

NİTRİK OKSİT SENTETAZ VE RENİN GRANÜLLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ALBİNO FARE (BALB/C) BÖBREĞİNDE HİSTOKİMYASAL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Hatice Yorulmaz¹ Dr. Cihan Demirci²

¹ T.C. Haliç Üniversitesi Sağlık Bilimleri Yüksekokulu Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Bölümü, İstanbul

² İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, İstanbul

ÖZET

Amaç: Nitrik oksitin (NO) renin salınımı ve sentezindeki rolünün incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod: Kontrol olarak alınan I. gruba serum fizyolojik intraperitoneal (ip) olarak, II. deney grubuna kaptopril ağızdan (100 mg/kg/gün), III. gruba NG-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME) intraperitoneal olarak (100 mg/kg/gün), IV. gruba kaptopril (100 mg/kg/gün) ve L-NAME (100 mg/kg/gün) birlikte, V. gruba sodyum nitro prussid (SNP) (25 mg/kg/gün) ağızdan 21 gün süreyle uygulandı. Yirmi birinci günün sonunda alınan doku örnekleri parafin ve dondurma mikrotomları için gerekli fiksatiflerde tespit edildi. Parafin kesitler, hemotoksilin-eosin (H+E) ve Bowie yöntemi ile boyandı. Dondurma mikrotomundan alınan kesitlere NADPH-d histokimyası uygulanarak nitrik oksit sentetaz (NOS) dağılımı bakımından incelendi.

Bulgular: Kaptopril uygulanması sonucu renin granüllerinin yoğunluğunda ve NO sentezinde belirgin bir artma, distal tübüllerde genişleme, proksimal tübüllerin fırça kenarlarında bozulma, tübül hücrelerinin sitoplazması ve nukleuslarında bozulmalar gözlemlendi. L-NAME uygulaması sonucu, renin granülleri ve NO sentezinde azalma, yine distal tübüllerde genişleme, tübül hücrelerinin sitoplazması ve nukleuslarında yapısal bozulmalar gözlemlendi. Kaptopril ve L-NAME'nin birlikte uygulandığı grupta, renin granüllerinin miktarı ve NO sentezinin kontrole yakın olduğu tespit edilirken, distal tübüllerde genişleme bu grupta da devam etti. SNP uygulanan grupta ise, renin granüllerinin arttığı, NO sentezinin azaldığı gözlemlendi.

Sonuç: Sonuç olarak, NO'nun, reninin salınması ve sentezinde uyarıcı etkisinin olduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Böbrek, kaptopril, NG-nitro-L-arginin metil ester, nitrik oksit, renin. Nobel Med 2013; 9(1): 42-48

HISTOCHEMICAL RESEARCH OF NITRIC OXIDE SYNTETAHASE AND RENIN GRANULES IN ALBINO MOUSE (BALB/ C) KIDNEY

ABSTRACT

Objective: We aimed to inspect what role nitric oxide (NO) has in renin synthesis and secretion.

Material and Method: Test animals were divided into five groups: Group I; control, serum physiologic intraperitoneally (i.p), group II; captopril (100 mg/kg/day) orally, group III; NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (100 mg/kg/day) i.p, group IV; both captopril (100 mg/kg/day) and L-NAME (100 mg/kg/day), group V; sodium nitroprusside (SNP) (25 mg/kg/day) orally.

All groups were given these substances for 21 days. At the end of 21 days, tissue samples were fixed for paraffin and freezy microtomes. Paraffin sections were stained with hematoxylen-eosin (HE) and Bowie method. NADPH-d histochemistry was applied to the sections of cryostat, which

were examined in terms of nitric oxide synthetase (NOS) distribution.

Results: Captopril application showed a remarkable increase in the renin granules and the synthesis of NO, with the observations of distal tubule dilatation, brush border degeneration of proximal tubules and cytoplasmic and nuclear degeneration of tubule cells. The result of L-NAME administration was a decrease in renin granules and NO synthesis. In this group distal tubules were dilated, and cytoplasm and nucleus of the tubule cells were degenerated. In the group which received a combination of Captopril and L-NAME, the amount of renin granules and NO synthesis was close to that of the control, along with the observation of a dilatation in distal tubules. SNP received group indicated an increase in renin granules and a decrease in NO synthesis.

Conclusion: In conclusion, we determined that NO has a stimulatory effect in both synthesis and secretion of renin.

Key Words: Captopril, kidney, NG-nitro-L-arginine methyl ester, nitric oxide, renin *Nobel Med 2013; 9(1): 42-48*

GİRİŞ

Böbrekteki nitrik oksit (NO), glomerular filtrasyon hızı, kan akımı, sodyum iletimi, renin üretimini kontrol eder. NO ayrıca, glomerular mesangiyal hücrelerin tonusunu, afferent arteriyollerin ve bazı durumlarda da efferent arteriyollerin direncini kontrol ederek de glomerular hemodinamikte kısa ve uzun süreli rol oynar.¹ Bazı çalışmalarda NO'nun renin salınımını azalttığı bazı çalışmalarda ise artırdığı izlenmiştir.^{2,3} Bu nedenle NO'nun renin üzerindeki etkisinin ne olduğu hala tartışmalı bir konudur. Makula densa hücrelerinde yüksek seviyede nöronal nitrik oksit sentetaz (nNOS), endotel hücrelerde ise endotelial nitrik oksit sentetaz (eNOS) anlatımı mevcuttur. eNOS, böbreklerde damar tonusunu belirlerken, nNOS, renin salınımının düzenlenmesinde rol oynayarak afferent arteriyollerin damar çapını kontrol eder.⁴ Yapılan bir seri çalışma, NO sentezini engelleyen NG-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME) gibi L-arginin türevlerinin, sıçan, tavşan izole edilmiş perfüze sıçan böbreklerinde renin salınımını da engellediğini göstermiştir.^{5,6} NOS inhibitörlerinin renin salınımı üzerindeki etkisi doza bağlıdır. Haftalarca NOS inhibitörleri ile muamele edilen sıçanlarda plazma renin aktivitesi yükselmektedir. Plazma renin aktivitesindeki yükselme de böbrekte yapısal değişikliklere ve organ morfolojisindeki değişikliklere bağlı hipertansiyona neden olur.⁷ Sıçan böbreklerinde NO'nun renin salınımı üzerindeki etkisi aynı zamanda bir NO vericisi olan sodyum nitroprussid (SNP) kullanılarak da incelenmiştir. SNP

