in proximal tubules from normotensive and hypertensive rats; *Am J Physiol*, 260: F695-F703, 1991
88. Malyusz M, Hackl A, Wrigge P, Lange M, Sick H: Ammonia production from hippurate by the rat kidney in vitro; *Renal Physiol*; 17:307-315, 1994
89. Arendshorst WJ, Chatziantoniou C, Daniels FH: Role of angiotensin II in the renal vasoconstriction observed during the development of genetic hypertension; *Kidney International*, 38: S92-S96, 1990
90. Schiffrin EL: Vascular and cardiac benefits of angiotensin receptor blockers; *Am J Med*; 113:409-418, 2002
91. Tannen RL, Sahai A: Biochemical pathways and modulators of renal ammoniagenesis; *Miner Electrolyte Metab* 16(5): 249-58, 1990
92. Aiello S, Noris M, Remuzzi G: Nitric oxide/L-Arginine in uremia; *Mineral and Electrolyte Metabolism*; 25:384-390, 1999
93. Harm P, Border WA, Noble NA: From rats to man: a perspective on dietary L-arginine supplementation in human renal disease; *Nephrol Dial Transplant*; 14: 1640-1650, 1999
94. Caruso-Neves C, Rangel LBA, Lara LS and Lopes AG: Regulation of the proximal tubule second sodium pump by angiotensins; *Braz J Med Biol Res*, 34(8), 1079-1084, 2001
95. Loscalzo J, London GM: Cardiovascular disease in end-stage renal failure; *Oxford clinical nephrology series*, 2000

96. Cooke JP, Dzau V: Nitric oxide synthase: Role in the genesis of vascular disease; *Annu Rev Med*, 48: 489-509, 1997
97. Förstermann U, Gath I, Schwarz P, Closs EI, Kleinert H: Isoforms of nitric oxide synthase-properties, cellular distribution and expressional control; *Biochemical Pharmacology*, 50, 1321-1332, 1995
98. Deng X, Welch WJ, Wilcox CS: Role of nitric oxide in short-term and prolonged effects of angiotensin II on renal hemodynamics; *Hypertension* 27, 1173-1179, 1996
99. Hennington BS, Zhang H, Miller MT, Granger JP, Reckelhoff JF: Angiotensin II stimulates of endothelial nitric oxide synthase; *Hypertension* 31: 283-288, 1998
100. Just A: Nitric oxide and renal autoregulation; *Kidney Blood Press Res*; 20: 201-204, 1997
101. He XR, Greenberg SG, Briggs JP and Schnermann JB: Effect of nitric oxide on renin secretion II. Studies in the perfused juxtaglomerular apparatus; *Am J Physiol*, 268: F953-F959, 1995
102. Biemesderfer D, Reilly RF, Exner M, Igarashi P and Aranson PS: immunocytochemical characterization of Na⁺-H⁺ exchanger isoform NHE-1 in rabbit kidney; *Am J Physiol*, 263: F833-F840, 1992
103. Leonard KC, Boron WF: Acid extrusion in S3 segment of rabbit proximal tubule I Effect of bilateral CO₂/HCO₃⁻; *Am J Physiol*, 268: F179-F192, 1995
104. Liu FY, Cogan MG: Role of angiotensin II in glomerulotubular balance; *Am J Physiol*, 272: F72-F79, 1990
105. Liguang C, Zhang BH, C H Harris D; Evidence suggesting that nitric oxide mediates iron-induced toxicity in cultured proximal tubule cells; *Am J Physiol*, 274: F18-F25, 1998
106. Kurtz A, Götz KH, Hamann M, Wagner C: Stimulation of renin secretion by nitric oxide is mediated by phosphodiesterase 3; *PNAS*; 95 (8): 4743-4747, 1998
107. Wall SM: Ammonium transport and the role of Na,K-ATPase: *Mineral and Electrolyte Metabolism*; 22:311-317, 1996

