

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

# **EGZERSİZİN ARTTIRDIĞI ÜRAT İTİRAHINDA RENAL ÜRAT TAŞIYICILARININ ROLÜ**

**Selma CİRRİK**

**Doktora Tezi**

**Antalya, 2009**

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

# **EGZERSİZİN ARTTIRDIĞI ÜRAT İTRAHINDA RENAL ÜRAT TAŞIYICILARININ ROLÜ**

**Selma CİRRİK**

**Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Gülsen ÖNER**

Bu çalışma Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.

(Proje no: 2007.03.0122.008)

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

**Antalya, 2009**

## **Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu ve Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı**

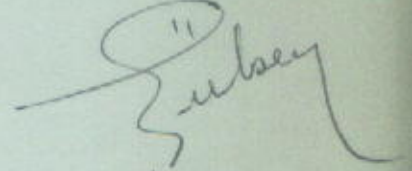
Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 22/06/2000 tarih ve 02/09 sayılı enstitü kurul kararı ve 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı senato kararı gereğince "Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim dalında SCI tarafından taranan dergilerde en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği" ilkesi gereğince yapılan yayının listesi aşağıdadır (Orjinali ekte sunulmuştur).

1. **Cirrik S, Oner G:** The effect of heavy muscle activity on renal cytoresistance in rats. *Ren Fail.* 2009;31:683-9.
2. **Oner G, Cirrik S:** The nephrotoxicity risk in rats subjected to heavy muscle activity. *J Sport Sci Med* 2009;8:481-488.
3. **Cirrik S, Oner G:** Effect of nitric oxide on ammoniagenesis in rats. *Nephron Physiol.* 2006;102:61-71.

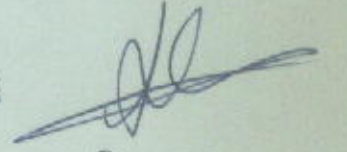
**Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;**

Bu çalışma, jürimiz tarafından Fizyoloji Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 11 / 12 / 2009

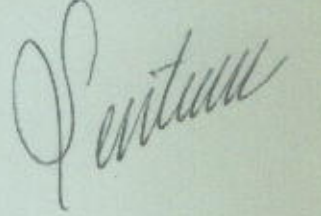
**Tez Danışmanı** : Prof. Dr. Gülsen ÖNER  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Fizyoloji Anabilim Dalı



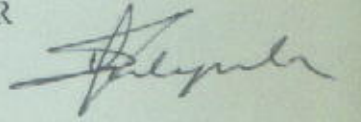
**Üye** : Prof. Dr. Aysel Ağar  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Fizyoloji Anabilim Dalı



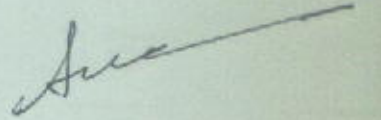
**Üye** : Prof. Dr. Ümit Kemal ŞENTÜRK  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Fizyoloji Anabilim Dalı



**Üye** : Prof. Dr. Gültekin SÜLEYMANLAR  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
İç Hastalıkları Anabilim Dalı



**Üye** : Prof. Dr. Aydan BABÜL  
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Fizyoloji Anabilim Dalı



**Onay:**

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

**Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL**

**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Bir antioksidan olan ürat, plazmada reaktif oksijen ve nitrojen türlerini süpürmektedir. Gut, böbrek taşı oluşumu ve hipertansiyon gibi hastalıklarla ilişkili olduğundan, kan ürat düzeyi renal proksimal tübüller tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Proksimal tübülde bulunan URAT1, OAT1, OAT3, UAT ve MRP4 gibi bazı taşıyıcılar renal ürat tutulumunda görev almaktadır. Hiperürisemiye neden olan faktörlerden birisi olan egzersiz, pürin katabolizmasında artışa ve ürat itrahında artışa neden olmaktadır. Ancak, egzersiz yapanların böbreğinde ürat transport yollarında herhangi bir adaptif değişimin olup olmadığı bilinmemektedir. Bu çalışma, egzersiz yapan sıçanlarda URAT1, OAT1 ve OAT3 özelliklerini ortaya koymak amacıyla düzenlenmiştir.

2,5-3 aylık erkek wistar sıçanların kullanıldığı bu çalışmada kontrol, egzersiz ve hiperürisemi olmak üzere 3 grup oluşturulmuştur. Egzersiz grubunda sıçanlara 5 gün süre ile, günde 1 kez, koşu bandında tüketici egzersiz yaptırılmıştır. Hiperürisemi grubu, sıçanlara 5 gün süreyle ürikaz inhibitörü oksonik asid verilerek ( $250 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{gün}^{-1}$ ) oluşturulmuştur. 5 günün ardından feda edilen sıçanlarda, proksimal tübül izolasyonu yapılarak, spesifik inhibitörler varlığında *in vitro* OAT1, OAT3 ve URAT1 aktiviteleri ölçülmüştür. Böbrek korteksinden alınan örneklerde bu taşıyıcıların mRNA ve protein düzeyleri incelenmiştir.

Egzersiz yapan sıçanlarda soleus kasında sitrat sentaz aktivitesi artmış, diğer gruplardan farklı olarak belirgin glukozüri, proteinüri ve hipoglisemi gözlenmiştir. Egzersiz ve deneysel hiperürisemi grubunda plazma ve idrar ürat konsantrasyonları artmasına karşın, ultrafiltrata geçen üratın, geri emilen ve idrarla atılan payları değişmemiştir. İzole proksimal tübüllerde yapılan çalışmalar bazal koşullarda tübüller ürat içeriğinin gruplar arasında farklı olmadığını ancak URAT1, OAT1 ve OAT3 aracılı total ürat transportunun hiperürisemi grubunda önemli arttığını göstermiştir. Total ürat taşınmasına URAT1'in katkısı egzersiz ve hiperürisemik gruplarda artmıştır. Bazolateral ürat taşıyıcılarından OAT1 aracılı taşınan ürat miktarı egzersizden etkilenmezken, hiperürisemide önemli artmıştır ( $p<0,05$ ). Kontrol grubunda hücre içine doğru olan OAT3 aracılı taşınma, egzersiz ve hiperürisemi gruplarında hücre dışına doğru olmuş, ancak sadece egzersizin etkisinde istatistiksel önem bulunmuştur ( $p<0,05$ ). OAT1, OAT3 ve URAT1'in böbrek korteksindeki mRNA düzeyleri hem egzersiz hem de hiperürisemik grupta azalırken, bu değişim sadece URAT1'in protein düzeylerine yansımış, OAT1 ve OAT3 protein düzeylerinde bir değişim gözlenmemiştir.

Hem egzersiz hem de hiperürisemi gruplarında gözlenen bu değişimler, proksimal tübül segmentlerinde hiperürisemiye bağlı olarak ortaya çıkan adaptif değişiklikler gibi gözükmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Egzersiz, Ürik Asid, OAT1, OAT3, URAT1

## ABSTRACT

Urate as an antioxidant molecule, scavenges both reactive oxygen and nitrogen species in the plasma. Because of its association with gout, nephrolithiasis and hypertension, the blood urate levels are tightly regulated by the renal proximal tubules. Several transporters such as URAT1, OAT1, OAT3, UAT and MRP4 localized proximal tubules are involved in the renal handling of urate. Among the several hyperuricemia inducers, exercise by increasing purine catabolism leads to excess uricosuria. However, it is not known whether any adaptive change is developed in the urate handling of the kidneys of exercisers or not. So in this study, we aimed to evaluate the characteristics of URAT1, OAT1 and OAT3 in exercising rats.

2,5-3 month old rats divided into 3 groups as control, exercise, hyperuricemia. Animals in exercise group were exhausted on a motor-driven treadmill once a day for 5 days. Hyperuricemia was induced by intraperitoneal administration of uricase inhibitor (oxonic acid,  $250 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{day}^{-1}$ ). Isolated proximal tubule segments were used to evaluate in vitro OAT1, OAT3 and URAT1 activity. mRNA and protein levels of these transporters were determined by RT-PCR, and western blot analysis respectively.

Exercise led to a marked increase in citrate synthase activity and caused proteinuria, glucosuria and hypoglycemia as distinct from the other groups. Plasma and urinary urate increased in the exercise and hyperuricemia groups, however, the excreted and reabsorbed percentage of ultrafiltrated urate did not alter. The data from isolated proximal tubule experiments showed similar basal tubular urate content but total urate transport through URAT1, OAT1 and OAT3 significantly increased in the hyperuricemia group. Both exercise and hyperuricemia caused an increase in the contribution of URAT1 mediated urate transport. Basolateral urate uptake via OAT1 was similar in control and exercise groups but increased in the hyperuricemia. OAT3 mediated urate influx turned to efflux in exercised and hyperuricemic animals. mRNA levels of studied urate transporters in the kidney cortex were found to be depressed both in exercise and hyperuricemia groups, however, this depression reflected to only URAT1 protein levels in both groups. Protein levels of other two transporters, OAT1 and OAT3 did not change significantly both in exercising and hyperuricemia group.

These alterations observed both in exercise and hyperuricemia groups seem to be attributed to hyperuricemia induced adaptive changes in proximal tubule segments.

**Keywords:** Exercise, Uric Acid, OAT1, OAT3, URAT1

## TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın planlanması, projelendirilmesi ve gerekleşmesinde değerli katkı ve eleştirileriyle bana yol gösteren sayın hocam Prof.Dr. Glсен NER'e, laboratuvar imkanlarını ve her trl desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. B. Uğur YAVUZER ve Prof.Dr. Ümit Kemal ŞENTÜRK'e, RT-PCR ve western blot deneylerindeki yardımları için sevgili arkadaşım Biolog Duygu nal ŐAHİNTÜRK'e, Yüksek lisans ve Doktora eğitimim boyunca yardımları için Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline, Deney Hayvanları nitesi çalışanlarına, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm arkadaşlarıma ve sonsuz destekleri için aileme en içten teŐekkürlerimi sunarım.

Selma CIRRIK

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>ÖZET</b>	v
<b>ABSTRACT</b>	vi
<b>TEŞEKKÜR</b>	vii
<b>İÇİNDEKİLER</b>	viii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b>	xi
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	xii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	xiii
<b>GİRİŞ</b>	1
<b>GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1. Ürik Asid ve Biyokimyasal Özellikleri	3
2.2. Ürik Asid Sentezi	3
2.2.1. Ksantin Oksidoredüktaz Sistemi	3
2.2.2. Ksantin Oksidoredüktaz Aktivitesinin Regülasyonu	5
2.3. Serum Ürik Asid Konsantrasyonunu Etkileyen Faktörler	5
2.4. Ürik Asidin Fonksiyonel Önemi	7
2.5. Hiperürisemi ve Hastalıklarla İlişkisi	7
2.5.1. Gut	8
2.5.2. Hipertansiyon	8
2.5.3. Böbrek Taşı (Nefrolitiazis)	9
2.5.4. Böbrek Yetmezliği	9
2.5.5. Akut Böbrek Yetmezliği	9
2.5.6. Serum Ürik Asid Seviyesini Düşüren Yaklaşımlar	10
2.6. Ürat azalışı ve Hastalıklar	10
2.7. Böbrekler	11
2.8. Proksimal Tübül	12
2.8.1. Proksimal Tübülün Metabolik Fonksiyonları	12
2.8.2. Proksimal Tübülde Geri Emilim	13
2.8.3. Proksimal Tübülde Sekresyon	13
2.8.4. Hidrojen Sekresyonu	13
2.8.5. Organik Katyon Sekresyonu	14
2.8.6. Organik Anyon Sekresyonu	14
2.9. Renal Ürat Transportu	15
2.9.1. Ürat Geri Emilimi	17
2.9.2. Ürat Sekresyonu	18
2.10. Egzersiz ve Böbrek Fonksiyonları	22
2.10.1. Renal Hemodinami ve Egzersiz	22
2.10.2. Renal Sodyum Tutulumu ve Egzersiz	24



2.10.3.	Egzersiz Proteinürisi	25
2.10.4.	Egzersizle İndüklenen Akut Böbrek Yetmezliği	25
2.10.5.	Hematüri	26
2.11.	Egzersiz ve Ürat Artışı	26
2.12.	Amaç ve Hipotez	28
<b>GEREÇ VE YÖNTEMLER</b>		<b>29</b>
3.1.	Deney Hayvanları	29
3.2.	Gruplandırma	29
3.3.	Egzersiz Protokolü	29
3.4.	Oksonik Asid Tedavisi	30
3.5.	DeneySEL İşlemler	30
3.5.1.	İdrar Toplama	30
3.5.2.	Kan Basıncı Ölçümü	30
3.5.3.	Böbrek Kan Akımı Ölçümü	30
3.5.4.	Glomerüler Filtrasyon Hızı (GFR) Ölçümü	31
3.6.	Deneyin Sonlandırılması, Dokuların Alınması ve Saklanması	31
3.7.	Proksimal Tübül İzolasyonu	31
3.8.	URAT1, OAT1 ve OAT3 Fonksiyonlarının Ölçümü	32
3.9.	Biyokimyasal Parametreler	34
3.9.1.	PAH Tayini	34
3.9.2.	Kreatinin Tayini	34
3.9.3.	Ürik Asid Tayini	35
3.9.4.	Glukoz Tayini	35
3.9.5.	Protein Tayini	35
3.9.6.	Sitrat Sentaz Aktivitesinin Ölçümü	36
3.10.	URAT1, OAT1 ve OAT3 mRNA Düzeylerinin Ölçülmesi	37
3.10.1.	RNA İzolasyonu	37
3.10.2.	cDNA Eldesi	37
3.10.3.	PZR Koşulları	37
3.11.	URAT1, OAT1 ve OAT3 Protein Düzeylerinin Tayini	39
3.11.1.	Doku Örneklerinin Hazırlanması	39
3.11.2.	Elektroforez ve Antikorların Uygulanması	39
3.11.3.	Görüntüleme ve Değerlendirme	40
3.12.	İstatistiksel Analiz	40
<b>BULGULAR</b>		<b>41</b>
4.1.	Genel Bulgular	41
4.1.1.	Günlük Egzersiz Süresi	41
4.1.2.	Ortalama Kan Basıncı	41
4.1.3.	Glomerüler Filtrasyon Hızı	41
4.1.4.	Böbrek Kan Akımı	42
4.1.5.	İdrar ve Plazma Glukoz Değişiklikleri	42
4.1.6.	İdrar ve Plazma Protein Değişiklikleri	42
4.1.7.	Soleus Kasında Sitrat Sentaz Aktivitesi	42
4.1.8.	Plazma ve İdrar Ürik Asid Değişiklikleri	43
4.2.	Taşıyıcı Proteinlerin Fonksiyonel Olarak Değerlendirilmesi	44
4.3.	URAT1, OAT1 ve OAT3 mRNA Değişimleri	46

4.3.1. URAT1 mRNA Değişimleri	46
4.3.2. OAT1 mRNA Değişimleri	46
4.3.3. OAT3 mRNA Değişimleri	47
4.4. URAT1, OAT1 ve OAT3 Protein Düzeyleri	48
4.3.1. URAT1 Protein Düzeyi	48
4.3.2. OAT1 Protein Düzeyi	48
4.3.3. OAT3 Protein Düzeyi	49
<b>TARTIŞMA</b>	<b>50</b>
<b>SONUÇLAR</b>	<b>56</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>58</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>73</b>
<b>EKLER</b>	<b>74</b>

**Ek-1: Cirrik S, Oner G:** The effect of heavy muscle activity on renal cytoresistance in rats. Ren Fail. 2009;31:683-9.

**Ek-2: Oner G, Cirrik S:** The nephrotoxicity risk in rats subjected to heavy muscle activity. J Sport Sci Med 2009;8:481-488.

**Ek-3: Cirrik S, Oner G:** Effect of nitric oxide on ammoniogenesis in rats. Nephron Physiol. 2006;102:61-71.

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>ACE</b>	:	Angiotensin dönüştürücü enzim
<b>ATP</b>	:	Adeneozin trifosfat
<b>CK2</b>	:	Kazein kinaz II
<b>COX-2</b>	:	Siklooksijenaz 2
<b>CRP</b>	:	C-Reaktif protein
<b>DNA</b>	:	Deoksiribonükleik asid
<b>EGF</b>	:	Epidermal büyüme faktörü
<b>FAD</b>	:	Flavin adenin dinükleotid
<b>GTP</b>	:	Guanozin trifosfat
<b>IMP</b>	:	İnozin mono fosfat
<b>MCP-1</b>	:	Monocyte chemotactic protein-1
<b>MDR</b>	:	Multidrug resistance protein
<b>mRNA</b>	:	Mesajcı ribonükleik asid
<b>MRP4</b>	:	Multidrug Resistance Protein 4
<b>NAD</b>	:	Nikotinamid adenin dinükleotid (okside)
<b>NADH</b>	:	Nikotinamid adenin dinükleotid (redükte)
<b>NHE</b>	:	Sodyum hidrojen eşdeğiştiricisi
<b>NO</b>	:	Nitrik oksid
<b>NOS</b>	:	Nitrik oksid sentaz
<b>nNOS</b>	:	Nöronal nitrik oksid sentaz
<b>OAT1</b>	:	Organik anyon taşıyıcısı 1
<b>OAT3</b>	:	Organik anyon taşıyıcısı 2
<b>OCT</b>	:	Organik katyon taşıyıcısı
<b>PAH</b>	:	Para-amino huppurik asid
<b>PDGF</b>	:	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
<b>PKA</b>	:	Protein kinaz A
<b>PKC</b>	:	Protein kinaz C
<b>PZA</b>	:	Pyrazinamide
<b>RNA</b>	:	Ribonükleik asid
<b>ROS</b>	:	Reaktif oksijen türleri
<b>SOD</b>	:	Süperoksid dizmutaz
<b>UAT</b>	:	Urate transporter/channel
<b>URAT1</b>	:	Ürat taşıyıcısı-1
<b>XD</b>	:	Ksantin dehidrogenaz
<b>XOR</b>	:	Ksantin oksidoredüktaz
<b>XO</b>	:	Ksantin oksidaz

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo</b>		<b>Sayfa</b>
<b>2.1.</b>	Farklı egzersiz şiddetlerinde renal hemodinamik parametrelerin değişimi.	<b>23</b>
<b>3.1.</b>	OAT1, OAT3 ve URAT1 fonksiyonlarının ölçümünde kullanılan inhibitörlerin doz ve etkileri.	<b>32</b>
<b>3.2.</b>	OAT1, OAT3 ve URAT1 fonksiyonlarının ölçümünde uygulanan protokoller.	<b>33</b>
<b>3.3.</b>	OAT1, OAT3, URAT1 ve beta aktin mRNA düzeylerinin ölçümünde kullanılan primerlerin dizilim ve lokalizasyonları.	<b>37</b>
<b>4.1.</b>	K, E ve H grubunda genel bulgular.	<b>41</b>
<b>4.2.</b>	K, E ve H gruplarında ortalama kan basıncı, glomerüler filtrasyon hızı, böbrek kan akımı değerleri ile idrar ve plazma analizleri.	<b>42</b>
<b>4.3.</b>	K, E ve H gruplarında plazma ve idrarda ölçülen ürik asid değerleri ile hesaplanmış filtre olan, idrarla atılan ve emilen ürik asid sonuçları.	<b>42</b>
<b>4.4.</b>	Farklı protokollerde 30 dk. inkübasyonu takiben proksimal tübülde ölçülen urat miktarları.	<b>44</b>
<b>4.5.</b>	Proksimal tübüle urat girişine farklı taşıyıcıların katkısı.	<b>45</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Ürik asid ve urat anyonu.	3
2.2. Pürinlerin yıkımı ve ürik asid sentezi.	4
2.3. Nefronun genel yapısı.	11
2.4. Renal urat transportunu açıklayan 4 bileşenli model.	16
2.5. Proksimal tübülde urat geri emilimi ve sekresyonunda görevli taşıyıcıların lokalizasyonu.	17
4.1. Soleus kasında sitrat sentaz aktivitesi.	43
4.2. İzole proksimal tübüllerde OAT1, OAT3 ve URAT1 aracılı urat transportu.	46
4.3. OAT1, OAT3 ve URAT1 PZR örnekleri	47
4.4. Böbrek korteksinde OAT1, OAT3 ve URAT1 mRNA düzeyleri.	47
4.5. OAT1, OAT3 ve URAT1'in western blot örnekleri	48
4.6. Böbrek korteksinde OAT1, OAT3 ve URAT1 protein düzeyleri	49

## GİRİŞ

Zayıf bir asid olan ürik asid, insanlarda ve diğer yüksek primatlarda pürin katabolizmasının son oksidasyon ürünü olarak ortaya çıkmaktadır. Güçlü antioksidan özellikleri olan bu molekülün plazma konsantrasyonunun artması veya azalması çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasıyla birlikte. Hiperürisemi olarak adlandırılan serum ürik asid konsantrasyon artışı, başta gut ve böbrek taşı oluşumu olmak üzere, hipertansiyon, kardiyovasküler hastalık oluşumu ve böbrek fonksiyon kaybı gibi hastalıkların oluşmasında rol oynamaktadır [1-6]. Serum ürik asid düzeylerindeki azalma, yani hipourisemi ise plazmada antioksidan kapasitesinin azalmasıyla ilişkili olarak özellikle nörodejeneratif hastalıkların gelişmesine katılmaktadır [7-8].

Organik anyon özelliği gösteren ürik asidin böbreklerde geri emilim ve sekresyonu, diğer organik anyonlara benzer şekilde nefronun proksimal tübül segmentinde gerçekleşmektedir. Proksimal tübül, serum ürik asid konsantrasyonunun düzenlenmesinde anahtar rol oynamaktadır. Böbreğin bu tübüler parçasındaki urat transportu 4 bileşenli bir modelle açıklanmaktadır. Bu modele göre, ilk basamakta plazmada bulunan uratin tamamı glomerüler kapiller membrandan geçerek ultrafiltrata girmektedir. Ultrafiltrattaki uratin yaklaşık %99'luk bir kısmı, ikinci basamakta proksimal tübülün S1 segmentinde geri emilmektedir. Geri emilen uratin %50'si üçüncü basamakta S2 segmentinde lümeneye salgılanmaktadır. S3 segmentinde gerçekleşen en son basamakta ise uratin %40'ı tekrar emilmektedir. Böylece organizmanın gereksinimine bağlı olarak, ultrafiltrata geçen uratin %1-10'luk bir kısmı proksimal tübülden çıkmakta ve nefron boyunca başka bir segmentte geri emilim yada sekresyonu olmadığından idrar ile uzaklaştırılmaktadır [9-11].

Proksimal tübülde uratin transepitelial taşınımı apikal ve bazolateral membranda bulunan organik anyon taşıyıcıları tarafından gerçekleştirilmektedir. Üratin geri emiliminden esas sorumlu taşıyıcı, tübül epitel hücresinin lümenal tarafında bulunan URAT1'dir. Sekresyonda ise bazolateral membranda bulunan OAT1 ve OAT3 ile apikal membranda bulunan UAT ve MRP4 isimli taşıyıcılar önemli rol oynamaktadır [9-11]. Bu taşıyıcılardan OAT1 ve OAT3 yalnızca urat taşınımında değil, çok sayıda endojen ve ekzojen organik anyonun sekresyonunda ve vücuttan uzaklaştırılmasında önemli rol oynamaktadır. İnsanda ve çeşitli hayvan modellerinde yapılan çalışmalar, bu taşıyıcıların ekspresyon düzeylerinin böbrek iskemi reperfüzyon hasarı, böbrek ve karaciğer hastalıklarında değiştiğini göstermiştir [12-15].

Vücutta pürin yıkımında artışa neden olan herhangi bir faktör, plazmada ürik asid konsantrasyonunun artmasına ve dolayısı ile hiperürikozüriye neden olmaktadır. Diyetel faktörler, polistemia vera ve hemolitik anemi gibi bazı hastalıklar, kemoterapi veya radyasyon tedavisi gibi durumlar serum ürik asid konsantrasyonunda artış yapan etkenler arasındadır [9]. İskelet kasında enerji ihtiyacının arttığı bir süreç olan egzersiz, ATP yıkımının artması nedeniyle, serumda

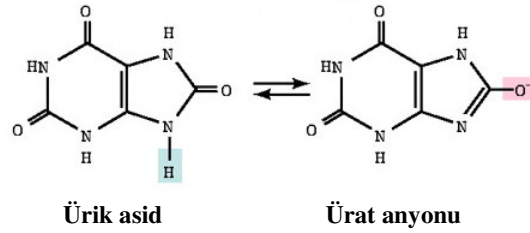
inozin, hipoksantin ve ksantin yanısıra ürik asid konsantrasyonunun da artmasına neden olmaktadır. Egzersizin bu etkisine, idrarla atılan ürik asid miktarındaki artış eşlik etmektedir [16-19]. Literatürde, egzersize bağlı ürat itrahındaki artış gösterilmesine rağmen, bunun mekanizması veya egzersizin ürat taşıyıcılarında adaptif bir değişikliğe neden olup olmadığını gösteren çalışma yoktur.

Bu çalışmanın amacı, egzersiz ile artan ürat itrahında proksimal tübülde bulunan URAT1, OAT1 ve OAT3 taşıyıcılarının özelliklerini incelemektir. Bu amaçla, 5 gün boyunca tüketici egzersiz yaptırılan sıçanlarda ve hiperürisemi oluşturulan sıçanlarda konu edilen taşıyıcıların aktivite ve ekspresyonlarındaki değişimler incelenmiştir.

## GENEL BİLGİLER

### 2.1. Ürik Asid ve Biyokimyasal Özellikleri

Ürik asid (7,9-dihidro-1H-purine-2,6,8(1H,3H,9H)-trione) karbon, nitrojen, oksijen ve hidrojenden oluşan organik bir bileşiktir (Şekil 2.1). İnsanlarda ve diğer yüksek primatlarda purin katabolizmasının son oksidasyon ürünü olarak ortaya çıkmaktadır. Ürik asid zayıf bir asittir ve iki farklı ayrışma sabitine sahiptir ( $pK_1 = 5,75$  ve  $pK_2 = 10,3$ ). Fizyolojik sıvıların farklı pH değerlerinde, ürik asit veya onun monosodyum tuzu olan sodyum urat şeklinde bulunmaktadır. pH değerinin 5,75'den düşük olduğu ortamlarda molekülün ürik asit formu fazla iken, 5,75'den büyük olduğu ortamlarda sodyum urat formu daha fazladır. Ortam pH'sı 5,75'e eşit olduğunda ise sodyum urat konsantrasyonu ile ürik asid konsantrasyonu birbirine eşittir. Sodyum uratın serumda ve 37 °C'deki çözünübilirliği 7 mg/dL'dir [9-11].



Şekil 2.1. Ürik asid ve urat anyonu [9]

### 2.2. Ürik Asid Sentezi

Pürin bazları olan adenin ve guanin, hücrede ATP ve GTP gibi enerji kaynaklarının ve nükleik asitlerin yapısına katılmaktadır. Pürinlerin yıkımında adenozin, sırasıyla adenozin deaminaz, pürin nükleozid fosforilaz ve ksantin oksidaz enzimlerinin, guanozin ise sırasıyla pürin nükleozid fosforilaz ve guanin deaminazın katalizlediği reaksiyonlarla ksantine dönüştürülmektedir. Ksantin ise daha sonraki basamakta ksantin oksidaz (XO) veya onun izoformu olan ksantin dehidrogenaz (XD) enzimlerinin katalizlediği bir reaksiyon ile ürik aside dönüştürülmektedir (Şekil 2.2) [9-11].

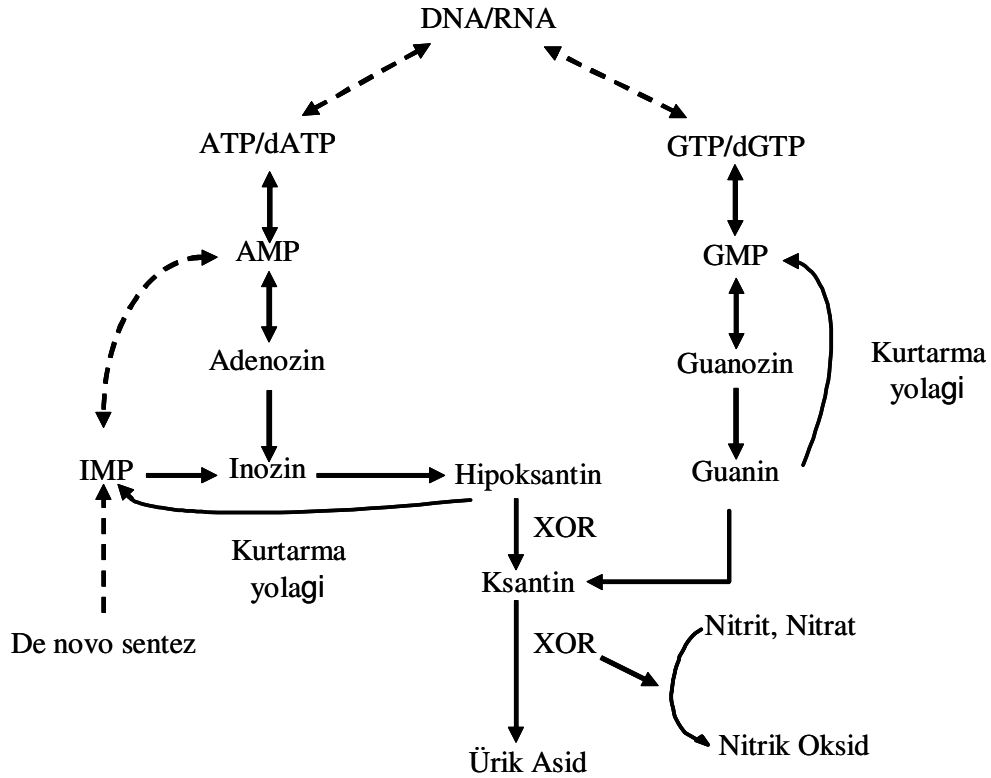
#### 2.2.1. Ksantin Oksidoredüktaz (XOR) Sistemi

Ürik asid sentezinde son basamakları katalizleyen XO ve XD enzimlerinin her ikisi de molibdenyum hidroksilaz flavoprotein ailesinin üyeleridir. XOR geninin esas ürünü XD'dir. Bu enzimin oksidasyon ve proteoliz gibi post-translasyonel modifikasyonlara uğraması, substrat bağlama özelliğinde değişime ve XO'a



dönüşmesine neden olmaktadır. XD ve XO enzim formları ve onların katalizlediği reaksiyonlar genellikle “XOR aktivitesi” olarak adlandırılmaktadır [20-21].

XOR aktivitesi gösteren her iki enzim de pürin katabolizmasında son basamağı katalizlese de  $\text{NAD}^+$  bağlayabilme özellikleri yönünden birbirlerinden farklıdır.  $\text{NAD}^+$  bağlayabilen XD formu, hipoksantin ve ksantin oksidasyonu sırasında ortaya çıkan elektronları  $\text{NAD}^+$ ’ya vererek molekülün  $\text{NADH}$ ’ya indirgenmesine neden olmaktadır.  $\text{NAD}^+$  bağlama özelliği olmayan XO ise, oksidasyon sırasında açığa çıkan elektronları moleküler oksijene transfer ederek süperoksit radikalinin oluşmasına neden olmaktadır. XO formuna göre daha az olsa da, XD da moleküler oksijeni kullanarak ROS oluşmasına neden olabilmektedir [20-23]. XOR aktivitesi sonucu oluşan ROS’un iskemi reperfüzyonun patolojisinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir [21].



Şekil 2.2. Pürinlerin yıkımı ve ürik asid sentezi [23]

XO, elektron alıcısı olarak NADH'nin varlığında nitratın nitrite ve nitritin de NO'ya indirgenmesini katalize etmekte ve NO üretebilmektedir. Bu yolla NO üretimi oksijenden bağımsız olduğundan, yolağın özellikle NOS aktivitesinin hipoksi nedeniyle sınırlandığı iskemik bölgelerde, kan akımının düzenlenmesinde rolü olabileceği düşünülmektedir. XO aracılı nitrit redüksiyonu için Km değeri oldukça yüksek olduğundan, XOR'ın bu fonksiyonunun fizyolojik önemi tam olarak bilinmemektedir [20-23].

### **2.2.2. XOR Aktivitesinin Regülasyonu**

XOR aktivitesi bütün türlerde ve hemen her organda saptanmıştır. Memelilerde, karaciğer ve barsakta yüksek, diğer organlarda ise daha düşük aktivite göstermektedir. Enzimin mRNA ve protein düzeylerinin dokular arasındaki dağılımı aktiviteyle uyumludur [20-23]. Fizyolojik koşullar altında, dolaşımdaki XOR konsantrasyonu düşüktür, ancak bazı hastalık durumlarında dramatik olarak yükselmektedir. Akut viral hepatitte, enzimin dolaşımdaki miktarı normalin 1000 katına kadar çıkmaktadır [20]. XD'ın serum proteazlar tarafından XO'a dönüştürülmesinden dolayı, dolaşımdaki XOR'ın çoğu oksidaz formundadır. XO'ın vasküler endotelyuma bağlandığı ve sonrasında da hücre içi kompartmanlara geçiş yaptığı gösterilmiştir [24].

Sitokinlerin XOR aktivitesini arttırdığı ve bu aktivasyonun transkripsiyonel düzeyde olduğu gösterilmiştir [21]. Hipoksi ise enzimin aktivitesini posttranskripsiyonel olarak arttırmakta, protein düzeyinde değişime neden olmamaktadır. XOR'ın akut aktivasyonu, enzimin fosforilasyonu ile gerçekleşmektedir. Fosforilasyon bölgesi veya bölgeleri tam olarak bilinmese de, fosforilasyonun kısmen kazein kinaz II (CK2) ve p38 MAPK'lar tarafından düzenlendiği gösterilmiştir [23]. Bu enzimlerin inhibitörleri hipoksi aracılı XOR fosforilasyonu ve aktivasyonunu engellemektedir [25].

Allopurinol, ksantin oksidoredüktazın ticari olarak satılan tek inhibitörüdür. Allopurinol inhibitör etkisini metaboliti olan oksipurinol üzerinden göstermektedir. Oksipurinol ksantin oksidazın yarışmacı inhibitörüdür. Enzimin molibden bölgesine bağlanarak ksantinin ürik aside oksidasyonunu engellemektedir. Allopurinol ve oksipurinol diğer pürin ve primidin bileşiklerine yapısal olarak benzediklerinden spesifik inhibitörler değildirler. Febuksostat ise, pürin yapısında olmayan yeni bir ajandır ve ksantin oksidoredüktazın okside ve redükte formlarını pürin ve primidin metabolizmasındaki diğer enzimlere etki etmeden inhibe etmektedir [23].

### **2.3. Serum Ürik Asid Konsantrasyonunu Etkileyen Faktörler**

Pürin yıkımında son ürün olarak ortaya çıkan ürik asid, urat oksidaz veya diğer adıyla ürikaz enzimine sahip olan türlerde karaciğer peroksizomlarında eriyebilirliği daha yüksek olan allantoin okside edilmektedir. Bu türlerde, pürin katabolizmasının son ürünü olan allantoin böbreklerden kolayca uzaklaştırılmaktadır. Memelilerin çoğunda bu enzim fonksiyonel olsa da insanda, kuyruksuz maymunlarda ve bazı yeni dünya maymunlarında, miyosen çağında (10-22 milyon yıl önce) meydana geldiği düşünülen mutasyonlar nedeniyle ürikaz geni fonksiyonunu kaybetmiştir [1,2,9,10]. Bu türlerde ürikaz enziminin olmaması ve böbreklerde etkin bir urat geri emilimi olması nedeniyle plazma urat seviyesi diğer

türlerden çok daha yüksektir; örneğin insanlarda plazma ürat konsantrasyonu 2 mg/dl'nin üzerinde iken, kemirgenlerde 0,5-2 mg/dl aralığındadır [5,9,26].

Serum ürik asid konsantrasyonu hem genetik hem de çevresel faktörlerden etkilenmektedir. İnsanda plazma ürat konsantrasyonunun erkekte 6,5-7 mg/dl'nin üzerine, kadında ise 6 mg/dl'nin üzerine çıkması hiperürisemi, 2 mg/dl'den düşük olması ise hipoürisemi olarak adlandırılmaktadır [9,5,26]. Hiperürisemi ve hipoürisemi çeşitli hastalıklarla ilişkili olduğundan bu konu üzerine yapılan çok sayıda araştırma vardır [1-9].

Serum ürik asid düzeyini etkileyen çevresel faktörlerin başında diyet gelmektedir [1,2]. Hayvansal gıdalar pürin yönünden zengin olan besin kaynaklarıdır. Bu tür besinlerin diyetten çıkarılması veya azaltılması serum ürat düzeyinde çok kısa sürede, önemli düzeyde azalmaya neden olmaktadır. Alkol tüketim oranı serum ürat konsantrasyonuna etkisi olan bir diğer faktördür. Alkol kullanımındaki artış vücutta ATP yıkımında artış ile ilişkili olarak ürat üretiminin artmasına neden olmaktadır. Etanolün Asetil-Co A dönüşümünü sağlayan reaksiyonlarda ATP kullanılmakta ve vücutta ADP ve AMP birikimine, sonuç olarak da ürik asid yapımının artmasına neden olmaktadır [2].

Genel olarak vücutta net ATP yıkımına ve AMP birikimine neden olan koşullar serumda ürik asid artışına neden olmaktadır [1,2]. Alkol tüketiminin yanı sıra fruktoz alımı da bu yolla benzer bir etki göstermektedir [1,2,27,28]. Fruktoz ürik asid metabolizmasına direk etkisi olan tek karbonhidrattır. Fruktozun karaciğerde fruktoz 6-fosfata dönüşümü sırasında ATP kullanılmaktadır. Bu nedenle fruktoz alımındaki artış AMP birikimi ve pürin yıkımının hızlanması ile birliktedir. Sonuç olarak, fruktoz infüzyonundan sonra dakikalar içinde plazma ve idrarda ürik asid konsantrasyonunda artmaktadır. İnsanlarda ve kemirgenlerde, ağız yoluyla fruktoz alımını takiben, serum ürik asid konsantrasyonundaki artış 30 dakika içinde en yüksek değerine ulaşmakta ve sonraki 90 dakika boyunca yüksek olarak kalmaktadır [29].

Vücutta yoğun bir doku yıkımı varsa, buna önemli miktarda DNA ve RNA (nükleotid) salınımı eşlik etmektedir. Bu durum, karaciğere gelen pürin yükünde ve buna bağlı olarak da ürat üretiminde ve serum ürat konsantrasyonunda önemli bir artışa neden olmaktadır. Kemoterapi veya radyasyon terapisinin en genel sonuçlarından birisi hücre döngüsü veya hücre lizisindeki artıştır. Özellikle lösemi ve lenfomada çok sık karşılaşılan bu durum "Tümör lizis sendrom" olarak adlandırılmaktadır [9]. Tümör lizis sendrom, pürin yıkımındaki artış ile uyumlu olarak, serum ürat seviyesinde hızlı bir artışla sonuçlanmakta ve bunu idrar ürat konsantrasyonundaki artış takip etmektedir. Üriner ürat artışı tübül içi kristalizasyon, tıkanma ve akut böbrek yetmezliği ile sonuçlanmaktadır. Tıkanmanın uzaması halinde lokal inflamasyon veya interstisyel fibrozis görülmektedir. Akut hemodiyaliz, hidrasyon ve idrarın alkalizasyonu ile tedavide kullanılan yöntemlerdir. Tümörlerin yanı sıra polisitemia vera, hemolitik anemiler ve hızlı hücre yıkımının olduğu diğer koşullarda da serum ürik asid artışı görülmektedir [9].

Diyete veya çeşitli hastalık durumlarına bağlı olarak görülen ürik asid artışlarına ilaveten, GFR'de veya ürik asid itrahında azalmaya, ya da tübüler geri emilimde artışa neden olan herhangi bir faktör de kronik hiperürisemiye neden olabilmektedir. Diüretik kullanımı renal ürat geri emilimini arttıran bir diğer hiperürisemi faktördür [9].

Egzersizde pürin yıkımındaki artışa paralel olarak, serum ve idrar ürik asid konsantrasyonu artışı daha ilerde tartışılacaktır [16-19].

#### **2.4. Ürik Asidin Fonksiyonel Önemi**

Artışı bir çok patolojiye neden olsa da, ürik asidin bir antioksidan olarak önemi fazladır. Ürik asid, askorbik asid gibi suda eriyebilir özelliği olan doğal bir antioksidandır [6,26,30-35]. İnsan kanında süperoksid radikali, hidroksil radikali, peroksinitrit ve tekil (singlet) oksijen gibi serbest radikallerin %60'ının süpürülmesinden sorumludur [34]. Ürik asid, geçiş metallerini bağlama özelliğine de sahiptir. Ayrıca proteinlerdeki tirozin rezidülerinin peroksinitrit tarafından nitratlamasını engellemekte, böylece hücresel enzimlerin inaktivasyonu ve hücre iskeletinde istenmeyen değişimleri engellemektedir [30,31]. Çok sayıda çalışmada nitrasyonun ürat tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir. Örneğin, kemirgenlerde endojen ürat artışı, kalbi peroksinitrit aracılı protein nitrasyonundan korumaktadır. Ürat (100 µM) sıçan embiriyolarında prenatal hipoksik hasar sonrasında nöronların canlı kalma oranını %20'den %80'e çıkarmıştır [36]. Ürik asid konsantrasyonundaki azalış, vücudun peroksinitrit ve diğer serbest radikallere karşı antioksidan kapasitesinde azalmaya neden olmaktadır. Antioksidan rolüne uygun olarak, Waring ve arkadaşları [33], ekzojen verilen ürik asidin oksidatif strese etkilerini göstermiştir. Sağlıklı gönüllülere intravenöz olarak verilen 1000 mg ürik asid, serumda serbest radikal süpürme kapasitesini, 1000 mg vitamin C'ye göre daha fazla arttırmaktadır [33]. Ürik asidin, atletlerde akut aerobik egzersiz ile ortaya çıkan oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir [34].

Hink ve arkadaşları, ürik asidin SOD3 yıkımını engellediğini göstermiştir [37]. SOD3; süperoksid anyonunu hidrojen peroksite dönüştüren hücre dışı bir enzim olup endotelial ve vasküler fonksiyonların düzenlenmesinde önem taşımaktadır. Normalde hidrojen peroksit bir feedback inhibisyon sonucu SOD3'ü inhibe etmektedir. Ürik asid, ürat radikale dönüşerek SOD3'ün rejenerasyonu sağlamakta ve hidrojen peroksit tarafından inaktive edilmesine engel olmaktadır. Oluşan ürat radikali de potansiyel bir prooksidan olmasına rağmen, klasik oksidanlara kıyasla çok daha düşük bir reaktiviteye sahiptir ve askorbat varlığında tekrar ürat formuna dönüşmektedir [37].

#### **2.5. Hiperürisemi ve Hastalıklarla İlişkisi**

Ürat özellikle antioksidan rolü nedeniyle büyük önem taşırsa da, genetik ve çevresel faktörlerden dolayı serum ürat konsantrasyonunun yükselmesi yani hiperürisemi, beraberinde bazı sorunları da getirmektedir. Hiperürisemi ile ilişkilendirilen hastalıkların başında gut ve böbrek taşı (nefrolitiazis) gelmektedir. Ayrıca hipertansiyon, vasküler hastalık ve böbrek yetmezliği gibi hastalıkların patogeneğinde serum ürik asid artışının rolünü gösteren bulgular vardır [1-6, 38].

### **2.5.1.Gut**

Gut, ürat ya da ürik asidin eklemelerde kristalizasyonu sonucu gelişen inflamatuvar bir artrittir. Fizyolojik sıvılardaki ürat konsantrasyonu arttıkça süpersatürasyon ve kristal oluşma riski de artmaktadır. Antihiperürisemik tedavinin tekrarlayan gut ataklarında %80'e varan azalmaya neden oluşu, serum ürik asid düzeyi ve gut arasındaki nedensel ilişkiyi desteklemektedir. Eklem sıvısında üratın eriyebilirliğini ısı, pH, katyonların konsantrasyonu, eklem dehidrasyonu gibi faktörlerin yanı sıra kollojen, kondroitin sülfat ve proteoglikan gibi kristal oluşumu için çekirdeklenme sağlayan ajanların varlığı da etkilemektedir. Bu faktörlerdeki çeşitlilik nedeniyle hiperürisemi hastalarının hepsinde gut riski aynı değildir [1,2,9,39].

### **2.5.2. Hipertansiyon**

Hiperürisemi genel popülasyonda hipertansiyonun habercisi olup, serum ürik asid konsantrasyonu ve hipertansiyon gelişimi arasındaki pozitif korelasyon gösterilmiştir [5,6].

Sıçanlarda yapılan çalışmalar, bir ürikaz inhibitörü olan oksonik asidin 3-5 hafta içerisinde, orta düzeyde hiperüriseminin yanı sıra kan basıncında da artışa neden olduğunu göstermiştir. Bu sıçanlarda zamanla renal mikrovasküler hastalık gelişmekte, afferent arterioller kalınlaşmakta ve bazen de hyalinozis gelişmektedir [40]. Araştırmacılar, ürik asid artışına bağlı hipertansiyona, böbrek makula densasında nNOS azalışı ve renin-angiotensin sistemindeki aktivasyonun aracılık ettiğini göstermiştir [5,6,40].

Ürik asidin damar düz kas hücrelerine etkileri çalışılmıştır. Molekülün düz kas hücresine girişini sağlayan spesifik taşıyıcılar tam olarak bilinmese de voltaja duyarlı ürat kanallarının ve organik anyon taşıyıcıları rolü olduğuna dair bulgular vardır [41,42]. Damar düz kas hücresine giren ürik asid, hücre proliferasyonuna neden olmaktadır. Ürik asidin bu etkisinde, MAP kinaz, COX-2, PDGF, MCP-1 ve CRP artışının aracı olduğunu gösteren çalışmalar vardır [40,42-44].

Ürik asidin endotel üzerindeki etkileri antiproliferatif yöndedir. Ayrıca endotelial NO salınımını inhibe ederek antioksidan özelliğine zıt bir etki ortaya koymaktadır [45,46]. Aort halkalarında yapılan bir çalışmada, asetilkolin aracılı gevşeme yanıtının, ürik asid varlığında doza bağlı olarak inhibe olduğu gösterilmiştir [47]. Hiperürisemik sıçanlarda düşük olan plazma nitrit konsantrasyonu, hiperüriseminin Allopurinol ile tedavi edilmesi sonucu normal düzeylerine yükselmiştir [45]. Ayrıca, hiperürisemik sıçanların böbrek makula densasında nNOS azalışı gösterilmiştir [48-51]. Ürik asidin endotel hücrelerinde l-arginaz enzimini de stimüle etmesi NO azaltıcı etkisiyle uyumludur [43]. İnsanlarda yapılan çalışmalar da, endotel hücresindeki fonksiyon kaybına ürik asidin etkisini doğrulamaktadır. İnsanda, plazma ürik asid seviyesindeki artış endotelial fonksiyon kaybı ve NO azalışı ile birlikte. Ürik asid seviyesini düşürmek, asemptomatik hiperürisemili, konjestif kalp yetmezlikli, diyabetli, hiperkolesterolemik hastalarda endotel fonksiyonlarını düzeltmektedir. Bu sonuçlar, ürik asidin endotelial NO seviyesini belirleyen güçlü bir regülatör olduğunu göstermektedir [43,52].