eklenmesi doza bağlı olarak renin salınımının uyarılmasını teşvik etmiştir.⁸ Uyarıcı etki perfüzyon basıncına bağlı olabilir. Düşük perfüzyon basıncı renin salınımını artırabilir. Yüksek perfüzyon basıncı ise azaltır. Perfüzyon basıncının renin salınımı üzerindeki inhibitör etkisi kalsiyuma bağlıdır. NO vericileriyle renin salınımı yüksek kalsiyum aktiviteleriyle azalır. Düşük kalsiyum aktiviteleriyle artar.⁹

Sıçanlarda L-NAME'nin uzun süreli uygulanması, renin-angiotensin sisteminin harekete geçmesi ve böbrek arteriyolleri dahil, bütün damarlarda hipertansiyon meydana getirmiştir. L-NAME'nin neden olduğu hipertansiyon Ang II'ye bağlıdır. Böbrekte Ang II'nin doku ve dolaşımdaki seviyesinin yükselmesi deneysel hipertansiyon modellerinde de meydana gelir.¹⁰ NO ve Ang II, kan basıncının düzenlenmesinde birbirine zıt olarak görev yaparlar. Ang II'nin etkisi AT (angiotensin) reseptör blokerleri ve ACE inhibitörleri tarafından engellenebilir.¹¹

Kaptopril çeşitli böbrek ve kalp rahatsızlıkları ve hipertansiyon tedavisinde kullanılan, Ang I'i Ang II'ye dönüştüren ACE'nin bir inhibitörüdür.^{12,13} ACE inhibitörleri kininazı engelleyerek ve bradikininin dokudaki miktarını artırarak endotelden NO salınımını sağlayabilir. ACE, bradikininin damar genişletici ve sodyumu atma özellikleri ile angiotensin II'nin tuz tutma ve damar daraltıcı özellikleri arasındaki dengeyi sağlar. Bu inhibitörler, bradikinin yıkımını ve Ang II oluşumunu azaltarak bu dengeyi değiştirir.¹⁴ ACE →

NİTRİK OKSİT SENTETAZ VE RENİN GRANÜLLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ALBİNO FARE (BALB/ C) BÖBREĞİNDE HİSTOKİMYASAL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Tablo 1: Deney gruplarındaki hayvanların proksimal tübüldeki NADPH reaksiyonlarının ortalama HSCORE ve SEM değerleri

	No	HSCORE	SEM	p
Kontrol ¹	5	375	50	1-2 p:0,039*
Kaptopril ²	5	520	54,16	1-3 p:0,008**
L-NAME ³	5	212,5	62,91	1-4 p:0,57
Kaptopril+L-NAME ⁴	5	400	56,56	1-5 p:0,027*
SNP ⁵	5	250	57,73	

*, p<0,05, **, p<0,01

Tablo 2: Deney gruplarındaki hayvanların jukstaglomerular aygıtının renin granülleri dağılımının ortalama HSCORE ve SEM değerleri

	No	HSCORE	SEM	p
Kontrol ¹	5	360	46,18	1-2 p:0,025*
Kaptopril ²	5	515	57,44	1-3 p:0,005**
L-NAME ³	5	135	55,07	1-4 p:0,62
Kaptopril+L-NAME ⁴	5	305	82,25	1-5 p:0,017*
SNP ⁵	5	515	57,44	

*, p<0,05, **, p<0,01

inhibitörleri kronik böbrek bozukluğu olan sıçanlarda yararlı bir etkiye sahiptir. Bu etki muhtemelen efferent arteriyollerin genişlemesi ile intraglomerular basıncın azalmasına bağlıdır. NOS inhibitörlerinin eklenmesi kaptoprilin yararlı etkisini azaltmıştır. Kaptopril ve L-arginin birlikte uygulanması, kronik böbrek hastalığı olan sıçanlarda böbrek fonksiyonlarının düzelmesi ve kan basıncının normale dönmesini sağlamıştır.

Kronik böbrek hastalığında, hipertansiyon gelişimi endojen bir NOS inhibitörünün varlığı ile ilgili görülmektedir. L-arginin ile artan NO üretimi veya kaptopril, NOS inhibitörünün etkisini ortadan kaldırılabılır ve bu durum da ilaçların sistemik hipotansiyon etkilerine bir açıklama olabilir.¹⁵ ACE inhibitörleri ve NO'nun glomerular efferent arteriyollerin genişlemesine neden olduğu bulunmuştur. NO ve kaptopril muhtemelen böbrekte angiotensinin damar büzücü etkisine karşı tampon görevi görür.¹⁶

Bütün bu çalışmalara rağmen, NO ve renin-angiotensin sistemi arasındaki ilişki tam olarak açıklanamamıştır. Bu nedenle biz de çalışmamızda Ang II oluşumunu kaptopril ile durdurarak, damarların genişlemesine yol açarsak, NOS, dolayısıyla NO üretiminin ve aynı şekilde L-NAME ile NOS'yi inhibe ederek, NO üretimi durdurulursa renin üretiminin bu durumdan nasıl etkilendiğini görmeyi amaçladık. Canlının yaşamı boyunca fizyolojik olarak dolaşımı ve bununla birlikte bütün organlarda arteriyollerin çapları her an değişebilmektedir ve bu olayda da pek çok ajan rol oynamaktadır. Bunlardan NO ve Ang II arasındaki ilişkiyi, böbrek fonksiyonlarındaki rolüne dayanarak açıklamaya çalıştık.