108. Lanctin H, Bronsnan JT and Ross BD: Glutamine synthesis in the perfused rat kidney and in isolated rat cortical tubules: regulation by pH; *Clinical Science*, 69, 701-707, 1985
109. Chobanian MC and Hammerman MR: Insulin stimulates ammoniogenesis in canine renal proximal tubular segments; *Am J Physiol*, 253: F1171-F1177, 1987
110. Gill RK, Saksena S, Syed IA, Tyagi S, Alrefai WA, Malakooti J; Regulation of NHE3 by nitric oxide in Caco-2 cells *Am J Physiol*, 283: G747-G756, 2002
111. Valdivielso JM, Perez-Barriocanal F, Garcia-Estan J, Lopez-Novoa JM: Role of nitric oxide in the early hemodynamic response after unilateral nephrectomy; *Am J Physiol*, 276: R1718-R1823, 1999
112. Chen LY, Mehta P, Mehta JL: Oxidized LDL decreases L-arginine uptake and nitric oxide synthase protein expression in human platelets, Relevance of the effect of oxidized LDL on platelet function; *Circulation*, 93: 1740-1746, 1996
113. Beromayer HU, Bergmeyer J and Marianne BarBI; *Methods of enzymatic analysis*, Third edition, VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-6940 Weinheim, Volume:VII, pp:364-69, 1990
114. Vinay P, Lemieux G, Cartier P, Ahmad M: Effect of fatty acids on renal ammoniogenesis in in vivo and in vitro studies; *Am J Physiol*; 231(3): 880-887, 1976
115. Nissim I, Yudkoff M, Segal S: Nitrogen sources for renal ammoniogenesis: study with ¹⁵N amino acid; ; *Am J Physiol*; 251(6-2): F995-F1002, 1986
116. Simon EE, Merli C, Herndon J and Hamm L: Contribution of luminal ammoniogenesis to proximal tubule ammonia appearance in the rat; *Am J Physiol*, 259: F402-F407, 1990
117. Guder WG: Stimulation of renal gluconeogenesis by angiotensin II: *Biochim Biophys Acta*; 584(3): 509-519, 1979
118. Leong PKK, Yang LE, Holstein-Rathlou NS, McDonough AA: Angiotensin II clamp prevents the second step in renal apical NHE3 internalization during acute hypertension; *Am J Physiol*, 283: F1142-F1150, 2002

119. Hernandez J, Astudillo H, Escalante B: Angiotensin II stimulates cyclooxygenase-2 mRNA expression in renal tissue from rats with kidney failure; *Am J Physiol*, 282: F592-F598, 2001
120. Zhang C, Mayeux PR: NO/cGMP signaling modulates regulation of Na⁺-K⁺-ATPase activity by angiotensin II in rat proximal tubules; *Am J Physiol*, 280: F474-F479, 2001
121. Kakoki M, Zou AP, Mattson DL: The influence of nitric oxide synthase 1 on blood flow and interstitial nitric oxide in the kidney; *Am J Physiol*, 281: R91-R97, 2001
122. Wang T, Inglis FM, Kalb RG: Defective fluid and HCO₃⁻ absorption in proximal tubule of neuronal nitric oxide synthase-knockout mice; *Am J Physiol*, 279: F518-F524, 2000
123. Schricker K, Hamann M and Kurtz A: Nitric oxide and prostaglandins are involved in the macula densa control of renin system; *Am J Physiol*, 269: F825-F830, 1995
124. Fisher KA, Lee SH, Walker J, Dileto-Fang C, Ginsberg L, Stapleton SR: Regulation of proximal tubule sodium/hydrogen antiporter with chronic volume contraction; *Am J Physiol*, 280: F922-F926, 2001
125. Nissim I and States B: Ammoniogenesis by cultured human renal cortical epithelial cells: study with ¹⁵N; *Am J Physiol*, 256: F187-F196, 1989
126. Ohigashi T, Brookins J, JW Fisher: Interaction of nitric oxide and cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate in erythropoietin production; *J Clin Invest*, 92: 1587-1591, 1993
127. Laughlin MM, Damasco MC, Igaretta P, Amorena C: In vitro and in vivo evaluation of proximal tubular acidification in aging rats; *Am J Physiol*, 280: R1627-R1631, 2001
128. Anderoli TE, Evenoff GV, Ketel BL, Snah SV, Walker PD; Böbrek hastalıkları. In: Cecil Essentials of medicine ; Third edition, W.B. Saunders Company-Kesim Ajans-Yüce Yayınları A.Ş, İstanbul, pp:181-254, 1995

ÖZGEÇMİŞ

25.05.1978 tarihinde Adana'da dünyaya gelen Selma CIRRİK, ilk öğrenimini ve orta öğrenimini Hürriyet ilköğretim okulunda tamamladı. İmamoğlu Lisesinden 1995 yılında mezun oldu ve aynı yıl Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde yüksek öğrenimine başladı. 1999 yılında lisans diplomasını aldıktan sonra aynı yıl Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
MERKEZ KÜTÜPHANESİ