Kang ve arkadaşları [52] endotel hücresinde ürik asidin CRP ekspresyonunu arttırdığını göstermiştir. Araştırmacılar ürik aside bağlı NO azalışına CRP artışının aracılık ettiğini belirtmektedir. Sonuç olarak, ürik asid tarafından NO'nun inhibisyonu renal vazokonstriksiyon ve iskemik hasarın artmasını sağlayan bir mekanizma olarak görülmektedir.

### **2.5.3. Böbrek Taşı (Nefrolitiazis)**

Daha önce de belirtildiği gibi, üratın çözünebilirliği ürik asite göre daha fazladır. pK1 değeri olan 5,75'in altındaki pH değerlerinde daha az çözünür olan ürik asid formu hakimdir. İdrar pH'sının 5,75'in altında olması ve idrarda ürik asid konsantrasyonunun artması, üriner sistemde ürik asid kristallerinin oluşmasına neden olmaktadır. Bu şekilde oluşan ürik asid taşları üriner taşların %5-10'undan sorumludur. Ürik asid taşları, sadece ürik asitten veya kalsiyum ve ürat kombinasyonundan oluşmaktadır. İdrarla atılan ürat miktarının erkekler günlük 800 mg'dan, kadınlarda 750 mg'dan fazla olması üriner taşların oluşumuna neden olmaktadır. Kalsiyum taşı olan hastaların yaklaşık %15-20'sinde aynı zamanda hiperürikozüri de vardır. Ancak serum ve idrar ürik asid düzeyleri normal olan bireylerde de ürik asid taşları oluşabilmektedir [53,54].

### **2.5.4. Böbrek Yetmezliği**

Gut hastalarının çoğunda hafif veya orta düzeyde böbrek fonksiyon kaybının gelişmesi ürik asid düzeyi ve böbrek hastalıkları arasında muhtemel bir bağlantıya işaret etmektedir. Deneysel hiperürisemik sıçanlarda, orta düzeyde renal hastalık gelişimi gösterilmiştir. Bu hayvanlarda hafif proteinüri, renal arterioler değişimler, glomerüler hipertrofi, tübülointerstisyel fibrozis ve glomerülosklerozis görülmektedir [3-5,40,51]. Hiperürisemiden önce sıçanlarda bir böbrek hastalığının olması, renal lezyonlarda artışa neden olmaktadır. Sonuç olarak hiperürisemi renal hastalıkları indüklediği gibi hastalığın ilerlemesine de katkıda bulunmaktadır. Ürik asid renin-angiotensin sisteminin aktivasyonunu sağlayarak böbrek hastalığının kötüleşmesine neden olmaktadır. Renin-angiotensin sistemi; hem sistemik ve glomerüler basınç artışına hem de renal ve vasküler hücrelerin fibrozisine yol açarak renal hastalığın ilerlemesine katkıda bulunmaktadır [3-5,40,44,48,53].

### **2.5.5. Akut Böbrek Yetmezliği**

Akut ürat nefropatisi akut böbrek yetmezliğinin tiplerinden birisidir. Genellikle tümör lizis sendromunun bir komplikasyonu olarak görülse de rabdomyolizisde ve başka durumlarda da görülmektedir. Ürik aside bağlı akut böbrek yetmezliğinde renal vazokonstriksiyona bağlı tübüler hasar önemli rol oynamaktadır [54]. Deneysel hiperürisemili sıçanlarda renal vazokonstriksiyon gösterilmiştir. Bu sıçanlarda, afferent arteriol direncindeki büyük artışa rağmen efferent arteriolde daha küçük bir direnç artışı olmakta ve buna tek nefron GFR'sindeki azalış eşlik etmektedir. Ürik asid seviyesinin allopurinol tedavisiyle düşürülmesi renal vasküler direncin normale dönmesini sağlamaktadır [49,50]. Renal kan akımında ürik aside bağlı azalış L-arginin varlığında düzeldiğinden, araştırmacılar bu etkinin nitrik oksid kaybından kaynaklandığını belirtmektedir. Bu bulgu üratın endotelde NO salınımını azaltıcı etkisiyle uyumludur [54,49-51].

Deneysel hiperüriseminin en önemli sonuçlarından birisi de preglomerüler arteriol hastalığının gelişmesi ve buna bağlı olarak da böbrek otheregülatör cevabın zayıflamasıdır [4,48,50,51]. Arteriopatı ürik asidin doğrudan etki ederek damar düz kas hücre proliferasyonunu stimüle etmesi, dolaylı olarak da renin angiotensin sistemini aktive etmesi ve endotelial NO azalışı yapmasıyla gelişmektedir [3,5].

Ürik asidin vazokonstriktif, proinflamatuvar, pro-oksidatif ve antiangiojenik özelliklerine ve bu özellikleriyle akut böbrek yetmezliği gelişimine katkıda bulunmasına rağmen, yukarıda da belirtildiği gibi ürik asid aynı zamanda antioksidandır ve insan plazmasında en bol bulunan antioksidan olarak kabul edilmektedir. Ürik asidin antioksidan ve NO koruyucu özelliği ile hiperürisemide veya yüksek ürik asid konsantrasyonlarında endotelial NO'nun azaldığı bulgusu birbirine zıttır. Araştırmacılar şiddetli oksidatif stres koşullarında ürik asidin bir miktar antioksidan yarar sağlasa da, serum ürik asid düzeyinde meydana gelen uzun süreli ve büyük artışların (> 7 mg/dl) yararlı olmadığını düşünmektedir [49].

### **2.5.6. Serum Ürik Asid Seviyesini Düşüren Yaklaşımlar**

Ürik asidin gut oluşması ve gelişimindeki rolünün yanı sıra, hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıklar ve renal hastalıklara olan potansiyel katkısı nedeniyle insanlarda serum ürik asid konsantrasyonunu düşürmek üzere çeşitli tedavi stratejileri geliştirilmiştir. Başlangıç olarak, hiperüriseminin çoğu sebebi düzeltilebilir olduğundan, diyetel ve yaşam tarzı değişiklikleri önerilmektedir. Bunların arasında protein ve alkol tüketiminde azalış ve obezitenin azaltılması gelmektedir.

Kronik hiperüriseminin tedavisinde kullanılan 2 tip ilaç vardır. Bunlardan ksantin oksidaz inhibitörleri, endojen urat üretimi artmış olan hastalarda kullanılmaktadır. Bir ksantin oksidaz inhibitörü olan allopurinol, ürik asid sentezini son 2 basamağında bloke etmektedir. Allopurinol ile tedavi sonucunda, plazmada urat konsantrasyonu azalırken, urat sentezinde öncül moleküller olan ksantin ve hipoksantin miktarı artmaktadır [20-23]. Hastada hiperüriseminin nedeni üriner urat itrahındaki azalış ise ürikozürük ilaçlar örneğin probenesid, sülfipirazon ve benzbromaron kullanılmaktadır. Bu ilaçlar, tübüler urat geri emilimden sorumlu taşıyıcı olan URAT1'i inhibe etmekte ve bu şekilde idrar ile uzaklaştırılan urat miktarını arttırarak serum ürik asid konsantrasyonunu normale getirmektedir [2].

### **2.6. Ürat Azalışı ve Hastalıklar**

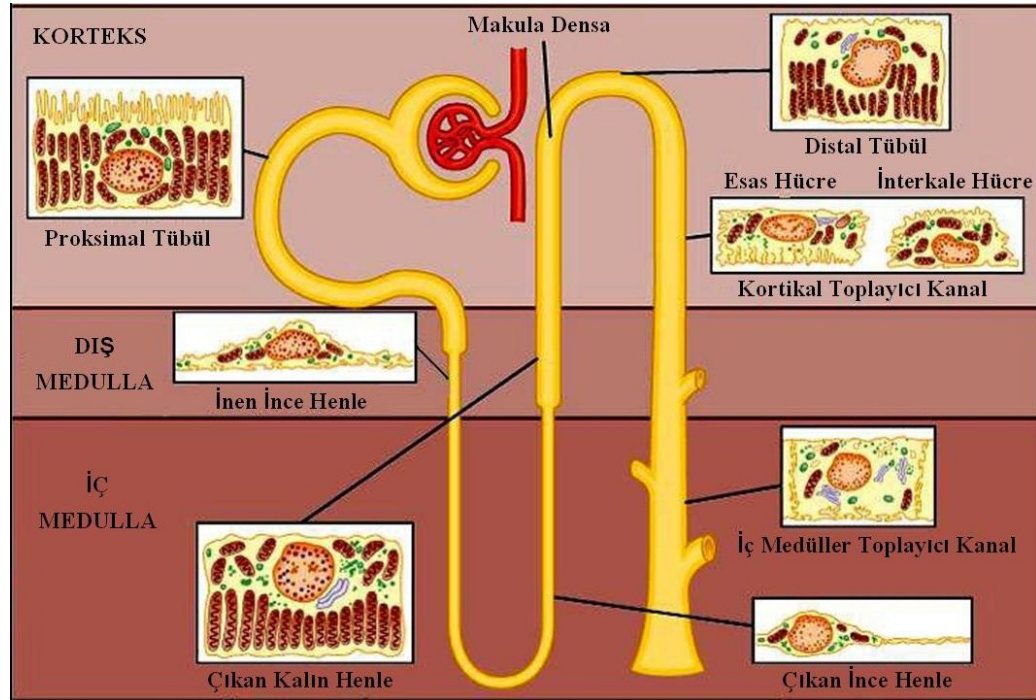
Serum ürik asid seviyesinin normal konsantrasyonların altında olması multiple skleroz, optik nörit, Parkinson ve Alzheimer gibi hastalıklar ile ilişkilidir. Düşük ürik asid seviyesi ve kan beyin bariyeri disfonksiyonu arasındaki korelasyon gösterilmiştir [55]. Özellikle multiple skleroz tedavisinde ekzojen ürik asidin kullanılabileceğine dair çalışmalar vardır. Multiple skleroz modeli olarak kullanılan deneysel alerjik ensefalitli farelerde, urat uygulanması hastalığın şiddetini azaltmaktadır. Hastalığın başlangıcından önce urat verilmesi kan beyin bariyerinden geçen makrofaj ve diğer inflamatuvar hücre sayısında azalmasına neden olmaktadır [7,56,57]. Ayrıca, yine multiple skleroz hastalarında, ürik asid prekürsörü olan inozin tedavisinin hastalığın ilerlemesini durdurduğu gösterilmiştir [58,59].

Parkinson çalışmaları için kullanılan hayvan modellerinde, ürik asid uygulamasının oksidatif stresi azalttığı ve hücre ölümüne karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir [60].

## 2.7. Böbrekler

Böbrekler vücut iç dengesinin korunmasında hayati öneme sahip organlardır. Sekresyon ve geri emilim fonksiyonları sayesinde böbrekler; kan basıncının ve kan hacminin düzenlenmesi, plazma elektrolit konsantrasyonunun sabit tutulması, metabolik atıkların ve vücut için zararlı bileşiklerin uzaklaştırılması ve asit baz dengesinin korunması gibi vücut için elzem işlevlerin yerine getirilmesini sağlamaktadır. Aynı zamanda endokrin bir organ olarak da tanımlanabilen böbreklerde eritropoietin, renin, kalsitriol, endotelin-1, prostaglandin E2 ve F2 $\alpha$  ile nitrik oksid gibi hormonların sentezi de gerçekleşmektedir [61]. Tüm bunların yanı sıra böbrekler glukoneogenez fonksiyonları ile metabolizmanın düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır. Böbreklerin glukoneogenez fonksiyonu özellikle ileri açlık durumlarında ön plana çıkmaktadır [62].

Böbreğin en küçük fonksiyonel birimi olan nefron vasküler ve tübüler yapılardan oluşmaktadır (Şekil 2.3). Nefronun vasküler kısmı olan glomerüler kapiller ağ, yüksek permeabilitesi ve hidrostatik basıncı ile diğer kapiller yataklardan ayrılmaktadır. Glomerüler kapillerlerden filtre olan sıvı, glomerüler yapıyı saran Bowman kapsülü içine geçmekte ve sonra nefronun tübüler kısmı içinde ilerlemektedir [61].



Şekil 2.3. Nefronun genel yapısı [61]



Glomerüler kapillerlerden geçerek bowman kapsülü içine geçen ve oradan tübüler yapılar boyunca ilerleyen ultrafiltratın içeriğini filtrasyon bariyerinin özellikleri belirlemektedir. Plazmadaki çapı 8 nm'den büyük moleküllerin hiçbiri filtrasyon bariyerini geçemezken, çapı 4 nm'dan küçük suda eriyebilen tüm moleküller bu bariyeri geçerek ultrafiltrasyona uğramaktadır. Çapı 4 ile 8 nm arasında olan moleküller ise yükleri ile ilişkili olarak filtrasyona uğramaktadırlar. Bowman kapsülüne giren ultrafiltratın bileşimi, nefronun tübüler segmentleri olan proksimal tübül, inen Henle, çıkan Henle, distal tübül ve toplayıcı tübül segmentlerinde geri emilim ve sekresyon yoluyla değişmekte ve en sonunda idrar oluşmaktadır [61].

## **2.8. Proksimal Tübül**

Nefronun geri emilim ve sekresyon açısından en önemli tübüler segmenti proksimal tübüldür. Bowman kapsülünden hemen sonra başlayan bu tübüler yapı, korteks medulla sınırına kadar ilerlemekte ve medullada inen ince henle olarak devam etmektedir. Proksimal tübül S1, S2 ve S3 olarak adlandırılmış ve fonksiyonel olarak küçük farklılıklar gösteren 3 alt segmentten oluşmaktadır. Tübül lümeni, fırçasmsı apikal membranı ve bol mitokondri içeriği ile karakterize epitel hücreleri ile astarlanmıştır. Epitel hücre tabakasındaki hücreler lüminal taraflarındaki sıkı bağlantı bölgeleri ile birbirine bağlanmış olsa da, elektriksel direncin çok düşük olması nedeniyle bu bölgelerin geçirgenliği oldukça yüksektir. Ayrıca, epitel hücrelerinin apikal ve bazolateral membranında bulunan çok sayıda taşıyıcı protein, kanal proteini ve pompa proksimal tübülde geri emilim ve sekresyona aracılık etmektedir. Hücreler arası sıkı bağlantı bölgelerinden veya transselüler yoldan geri emilen su ve solütler, proksimal tübülü çevreleyen peritübüler kapillerler sistem aracılığı ile kana verilmektedir [61].

Proksimal tübül fonksiyonlarını metabolik, geri emilim ve sekresyon olmak üzere 3 başlıkta toplamak mümkündür.

### **2.8.1. Proksimal Tübülün Metabolik Fonksiyonları**

Vücutta yeterli glukoneojenik enzim aktivitesinin ve glukoz-6-fosfataz aktivitesinin olduğu, yani glukoneogenez yoluyla dolaşıma glukoz desteği sağlayabilen dokular sadece karaciğer ve böbreklerdir. Normal postabsorptif koşullarda ve kısa süreli açlıkta glukoneogenezin gerçekleştiği tek doku karaciğerdir. Ancak, uzun süreli açlık ve asidoz koşullarında böbrek dokusu önemli bir glukoz kaynağı haline gelmektedir. Proksimal tübül hücrelerinde gerçekleşen renal glukoneogenez için kullanılan en önemli substratlar arasında laktat, glutamin ve glisin bulunmaktadır [62].

Proksimal tübülün bir diğer metabolik fonksiyonu glutaminden amonyak üretimidir. Proksimal tübül hücresinde glutaminin hücre dışı ve mitokondriyel olarak deaminasyonu sonucu amonyak üretilmektedir. Glutaminin iki molekül amonyaka tamamen oksidasyonu sonucu iki molekül de bikarbonat iyonu açığa çıkmaktadır. Bazolateral taşıyıcılar ile kana verilen bikarbonat iyonu vücut sıvılarının tamponlanmasına aracılık ettiğinden, proksimal tübülün "amonyagenez" olarak tanımlanan bu fonksiyonu asidozda büyük önem kazanmaktadır. Vücutta rezerv

alkalinin azaldığı asidoz durumunda proksimal tübülde amonyagenez artmaktadır [63,64].

### **2.8.2. Proksimal Tübülde Geri Emilim**

Proksimal tübül geri emilim fonksiyonunda, tübül epitel hücrelerinin bazolateral membranda bulunun  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz pompasının önemi büyüktür. Bu pompanın oluşturduğu hücre içi ve lüminal sıvı arasındaki sodyum gradienti çok sayıda molekülün geri emilimi için sürücü kuvveti oluşturmaktadır. Epitel hücresi içine doğru olan sodyum gradienti apikal membranda bulunan ve sodyum ile eşleşmiş taşıyıcılar üzerinden sekonder aktif olarak glukoz, amino asid, sülfat ve fosfat gibi moleküllerin geri emilimine aracılık etmektedir. Sodyum ile eşleşmiş transportlar arasında Na-glukoz (SGLUT'lar), Na-aa, Na-monokarboksilat, Na-dikarboksilat, Na-sülfat ve Na-fosfat eştaşıyıcıları bulunmaktadır [61].

Ultrafiltrata geçen sodyumun yaklaşık %70'i proksimal tübüllerden geri emilmektedir. Bikarbonat ve klor anyonlarının sodyumu takiben geri emilmesi elektriksel nötralizasyon sağlamaktadır. Proksimal tübülün suya geçirgen yapısı, geri emilen elektrolitlere, ozmotik gradient doğrultusunda suyun da eşlik etmesine ve geri emilmesine izin vermektedir [61].

Proksimal tübül, ultrafiltrata geçen glukoz, amino asid ve kaçak proteinlerin nefron boyunca geri emildiği tek tübül segmenti olması nedeniyle önem taşımaktadır. Bu moleküllerin proksimal tübülde geri emilememesi veya geri emilim eşliğinin aşılması idrarda görülmelerine neden olmaktadır [61].

### **2.8.3. Proksimal Tübülde Sekresyon**

Hidrojen ve amonyum iyonunun yanı sıra organik katyon ve organik anyon sınıfına giren çok sayıda molekülün ultrafiltrat içine salgılandığı yer proksimal tübüllerdir. Proksimal tübüller, sekresyon fonksiyonu aracılığı ile başta vücut asid baz dengesinin sağlanması olmak üzere, içinde toksik etkileri de olan çok sayıda organik katyon ve anyonun vücuttan uzaklaştırılmasını sağlamaktadır.

### **2.8.4. Hidrojen Sekresyonu**

Proksimal tübülde sekrete edilen hidrojen iyonu vücut asid-baz dengesinin sağlanmasında rol oynamaktadır. Karbonik asidin iyonlarına ayrılmasıyla epitel hücresi içinde oluşan hidrojen iyonu, apikal membranda bulunan  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  eş-değiştiricisi (NHE) aracılı sekonder aktif transport ile lümene verilmektedir. Karbonik asidin iyonlarına ayrılmasıyla oluşan bikarbonat iyonu da bazolateral membrandan  $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{K}^+-\text{HCO}_3^-$  eş taşıyıcıları ve  $\text{Cl}^+-\text{HCO}_3^-$  eş-değiştiricisi aracılı kana geçmekte ve böylece asidozun kontrolünü sağlamaktadır. Hidrojen sekresyonunda anahtar proteinlerden birisi olan NHE'nin NHE1, NHE2 ve NHE3 olmak üzere 3 izoformu vardır. Bunlardan NHE3, proksimal tübülde en fazla bulunan izoformudur [65]. Tübüler hidrojen sekresyonuna  $\text{H}^+$ -ATPaz'ların katkısı da gösterilmiştir [66]. NHE3'ün yanı sıra bikarbonat emiliminde görevli taşıyıcılardan birisi olan  $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$  eş taşıyıcı aktivitesi vücut asid-baz dengesindeki değişimlerden benzer şekilde etkilenmekte ve asidozda daha fazla hidrojen sekresyonu ve bikarbonat emilimine aracılık ederek homeostazisin sağlanmasına aracılık etmektedirler. Tübül lümeninde bulunan bikarbonat iyonu, amonyak, dibazik

fosfat ve sülfatlar, lümene salınan hidrojen iyonunun titrasyonunda ve lüminal pH'nın düzenlenmesinde rol oynamaktadır [61].

### **2.8.5. Organik Katyon Sekresyonu**

Proksimal tübül renal organik katyon sekresyonunun gerçekleştiği esas nefron segmentidir. Organik katyonlar fizyolojik pH'da net pozitif yükü olan heterojen yapıdaki bileşikler olup, moleküler ağırlıklarına göre tip I ve tip II olarak sınıflandırılırlar. Tip I organik katyonlar tetraetilamonyum, tributilmetilamonyum ve prosinamid etobromid gibi nispeten küçük (<400 mol wt) monovalent bileşiklerdir. Tip II organik katyonlar ise d-tubocurarine, vercuronium ve hexafluorenium gibi daha büyük (>500 mol wt) ve polivalent bileşiklerdir. Aktif olarak sekrete edilen endojen organik katyonlar arasında kolin, epinefrin ve dopamin sayılabilir. Ancak bu yolak daha çok alkaloidlerin, diyet orijinli heterosiklik bileşiklerin, tedavi veya destek amaçlı alınan katyonik ilaçların veya nikotin gibi katyonik çevresel toksinlerin vücuttan uzaklaştırıldığı bir mekanizmadır [67,68].

Organik katyon sekresyonu basitçe, peritübüler kapillerlerdeki organik katyonların proksimal tübül epitel hücresine bazolateral taraftan girişi ve apikal membran tarafından lümene geçişi şeklinde olmaktadır. Tip I organik katyonların bazolateralden girişi kolaylaştırılmış difüzyonla veya elektronötral antiport yoluyla gerçekleşmektedir. Hücre içine doğru olan negatif potansiyel fark organik katyonların proksimal hücrelerinde kana oranla 10-15 kat daha yüksek konsantrasyonda olmasını sağlamaktadır. Proksimal tübül epitel hücresine girişe aracılık eden taşıyıcı proteinler organik katyon taşıyıcısı (OCT) 1, 2 ve 3'tür. Tip I organik katyonların lüminal membrandan çıkışı, taşıyıcı aracılı hidrojen iyonu ile yer değiştirmesi şeklinde olmaktadır. Bu değişime aracılık eden proteinler organik katyon/karnitin taşıyıcısı (OCNT)-1 ve 2'dir. Organik katyon/hidrojen değişimi translüminal hidrojen iyon gradientine bağlı olarak, organik katyonların hücreden ayrılıp lüminde birikmesini ve net transepitelial sekresyonunu sağlamaktadır. Sekresyon lüminal hidrojen konsantrasyonunda dolayısı ile hidrojen sekresyonunda görev alan NHE3 ve H<sup>+</sup>-ATPaz'a bağlıdır [67].

Tip I organik katyonların aksine tip II organik katyonların proksimal tübül hücresine girişi difüzyon ile olmaktadır. Bu tip organik katyonların epitel hücresinden çıkışı apikal membranda yerleşmiş olan MDR1 (multidrug resistance transporter) aracılı olmaktadır [67,68].

### **2.8.6. Organik Anyon Sekresyonu**

Organik katyonlarda olduğu gibi, organik anyonların da renal sekresyonu primer olarak proksimal tübüllerde gerçekleşmektedir. Organik anyonlar; kimyasal olarak heterojen yapıda olan ve fizyolojik pH'da net negatif yüke sahip olan substratlardır. Nispeten küçük (400-500 kDa'dan küçük) ve hidrofilik yapıdaki organik anyonlar, örneğin PAH, urat, cAMP, cGMP Tip I organik anyonlar olarak tanımlanmaktadır. Safra asitleri ve glukronid konjugatlar gibi daha büyük (400-500 kDa'dan büyük) ve hidrofobik yapıda olan organik anyonlar ise Tip II organik anyonlar olarak adlandırılmaktadır. Ekzojen ve endojen metabolitlerin yanı sıra ilaçlar, bitkisel ve hayvansal toksinler dahil çok sayıda molekül organik anyon tanımına uymaktadır. Tip I organik anyonlar tercihen böbrekler aracılığı ile

uzaklaştırılırken, Tip II'ler karaciğer üzerinden safra yoluyla vücuttan atılmaktadır [67-70].

Organik anyonların sekresyonu, organik katyonlara benzer şekilde peritübüler kapillerlerden epitel hücrelerine giriş ve ardından apikal membrandan lümeneye sekresyon olmak üzere iki basamakta gerçekleşmektedir. Peritübüler organik anyonun epitel hücrelerine girişi sekresyonda hız kısıtlayıcı basamak olup, üçüncül aktif transportla gerçekleşmektedir. Bu basamakta, bazolateral membranda bulunan organik anyon taşıyıcıları (OAT) rol oynamaktadır. OAT1, OAT2 ve OAT3 olarak adlandırılan bu taşıyıcılar, organik anyonların intraselüler metabolizma sonucu oluşan  $\alpha$ -ketoglutarat ile yer değiştirmesini sağlamaktadır. Organik anyonla yer değiştirip hücre dışına çıkan  $\alpha$ -ketoglutaratın tekrar hücreye alınışı ve hücre içi konsantrasyonunun yüksek tutulması ise  $\text{Na}^+$ -dikarboksilat kotransporter (NaDC) tarafından sekonder aktif transport ile sağlamaktadır [67,68].

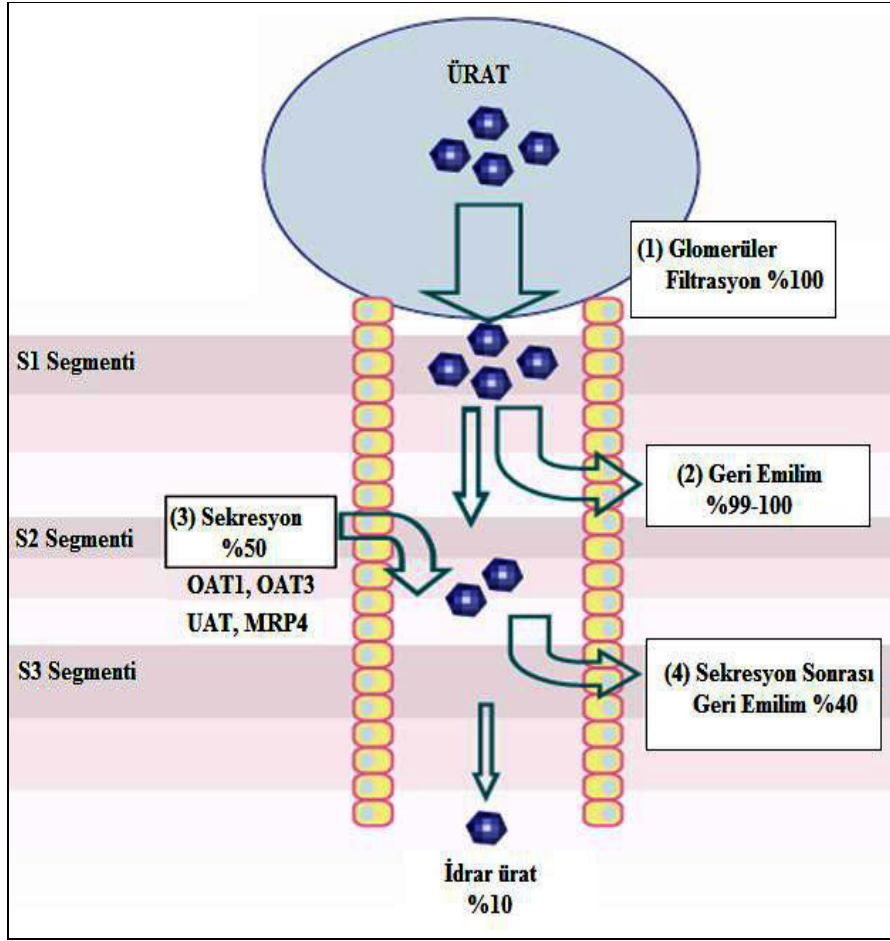
Apikal membranda organik anyon transportu hakkında bilinenler daha az olmakla birlikte, taşıyıcı aracılı anyon eşdeğişimi ve elektrojenik kolaylaştırılmış difüzyon mekanizmaları aracılı sekresyonun gerçekleştiği bildirilmektedir. Organik anyonların lümeneye geçişine aracılık eden taşıyıcılar arasında MRP2, OAT4, OATV1, OAT-K1, OAT-K2 sayılabilir [67].

Bu çalışmanın araştırma konusu olan ürat da bir organik anyondur. İlerleyen paragraflarda üratın renal transport mekanizması ve transportuna katılan taşıyıcı proteinler hakkında detaylı bilgi sunulmuştur.

## **2.9. Renal Ürat Transportu**

Tipik bir organik anyon olan üratın proksimal tübüldeki transportu renal fizyolojide organik anyon transportunun en önemli konularından birisidir. Serum ürat konsantrasyonu esas olarak renal proksimal tübül hücreleri tarafından düzenlenmektedir. Proksimal tübülde ürat geri emilim veya sekresyonunu etkileyen faktörler doğrudan serum ürat konsantrasyonunun da değişmesine neden olmaktadır [9,10,53].

Dolaşımda bulunan üratın %5'den az bir kısmı proteinlere bağlı olduğundan, ürat renal glomeruler filtrasyon bariyerinden kolayca geçmektedir. Ultrafiltrattaki ürat konsantrasyonu plazma ile yaklaşık aynıdır ve bunun hemen hepsi geri emilir, atılan kısım filtre olanın yaklaşık %5-10'luk bir kısmıdır [53,71].



Şekil 2.4. Renal ürat transportunu açıklayan 4 bileşenli model [72]

Renal ürat transportu 4 basamaktan oluşan bir modelle açıklanmaktadır (Şekil 2.4) [9,10]:

**1. Basamak; Glomerüler Filtrasyon:** Glomerüler kapillerlerden geçen kanda bulunan üratın hemen hepsi filtrasyon bariyerinden geçerek proksimal tübüle ulaşmaktadır.

**2. Basamak; Geri Emilim:** Ultrafiltratta bulunan üratın yaklaşık %99'u proksimal tübülün S1 segmentinden geri emilmektedir.

**3. Basamak; Sekresyon:** S1 segmentinde geri emilen üratın yaklaşık %50'si S2 segmentinde tübül lümenine sekrete edilmektedir.

**4. Basamak; Sekresyon Sonrası Geri Emilim:** S3 segmenti salgılanan üratın yeniden geri emildiği düz proksimal tübül segmentidir. Yaklaşık %40 oranında

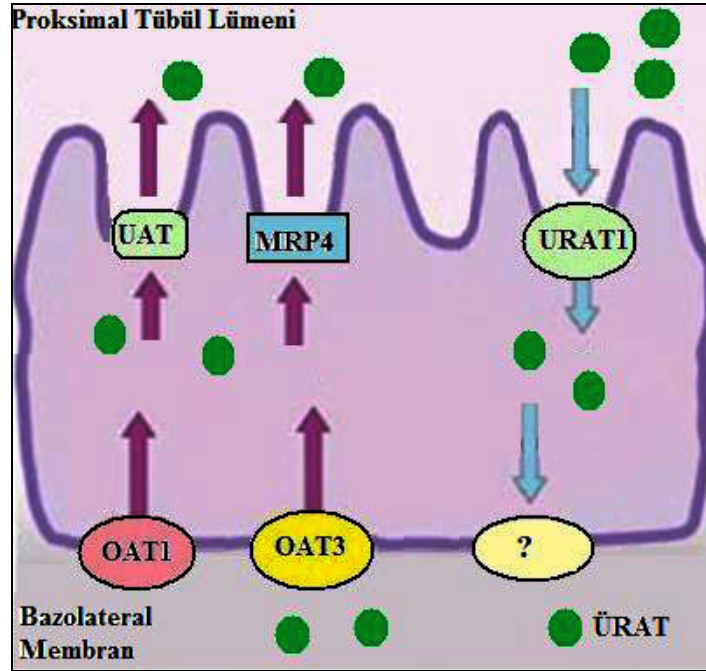
geri emilim gerçekleşir. Sonuçta tamamı filtre edilen üratın sadece %5-10'luk bir kısmı idrarla atılmaktadır [9,10,53,72].

Proksimal tübülde üratın geri emilim ve sekresyonundan sorumlu taşıyıcıların çoğu organik anyon taşıyıcısı ailesine ait proteinlerdir. Ürat taşıyıcısı-1 (URAT1), organik anyon taşıyıcıları OAT1, OAT3, OAT4, UAT (urate transporter/channel) ve ATP-bağımlı kaset taşıyıcılarından MRP4 (Multidrug Resistance Protein 4) transepitelial ürat transportuna aracılık eden taşıyıcılarıdır (Şekil 2.4 ve 2.5) [9,10,53,72].

### 2.9.1. Ürat Geri Emilimi

Ultrafiltrata geçen üratın, %99'unun S1 segmentinde epitel hücresi içine alınması yani geri emilimi, esas olarak URAT1 aracılı olmaktadır (Şekil 2.4 ve 2.5).

**URAT1:** Bir ürat/anyon eşdeğiştiricisi olan URAT1 proksimal tübül hücrelerinin apikal membranında lokalize olmuştur. 12 adet transmembran domaini olan proteinin 1. ve 2. transmembran domaininde N-glikozilasyon bölgeleri, 6. ve 7. transmembran domainlerinin hücre içi tarafında PKC ve PKA fosforilasyon bölgeleri bulunmaktadır [73,74]. Yapısında bulunan PDZ domaini, taşıyıcı aktivitesinin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır [75]. Western blot analizleri URAT1 molekül ağırlığının insanda 57 kDa ve farede 62-70 kDa olduğunu göstermektedir [73,74,76,77].



Şekil 2.5. Proksimal tübülde ürat geri emilimi ve sekresyonunda görevli taşıyıcıların lokalizasyonu

URAT1, ultrafiltratta bulunan üratı tübül epitel hücresi içine alırken aynı zamanda, elektriksel dengeyi sağlamak üzere tübül lümenine bir anyon geçişini sağlamaktadır. Bu değişimde lüminal ürata karşılık, hücre içi laktat, nikotinat, asetoasetat, hidroksibütirat, hidroksil, bikarbonat ve klor gibi monovalan anyonlar kullanılmaktadır [1,9,11].

URAT1 ekspresyonu böbrekte proksimal tübül apikal membranı ile kısıtlıdır. Ancak, son yapılan bir çalışmada insanda damar düz kas hücresinde de URAT1 mRNA ve protein ekspresyonu olduğu gösterilmiştir [41].

URAT1'in ekspresyonu cinsiyetler arasında farklılık göstermektedir. Farelerde yapılan çalışmalar, erkeklerde URAT1 ekspresyonunun dişidekinden fazla olduğunu göstermiştir [67]. hURAT1 gen promoter bölgesinde yapılan çalışmalarda ise promoter aktivitesinin testosteron aracılı arttığı bildirilmiştir [78]. Erkeklerde URAT1 ekspresyonunun fazla olması serum ürat konsantrasyonunun dişilerden yüksek olması ile uyumludur.

İnsanlarda, renal ürat tutulumu ve serum ürat konsantrasyonunun regülasyonunda URAT1'in önemi idiyopatik renal hipourisemili hastalarda çarpıcı bir şekilde görülmektedir [79]. İdiyopatik renal hipourisemi, görülme sıklığı %0.12 olan ürik aside özgü, defektif renal transport hastalığıdır. URAT1'in geni olan SLC22A12'deki bir mutasyondan kaynaklanmaktadır. Tübüler ürat geri emiliminin olmadığı bu hastalık, serum ürat seviyesinin düşük olması (genellikle 2 mg/dl'nin altındadır), egzersiz ile indüklenen akut böbrek yetmezliği ve kronik renal disfonksiyon ile karakterizedir. Japon herediter renal hipourisemili hastaların %80-90'ında hURAT1 genindeki mutasyonlar gösterilmiştir [80]. Diğer yandan, hiperurisemi ve gut hastalarında URAT1'de tek nükleotid polimorfizmi ve çerçeve kayması mutasyonu gösterilmiştir. Bu genetik korelasyonlar URAT1'in ürat homeostazisindeki önemini göstermektedir. Nonselektif proksimal tübül fonksiyon kaybının olduğu Fanconi sendromunda, glukoz, amino asid ve elektrolit geri emilimindeki azalmanın yanı sıra ürik asid geri emilimi de bozulmakta ve hipourisemi gelişmektedir [81].

URAT1 böbrekte ürat transportunun yalnızca bir aşamasından sorumludur. Üratın bazolateral membrandan kana geçiş yolu hala kesin olarak bilinmemektedir. Ancak voltaja duyarlı ürat taşıyıcıları ile hücreden çıktığı belirtilmektedir [53,72].

### 2.9.2. Ürat Sekresyonu

Ürat sekresyonu diğer organik anyonlarda olduğu gibi kandan epitel hücresine giriş ve apikal membrandan lümenine çıkış olmak üzere iki aşamada gerçekleşmektedir. Üratın bazolateral ve apikal membrandan geçişine aracılık eden farklı taşıyıcı proteinler vardır (Şekil 2.4 ve 2.5).

**A. Üratın bazolateral membrandan geçişi:** Peritübüler kapillerlerdeki üratın, S2 segmentinde epitel hücresine geçişi esas olarak OAT1 ve OAT3 aracılı olmaktadır.

**OAT1:** 550 amino asitli transmembran bir protein olan OAT1, URAT1'e benzer şekilde 12 adet transmembran domainine sahiptir. 1. ve 2. transmembran domainleri

arasındaki büyük ekstraselüler lup bölgesinde, türe bağlı olarak değişen 3-6 adet potansiyel N-glikozilasyon bölgesi saptanmıştır. 6. ve 7. transmembran domainler arasında ve karboksil terminalinde PKC, PKA, kazein kinaz II ve tirozin kinaz için potansiyel fosforilasyon bölgeleri bulunmaktadır. OAT1'in moleküler ağırlığı, insanda glikozilasyon durumuna bağlı olarak 60-90 kDa arasında değişmektedir. Diğer türlerde de moleküler ağırlığı benzer sınırlar içindedir. Sıçanda 57-77 kDa, farede 70-75 kDa düzeyindedir [67,82,83].

OAT1'in ekspresyonu daha çok böbrekte ve çok az oranda beyinde koroid pleksusta ve plasentada gösterilmiştir. Böbrekte proksimal tübülün bazolateral membranında lokalize olan OAT1'in ekspresyonu, S2 segmentinde diğer segmentlere kıyasla çok daha fazladır [67].

OAT1 bir organik anyon/dikarboksilat eşdeğiştiricisidir. Organik anyonların, hücre içinde metabolizma sonucu oluşan  $\alpha$ -ketoglutarat ile yer değiştirerek hücre içine alınmasını sağlamaktadır. OAT1, PAH gibi moleküler ağırlığı küçük olan hidrofilik organik anyonlar için daha yüksek afinite göstermektedir. OAT3 ile kıyaslandığında, OAT1'in PAH'a olan afinitesi OAT3'ten 5-10 kat fazladır [12]. OAT1'in PAH dışında, dikarboksilat, siklik nükleotidler, prostoglandinler ( $PGE_2$ ,  $PGF_{2\alpha}$ ), ürat, beta-laktamaz antibiyotikleri, ACE inhibitörleri, folat ve metotroksat gibi antineoplastikler ve çevresel bileşiklerin de içinde olduğu yüzden fazla substratı vardır [67-69,84,85].

İnsanda OAT1 aracılı ürat transportu benzbromaron, probenesid, salisilat ve PZA gibi ürikozürük ve antiürikozürük ajanlar tarafından inhibe edilmektedir. Anti-inflamatuar ilaçlar, antibiyotikler, kemoterapik ilaçlar, antiviral ilaçlar, vitaminler, antihipertansif ilaçlar, üremik toksinler, mikotoksinler, ağır metaller, DMPS (2,3-dimercapto-1-propane sulfonic acid) ve onun okside formunun da içinde olduğu organik anyonlar OAT1 aracılı transportu azaltmakta ya da inhibe etmektedirler [67-69,86].

**OAT 3:** Sıçan böbreğinden elde edilen OAT3 cDNA'sı 536 aa'lık bir protein kodlamaktadır. Fare, tavşan ve insan böbreğinde de varlığı gösterilen OAT3, böbrekler dışında karaciğer ve beyinde de eksprese edilmektedir. İnsan ve sıçanlarda proksimal tübüllerin S1, S2 ve S3 segmentlerinde bazolateral membranda lokalize olduğu gösterilmiştir. Sıçan böbreğinde ayrıca çıkan kalın henlede, distal tübülde, kortikal ve medüller toplayıcı tübüllerde bazolateral olarak eksprese edilmektedir [67-69,82].

OAT1 gibi organik anyon-dikarboksilat eşdeğiştiricisi olan OAT3, yine OAT1'e benzer olarak geniş bir substrat seçiciliğine sahiptir. Substratları arasında  $PGE_2$ , esteron sülfat, dikarboksilat, okratoksin A, metotroksat ve PAH bulunmaktadır. OAT3, OAT1'e göre daha geniş bir substrat seçiciliğine sahiptir. OAT1 küçük hidrofilik organik anyonlar için yüksek afinite gösterirken OAT3 amfipatik organik anyonları ve bazı organik katyonları da taşımaktadır. OAT1'e göre substrat seçiciliğinin daha geniş olması ve renal ekspresyonunun daha fazla olması nedeniyle OAT3 insanda renal organik anyon transportunda daha belirgin bir role sahiptir [67-69,87].



OAT1 ve OAT3 için birkaç polimorfizm tanımlanmıştır ve bunlardan bazıları in vitro koşullarda bazı substratlar için transport fonksiyonunun tamamen kaybedilmesine neden olmaktadır. Bu polimorfizmlerin bireylerde herhangi bir sağlık problemine neden olmaması, substrat seçiciliği çakışan diğer renal taşıyıcılar tarafından eksikliğin kompanse edildiğini göstermektedir. Ancak bu polimorfizmler ilaç kinetiğinde değişimlere yol açabildiğinden herhangi bir ilaç tedavisinde farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Bu durum OAT1 ve OAT3-knockout farelerde de görülmektedir. OAT1 knockout farelerde organik anyon transportunda önemli bir azalış vardır. Bu farelerde PAH tutulumu görülür ve furosemide verilen cevap azalmıştır. OAT3 kaybı, renal dilimlerde taurukolat ve esteron sülfat alımını azaltmaktadır. Yine de, her iki knockout hayvanlar sağlıklıdır ve herhangi bir major organ anormalliği veya toksisite gösterilmemiştir [85,88,89].

OAT1 ve OAT3 ekspresyonunun cinsiyet hormonları tarafından regüle edildiğine dair bulgular vardır [90-92]. Buist ve arkadaşları farelerde ve sıçanlarda OAT1 ve OAT3 mRNA ekspresyonlarının her iki cinste aynı olmadığını göstermişlerdir [93,94]. Böbrekte OAT1 mRNA ekspresyonu ve karaciğerdeki OAT3 ekspresyonu erkek sıçanlarda dişilere kıyasla daha fazladır. Erkek sıçanlarda, hipofizektomi OAT1 ve OAT3 ekspresyonlarını azaltmaktadır. Dişi sıçanlarda hipofizektomi ile OAT3 ekspresyonu artmaktadır. OAT1 ekspresyonunun cinsler arasında farklı olduğu protein düzeyinde de gösterilmiştir. Dişi sıçanların böbreklerinde OAT1 ekspresyonu erkek sıçanların yalnızca %40'ıdır. Renal korteksteki OAT1 ve OAT3 düzeyleri erkek farelerde dışidekinden daha yüksektir. Bu farklılıklar yalnızca yetişkin sıçanlarda gözlenmektedir [88,95].

OAT'ların cinsiyet hormonları dışında başka hormonlar tarafından da regüle edildiği gösterilmiştir. Bu hormonlar etkilerini protein kinaz C aktivitesini değiştirerek, OAT'ların hücre içi luplarında bulunan PKC fosforilasyon bölgeleri üzerinden göstermektedir. PKC aktivatörü olan PMA varlığında OAT1 ve OAT3 aktivitesinin azaldığı pek çok çalışmada gösterilmiştir [96-100]. Benzer şekilde PKC yolağı ile eşleşmiş ligandların tavşan proksimal tübül S2 segmentlerinde, organik anyonların bazolateral alımını ve transepitelial transportunu inhibe ettiği gösterilmiştir [101,102]. PKC aktivasyonu yaparak OAT1 ve OAT3 aktivitesini inhibe eden hormonlar arasında bradikinin, fenilefrin, angiotensin II ve paratroid hormon vardır [101-103]. EGF (epidermal growth factor)'nin ise MAPK ve onu takiben PKA aktivasyonu yaparak OAT3 aracılı transportu aktive ettiği gösterilmiştir. [104]. OAT1 ve OAT3 gibi taşıyıcıların hormonal regülasyonu hem toksik hem de terapotik ksenobiyotiklerin renal klirensini değiştireceğinden önem taşımaktadır.

Son yapılan çalışmalar, OAT ekspresyonunun patofizyolojik koşullarda değiştiğini göstermektedir [12,13,15,105-110]. Diyetsel proteinlerden kaynaklanan çeşitli üremik toksinlerin böbrek hasarının ilerlemesindeki rolü bilinmektedir. Üremik toksinler böbrekte birikerek hem renal disfonksiyona neden olmakta, hem de var olan renal hastalıkların gelişimini hızlandırmaktadır. Bu üremik toksinlerden birisi olan indoksil sülfatın bir organik anyon olduğu ve OAT1 ve OAT3'ün substratı olduğu gösterilmiştir. Enomoto ve arkadaşları [15] 5/6 nefroktomize sıçanlara

indoksil sülfat verildiğinde kronik renal yetmezlik geliştiğini göstermiştir. İmmunohistokimyasal çalışmalar, kronik böbrek yetmezliğinde proksimal tübülde indoksil sülfat biriktiğini, ayrıca OAT1 ve OAT3 ekspresyonunun arttığını göstermiştir. Üremik koşullarda OAT'ların ekspresyonundaki artış üremik maddelerin eliminasyonu için verilen kompensatuar bir yanıt olarak değerlendirilmektedir.

Kwon ve arkadaşları [12] iskemi-reperfüzyon hasarının OAT1 ekspresyonunda azalışa neden olduğunu göstermiştir. Araştırmacılar ayrıca, normalde proksimal tübül bazolateral membranında yerleşmiş olan bu taşıyıcıların iskemi-reperfüzyon hasarından sonra hücre içi dağılımının bozulduğunu ve stoplazmada agregatlar halinde biriktiğini göstermiştir. Araştırmacılar, proksimal tübüldeki OAT1'lerin proteozomal degradasyona uğradığını düşünmektedirler. İskemi reperfüzyon hasarının OAT1'in yanı sıra OAT3 mRNA ve protein düzeylerinde azalışa neden olduğu başka araştırmacılar tarafından da gösterilmiştir [107-109]. Ancak bu çalışmalara zıt olarak Zhang ve arkadaşları [110] iskemi reperfüzyon hasarını takiben böbrek korteksinde OAT1 ve OAT3 ekspresyonunun arttığını ve bu artışın reperfüzyonu takiben giderek azalsa da 4. günde bile sham-opere gruba göre hala yüksek olduğunu göstermişlerdir.