MATERYAL ve METOD

Bu çalışmada, deney hayvanı olarak ağırlıkları 40-50 g arasında değişen 3 aylık 25 adet erkek albino (BALB/c) fare kullanıldı. Bunlar, deney öncesi ve deney boyunca metal kafeslerde, standart fare yemi ve musluk suyu ile beslendiler. Hayvanlar; kontrol (I. grup), kaptopril (II. grup), L-NAME (III. grup), kaptopril+L-NAME (IV. grup), SNP (V. grup) uygulananlar olmak üzere 5 grup altında toplandılar. Yirmi bir gün boyunca, saat 14.⁰⁰-15.⁰⁰ arası, I. gruba serum fizyolojik su (FTS) intraperitoneal (ip) olarak, II. gruba 100 mg/kg/gün kaptopril ağızdan verildi. III. gruba 100 mg/kg/gün L-NAME ip olarak, IV. gruba hem kaptopril (ağızdan) hem de L-NAME (ip) birlikte, V. gruba 25 mg/kg/gün sodyum nitroprusid (SNP) ağızdan verildi. Yirmi birinci günün sonunda, ilaç verilmesinden bir saat sonra hayvanlara, FFM (Fentanil/fluanison ve midazolam malat) FTS ile 1:1 oranında sulandırılarak hazırlanan anestezi madde, 0,07 ml/10 g olacak şekilde enjekte edildi. Anesteziden 20 dakika sonra, ışık mikroskobu ve dondurma mikrotomu incelemeleri için hayvanların böbrekleri alındı. Alınan böbrek dokularının bir kısmı Bouin fiksatifinde, diğer bir kısmı da NADPH-diaforez yapılmak üzere %4 paraformaldehitte tespit edildi. Bouin fiksatif ile tespit edilen dokular, alkol serilerinden geçirilerek parafine gömüldüler ve 4-5 µm kalınlığında alınan kesitler, hematoksin-eosin (H+E) ve Bowie metodu ile boyanarak, Carl-Zeiss foto mikroskobu (Ultrapod II) ile değerlendirildi.

NADPH-d histokimyası

Yirmi birinci günün sonunda alınan böbrek dokuları 2 saat süreyle 0,1 M fosfat tamponunda (pH:7,6) hazırlanan %4 paraformaldehitte fikse edildikten sonra, 0,1 M fosfat tamponunda (pH:7,4) hazırlanan %20 sükrözde +4°C'de 1 gece tutuldu. Dondurma mikrotomu ile alınan 10 µm kalınlığındaki kesitler, 0,5 mM Nitro blue tetrazolium, %0,2 Triton X-100, 50 mM Tris HCl (pH:8) ve NADPH-d ile 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra 0,1 M fosfat tamponu (pH:7,4) ve distile su ile yıkanarak gliserol jelatin ile kapatıldı.¹⁷

Bowie yöntemi

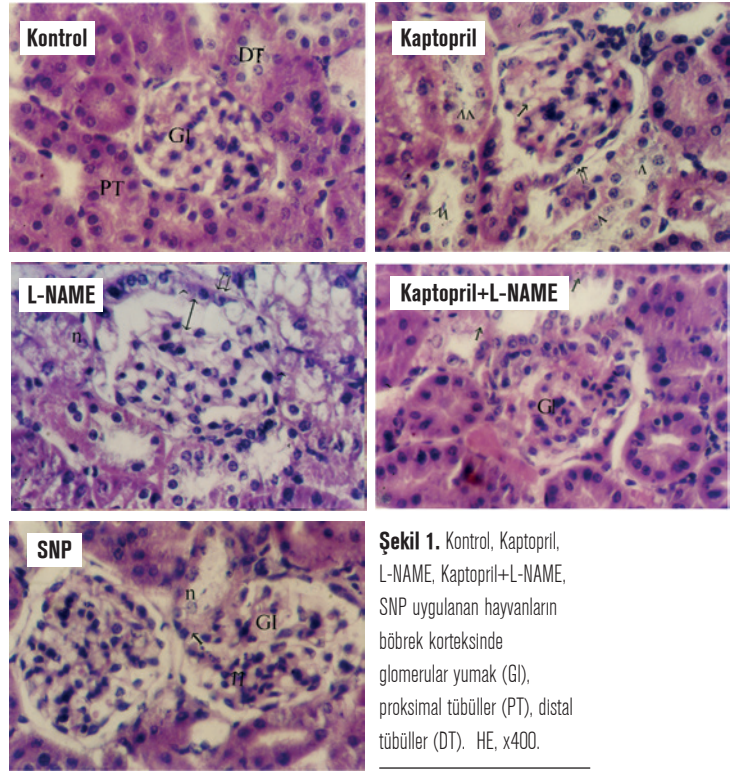
Bu tekniğe göre, Bowie stok solüsyonunun hazırlanışı şu şekildedir: 1 g Biebrich scarlet 250 cc saf suda eritilerek süzüldü. Sonra 2 g etil violet 500 cc distile suda eritilerek, aynı filtre kağıdı ile süzüldü ve çökeltili kurutulduktan sonra, bu çökeltiden 0,2 g alınarak 20 cc %95 alkolde eritildi. Parafin bloklardan alınan kesitler, ksilol ve inisi alkol serisinden geçirildikten sonra, 3 dakika alkol iodinide (50 alkolde %1'lik), 3 dakika sodyum tiyosülfatta (%5) tutularak akarsuya kadar getirildi ve 40°C'de potasyum bikromatta →