İnsanda yapılan çalışmalar, organik anyon taşıyıcılarından OAT1 ekspresyonunun böbrek hastalıklarında azaldığını göstermiştir [14]. Bu taşıyıcıların ekspresyonu yalnızca böbrek hastalıklarında değil karaciğer hastalıklarından da etkilenmektedir. Akut safra yolları tıkanıklığı olan sıçanlarda OAT1 aracılı organik anyon sekresyonunun kompensatuar olarak artışı bildirilmiştir [13].

**B. Üratin apikal membrandan lümene çıkışı:** Bazolateral membrandan epitel hücrelerine giren üratin lümene atılmasında, yani sekresyonun tamamlanmasında MRP4, UAT, UATv1 rol oynamaktadır (Şekil 2.4 ve 2.5).

**MRP4 (Multidrug Resistance Protein; ABCC4):** ATP bağımlı organik anyon taşıyıcısı olan MRP4'ün diğer MRP'lerden farklı olarak 1-5. transmembran domainleri eksiktir. Böbrekteki ekspresyonu proksimal tübül apikal membranı ile sınırlıdır. Konjuge veya konjuge olmayan bazı organik anyonların sekresyonuna aracılık etmektedir. Substratları arasında ürat, cGMP, cAMP, metotroksat, GSH, glukuronat ve fosfat konjugatları vardır. MRP4'ün ürat ile aynı anda cAMP veya cGMP transportu da yapması, çok sayıda allosterik substrat bağlama bölgesi olan tek yönlü çıkış pompası olduğunu göstermektedir [9,71,111]. Hepatositlerde bazolateral membranda yerleşmiş olan MRP4, üratin hepatositten kana geçişini sağlamaktadır. Ancak böbreklerde ürat taşınmasına etkisi yeterince bilinmemektedir [9].

**UAT/Galektin 9 (Ürat taşıyıcısı/kanalı):** UAT galektin ailesinin diğer üyelerine olan benzerliğinden dolayı "Galektin 9" olarak da adlandırılmaktadır. Proksimal tübül hücrelerinin apikal tarafında lokalize olmuş 322 amino asitli bir proteindir. Kanalin ürata olan geçirgenliği potasyum, klor, kalsiyum ve sülfata kıyasla çok daha fazladır [67-69,71].

İnsan ve sıçanda kalp, beyin, dalak, akciğer, iskelet kası, testisler ve duodenumun da içinde olduğu çok sayıda dokuda UAT mRNA'sına rastlanmıştır. İnsanda günlük üretilen üratın büyük bölümü böbrekler aracılı uzaklaştırılırken 1/3'lik kısmı gastrointestinal sistem aracılı uzaklaştırılmaktadır. UAT'nin intestinal dokularda ekspresyonunun yüksek olması, böbrekteki benzer olarak gastrointestinal sistemde üratın lümenine çıkışına aracılık ettiğini düşündürmektedir [71,112].

**OATv1:** Veziküler glutamat taşıyıcı ailesi SLC17'nin bir üyesi olan OATv1 apikal membranda yerleşmiş voltaja bağlı olarak organik anyon çıkışını sağlayan bir taşıyıcı proteindir. İlk olarak domuz böbreğinde voltaja bağlı PAH taşıyıcısı olarak tanımlanmıştır. Proksimal tübül apikal membranında lokalize olan bu taşıyıcı üratın tübül lümenine geçişine aracılık etmektedir [67-69]. İnsan, köpek ve sıçanlarda böbrekte net ürat geri emilimi söz konusu iken tavşan, domuz ve kuş gibi türlerde kan ürik asid düzeyi esas olarak sekresyon ile düzenlenmektedir. OATv1'in özellikle bu türlerde fonksiyonel öneme sahip olduğu düşünülmektedir [9]

## 2.10. Egzersiz ve Böbrek Fonksiyonları

Kas aktivitesindeki istemli ve sistemli artış olarak tanımlanan egzersiz, vücutta metabolizma hızının ve oksijen tüketiminin arttığı bir süreçtir. Artan metabolik ihtiyaç kardiyovasküler sistem ve solunum sisteminde meydana gelen değişimler sayesinde karşılanmaktadır. Egzersiz sırasında metabolik aktivitesi ve oksijen tüketimi artan dokuların başında iskelet kası gelmektedir. Egzersize adaptasyon sürecinde, sistemik kan dolaşımının yeniden düzenlenmesi ve iskelet kasına gelen kan akımının artmasıyla bu dokunun artan ihtiyaçları karşılanmaktadır. Egzersizin bu etkisi o kadar belirgindir ki, istirahat koşullarında iskelet kası kardiyak debinin yaklaşık %21'ini alırken, şiddetli egzersizde bu oran %88'lere kadar çıkmaktadır. Egzersizde iskelet kası kan akımındaki büyük artışlar ancak egzersize katılmayan dokuların kan akımındaki azalmayla mümkün olmaktadır. Bu azalmanın en belirgin olduğu organların başında böbrekler gelmektedir. Egzersiz sırasında, metabolizma hızı ve buna bağlı olarak böbrekler aracılı uzaklaştırılması gereken metabolitler artmasına rağmen, renal kan akımı azalmaktadır. Kan akımındaki azalış böbrek fonksiyonlarının değişmesine neden olmaktadır [113].

Böbrek fonksiyonlarını düzenlenmesinde nöral, endokrin ve hemodinamik faktörler rol oynamaktadır. Egzersiz sırasında böbrekler özellikle bu faktörlerin etkisi altındadır [114].

Böbreklerin nöral girdisi büyük oranda sempatik sinirlerle olmaktadır. Renal sempatik sinir aktivitesi renal hemodinamiyi (renal kan akımı, GFR), su ve sodyum itirahını, renin, prostaglandin ve norepinefrin gibi bileşiklerin salınımını etkilemektedir. Renal cevaba katılan adreno reseptörlerden  $\alpha$ -1 reseptörleri renal vazokonstriksiyon ve tübüler sodyum geri emiliminin artmasına aracılık ederken, beta-1 reseptörler renin salınımına aracılık etmektedir [114].

Renal fonksiyonların endokrin veya kimyasal kontrolüne Angiotensin II, ADH, Aldosteron, ANP ve NO aracılık etmektedir. Bu hormonlar, renal su ve sodyum tutulumu, GFR ve böbrek kan akımı değişimleri yaparak etkilerini göstermektedir [114].

### 2.10.1. Renal Hemodinami ve Egzersiz

Renal hemodinamik parametreler; renal kan akımı, GFR, kanın böbrek içinde dağılımı (medulla-korteks) ve filtrasyon fraksiyonundan oluşmaktadır. Egzersiz şiddetine bağlı olarak renal hemodinamide ortaya çıkan değişimler Tablo 2.1'de özetlenmiştir.

#### Renal Kan Akımı:

Dinlenim koşullarında renal plazma akımı 800 ml/dk'dır. Hematokrit ile düzeltme yapıldığında renal kan akımı 1300 ml/dk olarak hesaplanır. Egzersiz yoğunluğunun artmasıyla doğru orantılı olarak renal kan akımı azalmaktadır. Renal kan akımındaki azalış, egzersizin sıcak bir ortamda yapılmasıyla veya kişinin dehidrate olması halinde daha büyük olmaktadır [115]. Ağır veya maksimal egzersizde renal kan akımı 300 ml/dk ya kadar düşmektedir. Renal kan akımındaki azalış, renal sempatik sinir aktivitesi ve Angiotensin-II aracılı meydana gelen renal vazokonstriksiyondan kaynaklanmaktadır.

**Tablo 2.1.** Farklı egzersiz şiddetlerinde renal hemodinamik parametrelerin değişimi [114].

	İstirahat	%25 VO <sub>2max</sub>	%40 VO <sub>2max</sub>	>%80 VO <sub>2max</sub>
Böbrek kan akımı, (ml/dk)	1330	1250	1100	990
GFR, (ml/dk)	120	135	110	>80
İdrar hacmi, (ml/dk)	1,0	1,2	0,75	0,30-0,50
Üriner sodyum itrahi, (% istirahat)	100	125	60	20-50

#### Glomerüler Filtrasyon Hızı:

Glomerüler filtrasyon böbrek fonksiyonları için esensiyeldir. Böbreğin itrah fonksiyonunun yerine getirilebilmesi için su ve çeşitli kimyasal bileşiklerin filtre edilmesi veya sekrete edilen bileşiklerin renal tübüler yapılarla geçmesi gerekmektedir. GFR glomerüler kapillerlerdeki Starling kuvvetleri tarafından belirlenmektedir. Glomerüler kapillerlerde filtrasyonu sağlayan en büyük etken hidrostatik basınçtır ve genellikle filtrasyonun gerçekleşmesine yetecek güçtedir [114].

Dinlenim halinde GFR yaklaşık 120 ml/dk değerindedir. Hafif egzersiz GFR'yi etkilemezken egzersiz şiddetinin artması GFR'nin düşmesine neden olmaktadır [114]. Bu azalışın en önemli sebebi sempatik aktivasyon sonucu renal kan akımı ve buna bağlı olarak net filtrasyon basıncının azalmasıdır. Renal damar ağı sempatik sinirlerce yoğun bir şekilde innerve edilmektedir. Bu innervasyon hem preglomerüler hem de postglomerüler damarlara kadar girmektedir [116]. Preglomerüler afferent arteriölün selektif olarak kasılması glomerüler kapiller basıncın azalmasına ve GFR'nin azalmasına neden olurken, postglomerüler efferent

arteriolün kasılması tersi bir etki yaratmaktadır. Egzersiz şiddeti arttıkça böbrek kan akımında ve GFR'de meydana gelen değişimlerin aynı yönde olması vazokonstriksiyonun daha çok preglomerüler afferent arteriollerde olduğunu düşündürmektedir [117]. Egzersizde artan Angiotensin II ve Endotelin-1'in de afferent ve efferent arterioller vazokonstriksiyona katkıları vardır [118].

#### **Filtrasyon Fraksiyonu ve Egzersiz:**

Filtrasyon fraksiyonu renal plazma akımının filtre olan kısmını ifade etmektedir (GFR/renal plazma akımı). Bu değer normalde %20'dir. Eğer egzersizde GFR ve böbrek kan akımı benzer oranda düşerse filtrasyon fraksiyonu sabit kalır. GFR hafif egzersizde değişmediğinden veya çok az arttığından ayrıca orta ve ağır egzersizde renal plazma akımına göre daha küçük bir azalış gösterdiğinden, egzersiz şiddeti ve süresi arttıkça filtrasyon fraksiyonu artmaktadır. Filtrasyon fraksiyonundaki artışta postglomerüler efferent arteriol vazokonstriksiyonu önemlidir. Angiotensin-II tercihen postglomerüler damarlarda etki gösterdiğinden ve egzersiz şiddeti arttıkça konsantrasyonu arttığından [119] bu etkide Angiotensin II'nin rolü olduğu düşünülmektedir.

#### **Renal Kan Akımının Dağılımı:**

Total böbrek kan akımının %90'dan fazlası korteksi perfüze ederken geri kalan %10'luk kısım vasa rekta ile medullayı perfüze etmektedir. Egzersiz sırasında böbrek kan akımı azalsa da intrarenal kan akımındaki bu dağılım değişmemektedir [120]. Böbrek kan dağılımının değişmemesi medüller interstisyumdaki yüksek ozmolaritenin korunması açısından fizyolojik öneme sahiptir.

#### **2.10.2. Renal Sodyum Tutulumu ve Egzersiz**

Ekstraselüler tonisitedeki belirleyici rolünden dolayı sodyum en önemli elektrolitlerden birisidir. Dinlenme koşullarında vücuttaki sodyum miktarını diyetle alınan ve idrar ile kaybedilen sodyum miktarı belirlemektedir. Dinlenme halinde renal tübüler sodyum geri emilimini kontrol eden faktörler sodyum dengesini sıfırda tutmaktadır. Egzersiz sırasında, özellikle termal stres varsa, fazla miktarda sodyum terleme yoluyla kaybedilmektedir. Bu durum total vücut sodyumunda azalmaya neden olduğundan, sodyum dengesi sağlanması ancak üriner sodyum kaybının azalmasıyla mümkün olmaktadır [121].

Egzersiz şiddeti arttıkça sodyum itrahi da azalmaktadır. Çalışmalar sodyum itrahi ile egzersiz şiddeti arasındaki ters ilişkiyi göstermektedir. Maksimal egzersizde idrar ile sodyum atılımı bazal değerlerin %10-20'sine kadar düşmektedir [121]. Egzersizin antinatriüretik etkisinde GFR ve tübüler geri emilimdeki değişimler rol oynamaktadır. Egzersiz şiddeti arttıkça GFR'de meydana gelen azalış sodyumun ultrafiltrata geçişinde, dolayısı ile idrarla atılımında azalmaya neden olmaktadır [121].

Renal sodyum geri emilimini kontrol eden çeşitli faktörler vardır. Sempatik sinir aktivitesi, Angiotensin II ve Aldosteron doğrudan tübüler sodyum geri emilimini arttıran faktörlerdir. Egzersizde artan bu faktörler, sodyum tutulumunda rol oynamaktadır.

### **2.10.3. Egzersiz Proteinürisi**

Egzersiz proteinürisi egzersiz sırasında veya sonrasında üriner protein konsantrasyonunun artması anlamına gelmektedir. Normalde, büyüklükleri ve elektriksel özellikleri nedeniyle, yalnızca küçük miktarlarda protein glomerüler kapiller membranı geçebilmektedir. Ultrafiltrata geçen proteinler ise renal tübüler hücreler tarafından geri emilmektedir. İdrarda protein görülmesi, proteinlerin filtrasyonundaki artış ve/veya geri emilimin azalıştan kaynaklanabilir. Egzersiz proteinürisinde, her iki sebebin de etkili olduğu, ancak glomerüler membran geçirgenliğindeki artışın en büyük neden olduğu belirtilmektedir [122,123]. Akut egzersizde glomerüler membranın negatif yük özelliği kaybolmakta ve albumine olan geçirgenlik artmaktadır. Glomerüler membranın anyonik özelliği normalde negatif yüklü plazma proteinlerinin geçişini engellemektedir. Glomerüler membrandan protein geçişi, çeşitli böbrek hastalıklarında da gözlenmektedir. Ancak egzersiz proteinürisi hastalığın indüklediği proteinüri ile karıştırılmamalıdır. Egzersiz proteinürisi iyi huylu, geri dönüşümlü bir süreçtir. Egzersizden 24-48 saat sonra proteinüri düzeltilmektedir [121]. İdrardaki protein miktarı egzersizin şiddetine ve süresine bağlı olarak artmaktadır [124]. Şiddetli renal vazokonstriksiyonun egzersiz proteinürisinden sorumlu olduğu düşünülse de [121], aslında renal prostaglandinlerin proteinüriye neden olduğu gösterilmiştir. Mittleman ve Zambraski, egzersiz yapan bireylere renal prostaglandin sentezini inhibe ederek yaptıkları çalışmalarında, egzersiz proteinürisinin renal hemodinamide herhangi bir değişim olmaksızın önemli ölçüde azaldığını göstermişlerdir [125]. Egzersiz proteinürisinde artmış reaktif oksijen türlerinin rolü Gündüz ve Şentürk tarafından gösterilmiştir [126].

### **2.10.4. Egzersizle İndüklenen Akut Böbrek Yetmezliği**

Egzersizde böbrekler stres altındadır. Renal oksijen tüketimi geri emilen sodyum miktarı ile orantılı olarak artmaktadır. Ancak egzersizde böbrek kan akımı ve böbreklere ulaşan oksijen miktarı da azalmaktadır. İstirahatte, renal arteriovenöz oksijen farkı kas ile kıyaslandığında oldukça küçüktür. Egzersizle birlikte artan metabolik ihtiyacı karşılamak üzere oksijen tüketimi de artmaktadır. Yetersiz oksijenden dolayı egzersiz sırasında böbreklerin veya renal tübüllerin zarar gördüğü gösterilmemiştir. Ancak, egzersizin yanı sıra dehidrasyon da varsa tübüler hasarın gelişebileceğine dair bulgular vardır. Güreşçilerin idrarında potasyum ve lösin aminopeptidaz konsantrasyonu son derece yüksektir [127]. Egzersiz ve dehidrasyonun kombine etkisinin bir sonucu olarak renal tübül hücre hasarının oluştuğu ve lösin aminopeptidaz ve potasyum konsantrasyonundaki artışın bu hasarın bir göstergesi olduğu öne sürülmektedir [128].

Akut böbrek yetmezliği GFR'deki önemli azalışla ilişkili olarak böbrek fonksiyonlarında meydana gelen ani azalışlar olarak tanımlanmaktadır. Renal sempatik aktivitenin ve Angiotensin II'nin artması, hipovolemi ve hipotansiyon gibi renal perfüzyonda veya renal kan akımında değişime neden olan faktörler akut böbrek yetmezliğinin gelişmesine neden olmaktadır. Rabdomyolizis kas dokusundaki yıkımdır ve akut böbrek yetmezliğine neden olmaktadır. Ağır egzersiz, özellikle dehidrasyon, ısı stresi ve sempatik cevapla birlikte akut böbrek yetmezliğine neden olabilmektedir. Yine de egzersizin indüklediği akut böbrek yetmezliği oldukça nadir görülen bir durumdur [127,128].

### 2.10.5. Hematüri

İdrarda kan hücrelerinin özellikle eritrositlerin görülmesi hematüri olarak tanımlanmaktadır. Hematüri egzersiz sonrasında sık görülen anormalliklerden birisi olup egzersiz şiddetine bağlı olarak idrara eritrosit geçişinin arttığı gösterilmiştir [129]. Egzersiz hematürisi travmaya bağlı olarak veya herhangi bir travma olmadan ortaya çıkabilmektedir. Travmatik hematüri renal hasardan veya idrar kesesi hasarından kaynaklanmaktadır. Travmatik olmayan hematüri için iki mekanizma öne sürülmektedir. Bunlardan ilki; egzersizde glomerüler membran geçirgenliğinin artması, ikincisi efferent arteriolün afferent arteriole oranla daha fazla kasılması sonucunda filtrasyon basıncının artmasıdır. Permeabilite ve/veya filtrasyon basıncının artması proteinlerin yanı sıra eritrositlerin de ultrafiltrata geçmesine ve hematüriye neden olmaktadır. Egzersiz proteinürisine benzer olarak, spor aktivite sonucu oluşan hematüri de geçicidir. Egzersizden sonraki 1-2 gün içinde ortadan kalkmaktadır [130].

### 2.11. Egzersiz ve Ürat Artışı

Egzersiz, iskelet kasında ATP ihtiyacının arttığı, aerobik ve anaerobik metabolizmanın hızlandığı bir süreçtir. Egzersiz yoğunluğunun artmasıyla kasta ATP hidrolizi sentez reaksiyonlarının önüne geçmekte ve sonraki miyokinaz ve AMP-deaminaz aktivitesi ile iskelet kasında net ATP kaybı gerçekleşmektedir. Bu süreçte ATP yıkım ürünleri olan IMP ve amonyak konsantrasyonunda artış olmaktadır. Kasta biriken IMP, enzimatik olarak inozine ve ardından hipoksantine dönüştürülmektedir. Bu iki yıkım ürününün büyük bölümü plazmaya geçip dokudan uzaklaşırken, küçük bir kısmı pürin kurtarma yolağı aracılı tekrar IMP'ye dönüştürülmektedir (Şekil 2.2). Pürin kurtarma yolağı, hipoksantin IMP'ye dönüşmesini ve tekrar pürin nükleotid döngüsüne katılarak ATP sentezine kullanılmasını sağlayan bir mekanizmadır. Bu mekanizma kasılma veya toparlanma dönemlerinde kastaki potansiyel ATP kaybını azaltmaktadır. Ancak, egzersizde bu yolla ATP geri kazanımı, net ATP yıkımının önüne geçememektedir. Yoğun egzersizden sonra kas dokusunda yıkılan pürin bazı miktarının, egzersiz öncesinde kasta bulunan total ATP miktarının yaklaşık %9'u olduğu, ancak bireyin antrene oluşuna bağlı olarak bu oranın azalabileceği bildirilmiştir [131,132].

Egzersiz takiben dolaşımda konsantrasyonu artan hipoksantin karaciğer tarafından alınmakta ve XOR aktivitesiyle ksantine ve ürik aside dönüştürülmektedir. Daha önce değinildiği gibi ürik asit pürin katabolizmasının son ürünüdür ve egzersizden sonra, egzersizin şiddetiyle doğru orantılı olarak plazmada konsantrasyonu artmaktadır [18,132-139]. XOR inhibitörü allopurinol ile ön tedavinin egzersizde ürat artışına engel olduğu bildirilmiştir [17]. Egzersiz, ürik asidin yanı sıra, diğer pürin yıkım ürünleri olan inozin, hipoksantin ve ksantin de plazmada birikmesine neden olmaktadır. Bu metabolitlerin plazmadan uzaklaştırılması esas olarak böbrekler aracılı olmaktadır. Ancak daha düşük oranlarda gastrointestinal sistem aracılı ürat atılımı da söz konusudur. Dolaşımdaki ürat konsantrasyonu çok yüksek olduğunda, egzersiz sonrası toparlanma döneminde kas dokusunun küçük miktarlarda ürik asidi ROS süpürücü olarak kullanmak üzere geri aldığı da bildirilmiştir [17,131,139].

Pürin yıkım ürünlerinin uzaklaştırılmasını sağlayan ana yol renal atılım olduğundan, egzersizde serum urat artışına paralel olarak, idrar urat konsantrasyonu da artmaktadır. Böbrekler aracılı urat atılımındaki bu artış, ağır egzersizde ürolitiazis riskinin artmasına sebep olmaktadır [140-142]. Bu risk, renal hipourisemili hastalar için de geçerlidir ve daha önce belirtildiği gibi egzersiz bu hastalarda akut böbrek yetmezliğine neden olmaktadır. Renal hipourisemili hastalarda egzersizle birlikte akut böbrek yetmezliği gelişmesinin nedeni, egzersizin neden olduğu urat artışıdır [9,72,80,140]. Serum urat konsantrasyonunun artması ve fonksiyonel URAT1 taşıyıcısının olmaması nedeniyle, egzersizle birlikte renal tübüllerdeki urat miktarı artmaktadır. Yüksek konsantrasyondaki uratin tübül içinde kristalleşmeye başlaması ve egzersizin neden olduğu ROS artışı, tübül hücrelerinin hasar görmesine neden olmaktadır. Fonksiyonel URAT1'i olmayan idiyopatik renal hipourisemili hastalar, egzersiz yapmadıkları sürece böbrek taşlarının artışı dışında, normal yaşamlarına devam etmektedir. Ayrıca, egzersiz sırasında serum urat artışının engellenmesi halinde de bu hastalarda böbrek fonksiyonları korunmaktadır [80,140].

Egzersizde gözlenen artmış urat itrahının nedeni, sistemik urat üretiminin artması yani renal geri emilim kapasitesinin aşılması olarak düşünülmektedir. Ancak urat geri emilim ve sekresyonundan sorumlu taşıyıcıların sayısı veya aktivitesindeki değişimler de bu sonuca neden olabilir. Örneğin URAT1 aracılı geri emilimin azalması veya urat sekresyonunda görev alan OAT1, OAT3, MRP4 veya UAT aracılı sekresyonun artması gibi değişimler urat itrahının artmasına neden olacaktır. Ancak literatürde bu taşıyıcıların egzersiz ile nasıl değiştiğine dair herhangi bir çalışma yoktur.

Proksimal tübül transport fonksiyonları üzerine yaptığımız daha önceki çalışmanın sonuçları egzersizin, proksimal tübül taşıyıcı proteinlerinde bir takım adaptasyonel değişimler yaptığı izlenimi vermiştir [143]. Söz konusu çalışmada 5 gün boyunca tüketici egzersiz yapmış olan sıçanların proksimal tübülleri izole edilmiştir. İzole proksimal tübüllerde bir organik anyon olan PAH'ın transportu incelenmiştir. Sonuç olarak, egzersiz yapmış sıçanlarda, tübül lümenine salgılanan total PAH miktarı değişmediği halde, tübül içinde biriken PAH miktarında artış gözlenmiştir. Daha önce belirtildiği gibi PAH afinitesi OAT1'e daha yüksek olmakla birlikte hem OAT1 hem de OAT3 tarafından taşınarak bazolateral membrandan epitel hücre içine alınan bir organik anyondur. Bu nedenle tübül içinde PAH birikiminin fazla olması, OAT1 ve OAT3 aracılı PAH transportunun arttığını düşündürmektedir. Aynı taşıyıcıların urat sekresyonunun birinci basamağında da görev aldığı düşünülürse, egzersizle artan urat itrahında bu taşıyıcıların rolü olduğu sonucuna varılmaktadır. Literatürde benzeri bulgu olmayışına karşın, bu sonuç, egzersizin proksimal tübül taşıyıcılarında yeniden yapılanmaya neden olduğuna işaret etmektedir. Ancak bu bulgu, artışın taşıyıcıların aktivite artışından mı, yoksa taşıyıcı protein sentezindeki artıştan mı kaynaklandığını göstermekten uzaktır.

Aslında egzersizin böbrek kan akımında yarattığı değişiklikler göz önüne alındığında Zhang ve arkadaşlarının çalışması bu düşüncüyü destekler niteliktedir. Egzersizin, özellikle şiddetli egzersizin, böbrek kan akımında yaptığı azalış ve egzersiz sonrasında kan akımının normale dönmesi, egzersizde böbreklerin iskemi reperfüzyon benzeri bir durumla karşılaşmasına neden olmaktadır. Zhang ve



arkadaşları iskemi reperfüzyonun OAT1 ve OAT3 ekspresyonunda artış yaptığını göstermişlerdir [110]. Bu bulgu egzersizde ürat itrahının artmasıyla uyumludur.

### **2.12. Amaç ve Hipotez**

Egzersizde görülen artmış ürat eliminasyonundan, apikal membranda geri emilimden sorumlu URAT1 aktivitesinde ve/veya sentezindeki değişimler kadar, bazolateral membranda bulunan OAT1 ve 3 aktivitesinde ve/veya sentezindeki değişimler de sorumlu olabilir. Bu konunun incelenmesi sorunun çözümüne daha doğrudan yaklaşım için gereklidir. Bu nedenle bu deneysel çalışmada ağır egzersiz yapmış sıçanlarda, renal URAT1, OAT1 ve OAT3 aktivitesi ve ekspresyonundaki değişimler incelenmiştir. Böylece, bu çalışmada daha önceki bulgularımıza dayanarak, oluşturulan “Ağır egzersizdeki artmış ürat itrahı, proksimal tübülde URAT1 aracılı geri emilim azalışı ve/veya OAT1 ile OAT3 aracılı sekresyon artışından kaynaklanmaktadır” hipotezi test edilmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada, 5 gün süre ile ağır egzersiz yaptırılan sıçanlarda ürat itrahi ve buna aracılık eden proksimal tübül URAT1, OAT1 ve OAT3 taşıyıcılarının aktivite ve sentezindeki değişimler incelenmiştir.

### 3.1. DeneY Hayvanları

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı ve Merkezi Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilen bu deneysel çalışmada 30 adet, 2,5-3 aylık erkek Wistar sıçanlar kullanılmıştır. Etik kurul onayı ile DeneY Hayvanları Ünitesinden sağlanan sıçanlar  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$  oda ısısında ve 12 saat aydınlık-12 saat karanlık periyodu uygulanan koşullarda tutulmuş ve istedikleri kadar ticari sıçan yemi ve musluk suyu almalarına olanak sağlanmıştır.

### 3.2. Gruplandırma

Çalışmanın başında sıçanlar rastgele 3 gruba ayrılmış ve gruplandırma aşağıda tanımlandığı şekilde yapılmıştır;

1. Kontrol grubu (K)
2. Ağır egzersiz grubu (E)
3. Hiperürisemi grubu (H)

### 3.3. Egzersiz Protokolü

Egzersiz protokolü, tüketici koşu egzersizi olarak belirlenmiş ve May marka (TME 9805, Ankara), beş yollu sıçan koşu bandında gerçekleştirilmiştir. Sıçanlar 2 günlük alete alışma periyodundan geçirildikten sonra deneye alınmış ve 5 gün süresince tüketici egzersiz yaptırılmıştır. Uygulama sırasında, koşu bandının eğimi ve hızı aşağıda gösterildiği gibi kademeli olarak arttırılmıştır;

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

Sıçanlarda doğrulma refleksinin ortadan kalkması tükenme belirtisi olarak kabul edilmiştir.

### 3.4. Oksonik Asid Tedavisi (Hiperüriseminin Oluşturulması)

3. gruptaki sıçanlara 5 gün boyunca intraperitoneal olarak, 250 mg.kg<sup>-1</sup>.gün<sup>-1</sup> dozunda oksonik asid verilmiştir. Oksonik asid, hepatik ürikaz inhibitörüdür ve sıçanlarda ürik asidin allantoine okside olmasını engelleyerek hiperürisemiye yol açmaktadır [4,45,50,51,144]. Yukarıda belirtildiği gibi egzersiz de hiperürisemiye neden olmaktadır. Deneye bu grubun eklenmesi ile egzersizin ürik asid itrahına olacak doğrudan etkilerinin, hiperürisemiye bağlı adaptif değişikliklerden ayırd edilmesi amaçlanmıştır.

### 3.5. Deneysel İşlemler

#### 3.5.1. İdrar Toplama

Kontrol grubundaki denekler, feda edilmeden 1 gün önce, egzersiz grubu ve hiperürisemi grubundaki denekler ise egzersiz veya ilaç uygulamasının 4. günü metabolik kafese alınmıştır. Deneklerin 24 saatlik idrarları toplanmış ayrıca yem ve su tüketimleri takip edilmiştir.

#### 3.5.2. Kan Basıncı Ölçümü

Sıçanların kan basıncı ölçümleri feda edildikleri gün gerçekleştirilmiştir. Hafif eter anestezisi altındaki sıçanların kan basıncı ölçümleri, tail-cuff metoduyla kuyruk arterinden yapılmıştır. Kuyruğa takılan halka şeklindeki basınç probuyla alınan sinyaller, MP 150 veri toplama sistemi (BIOPAC Systems, CA-USA) ve MAY-BPHR 9610-PC (Commat Ltd, Ankara) ünitesi aracılığıyla bilgisayara aktarılmış ve ölçümler Acknowledge paket programıyla çizdirilen basınç traseleri üzerinden yapılmıştır. Her bir sıçan için en az üç ölçüm yapılmış ve değerlerin ortalaması alınmıştır.

#### 3.5.3. Böbrek Kan Akımı Ölçümü

Sıçanların böbrek kan akımı, feda edilmeden önce, PAH klirensi yöntemi ile ölçülmüştür [145]. Denekler, üretan (1 mg/kg) ile anestezisi edildikten sonra, PAH infüzyonu için jugular ven kataterizasyonu, idrar toplama işlemi için mesane kataterizasyonu yapılmıştır. Cerrahi işlemler tamamlandıktan sonra, jugular venden 1 saat süresince, %0,9'luk izotonik sodyum klorür içinde hazırlanmış, %0,6'lık PAH infüzyonu yapılmıştır. İnfüzyon pompası yardımıyla yapılan infüzyonun hızı, 100 gram vücut ağırlığı başına 8 µl/dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Plazma PAH konsantrasyonunun sabit bir değere ulaşması için 30 dakika beklenmiştir. İlk 30 dakikanın bitiminde mesane içindeki idrar boşaltılmıştır. İnfüzyonun son 30 dakikasında mesanede biriken idrar toplanmış ve hacmi kaydedilmiştir. Çalışmanın bitiminde, abdominal aortadan alınan kan örneklerinde ve idrar örneklerinde PAH tayini yapılmıştır. Plazma ve idrar PAH düzeyleri ve idrar akım hızı üzerinden aşağıdaki formüle göre böbrek plazma akımı hesaplanmıştır. Hematokrit değeri ile yapılan düzeltme sonucu böbrek kan akımı hesaplanmıştır:

$$\text{Böbrek Plazma Akımı (ml/dk)} = ([\text{PAH}]_{\text{idrar}} \times \text{idrar akım hızı}) / [\text{PAH}]_{\text{plazma}}$$

$$\text{Böbrek Kan Akımı (ml/dk)} = \text{Böbrek Plazma Akımı} / (1 - \text{Hematokrit})$$

### 3.5.4. Glomerüler Filtrasyon Hızı (GFR) Ölçümü

Sıçanların GFR değerleri kreatinin klirensi olarak hesaplanmıştır. Metabolik kafeslerde toplanan 24 saatlik idrarlarda ve deneklerin feda edilmesi sırasında alınan kan örneklerinde kreatinin tayini yapılmıştır. İdrar ve plazma kreatinin değerleri ile idrar akım hızı değerleri kullanılarak aşağıdaki formüle göre GFR değerleri hesaplanmıştır:

$$\text{GFR (ml/dk)} = ( [\text{Kreatinin}]_{\text{idrar}} \times \text{idrar akım hızı} ) / [\text{Kreatinin}]_{\text{plazma}}$$

### 3.6. Deneyin Sonlandırılması, Dokuların Alınması ve Saklanması

Anestezi altındaki sıçanlarda orta hat kesisi yapılarak abdominal aorta açığa çıkarılmıştır. 22 gauge branül yardımıyla aorta kanüle edilmiştir. Branül aracılığı ile kan örneği alındıktan sonra, aynı yolla soğuk krebs tamponu (pH 7,4; 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11 mM glukoz, 2,4 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>) perfüze edilmiştir. Böbrek dokusundaki kanı uzaklaştırmak için yapılan bu işleme, dokudaki kırmızı renk kaybolana kadar devam edilmiştir. Kandan arındırılan böbrekler, hızlı bir şekilde alınıp soğuk krebs tamponu içine koyulmuştur. Yağ dokusu ve dış zarı uzaklaştırılan böbreklerin yaş ağırlıkları kaydedilmiştir. Boyuna ikiye ayrılan böbreklerin medüller kısımları bir makas yardımıyla çıkartılıp uzaklaştırılmıştır. Böbreğin korteks kısmından alınan yaklaşık 100 mg'lık bir örnek, sıvı azot içinde dondurularak sonraki OAT1, OAT3, URAT1 ve beta-aktin mRNA ve protein ölçümleri için, kullanılmaya kadar -80 °C'de saklanmıştır. Böbrek korteksinin kalan kısımları proksimal tübül izolasyonu için kullanılmıştır.

### 3.7. Proksimal Tübül İzolasyonu

Böbrek korteksinden proksimal tübül izolasyonu Perkol dansite gradienti yöntemiyle yapılmıştır [146]. Böbrek korteks dokusu, bir bistüri yardımıyla mümkün olduğunca küçük parçalara ayrılıp kıyma haline getirilmiştir. Kıyma halindeki doku, önceden oksijenlendirilmiş (%95 O<sub>2</sub>, %5 CO<sub>2</sub>, 30 dakika) krebs tamponu içinde 3 kez yıkanmıştır. Yıkamayı takiben doku, %0,15 kollojenaz (Sigma-C5138, Clostridium histolyticum, ≥ 125 CDU/mg solid) içeren 10 ml krebs tamponu içine alınmıştır. Kollojenaz ile sindirim işlemi 37°C'de 1 saat sürmüştür. Doku süspansiyonu 100g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet alınarak 2 kez yıkama işleminden geçirilmiştir (100g'de, 1 dakika). Son pellet %5'lik albumin içinde resüspanse edilmiş ve 100g'de, 5 dk tekrar santrifüj edilmiştir. Santrifüjün sonunda elde edilen pellet %50'lik perkol (Sigma P1644) içinde resüspanse edilmiştir. 26000g'de 1 saat devam eden santrifüjün sonunda bir doku süspansiyon gradienti oluşmaktadır. Bu gradientin en altta kalan bölümü, proksimal tübül yönünden zengindir. Diğerlerinden ayrılan proksimal tübül süspansiyonu, krebs tamponu ile 3 kez yıkanmıştır (26000g'de 5 dakika). Yıkama işlemlerinden geçirildikten sonra, protein düzeyi saptanan tübül süspansiyonu, aşağıda tanımlandığı şekilde OAT1 OAT3 ve URAT1 aktivite ölçümleri için kullanılmıştır.

### 3.8. URAT1, OAT1 ve OAT3 Fonksiyonlarının Ölçümü

OAT1 ve OAT3 proksimal tübülde bazolateral membrandan, URAT1 ise apikal membrandan epitel hücre içine ürat taşınmasında görev alan taşıyıcılardır. Bu taşıyıcıların aktivitesi, spesifik inhibitörleri varlığında ve yokluğunda tübül içine alınan ürat miktarına göre değerlendirilmiştir.

Ortalama 300 µg protein içeren 0.5 ml tübül süspansiyonu, aşağıda görevleri tanımlanan inhibitörlere, farklı kombinasyonlarda maruz bırakılmıştır. Ortama 100 µM ürat eklenerek, 37°C'de %95 O<sub>2</sub> + %5 CO<sub>2</sub> varlığında gerçekleştirilen inkübasyona 30 dakika devam edilmiştir. İnkübasyon ortamına soğuk kreps eklenerek sonlandırılmıştır. Santrifüj edilerek çöktürülen tübül süspansiyonu, içinde aşağıda tanımlanan bütün inhibitörleri içeren krebs tamponu ile 2 kez yıkanmış ve ortamdaki ürat uzaklaştırılmıştır. Yıkama işleminden sonra ürik asid ölçüm kitinde bulunan 1x reaksiyon tamponu içinde resüspanse edilen tübül segmentleri sonikasyon işlemi ile parçalanmıştır. Bu işlemi takiben yapılan santrifügasyon sonucu elde edilen süpernetantlarda ürat ölçümü yapılmıştır.

Taşıyıcı fonksiyonlarının ölçümlerinde kullanılan inhibitörlerin dozları ve etkileri Tablo 3.1'de belirtilmiştir.

**Tablo 3.1.** OAT1, OAT3 ve URAT1 fonksiyonlarının ölçümünde kullanılan inhibitörlerin doz ve etkileri.

<b>İnhibitör</b>	<b>Fonksiyonu</b>	<b>Konsantrasyon</b>
MK571	MRP4 inhibitörü [147]	10 µM
Ksantin	UAT inhibitörü [148]	5 µM
Morin	URAT1 inhibitörü [149-151]	100 µM
Sefadroksil	OAT1 ve OAT3 inhibitörü [9,74]	50 µM
Simetidin	OAT3 inhibitörü [147,152]	500 µM

Proksimal tübül süspansiyonu Tablo 3.2'de belirtilen protokollere uygun olarak hazırlanan koşullarda, inhibitörlere maruz bırakılmıştır.

**Tablo 3.2.** OAT1, OAT3 ve URAT1 fonksiyonlarının ölçümünde uygulanan protokoller.

	Ürat (100 µM)	MK571 (10 µM)	Ksantin (5 µM)	Morin (100 µM)	Sefadroksil (50 µM)	Simetidin (500 µM)
0. Protokol	-	-	-	-	-	-
1. Protokol	+	+	+	-	-	-
2. Protokol	+	+	+	+	+	-
3. Protokol	+	+	+	-	+	-
4. Protokol	+	+	+	+	-	+
5. Protokol	+	+	+	+	-	-

**0.Protokol:** İzole tübüllerde, bazal şartlardaki ürat içeriğinin ölçümü amaçlanmıştır.

**1.Protokol:** Bilinen çıkış yolları olan MRP4 ve UAT'nin inhibitörleri varlığında, OAT1, OAT3 ve URAT1 aracılı tübül içine giren net ürat miktarının ölçülmesi amaçlanmıştır. Bu protokol ile 2. protokolün farkı OAT1, OAT3 ve URAT1 aracılı tübül içine giren ürat miktarını göstermektedir.

**2.Protokol:** MRP4, UAT, OAT1, OAT3 ve URAT1 inhibitörleri varlığında, bütün taşıyıcılar inhibe haldeyken tübül içine nonselektif yollardan giren ve çıkan net ürat miktarının saptanması amaçlanmıştır.

**3.Protokol:** MRP4, UAT, OAT1 ve OAT3 inhibitörleri varlığında, URAT1 aktif iken tübül içine giren net ürat miktarının ölçülmesi amaçlanmıştır. Buradan elde edilen sonuç ile 2. protokolün farkı URAT1 aracılı transportun katkısını göstermektedir.

**4.Protokol:** MRP4, UAT, OAT3 ve URAT1 inhibitörleri varlığında, OAT1 aktif iken tübül içine giren net ürat miktarının ölçülmesi amaçlanmıştır. Buradan elde edilen sonuç ile 2. protokolün farkı OAT1 aracılı girişi göstermektedir.

**5.Protokol:** MRP4, UAT ve URAT1 inhibitörleri varlığında OAT1 ve OAT3 aktif iken tübül içine giren net ürat miktarını göstermektedir. Buradan elde edilen sonucun 2. protokolden farkı OAT1 ve OAT3'ün birlikte katkısını, 4. protokolden farkı ise OAT3'ün ürat taşınmasına olan tek başına katkısını göstermektedir.

### 3.9. Biyokimyasal Parametreler

#### 3.9.1. PAH Tayini

Böbrek kan akımının hesaplanmasında kullanılmak üzere, plazma ve idrar örneklerindeki PAH konsantrasyonları spektrofotometrik olarak ölçülmüştür [153]. Yöntem, p-dimethylaminocinnamaldehyde (DACA) ile PAH arasındaki reaksiyonun kırmızı renk vermesine dayanmaktadır.

#### Kullanılan solüsyonlar

- DACA solüsyonu (%1); 100 ml %99,5'lik etanol içine 1 gram DACA eklenerek hazırlanmıştır.
- Trikloroasetik asid (TCA) solüsyonu (%15); 100 ml distile su için 15 gram TCA eklenerek hazırlanmıştır.

#### İşlemler

- PAH tayini yapılacak olan idrar numunelerinde 1/10 oranında dilüsyon yapılırken, plazma numuneleri doğrudan kullanılmıştır.
- 100 µl numune (idrar, plazma, standart, distile su) üzerine %15'lik TCA solüsyonu eklenerek vorteks ile karıştırıldıktan sonra 14000g'de 4 dakika santrifüj edilmiştir. Bu aşamada örneklerdeki proteinler çöktürülmüştür.
- Santrifüj sonrası elde edilen süpernatantlardan 50 µl alınarak 96 kuyulu plakalara aktarılmıştır.
- Her örneğin üzerine 150 µl %1'lik DACA solüsyonu eklenmiştir.
- Oda ısısında 20 dakika inkübasyonu takiben, spektrofotometrede 550 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır.
- Hazırlanan standart grafiği üzerinden numunelerdeki PAH konsantrasyonları hesaplanmıştır.

#### 3.9.2. Kreatinin Tayini

İdrar ve serum kreatinin ölçümleri Jaffe metoduna göre yapılmıştır. Yöntem, kreatinin alkali ortamda pikrik asid ile birleşerek turuncu-kırmızı renkli bir bileşik oluşturması ve bu bileşiğin absorbansının spektrofotometrede 500 nm'de okunabilmesi esasına dayanmaktadır [154].

#### Kullanılan solüsyonlar

- Pikrik asid solüsyonu 33 mM
- Sodyum hidroksit (NaOH): 0,4 M
- Standart solüsyonu: 2 mg/dl kreatinin solüsyonu

#### İşlemler

- Kullanılan idrar örnekleri distile su ile 1/50 oranında sulandırılmış ancak serum örneklerinde herhangi bir sulandırma yapılmamıştır.
- Pikrik asid solüsyonu ve NaOH 1:1 oranında karıştırılmıştır.
- Numuneler ve pikrik asid solüsyonu-NaOH karışımı deneyden 10 dakika önce 37°C'ye ayarlanmış su banyosuna koyulmuştur.

- 1 ml Pikrik asid-NaOH karışımı üzerine 100 µl numune-standart-distile su eklenerek karıştırılmıştır.
- Spektrofotometrede 550 nm dalga boyunda 30. ve 90. saniyelerde absorbans değerleri kaydedilmiştir.
- Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır.

$$\text{mg/dl kreatinin} = [(Ab_{S90} - Ab_{S30})_{\text{numune}} / (Ab_{S90} - Ab_{S30})_{\text{std}}] \times 2$$

### 3.9.3. Ürik Asid Tayini

İdrar, plazma örneklerinde ve inkübasyon sonunda proksimal tübüllerde biriken ürik asid konsantrasyonu ticari kit kullanılarak ölçülmüştür (Amplex® Red Uric Acid/Uricase Assay Kit, Invitrogen: A22181). Kit ürikaz varlığında, ürik asidin allantoin, hidrojen peroksid ve karbondioksit dönüşümü ve ardından hidrojen peroksidin “Horseradish peroxidase (HRP)” enzimi varlığında kırmızı renk veren resofurine dönüşmesi esasına dayanmaktadır.

#### Kullanılan solüsyonlar

- Karışım solüsyonu; kit içinde bulunan reaktif ve enzimlerin prospektüste belirtilen şekilde karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. İçeriğinde Aplex Red reaktifi (100 µM), HRP (0,4 U/ml) ve ürikaz (0,4 U/ml) enzimi olan solüsyon, deneyden hemen önce hazırlanmıştır.
- İdrar, plazma örnekleri ve aktivite ölçümleri sonucunda elde edilen doku süpernetantları kullanılmıştır. Örneklerde herhangi bir dilüsyon yapılmamıştır.

**İşlemler:** Yukarıda içeriği belirtilen karışım solüsyonu (50 µl) ile Kör/Standart/Pozitif kontrol/Numune (50 µl) eşit oranda karıştırılmıştır. 37 °C’de 30 dakika bekletilen bu karışım spektrofotometrede 560 nm’de, köre karşı okunmuştur. Sonuçlar hazırlanan standart grafiği aracılığı ile µM olarak hesaplanmıştır.

### 3.9.4. Glukoz Tayini

İdrar ve plazmada glukoz tayini, ticari kit aracılı spektrofotometrik olarak yapılmış (Glucose Assay Kit, BioVision: K606-100) ve ölçüm kitte önerildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

### 3.9.5. Protein Tayini

Lowry yöntemi kullanılarak numunelerdeki protein ölçümleri yapılmıştır. Yöntem, bazik ortamda proteinlerin Cu<sup>+2</sup> (bakır) ile reaksiyona girerek oluşturdukları bakır-peptid komplekslerinin, Folin reaktifi varlığında tirozin ve triptofan kalıntıları ile birleşmesiyle oluşan renkli bileşiklerin spektrofotometrik olarak saptanmasına dayanmaktadır [155].

#### Kullanılan solüsyonlar

- Sığır albumini (Albumine Bovine, Sigma, A-8022) 1 mg/ml’lik standart
- NaOH (Sodium hydroxide, Merck, 6462) 1 N
- D reaktifi: aşağıda belirtilen çözeltilerden taze olarak hazırlanmıştır.



10 ml, %2'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (sodium carbonate, anhydrous, Merck, 6398),  
0,1 ml %1'lik CuSO<sub>4</sub> (Copper (II) sulfate, Merck, 2787)  
0,1 ml %2'lik C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (di-Sodium tartarate, Merck, 6662)

- Folin reaktifi (Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent, Sigma, F-9252)

**İşlemler:** 0,1 ml numune veya standart üzerine 0,1 ml NaOH ve 1 ml D reaktifi eklenerek karıştırılmıştır. Ardından bütün tüplere 1:1 oranında sulandırılmış Folin reaktifinden 0,1 ml eklenerek oda ısısında ve karanlıkta 30 dakika bekletilmiştir. Sürenin bitiminde tüplere 2 ml distile su eklenerek 750 nm dalga boyunda köre karşı spektrofotometrede (Shimadzu UV 1600) okuma yapılmıştır. Elde edilen standart grafiğinden sonuçlar mg/ml protein olarak hesaplanmıştır.

### 3.9.6. Sitrat Sentaz Aktivitesinin Ölçümü

Deneklere egzersiz yaptırıldığının göstergesi olarak, soleus kası örneklerinde sitrat sentaz enzim aktivitesi ölçülmüştür [156,157]. Yöntem; Asetil CoA ve Oksaloasetik asid'in Sitrat sentaz varlığında Sitrat ve CoA-SH'a ve ardından 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) varlığında CoA-SH'ın 412 nm'de ışığı güçlü bir şekilde absorbe eden Merkaptid iyonuna dönüşmesine dayanmaktadır.

#### Kullanılan Solüsyonlar

- Tris tamponu (pH: 8,0): 100 mM
- Fosfat tamponu (pH: 7,4): 100 mM
- DTNB: 1 mM
- Asetil CoA: 3 mM
- Oksaloasetik asit; 5 mM

**Doku Örneklerinin Hazırlanması:** Deney gününe kadar -80 °C'de saklanan Soleus kas örnekleri, yaş ağırlıkları kaydedildikten sonra, bir bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrılmıştır. Fosfat tamponu ile 1:20 oranında dilüe edilen doku parçaları, teflon uçlu homojenizatör ve sonikatör yardımıyla homojenize edilmiştir. Homojenatların fosfat tamponu ile tekrar 1:20 oranında sulandırılmasıyla örnekler ölçüme hazırlanmıştır.

**İşlemler:** Tris tamponu (650 µl), Asetil CoA (50 µl), DTNB (100 µl) ve homojenat (100 µl) karışımı hazırlandıktan sonra 30 °C'de 5 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Sürenin bitiminde karışıma 100 µl oksaloasetik asit eklenerek spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda ilk okuma gerçekleştirilmiştir. 37°C'de gerçekleştirilen spektrofotometrik okuma 3 dakika sonra tekrarlanmıştır. Merkaptid iyonunun molar ekstinsiyon katsayısı (13,6), 1 dakikalık absorbans değişimi, dilüsyon faktörü ve kas yaş ağırlıkları üzerinden enzim aktivitesi hesaplanmış, sonuçlar µM.g yaş doku<sup>-1</sup>. dakika<sup>-1</sup> olarak verilmiştir.

### 3.10. URAT1, OAT1 ve OAT3 mRNA Düzeylerinin Ölçülmesi

RT-PZR (reverse transcription-polymerase chain reaction = ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemi ile bu taşıyıcıların mRNA düzeyleri değerlendirilmiştir.

#### 3.10.1. RNA İzolasyonu

RT-PZR için kullanılacak olan böbrek korteks örnekleri kullanılacağı güne kadar -80°C'de saklanmıştır. Deney günü, buz üzerinde çözülün dokular 30-40 mg ağırlığında tartılarak total RNA izolasyonu için kullanılmıştır. İzolasyon, kullanılan ticari kitin (RNeasy Protect Mini Kit; QIAGEN: 74126) önerdiği şekilde yapılmıştır. Elde edilen RNA'ların miktarları spektrofotometrik olarak ölçülüp kaydedildikten sonra, kullanılmaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

#### 3.10.2. cDNA Eldesi

250 ng total RNA, reverse transkriptaz enzimi ve oligodT (12) primerleri kullanılarak cDNA'ya dönüştürülmüştür. Bu amaç için Sensiscript RT Kit (QIAGEN: 205213) kullanılmış ve üretici firmanın önerileri doğrultusunda sentez gerçekleştirilmiştir.

#### 3.10.3. PZR Koşulları

cDNA'nın amplifikasyonu sırasında kullanılan primerlerin dizin ve lokalizasyonları Tablo 3.3'de belirtilmiştir.

**Tablo 3.3.** URAT1, OAT1, OAT3 ve Beta aktin mRNA düzeylerinin ölçümünde kullanılan primerlerin dizilim ve lokalizasyonları.

<b>Sıçan URAT1 primerleri (LOCUS: NM_001034943)</b>	<b>Lokalizasyon</b>
Sol: 5'-gcacaatagctgccctcatgc Sağ: 5'-gccaactgcagcatcctcc	817-837 1048-1030
<b>Sıçan OAT1 primerleri (LOCUS: NM_017224)</b>	<b>Lokalizasyon</b>
Sol: 5'-gctagcattgcaatcaactgc Sağ: 5'-gctccatggctgaggcttgg	851-871 1238-1219
<b>Sıçan OAT3 primerleri (LOCUS: NM_031332)</b>	<b>Lokalizasyon</b>
Sol: 5'-gcctgagaagtgtctccgc Sağ: 5'-gccatgaagatcgactggg	330-348 515-497
<b>Sıçan Beta Aktin primerleri (LOCUS: NM_031144)</b>	<b>Lokalizasyon</b>
Sol: 5'-gg agaagagcta tgagctgc Sağ: 5'-gcaatgatcttgatcttcatgg	789-808 1071-1052

Her bir gen için hazırlanan PZR koşulları birbirinden farklıdır;

### **3.10.3.1. URAT-1**

Tanımlanan URAT1 primerleri kullanılarak cDNA'da 231 baz çiftlik bir bölge çoğaltılmıştır. Reaksiyon 0,5 µl cDNA ve 0,3 µM primer (her biri) varlığında gerçekleştirilmiştir. PZR şartları; zincir ayrılması (denaturation) 94 °C'de 30 saniye; primer-kalıp eşleşmesi (annealing) 52 °C'de 30 saniye ve zincir uzaması (elongation) 72 °C'de 40 saniye olarak belirlenmiş ve 35 döngü uygulanmıştır.

### **3.10.3.2. OAT-1**

Tablo 3.3'de dizin ve lokalizasyonları verilen OAT1 primerleri kullanılarak cDNA'da 387 baz çiftlik bir bölge çoğaltılmıştır. Reaksiyon 4 µl cDNA ve 0,3 µM primer (her biri) varlığında gerçekleştirilmiştir. PZR şartları; zincir ayrılması (denaturation) 94°C'de 30 saniye; primer-kalıp eşleşmesi (annealing) 50°C'de 30 saniye ve zincir uzaması (elongation) 72°C'de 40 saniye olarak belirlenmiş ve 35 döngü uygulanmıştır.

### **3.10.3.3. OAT-3**

Tablo 3.3'de belirtilen OAT3 primerleri varlığında cDNA'da 185 baz çiftlik bir bölge çoğaltılmıştır. Kullanılan cDNA ve primer konsantrasyonları ile PZR koşulları, OAT1 amplifikasyonunda tanımlandığı şekildedir.

### **3.10.3.4. Beta aktin**

Sıçan beta-aktin mRNA'sından elde edilen PZR ürünleri kontrol olarak kullanılmıştır. Bunun için, Tablo 3.3'de tanımlanan primerler ile cDNA'da 282 baz çiftlik bir bölge çoğaltılmıştır. 2,5 µl cDNA ve 0,2 µM primer kullanılarak reaksiyon ortamı oluşturulmuştur. PZR şartları; zincir ayrılması (denaturation) 94°C'de 30 saniye; primer-kalıp eşleşmesi (annealing) 50°C'de 30 saniye ve zincir uzaması (elongation) 72°C'de 40 saniye olarak belirlenmiş ve bu koşullar 35 kez tekrarlanmıştır.

Amplifikasyon sonrasında örnekler, %2' lik agaroz jele yüklenmiştir. 70 V'da 45 dakika süren elektroforezi takiben jeller etidyum bromür ile boyanarak görüntü alınmıştır. Elde edilen görüntü ImageJ (Image Processing and analysis in Java) analiz programı ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, beta-aktin değerlerine göre normalize edilerek saptanmıştır.

### 3.11. URAT1, OAT1 ve OAT3 Protein Düzeylerinin Tayini

Böbrek korteksinde bu taşıyıcıların protein düzeyleri Western Blot yöntemi ile saptanmıştır.

#### 3.11.1. Doku Örneklerinin Hazırlanması

Böbrek korteksinden alınan örnekler deney gününe kadar -80°C saklanmıştır. Deney günü çıkarılıp buz içine alınan doku örneklerinin yaş ağırlıkları kaydedilmiştir. 10 ml'lik plastik tüpler içine alınan dokuların üzerine, ağırlıklarının 3 katı hacimde, içinde %5 oranında proteaz inhibitör kokteyli (Sigma P2714) bulunan lizis tamponu (10 mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaF, 20 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1% Triton-X, %10 gliserol, %0.1 SDS, % 0.5 deoksikolat) eklenmiştir. Teflon uçlu doku homojenizatörü (TRI-R STIR-R, Model K43) yardımı ile dokular maksimum hızda 20 saniye homojenize edilmiştir. Homojenat, %70 güçte, 5 saniye süreyle, 2-3 kez sonike edildikten sonra 30 dakika buz içinde bekletilmiştir. Sürenin bitiminde, numuneler +4°C'de 10.000g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernetantlarda Lowry yöntemi ile protein tayini yapılmıştır. Eşit miktarda (50µg) protein içeren örnekler, protein denaturasyonu için eşit hacimde 2xLaemmli tamponu (Sigma, S3401) ile karıştırılmıştır. Kısa süreli vorteksleme işlemi takiben örnekler 5 dakika 95°C'de bekletilmiş ve ardından 5 dakika 5000g'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernetant western blot analizi için kullanılmıştır.

#### 3.11.2. Elektroforez ve Antikorların Uygulanması

Elektroforez ve blotting aşamalarında BioRad Mini Protean 3 sistemi kullanılmıştır. Proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılması için %7,5'lik poliakrilamid jel kullanılmıştır. Moleküler ağırlık standardı (Fermantas, SM1811) ve 50 µg protein içeren örnekler kuyucuklara yüklenmiş ve elektroforez işlemi başlatılmıştır (80 V akımda, 2 saat). Elektroforezin bitiminde, moleküler ağırlıklarına göre ayrılan proteinler, ıslak transfer yöntemi ile jelden nitroselüloz membrana (Bio-rad, 162-0115) transfer edilmiştir. Transfer işlemi +4°C'de, 3 saat boyunca 250 mA akım uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Transfer sonrasında membran, %5 süt tozu (BioRad, 170-6404) içeren TBS-T solüsyonunda 1 saat bloke edilmiş ve ardından 40 dakika boyunca 4 kez tazelenen TBS-T solüsyonu (%0,1 Tween 20 içeren TBS) kullanılarak yıkanmıştır. Yıkama işlemi takiben membranlar 1:100 dilüsyonda hazırlanmış anti-OAT1 (Alpha Diagnostic, OAT11-A), anti-OAT3 (Alpha Diagnostic, OAT31-A), anti-URAT1 (Alpha Diagnostic, URAT11-A) veya β-aktin (Santa Cruz; SC47778) primer antikorları ile +4 °C'de, çalkalayıcı üzerinde, gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Primer antikor inkübasyonu sonrasında membranlar, 40 dakika süreyle 4 kez yenilenen TBS-T solüsyonu ile yıkanmış ve bu şekilde fazla antikor uzaklaştırılmıştır. Yıkama işlemi takiben membranlar 1:3000 oranında sulandırılmış HRP-konjuge IgG (Alpha Diagnostic Intl. Inc, 20120) ile oda ısısında, 1 saat boyunca çalkalanarak inkübe edilmiştir. İnkübasyonun bitiminde membranlar tekrar 40 dakika süresince çalkalanarak yıkanmış ve görüntüleme aşamasına geçilmiştir.

### **3.11.3.Görüntüleme ve Değerlendirme**

Sekonder antikorla konjuge halde bulunan peroksidaz enziminin kemiluminisans oluşturacak ürünü için substrat içeren ECL reaksiyon karışımı (Pierce, 32209) nitroselüloz membranların üzerine uygulanmış ve karanlıkta 5 dakika bekletilmiştir. Bekleme süresinin sonunda, ECL'nin uzaklaştırılmasını takiben membranlar fotoğraf filmine (Hyperfilm, Amersham, RPN3103K) konularak görüntüleme sağlanmıştır.

Her bir örnek için 3 kez tekrarlanan deneylerin sonucunda elde edilen filmler taranarak bilgisayar ortamına aktarılmış ve görüntülerin dansitometrik analizi için ImageJ programı kullanılmıştır. Sonuçlar; her grup için OAT1/ $\beta$ -aktin, OAT3/ $\beta$ -aktin, ve URAT1/ $\beta$ -aktin şeklinde  $\beta$ -aktin proteininin miktarına oranlanarak ayrı ayrı hesaplanmış ve ünite cinsinden ifade edilmiştir.

### **3.12. İstatistiksel Analiz**

Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir. Sonuçların değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi kullanılmış ve gruplar arası değerlendirmede Newman-Keuls testi kullanılmıştır.  $P<0.05$  olan değerler istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

## BULGULAR

### 4.1. Genel Bulgular

2,5-3 aylık erkek Wistar sıçanların kullanıldığı bu çalışmada, Kontrol (K) grubundaki denekler sedanter bırakılırken, Egzersiz (E) grubundaki sıçanlara 5 gün boyunca, günde 1 kez tüketici egzersiz yaptırılmıştır. 3. grup olan Hiperürisemi (H) grubunda ise sıçanlara 5 gün boyunca, günde 1 kez 250 mg/kg dozunda oksonik asid verilerek hiperürisemi oluşturulmuştur. Tablo 4.1'de görüldüğü gibi, bu uygulamaların günlük yem ve su tüketimi, vücut ağırlığı ve böbrek ağırlığı gibi parametrelerde istatistiksel olarak önemli bir etkisi olmamıştır.

**Tablo 4.1.** K, E ve H grubunda genel bulgular.

	<b>K</b>	<b>E</b>	<b>H</b>
Yem tüketimi (g/gün)	20,0±1,3	20,4±1,0	18,3±1,4
Su tüketimi (ml/gün)	30,9±4,7	29,9±2,6	28,7±3,0
Vücut ağırlığı (g)	303,0±8,7	307,2±6,1	307,1±7,6
Böbrek ağırlığı (g)	1,9±0,1	2,1±0,1	2,1±0,1
% Böbrek ağırlığı	0,64±0,02	0,69±0,04	0,67±0,02

Her grup için n=10

#### 4.1.1. Günlük Egzersiz Süresi

Birbirini takip eden 5 gün boyunca, tükenene kadar egzersiz yaptırılan E grubundaki deneklerin günlük tükenme süreleri 53,2±2,3; 53,0±2,8; 52,6±2,1; 54,3±2,2 ve 54,9±1,8 dakika olarak kaydedilmiştir. Bu değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmamıştır.

#### 4.1.2. Ortalama Kan Basıncı

Deneklerin feda edilmeden hemen önce ölçülen kan basıncı değerleri Tablo 4.2'de sunulmuştur. Hiperürisemi grubunda küçük bir artış görülse de, ortalama kan basıncı değerleri arasında istatistiksel önemli bir fark görülmemiştir.

#### 4.1.3. Glomerüler Filtrasyon Hızı (GFR)

Kreatin klirensi üzerinden hesaplanan glomerüler filtrasyon hızı değerleri Tablo 4.2'de sunulmuştur. Egzersiz ve hiperürisemi grubunda gözlenen hafif azalışların kontrol değerlerine göre istatistiksel olarak önemli bir farkı yoktur.

#### 4.1.4. Böbrek Kan Akımı

PAH klirensi üzerinden hesaplanan böbrek kan akımı değerleri K, E ve H grubunda birbirinden farklı değildir. Sonuçlar Tablo 4.2’de sunulmuştur.

**Tablo 4.2.** K, E ve H gruplarında ortalama kan basıncı, glomerüler filtrasyon hızı, böbrek kan akımı değerleri ile idrar ve plazma analizleri.

	<b>K</b>	<b>E</b>	<b>H</b>
Ortalama Kan Basıncı (mmHg)	95,20±1,83	93,56±2,3	100,5±4,2
GFR (ml/dk)	0,692±0,13	0,605±0,08	0,633±0,03
Böbrek Kan Akımı (ml/dk)	5,45±1,03	7,61±0,99	6,09±1,96
İdrar glukoz (mg/dl)	0,9±0,2	26,4±2,2**	1,7±1,0
İdrar protein (mg/dl)	0,05±0,07	0,51±0,1**	0,08±0,02
Plazma glukoz (mg/dl)	146,2±6,3	97,8±5,7*	156,1±17,6
Plazma protein (g/dl)	1,52±0,02	1,49±0,01	1,44±0,1

K grubundan fark; \*p<0,05, \*\* p<0,001.  
Her grup için n=10

#### 4.1.5. İdrar ve Plazma Glukoz Değişiklikleri

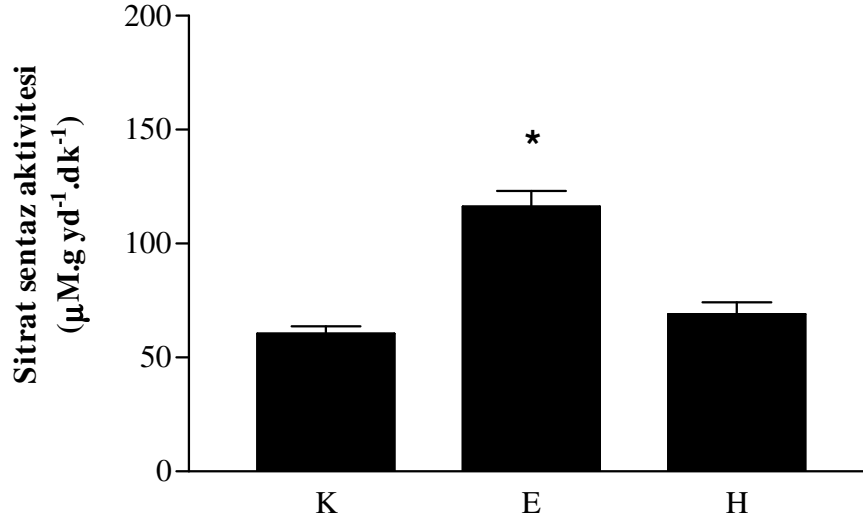
İdrar ve plazma örneklerinde yapılan glukoz ölçümlerinin sonuçları Tablo 4.2’de sunulmuştur. Tüketici egzersiz grubunda idrar glukoz konsantrasyonundaki artış (p<0,001) ve plazma glukoz değerlerindeki azalış (p<0,05) istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Hiperüriseminin idrar ve plazma glukoz değerlerine önemli bir etkisi gözlenmemiştir.

#### 4.1.6. İdrar ve Plazma Protein Değişiklikleri

Tablo 4.2’de görüldüğü gibi tüketici egzersiz, deneklerde proteinüriye neden olmuştur (p<0,001). Hiperüriseminin ise böyle bir etkisine rastlanmamıştır. Plazma protein düzeyinde ise istatistiksel olarak önemli bir değişim gözlenmemiştir.

#### 4.1.7. Soleus Kasında Sitrata Sentaz Aktivitesi

Tüm gruplarda, deneklerden alınan soleus kas örneklerinde sitrat sentaz aktivitesi ölçülmüştür. Sedanter bırakılan kontrol grubunda sitrat sentaz aktivitesi 60,38±3,45  $\mu\text{M.g yaş doku}^{-1}.\text{dk}^{-1}$  olarak saptanmış, tüketici egzersiz yapan grupta ise bu değer 116,17±7,01  $\mu\text{M.g yaş doku}^{-1}.\text{dk}^{-1}$  değerine yükselmiştir (p<0,001). Hiperürisemi grubunda bulunan sonuç, kontrol grubundan farklı değildir (69,05±5,24  $\mu\text{M.g yaş doku}^{-1}.\text{dk}^{-1}$ ). Sonuçlar Şekil 4.1’de sunulmuştur.



**Şekil 4.1.** Soleus kasında sitrat sentaz aktivitesi. Kontrolde fark \*p<0,001. Her grup için n=10

#### 4.1.8. Plazma ve İdrar Ürik Asid Değişiklikleri

Plazma ve idrar ürik asid konsantrasyonları hem tüketici egzersiz grubunda hem de ürikaz inhibitörü oksonik asid verilen hiperürisemi grubunda istatistiksel olarak önemli düzeyde artmıştır. Sonuçlar Tablo 4.3’de görülmektedir.

Plazma ürik asid konsantrasyonu ve glomerüler filtrasyon hızının çarpımı ile hesaplanan 1 dakikada ultrafiltrata geçen ürik asid miktarı, kontrol ve egzersiz gruplarında birbirine benzer iken, hiperürisemi grubunda bu değer istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur (p<0.01).

İdrar akım hızı ve idrar ürat konsantrasyonunun çarpımı ile hesaplanan 1 dakikada idrarla atılan ürik asid miktarı, hiperürisemi grubunda kontrole göre önemli düzeyde artarken (p<0,001), egzersiz grubu ve kontrol grubu değerleri birbirine yakın bulunmuştur.

Yukarıda tanımlandığı şekilde hesaplanan filtre olan ürat ile idrara geçen ürat miktarları arasındaki fark geri emilen ürat miktarı olarak kabul edilmiştir. Hesaplanan bu değer, kontrol ve egzersiz grubunda birbirinden farklı değilken, hiperürisemi grubundaki artış istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p<0,05).

Atılan ve emilen ürat miktarları, filtre olan üratın % değeri olarak hesaplandığında ise kontrol sıçanlarında filtre olan üratın %96,57±0,43’ünün geri emildiği ve %3,43±0,43’ünün ise idrar ile atıldığı gözlenmiştir. Bu değerler E ve H gruplarında istatistiksel olarak önemli ölçüde değişmemiştir (Tablo 4.3).



**Tablo 4.3:** K, E ve H gruplarında plazma ve idrarda ölçülen ürik asid değerleri ile hesaplanmış filtre olan, idrarla atılan ve emilen ürik asid sonuçları.

	<b>K</b>	<b>E</b>	<b>H</b>
Plazma ürik asid (mg/dl)	0,81±0,03	1,22±0,07**	1,95±0,23*** ###
İdrar ürik asid (mg/dl)	3,00±0,39	4,80±0,41**	7,29±0,61***##
Filtre olan ürik asid (µg/dk)	6,74±1,84	6,42±1,12	13,24±1,65**#
İdrarla atılan ürik asid (µg/dk)	0,19±0,04	0,21±0,02	0,68±0,14***###
Emilen ürik asid (µg/dk)	6,56±1,84	6,88±0,87	12,56±1,64*#
Atılan ürik asid (%)	3,43±0,43	4,03±1,05	5,42±1,15
Geri emilen ürik asid (%)	96,57±0,43	96,05±1,07	94,58±1,05

K grubundan fark; \*p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\*p<0,001  
E grubundan fark; #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001  
Her grup için n=10

#### 4.2. Taşıyıcı Proteinlerin Fonksiyonel Olarak Değerlendirilmesi

Metodolojide tanımlanan protokollere maruz bırakılan proksimal tübüllerde 30 dakikalık inkübasyonu takiben biriken urat miktarları ölçülmüş ve sonuçlar Tablo 4.4'de sunulmuştur.

**Tablo 4.4.** Farklı protokollerde 30 dk. inkübasyonu takiben proksimal tübülde ölçülen urat miktarları.

<b>Doku urat (µg/mg protein)</b>	<b>K</b>	<b>E</b>	<b>H</b>
<b>0. Protokol (P0)</b>	7,79±1,85	6,06±0,84	8,46±1,69
<b>1. Protokol (P1)</b>	11,76±2,93	10,53±1,45	14,88±1,99
<b>2. Protokol (P2)</b>	7,45±1,99	7,52±1,06	6,79±1,62
<b>3. Protokol (P3)</b>	8,67±2,17	9,55±1,32	9,79±1,82
<b>4. Protokol (P4)</b>	8,89±2,30	8,55±1,19	9,27±1,68
<b>5. Protokol (P5)</b>	9,16±2,30	8,00±1,11	8,81±1,73

**P0:** Bazal koşullarda, ortama urat eklenmeden tübülde ölçülen endojen urat miktarı.  
**P1:** 100 µM urat varlığında, URAT1, OAT1 ve OAT3 inhibitörleri yokluğunda ölçülen urat miktarı.  
**P2:** 100 µM urat ile URAT1, OAT1 ve OAT3 inhibitörleri varlığında ölçülen urat miktarı.  
**P3:** 100 µM urat ile OAT1 ve OAT3 inhibitörü varlığında ölçülen urat miktarı.  
**P4:** 100 µM urat ile URAT1 ve OAT3 inhibitörleri varlığında ölçülen urat miktarı.  
**P5:** 100 µM urat ile URAT1 inhibitörü varlığında ölçülen urat miktarı.

İzole proksimal tübüllerde başlangıçta var olan ürat miktarlarının ölçüldüğü P0 protokolünde, değerlerin egzersiz grubunda kontrole göre düşük ve hiperürisemi grubunda yüksek olduğu gözlenmiş, ancak bu değişimlerde istatistiksel olarak bir önemlilik bulunamamıştır.

Bazal ürat miktarlarının ölçüldüğü P0 protokolü ile bilinen giriş çıkışların inhibe edildiği 2. protokolde, proksimal tübülde ölçülen ürat miktarları birbirine çok yakın olduğundan non-selektif giriş ve çıkışların deneyimizde önemli bir katkısının olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Bu nedenle, P2’de elde edilen sonuçlar P1, P3, P4 ve P5’de elde edilen sonuçlardan çıkartılarak taşıyıcıların ürat transportuna olan katkıları değerlendirilmiştir. Bu şekilde hesaplanan sonuçlar Tablo 4.5 ve Şekil 4.2’de sunulmuştur.

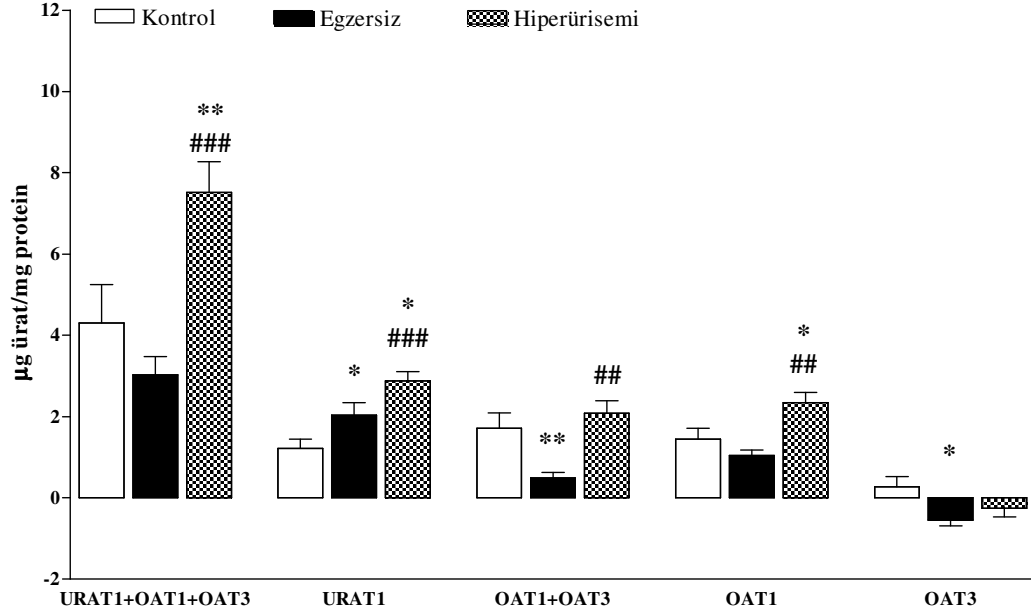
**Tablo 4.5.** Proksimal tübüle ürat girişine farklı taşıyıcıların katkısı.

<b>Doku ürat (µg/mg protein)</b>		<b>K</b>	<b>E</b>	<b>H</b>
<b>P1-P2</b>	OAT1, OAT3, URAT1 aracılı girişin katkısı	4,30±0,95	3,02±0,46	7,51±0,76 **###
<b>P3-P2</b>	URAT1 aracılı girişin katkısı	1,22±0,22	2,03±0,31 *	2,88±0,23 *###
<b>P5-P2</b>	OAT1 ve OAT3 aracılı girişin katkısı	1,71±0,38	0,49±0,13 **	2,08±0,31 ##
<b>P4-P2</b>	OAT1 aracılı girişin katkısı	1,44±0,27	1,04±0,14	2,34±0,25 *##
<b>P5-P4</b>	OAT3 aracılı girişin katkısı	0,27±0,25	-0,55±0,14 *	-0,26±0,21

Kontrol grubundan fark \*p<0,05, \*\*p<0,01  
Egzersiz grubundan fark #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001  
Her grup için n=8

Bu tablodan görüleceği gibi kontrol grubunda 30 dakikalık süre içinde proksimal tübüle incelenen her üç taşıyıcı aracılığı ile 4,30±0,95 µg/mg protein ürat alınmıştır. Egzersiz grubunda ise aynı sürede tübüle giren ürat miktarında istatistiksel önem göstermese de bir azalma dikkati çekmiştir. Hiperürisemik grupta içeri alınan ürat miktarında belirgin şekilde artış gözlenmiştir.

Kontrol grubunda URAT1 ve OAT1’in ürat girişindeki payları birbirine yakın, hatta OAT1 ile taşınan miktar daha fazla iken OAT3’ün katkısının oldukça az olduğu görülmüştür. Egzersiz bu durumu değiştirerek URAT1 aracılı girişi ön plana çıkarmıştır. OAT3 ile giriş ortadan kalkmış ve ters yönde taşınma ortaya çıkmıştır. Hiperürisemide ise URAT1 ve OAT1 aracılı taşınma, hem sedanterlere hem de egzersiz yapan deneklere göre anlamlı artmış ancak OAT3’te bir baskılanma, hatta ters yönde taşınma ortaya çıkmıştır (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2.** İzole proksimal tübüllerde OAT1, OAT3 ve URAT1 aracılı ürat transportu. Kontrol grubuna göre istatistiksel fark; \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001. Egzersiz grubuna göre istatistiksel fark; #p<0,05, ##p<0,001, ###p<0,001 Her grup için n=8

### 4.3. URAT1, OAT1 ve OAT3 mRNA Değişimleri

Tüm gruplarda böbrek korteksinde ölçülen OAT1, OAT3 ve URAT1 mRNA miktarları, aynı dokuda ölçülen Beta-aktin mRNA miktarına oranlanmıştır. Her bir örnek için mRNA ölçümü 3 kez tekrarlanmış ve sonuçlarının ortalaması alınmıştır. Sonuçlar Şekil 4.3 ve 4.4’de sunulmuştur.

#### 4.3.1. URAT1 mRNA Değişimleri

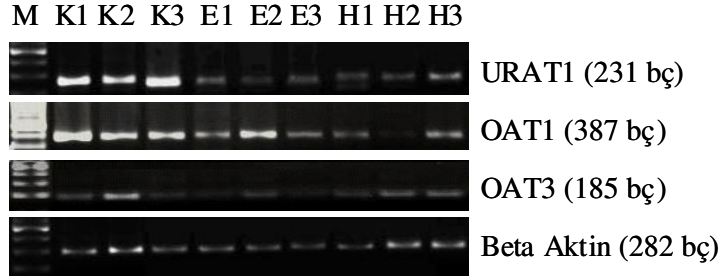
Kontrol grubunda  $6,40 \pm 2,66$  olarak saptanan URAT1 mRNA düzeyi, egzersiz grubunda  $2,38 \pm 0,70$  ve hiperürisemi grubunda  $1,94 \pm 0,83$  olarak bulunmuştur. Egzersiz ve hiperüriseminin neden olduğu bu düşüş her iki grupta da istatistiksel olarak önemli düşük bulunmuştur ( $p < 0,001$ ).

#### 4.3.2. OAT1 mRNA Değişimleri

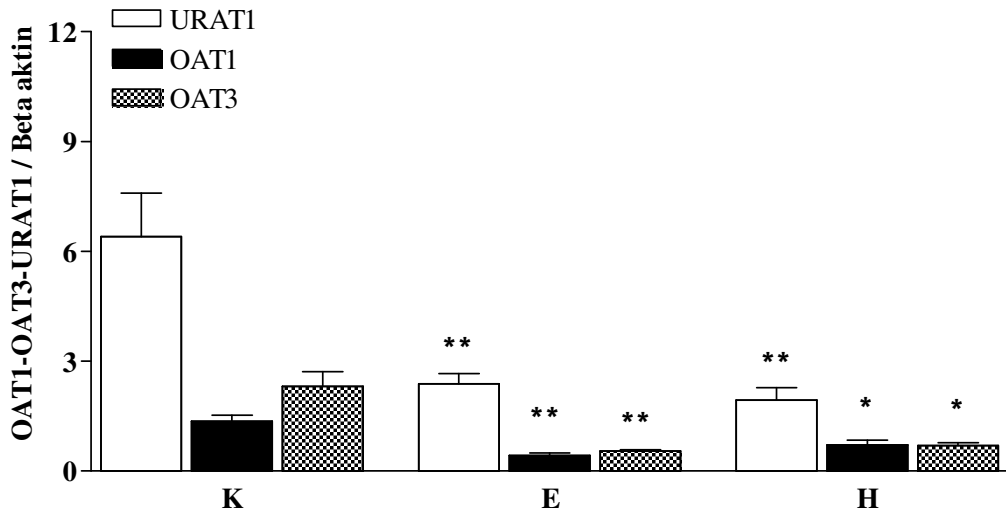
Kontrol grubunda  $1,36 \pm 0,38$  olan OAT1/Beta aktin oranı, Egzersiz ( $0,43 \pm 0,15$ ;  $p < 0,001$ ) ve Hiperürisemi ( $0,72 \pm 0,29$ ;  $p < 0,01$ ) gruplarında istatistiksel olarak önemli düzeyde azalmıştır.

### 4.3.3. OAT3 mRNA Değişimleri

Böbrek korteksinde OAT3 mRNA düzeyi, egzersiz ( $0,51 \pm 0,08$ ;  $p < 0,05$ ) ve hiperürisemi ( $0,69 \pm 0,19$ ;  $p < 0,01$ ) gruplarında kontrol ( $2,31 \pm 0,99$ ) değerlerine göre düşük bulunmuştur.



Şekil 4.3. OAT1, OAT3 ve URAT1 PZR örnekleri



Şekil 4.4. Böbrek korteksinde OAT1, OAT3 ve URAT1 mRNA düzeyleri. Kontrole göre istatistiksel fark; \* $p < 0,01$ , \*\* $p < 0,001$  ( $n=5$ ).

#### 4.4. URAT1, OAT1 ve OAT3 Protein Düzeyleri

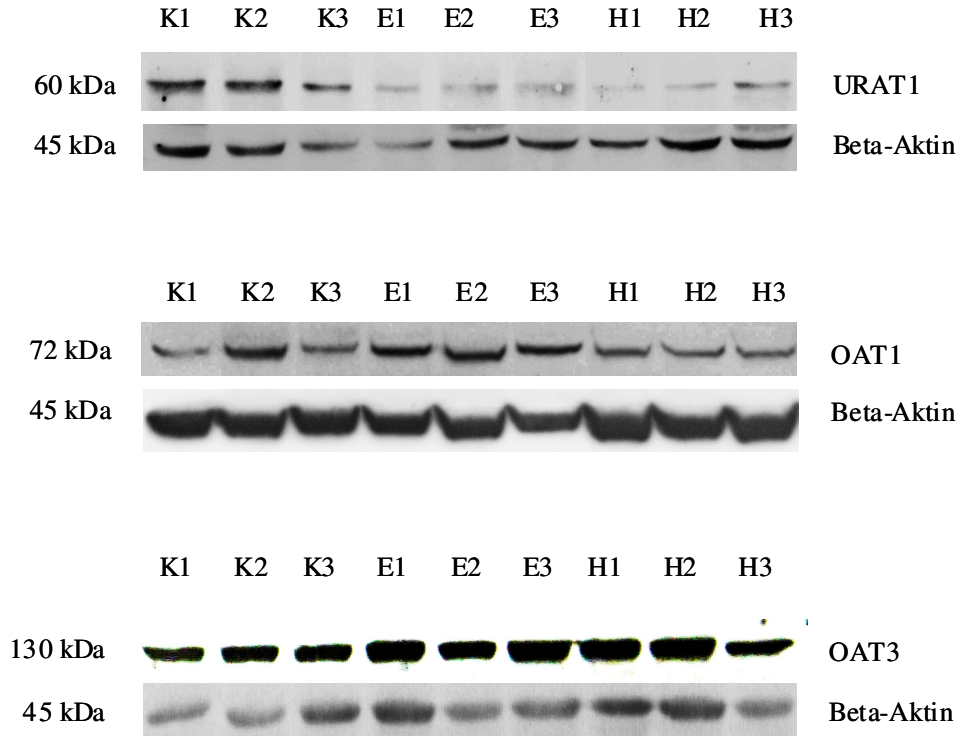
Tüm gruplarda böbrek korteksinde ölçülen OAT1, OAT3 ve URAT1 protein düzeyleri, aynı dokuda ölçülen Beta-aktin miktarına oranlanmıştır. Her bir örnek için 3 kez tekrarlanan ölçümlerin ortalaması alınmış ve sonuçlar Şekil 4.5 ve 4.6'da sunulmuştur.

##### 4.4.1. URAT1 Protein Düzeyi

Yaklaşık 60 kDa ağırlığında gözlenen URAT1 proteininin böbrek korteksindeki düzeyi kontrol grubunda  $1,09 \pm 0,02$  olarak saptanmıştır. Egzersiz ve hiperürisemi bu proteinin ekspresyonunda istatistiksel olarak önemli düşümlere neden olmuştur. URAT1/Beta aktin oranı, egzersiz grubunda  $0,90 \pm 0,05$  ( $p < 0,01$ ) ve hiperürisemi grubunda  $0,89 \pm 0,03$  ( $p < 0,01$ ) olarak ölçülmüştür.

##### 4.4.2. OAT1 Protein Düzeyi

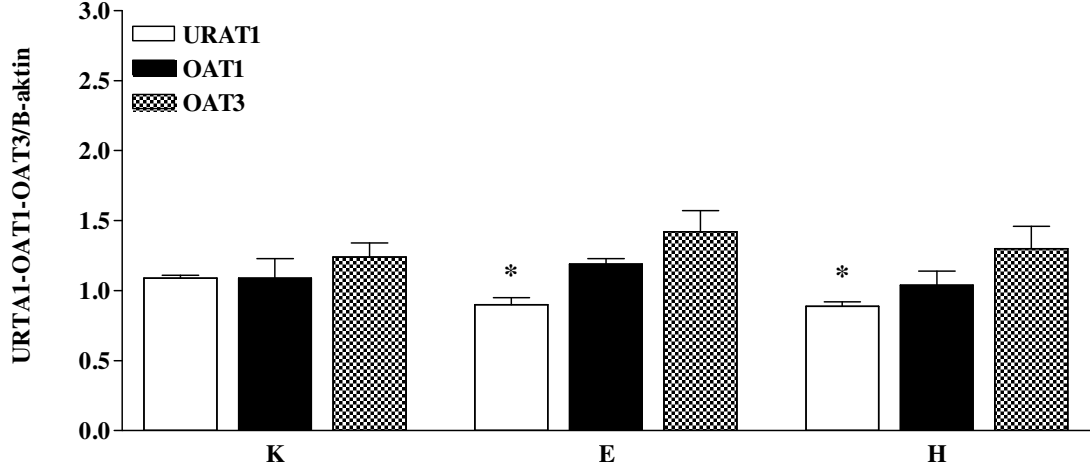
Yaklaşık ağırlığı 72 kDa olarak gözlenen OAT1 proteininin ekspresyon düzeyi egzersiz ve hiperürisemiden etkilenmemiştir. OAT1/beta aktin oranı kontrol grubunda  $1,09 \pm 0,14$ , egzersiz grubunda  $1,19 \pm 0,04$  ve hiperürisemi grubunda  $1,04 \pm 0,10$  olarak saptanmıştır.



Şekil 4.5. URAT1, OAT1 ve OAT3'ün western blot örnekleri

#### 4.4.3. OAT3 Protein Düzeyi

Sıçanda 130 kDa'luk bir protein olan OAT3'ün böbrek korteksindeki düzeyi kontrol grubunda  $1,24 \pm 0,1$  olarak saptanmıştır. Bu değer egzersiz grubunda  $1,42 \pm 0,15$  ve hiperürisemi grubunda  $1,30 \pm 0,16$  olarak hesaplanmıştır. Değerler, gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark göstermemektedir.



Şekil 4.6. Böbrek korteksinde OAT1, OAT3 ve URAT1 protein düzeyleri. Kontrol grubuna göre istatistiksel fark; \* $p < 0,01$ . (n=5)

## TARTIŞMA

Çalışmamızda, egzersiz esnasında kanda yükselen ürik asidin böbrekler tarafından uzaklaştırılmasında rol alan proksimal tübül taşıyıcıları OAT1, OAT3 ve URAT1'in aktivite ve ekspresyonunda, egzersize bağlı olası adaptif değişikliklerin incelenmesi amaçlanmıştır.

İstemli ve sistemli kassal aktivite artışı olarak tanımlanan egzersizin, bireyin beden ve ruh sağlığı üzerine olan olumlu etkileri yanında toplumsal yararları da çok yönlü incelenmiştir [158-160]. Son yıllarda yapılan çalışmalar, istemsiz (forced) egzersizin, egzersizden beklenen yararları sağlamayacağını öne sürmektedir [114,121,129,130,161,162]. Bu çalışmalar dikkate alındığında, çeşitli deneysel egzersiz modelleri kullanılarak yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçların istem dışı kassal aktiviteyi yansıtacağı ve deneysel ve insan çalışmalarının sonuçları arasındaki bazı tutarsızlıkların açıklanmasında bu farkın önemli olabileceği düşünülmektedir.

İster istemli, isterse istemeden yapılsın, her türlü kassal aktivite esnasında böbreğe giden kan akımı önce kesintiye uğrayıp, sonra normale dönmektedir [120, 163]. Böylece hem atletler, hem de bedenen çalışan işçilerde (istemsiz kassal aktivite) kassal aktivitenin böbrekler üzerine iskemi-reperfüzyon benzeri bir etkisi olmaktadır. Ağır egzersizin böbrekler üzerine olumlu etkilerinin yanı sıra glikozüri, hematüri ve proteinüri gibi olumsuz etkilerinin bildirilmesi de, böbreklerde egzersiz sonrası bir takım değişikliklerin olduğunu göstermektedir [113,114,119-121,128-130,161,162]. Bu düşünceden hareket ederek, haftanın 5 günü çalışan bir işçinin veya her gün yorucu antrenmana maruz kalan atletlerin böbreklerine, egzersiz ile binen yükün ve bu yüke böbreklerin adaptif cevabının daha gerçekçi incelenebileceği bir model oluşturmak amacı ile, biz çalışmamızı 5 gün ard arda tüketici egzersize maruz bırakılan sıçanlarda gerçekleştirdik.

Akut, ağır egzersiz modeli olarak kabul edilen koşu bandındaki tüketici egzersize 5 gün ard arda maruz bırakılan sıçanlarda yapılan analizler, vücut ağırlığı, su-yem tüketimi, GFR, böbrek kan akımı, ortalama kan basıncı gibi rutin parametrelerin bu egzersiz modelinden etkilenmediğini göstermiştir. Bu sonuçlar literatürdeki benzer çalışmaların sonuçları ile uyumludur [121,164]. Ağır kassal aktivitenin proteinüri ve glukozüri yapıcı etkisini gösteren yayınları destekler şekilde egzersiz grubu deneklerin idrarında hem glukoz hem de protein miktarı önemli artış sergilemiştir (Tablo 4.2) [121,122,125]. Soleus kasında ölçülen sitrat sentaz enzim aktivitesindeki artış, seçilen egzersiz modelinin yeterli oksidatif fosforilasyon artışına neden olduğunun kanıtıdır [157]. Bu hayvanlarda, kan ürik asid miktarının artışı da kassal aktivite esnasında artan pürin yıkım ürünü olarak, dolaylı yoldan kassal aktivite göstergesi olarak kabul edilebilir [16-18].

Ürik asid, plazmadaki önemli antioksidanlardan biri olmasına karşın kandaki düzeyi normal sınırlarda tutulmaya çalışılmaktadır. Plazmadaki ürik asid proteinlere bağlı olmadığından, egzersiz sırasında plazmada artan ürik asidin hemen hepsi kolaylıkla ultrafiltrata geçmektedir [7-11]. Bu nedenle egzersiz sonrası dönemde proksimal tübüle binen ürik asid yükü artmaktadır. Çalışmamızda, plazmada artan ürik asid böbrekler aracılı uzaklaştırılırken, böbreklerde egzersize has adaptif değişimler olup olmadığı incelenmek istendiğinden, ayrıca hiperürisemi oluşturulmuş bir grup çalışmaya dahil edilerek, hiperüriseminin böbreklerdeki olası etkisinin egzersize ait etkilerden ayırt edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla sıçanlara 5 gün boyunca intraperitoneal yoldan oksonik asid verilerek ürik asid yıkımı engellenmiştir. Bu uygulama sonucunda sıçanlarda kan ürat konsantrasyonu ve ürat itrah artışı gözlenmiştir (Tablo 4.3). Oksonik asid ile oluşturulan hiperürisemi, egzersizin neden olduğu ürat artışından daha fazla olsa da, hiperürisemide görülebilecek kan basıncı artışı, GFR azalışı ve proteinüri gibi olumsuz etkilerin ortaya çıkmasına neden olacak düzeyde değildir (Tablo 4.2). Bu nedenle, egzersizin neden olduğu böbrek fonksiyon değişimlerini, plazma ürat artışından kaynaklanan etkilerden ayırmak amacıyla bu iki grubun sonuçlarının karşılaştırılabileceği kanısına ulaşılmıştır.

Egzersiz, kasta artan pürin yıkımı nedeniyle plazmada ürat artışına neden olmaktadır [16-18]. Mikami ve Kitagawa [16] yaptıkları bir çalışmada, yoğun egzersizden hemen sonra plazma ürat konsantrasyonunun arttığını göstermişlerdir. Bu artışın egzersizden 1 saat sonra azalmakla birlikte, kontrolden hala yüksek olduğunu belirten araştırmacılar, ürat seviyesinin 7 saat sonra kontrol düzeyine döndüğünü ifade etmişlerdir. Çalışmamızda egzersiz yaptırılan sıçanlar, egzersiz bitiminden sonraki 1 saat içinde feda edilerek kan örnekleri alınmış ve plazmada ürat analizi yapılmıştır. Tablo 4.3'de görüldüğü gibi, egzersiz plazma ürat konsantrasyonunda, literatür ile uyumlu olarak istatistiksel önemde bir artış yapmıştır.

Egzersiz neden olduğu ürat yapımı ve plazma ürat artışına, idrar ürat konsantrasyonundaki yükselme eşlik etmekte ve böylece vücut, plazma ürat konsantrasyonunu normal değerlerine getirmeye çalışmaktadır. Stathis ve arkadaşları [17] insanlarda yaptıkları çalışmalarında, egzersizden sonraki ilk 8 saat boyunca idrar ürat konsantrasyonunun yüksek olduğunu ancak 8-24. saatlerde topladıkları idrar örneklerinde ürat konsantrasyonunun egzersiz yapan ve yapmayan gruplarda aynı olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda, egzersiz sonrasında farklı zaman aralıklarında idrar örneği toplanmamış, ancak denekler 4. gün egzersizin hemen bitiminde metabolik kafese alınarak 24 saatlik idrar örneği toplanmıştır. Bu örneklerde yapılan ürat ölçümleri 24 saatlik kümülatif ürat birikimini gösterdiğinden, literatüre benzer olarak egzersiz yapan grupta idrar ürat konsantrasyonu yüksek bulunmuştur.