(%2,5) bir gece mordanlandı. Saf suda çalkalandıktan sonra, 100 cc %20 alkole, 10-15 damla stok Bowie solüsyonu damlatılarak hazırlanan boya içinde, 3 saat 40°C'de ve bir gece oda ısısında bırakıldı. Kesitler filtre kağıdı ile kurutularak boyanın fazlası için 2-3 defa asetona batırıldı. Ksilol ve karanfil yağı (1:1) karışımında kesitler kırmızı veya kırmızımsı mor oluncaya ve jukstaglomerular hücreler boyanana kadar bekle-tildikten sonra, ksilol ve benzenden geçirilip permount ile kapatıldı.¹⁸

Ayrıca her deney grubunda NADPH-d histokimyası ile boyanan kesitlerde NOS dağılımı, Bowie yöntemi ile boyanan kesitlerde renin granülleri dağılımı HSCORE değeri ile hesaplandı. $[HSCORE=(Pi(i+1))]$. Bu formüldeki i; yoğunluk skorunu, Pi ise hücrelerin tahmini yüzdesini ifade etmektedir. Her örnek için x1000 büyütmede, 5 farklı alan değerlendirilerek bu alanlar içerisindeki her yoğunluktan hücrelerin yüzdesi hesaplanmıştır. Bu 5 alanın ortalama değeri o deney grubu için ortalama HSCORE değeri olarak kullanılmıştır. Analiz için Windows tabanlı SPSS 15.0 istatistiksel analiz programı kullanıldı (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Gruplar arasındaki farklılıklar Tek Yönlü Varyans Analizi ve ardından Tukey Analizi değerlendirildi.

BULGULAR

Kontrol, kaptopril, L-NAME, kaptopril+L-NAME ve SNP grubu olmak üzere 5 gruba ayırdığımız hayvanların böbrek kortekslerinde yapılan ışık mikroskobu incelemeleri sonucunda, bütün deney hayvanlarında kontrollara nazaran belirgin değişiklikler tespit edildi. Kontrol grubunun parietal yaprağı oldukça muntazam ve glomerular kapiller düzenli iken kaptopril uygulanan grupta, Bowman kapsülünün parietal yaprak epitelinde bozulmalar, glomerular yumakta düzensizlikler olduğu görüldü. Kaptopril uygulanan grupta ayrıca, tübül hücrelerinin, nukleuslarının kromatin materyalinin, kontrol grubuna göre oldukça yoğunlaştığı ve piknotik görünüm aldıkları, bazı tübül hücreleri arasındaki hücre sınırlarının belirgin olmadığı, sitoplazmalarının sabun köpüğü görünümü aldığı tespit edildi. NOS aktivitesinin inhibe edildiği L-NAME grubu hayvanların glomerular yumağında ve parietal yaprağında meydana gelen düzensizliklerle birlikte, Bowman kapsülü aralığının diğer deney gruplarındakine ve kontrollara nazaran genişlemiş olduğu tespit edildi. Yine L-NAME uygulanan bu grubun örneklerinde, proksimal tübül nukleuslarının piknotik olduğu, hücreler arasındaki sınırların yer yer ortadan kalktığı görüldü. Ayrıca distal tübül hücrelerinin sitoplazmalarında sabun köpüğü görünümünde olan bölgelerin ve tübül lümeninde bozulmuş hücre kalıntılarının olduğu izlendi. Kaptopril ile L-NAME'nin birlikte uygulandığı farelerin glomerular yumakların-



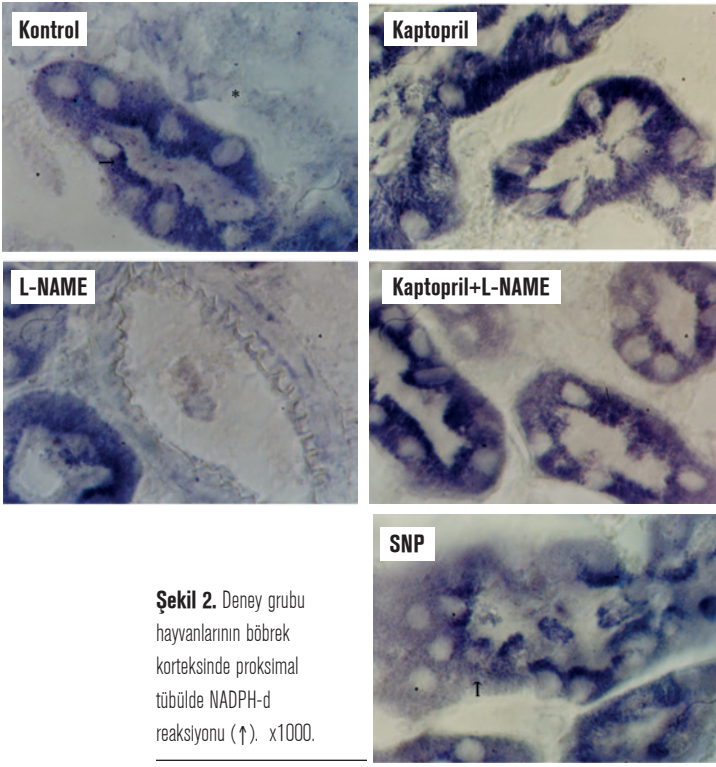
Şekil 1. Kontrol, Kaptopril, L-NAME, Kaptopril+L-NAME, SNP uygulanan hayvanların böbrek korteksinde glomerular yumak (GI), proksimal tübüller (PT), distal tübüller (DT). HE, x400.

da herhangi bir değişiklik izlenmedi. Ancak kaptopril ve L-NAME uygulanan bu grupta diğer gruplarda rastlanmayan kanama alanları görüldü. Ayrıca, distal tübül hücrelerinin sitoplazmalarında sabun köpüğü görünümü alan bölgelere bu grupta da rastlandı SNP verilen hayvanlarda da, Kaptopril uygulanan gruptakine benzer değişiklikler gözlemlendi. Parietal yaprak ve glomerular yumaktaki bozukluklar ve piknotik nukleuslar, proksimal tübül hücrelerinin sabun köpüğü görünümünde olan bölgelere sahip olması en belirgin değişikliklerdi (Şekil 1).