Vücutta ürik asidin kronik olarak yüksek olması kan basıncı artışı, glomerüler hipertrofi, tübülointerstisyel fibrozis ve proteinüri gibi patolojilere neden olmaktadır [4,5,9,40,48,53,165]. Çalışmamızda, ürat yıkımını engellemek suretiyle oluşturduğumuz hiperürisemi grubunda, literatürde belirtilen patolojilerin ortaya çıkmayışı, hiperüriseminin sadece 5 günlük kısa bir geçmişe sahip olmasına



bağlanabilir kanısında. Ortalama 4 haftalık oksonik asid tedavisinden sonra kan basıncı artışı ve proteinüri gözlemlendiğini bildiren yayınlar bu düşüncemizi desteklemektedir [3,40].

Ürat eliminasyonunda ve geri emiliminde önemli olan nefron segmenti proksimal tübüldür. Bu segment boyunca, ultrafiltrata geçen üratın önce %99'luk kısmı geri emilmekte, ardından %50'si tekrar lümene salgılanmakta ve son olarak da %40'luk kısım tekrar geri emilmektedir. Sonuç olarak ultrafiltrata geçen üratın %90'ı proksimal tübüllerden geri kazanılmaktadır [9-11]. Bu yüksek geri kazanım, üratın güçlü antioksidan etkisi düşünüldüğünde [7,32-34] özellikle egzersize bağlı artmış renal ROS eliminasyonunda fizyolojik öneme sahip bir fonksiyondur. Bir başka ifade ile, egzersize uyum olarak böbrek proksimal tübülünden ürat geri emilimi, egzersizin tübülde iskemi/reperfüzyon benzeri etkisinin sonucunda artan ROS için güçlü bir süpürücü olabilir. Üratın reaktif nitrojen ve oksijen oluşumunu engelleyici etkisini gösteren yayınlar ve NO yarılanma süresini arttırdığını bildiren çalışmalar [30-34] bizim görüşümüzü, yani egzersizde adaptif olarak proksimal tübüle ulaşan üratın geri kazanılmasının fizyolojik açıdan önemli olacağını pekiştirmektedir.

Egzersizin proksimal tübülde ürat geri emilimine nasıl etki ettiğinin gösteren literatür bilgisi mevcut değildir. Fizyolojik koşullarda, yani sedanterlerde, filtre olan üratın %1-10'luk kısmı idrar ile atılmaktadır [9,10]. Bu bilgi ile uyumlu olarak, çalışmamızın kontrol deneklerinde ultrafiltrata geçen üratın  $3,43 \pm 0,43$ 'lük kısmının idrar ile atıldığı gözlemlenmiştir. Egzersiz yapan sıçanlarda, yüksek kan ürik asid düzeyine karşın, GFR'deki hafif azalışa bağlı olarak ultrafiltrata binen ürat yükü ve bunun idrarla atılan kısmında anlamlı değişim olmamıştır (Tablo 4.3). Hiperürisemik sıçanlarda ise hem filtre olan miktar hem de atılan miktar artmasına karşın, geri emilim ve atılım yüzde olarak sabit kalmıştır (Tablo 4.3). Bu sonuçlar, plazma ürat konsantrasyonu veya ultrafiltrata binen ürat konsantrasyonu ne kadar yüksek olursa olsun, geri emilen ve atılan ürat yüzdelerinin egzersiz ve hiperürisemiden etkilenmediğini göstermektedir.

Organizma üratı zararlı bir molekül olarak algılıyor olsaydı, adaptif önlem olarak onun eliminasyonuna yardım eden mekanizmaları arttırması veya geri emilimini azaltıcı önlemler alması gerekirdi. Fakat tam tersi olarak, proksimal tübülde üratın ultrafiltrata geçişini takiben geri emilim, sekresyon ve sekresyon sonrası geri emilim gibi karmaşık bir mekanizma ile üratı geri kazanmaya yönelik bir yol izlenmektedir [9-11]. Proksimal tübülde apikal ve bazolateral membrandaki ürat taşıyıcıları, üratın tübül içindeki döngüsüne aracılık etmektedir. Çalışmamızda, incelemek üzere seçtiğimiz ürat taşıyıcılarından URAT1 tübül hücresine apikal membrandan ürat girişine, OAT1 ve OAT3 ise bazolateral membrandan ürat girişine aracılık etmektedir. Bunlardan URAT1, bir ürat/anyon değiştiricisi olup, proksimal tübülün S1 ve S2 segmentinde filtre olan üratın %99'unun geri emiliminden sorumludur [9,10,73-77]. Bazolateral membranda yer alan OAT1 ve OAT3 ise kandan tübül içine tersiyer aktif olarak ürat kazanılmasında rol alırlar. Proksimal tübül epitel hücresine, hem kan hem de lümen tarafından bu yollarla giren ürat, şu an için çok açık olmayan fonksiyonunu bitirdikten sonra, tekrar UAT ve MRP4 gibi taşıyıcılarla lümene salgılanarak vücuttan uzaklaşmakta, bir kısmı ise tekrar kana

dönerek kan düzeyinin sabit tutulmasına katkıda bulunmaktadır (Şekil 2.4 ve 2.5) [9,67-69].

Üratin tübül sistemde artması asidik ortamda ürat taşı oluşumunu kolaylaştıracağından, bu tehlikesine karşın proksimal tübülde bir ürat döngüsü oluşturmanın fizyolojik önemi detaylı incelenmeyi gerektiren bir konudur. Biz çalışmamızda egzersize bağlı ürat artışının in vivo sonuçlarını pekiştirmek amacı ile ürat emiliminden sorumlu taşıyıcıların aktivitelerini spesifik inhibitörler varlığında ve yokluğunda izole proksimal tübül segmentlerinde in vitro olarak araştırdık. Tablo 4.4'de görüldüğü gibi proksimal tübül bazal ürat düzeyleri geri emilim-sekresyon-geri emilim döngüsüne karşın egzersiz ve hiperürisemi gruplarında anlamlı değişiklik göstermemiştir (P0). Çalışılan 3 ürat taşıyıcısı bloke edildiğinde bu dengenin ortamda ürat varlığına karşın korunması (P2) da nonspesifik başka kanallarla girişin deney koşullarımızda çok etkili olmadığını göstermektedir. URAT1 mutasyonlu idiyoPATİK renal hipourisemili hastalarda ultrafiltrata geçen üratın %100'ünün atıldığını gösteren Bahat ve arkadaşlarının [166] bulguları da apikalden girişte esas yolun URAT1 olduğunu göstermesi bakımından bizimle aynı fikirdedir.

Proksimal tübül ürat miktarı ekstraselüler kaynaklı olabileceği gibi, ksantin oksidaz enzim artışına bağlı intraselüler kaynaklı da olabilir. Ksantin oksidaz aktivasyonuna neden olan durumlar örneğin hipoksi ve iskemi, doku ürat miktarında artışa neden olmaktadır [20-23]. Tübül hücrelerinde ksantin oksidaz enziminin varlığı bilinmekle beraber [167-169], egzersizin enzim aktivitesinde önemli bir değişime neden olmadığı Koçer ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir [170]. Bu durum, egzersiz grubunda gözlediğimiz tübül segment ürat değişikliklerinde, hücre dışı kaynaklı üratın esas olduğunu düşündürmektedir.

İzole proksimal tübül segmentlerinde URAT1, OAT1 ve OAT3 aktif halde iken (P1) içeriye giren net ürat miktarı (Tablo 4.5, P1-P2), egzersiz grubunda kontrole göre hafif bir azalış, hiperürisemi grubunda ise önemli ( $p<0,01$ ) artış göstermiştir. Bu taşınmanın komponentleri incelendiğinde, kontrol grubunda 30 dakikada toplam  $4,30\pm 0,95$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein üratın taşınmasında bazolateraldeki OAT1 ( $1,44\pm 0,27$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein) ve apikaldeki URAT1 ( $1,22\pm 0,22$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein) benzer paya sahipken OAT3'ün rolünün oldukça az olduğu dikkati çekmiştir. Literatür bilgileri de ürat taşınmasında URAT1 ve OAT1'in daha etkin olduğunu, OAT3'ün daha az öneme sahip olduğunu doğrulamaktadır [15,171].

Egzersizde 30 dakika süreyle hücreye taşınan toplam ürat miktarı azalmışsa da bu azalış istatistiksel önem arz etmemiştir. Ancak egzersiz grubunda hücreye ürat girişinde birincil rol URAT1'e aittir. Kontrole göre 30 dakikada URAT1 aracılı taşınma anlamlı artmış, buna karşın OAT1 aracılı taşınmada değişme olmamıştır (Şekil4.2). Egzersizin yaptığı bir diğer değişiklik ise OAT3 aracılı ters yönlü taşınmadaki önemli artıştır. Egzersiz grubunda ortaya çıkan bu zıt yönlü OAT3 aracılı taşınma, URAT1 aracılı apikalden giriş artışını dengelemeye yönelik fonksiyonel bir adaptasyon olarak açıklanabilir ve bu zıt yönlü taşınma bazal ürat miktarındaki azalışın nedeni olabilir. Nitekim egzersizde bu taşıyıcı davranışları incelenmemiş olmakla birlikte OAT3'ün iki yönlü çalışabileceği oosit çalışmalarında gösterilmiştir [171,172].

Egzersizde proksimal tübüle yüklenen ürat miktarı artmamasına rağmen, URAT1 aktivite artışıyla apikal taraftan daha fazla üratı içeri taşıma çabasının fizyolojik önemi, üratın antioksidan özelliği olabilir. Aynı egzersiz modelini kullanarak proksimal tübülde ROS artışını gösterdiğimiz daha önceki çalışmamız [173] ve literatürdeki buna benzer çalışmalar [174,175] dikkate alındığında lüminal üratın emilimindeki artış, bir tür antioksidan savunma olarak kabul edilebilir.

Egzersizde gözlenen bu değişikliklerin egzersize özgü mü yoksa egzersizin sebep olduğu hiperürisemiye bağlı adaptif değişiklik mi olduğunu belirlemek amacı ile hiperürisemik hale getirilmiş sıçanlarda aynı taşıyıcıların davranışları incelenmiştir. Hiperürisemi grubunda plazma ürik asidinde anlamlı artışa karşın proksimal tübülde bazal ürik asid miktarındaki artış anlamlı bulunmamıştır. Nonselektif ürat giriş yolları da kontrolden farksızdır (Tablo 4.4, P2). Buna karşın OAT1, OAT3 ve URAT1 aracılı 30 dakikalık total ürat alınması kontrol ve egzersiz grubuna göre anlamlı artmıştır. Bu da hiperürisemideki giriş artışından incelediğimiz giriş yollarındaki artışın sorumlu olduğunu gösterir. Hiperürisemili grupta net ürat girişinde hem URAT1 hem de OAT1 rol alırken OAT3'ün katkısı ihmal edilebilir düzeyde azalmış, hatta zıt yönlü taşınma şekline dönmüştür (Tablo 4.4, Şekil 4.2). Bizim çalışmamıza benzer olarak Habu ve arkadaşları [176] hiperüriseminin renal organik anyon ve katyon taşıyıcılarına olan etkilerini inceledikleri çalışmalarında 10 gün süre ile sıçanlara %5 oksonik asid ve %2,5 ürik asid vererek hiperürisemi oluşturmuşlardır. Araştırmacılar bu şekilde oluşturulan hiperüriseminin hem OAT1 hem de OAT3 aktivitesinde azalışa neden olduğunu göstermişlerdir. Aynı araştırmada OAT1 ve OAT3 aktivite azlığına bu taşıyıcıların ekspresyonundaki azalışın da eşlik ettiği vurgulanmıştır. Bizim araştırmamızda saptanan plazma ürik asid düzeylerinin Habu ve arkadaşlarının bulgularına göre daha düşük olması, ürikaz inhibitörünün kullanma süresinin 5 gün ile sınırlı olması ve ürik asid verilmeyişi ile açıklanabilirse de, biz onların aksine kontrole göre OAT1 aracılı taşınmanın anlamlı arttığını, OAT3 aracılı taşınmanın ise tersine döndüğünü gözlemledik. Çalışmamızın western blot sonuçları OAT1 ve OAT3 protein miktarlarının değişmediğini, URAT1 proteininde ise anlamlı azalış olduğunu, her üç taşıyıcının mRNA düzeylerinin ise Habu ve arkadaşlarını destekler şekilde azaldığını göstermiştir. Bu sonuçlar dikkate alındığında hiperürisemi süresinin uzatılması halinde bulgularımız ile literatür arasındaki bu çelişkinin ortadan kalkacağı ve bizim hiperürisemik grubumuzda da OAT1 ve OAT3 aktivitesinin azalacağı düşünülebilir.

5 gün süre ile ağır egzersiz yaptırılması ürat taşınmasında görevli proteinlerin hem transkripsiyonunda hem de ekspresyonunda 5 günlük hiperürisemide görülene benzer etki yapmıştır. Bir başka ifade ile egzersizde artmış olan plazma ürik asid miktarı bu genlerin mRNA miktarlarını anlamlı baskılamış ancak bunların western blot ile ölçülen protein miktarlarında sadece URAT1'de anlamlı azalışa neden olmuştur. Halbuki fonksiyonel özelliklerine bakıldığında egzersiz ve hiperürisemi URAT1 aracılı taşınmada artışa neden olurken, egzersiz OAT1 ve OAT3 aracılı taşınmada azalışa neden olmuş bu azalış OAT3'de çok belirgin hal almıştır. Hiperürisemi ise OAT1 aracılı taşınmayı artırıcı yönde etkilemiştir. Hiperüriseminin OAT1 ve OAT3 aktivite ve ekspresyonuna olan azaltıcı etkisinin geçici olduğu ve hiperürisemiye neden olan faktörün ortadan kaldırılması ile 1-2 hafta içinde normale

döndüğü bilinmektedir [177]. Egzersizin etkisinin de zamana bağlı olup olmadığını saptamak için zamana bağlı inceleme gereklidir.

Daha önce de belirtildiği gibi ağır kassal aktivitenin ürat taşınmasında rol alan taşıyıcıların transkripsiyon ve aktivitesine etkisini gösteren başka çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak, OAT1 ve OAT3'ün böbrek korteksindeki ekspresyonu farklı amaçlarla pek çok çalışmada incelenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda, ekspresyonlarının çeşitli patofizyolojik koşullardan etkilendiği gösterilmiştir. Örneğin indoksil sülfat gibi üremik toksinler varlığında [15], bilateral üretral tıkanıklıkta ve akut safra yolları tıkanıklığında böbrekte OAT1 ve/veya OAT3 ekspresyonunun arttığı [178,179], iskemik akut böbrek yetmezliğinden sonra ise her iki taşıyıcının ekspresyonunun azaldığı [109] bilinmektedir. Böbrekte iskemi reperfüzyon hasarının bu taşıyıcıların ekspresyonunda azalışa neden olduğunu bildiren yayınların [107-109] yanı sıra artış yaptığını gösteren yayınlar da mevcuttur [110]. Egzersizin renal ürat taşıyıcı proteinlerin ekspresyon ve aktivasyonuna olan etkisi incelenmemiş olsa da, renal patolojide bu proteinlerin değiştiğinin gösterilmesi, ağır kassal aktivitenin proksimal tübülde yapısal ve fonksiyonel değişiklik yaptığını gösteren bulgularımızı dolaylı olarak desteklemektedir.

Proksimal tübül hücrelerinin, hiperürisemik sıçanlarda ve egzersiz yapan sıçanlarda artmış olan tübül ürat yüküne karşı davranışı birbirinden oldukça farklı gibi görünmektedir. Hiperürisemide hem kandaki, hem de lümendeki fazla ürat hücreye alınarak hücrede biriktirilmiştir. Nitekim maruziyet süresi uzatılmış olsa idi bu birikimin hücre patolojisi ile son bulacağı literatür çalışmaları ile sabittir [180,181]. Egzersizde ise ultrafiltrata geçen üratın böbrekler aracılı kullanılması hatta kana geri kazandırılması amaç gibi görünmektedir. URAT1'de anlamlı artış, OAT1'de azalış ve OAT3'de ters yönde taşınmanın ortaya çıkması bizi bu düşünceye itmiştir. Aynı kassal aktivitenin proksimal tübül segmenlerinde NO ve peroksinitrit artışına, kolesterol birikimi ve sitorezistans gelişimine neden olduğunu gösterdiğimiz önceki çalışmalarımızın [173] sonuçları ile birlikte düşünüldüğünde egzersizde ortaya çıkan lümenal üratı geri kazanma çabası, oldukça mantıklı bir adaptif değişim gibi görünmektedir. Üratın tübül hücrede azalmış olması ve zararlı bir ROS olan peroksinitriti daha az zararlı hale çevirdiğini bildiren yayınlar [30,32,37] bizim görüşümüzle uyumaktadır. Ancak hem western blot hem de mRNA (PZR) sonuçları ister egzersiz, isterse başka nedenle ürat artışının çalışılan taşıyıcılarda depresyona neden olduğunu göstermesi, bu taşıyıcılardaki devamlı depresyonun zamanla URAT1 mutasyonlu hiperürisemiklerde gözlenen benzer klinik renal tablonun tetiklenebileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmada bu düşüncemizi destekleyecek zamana bağlı inceleme yapılmamıştır, ancak ağır kassal aktivitenin böbrekleri savunmaya iten bir stres olacağı ve etkisi devamlı olduğunda yani vücuda toparlanma süreci verilmediğinde taşıyıcı ekspresyonundaki depresyonun devamlı olacağı ve bunun taşıyıcı aktivitelerine yansıtacağı görüşü oldukça mantıklıdır. Bu düşüncenin kesinlik kazanması için daha ileri çalışmalar gerekmektedir.

## SONUÇLAR

Bu deneysel çalışmamızın literatüre bir takım ilkler kazandırdığı kanısındayız. Bu ilkleri aşağıdaki şekilde sıralayabiliriz;

1. Literatürde ürat eliminasyonunun egzersizle nasıl değiştiğini inceleyen başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Egzersizde ürat yapımındaki artışa karşın geri emilim ve atılım yüzdelерinin korunması, üretilen ürattan antioksidan olarak yararlanma amacına yönelik bir adaptasyon olarak kabul edilmiştir.
2. İdrarla atılan ürat yüzdesinin sabit kalmasını destekler şekilde, proksimal tübüle lüminal ürat girişinin -URAT1 gen transkripsiyonu ve proteini azalmış olmasına karşın- artmış olması da literatürde olmayan bir bulgudur.
3. İlginç olarak, in vitro oosit çalışmalarında gösterildiği şekilde, egzersizde de OAT3'ün ters yönde çalıştığı gözlemlenmiştir. Egzersizde azalan bazolateral taşınma bu ters taşınma ile rahatlıkla açıklanabilir ve üratın kana kazandırılma çabası olarak yorumlanabilir. Tübül hücresindeki bazal ürat azlığından bu ters taşınma sorumlu tutulabilir.
4. Ağır kassal aktivite ile ürat taşıyıcılarından URAT1, OAT1, OAT3 gen transkripsiyonunda azalmayı gösteren başka araştırma olmayışına karşın, renal patolojilerde benzer değişikliğin gösterilmesi, ağır egzersizlerin renal bir stresör olduğunun bir kanıtı olabileceği kanısındayız.
5. Taşıyıcı proteinlerde gözlenen değişimlerden kassal aktivitenin sorumlu olmadığını, esas etkenin kan ürat artışı olduğunu gösteren sonuçlarımız, çalışmamızın bir başka orijinal yönüdür. Verilerimize göre hiperürisemi ürat taşıyıcılarının ekspresyonunu baskılamakta ve bu baskı en erken URAT1 protein miktarında kendini göstermektedir. Ancak, protein miktarındaki bu erken azalmayı telafi edersine URAT1 aktivitesinin hem egzersiz hem de hiperürisemide artması, lüminal ürat artışına karşı hücrenin akut bir adaptif uyumu gibi görünmektedir. Bu da ilk olarak çalışmamızda ortaya çıkarılmış orijinal bir bulgudur.
6. Araştırmamızın konuya getirdiği bir başka açıklık ise egzersizde alınan adaptif önlemlerin, artan üratın uzaklaştırılmasına yönelik olmadığını, aksine üratın kana kazandırılmasına yönelik değişimler olduğunun gösterilmesidir. Hiperürisemide ise ürat tübül hücresinde hapsedilmeye ve takiben atılmaya çalışıyor gibi görünmektedir.
7. Egzersizde görüldüğü halde hiperürisemide görülmeyen glukozüri ve proteinüri, bu iki madde taşıyıcısının ürat taşıyıcılarına göre egzersize bağlı

değişikliklere daha duyarlı olduğunu ve hiperürisemiden bağımsız olduğunu düşündürmektedir.

Sonuç olarak, ağır kassal aktivitede artan üratı uzaklaştırmaya değil, geri emerek kana kazandırmaya yönelik olan akut tübüler adaptif değişiklikler, aktivitenin aralıksız devam etmesi halinde kalıcı hale gelebilir. Bu durumda lümeninde biriken ürat, hiperüriseminin neden olduğu renal patolojiye yol açabilir. Ancak konunun pekiştirilmesi için daha ileri deneysel ve klinik araştırmalara gereksinim olduğu da açıktır.

## KAYNAKLAR

1. Choi HK, Mount DB, Reginato AM: Pathogenesis of gout. *Ann Intern Med* 2005;143:499-516.
2. Terkeltaub R: Gout in 2006: the perfect storm. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2006;64:82-6.
3. Kang DH, Nakagawa T, Feng L, Watanabe S, Han L, Mazzali M, Truong L, Harris R, Johnson RJ: A role for uric acid in the progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:2888-97.
4. Nakagawa T, Mazzali M, Kang DH, Kanellis J, Watanabe S, Sanchez-Lozada LG, Rodriguez-Iturbe B, Herrera-Acosta J, Johnson RJ: Hyperuricemia causes glomerular hypertrophy in the rat. *Am J Nephrol* 2003;23:2-7.
5. Johnson RJ, Kang DH, Feig D, Kivlighn S: Is there a pathogenetic role for uric acid in hypertension and cardiovascular and renal disease? *Hypertension* 2003;41:1183-1190.
6. Warig WS, E Shahana: How should serum uric acid concentrations be interpreted in patients with hypertension? *Current Hypertension Reviews* 2005;1:89-95.
7. Hooper DC, Spitsin S, Kean RB, Champion JM, Dickson GM, Chaudhry I, Koprowski H: Uric acid, a natural scavenger of peroxynitrite, in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:675-80.
8. Rentzos M, Nikolaou C, Anagnostouli M, Rombos A, Tsakanikas K, Economou M, Dimitrakopoulos A, Karouli M, Vassilopoulos D: Serum uric acid and multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 2006 108:527-31.
9. Hediger MA, Johnson RJ, Miyazaki H, Endou H: Molecular physiology of urate transport. *Physiology (Bethesda)* 2005;20:125-33.
10. You G: Structure, function, and regulation of renal organic anion transporters. *Med Res Rev* 2002;22:602-16.
11. Rizwan AN, Burekhardt G: Organic Anion Transporters of the SLC22 Family: Biopharmaceutical, Physiological, and Pathological Roles. *Pharm Res* 2007;24:450-470.
12. Kwon O, Wang WW, Miller S: Renal organic anion transporter 1 is

maldistributed and diminishes in proximal tubule cells but increases in vasculature after ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;295:F1807-16.

13. Brandoni A, Villar SR, Picena JC, Anzai N, Endou H, Torres AM: Expression of rat renal cortical OAT1 and OAT3 in response to acute biliary obstruction. *Hepatology* 2006;43:1092-100.
14. Sakurai Y, Motohashi H, Ueo H, Masuda S, Saito H, Okuda M, Mori N, Matsuura M, Doi T, Fukatsu A, Ogawa O, Inui K: Expression levels of renal organic anion transporters (OATs) and their correlation with anionic drug excretion in patients with renal diseases. *Pharm Res* 2004;21:61-7.
15. Enomoto A, Takeda M, Tojo A, Sekine T, Cha SH, Khamdang S, Takayama F, Aoyama I, Nakamura S, Endou H, Niwa T: Role of organic anion transporters in the tubular transport of indoxyl sulfate and the induction of its nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:1711-20.
16. Mikami T, Kitagawa J: Intense exercise induces the degradation of adenine nucleotide and purine nucleotide synthesis via de novo pathway in the rat liver. *Eur J Appl Physiol* 2006;96:543-50.
17. Stathis CG, Carey MF, Snow RJ: The influence of allopurinol on urinary purine loss after repeated sprint exercise in man. *Metabolism* 2005;54:1269-75.
18. Tullson PC, Bangsbo J, Hellsten Y, Richter EZ: IMP metabolism in human skeletal muscle after exhaustive exercise. *J Appl Physiol* 1995;78:146-152.
19. Abreu NP, Bergamaschi CT, di Marco GS, Razvickas CV, Schor N: Effect of an isotonic rehydration sports drink and exercise on urolithiasis in rats. *Braz J Med Biol Res* 2005;38:577-82.
20. Pritsos CA: Cellular distribution, metabolism and regulation of the xanthine oxidoreductase enzyme system. *Chem Biol Interact* 2000;129:195-208.
21. Harrison R: Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med* 2002;33:774-97.
22. Harrison R: Physiological roles of xanthine oxidoreductase. *Drug Metab Rev* 2004;36:363-75.
23. Boueiz A, Damarla M, Hassoun PM: Xanthine oxidoreductase in respiratory and cardiovascular disorders. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;294:L830-40.
24. Houston M, Estevez A, Chumley P, Aslan M, Marklund S, Parks DA, Freeman BA: Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium. *Kinetic*



characterization and oxidative impairment of nitric oxide-dependent signaling. *J Biol Chem* 1999;274:4985-94.

25. Kayyali US, Donaldson C, Huang H, Abdelnour R, Hassoun PM: Phosphorylation of xanthine dehydrogenase/oxidase in hypoxia. *J Biol Chem* 2001;276:14359-65.
26. Sánchez-Lozada LG, Nakagawa T, Kang DH, Feig DI, Franco M, Johnson RJ, Herrera-Acosta J: Hormonal and cytokine effects of uric acid. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006;15:30-3.
27. Ohno M, Ka T, Inokuchi T, Moriwaki Y, Yamamoto A, Takahashi S, Tsutsumi Z, Tsuzita J, Yamamoto T, Nishiguchi S: Effects of exercise and grape juice ingestion in combination on plasma concentrations of purine bases and uridine. *Clin Chim Acta* 2008;388:167-72.
28. Gibson T, Rodgers AV, Simmonds HA, Court-Brown F, Todd E, Meilton V: A controlled study of diet in patients with gout. *Ann Rheum Dis* 1983;42:123-7.
29. Heinig M, Johnson RJ: Role of uric acid in hypertension, renal disease, and metabolic syndrome. *Cleve Clin J Med* 2006;73:1059-64.
30. Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S: Interactions of peroxynitrite with uric acid in the presence of ascorbate and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric oxide synthase. *Biochem Pharmacol* 2005;70:343-54.
31. Sevanian A, Davies KJ, Hochstein P: Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid. *Am J Clin Nutr* 1991;54:1129S-1134S.
32. Robinson KM, Morré JT, Beckman JS: Triuret: a novel product of peroxynitrite-mediated oxidation of urate. *Arch Biochem Biophys* 2004;423:213-7.
33. Waring WS, Webb DJ, Maxwell SR: Systemic uric acid administration increases serum antioxidant capacity in healthy volunteers. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001;38:365-71.
34. Waring WS, Convery A, Mishra V, Shenkin A, Webb DJ, Maxwell SR: Uric acid reduces exercise-induced oxidative stress in healthy adults. *Clin Sci* 2003;105:425-30.
35. Maxwell SR, Thomason H, Sandler D, Leguen C, Baxter MA, Thorpe GH, Jones AF, Barnett AH: Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* 1997;27:484-90.

36. Yu ZF, Bruce-Keller AJ, Goodman Y, Mattson MP: Uric acid protects neurons against excitotoxic and metabolic insults in cell culture, and against focal ischemic brain injury in vivo. *J Neurosci Res* 1998;53:613-25.
37. Hink HU, Santanam N, Dikalov S, McCann L, Nguyen AD, Parthasarathy S, Harrison DG, Fukai T: Peroxidase properties of extracellular superoxide dismutase: role of uric acid in modulating in vivo activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1402-8.
38. Edwards NL: The role of hyperuricemia and gout in kidney and cardiovascular disease. *Cleve Clin J Med* 2008;75:S13-6.
39. Pillinger MH, Rosenthal P, Abeles AM: Hyperuricemia and gout: new insights into pathogenesis and treatment. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2007;65:215-21.
40. Mazzali M, Hughes J, Kim YG, Jefferson JA, Kang DH, Gordon KL, Lan HY, Kivlighn S, Johnson RJ: Elevated uric acid increases blood pressure in the rat by a novel crystal-independent mechanism. *Hypertension* 2001;38:1101-6.
41. Price KL, Sautin YY, Long DA, Zhang L, Miyazaki H, Mu W, Endou H, Johnson RJ: Human vascular smooth muscle cells express a urate transporter. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:1791-5.
42. Kang DH, Han L, Ouyang X, Kahn AM, Kanellis J, Li P, Feng L, Nakagawa T, Watanabe S, Hosoyamada M, Endou H, Lipkowitz M, Abramson R, Mu W, Johnson RJ: Uric acid causes vascular smooth muscle cell proliferation by entering cells via a functional urate transporter. *Am J Nephrol* 2005;25:425-33.
43. Zharikov S, Krotova K, Hu H, Baylis C, Johnson RJ, Block ER, Patel J: Uric acid decreases NO production and increases arginase activity in cultured pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;295:C1183-90.
44. Menè P, Punzo G: Uric acid: bystander or culprit in hypertension and progressive renal disease? *J Hypertens* 2008;26:2085-92.
45. Khosla UM, Zharikov S, Finch JL, Nakagawa T, Roncal C, Mu W, Krotova K, Block ER, Prabhakar S, Johnson RJ: Hyperuricemia induces endothelial dysfunction. *Kidney Int* 2005;67:1739-42.
46. Suzuki T: Nitrosation of uric acid induced by nitric oxide under aerobic conditions. *Nitric Oxide* 2007;16:266-73.
47. Nakagawa T, Hu H, Zharikov S, Tuttle KR, Short RA, Glushakova O, Ouyang X, Feig DI, Block ER, Herrera-Acosta J, Patel JM, Johnson RJ: A

causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;290:F625-31.

48. Nakagawa T, Mazzali M, Kang DH, Sanchez-Lozada LG, Herrera-Acosta J, Johnson RJ: Uric acid-a uremic toxin? *Blood Purif* 2006;24:67-70.
49. Ejaz AA, Mu W, Kang DH, Roncal C, Sautin YY, Henderson G, Tabah-Fisch I, Keller B, Beaver TM, Nakagawa T, Johnson RJ: Could uric acid have a role in acute renal failure? *Clin J Am Soc Nephrol* 2007;2:16-21.
50. Sanchez-Lozada LG, Tapia E, Santamaria J, Avila-Casado C, Soto V, Nepomuceno T, Rodriguez-Iturbe B, Johnson RJ, Herrera-Acosta J: Mild hyperuricemia induces vasoconstriction and maintains glomerular hypertension in normal and remnant kidney rats. *Kidney Int* 2005;67:237-247.
51. Sanchez-Lozada LG, Tapia E, Avila-Casado C, Soto V, Franco M, Santamaria J, Nakagawa T, Rodriguez-Iturbe B, Johnson RJ, Herrera-Acosta J: Mild hyperuricemia induces glomerular hypertension in normal rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;283:F1105 -F1110.
52. Kang DH, Park SK, Lee IK, Johnson RJ: Uric acid-induced C-reactive protein expression: implication on cell proliferation and nitric oxide production of human vascular cells. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:3553-62.
53. Capasso G, Jaeger P, Robertson WG, Unwin RJ: Uric acid and the kidney: urate transport, stone disease and progressive renal failure. *Curr Pharm* 2005;11:4153-9.
54. Bihl G, Meyers A: Recurrent renal stone disease-advances in pathogenesis and clinical management. *Lancet* 2001;358:651-6.
55. Toncev G, Milicic B, Toncev S, Samardzic G: Serum uric acid levels in multiple sclerosis patients correlate with activity of disease and blood-brain barrier dysfunction. *Eur J Neurol* 2002;9:221-6.
56. Koch M, De Keyser J: Uric acid in multiple sclerosis. *Neurol Res* 2006;28:316-9.
57. Kean RB, Spitsin SV, Mikheeva T, Scott GS, Hooper DC: The peroxy nitrite scavenger uric acid prevents inflammatory cell invasion into the central nervous system in experimental allergic encephalomyelitis through maintenance of blood-central nervous system barrier integrity. *J Immunol* 2000;165:6511-8.
58. Toncev G: Therapeutic value of serum uric acid levels increasing in the treatment of multiple sclerosis. *Vojnosanit Pregl* 2006;63:879-82.

59. Scott GS, Spitsin SV, Kean RB, Mikheeva T, Koprowski H, Hooper DC: Therapeutic intervention in experimental allergic encephalomyelitis by administration of uric acid precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:16303-8.
60. Weisskopf MG, O'Reilly E, Chen H, Schwarzschild MA, Ascherio A: Plasma urate and risk of Parkinson's disease. *Am J Epidemiol* 2007;166:561-7.
61. Koeppen BM, Stanton BA: Renal System. In: Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA eds. *Berne and Levy Physiology*. Mosby;2008:555-576.
62. Gerich JE, Meyer C, Woerle HJ, Stumvoll M: Renal gluconeogenesis: its importance in human glucose homeostasis. *Diabetes Care* 2001;24:382-91.
63. Nagami GT: Ammonia production and secretion by the proximal tubule. *Am J Kidney Dis* 1989;4:258-261.
64. 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* 1989;256:F1104-F1110.
65. Choi JY, Shah M, Lee MG, Schultheis PJ, Shull GE, Muallem S, Baum M: Novel amiloride-sensitive sodium-dependent proton secretion in the mouse proximal convoluted tubule. *J Clin Invest* 2000;105:1141-6.
66. Gluck SL, Underhill DM, Iyori M, Holliday LS, Kostrominova TY, Lee BS: Physiology and biochemistry of the kidney vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Annu Rev Physiol* 1996;58:427-45.
67. Wright SH, Dantzler WH: Molecular and cellular physiology of renal organic cation and anion transport. *Physiol Rev* 2004;84:987-1049.
68. Eraly SA, Bush KT, Sampogna RV, Bhatnagar V, Nigam SK: The molecular pharmacology of organic anion transporters: from DNA to FDA? *Mol Pharmacol* 2004;65:479-87.
69. Launay-Vacher V, Izzedine H, Karie S, Hulot JS, Baumelou A, Deray G: Renal Tubular Drug Transporters. *Nephron Physiol* 2006;103:97-106.
70. Miyazaki H, Sekine T, Endou H: The multispecific organic anion transporter family: properties and pharmacological significance. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25:654-62.
71. Rafey MA, Lipkowitz MS, Leal-Pinto E, Abramson RG: Uric acid transport. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003;12:511-6.
72. Enomoto A, Endou H: Roles of organic anion transporters (OATs) and a urate transporter (URAT1) in the pathophysiology of human disease. *Clin*

Exp Nephrol 2005;9:195-205.

73. Mori K, Ogawa Y, Ebihara K, Aoki T, Tamura N, Sugawara A, Kuwahara T, Ozaki S, Mukoyama M, Tashiro K, Tanaka I, Nakao K: Kidney-specific expression of a novel mouse organic cation transporter-like protein. *FEBS Lett* 1997;417:371-4.
74. Enomoto A, Kimura H, Chairoungdua A, Shigeta Y, Jutabha P, Cha SH, Hosoyamada M, Takeda M, Sekine T, Igarashi T, Matsuo H, Kikuchi Y, Oda T, Ichida K, Hosoya T, Shimokata K, Niwa T, Kanai Y, Endou H: Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature* 2002;417:447-52.
75. Anzai N, Miyazaki H, Noshiro R, Khamdang S, Chairoungdua A, Shin HJ, Enomoto A, Sakamoto S, Hirata T, Tomita K, Kanai Y, Endou H: The multivalent PDZ domain-containing protein PDZK1 regulates transport activity of renal urate-anion exchanger URAT1 via its C terminus. *J Biol Chem* 2004;279:45942-50.
76. Hosoyamada M, Ichida K, Enomoto A, Hosoya T, Endou H: Function and localization of urate transporter 1 in mouse kidney. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:261-8.
77. Srimaroeng C, Perry JL, Pritchard JB: Physiology, structure, and regulation of the cloned organic anion transporters. *Xenobiotica* 2008;38:889-935.
78. Li T, Walsh JR, Ghishan FK, Bai L: Molecular cloning and characterization of a human urate transporter (hURAT1) gene promoter. *Biochim Biophys Acta* 2004;1681:53-8.
79. Sperling O: Hereditary renal hypouricemia. *Mol Genet Metab* 2006;89:14-8.
80. Yeun JY, Hasbargen JA: Renal hypouricemia: prevention of exercise-induced acute renal failure and a review of the literature. *Am J Kidney* 1995;25:937-46.
81. Meisel AD, Diamond HS: Hyperuricosuria in the Fanconi syndrome. *Am J Med Sci* 1977;273:109-15.
82. Kojima R, Sekine T, Kawachi M, Cha SH, Suzuki Y, Endou H: Immunolocalization of multispecific organic anion transporters, OAT1, OAT2, and OAT3, in rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:848-57.
83. Kwak JO, Kim HW, Oh KJ, Kim DS, Han KO, Cha SH: Co-localization and interaction of organic anion transporter 1 with caveolin-2 in rat kidney. *Exp Mol Med* 2005;37:204-12.
84. Burckhardt G, Bahn A, Wolff NA: Molecular physiology of renal p-

aminohippurate secretion. *News Physiol Sci* 2001;16:114-8.

85. Eraly SA, Vallon V, Vaughn DA, Gangoiti JA, Richter K, Nagle M, Monte JC, Rieg T, Truong DM, Long JM, Barshop BA, Kaler G, Nigam SK: Decreased renal organic anion secretion and plasma accumulation of endogenous organic anions in OAT1 knock-out mice. *J Biol Chem* 2006;281:5072-83.
86. Hosoyamada M, Sekine T, Kanai Y, Endou H: Molecular cloning and functional expression of a multispecific organic anion transporter from human kidney. *Am J Physiol* 1999;276:F122-8.
87. Vallon V, Rieg T, Ahn SY, Wu W, Eraly SA, Nigam SK: Overlapping in vitro and in vivo specificities of the organic anion transporters OAT1 and OAT3 for loop and thiazide diuretics. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;294:F867-73.
88. El-Sheikh AA, Masereeuw R, Russel FG: Mechanisms of renal anionic drug transport. *Eur J Pharmacol* 2008;585:245-55.
89. Vanwert AL, Bailey RM, Sweet DH: Organic anion transporter 3 (Oat3/Slc22a8) knockout mice exhibit altered clearance and distribution of penicillin G. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;293:F1332-41.
90. Cerrutti JA, Brandoni A, Quaglia NB, Torres AM: Sex differences in p-aminohippuric acid transport in rat kidney: role of membrane fluidity and expression of OAT1. *Mol Cell Biochem* 2002;233:175-9.
91. Groves CE, Suhre WB, Cherrington NJ, Wright SH: Sex differences in the mRNA, protein, and functional expression of organic anion transporter (Oat) 1, Oat3, and organic cation transporter (Oct) 2 in rabbit renal proximal tubules. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;316:743-52.
92. Ljubojevic M, Herak-Kramberger CM, Hagos Y, Bahn A, Endou H, Burckhardt G, Sabolic I: Rat renal cortical OAT1 and OAT3 exhibit gender differences determined by both androgen stimulation and estrogen inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;287:F124-38.
93. Buist SC, Cherrington NJ, Choudhuri S, Hartley DP, Klaassen CD: Gender-specific and developmental influences on the expression of rat organic anion transporters. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;301:145-51.
94. Buist SC, Klaassen CD: Rat and mouse differences in gender-predominant expression of organic anion transporter (Oat1-3; Slc22a6-8) mRNA levels. *Drug Metab Dispos* 2004;32:620-5.
95. Terlouw SA, Masereeuw R, and Russel FG: Modulatory effects of hormones, drugs, and toxic events on renal organic anion transport. *Biochem Pharmacol*

2003;65:1393–1405.

96. Miller DS: Protein kinase C regulation of organic anion transport in renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 1998;274: F156–F164.
97. Lu R, Chan BS, Schuster VL: Cloning of the human kidney PAH transporter: narrow substrate specificity and regulation by protein kinase C. *Am J Physiol Renal Physiol* 1999;276: F295–F303.
98. You G, Kuze K, Kohanski RA, Amsler K, and Henderson S: Regulation of mOAT-mediated organic anion transport by okadaic acid and protein kinase C in LLC-PK1 cells. *J Biol Chem* 2000;275: 10278–10284.
99. Wolff NA, Thies K, Kuhnke N, Reid G, Friedrich B, Lang F, Burckhardt G: Protein kinase C activation downregulates human organic anion transporter 1-mediated transport through carrier internalization. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:1959–1968.
100. Takano M, Nagai J, Yasuhara M, Inui KI: Regulation of paminohippurate transport by protein kinase C in OK kidney epithelial cells. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 1996;271:F469–F475.
101. Shuprisha A, Lynch RM, Wright SH, Dantzer WH: PKC regulation of organic anion secretion in perfused S2 segments of rabbit proximal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;278:F104–F109.
102. Gekle M, Mildenerger S, Sauvants C, Bednarczyk D, Wright SH, Dantzer WH: Inhibition of initial transport rate of basolateral organic anion carrier in renal PT by BK and phenylephrine. *Am J Physiol Renal Physiol* 1999;277: F251–F256.
103. Nagai J, Yano I, Hashimoto Y, Takano M, Inui KI: Inhibition of PAH transport by parathyroid hormone in OK cells: involvement of protein kinase C pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* 1997;273: F674–F679.
104. Soodvilai S, Chatsudhipong V, Evans KK, Wright SH, Dantzer WH: Acute regulation of OAT3-mediated estrone sulfate transport in isolated rabbit renal proximal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;287:F1021-9.
105. Villar SR, Brandoni A, Torres AM: Time course of organic anion excretion in rats with bilateral ureteral obstruction: role of organic anion transporters (Oat1 and Oat3). *Nephron Physiol* 2008;110:45-56.
106. Mónica Torres A, Mac Laughlin M, Muller A, Brandoni A, Anzai N, Endou H: Altered renal elimination of organic anions in rats with chronic renal failure. *Biochim Biophys Acta* 2005;1740:29-37.
107. Di Giusto G, Anzai N, Endou H, Torres AM: Elimination of organic anions

in response to an early stage of renal ischemia-reperfusion in the rat: role of basolateral plasma membrane transporters and cortical renal blood flow. *Pharmacology* 2008;81:127-36.

108. Matsuzaki T, Watanabe H, Yoshitome K, Morisaki T, Hamada A, Nonoguchi H, Kohda Y, Tomita K, Inui K, Saito H: Downregulation of organic anion transporters in rat kidney under ischemia/reperfusion-induced acute [corrected] renal failure. *Kidney Int* 2007;71:539-47.
109. Schneider R, Sauvant C, Betz B, Otremba M, Fischer D, Holzinger H, Wanner C, Galle J, Gekle M: Downregulation of organic anion transporters OAT1 and OAT3 correlates with impaired secretion of para-aminohippurate after ischemic acute renal failure in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;292:F1599-605.
110. Zhang R, Yang X, Li J, Wu J, Peng WX, Dong XQ, Zhou SF, Yu XQ: Upregulation of rat renal cortical organic anion transporter (OAT1 and OAT3) expression in response to ischemia/reperfusion injury. *Am J Nephrol* 2008;28:772-83.
111. Sekine T, Miyazaki H, Endou H: Molecular physiology of renal organic anion transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;290:F251-61.
112. Leal-Pinto E, Tao W, Rappaport J, Richardson M, Knorr BA, Abramson RG: Molecular cloning and functional reconstitution of a urate transporter/channel. *J Biol Chem* 1997;272:617-25.
113. Wilmore JH, Costill DC: Part III: Cardiorespiratory function and performance, In: *Physiology of sport and exercise*. Human Kinetics, Champaign 1999: 205-308.
114. Freund BJ, Shizuru EM, Hashiro GM, Claybaugh JR: Hormonal, electrolyte, and renal responses to exercise are intensity dependent. *J Appl Physiol* 1991;70:900-6.
115. Radigan LR, Robinson S: Effects of environmental heat stress and exercise on renal blood flow and filtration rate. *J Appl Physiol* 1949;2:185-91.
116. DiBona GF, Kopp UC: Neural control of renal function. *Physiol Rev* 1997;77:75-197.
117. O'Hagan KP, Casey SM, Clifford PS: Muscle chemoreflex increases renal sympathetic nerve activity during exercise. *J Appl Physiol* 1997;82:1818-25.
118. Naicker S, Bhoola KD: Endothelins: vasoactive modulators of renal function in health and disease. *Pharmacol Ther* 2001;90:61-88.
119. Wade CE, Dressendorfer RH, O'Brien JC, Claybaugh JR: Renal function,



aldosterone, and vasopressin excretion following repeated long-distance running. *J Appl Physiol* 1981;50:709-12.

120. Sanders M, Rasmussen S, Cooper D, Bloor C: Renal and intrarenal blood flow distribution in swine during severe exercise. *J Appl Physiol* 1976; 40:932-5.
121. Poortmans JR: Exercise and renal function. *Sports Med* 1984;1:125-53.
122. Poortmans JR, Vanderstraeten J: Kidney function during exercise in healthy and diseased humans. An update. *Sports Med* 1994;18:419-37.
123. Poortmans JR, Vancalck B: Renal glomerular and tubular impairment during strenuous exercise in young women. *Eur J Clin Invest* 1978;8:175-8.
124. Poortmans JR, Mathieu N, De Plaen P: Influence of running different distances on renal glomerular and tubular impairment in humans. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1996;72:522-7.
125. Mittleman KD, Zambraski EJ: Exercise-induced proteinuria is attenuated by indomethacin. *Med Sci Sports Exerc* 1992;24:1069-74.
126. Gündüz F, Şentürk UK: The effect of reactive oxidant generation in acute exercise-induced proteinuria in trained and untrained rats. *Eur J Appl Physiol* 2003;90: 526-32.
127. Tipton CM, Tcheng TK, Zambraski EJ: Iowa wrestling study: weight classification systems. *Med Sci Sports* 1976;8:101-4.
128. Zambraski EJ: The kidney and body fluid balance during exercise. In: Buskirk ER, Puhl SM, eds. *Body Fluid Balance: Exercise and Sport*. New York; CRC: 1996: 75-95.
129. McInnis MD, Newhouse IJ, von Duvillard SP, Thayer R: The effect of exercise intensity on hematuria in healthy male runners. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1998;79:99-105.
130. Abarbanel J, Benet AE, Lask D, Kimche D: Sports hematuria. *J Urol* 1990;143:887-90.
131. Hellsten Y, Sjodin B, Richter EA, Bangsbo J: Urate uptake and lowered ATP levels in human muscle after high-intensity intermittent exercise. *Am J Physiol* 1998;274: E600–E606.
132. Stathis CG, Febbraio MA, Carey MF, Snow RJ: Influence of sprint training on human skeletal muscle purine nucleotide metabolism. *J Appl Physiol* 1994;76:1802-9.

133. Hellsten-Westing Y, Sollevi A, Sjödín B: Plasma accumulation of hypoxanthine, uric acid and creatine kinase following exhausting runs of differing durations in man. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1991;62:380-4.
134. Sjödín B, Hellsten Westing Y: Changes in plasma concentration of hypoxanthine and uric acid in man with short-distance running at various intensities. *Int J Sports Med* 1990;11:493-5.
135. Green HJ, Fraser IG: Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. *Med Sci Sports Exerc* 1988;20:55-9.
136. Kaptanoğlu B, Turgut G, Genç O, Enli Y, Karabulut I, Zencir M, Turgut S: Effects of acute exercise on the levels of iron, magnesium, and uric acid in liver and spleen tissues. *Biol Trace Elem Res* 2003;91:173-8.
137. Balsom PD, Seger JY, Sjödín B, Ekblom B: Physiological responses to maximal intensity intermittent exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1992;65:144-9.
138. Rietjens SJ, Beelen M, Koopman R, VAN Loon LJ, Bast A, Haenen GR: A single session of resistance exercise induces oxidative damage in untrained men. *Med Sci Sports Exerc* 2007;39:2145-51.
139. Hellsten Y, Richter EA, Kiens B, Bangsbo J: AMP deamination and purine exchange in human skeletal muscle during and after intense exercise. *J Physiol* 1999;520:909-20.
140. Ohta T, Sakano T, Igarashi T, Itami N, Ogawa T: ARF Associated with Renal Hypouricemia Research Group. Exercise-induced acute renal failure associated with renal hypouricaemia: results of a questionnaire-based survey in Japan. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:1447-53.
141. Sriboonlue P, Prasongwatana V, Tosukhowong P, Tungsanga K, Bovornpadoongkitti S: Increased risk of urinary stone disease by physical exercise. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1996;27:172-7.
142. Sakhaee K, Nigam S, Snell P, Hsu MC, Pak CY: Assessment of the pathogenetic role of physical exercise in renal stone formation. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;65:974-9.
143. Oner G, Cirrik S: The nephrotoxicity risk in rats subjected to heavy muscle activity. *J Sport Sci Med* 2009;8:481-488.
144. Nguyen MT, Awale S, Tezuka Y, Shi L, Zaidi SF, Ueda JY, Tran QL, Murakami Y, Matsumoto K, Kadota S: Hypouricemic effects of acacetin and 4,5-o-dicaffeoylquinic acid methyl ester on serum uric acid levels in potassium oxonate-pretreated rats. *Biol Pharm Bull* 2005;28:2231-4.

145. Gehrig JJ Jr, Jamison RL, Baylis C, Troy JL, Brenner BM, Jamison RL: Effect of intermittent feeding on renal hemodynamics in conscious rats. *Am J Physiol* 1986;250:F566-72.
146. Vinay P, Gougoux A, Lemieux G: Isolation of a pure suspension of rat proximal tubules. *Am J Physiol* 1981;241:F403-11.
147. Dudas PL, Pelis RM, Braun EJ, Renfro JL: Transepithelial urate transport by avian renal proximal tubule epithelium in primary culture. *J Exp Biol* 2005;208:4305-15.
148. Leal-Pinto E, Cohen BE, Abramson RG: Functional analysis and molecular modeling of a cloned urate transporter/channel. *J Membr Biol* 1999;169:13-27.
149. Yu Z, Fong WP, Cheng CH: Morin (3,5,7,2',4'-pentahydroxyflavone) exhibits potent inhibitory actions on urate transport by the human urate anion transporter (hURAT1) expressed in human embryonic kidney cells. *Drug Metab Dispos* 2007;35: 981-6.
150. Li X, Yun JK, Choi JS: Effects of morin on the pharmacokinetics of etoposide in rats. *Biopharm Drug Dispos* 2007;8:151-156.
151. Yu Z, Fong WP, Cheng CH: The dual actions of morin (3,5,7,2',4'-pentahydroxyflavone) as a hypouricemic agent: uricosuric effect and xanthine oxidase inhibitory activity. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;316:169-75.
152. Lash LH, Putt DA, Cai H: Membrane transport function in primary cultures of human proximal tubular cells. *Toxicology* 2006;228:200-18.
153. Agarwal R: Rapid microplate method for PAH estimation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;283: F236-41.
154. Newman DJ, Price CP: Renal Function and Nitrogen Metabolites. In *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, Ed. Burtis CA, Ashwood ER. Pennsylvania, WB Saunders Company. 1999;1204-1270.
155. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randell RJ: Protein measurement with folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193: 265-275.
156. Srere PA. Citrate synthase. In: Lowenstein JM Ed. *Methods in Enzymology*, New York: Academic Press, 1969: 3-5.
157. Leek BT, Mudaliar SR, Henry R, Mathieu-Costello O, Richardson RS: Effect of acute exercise on citrate synthase activity in untrained and trained human skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;280:R441-7.
158. Daley A: Exercise and depression: a review of reviews. *J Clin Psychol Med*

Settings 2008;15:140-7.

159. Zdrengea D, Poantă L, Pop D, Zdrengea V, Zdrengea M: Physical training--beyond increasing exercise capacity. *Rom J Intern Med* 2008;46:17-27.
160. Ploughman M: Exercise is brain food: the effects of physical activity on cognitive function. *Dev Neurorehabil* 2008;11:236-40.
161. Kachadorian WA, Johnson RE: Renal responses to various rates of exercise. *J Appl Physiol* 1970;28:748-52.
162. Hellebrandt FA, Walters CE, Miller ME: The post exercise suppression of kidney functions in man. *Am J Physiol* 1935;116:168-173.
163. Pricher MP, Holowatz LA, Williams JT, Lockwood JM, Halliwill JR: Regional hemodynamics during postexercise hypotension. I. Splanchnic and renal circulations. *J Appl Physiol* 2004;97:2065-70.
164. Millard RW, Higgins CB, Franklin D, Vatner SF: Regulation of the renal circulation during severe exercise in normal dogs and dogs with experimental heart failure. *Circ Res* 1972;31:881-8.
165. Obermayr RP, Temml C, Gutjahr G, Knechtelsdorfer M, Oberbauer R, Klauser-Braun R: Elevated uric acid increases the risk for kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2008;19:2407-13.
166. Bahat H, Dinour D, Ganon L, Feldman L, Holtzman EJ, Goldman M: Non-urate transporter 1-related renal hypouricemia and acute renal failure in an Israeli-Arab family. *Pediatr Nephrol* 2009;24:999-1003.
167. Cirillo P, Gersch MS, Mu W, Scherer PM, Kim KM, Gesualdo L, Henderson GN, Johnson RJ, Sautin YY: Ketohexokinase-dependent metabolism of fructose induces proinflammatory mediators in proximal tubular cells. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:545-53.
168. Gwinner W, Scheuer H, Haller H, Brandes RP, Groene HJ: Pivotal role of xanthine oxidase in the initiation of tubulointerstitial renal injury in rats with hyperlipidemia. *Kidney Int* 2006;69:481-7.
169. Doctor RB, Mandel LJ: Minimal role of xanthine oxidase and oxygen free radicals in rat renal tubular reoxygenation injury. *J Am Soc Nephrol* 1991;1:959-69.
170. Koçer G, Sentürk UK, Kuru O, Gündüz F: Potential sources of oxidative stress that induce postexercise proteinuria in rats. *J Appl Physiol* 2008; 104:1063-8.

171. Sato M, Iwanaga T, Mamada H, Ogihara T, Yabuuchi H, Maeda T, Tamai I: Involvement of uric acid transporters in alteration of serum uric acid level by angiotensin II receptor blockers. *Pharm Res* 2008;25:639-46.
172. Cha SH, Sekine T, Fukushima JI, Kanai Y, Kobayashi Y, Goya T, Endou H: Identification and characterization of human organic anion transporter 3 expressing predominantly in the kidney. *Mol Pharmacol* 2001;59:1277-86.
173. Cirrik S, Oner G: The effect of heavy muscle activity on renal cytoresistance in rats. *Ren Fail* 2009;31:683-9.
174. Leeuwenburgh C, Ji LL: Glutathione and glutathione ethyl ester supplementation of mice alter glutathione homeostasis during exercise. *J Nutr* 1998;128:2420-6.
175. Huang CC, Tsai SC, Lin WT: Potential ergogenic effects of L-arginine against oxidative and inflammatory stress induced by acute exercise in aging rats. *Exp Gerontol* 2008;43:571-7.
176. Habu Y, Yano I, Takeuchi A, Saito H, Okuda M, Fukatsu A, Inui K: Decreased activity of basolateral organic ion transports in hyperuricemic rat kidney: roles of organic ion transporters, rOAT1, rOAT3 and rOCT2. *Biochem Pharmacol* 2003;66:1107-14.
177. Habu Y, Yano I, Okuda M, Fukatsu A, Inui K: Restored expression and activity of organic ion transporters rOAT1, rOAT3 and rOCT2 after hyperuricemia in the rat kidney. *Biochem Pharmacol* 2005;69:993-9.
178. Chen J, Terada T, Ogasawara K, Katsura T, Inui K: Adaptive responses of renal organic anion transporter 3 (OAT3) during cholestasis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;295:F247-52.
179. Brandoni A, Anzai N, Kanai Y, Endou H, Torres AM: Renal elimination of p-aminohippurate (PAH) in response to three days of biliary obstruction in the rat. The role of OAT1 and OAT3. *Biochim Biophys Acta* 2006;1762:673-82.
180. Han HJ, Lim MJ, Lee YJ, Lee JH, Yang IS, Taub M: Uric acid inhibits renal proximal tubule cell proliferation via at least two signaling pathways involving PKC, MAPK, cPLA2, and NF-kappaB. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;292:F373-81.
181. Sánchez-Lozada LG, Soto V, Tapia E, Avila-Casado C, Sautin YY, Nakagawa T, Franco M, Rodríguez-Iturbe B, Johnson RJ: Role of oxidative stress in the renal abnormalities induced by experimental hyperuricemia. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;295:F1134-41.

## ÖZGEÇMİŞ

Selma CIRRIK 25.05.1978 tarihinde Adana doğdu. İlk ve orta öğrenimini 1992 yılında Hürriyet İlköğretim Okulunda, lise öğrenimini 1995 yılında İmamoğlu Lisesinde, yüksek öğrenimini ise 1999 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde tamamladı. Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimini 2003 yılında tamamlayarak aynı yıl doktora eğitimine başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.

## **EKLER**

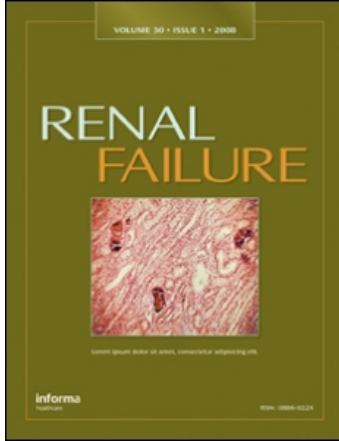
This article was downloaded by: [TÜBİTAK EKUAL]

On: 23 December 2009

Access details: Access Details: [subscription number 772814176]

Publisher *Informa Healthcare*

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



## Renal Failure

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713597293>

### The Effect of Heavy Muscle Activity on Renal Cytoresistance in Rats

Selma Cırrık<sup>a</sup>; Gülsen Öner<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Medicine, Department of Physiology, Akdeniz University, Antalya, Turkey

**To cite this Article** Cırrık, Selma and Öner, Gülsen(2009) 'The Effect of Heavy Muscle Activity on Renal Cytoresistance in Rats', *Renal Failure*, 31: 8, 683 – 689

**To link to this Article:** DOI: 10.3109/08860220903136576

**URL:** <http://dx.doi.org/10.3109/08860220903136576>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.



## LABORATORY STUDY

# The Effect of Heavy Muscle Activity on Renal Cytoresistance in Rats

Selma Cırrık and Gülsen Öner

Akdeniz University, Faculty of Medicine, Department of Physiology, 07070, Campus, Antalya, Turkey

Cytoresistance is the term used to describe the response of the proximal tubule cells to various stress inducers via cholesterol accumulation. However, the role of extensive exercise as a renal insult has not been examined. In this study, the effect of heavy muscle activity on proximal tubule cytoresistance was investigated. Results obtained from rats subjected to running a treadmill for five days were compared to those of controls. Extensive muscle activity-induced soleus citrate synthase and blood lactate elevation were associated with normal MAP, RBF, and GFR. Blood electrolytes and cholesterol levels remained unchanged, whereas the total and free cholesterol accumulations in the proximal tubule cells of the exercised group were higher than controls. Cholesterol-loaded tubules were more resistant (as proved by LDH release) to an ATP-depleted/calcium overloaded second stress. These data clearly demonstrate that heavy muscle activity induces cholesterol accumulation in the proximal tubules of kidney, without influencing ATP generation.

**Keywords** cytoresistance, exercise, kidney

## INTRODUCTION

It is well known that exercise results in a significant redistribution of tissue blood flow, such that it is increased in the working muscles but decreased in uninvolved organs. Among these distant uninvolved organs, kidneys have a crucial importance. An exercising body needs normal kidney functions for the elimination of exercise-induced elevated metabolic waste products. Despite conflicted reports,<sup>[1,2]</sup> most of the research studying renal blood flow suggests that each period of exercise creates an ischemia/reperfusion condition for kidneys when reduced kidney blood flow

due to exercise returns to normal following exercise.<sup>[3–8]</sup> In addition to its ischemia/reperfusion-like effects, strenuous muscle activity induces oxidative stress as measured by oxidative damage of lipids, proteins, and even genetic materials responsible for altered enzyme activities.<sup>[9]</sup> Exercise-induced elevated oxidative stress has been also shown to increase apoptosis in the renal tubule cells.<sup>[3]</sup>

There is clinical evidence supporting the results obtained from these experimental studies.<sup>[10–13]</sup> Since 1936, it has been known that violent exercise is associated with a modification of kidney functions characterized by diminution of excretory rate, increased urinary pH, and the appearance of abnormal constituents in the urine.<sup>[14]</sup> It is generally accepted that exercise intensity, rather than duration, has a more extensive effect on protein excretion rates. According to Poortmans and Labilloy,<sup>[15]</sup> moderate or submaximal exercise affects mainly the glomerular structures, while strenuous exercise has an impact at both glomerular and tubular levels. Glomerular membrane permeability and the S1- S2 segments of proximal tubule cells seem to be the nephron parts that are most sensitive to biochemical changes related to the intensity of exercise.<sup>[15,16]</sup>

Today, irrespective of their age and kidney function, people are encouraged to take regular muscular activity as part of a healthier lifestyle.<sup>[17–19]</sup> Thus, the results of the above-mentioned experimental and clinical studies, indicating renal dysfunctions during heavy exercise,<sup>[10–13]</sup> seem to be disregarded. One reason for this is the presence of lower blood creatinine levels and normal glomerular filtration rates (GFR) in regular exercisers.<sup>[20,21]</sup> Another reason is the acceptance of the elevated protein excretion, which is observed after vigorous exercise, as a non-pathological proteinuria.<sup>[22]</sup> In addition, several authors have attributed the unaltered kidney functions to the unidentified adaptive metabolic and functional changes induced by endurance exercise training.<sup>[3,23–25]</sup> Taken together, these training-induced adaptive changes and the presence of normal kidney functions in training athletes<sup>[26]</sup> may be the reason for the encouragement of regular exercise, ignoring the potentially damaging effects of heavy muscle activity on the kidneys.

Received 9 February 2009; accepted 1 June 2009.

Address correspondence to Gülsen Öner, Akdeniz University, Faculty of Medicine, Department of Physiology, 07070, Campus, Antalya, Turkey; E-mail: onerg@akdeniz.edu.tr, scirrik@akdeniz.edu.tr

Copyright Clearance Center, Inc. All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored, transmitted, or disseminated, in any form, or by any means, without prior written permission from the publisher. This article is intended solely for the personal use of the individual user and is not to be disseminated broadly. Unauthorized use, reproduction, distribution, display, view and print a single copy for personal use.

The characteristics of endurance exercise-induced adaptive metabolic and functional changes in kidneys are not clear, but may include a cytoresistance-like response. In their numerous studies, Zager et al. have shown that when proximal tubule cells are subjected to diverse forms of injury such as acute renal failure, endotoxemia, ischemia/reperfusion injury, LPS insult, or oxidative stress, they undergo adaptive changes that serve to protect them from subsequent attacks.<sup>[27-33]</sup> They denote these adaptive changes as acquired cytoresistance, which is generally expressed by 18 to 24 hrs following the initial insult. In these studies, heavy muscle activity or exercise is not included among the stress factors that initiate cytoresistance in proximal tubule cells. However, because kidney blood flow is reduced during exercise and recovers subsequently, strenuous exercise can potentially mimic ischemia/reperfusion injury, which may cause cytoresistance in the proximal tubule cells. It is entirely possible that the adaptive changes seen in trained athletes occur through this cytoprotection mechanism.<sup>[3,23-25]</sup>

However, there is no clear consensus on the benefits or risks of acute and chronic exercise on kidney functions. Therefore, assessment of the effects of heavy physical exercise on the physiology and structure of proximal tubule cells is studied. This is an important clinical question given the encouragement by the health professionals for regular exercise at least five days per week.<sup>[26]</sup> Even elderly people who are taking medications are encouraged to take up regular exercise to prevent age-induced kidney damage.<sup>[34]</sup>

Therefore, we conducted an experimental study in rats that were subjected to heavy muscle activity in order to assess whether exercise can induce stress in proximal tubule cells and initiate acquired renal cytoresistance.

## MATERIALS AND METHODS

2.5–3-month-old male Wistar rats weighing  $286.92 \pm 7.04$  g were randomly divided into two groups. Twenty animals were used as a sedentary control, while the other 20 animals were subjected to heavy muscle activity for five days. The rats were provided food and water ad libitum. Post-exercise weight of the exercising animals remained unchanged ( $272.31 \pm 6.62$  g). All procedures were approved by Akdeniz University Animal Care and Usage Committee (06-12/02).

### Exercise Protocol

In order to mimic the effects of irregular heavy muscle activity on kidney functions of laborers, short-term exhausting muscle activity was chosen as an exercise

model. Animals were exhausted on a motor-driven treadmill (MAY-TME 9805, Commat, Ankara, Turkey) once a day for five days. Before the exhaustive protocol, the rats were familiarized with a treadmill running for two days. The exhaustive protocol was started at 20 m/min and a 5% gradient for 5 min. The gradient and speed were gradually increased to 15% and 24 m/min, and running was continued until exhaustion. For the animals that failed to escape from electrical stimulation, the exhaustion was approved by the loss of the straightening reflex for ten seconds when animals were placed on their back.

All animals were placed in metabolic cages for 24 hours, and urine samples were collected. The exhausted rats were placed in metabolic cages at the fourth exercise day and sacrificed after the last treadmill running. The urine samples were used for protein, glucose, and creatinine measurements. Protein, creatinine, and glucose levels were determined using the Lowry method,<sup>[35]</sup> Jaffe method,<sup>[36]</sup> and a commercial kit (QuantiChrom™ Glucose Assay Kit, DIGL-200), respectively. Urine and serum electrolyte levels were measured by an autoanalyzer (Roche Hitachi F-800).

### Blood Lactate Concentration

Ten minutes following the last exercise session, lactate concentration was measured in blood samples obtained from the tail vein using a lactate analyzer BM-Lactate test strips (Accusport, Mannheim Boehringer, Accusport Diagnostics & Biochemicals, U.K.).

### Activity of Citrate Synthase (CS)

CS activity was determined for the soleus muscle of each rat according to the spectrophotometric method described by Srere.<sup>[37]</sup> Data were expressed as micromoles per gram wet weight per minute.

### Measurement of Main Arterial Pressure (MAP)

Under light ether anesthesia, MAP was determined by tail cuff method (Biopac, BP HR200 module plus MP100 system, Goleta, California, USA).

### Measurement of Renal Blood Flow (RBF)

Renal plasma flow (RPF) was calculated as the clearance of para-aminohippurate (PAH), and RBF was calculated as the clearance of RPF/(1 - Hct). Under the urethane anesthesia (1 mg/kg bw, ip), the left jugular vein and urinary bladder

were cannulated for PAH infusion (0.6%) and urine collection, respectively. Plasma and urine PAH concentrations were determined by spectrophotometry.<sup>[38,39]</sup>

After the collection of urine and blood samples, kidneys were perfused with ice-cold krebs phosphate buffer (118 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 24 mM NaHCO<sub>3</sub>, 11 mM glucose, pH:7.4) to wash off the blood. Then, both kidneys were excised, cleaned from adhesive fat tissues, and decapsulated in an ice-cold buffer. The cooled kidneys were longitudinally dissected, and the medullary part was discarded. The renal cortical tissue was used for proximal tubule or mitochondria isolation.

### Proximal Tubule Isolation

As previously described,<sup>[40]</sup> renal proximal tubules were isolated from rats based on the method of Vinay et al.<sup>[41]</sup> Briefly, the digested tissue was separated by centrifugation into four distinct bands, F1–F4. The proximal tubule-rich F4 band, after washing three times, was resuspended in krebs buffer and used for cholesterol determination or cytoresistance experiments.

### Cholesterol Determination

Following isolation, proximal tubules were subjected to lipid extraction as previously described.<sup>[28]</sup> Then, total and free cholesterol (FC) levels were determined using a commercial kit (Cholesterol Fluorometric (Red) Assay Kit, Amplex® Red from Molecular Probes, Invitrogen, A12216). Cholesterol ester (CE) level in samples was calculated by subtracting the free fraction from the total cholesterol. Serum total cholesterol and HDL cholesterol levels (following phosphotungstic acid/magnesium chloride precipitation) were determined using the same cholesterol kit. LDL cholesterol levels were calculated by subtracting the HDL cholesterol from total cholesterol.

### Cytoresistance

As outlined by Zager et al.,<sup>[28–30]</sup> isolated proximal tubules were incubated either in basal conditions or ATP-depleted/Ca<sup>2+</sup> overloaded conditions, containing mitochondrial respiration and glycolysis inhibitors and Ca<sup>2+</sup> ionophore (7.5 μM antimycin A, 20 mM 2-deoxyglucose and 10 μM A23187, respectively) for four hours. Medium LDH (lactate dehydrogenase) levels were determined using a commercial kit (QuantiChrom™ Lactate Dehydrogenase Kit, DLDH-100), and its release was expressed as a percentage of total LDH level.

### Mitochondrial Isolation

Mitochondria were isolated from renal cortical tissue using a method defined by Weinberg et al.<sup>[42]</sup> Isolated mitochondria were used for inorganic phosphate determination.

### Inorganic Phosphate Determination

As an indicator of F<sub>0</sub>/F<sub>1</sub>-ATPase activity, inorganic phosphate levels in the mitochondria and PTSs were measured. This spectrophotometric method was previously described by Katewa and Katyare.<sup>[43]</sup> Data were expressed as μg.mg prot<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>.

### Statistical Analysis

All values are presented as means ± SEM. Statistical comparisons were performed by unpaired Student's t-test.  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

In order to attain heavy muscle activity, the rats were exercised to exhaustion for five days, and the signs of cytoresistance were evaluated by measuring the tubular cholesterol and LDH release from the isolated proximal tubule segments. As shown in Table 1, five days of exhaustive muscle activity had no significant effect on MAP, GFR, or RBF. The blood total cholesterol, LDL-HDL

**Table 1**

Studied parameters in rats from sedentary control and five-day exhausted groups

Groups	Sedentary control	Heavy muscle activity
MAP (mmHg)	91.20 ± 1.83	86.75 ± 3.69
GFR (mL/dk)	0.572 ± 2.1	0.659 ± 0.11
RBF (mL/dk)	5.45 ± 1.03	7.61 ± 0.99
Urinary glucose (mg/mL)	0.003 ± 0.0027	0.293 ± 0.070*
Urinary protein (mg/dL)	0.054 ± 0.072	0.486 ± 0.071 <sup>†</sup>
FE <sub>Na</sub> <sup>+</sup>	0.151 ± 0.04	0.111 ± 0.04
FE <sub>K</sub> <sup>+</sup>	52.52 ± 9.32	57.16 ± 13.37
Serum total cholesterol (mg/mL)	0.97 ± 0.04	1.17 ± 0.11
HDL cholesterol (mg/mL)	0.28 ± 0.026	0.30 ± 0.045
LDL cholesterol (mg/mL)	0.671 ± 0.034	0.869 ± 0.09

Statistically differences from sedentary control; \* $p < 0.01$ , <sup>†</sup> $p < 0.001$ .

cholesterol, and electrolytes were within normal limits. Fractionated sodium ( $FE_{Na^+}$ ) and potassium ( $FE_{K^+}$ ) excretion were also unchanged.

Despite normal GFR, the heavily exercised animals exhibited a significant proteinuria and glucosuria (see Table 1). In the exhausted group, the mean blood lactate level was increased two-fold (from  $1.99 \pm 0.11$  to  $4.22 \pm 0.32$  mM,  $p < 0.001$ ), and CS activity in soleus muscle was elevated significantly from  $60.38 \pm 3.45 \mu\text{M} \cdot \text{g ww}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  to  $116.17 \pm 6.98 \mu\text{M} \cdot \text{g ww}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  ( $p < 0.001$ ; see Figure 1).

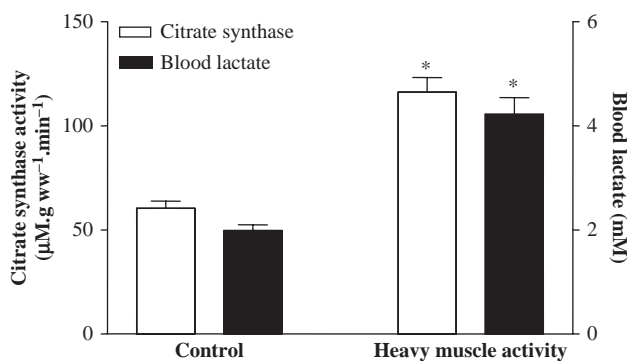
The isolated proximal tubule segments exhibited a different picture when cholesterol levels were considered (see Figure 2). Despite the lack of alteration in plasma cholesterol levels, the isolated proximal tubule segments from the exhausted rats revealed a significant increase in cholesterol levels with respect to the controls ( $0.662 \pm 0.067 \mu\text{M}/\text{mg prot}$  vs.  $0.499 \pm 0.008 \mu\text{M}/\text{mg prot}$ ;  $p < 0.05$ ). The elevation was prominent in the free cholesterol fraction, increasing from  $0.234 \pm 0.029 \mu\text{M}/\text{mg prot}$  to  $0.420 \pm 0.037 \mu\text{M}/\text{mg prot}$  ( $p < 0.01$ ) in the tubule of exhausted animals. However, the mean esterified cholesterol levels remained unaltered both in the control ( $0.230 \pm 0.032 \mu\text{M}/\text{mg prot}$ ) and the exhausted group ( $0.265 \pm 0.027 \mu\text{M}/\text{mg prot}$ ).

### Proximal Tubule Cytoresistance (LDH Release)

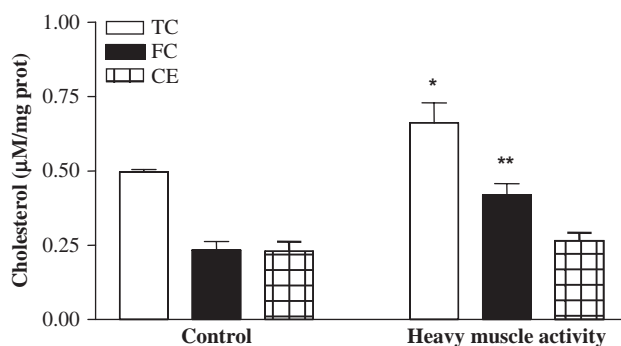
At the basal conditions, after a four-hour incubation at  $37^\circ\text{C}$ , LDH release from the isolated proximal tubules into the incubation medium was  $30.2 \pm 7.07\%$  and  $30.59 \pm 7.27\%$  in the control and exhausted groups, respectively, whereas LDH release as a response to ATP-depleted/calcium-overloaded conditions, which is used as a second stress model, was statistically different in the tubules of control and exhausted group. LDH release was  $54.6 \pm 8.2\%$  and  $34.41 \pm 9.99\%$  ( $p < 0.001$ ) in the tubule segments of sedentary control and exhausted rats, respectively (see Figure 3).

### Inorganic Phosphate Level

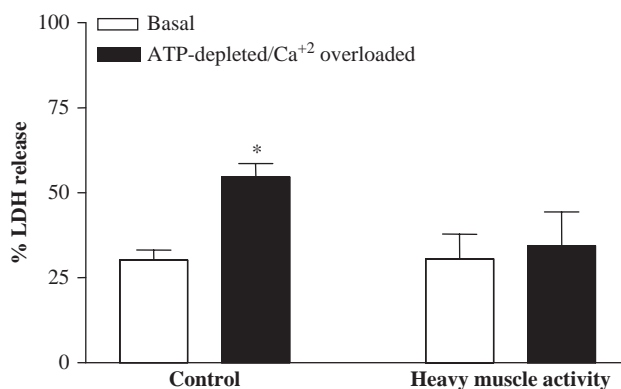
Total inorganic phosphate of isolated PTS was similar both in sedentary and exercising animals ( $67.57 \pm 8.69$  and  $69.75 \pm 5.40 \mu\text{g}/\text{mg prot}$ , respectively). Mitochondria, isolated from the renal cortex of control and exhausted animals, were used to study the F<sub>0</sub>/F<sub>1</sub> ATPase activity, based on inorganic phosphate release during the 10 min incubation period. Inorganic phosphate releasing effect of F<sub>0</sub>/F<sub>1</sub> ATP synthase in the mitochondria of control and exercised rats was  $3.69 \pm 0.23 \mu\text{g} \cdot \text{mg prot}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  and  $3.85 \pm 0.39 \mu\text{g} \cdot \text{mg prot}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , respectively.



**Figure 1.** CS activity for soleus muscle and blood lactate levels in the sedentary control and in five-day exhausted animals (difference from sedentary control; \* $p < 0.001$ ).



**Figure 2.** Total cholesterol (TC), free cholesterol (FC), and cholesterol ester (CE) levels in proximal tubules isolated from sedentary control and five-day exhausted animals (differences from sedentary controls; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).



**Figure 3.** LDH release from proximal tubules isolated from control and five-day exhausted rats. LDH release was determined in the basal and ATP-depleted/ $\text{Ca}^{2+}$  overloaded conditions ( $7.5 \mu\text{M}$  Antimycin A,  $20\text{mM}$  2-deoxyglucose and  $10 \mu\text{M}$  A23187) and expressed as percentage of total LDH (differences from individual basal conditions; \* $p < 0.001$ ).

## DISCUSSION

The present study demonstrated that intense physical activity, as confirmed by increased blood lactate concentration and citrate synthase activity in soleus muscle, induces some degree of renal dysfunction associated with proteinuria and glucosuria, without altering MAP, RBF, and GFR. These results are in agreement with the studies reporting on the approving and disapproving effects of vigorous muscle activity on kidney functions.<sup>[5–8,10–16,44]</sup>

According to Poortmans and Vancalck,<sup>[12]</sup> proteinuria and glucosuria, seen as a consequence of strenuous physical activity, are indications of impaired glomerular and tubular function, whereas several other authors disagree with the harmful effects of muscular activity because of unaltered kidney functions in trained athletes<sup>[45]</sup> or exercising animals.<sup>[46]</sup> In addition, exercise-induced glucosuria and proteinuria are accepted as nonpathological benign processes by Bergstein.<sup>[22]</sup> In that sense, glucosuria and proteinuria detected in our study may not be regarded as pathological. Because of the lack of a clear consensus on the benefits and risks of acute and chronic exercise on renal functions, the renal cytoresistance theory of Zager et al.<sup>[28–32]</sup> seems to be useful for the interpretation of our data.

Zager et al.<sup>[27–33]</sup> believe that when subjected to diverse forms of injury, proximal tubule cells develop adaptive changes as protection against subsequent attacks. Cholesterol loading in the proximal tubule cells is one of these adaptive changes and is accepted as the main criterion for the acquired renal cytoresistance.<sup>[27–33]</sup> If so, then our result demonstrating the elevated levels of both the total and free cholesterol in the proximal tubule cells of exhausted rats (see Figure 2) should indicate evidence of renal insult, and thus heavy muscle activity should be included among the other well-studied insults, such as acute renal failure, ischemia/reperfusion injury, sepsis, endotoxemia, oxidative stress, and urethral obstruction.

It is noteworthy that despite significant cholesterol accumulation in the proximal tubule cells, neither the total nor HDL-LDL cholesterol levels in the plasma were altered significantly in these rats. The mechanistic pathways of cholesterol accumulation in the proximal tubule cells, as response to stress, have been discussed in detail elsewhere<sup>[27–33,47]</sup> and is not the topic of this study. However, as demonstrated by Zager et al.,<sup>[48]</sup> in the sepsis-induced mice, the elimination of tubular cytoresistance in statin-treated exercising rats suggests the involvement of dysregulated cholesterol biosynthesis (unpublished data). A sublethal ATP depletion, which initiates both statin sensitive and resistant cholesterol-loading states in the stressed tubule cells, seems not to be operative in our study. This is indicated by the normal mitochondrial ATP generation in

the proximal tubule cells of the exhausted rats. In addition to the existence of normal ATP generation in the tubule segments of exhausted rats, esterified cholesterol levels remained normal, whereas free cholesterol levels were elevated. Contrary to these observations, several authors have reported the predominance of esterified cholesterol accumulation in the tubule cells that are subjected to various forms of stress.<sup>[33,47]</sup> This could be explained by the fact that exercise produces reactive oxygen species (ROS) in the tubule cells,<sup>[46,49]</sup> which in turn stimulates the PPAR $\gamma$  activity, known to inhibit cholesterol esterification by an ACAT-independent mechanism.<sup>[50,51]</sup> Thus, the elevation of free cholesterol may be explained by disruption of the fine balance between the exercise-stimulated cholesterol synthesis<sup>[52]</sup> and ACAT-independent inhibition of cholesterol esterification by ROS stimulated PPAR $\gamma$ . Moreover, as seen in Figure 3, with the use of an ATP-depleted/Ca<sup>2+</sup>-overload attack, there was increased release of LDH by the control group of rats as a response to this mitochondrial stress. Unaltered LDH release from the tubule segments of rats exposed to heavy muscle activity indicates membrane resistance in the cholesterol-loaded tubule segments of exercised animals and may represent some adaptive changes as reported by Zager et al.<sup>[27–33]</sup>

In conclusion, we suggest that the muscle activity model used in this study may be able to stress the proximal tubule cells, thus causing renal cytoresistance. From a clinical point of view, the functional significance of tubular cytoresistance may gain importance in exercising people subjected to cholesterol-lowering approaches. However, the clinical implications of heavy muscle activity-induced renal cytoresistance remains to be elucidated.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Prof. B.U.Yavuzer for her help in the editing of this manuscript. This work was supported by a research grant from Akdeniz University Research Foundation (No: 2005.01.0103.011). The authors report no conflicts of interest.

## REFERENCES

1. Vatner SF, Higgins CB, White S, Patrick T, Franklin D. The peripheral vascular response to severe exercise in untethered dogs before and after complete heart block. *J Clin Invest.* 1971;50:1950–1960.
2. Millard RW, Higgins CB, Franklin D, Vatner SF. Regulation of the renal circulation during severe exercise in normal dogs and dogs with experimental heart failure. *Circ Res.* 1972;31:881–888.

3. Podhorska-Okołów M, Dziegiel P, Murawska-Ciałowicz E, et al. Exercise-induced apoptosis in renal tubular cells of the rat. *Folia Morphol (Warsz)*. 2004;63:213–216.
4. Di Meo S, Venditti P. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept*. 2001;10:125–140.
5. Momen A, Leuenberger UA, Ray CA, Cha S, Handly B, Sinoway LI. Renal vascular responses to static handgrip: Role of muscle mechanoreflex. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285:H1247–H1253.
6. Momen A, Leuenberger UA, Handly B, Sinoway LI. Effect of aging on renal blood flow velocity during static exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287:H735–H740.
7. Maeda S, Miyauchi T, Iemitsu M, et al. Endothelin receptor antagonist reverses decreased NO system in the kidney in vivo during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004;286:E609–E614.
8. Middlekauff HR, Nitzsche EU, Nguyen AH, Hoh CK, Gibbs GG. Modulation of renal cortical blood flow during static exercise in humans. *Circ Res*. 1997;80:62–68.
9. Atalay M, Oksala NK, Laaksonen DE, et al. Exercise training modulates heat shock protein response in diabetic rats. *J Appl Physiol*. 2004;97:605–611.
10. Gerth J, Ott U, Fünfstück R, et al. The effects of prolonged physical exercise on renal function, electrolyte balance and muscle cell breakdown. *Clin Nephrol*. 2002;57:425–431.
11. Poortmans JR. Exercise and renal function. *Sports Med*. 1984;1:125–153.
12. Poortmans JR, Vancalck B. Renal glomerular and tubular impairment during strenuous exercise in young women. *Eur J Clin Invest*. 1978;8:175–178.
13. Peters HP, De Vries WR, Vanberge-Henegouwen GP, Akkermans LM. Potential benefits and hazards of physical activity and exercise on the gastrointestinal tract. *Gut*. 2001;48:435–439.
14. Hellebrandt FA, Walters CE, Miller ML. The post exercise suppression of kidney function on man. *Am J Physiol*. 1936;116:168–173.
15. Poortmans JR, Labilloy D. The influence of work intensity on postexercise proteinuria. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1988;57:260–263.
16. Olsen NV, Kanstrup IL, Richalet JP, Hansen JM, Plazen G, Galen FX. Effects of acute hypoxia on renal and endocrine function at rest and during graded exercise in hydrated subjects. *J Appl Physiol*. 1992;73:2036–2043.
17. Donaldson LJ. Sport and exercise: The public health challenge. *Br J Sports Med*. 2000;34:409–410.
18. Khazaenia T, Ramsey AA, Tam YK. The effects of exercise on the pharmacokinetics of drugs. *J Pharm Pharm Sci*. 2000;3:292–302.
19. Brown WJ, Burton NW, Rowan PJ. Updating the evidence on physical activity and health in women. *Am J Prev Med*. 2007;33:404–411.
20. Lippi G, Banfi G, Luca Salvagno G, Montagnana M, Franchini M, Cesare Guidi G. Comparison of creatinine-based estimations of glomerular filtration rate in endurance athletes at rest. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46:235–239.
21. Zheng H, Li YF, Zucker IH, Patel KP. Exercise training improves renal excretory responses to acute volume expansion in rats with heart failure. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006;291:F1148–F1156.
22. Bergstein JM. A practical approach to proteinuria. *Pediatr Nephrol*. 1999;13:697–700.
23. Maeda S, Iemitsu M, Jesmin S, Miyauchi T. Acute exercise causes an enhancement of tissue renin-angiotensin system in the kidney in rats. *Acta Physiol Scand*. 2005;185:79–86.
24. Boveris A, Navarro A. Systemic and mitochondrial adaptive responses to moderate exercise in rodents. *Free Radic Biol Med*. 2008;44:224–229.
25. Nagashima K, Wu J, Kavouras SA, Mack GW. Increased renal tubular sodium reabsorption during exercise-induced hypervolemia in humans. *J Appl Physiol*. 2001;91:1229–1236.
26. Haskell WL, Lee IM, Pate RR, et al. American College of Sports Medicine; American Heart Association. Physical activity and public health: Updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Circulation*. 2007;116:1081–1093.
27. Zager RA. Plasma membrane cholesterol: A critical determinant of cellular energetics and tubular resistance to attack. *Kidney Int*. 2000;58:193–205.
28. Zager RA, Burkhart KM, Johnson AC, Sacks BM. Increased proximal tubular cholesterol content: Implications for cell injury and “acquired cytoresistance.” *Kidney Int*. 1999;56:1788–1797.
29. Zager RA, Andoh T, Bennett WM. Renal cholesterol accumulation: A durable response after acute and subacute renal insults. *Am J Pathol*. 2001;159:743–752.
30. Zager RA, Shah VO, Shah HV, Zager PG, Johnson AC, Hanson S. The mevalonate pathway during acute tubular injury: Selected determinants and consequences. *Am J Pathol*. 2002;161:681–692.
31. Zager RA, Johnson AC, Hanson SY. Proximal tubular cholesterol loading after mitochondrial, but not glycolytic, blockade. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;285:F1092–F1099.
32. Zager RA, Johnson AC, Hanson SY. Renal tubular triglyceride accumulation following endotoxic, toxic, and ischemic injury. *Kidney Int*. 2005;67:111–121.
33. Zager RA, Kalthorn TF. Changes in free and esterified cholesterol: Hallmarks of acute renal tubular injury and acquired cytoresistance. *Am J Pathol*. 2000;157:1007–1016.
34. Ichikawa M, Fujita Y, Ebisawa H, Ozeki T. Effects of long-term, light exercise under restricted feeding on age-related changes in physiological and metabolic variables in male Wistar rats. *Mech Ageing Dev*. 2000;113:23–35.
35. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr al., Randell RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265–275.
36. Newman DJ, Price CP. Renal function and nitrogen metabolites. In Burtis CA, Ashwood ER (eds.). *Tietz textbook of clinical chemistry*. Philadelphia: WB Saunders Company; 1999:1204–1270.
37. Srere PA. Citrate synthase. In Lowenstein JM (ed.). *Methods in enzymology*. New York: Academic Press;1969:3–5.

38. Gehrig JJ Jr, Jamison RL, Baylis C, Troy JL, Brenner BM, Jamison RL. Effect of intermittent feeding on renal hemodynamics in conscious rats. *Am J Physiol*. 1986;250:F566–F572.
39. Agarwal R. Rapid microplate method for PAH estimation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002;283:F236–F241.
40. Cirrik S, Oner G. Effect of nitric oxide on ammoniogenesis in rats. *Nephron Physiol*. 2006;102:61–71.
41. Vinay P, Gougoux A, Lemieux G. Isolation of a pure suspension of rat proximal tubules. *Am J Physiol*. 1981;241:F403–F411.
42. Weinberg JM, Harding PG, Humes HD. Mitochondrial bioenergetics during the initiation of mercuric chloride-induced renal injury. *J Biol Chem*. 1982;257:60–67.
43. Katewa SD, Katyare SS. A simplified method for inorganic phosphate determination and its application for phosphate analysis in enzyme assays. *Anal Biochem*. 2003;323:180–187.
44. Poortmans JR, Blommaert E, Baptista M, De Broe ME, Nouwen EJ. Evidence of differential renal dysfunctions during exercise in men. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1997;76:88–91.
45. Neumayr G, Pfister R, Hoertnagl H, Mitterbauer G, Prokop W, Joannidis M. Renal function and plasma volume following ultra marathon cycling. *Int J Sports Med*. 2005;26:2–8.
46. Asghar M, George L, Lokhandwala MF. Exercise decreases oxidative stress and inflammation and restores renal dopamine D1 receptor function in old rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;293:F914–F919.
47. Johnson AC, Yabu JM, Hanson S, Shah VO, Zager RA. Experimental glomerulopathy alters renal cortical cholesterol, SR-B1, ABCA1, and HMG CoA reductase expression. *Am J Pathol*. 2003;162:283–291.
48. Zager RA, Johnson AC, Hanson SY. Sepsis syndrome stimulates proximal tubule cholesterol synthesis and suppresses the SR-B1 cholesterol transporter. *Kidney Int*. 2003;63:123–133.
49. Podhorska-Okołów M, Dziegiel P, Dolińska-Krajewska B, et al. Expression of metallothionein in renal tubules of rats exposed to acute and endurance exercise. *Folia Histochem Cytobiol*. 2006;44:195–200.
50. Bilban M, Bach FH, Otterbein SL, et al. Carbon monoxide orchestrates a protective response through PPARgamma. *Immunity*. 2006;24:601–610.
51. Li AC, Binder CJ, Gutierrez A, et al. Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPARalpha, beta/delta, and gamma. *J Clin Invest*. 2004;114:1564–1576.
52. Mahoney DJ, Safdar A, Parise G, et al. Gene expression profiling in human skeletal muscle during recovery from eccentric exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;294:R1901–R1910.

Research article

## The nephrotoxicity risk in rats subjected to heavy muscle activity

Gülşen Öner ✉ and Selma Cirrik

Akdeniz University, Medical Faculty, Department of Physiology, Antalya, Turkey

### Abstract

When the body is exposed to insults, the kidneys exhibit adaptive changes termed renal cytoresistance, characterized by cholesterol accumulation in the membranes of the tubule cells. However, heavy muscle activity has not yet been accepted as one of the stressors that could lead to cytoresistance. In order to study the renal functional characteristics of animals exposed to heavy muscle activity, rats were subjected to exhaustive treadmill exercise for 5 days and their data was compared to those of sedentary controls. It was found that in exercised rats, blood lactate, muscle citrate synthase and proximal tubule peroxynitrite levels were all elevated, suggesting the presence of oxidative stress in the proximal tubule segments. However, mean arterial pressure, renal blood flow, glomerular filtration rate, fractional excretion of sodium and potassium, and organic anion excretion remained normal. Despite unchanged blood cholesterol levels, cholesterol loading in the proximal tubule segments, especially the free form, and decreased lactate dehydrogenase release from cytoresistant proximal tubule segments indicated the development of renal cytoresistance. However, this resistance did not seem to have protected the kidneys as expected because organic anion accumulation associated with glycosuria and proteinuria, in addition to the elevated urinary cholesterol levels, all imply the presence of an impaired glomerular permeability and reabsorption in the proximal tubule cells. Therefore, we suggest that in response to heavy muscle activity the tubular secretion may remain intact, although cytoresistance in the proximal tubule cells may affect the tubular reabsorptive functions and basolateral uptake of substances. Thus, this differential sensitivity in the cytoresistance should be taken into account during functional evaluation of the kidneys.

**Key words:** Exercise, proximal tubule, cytoresistance, nephrotoxicity.

### Introduction

In recent years, lifelong physical activity has been recommended for everyone in order to improve their physiological and functional capacity. Today, even the elderly under medication are encouraged to do daily exercises (Ichikawa et al. 2000). It is known that during heavy muscle activity, the perfusion of working muscle is elevated at the expense of several uninvolved organs, including the kidneys, which undergo partial ischemia due to the reduced blood flow. Cessation of exercise causes blood re-flow to hypoxic tissues, leading to re-oxygenation and subsequent production of excessive ROS, which is similar to the ischemia/perfusion phenomenon. Therefore, physical exercise should be accepted as a stress inducer and, apart from the working muscle, many other organs should also exhibit considerable adaptive changes in response to

heavy muscle activity (Di Meo and Venditti, 2001; Gündüz and Senturk, 2003; Koçer et al., 2008; Maeda et al., 2004; Middlekauff et al., 1997; Momen et al., 2003; 2004; Podhorska-Okolów et al., 2004).