Dondurma mikrotomunda alınan kesitlere NADPH-d yöntemi uygulayarak, NOS dağılımı bakımından bu dört grubun böbrek korteksleri karşılaştırıldığında, reaksiyonun proksimal tübüllerde, diğer yapısal unsurlara kıyasla, oldukça iyi görüldüğü, NO üretiminin bu hücrelerde diğerlerinden fazla olduğu tespit edildi. Gruplara ait H-SCORE değerleri incelendiğinde kaptopril verilen grupta proksimal tübüllerdeki NADPH-d reaksiyonunun, kontrol grubundan çok fazla olduğu ($p<0,05$) L-NAME verilen grupta ise, kontroldekinden çok daha az olduğu ve pek çok tübülde de reaksiyonun olmadığı ($p<0,01$) görüldü. Kaptopril yanında L-NAME verilen grupta ise proksimal tübüllerin bir kısmında kontrollerdeki reaksiyona benzer reaksiyon gözlenirken ($p>0,05$), diğer bir kısmında ise artmış NOS reaksiyonunun varlığı açıkça tespit edildi. SNP verilenlerde ise, proksimal tübüllerde NADPH-d reaksiyonunun, kontrole göre daha az olduğu tespit edildi ($p<0,05$) (Tablo 1, Şekil 2).

NO miktarının artması veya azalmasına bağlı olarak →

NİTRİK OKSİT SENTETAZ VE RENİN GRANÜLLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ALBİNO FARE (BALB/C) BÖBREĞİNDE HİSTOKİMYASAL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ



Şekil 2. Deney grubu hayvanlarının böbrek korteksinde proksimal tübülde NADPH-d reaksiyonu (↑). x1000.

jukstaglomerular aygıtın, renin içeren jukstaglomerular (JG) granüllü hücrelerini, granül dağılımı bakımından karşılaştırmak üzere uyguladığımız Bowie yönteminde, kontrol grubu muntazam görünümlü ve homojen dağılmış JG granüllere sahipti. Gruplara ait H-SCORE değerleri incelendiğinde; kaptopril uygulanan grupta, bu granüllerin oldukça arttığı, adeta hücre içinde bütün sitoplazmayı kaplayacak yoğunlukta oldukları görüldü ($p<0,05$). Bu grubun tamamen aksine, L-NAME uygulanarak NO sentezinin durdurulduğu hayvanlarda, JG granüllerin yok denecek kadar azaldığı, bazı hücrelerde hiç bulunmaz iken, bazılarında da birkaç granülün olduğu açıkça görülmekteydi ($p<0,01$). Kaptopril ile birlikte L-NAME uygulanan grupta, JG hücrelerin içerdiği renin granüllerinde, kaptoprilin neden olduğu artışa rastlanmadığı gibi, L-NAME'nin verdiği azalma da yoktu ($p>0,05$). Granül dağılımı hemen hemen kontrol grubundakilere benzemektedir. NO vericisi olan SNP uygulanan hayvanlarda ise, kaptopril uygulanan gruba benzer şekilde, JG hücrelerinde renin granüllerinin sayı ve yoğunluklarının artması tespit edildi ($p<0,05$) (Tablo 2, Şekil 3).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Renin-angiotensin sistemi, böbrek ve kalp-damar sistemi fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli rol oynar. Renin salınımı, böbrek tübüllerindeki süzüntüden sodyumun geri emiliminden, sempatik sinirlerin uyarılmasından, bazı hormonlardan ve kan basıncındaki değişikliklerden etkilenir. Bununla birlikte, renin salınımını kontrol eden hücresel mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Özellikle NO'nun,