Zager et al. (1999; 2001; 2003a; 2003b; 2005; Zager and Kalhorn, 2000) studied kidney responses to several forms of injury such as renal failure, sepsis, endotoxemia, ischemia-reperfusion or oxidative stress, and they showed that proximal tubule cells undergo some adaptive changes for protection from subsequent hazards. The response of kidneys to the studied stressors is termed “acquired renal cytoresistance” and is characterized by cholesterol accumulation in the proximal tubule cells. Cholesterol accumulation in the membranes of the tubule cells is the hallmark of cellular response to stress and makes the cells resistant to further attacks. However, as mentioned above, up to the present neither heavy muscle activity nor exercise have been studied as a stress inducer.

The results of some experimental and clinical studies indicated that acute or heavy muscle activity can induce stress response and considerable pathological changes can occur, including apoptosis in the tubular cells of the kidney (Podhorska-Okolów et al., 2004). However, several results demonstrating renal dysfunction and the ROS generating effect of heavy exercise on kidneys were disregarded, and these detrimental effects of exercise on renal functions were accepted as nonpathological benign processes by some authors (Bergstein, 1999; Brown et al., 2007; Gündüz and Senturk, 2003; Khazaeinia et al., 2000; Koçer et al., 2008).

If exercise was to be accepted as a stress inducer and had a similar resistance generating effect on proximal tubule cells, the kidneys of exercisers would be more resistant to subsequent attacks and the renal functional capacity of trained athletes would be greater than those having a sedentary lifestyle. This expectation is in good accord with the studies indicating normal renal functional capacity in trained athletes (Neumayr et al., 2005). On the other hand, the high prevalence of exercise-induced proteinuria and hematuria in athletes (Bellinghien et al., 2008) undermines the clarity of the consensus about the risk or benefit of heavy muscle activity on kidney functions, and the effects of muscle activity on proximal tubule resistance remain to be studied. Considering that many people are subjected regularly or irregularly to either voluntary or involuntary (such as labourers) heavy muscle activity throughout their lifetime, it is not surprising that their proximal tubule cells would be loaded with acidic metabolites that might trigger some subsequent adaptive changes.

Previously, we observed that, as with other stress-



ors, exhaustive heavy muscle activity also induces cytoresistance, characterised by cholesterol accumulation in the proximal tubule segments. These cholesterol loaded tubule segments also exhibited resistance to further attack, such as ATP depleting stress, and had a lower LDH release response (unpublished data). In the present experiment using both in vitro and in vivo parameters, we aimed to investigate the functional characteristics of cholesterol loaded cytoresistant tubule cells of rats subjected to exhaustive muscle activity.

## Methods

In this experimental study 2.5-3 month old male Wistar rats were used. The animals were randomly divided into a sedentary (control,  $n = 20$ ) and a heavily exercised group ( $n = 20$ ). The rats were provided with food and water ad libitum. All procedures were approved by the Akdeniz University Animal Care and Usage Committee (06-12/02).

### Exercise protocol

In this study, the exhaustive exercise protocol (Gündüz & Senturk, 2003; Kocer et al. 2008) was repeated on five consecutive days to mimic heavy muscle activity carried out by labourers. Animals were exhausted on a motor-driven treadmill (MAY-TME 9805, Commat, Ankara, Turkey) for 5 days. Before the exhaustive protocol, the rats were familiarized with treadmill running for 2 days. The exhaustive protocol was started at  $20 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$  and a 5% gradient for 5 min. The gradient and speed were gradually increased to 15% and  $24 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ , and running was continued until exhaustion developed. Exhaustion was defined as the inability to continue running and the loss of the straightening reflex within ten seconds when animals were placed on their back.

All animals were placed in metabolic cages for 24 hours and urine samples were collected. The exhausted rats were placed in metabolic cages on the fourth exercise day and sacrificed after the last treadmill running.

### Blood lactate concentration

Ten minutes following the last exercise session, lactate concentration was measured in blood samples obtained from the tail vein using a lactate analyzer BM-Lactate test strips (Accusport, Mannheim Boehringer, Accusport Diagnostics & Biochemicals, U.K.).

### MAP measurement

Under light ether anesthesia, MAP was determined by the tail cuff method (Biopac, BP HR200 module plus MP100 system, Goleta, CA).

### Measurement of RBF and organic anion excretion

The renal plasma flow (RPF) was calculated as a clearance of PAH, an organic anion prototype and RBF was estimated from RPF/1-Hematocrit (Agarwal, 2002; Gehrig et al., 1986). GFR and plasma PAH concentrations were used for the calculation of filtered PAH load. Secreted PAH load was calculated by subtracting excreted total PAH from filtered PAH.

After collection of urine and blood samples, the

kidneys were perfused with ice-cold Krebs phosphate buffer (118 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 24 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 11 mM glucose, pH:7.4) to wash off the blood. Then, both kidneys were excised, cleaned from adhesive fat tissues and decapsulated in an ice-cold buffer. The cooled kidneys were longitudinally dissected and the medullary portion was discarded. The renal cortical tissue was used for proximal tubule isolation or mitochondria isolation.

The blood and urine samples were used for protein, creatinine, electrolyte, glucose and cholesterol measurements. Protein and creatinine levels were determined using the Lowry (Lowry et al., 1951) and Jaffe methods (Newman et al., 1999) respectively. GFR was estimated by creatinine clearance. The electrolyte levels were measured by an autoanalyzer (Roche Hitachi F-800). Appropriate commercial kits were used for glucose (Quanti-Chrom™ Glucose Assay Kit, DIGL-200) and cholesterol measurements (Cholesterol Fluorometric (Red) Assay Kit, Amplex® Red from Molecular Probes, Invitrogen; A12216). Serum total cholesterol and HDL cholesterol levels, following phosphotungstic acid/ magnesium chloride precipitation, were determined using the same cholesterol kit. LDL cholesterol levels were calculated by subtracting HDL cholesterol from the total cholesterol.

### Citrate Synthase (CS) activity

CS activity was determined for the soleus muscle of each rat according to the spectrophotometric method described by Srere (1969).

### Proximal tubule isolation

As mentioned in our previous study (Cirrik & Oner, 2006), renal proximal tubules were isolated from rats based on the method of Vinay et al. (1981).

### Tissue cholesterol levels

Following isolation, proximal tubules were subjected to lipid extraction as previously described (Zager et al., 1999). Total and free cholesterol levels were then determined using the commercial kit. Cholesterol ester (CE) levels in samples were calculated by subtracting the free cholesterol from the total cholesterol. Hepatic total cholesterol levels were determined using the same commercial kit, after the same lipid extraction procedure.

### Cytoresistance

As outlined by Zager et al. (1999; 2001; 2003a; 2003b; 2005; Zager and Kalhorn, 2000), isolated proximal tubules were incubated either under basal conditions or ATP-depleted/  $\text{Ca}^{+2}$  overloaded conditions, which consisted of mitochondrial respiration and glycolysis inhibitors and  $\text{Ca}^{+2}$  ionophore ( $7.5 \mu\text{M}$  antimycin A,  $20 \text{ mM}$  2-deoxyglucose and  $10 \mu\text{M}$  A23187, respectively) for 4 hours. After 4 hours incubation, the medium LDH level was determined using a commercial kit (QuantiChrom™ Lactate Dehydrogenase Kit, DLDH-100) and LDH release was expressed as a percentage of the total LDH level.

### Tubule organic anion accumulation study

Isolated PTSs were incubated in Krebs phosphate buffer

containing 50  $\mu\text{M}$  PAH, at 37°C for 1 hour and 1 mM Probenecide (an inhibitor of OATs localized at the basolateral membrane of the tubule cells and transport PAH into the cells) was added to the incubation medium at the 45<sup>th</sup> min to prevent its reverse release during washing processes. The PAH loaded tubules were washed three times and a further 15 min incubation was carried out under the same conditions, without PAH but with 1 mM Probenecide. At the end of the incubation, tubules were sonicated and their PAH contents were measured (Gehrig et al. 1986; Agarwal, 2002).

### Tubule peroxynitrite level

Peroxyntite levels in the PTSs incubated at 37°C for one hour were determined by a spectrophotometric method described by Beckman et al. (1992).

### Mitochondrial isolation

Mitochondria were isolated from renal cortical tissue using a method defined by Weinberg et al. (1982). Isolated mitochondria were used for inorganic phosphate determination.

### Inorganic phosphate

Inorganic phosphate levels in the mitochondria were determined according to the spectrophotometric method described by Katewa and Katyare (2003).

### Statistical analysis

All values are presented as means  $\pm$  SEM. Statistical comparisons were performed by unpaired Student's t-test.  $P < 0.05$  was considered as statistically significant.

## Results

### Functional parameters

In this study, heavy muscle activity-induced renal cytoresistance and its functional importance were examined. The PTSs of sedentary and exhausted rats were isolated and tubular cholesterol and LDH release were determined. In the exhausted group, the blood lactate level was in-

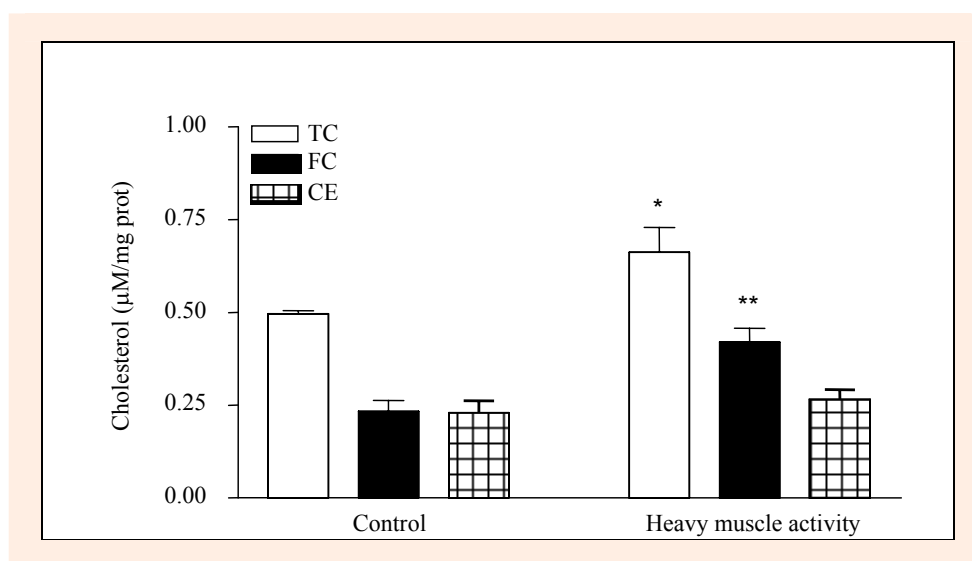
creased two fold (from  $1.87 \pm 0.12$  to  $4.36 \pm 0.39$  mM,  $p < 0.001$ ) and CS activity in the soleus muscle was elevated significantly from  $65.14 \pm 6.81$  to  $123.54 \pm 10.14$   $\mu\text{M}\cdot\text{g ww}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  ( $p < 0.001$ ).

As seen in Table 1, five days of exhaustive muscle activity had no significant effect on either MAP, GFR or RBF. Kidneys displayed normal functions according to routine laboratory tests. Plasma electrolytes were within normal limits, blood total, LDL and HDL cholesterol levels did not alter significantly with respect to the control group. However, although the fractionated urinary  $\text{Na}^+$  ( $\text{FE}_{\text{Na}^+}$ ) and  $\text{K}^+$  excretion ( $\text{FE}_{\text{K}^+}$ ) remained unaltered, animals subjected to heavy muscle activity exhibited a significant proteinuria and glycosuria associated with low serum protein and glucose levels. Urinary cholesterol excretion was also increased.

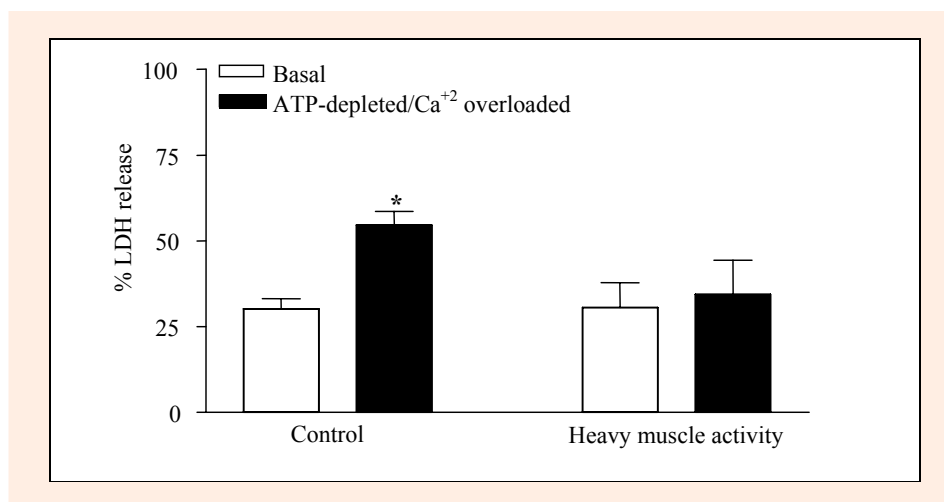
Although the serum cholesterol levels did not exhibit a significant difference between the control and the exhausted groups, there was a marked increase in the total cholesterol in the PTSs of exhausted group with respect to the controls ( $0.662 \pm 0.067$   $\mu\text{M}\cdot\text{mg}^{-1}$  protein vs  $0.499 \pm 0.008$   $\text{M}\cdot\text{mg}^{-1}$  protein,  $p < 0.05$ ) (Figure 1). Interestingly, the elevation was prominent particularly in the free cholesterol fraction ( $0.420 \pm 0.037$   $\mu\text{M}\cdot\text{mg}^{-1}$  protein vs  $0.234 \pm 0.029$ ,  $p < 0.01$ ), while the mean cholesterol ester level remained unchanged between the groups ( $0.265 \pm 0.027$   $\mu\text{M}\cdot\text{mg}^{-1}$  protein vs  $0.230 \pm 0.032$   $\mu\text{M}\cdot\text{mg}^{-1}$  protein). While studying the cholesterol loading effects of heavy muscle activity we found that, in addition to the kidney, the liver was also affected. Similar to the findings in proximal tubule cells, total cholesterol was significantly elevated in the hepatic cells of the exhausted group with respect to the control group ( $0.428 \pm 0.023$   $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  ww. vs control value of  $0.221 \pm 0.020$   $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  ww,  $p < 0.01$ ).

### Proximal tubule cytoresistance; LDH release

At basal conditions, after a 4-hour incubation at 37 °C, LDH release into the incubation medium from isolated PTSs of sedentary and 5-day exhausted rats was similar ( $30.59 \pm 7.27\%$  and  $30.2 \pm 7.07\%$  respectively). In



**Figure 1.** Total cholesterol (TC), free cholesterol (FC) and ester cholesterol (EC) levels in proximal tubules isolated from sedentary control and 5-day exhausted animals. Statistically different from sedentary control; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



**Figure 2.** LDH release from proximal tubules isolated from control and 5-day exhausted rats. LDH release was determined in the basal and ATP-depleted/ Ca<sup>2+</sup> overloaded (Antimycin A, 7.5  $\mu\text{M}$ , 2-deoxyglucose, 20 mM and A23187, 10  $\mu\text{M}$ ) conditions and expressed a percentage of total LDH. Statistically different from individual basal conditions; \*  $p < 0.001$ .

response to ATP-depleted/ calcium-overloaded conditions, used as a second attack, LDH release increased significantly ( $54.6 \pm 8.2\%$ ,  $p < 0.001$ ) in the PTSs of sedentary control rats, while LDH release ( $34.41 \pm 9.99\%$ ) in the PTSs of exhaustive rats remained unaltered (Figure 2).

#### Urinary PAH (organic anion) excretion

An organic anion prototype PAH excretion was found to be  $32.34 \pm 7.11 \mu\text{g}\cdot\text{g}\cdot\text{kw}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  in the control sedentary rats and did not change significantly in the exhaustive animals ( $49.37 \pm 5.75 \mu\text{g}\cdot\text{g}\cdot\text{kw}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ). It was estimated that  $84.81 \pm 2.31\%$  and  $78.13 \pm 6.52\%$  of the excreted PAH originated from the tubular secretion of control and exhausted animals, respectively (Figure 3). Thus, heavy muscle activity did not cause a significant effect on tubular PAH secretion.

#### PAH (organic anion) accumulation in the proximal tubule segments

PAH loaded PTSs were incubated at 37 °C for 15 min in the Krebs Phosphate buffer containing 1 mM probenecide

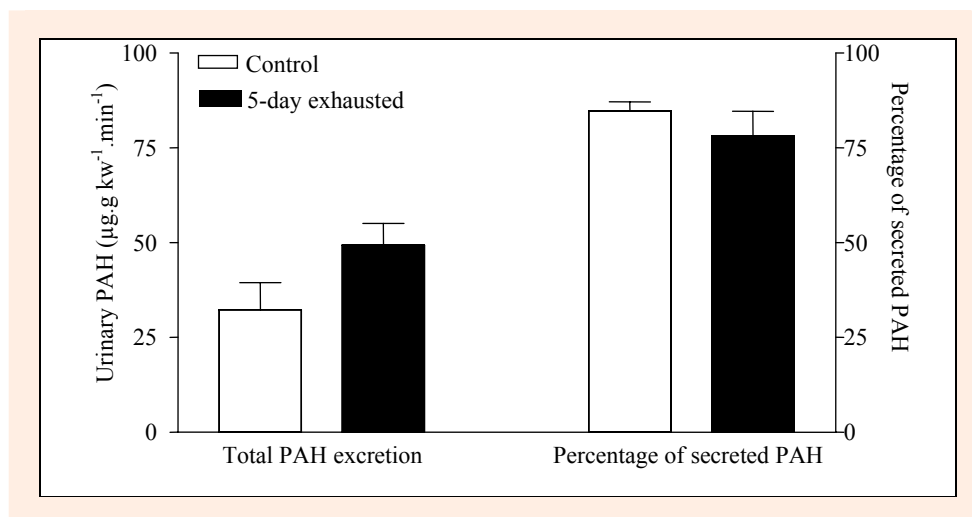
and time dependent PAH release was studied. The amount of PAH released into the medium in control and exhausted groups was similar ( $10.74 \pm 0.47$  and  $9.04 \pm 1.08 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  protein, respectively). However, following the 15 min release period, the remaining unreleased PAH, which is accepted as the accumulated amount, in the PTS of exhaustive rats was significantly higher than that of sedentary rats ( $1.77 \pm 0.27$  and  $4.54 \pm 1.00 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  protein in control and exercised animals respectively,  $p < 0.001$ ).

#### Peroxynitrite levels in the proximal tubule segments

Peroxynitrite, an NO oxidation product, increased dramatically in the isolated tubules of exhausted rats relative to the values obtained from the control group ( $100.87 \pm 26.60$  vs  $1213.43 \pm 19.45 \text{ nM}\cdot\text{mg}^{-1}$  protein,  $p < 0.01$ ).

#### Inorganic phosphate level

Isolated mitochondria of the renal cortex from control and exhausted animals were used to study the F<sub>0</sub>/F<sub>1</sub> ATPase activity, based on inorganic phosphate release during the 10 min incubation period. The inorganic phosphate



**Figure 3.** Total PAH excretion and percentage of secreted PAH in control and 5-day exhausted rats.

**Table 1.** Studied parameters in rats from sedentary control and 5-day exhausted groups.

Groups	Sedentary Control	Heavy muscle activity
MAP (mmHg)	91.2 (1.8)	86.75 (3.69)
GFR (ml·dk <sup>-1</sup> )	.572 (2.1)	.659 (.11)
RBF (ml·dk <sup>-1</sup> )	5.45 (1.03)	7.61 (.99)
Urinary glucose (mg·ml <sup>-1</sup> )	.003 (.003)	.293 (.070) *
Urinary protein (mg·dL <sup>-1</sup> )	.054 (.072)	.486 (.071) **
Urinary cholesterol (mg·dL <sup>-1</sup> )	.032 (.002)	.038 (.002) ***
FE <sub>Na</sub> <sup>+</sup>	.151 (.040)	.111 (.040)
FE <sub>K</sub> <sup>+</sup>	52.52 (9.32)	57.16 (3.37)
Serum total chol (mg·mL <sup>-1</sup> )	.97 (.04)	1.17 (.11)
Serum HDL-chol (mg·mL <sup>-1</sup> )	.28 (.03)	.30 (.05)
Serum LDL-chol (mg·mL <sup>-1</sup> )	.671 (.034)	.869 (.090)
Serum glucose (mg·mL <sup>-1</sup> )	1.46 (.06)	.95 (.07) ***
Serum protein (g·dL <sup>-1</sup> )	1.52 (.02)	1.46 (.02) *
Plasma [Na <sup>+</sup> ] mmol·L <sup>-1</sup>	140.25 (1.13)	141.25 (.73)
Plasma [K <sup>+</sup> ] mmol·L <sup>-1</sup>	3.58 (.05)	3.63 (.14)

Statistically different from sedentary control; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

releasing effect of F0/F1 ATP synthase in the mitochondria of control and exercised rats was  $3.69 \pm 0.23 \mu\text{g}\cdot\text{mg protein}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  and  $3.85 \pm 0.39 \mu\text{g}\cdot\text{mg protein}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ , respectively.

## Discussion

As demonstrated previously in our laboratory (Gündüz and Senturk, 2003; Kocer et al., 2008), exhaustive muscle activity leads to oxidative damage in the kidneys. In accordance with these studies, in the present experiment, exhaustive activity, as proved by elevated blood lactate and CS activity of the soleus muscle, is associated with significant elevation of tubular peroxynitrite levels, which is an oxidation product of nitric oxide. This exhaustive physical activity induced some degree of renal dysfunction such as proteinuria and glycosuria (Table 1). However other tests used to evaluate the functional integrity of the kidneys, such as GFR, urinary electrolytes and organic anion (PAH) excretions, remained within normal limits. The functional interpretation of these parameters may be subjective. To some authors who accept proteinuria and glycosuria as a benign exercise induced process (Asgar et al., 2007; Bergstein, 1999; Neumayr et al., 2005), the kidney functions of the exhausted rats in the present experiment can be totally normal, whereas for others, proteinuria, glycosuria and elevated urine cholesterol may be the criteria of impaired kidney functions in exhausted rats (Di Meo and Venditti, 2001; Maeda et al., 2004; Middlekauff et al., 1997; Momen et al., 2003; 2004; Podhorska-Okolów et al., 2004). Therefore, our results supported most of the previous studies, indicating both positive and negative effects of exhaustive exercise on kidney functions (Asgar et al., 2007; Poortmans, 1984; Poortmans and Labilloy, 1988; Poortmans and Vancalck, 1978; Neumayr et al., 2005). The authors who consider glomerular and tubular structures as the most sensitive areas are supported by the significant increase in urinary protein, glucose and cholesterol excretion in the exhausted animals (Poortmans, 1984; Poortmans and Labilloy, 1988; Poortmans and Vancalck, 1978). The elevated glomerular permselectivity to macromolecules and other tubular adaptive changes in exercisers are reported to be transient and decline rapidly after exercise and their aetiology remains unclear (Poortmans, 1984; Poortmans and

Vancalck, 1978; Poortmans and Vanderstraeten, 1994). We are unable to say that elevated protein and glucose excretion return to normal levels at a certain postexercise period, since we have not studied time dependent functional changes. However, Schneider et al. (2007) reported that the most sensitive test for kidney functions is the organic anion excretion rate, and therefore we also measured an organic anion prototype PAH excretion rate both in vivo and in vitro in our study. Neither PAH excretion nor its tubular secretory portion changed significantly in the exhausted animal group (Figure 3). This in vivo result is also verified by the in-vitro excretion study, and the PAH secretion rate in the isolated PTSs from exhausted rats remained unchanged.

Our data, together with the literature findings, imply that while most secretory functions of the nephron are within normal limits during heavy muscle activity, some functions depending on glomerular permeability and tubular reabsorption seem to be vulnerable (Table 1). This difference in the sensitivity of the kidney functions of exercising animals may arise from the characteristics of adaptive changes in the proximal tubule cells occurring in response to heavy muscle activity.

It has been reported previously that several forms of stress in the body produce some adaptive changes in the kidney proximal tubules by stimulating self-defence mechanisms. These changes are denoted as “acquired renal cytoresistance” (Zager et al., 1999; 2001; 2003a; 2003b; 2005; Zager and Kalhorn, 2000). Although Zager et al. (1999; 2001; 2003a; 2005; Zager and Kalhorn, 2000) did not include heavy muscle activity as a stressor, the results of the present study clearly indicated that, like other stressors, strenuous physical activity renders the kidneys more resistant to subsequent attacks, because the isolated PTSs from exhausted rats showed resistance to ATP depletion and released less LDH into the medium (Figure 2).

Cholesterol accumulation is accepted as a hallmark of stress-induced cytoresistance in the proximal tubule cells, and its mechanisms have been investigated intensively (Zager et al., 1999; 2001; 2003a; 2005; Zager and Kalhorn, 2000). As with other renal cytoresistance inducers, heavy muscle activity caused a cellular cholesterol load in the proximal tubule cells. To our knowledge, there are no direct studies on the effects of heavy muscle activ-

ity on tubule cholesterol homeostasis, and our study is the first to determine the changes in cholesterol homeostasis in the proximal tubule cells.

Under physiological conditions, free cholesterol biosynthesis and cholesterol influx and efflux are balanced, and cellular cholesterol levels remain normal (Chawla et al., 2001; Weber et al., 2004). In the present study, it is obvious that, like other stressors, heavy muscle activity leads to cholesterol accumulation and cytoresistance in the tubule cells by impairing either elimination/esterification of free cholesterol or its influx pathways. Previous reports show a predominance of esterified cholesterol elevation in tubule cells as a response to other stressors (Zager et al., 1999; 2001; 2003a; 2005; Zager and Kalhorn, 2000). However, the free cholesterol related increase indicates the involvement of some other unknown mechanisms in the present experiment which cannot be fully explained with our present data. Nevertheless, elevated peroxynitrite levels may be one of the causative factors, and reduced elimination of free cholesterol by nitrosylated Apoprotein A1 with elevated peroxynitrite (Shao et al., 2005) may account for the increased free cholesterol in the tubule cells of exhausted rats.

Despite an obvious cholesterol elevation, most excretory kidney functions, including organic anion excretion rate, are not influenced by the free cholesterol accumulation in proximal tubule cells, whereas some reabsorptive functions such as protein endocytosis and glucose reabsorption by the apical membrane appear to be vulnerable. We have not measured tubular prostaglandin E2 levels, but previous reports regard the reduced tubular prostaglandin E2 production as responsible for the diminished apical endocytosis in exercisers (Mittleman and Zambraski, 1992; Llorente et al., 2000; Zambraski et al., 1986).

Intriguingly, in the present study an unaltered PAH secretion was associated with significant accumulation in cholesterol loaded isolated tubule cells. This shows that heavy muscle activity induced cholesterol loading, by impairing the balance between influxers and effluxers, thus facilitating organic anion (as well as xenobiotics) accumulation in the cholesterol loaded proximal tubule cells. Both organic anions and xenobiotics in the blood use the same organic anion transporters (OATs) for entry into proximal tubule cells and they then exit these cells through ATP dependent ABCC2 (MRP2) and ABCC4 (MRP4), cassette transporters located at the luminal membrane of the cells (Sekine et al., 2006). Neither organic anions nor xenobiotics accumulate in the tubule cells while their entrance and exit are balanced. PAH accumulation in the tubule cells of exhausted rats shows impairment of this delicate balance. Altered PAH entry may be responsible for this imbalance, since the tubular PAH secretory rate remained unchanged in the PTSs of the exhausted rats. There are no other studies related to MRPs changes in the tubular cells of exercisers, but unaltered ATP generation in the PTSs of exhausted rats seems to support the functional integrity of these ATP dependent MRPs. Also, additional data from the literature indicating unaltered ABCA1 expression, another member of ATP dependent MRPs family in cholesterol loaded cytoresis-

tant tubule cells (Zager et al., 2003b), is also supportive evidence for our unchanged PAH secretion result.

Despite the lack of direct evidence related to organic anion transporter (OAT) activity in the cholesterol loaded kidney cells of the exercisers, some indirect data such as basolateral preference of cholesterol accumulation (Imai et al., 1992) and different action of membrane cholesterol enrichment on carrier mediated transport processes (Levi et al., 1990), suggest that OAT1 and OAT3 activities localized at the basolateral membrane, which mediate the entries of several endogenous and exogenous substances into the proximal tubule cells, can be influenced earlier by cholesterol accumulation than the effluxing transporters localized apically. Furthermore, the elevated number of OAT1/bile acid transporters in the liver of chronic exercisers (Wilund et al., 2008) supports our view concerning the sensitivity of OATs activity to exercise induced cholesterol elevation in the cells. Contrary to Zager et al. (2001), who maintain that hepatic cholesterol does not change during cytoresistance, we found a similar cholesterol elevation in the liver of exhausted rats. Since both organs are located in the same splanchnic area and are subjected to reduced perfusion during each period of exercise, similar stress induced cholesterol accumulation would be a normal result, not a paradox. Therefore, the similar changes of OATs activities in both organs loaded with cholesterol are a logical expectation.

The biological significance of increased organic anion transport without alteration in its luminal secretion rate in animals or humans subjected to heavy muscle activity can be a topic for further study. The impaired balance between entrance and exit of xenobiotic/organic anions is important data, implying the elevated susceptibility to nephrotoxicity in humans/animals subjected to heavy muscle activity. This may have clinical significance, especially in those exposed simultaneously to heavy muscle activity and xenobiotics, pollutants, heavy metals and antibiotics which are eliminated by the kidneys through the same transporters. However, this hypothesis requires further studies for proof.

## Conclusion

The present data clearly demonstrated that (i) like other studied stressors, heavy muscle activity induces renal cytoresistance, (ii) organic anion accumulation as well as failure of the absorptive capacity of the tubule cells suggest the presence of some biochemical changes and increased vulnerability of kidneys to nephrotoxic agents in rats subjected to heavy muscle activity and (iii) when considering the broad substrate spectrum of OATs, this vulnerability to several endogenous and exogenous substances is of vital importance in exercisers or workers who are subjected to several chemicals, environmentally or therapeutically. Clinically, this vulnerability to nephrotoxicity in workers is very important and must be evaluated by further experimental and clinical studies.

## Acknowledgements

This study was supported by Akdeniz University Research Foundation (Grant No: 2005.01.0103.011) and The Scientific and Technical Research Council in Turkey (Grant No: 105S16; SBAG-HD-51).

## References

- Agarwal, R. (2002) Rapid microplate method for PAH estimation. *The American Journal of Physiology - Renal Physiology* **283**, F236-241.
- Asghar, M., George, L. and Lokhandwala, M.F. (2007) Exercise decreases oxidative stress and inflammation and restores renal dopamine D1 receptor function in old rats. *The American Journal of Physiology - Renal Physiology* **293**, F914-919.
- Beckman, J.S., Ischiropoulos, H., Zhu, L., van der Woerd, M., Smith, C., Chen, J., Harrison, J., Martin, J.C. and Tsai, M. (1992) Kinetics of superoxide dismutase- and iron-catalyzed nitration of phenolics by peroxynitrite. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **298**, 438-445.
- Bellinghieri, G., Savica, V. and Santoro, D. (2008) Renal alterations during exercise. *Journal of Renal Nutrition* **18**(1), 158-164.
- Bergstein, J.M. (1999) A practical approach to proteinuria. *Pediatric Nephrology* **13**, 697-700.
- Brown, W.J., Burton, N.W. and Rowan, P.J. (2007) Updating the evidence on physical activity and health in women. *American Journal of Preventive Medicine* **33**, 404-411.
- Chawla, A., Boisvert, W.A., Lee, C.H., Laffitte, B.A., Barak, Y., Joseph, S.B., Liao, D., Nagy, L., Edwards, P.A., Curtiss, L.K., Evans, R.M. and Tontonoz, P. (2001) A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Molecular Cell* **7**, 161-171.
- Cirrik, S. and Oner, G. (2006) Effect of nitric oxide on ammoniogenesis in rats. *Nephron Physiology* **102**, 61-71.
- Di Meo, S. and Venditti, P. (2001) Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biological Signals and Receptors* **10**, 125-140.
- Gehrig, J.J. Jr., Jamison, R.L., Baylis, C., Troy, J.L., Brenner, B.M. and Jamison, R.L. (1986) Effect of intermittent feeding on renal hemodynamics in conscious rats. *The American Journal of Physiology* **250**, F566-572.
- Gündüz, F. and Sentürk, U.K. (2003) The effect of reactive oxidant generation in acute exercise-induced proteinuria in trained and untrained rats. *European Journal of Applied Physiology* **90**(5-6), 526-532.
- Ichikawa, M., Fujita, Y., Ebisawa, H. and Ozeki, T. (2000) Effects of long-term, light exercise under restricted feeding on age-related changes in physiological and metabolic variables in male Wistar rats. *Mechanisms of Ageing and Development* **113**, 23-35.
- Imai, Y., Scoble, J.E., McIntyre, N. and Owen, J.S. (1992) Increased Na(+)-dependent D-glucose transport and altered lipid composition in renal cortical brush-border membrane vesicles from bile duct-ligated rats. *Journal of Lipid Research* **33**, 473-483.
- Katewa, S.D. and Katyare, S.S. (2003) A simplified method for inorganic phosphate determination and its application for phosphate analysis in enzyme assays. *Analytical Biochemistry* **323**, 180-187.
- Khazaenia, T., Ramsey, A.A. and Tam, Y.K. (2000) The effects of exercise on the pharmacokinetics of drugs. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* **3**, 292-302.
- Koçer, G., Sentürk, U.K., Kuru, O. and Gündüz, F. (2008) Potential sources of oxidative stress that induce postexercise proteinuria in rats. *Journal of Applied Physiology* **104**(4), 1063-1068.
- Levi, M., Baird, B.M. and Wilson, P.V. (1990) Cholesterol modulates rat renal brush border membrane phosphate transport. *The Journal of Clinical Investigation* **85**, 231-237.
- Llorente, A., van Deurs, B., Garred, O., Eker, P. and Sandvig, K. (2000) Apical endocytosis of ricin in MDCK cells is regulated by the cyclooxygenase pathway. *Journal of Cell Science* **113**, 1213-1221.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* **193**, 265-275.
- Maeda, S., Miyauchi, T., Iemitsu, M., Tanabe, T., Goto, K., Yamaguchi, I. and Matsuda, M. (2004) Endothelin receptor antagonist reverses decreased NO system in the kidney in vivo during exercise. *The American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* **286**, E609-614.
- Middlekauff, H.R., Nitzsche, E.U., Nguyen, A.H., Hoh, C.K. and Gibbs, G.G. (1997) Modulation of renal cortical blood flow during static exercise in humans. *Circulation Research* **80**, 62-68.
- Mittleman, K.D. and Zambarski, E.J. (1992) Exercise-induced proteinuria is attenuated by indomethacin. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **24**(10), 1069-1074.
- Momen, A., Leuenberger, U.A., Ray, C.A., Cha, S., Handly, B. and Sinoway, L.I. (2003) Renal vascular responses to static hand-grip: role of muscle mechanoreflex. *The American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **285**, H1247-253.
- Momen, A., Leuenberger, U.A., Handly, B. and Sinoway, L.I. (2004) Effect of aging on renal blood flow velocity during static exercise. *The American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **287**, H735-40.
- Newman, D.J. and Price, C.P. (1999) Renal function and nitrogen metabolites. In: *Tietz textbook of clinical chemistry*. Eds: Burtis, C.A. and Ashwood, E.R. 3rd edition. Philadelphia: WB Saunders Company. 1204-1270.
- Neumayr, G., Pfister, R., Hoertnagl, H., Mitterbauer, G., Prokop, W. and Joannidis, M. (2005) Renal function and plasma volume following ultramarathon cycling. *International Journal of Sports Medicine* **26**, 2-8.
- Podhorska-Okolów, M., Dziegiel, P., Murawska-Ciałowicz, E., Krajewska, B., Ciesielska, U., Jethon, Z. and Zabel, M. (2004) Exercise-induced apoptosis in renal tubular cells of the rat. *Folia Morphologica (Warsz)* **63**, 213-216.
- Poortmans, J.R. (1984) Exercise and renal function. *Sports Medicine* **1**, 125-153.
- Poortmans, J.R. and Labilloy, D. (1988) The influence of work intensity on postexercise proteinuria. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology* **57**, 260-263.
- Poortmans, J.R. and Vancalck, B. (1978) Renal glomerular and tubular impairment during strenuous exercise in young women. *European journal of Clinical Investigation* **8**, 175-178.
- Poortmans, J.R. and Vanderstraeten, J. (1994) Kidney function during exercise in healthy and diseased humans. An update. *Sports Medicine* **18**, 419-437.
- Schneider, R., Sauvant, C., Betz, B., Otremba, M., Fischer, D., Holzinger, H., Wanner, C., Galle, J. and Gekle, M. (2007) Downregulation of organic anion transporters OAT1 and OAT3 correlates with impaired secretion of para-aminohippurate after ischemic acute renal failure in rats. *The American Journal of Physiology - Renal Physiology* **292**, F1599-605.
- Sekine, T., Miyazaki, H. and Endou, H. (2006) Molecular physiology of renal organic anion transporters. *The American Journal of Physiology - Renal Physiology* **290**, F251-261.
- Shao, B., Bergt, C., Fu, X., Gren, P., Voss, J.C., Oda, M.N., Oram, J.F. and Heinecke, J.W. (2005) Tyrosine 192 in apolipoprotein A-I is the major site of nitration and chlorination by myeloperoxidase, but only chlorination markedly impairs ABCA1-dependent cholesterol transport. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 5983-5993.
- Srere, P.A. (1969) Citrate synthase. In: *Methods in Enzymology*. Ed: Lowenstein, J.M. 2nd edition. New York: Academic Press. 3-5.
- Vinay, P., Gougoux, A. and Lemieux, G. (1981) Isolation of a pure suspension of rat proximal tubules. *The American Journal of Physiology* **241**, F403-411.
- Weber, L.W., Boll, M. and Stampfl, A. (2004) Maintaining cholesterol homeostasis: sterol regulatory element-binding proteins. *World J Gastroenterol* **10**, 3081-3087.
- Weinberg, J.M., Harding, P.G. and Humes, H.D. (1982) Mitochondrial bioenergetics during the initiation of mercuric chloride-induced renal injury. *The Journal of Biological Chemistry* **257**, 60-67.
- Wilund, K.R., Feeney, L.A., Tomayko, E.J., Chung, H.R. and Kim, K. (2008) Endurance exercise training reduces gallstone development in mice. *Journal of Applied Physiology* **104**, 761-7765.
- Zager, R.A., Burkhart, K.M., Johnson, A.C. and Sacks, B.M. (1999) Increased proximal tubular cholesterol content: implications for cell injury and "acquired cytoresistance". *Kidney International* **56**, 1788-1797.
- Zager, R.A. and Kalthorn, T.F. (2000) Changes in free and esterified cholesterol: hallmarks of acute renal tubular injury and acquired cytoresistance. *The American Journal of Pathology* **157**, 1007-1016.
- Zager, R.A., Andoh, T. and Bennett, W.M. (2001) Renal cholesterol accumulation: a durable response after acute and subacute renal insults. *The American Journal of Pathology* **159**, 743-752.
- Zager, R.A., Johnson, A.C. and Hanson, S.Y. (2003a) Sepsis syndrome stimulates proximal tubule cholesterol synthesis and suppresses the SR-B1 cholesterol transporter. *Kidney International* **63**, 123-133.
- Zager, R.A., Johnson, A.C. and Hanson, S.Y. (2003b) Proximal tubular

cholesterol loading after mitochondrial, but not glycolytic, blockade. *The American Journal of Physiology - Renal Physiology* **285**, F1092-1099.

Zager, R.A., Johnson, A.C. and Hanson, S.Y. (2005) Renal tubular triglyceride accumulation following endotoxic, toxic, and ischemic injury. *Kidney International* **67**, 111-121.

Zambraski, E.J., Dodelson, R., Guidotti, S.M. and Harnett, C.A. (1986) Renal prostaglandin E2 and F2 alpha synthesis during exercise: effects of indomethacin and sulindac. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **18(6)**, 678-684.

### Key points

- The cholesterol loading and decreased LDH release from PTs isolated from exhausted rats indicate the heavy muscle activity induced renal cytoresistance.
- Heavy muscle activity-induced renal cytoresistance did not preserve the kidney functions.
- Organic anion accumulation as well as failure in the absorptive capacity of the tubule cells suggest the presence of some biochemical changes and elevated vulnerability of kidneys against nephrotoxic agents in rats subjected to heavy muscle activity.

### AUTHORS BIOGRAPHY

#### Gülşen ÖNER

##### Employment

Prof., Akdeniz University, Medical Faculty, Department of Physiology, Antalya, Turkey

##### Degree

PhD

**E-mail:** onerg@akdeniz.edu.tr

#### Selma CİRRİK

##### Employment

Akdeniz University, Medical Faculty, Department of Physiology, Antalya, Turkey

**E-mail:** scirrik@akdeniz.edu.tr

#### ✉ Gülşen Öner

Akdeniz University, Medical Faculty, Department of Physiology, Antalya, Turkey

# Effect of Nitric Oxide on Ammoniogenesis in Rats

Selma Cırrık Gülsen Öner

Akdeniz University, Faculty of Medicine, Department of Physiology, Antalya, Turkey

## Key Words

Nitric oxide · Permeability transition pore · Glutamine · Ammoniogenesis · Cyclosporin A

## Abstract

**Aim:** This in vitro study using rat cortical slices, isolated proximal tubules and mitochondria was conducted to investigate the effect of exogenous and endogenous nitric oxide on ammoniogenesis. **Methods and Results:** The cortical slices were incubated with phosphate-buffered saline containing 1 mM L-glutamine at 37°C and glutamine-stimulated ammoniogenesis which was further elevated with  $10^{-7}$  M ANGII showed a time-dependent decrease during 2 h.  $10^{-4}$  M L-NAME or  $10^{-5}$  M L-canavanin caused a similar ammonia elevation to that of ANGII, whereas the addition of  $10^{-5}$  M SNAP attenuated the ammonia-increasing effects of ANGII and L-NAME. Basal or exogenous NO without significantly affecting glutamine uptake of the slices seemed to convert the glutamine deamidation pathway to transamination, since L-NAME increased the ammonia to glutamine ratio from  $0.87 \pm 0.08$  mol/mol to  $1.03 \pm 0.04$  ( $p < 0.01$ ). L-NAME increased both ammoniogenesis and mitochondrial oxygen consumption but SNAP depressed them. Endogenous NO reduced ammoniogenesis without changing the mitochondrial permeability transition pore (PTP), whereas exogenous NO-induced attenuation in ammoniogenesis was associated with elevated PTP in a CsA-sensitive manner. **Conclusion:** These results demonstrated that in rat kidney, basal NO depresses mito-

chondrial oxygen consumption and attenuates ammoniogenesis without affecting PTP; however, exogenous NO inhibits ammonia production by disturbing PTP in isolated mitochondria.

Copyright © 2006 S. Karger AG, Basel

## Introduction

Nitric oxide (NO) is a small gaseous molecule, generated in most cells during the oxidation of L-arginine to L-citrulline by nitric oxide synthase (NOS) enzymes. NO is a major participant in a number of physiological functions such as blood pressure regulation, platelet aggregation, neurotransmission and immune responses in biological systems. It is also involved in renal hemodynamics and reabsorptive functions [1, 2]. In vivo and vitro studies [2–4] revealed that NO plays a significant role in proximal tubule physiology and physiopathology. It has been demonstrated that after appropriate stimulations, proximal tubule cells are able to produce large quantities of NO [3]. A substantial NO generation associated with increased NO synthase (NOS) has been reported after the incubation of isolated tubule cells with LPS, TNF- $\alpha$ , or interferon- $\gamma$  [3, 4]. In addition to cytokines and LPS, several other factors such as hypoxia, iron, atrial natriuretic hormone, angiotensin II (ANGII) [3], insulin [4], and endothelin [5] were shown to stimulate NO production in proximal tubules.

NO exerts its effect by binding the soluble guanylate cyclase and triggering a series of events initiated by cGMP



in the cells [2, 3, 6]. Recent evidence demonstrated that mitochondrial NO which is produced by NO synthase enzyme (NOS), localized at the inner mitochondrial membrane close to the cytochrome c oxidase site, modulates oxygen consumption and ATP generation of tissue by a cGMP-independent pathway [1, 7, 8]. Mitochondrial NO regulates both oxygen consumption and oxygen free radical production by competitive inhibition of cytochrome c oxidase. Thus, it helps average oxygen utilization among cells at different distances from the capillaries [1, 7, 8]. At low NO levels, cytochrome c oxidase inhibition appears to slow oxygen consumption by cells closest to blood vessels allowing oxygen to penetrate to cells which are in danger of becoming hypoxic, whereas at higher concentrations mitochondrial NO reduces oxygen uptake as well as ATP generation and damages mitochondrial integrity by increasing the production of superoxide radicals [1, 7–9].

The proximal tubules are the nephron site reabsorbing approximately two-thirds of sodium and water filtered by the glomerulus [10]. This part of the nephron also has a dominant role in the absorption of many other substances including amino acids, glucose, bicarbonate and phosphate [2, 3]. NO has been shown to be involved in regulation of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers and paracellular permeability of tubular cells thereby, NO functions as inhibitor for the proximal tubular fluid, sodium, bicarbonate and phosphate reabsorption [2, 3, 11]. On the other hand, some authors [12–14] have pointed out the stimulatory role of NO on bicarbonate and fluid absorption in proximal tubules by indicating development of metabolic acidosis in NOS knockout mice. Nevertheless, due to the compensatory increase in bicarbonate reabsorption in the late nephron, the effect of NO does not reflect on blood pH and bicarbonate levels in normal animals with intact kidneys [14].

Since the reabsorption of filtered material in the proximal tubule cells is greatly dependent on Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase which uses ATP generated in intact mitochondria, the factors involved in ATP production are expected to influence proximal tubule cell functions. NO-induced inhibition in cytochrome c oxidase and oxygen utilization as well as ATP generation are likely to explain the inhibition rather than stimulation in the reabsorptive capacity of proximal tubule cells.

Ammonia (NH<sub>3</sub>) is one of the most important secretory product of the proximal tubule cells and ammoniogenesis is an adaptable and very important function in maintaining body fluid pH at the physiological limits by the kidney. Ammonia production in this part of the neph-

ron is regulated by two enzymes, a phosphate-dependent glutaminase (PDG) and glutamate dehydrogenase (GDH) [15]. These mitochondrial enzymes have the ability to react to intracellular pH changes as well as energy level. ATP activates glutaminase whereas it acts as an allosteric inhibitor for GDH [16]. They are heavily localized in the S1 and S2 segments of the proximal tubules [15, 17] where the cells are able to synthesize *L*-arginine from *L*-citrulline, so there is no lack of NO precursor in these tubule segments [18].