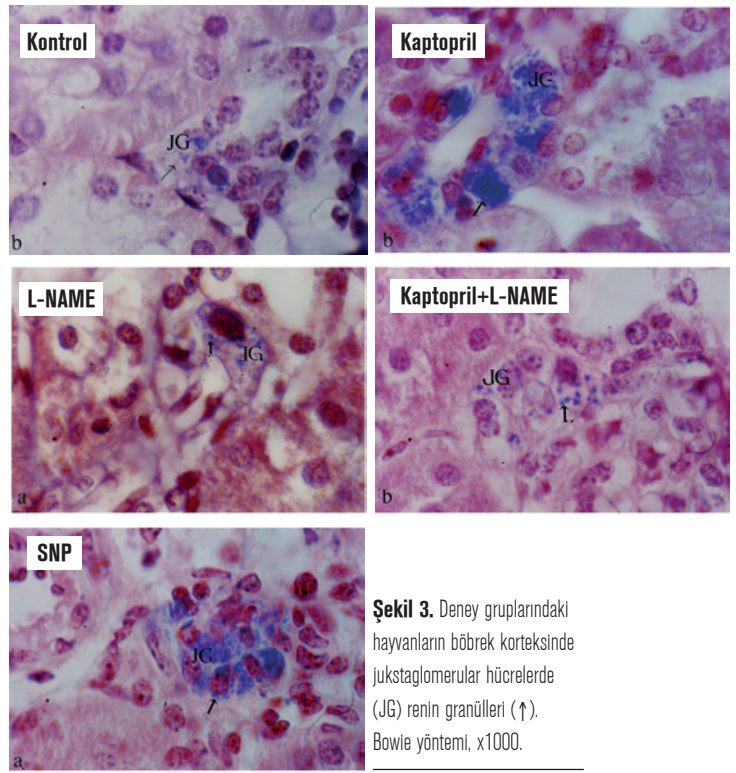
renin sentezi ve salınmasına olan etkileri ile ilgili birbirine zıt araştırmalar vardır.^{2,3} Ancak böbrekte, proksimal tübül hücreleri başta olmak üzere, mesangiyal hücreler, makula densa ve arteriyollerin endotelleri NO üretmektedir.⁴ Proksimal tübül ve makula densadaki NOS dağılımı bizim NADPH-d histokimyası uyguladığımız böbrek kesitlerinde de açıkça görüldü. Ancak kaptopril gibi, Ang II oluşumunu engelleyen bir inhibitör uygulandığı zaman, böbrekteki NO dağılımında özellikle proksimal tübüllerde NADPH-d reaksiyonunun arttığı açıkça görüldü. Bu durum bize, kaptoprilin kan basıncı azalmasını gerçekleştirirken, NO yolunu kullanabileceğini açıkça göstermiştir. Ang II üretilmemesi, damar daralmasını durdururken, NO üretiminin artması damar genişlemesine, kan basıncının düşmesine, glomerular filtrasyon hızının yavaşlamasına neden olur. ACE inhibitörleri, sistemik damar direncini azaltır ve idrarla sodyum atılımını artırır. Bu durum, hipertansiyon tedavisinde önemlidir ve kalp yetersizliğinden ölüm oranını azaltır.¹² Hayvanlara ACE inhibitörlerinin uygulanması dokudaki renin mRNA'sının miktarını, renin sentezini ve salgılanmasını artırır.¹³ Kaptopril gibi inhibitörler, efferent arteriyollerini genişletip, glomerular kapiller basıncını azaltarak tansiyonu düşürürler.¹⁴ Çalışmamız, kaptopril uygulamasının böbrek dokusundaki NOS dağılımını artırdığını gösterirken, jukstaglomerular granüllü hücrelerdeki renin içeriğinin de artmış olduğunu gösterdi. Kaptopril uyguladığımız hayvanlarda, hipertansiyon oluşturulmuş değildi. Bunlar normal kan basıncına sahip hayvanlardı. Yirmi bir gün süreyle, bu ilacı uygulamamız, NO'nun artmasına, dolayısıyla hipotansiyona neden olabilir. Azalan glomerular filtrasyon basıncını artırabilmek için böbrek dokusunun Ang II'ye ihtiyacı vardır. Bunu sağlayabilmek için de böbreklerde renin üretimi ve salgılanması artırılmaktadır. Böylece NO'nun fazla üretilmesi durumunda, renin üretiminin de artabileceği görülmektedir.

Jukstaglomerular aygıt bölgesinde meydana gelen NO'nun, renin sentezini ve salgılanmasını kontrol edip etmediği bilinmezken, renin salınmasında NO'nun uyarıcı etkisi olduğu gösterildi. Bununla ilgili olarak yapılan ilk çalışmalar, kültüre edilen JG granüllü hücrelerin 4 saatten fazla SNP'ye maruz bırakıldığında, renin salınmasını uyardığını göstermekteydi.¹⁹ Bu da NO'nun renin salgılanmasında doğrudan etkisi olabileceğine işaret etmektedir. Uzun süre L-NAME ile muamele edilmiş sıçanların böbrek dokusuna, doğrudan SNP'nin uygulanması renin salınımını artırmıştır. SNP'nin kan basıncının düşmesini sağlayacak dozda uygulanması, böbreğin sempatik sinirlerini aktive ederek, renin salınımını uyarabilir.⁸ Bununla birlikte, izole edilmiş JG granüllü hücrelere NO vericilerinin uygulanması, bu hücrelerde renin salınımını engellemiştir.²⁰ Makula densa kökenli →

NO'nun, distal tübüllerin fonksiyonunda önemli olduğu ve bu yolla renin oluşumuna aracılık edebileceği ileri sürülmüştür.²¹ Bütün bu çalışmalar renin salınımında, NO'nun önemli bir yere sahip olduğunu göstermektedir. Biz de bir grup deney hayvanımıza doğrudan NO gibi rol oynayan, endojen NO'yu etkilemeden onun yerini alabilen bir verici olarak bilim adamlarının sıklıkla kullandığı SNP'yi uyguladığımız zaman böbrek dokusunda, NADPH-d aktivitesinin azaldığını, afferent arteriyol duvarında jukstaglomerular hücrelerin granüllerinin de oldukça fazla olduğunu açık bir şekilde gördük. Bugüne kadar yapılan araştırmalarda, SNP'nin renin aktivitesine olan etkisi hep biyokimyasal olarak araştırılmıştır. Bizim hücre içinde artan granülleri göstermemiz, bu çalışmaları desteklemiş ve NO'nun renin sentezinde ve salınımında etkili olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızda da kaptopril ve L-NAME'nin birlikte uygulandığı hayvanlarda, hem NOS dağılımının hem de renin içeriğinin kontrol hayvanlardaki gibi olması, ACE inhibitörlerinin NO'yu artırarak kan basıncını düşürdüğünü desteklemektedir. Bu grup hayvanlarda L-NAME ile NO üretimi önlenirken, kaptoprilin uyarıcı etkisi devam etmektedir. Bu nedenle de, kontrollere yakın bir NOS dağılımı görülmüştür. Renin granülleri açısından da aynı durum söz konusudur. Kaptoprilin uyarıcı etkisinin yanında NO sentezinin inhibe edilmesi, renin sentezini normal düzeyde tutmuştur. Khattab ve ark. L-NAME ile muamele ettikleri sıçanlarda 3 hafta sonra sistolik, diastolik, ortalama kan basıncının yükseldiğini ve kaptopril (10 mg/kg/gün) uygulaması ile 4 hafta sonra kan basıncı eğerlerindeki yükselmenin normale döndüğünü göstermişlerdir.²² L-NAME ve furosemid gibi bir diüretigin birlikte uygulandığı sıçanlarda, renin-angiotensin sisteminin baskılanmasının önüne geçilmiştir.²³ Uzun süreli böbrek rahatsızlığı olan sıçanlarda, ACE inhibitörleri yararlı bir etkiye sahiptir. Bu etki efferent arteriyollerdeki genişleme ve glomerular kan basıncındaki azalmaya bağlıdır. Kronik kaptopril uygulanması L-NAME kaynaklı hipertansiyonu önlemiştir.²⁴ Ayrıca Chen ve ark. sıçanlarda ilerlemiş oksidasyon protein ürünlerine bağlı olarak oluşan hasarda kaptopril ve enalaprilin aortik endotelial fonksiyonu koruduğunu ve bu durumun NO sentezinde yükselme meydana getirmeleriyle ilişkili olduğunu önermişlerdir. Bu yüzden kaptopril ve enalapril oksidasyon stresi önlemede farmakolojik ajanlar olarak gösterilmişlerdir.²⁵ Pechanova ve ark. kaptopril ve aldosteron reseptör antagonisti spiranalaktonun L-NAME kaynaklı hipertansiyonu ve böbrek dokusunda meydana getirdiği antioksidan kapasitesindeki düşmeyi önlediğini göstermiştir.²⁶

Kan basıncında meydana gelebilecek bir düşme, glomerular kapillerlerde genişleme ve glomerular filtrasyon hızında azalma, kaptopril ve SNP uygulanan



Şekil 3. Deney gruplarındaki hayvanların böbrek korteksinde jukstaglomerular hücrelerde (JG) renin granülleri (↑). Bowie yöntemi, x1000.

hayvanlarda beklenen fizyolojik değişikliklerdi. Buna bağlı olarak, HE uyguladığımız böbrek kesitlerinde, glomerular yumakta meydana gelen bozulmalar, tübüllerin sitoplazma ve nukleuslarında meydana gelen değişiklikler, yavaşlayan filtrasyon sonucu geri emilimde de bir yavaşlamanın olduğunu göstermektedir.

L-NAME uyguladığımız hayvanların glomerular yumaklarında görülen değişiklikler, NO üretiminin durması sonucu damar çapının daralmasına bağlı olarak glomerular yumağın kapladığı alanın daralmasına neden olmuştur. Bu gruptaki hayvanların kapsül alanlarındaki genişleme de glomerular kollaps ile birlikte, artan kan basıncı ve değişen glomerular filtrasyon sonucu Bowman kapsülü lümeninde ultrafiltratın arttığını göstermektedir. L-NAME verilen hayvanlarda glomerular yumağın hacimce azalmasına karşın, bazal membranında belirgin bir kalınlaşma ve Bowman kapsülünde belirgin bir genişleme gözlemlendi. Araştırmacılar yaptıkları çalışmaları sonucu Yüksek kan basıncı sıçanlarda 3 hafta süresince L-NAME uygulanmasının hiyalin birikmesi, kapiller hasar, mesangial matriksde artma, glomerular yumağın bazal membranının bir kısmının veya tamamının kalınlaşması gibi belirgin glomerular değişiklikler ortaya çıkardığını saptamışlardır. Ayrıca, yine aynı araştırmacılar distal tübüllerde genişleme ve fibrozis de meydana geldiğini gözlemlemiştir ve bu değişiklikleri, azalan glomerular filtrasyon hızı, artan basınç ve protein salınımına bağlayarak açıklanmıştır.²⁷ Ribiero ve ark., yüksek dozda L-NAME uygulanmasının arteriyollerin duvar kalınlığına bağlı olarak glomerular hasar oluşturduğunu, L-NAME'nin doza bağlı olarak, glomerular perfüzyon basıncında farklılıklar meydana getirdiğini göstermişlerdir.²⁸ Atakişi ve ark., ise →

NİTRİK OKSİT SENTETAZ VE RENİN GRANÜLLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ALBİNO FARE (BALB/C) BÖBREĞİNDE HİSTOKİMYASAL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

tavşanlara 11 gün süreyle uyguladıkları L-NAME'nin Kutlubay ve ark. da sıçanlara litrede 0,1 gr uyguladıkları L-NAME'nin böbrek dokusunda önemli bir değişiklik meydana getirmediğini göstermişlerdir. Bu durum L-NAME'nin etkisinin doz ve süreye bağlı olarak değiştiğini göstermektedir.^{29,30}

Sonuç olarak, çalışmamız NO ile renin sentez ve salınımı arasında doğrudan ya da dolaylı yoldan bir ilişkinin kesin olarak var olduğunu göstermektedir. Çalışmamız, uyguladığımız genel bir inhibitör olan, her üç tip NOS'yi de inhibe ettiği özellikle de, endotel kaynaklı nitrik oksit üretimini tamamen durdurabildiği bilinen L-NAME'nin uygulanması, afferent arteriyol

duvarında üretilen renini doğrudan etkileyebildiğini açıkça göstermiştir. Bunun gibi mesangial hücrelerin ürettiği eNO da benzer etkiyi yapabilir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar, genel olarak böbrek fonksiyonlarında NO vericilerinin ve sadece L-NAME gibi genel bir NOS inhibitörünün etkilerine dayanarak yapılmıştır. Çalışmamız, JGA'daki granüllü hücreleri ve granülleri en iyi şekilde gösteren Bowie yöntemi-ni uygulayarak, NO'nun renin üretimindeki rolünü açıkça göstermesi açısından özgün bir çalışmadır. NO vericisi ve NOS inhibitörü yanında, bir ACE inhibitörü de kullanarak, bu inhibitörlerin ve kan basıncını düzenlemede kullanılan ilaçların da NO ile bağlantılı çalışabileceğini göstermesi bakımından da önemlidir.