Ammonia which is one of the most important secretory products of the proximal tubule mitochondria is expected to be influenced by the reduction in oxygen consumption and ATP generation. The factors influencing mitochondrial oxygen consumption such as NO [1, 7–9] might have an inhibitory effect on ammoniogenesis. However, many agents which act as NO stimulators have also been reported to increase ammonia production in the renal cortex [3]. Among them, the effect of ANGII has been studied extensively and its stimulatory action on both ammonia and NO production in proximal tubule cells has been reported by several authors [17, 19]. The results indicating ANGII-induced increase both in ammonia and NO contradict the authors who showed the suppressive effect of NO on mitochondrial oxygen consumption and ATP generation [1, 7, 8] and the controversies remain. When taking into consideration the ATP sensitivity of the enzymes involved in ammonia production such as PDG and GDH [16] together with the suppressive effects of NO on mitochondrial functions [1, 7–9], ammoniogenesis would be expected to be influenced by the altered NO levels in the proximal tubule cells.

Despite the presence of several unanswered questions on this topic, reviewing the related literature showed that the role of either exogenously or endogenously produced NO in ammoniogenesis has not yet been studied. The purpose of the present experimental study, therefore, is to investigate (1) the effect of endogenous and exogenous NO on ammoniogenesis, and (2) the contribution of mitochondrial NO and its action mechanism in the ammonia production of rat proximal tubules.

## Materials and Methods

Three-month-old male albino rats received food and water ad libitum before the experiment. Under light ether anesthesia following a midline abdominal incision, a catheter was placed into the thoracic aorta and used to perfuse both kidneys with an ice-cold Krebs phosphate buffer to remove the blood. Then both kidneys were excised, cleaned of adhesive fat tissues and decapsulated in

an ice-cold buffer. The cooled kidneys were hemisected longitudinally, the medullary part discarded, and cortical tissue sliced finely using a sharp razor blade.

Cortical slices and isolated mitochondria from the renal cortex of rats were used to study the involvement of mitochondrial and cytosolic NO in ammonia production as well as its possible mechanism of action. In order to study the effect of endogenous and exogenous NO on the proline synthesis from *L*-glutamine, we used the proximal tubule segments which were isolated by the method of Vinay et al. [20].

#### *Isolation Procedure of the Cortical Mitochondria*

Some of the cortical slices were used for the isolation of mitochondria according to the method described by Weinberg et al. [21]. Briefly, the minced slices were homogenized in a buffer containing 270 mM sucrose, 1 mM EGTA, 5 mM Tris-HCl, pH 7.4 (tissue weight to volume ratio was 1:10) and initial renal cortical homogenate was centrifuged at 600 *g* at  $-4^{\circ}\text{C}$  for 10 min. The supernatant was decanted and the pellet after resuspension with the washing buffer containing 0.50 mM Tris-HCl and 250 mM sucrose at pH 7.4 was recentrifuged at 10,000 *g* for 5 min. The postmitochondrial supernatant was decanted then centrifugation was repeated twice at 10,000 *g* for 5 min. The resulting mitochondrial pellet was suspended in cold  $\text{K}^{+}$ -rich buffer containing 100 mM KCl, 2 mM  $\text{K}_2\text{PO}_4$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM HEPES (pH 7.4 with TRIZMA base) to obtain a final concentration of 2.5 mg protein per ml. Mitochondrial protein concentration was measured by the method of Lowry et al. [22].

#### *Incubation Procedures of the Cortical Slices*

Approximately 100 mg of cortical slices were put in each tube containing 3 ml of phosphate-buffered saline (PBS) (as mM 117 NaCl, 4.7 KCl, 25  $\text{NaHCO}_3$ , 1.6  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 11 glucose, 2.4  $\text{CaCl}_2$ , 0.6  $\text{MgCl}_2$ ) with 0.5 mM *L*-methionine sulfoximine (MSO), an inhibitor of glutamine synthase. The cortical slices in all groups were incubated in 3 ml PBS containing 1 mM ammonia precursor, *L*-glutamine, and they were subjected to the following treatments. Briefly, in the 1st and 2nd groups, the slices were incubated in 3 ml PBS without and with 1 mM *L*-glutamine, respectively. In the third group, the slices were subjected to  $10^{-4}$  M *L*-NAME, a nonspecific NO synthase inhibitor to eliminate the role of basal nitric oxide. In the 4th group, the slices were subjected to  $10^{-7}$  M ANGII to stimulate ammoniogenesis as well as NO production. The slices in the 5th group were subjected to  $10^{-5}$  M SNAP (S-nitroso-N-acetylpenicillamine), a NO donor. In the 6th, 7th and 8th groups, the cortical slices were subjected to the combination of ANGII + *L*-NAME, or ANGII + *L*-canavanin, a specific iNOS inhibitor, and ANGII + *L*-NAME + SNAP.

All tubes were incubated for 2 h under 95%  $\text{O}_2$  and 5%  $\text{CO}_2$  at  $37^{\circ}\text{C}$  and pH 7.4. Medium samples were obtained at the 15th and 60th min of incubation, and both medium and tissue samples were obtained at the end of incubation for the analysis of ammonia, nitrite and glutamine.

#### *Incubation Procedure of Proximal Tubule Segments*

Isolated proximal tubule suspensions (approximately 500  $\mu\text{g}$  protein) in 3 ml of PBS containing 1 mM *L*-glutamine were incubated for 2 h without and with  $10^{-4}$  M *L*-NAME or  $10^{-5}$  M SNAP. At the end of the incubation period, the total protein and proline content of the media and tubule segments was measured.

#### *Measurement of Ammonia in the Isolated Mitochondria*

250  $\mu\text{g}$  of mitochondrial protein in a final volume of 1 ml buffer containing 100 mM KCl, 2 mM  $\text{K}_2\text{PO}_4$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM HEPES (pH 7.0 with TRIZMA base) was subjected to 1 mM *L*-glutamine as ammonia substrate and 1 mM *L*-arginine as NO substrate and incubated for 15 min at  $37^{\circ}\text{C}$  under 95%  $\text{O}_2$  and 5%  $\text{CO}_2$  aeration. The mitochondria-containing tubes were divided into 5 groups as duplicate. The first pair of tubes were used as a control to measure basal ammoniogenesis, the second, third and fourth pairs were subjected to  $10^{-4}$  M *L*-NAME,  $10^{-5}$  M *L*-canavanin and  $10^{-5}$  M SNAP, respectively, to measure the effect of endogenous and exogenous NO on mitochondrial ammoniogenesis. The 5th pair of tubes was subjected to 5 mM NaCN, a cytochrome c oxidase inhibitor to inhibit the metabolic activity of mitochondria. At the 15th min, all tubes were centrifuged at 10,000 *g* for 5 min at  $-4^{\circ}\text{C}$  and the supernatants were used for ammonia analysis. All mitochondrial incubations were done in duplicate on freshly isolated mitochondria within 1 h of their separation.

#### *Measurement of Mitochondrial Permeability Changes*

The mitochondrial swelling-induced changes in the absorbance of mitochondria solution at 540 nm were measured with a Shimadzu spectrophotometer (model 1601). The validity of this method has been proven by several authors who showed the association of elevated permeability with impaired mitochondrial functions [23–26]. The absorbance of 250  $\mu\text{g}$  mitochondrial protein in 1 ml of  $\text{K}^{+}$ -rich buffer at pH 7.4 was recorded as a control absorbance, then 60 nmol of calcium/mg mitochondrial protein was added with stirring at ambient temperature to activate the mitochondrial permeability transition pore (PTP). Then activated mitochondria were immediately subjected to one of the following agents: 10  $\mu\text{M}$  SNAP, 10  $\mu\text{M}$  *L*-NAME, 10  $\mu\text{M}$  sodium fluoride (NaF, a Mn-dependent superoxide dismutase inhibitor is used to increase ROS generation), 10  $\mu\text{M}$  cyclosporin A (CsA) – a PTP blocker, 1% dimethyl sulfoxide (DMSO, a CsA vehicle) or their combinations. These factor-induced changes in mitochondrial absorbance at 540 nm were recorded continuously for 3 min. The absorbance at the 3rd min was expressed as the percentage of the control absorbance.

The alteration in ammoniogenesis accompanied by the permeability changes during mitochondrial swelling were also measured in the tubes incubated with the above-mentioned agents during 3 min incubation at  $37^{\circ}\text{C}$  under 95%  $\text{O}_2$  and 5%  $\text{CO}_2$  aeration at pH 7.0 and at the 3th min all tubes were centrifuged at 10,000 *g* and their supernatants were used for ammonia measurement.

#### *Measurement of Mitochondrial Oxygen Consumption*

During 3 min incubation, 250  $\mu\text{g}$  mitochondrial protein was incubated for 3 min at  $37^{\circ}\text{C}$  in 1 ml  $\text{K}^{+}$ -rich buffer aerated overnight with a 95%  $\text{O}_2$  and 5%  $\text{CO}_2$  gas mixture in a closed system which permits elimination of the produced  $\text{CO}_2$ . Then, following centrifugation at 10,000 *g* at  $-4^{\circ}\text{C}$ , the oxygen content of the supernatant was measured using Stat profile pHox Plus and Plus L analyzer (Nova Biomedical). The oxygen utilization was expressed as nmol oxygen/mg protein/min.

In the samples, the ammonia content was measured by the method of Curnerro and Weiner [27]. Glutamine content was measured by the method of Mecke [28], nitrite level by the method of Bories and Bories [29], and proline by the method of Woessner [30].

**Table 1.** Ammonia secretion rate from kidney cortical slices during 120 min incubation

Groups	15th min (nM · mg protein <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )	60th min (nM · mg protein <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )	120th min (nM · mg protein <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )
Control (PBS)	1.25 ± 0.1	0.49 ± 0.04	0.27 ± 0.01
Glutamine (1 mM)	1.81 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.84 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.55 ± 0.02 <sup>a</sup>
L-NAME (100 μM)	2.99 ± 0.6 <sup>a, b</sup>	1.35 ± 0.27 <sup>a, b</sup>	0.83 ± 0.16 <sup>a, b</sup>
ANGII (100 nM)	3.14 ± 0.3 <sup>a, b</sup>	1.25 ± 0.13 <sup>a, b</sup>	0.81 ± 0.09 <sup>a, b</sup>
SNAP (10 μM)	1.18 ± 0.2 <sup>b</sup>	0.46 ± 0.09 <sup>b</sup>	0.23 ± 0.04 <sup>b</sup>
ANGII + L-NAME	3.17 ± 0.8 <sup>a, b</sup>	1.34 ± 0.35 <sup>a, b</sup>	0.86 ± 0.20 <sup>a, b</sup>
ANGII + L-canavanin (10 μM)	3.28 ± 0.9 <sup>a, b</sup>	1.46 ± 0.28 <sup>a, b</sup>	0.93 ± 0.21 <sup>a, b</sup>
ANGII + L-NAME + SNAP	2.73 ± 0.5 <sup>a, b</sup>	1.17 ± 0.20 <sup>a, b</sup>	0.76 ± 0.14 <sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> Denotes significance vs. control group.

<sup>b</sup> Shows significance vs. glutamine group ( $p < 0.05$ ). The values obtained from 8–10 animals were expressed as mean ± SE.

For statistical evaluation of the data, one-way ANOVA and Newman-Keuls (as a posthoc test) and Student's *t* test when appropriate were used. The data were expressed as mean ± SE,  $p < 0.05$  was accepted as significant.

## Results

### Ammonia Excretion Rate from Cortical Slices

Ammonia excretion rate showed a gradual decrease (table 1) during the 2-hour incubation period. At the 15th min of incubation, unstimulated cortical slices produced  $1.25 \pm 0.12$  nmol ammonia/mg protein/min. At the 60th and 120th min, the excretion rate dropped significantly to  $0.49 \pm 0.04$  ( $p < 0.001$ ) and  $0.27 \pm 0.01$  nmol ( $p < 0.001$ ) ammonia/mg protein/min, respectively. The presence of 1 mM *L*-glutamine in the incubation medium caused a significant increase in ammonia excretion without influencing its time-dependent decrease pattern. Both L-NAME and ANGII elevated the ammonia excretion rate by keeping its time-dependent decrease in all groups. As seen in table 1, combining ANGII with nonspecific and specific NOS inhibitors such as L-NAME or *L*-canavanin did not cause a further increase in the ammonia excretion rate.

However, in the slices treated with  $10^{-5}$  M SNAP, the ammonia excretion rate dropped to the levels seen in the unstimulated group ( $p < 0.01$ ). On the other hand, the ANGII + L-NAME-induced elevation in ammonia excretion was not influenced significantly by the presence of 10 μM SNAP (table 1).

### Total Ammonia in the Cortical Slices

As seen in table 2, during 120 min incubation at 37°C, the total ammonia content of the cortical slices, i.e. secreted and tissue ammonia, was significantly increased after adding 1 mM glutamine into the incubation medium ( $p < 0.001$ ).  $10^{-4}$  M L-NAME caused a further increase in total ammonia.  $10^{-7}$  M ANGII led to a similar increase as that of L-NAME. The combination of ANGII with L-NAME or *L*-canavanin caused a slight and insignificant elevation in total ammonia content. Subjecting the cortical slices to  $10^{-5}$  M SNAP significantly inhibited the amount of ammonia which was lower than the *L*-glutamine-induced production ( $p < 0.05$ ).

### Tissue Ammonia Content

The tissue ammonia content of unstimulated slices was  $19.64 \pm 0.87$  nmol ammonia/mg protein. This value did not differ significantly in any of the groups except for the ANGII group ( $27.51 \pm 1.62$ ,  $p < 0.05$ ) (table 2).

### Glutamine Uptake of the Cortical Slices

Since glutamine synthesis was blocked with 0.5 mM *L*-methionine sulfoximine, a glutamine synthase inhibitor in the slices, in the present experiment, the only way of glutamine supply was its influx from extracellular sources. At the beginning of incubation, the mean glutamine content of the slices was  $2.23 \pm 0.5$  nmol glutamine/mg protein and total glutamine consumption was calculated as  $100.12 \pm 14.0$  nmol glutamine/mg protein in the slices subjected to 1 mM glutamine. The elevation in glutamine utilization observed in the slices subjected to L-NAME, ANGII, ANGII + L-NAME, ANGII + *L*-cana-

**Table 2.** Tissue and total ammonia, glutamine consumption and nitrite/nitrate levels of the kidney cortical slices at the 120th min of incubation

Groups	Tissue ammonia nmol/mg protein	Total ammonia nmol/mg protein	Glutamine consumption nmol/mg protein	Total nitrite and nitrate nmol/mg protein
Control (PBS)	19.64 ± 0.8	52.91 ± 2.7		12.99 ± 5.07
Glutamine (1 mM)	19.32 ± 1.5	84.38 ± 3.8 <sup>a</sup>	100.12 ± 14.0	12.07 ± 1.92
L-NAME (100 μM)	23.29 ± 3.9	122.65 ± 21.5 <sup>a, b</sup>	135.87 ± 26.1	10.05 ± 1.06
SNAP (10 μM)	19.09 ± 3.4	48.64 ± 10.5 <sup>b</sup>	103.73 ± 15.9	34.71 ± 4.57 <sup>a, b</sup>
ANGII (100 nM)	27.51 ± 1.6 <sup>b</sup>	120.59 ± 9.1 <sup>a, b</sup>	138.9 ± 28.9	16.23 ± 2.19
ANGII + L-NAME	26.24 ± 4.5	129.78 ± 27.3 <sup>a, b</sup>	152.3 ± 31.3	13.79 ± 0.95
ANGII + L-canavanin (10 μM)	29.15 ± 6.5	140.18 ± 29.8 <sup>a, b</sup>	156.9 ± 32.7	17.13 ± 2.50
ANGII + L-NAME + SNAP	19.85 ± 3.5	103.94 ± 19.7 <sup>a, b</sup>	114.4 ± 18.5	36.41 ± 4.45 <sup>a, b</sup>

Each value obtained from 8–10 animals was expressed as mean ± SE.

<sup>a</sup>  $p < 0.05$  represents the difference between control.

<sup>b</sup> Glutamine groups.

vanin was not statistically significant but higher than that of glutamine alone and SNAP or in combination with ANGII + L-NAME and had no significant influence on the glutamine consumption of the slices (table 2).

#### Ratio of Ammonia to Glutamine (mol/mol)

The conversion of utilized glutamine into ammonia was estimated as  $0.87 \pm 0.08$  mol/mol in the cortical slices subjected to 1 mM glutamine-containing medium. Addition of L-NAME and ANGII into the incubation medium increased this ratio to  $1.03 \pm 0.04$  ( $p < 0.01$ ) and  $0.98 \pm 0.04$  ( $p < 0.05$ ), respectively. Combining ANGII with L-NAME or L-canavanin had no further effect on the conversion ratio which was  $1.07 \pm 0.08$  and  $0.93 \pm 0.03$  mol/mol, respectively. The ammonia/glutamine ratio did not differ significantly in the group treated with the combination of ANGII + L-NAME + SNAP ( $0.92 \pm 0.03$  mol/mol), whereas SNAP alone significantly dropped this ratio to  $0.48 \pm 0.12$  ( $p < 0.05$ ).

Nitrite and nitrate levels in tissue and medium did not change significantly except in the SNAP-added groups (table 2).

#### OH-Proline and Ammonia Results of Isolated Proximal Tubule Segments

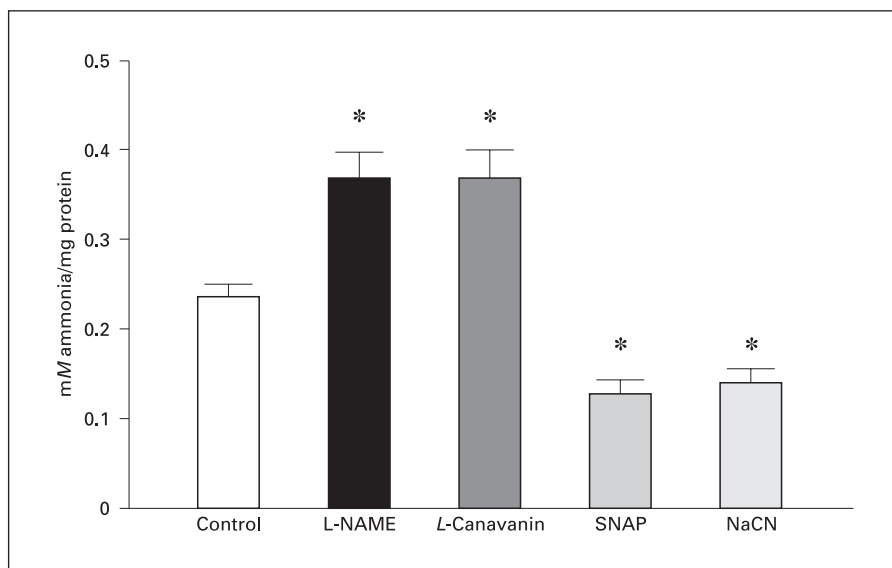
Isolated proximal tubule segments during 2 h incubation in the presence of 1 mM L-glutamine excreted  $833.9 \pm 44.4$  μmol ammonia/mg protein and its proline content was  $10.9 \pm 2.13$  μmol/mg protein.  $10^{-4}$  M L-NAME supplementation into the incubation medium increased

ammonia excretion to  $1,024 \pm 71.8$  μmol ammonia/mg protein and decreased the proline content to  $5.39 \pm 1.02$  μmol/mg protein ( $p < 0.05$ ). On the other hand, the ammonia excretion decreased to  $607.4 \pm 84.2$  μmol/mg protein, and proline content rose to  $16.89 \pm 2.04$  μmol/mg protein ( $p < 0.05$ ) in the proximal tubule segments subjected to  $10^{-5}$  M SNAP for 2 h.

#### Results Obtained from Isolated Mitochondria

As depicted in figure 1, the incubation of isolated mitochondria in the K<sup>+</sup>-rich buffer containing 1 mM L-glutamine and L-arginine for 15 min at 37°C under 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> aeration at pH 7.0 produced  $0.237 \pm 0.013$  mmol ammonia/mg protein/15 min. The elimination of basal NO by  $10^{-4}$  M L-NAME ( $p < 0.01$ ) and  $10^{-5}$  M L-canavanin ( $p < 0.001$ ) caused a significant increase in mitochondrial ammoniogenesis ( $0.370 \pm 0.03$  and  $0.369 \pm 0.03$  mmol ammonia/mg protein/15 min, respectively). On the other hand, addition of  $10^{-5}$  M SNAP significantly attenuated the ammoniogenic capacity of the mitochondria and the ammonia production dropped to  $0.128 \pm 0.02$  mmol ammonia/mg protein/15 min ( $p < 0.05$ ). To a similar extent, ammoniogenesis depression to SNAP-treated mitochondria was observed in the presence of the mitochondrial complex IV inhibitor NaCN (5 mM) in the incubation medium. The amount of ammonia was  $0.139 \pm 0.02$  mmol ammonia/mg protein/15 min in the mitochondria subjected to NaCN ( $p < 0.05$ ).

**Fig. 1.** Ammonia production of isolated mitochondria subjected to L-NAME ( $10^{-4}$  M), L-canavanin ( $10^{-5}$  M), SNAP ( $10^{-5}$  M) and NaCN (5 mM). 250  $\mu$ g mitochondria protein was incubated at 37°C in 1 ml  $K^+$ -rich buffer containing 1 mM L-glutamine and L-arginine at pH 7.0 for 15 min. The values (mean  $\pm$  SEM) of each group were obtained from the cortical mitochondria of 6–8 animals. \*  $p < 0.05$  vs. control.



#### Results of the Mitochondrial Permeability Measurement

As depicted in figure 2, the absorbance changes of the mitochondrial solution containing 250  $\mu$ g mitochondrial protein activated by 60 nmol  $Ca^{2+}$ /mg protein at 540 nm did not change significantly in the presence of either 10  $\mu$ M NaCl or 10  $\mu$ M CsA and 1% DMSO. At the 3rd min, the absorbance decrease was  $8.84 \pm 0.5\%$  in  $Ca^{2+}$ -stimulated control mitochondria and this value was observed as  $7.40 \pm 0.8\%$  in the CsA-stimulated and  $6.9 \pm 0.9\%$  in the DMSO-stimulated mitochondria. As expected, a known mitochondrial toxin, NaCN, at 5 mM concentration significantly impaired mitochondrial permeability.

As seen in figure 3, the addition of 10  $\mu$ M SNAP caused a significant decrease in the absorbance of mitochondria ( $20.3 \pm 0.7\%$ ) which was completely prevented by CsA ( $7.2 \pm 1.6\%$ ). On the other hand, 10  $\mu$ M L-NAME did not change the permeability of  $Ca^{2+}$ -activated mitochondria ( $7.2 \pm 1.3\%$ ). 10  $\mu$ M NaF, a SOD inhibitor alone or in co-application with SNAP, caused a significant increase in mitochondrial permeability which was  $20.36 \pm 0.24\%$  and  $20.9 \pm 0.6\%$  in  $Ca^{2+}$ -activated mitochondria, respectively. CsA completely prevented the permeability changes induced by NaF + SNAP ( $7.5 \pm 1.6\%$ ,  $p < 0.05$ ). NaF-induced permeability changes were CsA resistant but sensitive to antioxidants such as  $10^{-5}$  M vitamin C. NaCN (5 mM), a known complex IV inhibitor, caused a permanent increase in the mitochondrial permeability ( $21.6 \pm 0.9\%$ ,  $p < 0.001$ ) which was resistant to CsA.

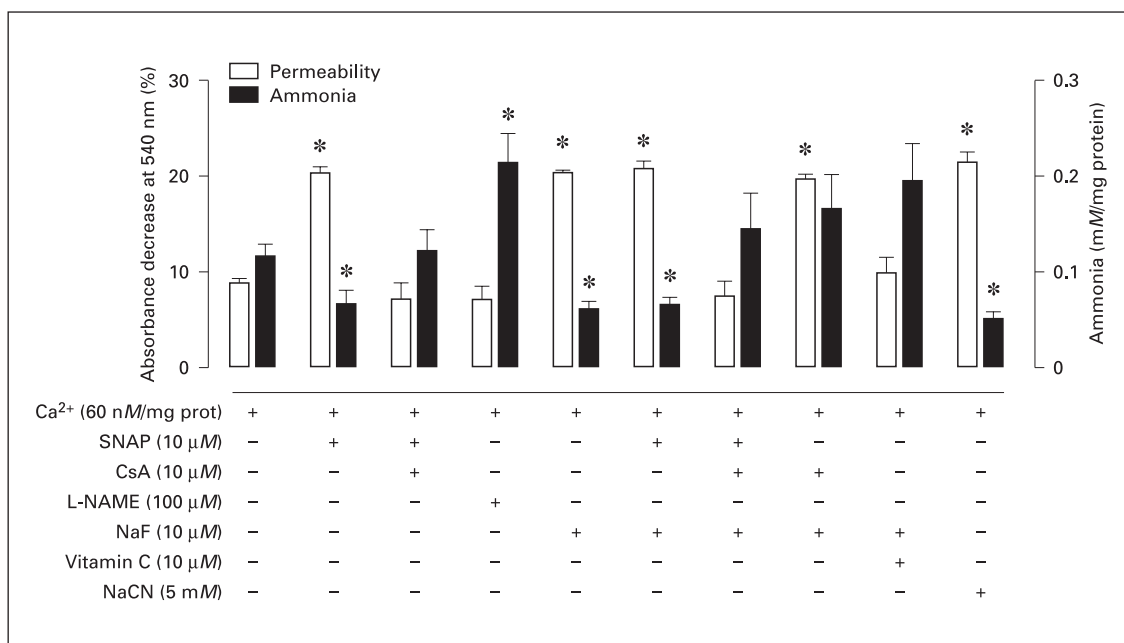
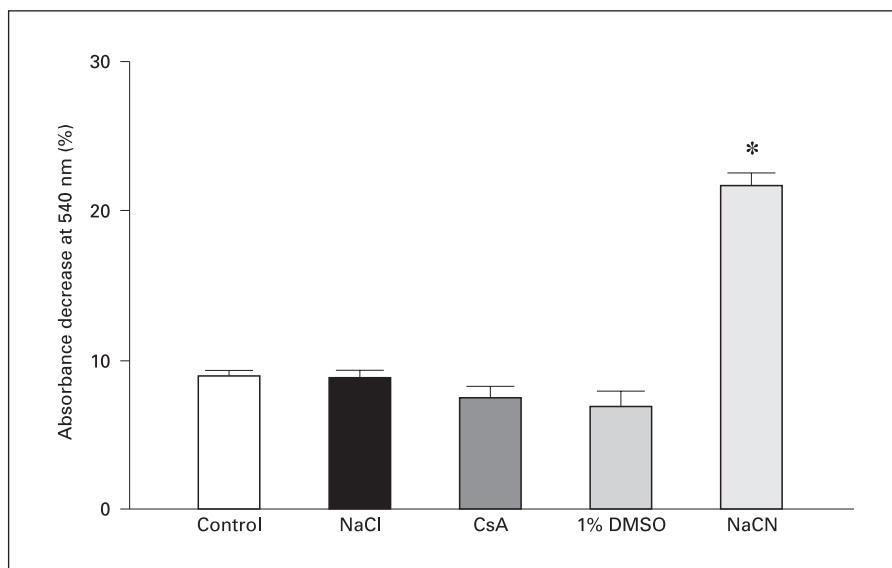
#### Relationship between Increased Permeability and Mitochondrial Ammonia Production

The agents which tested their effects on mitochondrial permeability transition pore (PTP) of  $Ca^{2+}$ -activated mitochondria also influenced the ammoniagenic capacity. As seen in figure 3, ammonia reduction was associated with an increased PTP in the mitochondria subjected to SNAP ( $p < 0.01$ ), NaF or NaF + SNAP ( $p < 0.05$ ). SNAP-induced PTP and ammonia changes were completely reversed by CsA, but NaF-induced decrease in ammoniagenesis was CsA reversible whereas its PTP-inducing effect was removed with vitamin C. L-NAME elevated ammonia production ( $p < 0.01$ ) without changing PTP. As expected, the inhibition of cytochrome c oxidase by NaCN decreased ammoniagenesis and elevated PTP to a similar extent as that of SNAP.

#### Mitochondrial Oxygen Consumption

The oxygen consumption of mitochondria treated with 1 mM glutamine was  $10.5 \pm 1.67$  nmol  $O_2$ /mg protein/min. It increased significantly to  $12.84 \pm 2.01$  nmol  $O_2$ /mg protein/min in the mitochondria incubated with L-NAME ( $p < 0.05$ ) and decreased to  $2.54 \pm 1.53$  nmol  $O_2$ /mg protein/min in the mitochondria subjected to  $10^{-5}$  M SNAP. NaCN, an irreversible mitochondrial complex IV inhibitor, significantly diminished the oxygen consumption to  $2.71 \pm 1.01$  nmol  $O_2$ /mg protein/min.

**Fig. 2.** Permeability changes of the mitochondria activated by 60 nmol Ca<sup>2+</sup>/mg protein in the presence of 20 μM of NaCl, 10 μM CsA, 1% DMSO and 5 mM NaCN. Each value obtained from 6–8 experiments. \* p < 0.01 vs. control.



**Fig. 3.** Mitochondrial ammonia production associated with permeability changes. 250 μg mitochondria protein was incubated at 37°C in 1 ml K<sup>+</sup>-rich buffer containing 1 mM L-glutamine and L-arginine at pH 7.0 for 3 min in the presence of tested agents \* p < 0.05 denotes changes from the Ca<sup>2+</sup>-activated control group.

## Discussion

The results of the present study indicated that rat renal cortical slices produced a substantial amount of ammonia during 2 h incubation under our experimental conditions.

This production showed a further increase when the slices were subjected to 1 mM L-glutamine, an ammonia precursor. L-Glutamine-induced ammonia increase was observed in the previous studies using cortical slices, isolated proximal tubules or cells [15, 31–33]. In the present

study, the ammonia production rate gradually decreased with time (table 1) in the slices incubated without and with *L*-glutamine. Elimination of basal NO with the incubation of L-NAME significantly increased the ammonia production of the slices. A similar increase was observed in the slices subjected to *L*-canavanin, a specific iNOS inhibitor, which supported the results of the authors who reported the presence of iNOS in proximal tubule cells [2, 3].

*L*-Glutamine is involved in a variety of metabolic pathways and plays a key role in many physiological processes [34]. In proximal tubule cells, *L*-glutamine is used both in the transamidation and the deamidation pathways [16, 32]. In the transamidation pathway, *L*-glutamine is a precursor to synthesize matrix proteins such as glucosaminoglycans and glycoproteins [16]. In the deamidation pathway, glutamine is used to produce ammonia and glutamate. Depending on the metabolic state, the ratio of the moles of ammonia formed to the moles of glutamine catabolized can vary between 1 and 2. In control conditions, the reported value of the ammonia to glutamine ratio for rats was around 1:1 and the value of  $0.87 \pm 0.08$  (mol/mol) in our control slices falls within the normal limits reported in the literature [35–37]. Elimination of basal NO or ANGII-stimulated NO with L-NAME and *L*-canavanin significantly elevated ammonia production from glutamine since the ratio of ammonia to glutamine increased; however, the slight increase in glutamine uptake was not statistically significant (probably due to the high SD) in those groups (table 2). These findings clearly demonstrated NO-induced changes in ammoniogenesis and glutamine catabolism. To our knowledge, the effect of NO on glutamine metabolism in the kidney is not known properly. Neither glutamate level nor GDH activity were measured in our experiment but the literature knowledge [16] reported that ATP which is an allosteric inhibitor for GDH activity, is necessary for the optimal activity of glutaminase. This piece of information suggests that NO by reducing mitochondrial oxygen utilization and ATP generation indirectly affects ammoniogenesis.

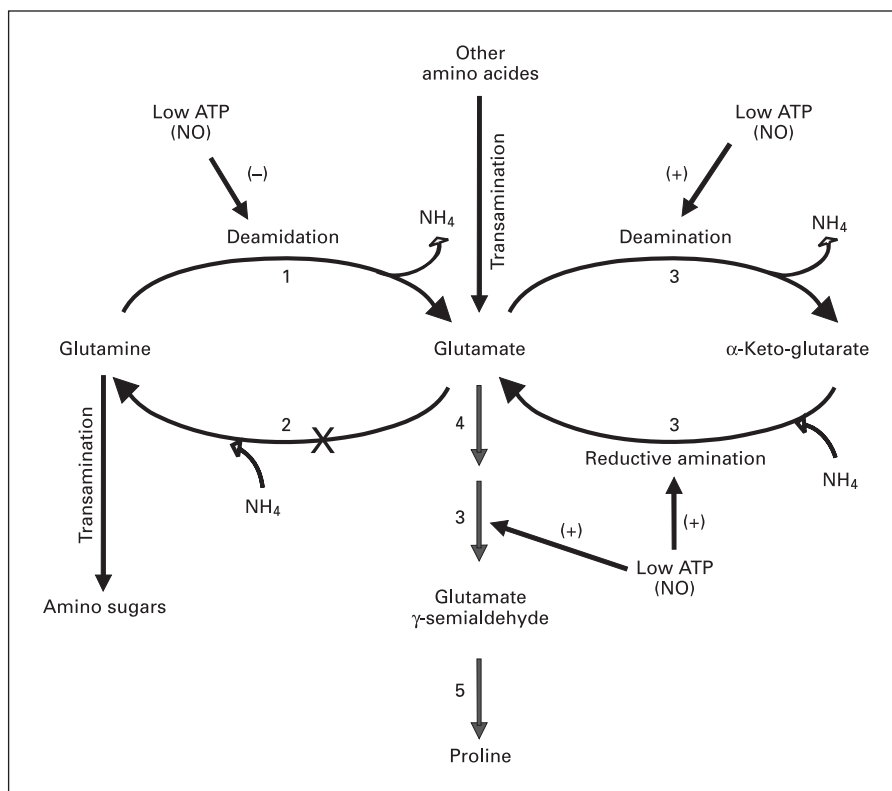
The following scenario seems to explain the effect of NO on the ammoniogenesis perfectly. The competition of basal NO with oxygen for cytochrome c oxidase by reducing ATP generation depresses glutaminase activity thereby decreasing glutamine deamidation and shifting glutamine catabolism to the extramitochondrial pathways. However, as indicated in figure 4, ammonia production from glutamate may still continue since glutamine deamidation is not the only way to cause glutamate generation. It is also formed by the transamination of

amino groups of other amino acids [16]. During energy restriction, glutaminase is inhibited but activated GDH continues to eliminate the amino groups of other amino acids such as ammonia by oxidative deamination and keeps glutamine as an energy provider in the kidney. On the other hand, activated GDH-induced reductive amination may cause a further reduction in produced ammonia and stimulate the conversion of glutamate to proline.

Our results from L-NAME- and SNAP-treated slices and mitochondria fit perfectly into this scenario and led us to suggest that NO as reported by many authors [1, 7–9] regulates mitochondrial oxygen utilization and ATP generation. The ammonia-reducing effect of NO is not a unique but an indirect and ATP-dependent effect. Any factor which reduces cellular energy production is supposed to have a similar effect to that of NO on ammoniogenesis. ATP dependency of both mitochondrial enzymes, glutaminase and GDH seems to be the main reason for alterations seen in ammoniogenesis. Indeed, the elimination of endogenous NO by L-NAME treatment caused a significant increase in both ammonia production and the ratio of ammonia to glutamine, but the ratio was still around 1:1 which supports ATP-induced reciprocal changes in the activities of glutaminase and GDH. In the presence of L-NAME, the elevated ATP-induced reduction in glutamate deamination is compensated for by the increased deamidation of glutamine. Association of a slight increase in glutamine uptake with elevated ammonia gives further support to the activation of glutaminase pathways during L-NAME treatment in the renal cortical slices.

Glutamate levels rather than glutamine seem to be important in ammoniogenesis. Transaminases were not determined in our experiment; however, during energy needs, as indicated by Vercoetere et al. [34], other amino acids keep cellular glutamate levels constant while the energy providers such as glutamine are shifted to the metabolic pathways to provide glucose and CO<sub>2</sub> or other products in the proximal tubule cells.

Association of elevated proline formation with reduced ammoniogenesis in SNAP-treated isolated proximal tubule segments indicates an increase in the conversion of glutamate to proline. As outlined in figure 4, all these findings can be explained by SNAP-induced ATP suppression and increased GDH activity. Besides the deamination of glutamate, GDH is involved in the reductive amination of  $\alpha$ -ketoglutarate and glutamate  $\gamma$ -semi-aldehyde formation which is the main step of proline synthesis. Reductive amination may explain the SNAP-



**Fig. 4.** Ammonia and proline production from glutamine and the possible effects of NO on glutamine metabolism in kidney proximal tubule cells. 1 = Phosphate-dependent glutaminase; 2 = glutamine synthase; 3 = glutamate dehydrogenase; 4 = glutamate kinase; 5 = pyrroline carboxylate reductase.

induced reduction in ammoniagenesis and the increased proline formation since the presence of available ATP, as indicated in L-NAME-treated tubules, reversed the increase in proline synthesis.

Mitochondrial integrity is required for the optimal energy production in a normal cell. Competition between basal NO and oxygen for cytochrome c oxidase reduced oxygen utilization and ammoniagenesis without affecting PTP, as indicated in the L-NAME-treated mitochondria. On the other hand, high exogenous NO (SNAP) led to a CsA-reversible PTP increase associated with depressed ammoniagenesis and oxygen utilization. Another cytochrome c oxidase inhibitor, NaCN, behaved similarly to exogenous NO and reduced both oxygen utilization and ammonia production associated with increased permeability; however, its effects were irreversible.

The action mechanism of exogenous NO as a PTP inducer and the involvement of PTP in ammoniagenesis have not been studied before. NO-induced ROS elevation may be one of the causative factors of elevated mitochondrial PTP, but its effect seems to be different than that of ROS generators. Reduced ammoniagenesis and elevated PTP in the mitochondria subjected to NaF, an inhibitor of mitochondrial SOD, suggested that NaF-induced ele-

vated ROS impairs the integrity of mitochondrial permeability and functions. The ammonia-impairing effect of NaF was corrected with CsA; however, its permeability deteriorating effect was found to be CsA independent but vitamin C sensitive (fig. 3). Whereas the ammonia reducing and PTP impairing effects of exogenous NO were reversed completely by CsA pretreatment.

These findings imply the presence of two different contributors to the mitochondrial permeability changes observed in our study. Some factors, by the opening of mitochondrial pores, increase permeability in a CsA-sensitive manner which is called PTP [21, 38]. On the other hand, other factors acting as ROS generators may cause a PTP-independent, nonselective increase in mitochondrial membrane permeability [26]. In the present study, exogenous NO-induced permeability changes seemed to be purely PTP dependent, whereas NaF by increasing ROS production, impairs mitochondrial permeability in both PTP-dependent and PTP-independent ways. However, as seen in table 3, there seems to be a close relationship between ammoniagenesis and mitochondrial permeability changes whether PTP-dependent or not, since the correction of permeability with CsA or vitamin C was associated with an improvement in ammoniagenesis.



**Table 3.** Relation between permeability changes and ammonia production rate in the isolated mitochondria subjected to different agents for 3 min

Groups	% absorbance decrease at the 3rd min	Ammonia secretion rate $\mu\text{mol} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
Calcium (60 nmol/mg protein)	8.84 ± 0.5	38.81 ± 4.5
SNAP (10 $\mu\text{M}$ )	20.30 ± 0.7 <sup>a</sup>	22.15 ± 4.6 <sup>a</sup>
SNAP + CsA (10 + 10 $\mu\text{M}$ )	7.20 ± 1.6	40.54 ± 7.2
NaF (10 $\mu\text{M}$ )	20.36 ± 0.2 <sup>a</sup>	20.21 ± 2.6 <sup>a</sup>
NaF + CsA (10 + 10 $\mu\text{M}$ )	19.71 ± 0.5 <sup>a</sup>	54.88 ± 12.2
L-NAME (100 $\mu\text{M}$ )	7.20 ± 1.3	71.38 ± 4.5 <sup>a</sup>
CsA (10 $\mu\text{M}$ )	7.40 ± 0.8	41.53 ± 7.6
NaCN (5 mM)	21.60 ± 0.9 <sup>a</sup>	16.83 ± 2.4 <sup>a</sup>

Each value obtained from 8–10 animals was expressed as mean ± SE.

<sup>a</sup>  $p < 0.05$  indicates the significance of difference from the calcium-activated group.

As a result, our findings demonstrated for the first time that cytosolic and mitochondrial, basal or stimulated NO have an inhibitory action on mitochondrial function. Basal mitochondrial NO attenuated ammoniogenesis by reducing mitochondrial oxygen consumption without changing PTP, whereas cytosolic or exogenous high NO impaired PTP and consequently decreased ammonia production in the rat kidney cortex. Loss of functional integrity of mitochondria by reducing the ATP generation seems to inhibit the activity of the deamidation enzyme and shift mitochondrial glutamine metabolism to the extramitochondrial pathways. However, more detailed studies are required on this topic.

### Acknowledgment

This study was supported by Akdeniz University Research Foundation (Grant No. 21.01.0122.06).

### References

- Cecilla G: Characterization and function of mitochondrial nitric oxide synthase. *Free Rad Biol Med* 2003;34:397–408.
- Kone BC, Baylis C: Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney. *Am J Physiol* 1997;272:F561–F578.
- Liang M, Knox FG: Production and functional roles of nitric oxide in the proximal tubule. *Am J Physiol* 2000;278:R1117–R1124.
- Kahn NN, Acharya K, Bhattacharya S, Acharya R, Mazumder S, Bauman WA, Sinha AK: Nitric oxide: the 'second messenger' of insulin. *IUBMB Life* 2000;49:441–450.
- Notenboom S, Miller DS, Simits P, Russel FGM, Masereeuw R: The role of NO in endothelin-regulated drug transport in the renal proximal tubule. *Am J Physiol* 2002;282:F458–F464.
- Eitle E, Hiranyachattada, Wang H, Harris PJ: Inhibition of proximal tubular fluid absorption by nitric oxide and atrial natriuretic peptide in rat kidney. *Am J Physiol* 1998;274:C1075–C1080.
- Cecilla G: Functional implication of nitric oxide produced by mitochondria in mitochondrial metabolism. *Biochem J* 1998;332:673–679.
- Elfering LS, Sarkela TM, Guilivi C: Biochemistry of mitochondrial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 2002;277:38079–38086.
- Brown GC, Borutaite V: Nitric oxide, cytochrome c and mitochondria. *Biochem Soc Symp* 1999;66:17–25.
- Koappen BM, Stanton BA: *Renal Physiology*, ed 3. St Louis, Mosby, an Imprint of Elsevier Sci, 2001.
- Ortiz PA, Garvin JL: Role of nitric oxide in the regulation of nephron transport. *Am J Physiol* 2002;282:F777–F784.
- Tong W: Nitric oxide regulates  $\text{HCO}_3^-$  and  $\text{Na}^+$  transport by a cGMP-mediated mechanism in the kidney proximal tubule. *Am J Physiol* 1997;272:F242–F248.
- Lahera V, Navarro J, Biondi ML, Ruilope LM, Romero JC: Exogenous cGMP prevents decrease in diuresis and natriuresis induced by inhibition of NO synthesis. *Am J Physiol* 1993;264:F344–F347.
- Tong Wang: Role of iNOS and eNOS in modulating proximal tubule transport and acid-base balance. *Am J Physiol* 2002;283:F658–F662.
- Di-Giovanni SR, Madsen KM, Luther AD, Knepper AM: Dissociation of ammoniogenic enzyme adaptation in rat proximal tubules and ammonium excretion response. *Am J Physiol* 1994;267:F407–F414.
- Mathews CK, van Holde KE: *Biochemistry*. Redwood City, The Benjamin Cummings Publishing Company, 1990, chap 16 and 21.
- Nagami GT: Enhanced ammonia secretion by proximal tubules from mice receiving  $\text{NH}_4\text{Cl}$ : role of angiotensin II. *Am J Physiol* 2002;282:F474–F477.
- Levillain O, Hus-Citharel A, Morel F, Bankir L: Arginine synthesis in mouse and rabbit nephron: localization and functional significance. *Am J Physiol* 1993;264:F1038–F1045.
- Zhang C, Mayeux PR: Angiotensin II signaling activates the NO-cGMP pathway in rat proximal tubules. *Life Sci* 1998;63:75–80.
- Vinay P, Gaugoux A, Lemieux G: Isolation of a pure suspension of rat proximal tubules. *Am J Physiol* 1981;241:F403–F411.
- Weinberg JM, Harding PG, Humes HD: Mitochondrial bioenergetics during the initiation of mercuric chloride-induced renal injury. *J Biol Chem* 1982;257:60–67.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–275.
- Shilo S, Aronin A, Komarnitsky R, Tirosh O: Selenite sensitizes mitochondrial permeability transition pore opening in vitro and in vivo: a possible mechanism for chemoprotection. *Biochem J* 2003;370:283–290.
- Oner G, Cirrik S, Bakan O: Effects of silica on mitochondrial functions of the proximal tubule cells in rats. *Kidney Blood Press Res* 2005;28:203–210.
- Kondoh M, Ogasawara S, Araragi S, Higashimoto M, Sato M: Cytochrome c release from mitochondria induced by cadmium. *J Health Sci* 2001;47:78–82.
- Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE: Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett* 2001;495:12–15.
- Curnerro JA, Weiner MW: A comparison of methods for measuring urinary ammonium. *Kidney Int* 1974;5:303–305.

- 28 Mecke D: *L*-Glutamine, colorimetric method with glutamine synthase; in Bergmayer HU, Bergmayer J, BarBI M (eds): *Methods of Enzymatic Analysis*, ed 3. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft, 1990, vol VII, pp 364–369.
- 29 Bories PN, Bories C: Nitrate determination in biological fluids by an enzymatic one step assay with nitrate reductase. *Clin Chem* 1995;41: 904–907.
- 30 Woessner JF Jr: The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys* 1961;93:440–447.
- 31 Welbourne WC, Francoeur D, Thornley-Brown G, Welbourne CJ: Ammonia production and pathways of glutamine utilization in rat kidney slices. *Biochem Biophys Acta* 1976; 444:644–652.
- 32 Newsholme P, Lima MMR, Procopio J, Pithon-Curi TC, Doi SQ, Bazotte RB, Curi R: Glutamine and glutamate as vital metabolites. *Braz J Med Biol Res* 2003;36:153–163.
- 33 Welbourne TC, Mu X: Extracellular glutamate flux regulates intracellular glutaminase activity in LLC-PK<sub>1</sub>-F<sup>+</sup> cells. *Am J Physiol* 1995;268: C1418–C1424.
- 34 Vercoutere B, Durozard D, Baverel G, Martin G: Complexity of glutamine metabolism in kidney tubules from fed and fasted rats. *Biochem J* 2004;378:485–495.
- 35 Goldstein L, Solomon RJ, Perlman DF, McLaughlin PM, Taylor MA: Ketone body effects on glutamine metabolism in isolated kidneys and mitochondria. *Am J Physiol* 1982; 243:F181–F187.
- 36 Wadoux P, Welbourne TC: Ammoniogenesis: *D*-glutamyltransferase as a source of ammonia in the rat kidney. *Can J Biochem* 1975;53:930–933.
- 37 Welbourne TC: Cytoplasmic gamma-glutamyltransferase: isolation, product formation and physiological role. *Curr Probl Clin Biochem* 1977;8:201–215.
- 38 Sharpe MA, Cooper CE: Reaction of nitric oxide with mitochondrial cytochrome c: a novel mechanism for the formation of nitroxyl anion and peroxynitrite. *Biochem J* 1998;332:9–19.

Copyright: S. Karger AG, Basel 2006. Reproduced with the permission of S. Karger AG, Basel.  
Further reproduction or distribution (electronic or otherwise) is prohibited without permission  
from the copyright holder.