	İLETİŞİM İÇİN: Dr. Hatice Yorulmaz Haliç Üniv. Sağlık Bilimleri Yüksekokulu, Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Böl., Kaptanpaşa mah. Darülaceze cad. Şişli, İstanbul haticeyorulmaz@hotmail.com
	GÖNDERDİĞİ TARİHİ: 21 / 09 / 2010 • KABUL TARİHİ: 20 / 10 / 2011

KAYNAKLAR

1. Ito S. Nitric oxide in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1995; 4: 23-30.
2. Beierwaltes WH, Carretero OA. Nonprostanoid endothelium-derived factors inhibit renin release. *Hypertension* 1992; 19: 68-73.
3. Krämer GK, Rithaler T, Ackermann M, et al. Endothelium-mediated regulation of renin secretion. *Kidney Int* 1994; 46: 1577-1579.
4. Bachmann S, Bosse H, Mundel P. Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney. *Am J Physiol* 1995; 268: 885-898.
5. Schriker K, Kurtz A. Blockade of nitric oxide formation inhibits the stimulation of the renin system by a low salt intake. *Pflügers Arch* 1996; 432: 187-191.
6. Chiu T, Reid IA. Role of cyclic GMP inhibitable phosphodiesterase and nitric oxide in the beta adrenoceptor control of renin secretion. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 278: 793-799.
7. Zanchi A, Schaad NC, Osterheld MC, et al. Effects of chronic NO synthase inhibition in rats on renin-angiotensin system and sympathetic nervous system. *Am J Physiol* 1995; 268: 2267-2273.
8. Kurtz A, Gotz KH, Hamann M, Wagner C. Stimulation of renin secretion by NO donors is related to the cAMP pathway. *Am J Physiol* 1998; 274: 709-717.
9. Beierwaltes WH. Nitric oxide participates in calcium-mediated regulation of renin release. *Hypertension* 1994; 23: 140-144.
10. Melaragno MG, Fink GD. Role of ANG II in hypertension produced by chronic inhibition of nitric oxide synthase in conscious rats. *Am J Physiol* 1996; 271: 806-811.
11. Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, et al. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* 1993; 45: 205-251.
12. Ong HT. Are angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers especially useful for cardiovascular protection? *J Am Board Fam Med* 2009; 22: 686-697.
13. Manley HJ. Role of angiotensin-converting-enzyme inhibition in patients with renal disease. *Am J Health Syst Pharm* 2000; 57: 12-18.
14. Yayama K, Okamoto H. Angiotensin II-induced vasodilation via type 2 receptor: role of bradykinin and nitric oxide. *Int Immunopharmacol* 2008; 8: 312-318.
15. Bernatova I, Pechonova O, Simko F. Effect of captopril in L-NAME induced hypertension on the rat myocardium, aorta, brain. *Exp Physiol* 1999; 84: 1095-1105.
16. Kon V, Fogo A, Ichikawa I. Bradykinin causes selective efferent arteriolar dilation during angiotensin I converting enzyme inhibition. *Kidney Int* 1993; 44: 545-550.
17. Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, Vincent SR. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Prot Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2811-2814.
18. Demirci C, Özarslan S. The effects of insulin on the juxtaglomerular apparatus and plasma renin activity. *Turk J Biol* 1997; 21: 405-421.
19. Schriker K, Kurtz A. Liberators of NO exert a dual effect on renin secretion from isolated mouse renal juxtaglomerular cells. *Am J Physiol* 1993; 265: 180-186.
20. Greenberg SG, He XR, Schnermann JB, Briggs JP. Effect of nitric oxide on renin secretion. I. Studies in isolated juxtaglomerular cells. *Am J Physiol* 1995; 268: 948-952.
21. Schnackenberg CG, Tabor BL, Strong MH, Granger JP. Inhibition of intrarenal NO stimulates renin secretion through a macula densa-mediated mechanism. *Am J Physiol* 1997; 272: 879-886.
22. Khatib MM, Mostafa A, Al-Shabanah O. Effects of Captopril on Cardiac and Renal Damage, and Metabolic Alterations in the Nitric Oxide-Deficient Hypertensive Rat. *Kidney Blood Press Res* 2005; 28: 243-250.
23. Tharaux PL, Dussault JC, Pauti MD, et al. Activation of renin synthesis is dependent on intact nitric oxide production. *Kidney Int* 1997; 51: 1780-1787.
24. Zicha J, Dobesová Z, Kunes J. Antihypertensive mechanisms of chronic captopril or N-acetylcysteine treatment in L-NAME hypertensive rats. *Hypertens Res* 2006; 29: 1021-1027.
25. Chen SX, Song T, Zhou SH, et al. Protective effects of ACE inhibitors on vascular endothelial dysfunction induced by exogenous advanced oxidation protein products in rats. *Eur J Pharmacol* 2008; 584: 368-375.
26. Pechanova O, Matuskova J, Capikova D, et al. Effect of spironolactone and captopril on nitric oxide and S-nitrosothiol formation in kidney of L-NAME-treated rats. *Kidney Int* 2006; 70: 170-176.
27. Hidehiko O, Yuko O, Edward D. Frohlich Nitric Oxide Synthase Inhibition in Spontaneously Hypertensive Rats, Systemic, Renal, and Glomerular Hemodynamics. *Hypertension* 1995; 26: 249-255.
28. Ribeiro MO, Antunes E, De Nucci G, Lovisolo SM, Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension* 1992; 20: 298-303.
29. Atakışi O, Atakışi E, Atabay T, Uzun M. L-arjinin ve Nω-nitro-L-arjinin metil esteri uygulamasının beyin, karaciğer, böbrek dokusu nitrik oksit ve malondialdehit düzeylerine etkisi. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg* 2009; 15: 71-75.
30. Kutlubay R, Oğuz EO, Turgut G, Kocamaz E. Karaciğer ve böbrek üzerine etanolün toksisitesi ve L-NAME'in koruyucu etkisi. *SDÜ Tıp Fak Derg* 2008; 15: 11-17.