

## Üreter Obstrüksiyonu Yapılan Ratlarda Pregabalinin Böbrek Dokusu Üzerine Etkileri

### The Effects of Pregabalin on Kidney Tissue of the Rats those have Ureter Obstruction

Zerrin Yılmaz<sup>1</sup>, Ayşe Hande Arpacı<sup>2</sup>, Nuran Süngü<sup>3</sup>, Aydan Kılıçarslan<sup>3</sup>, Volkan Şıvgın<sup>4</sup>, Nurten İnan<sup>4</sup>, Emine Ünal Ceran<sup>4</sup>,  
Metin Alkan<sup>4</sup>, Ayşegül Küçük<sup>5</sup>, Hakan Boyunağa<sup>6</sup>, Mustafa Arslan<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Sağlık Bilimleri Üniversitesi Samsun Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye

<sup>2</sup> Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

<sup>3</sup> Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

<sup>4</sup> Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

<sup>5</sup> Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Kütahya, Türkiye

<sup>6</sup> Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Kırıkkale, Türkiye

#### ÖZET

**Amaç:** Nöropatik ağrı tedavisi için günümüzde çeşitli algoritmalar ve tedavi rehberleri oluşturulmuştur. Bu algoritmalarda özetle trisiklik antidepresanlar, antikonvülanlar, serotonin geri alım inhibitörleri ve opioidlerden yararlanılmaktadır. Pregabalin nöropatik ağrı tedavisinde sıklıkla kullanılmakta olan bir antikonvülan ilaçtır. Kullanımı sırasında böbreklerden değişmeden atılması nedeniyle böbrek yetmezliği olan hastalarda doz ayarlanması gerekliliğine dikkat çekilmiştir. Bu nedenle çalışmamızda üreter obstrüksiyonu oluşturarak renal yetmezlik tablosu meydana gelen ratlarda pregabalinin renal dokuya etkilerini araştırmayı hedefledik.

**Materyal ve Metod:** Etik kurul onayı alındıktan sonra, 24 adet rat, rastgele 4 gruba ayrıldılar: Grup K: Kontrol, Grup P: Pregabalin, Grup ÜO: Üreter Obstrüksiyonu, Grup ÜO-P: Üreter Obstrüksiyonu- Pregabalin. Üreter obstrüksiyonu gruplarına ketamin anestezisi altında düşük abdominal insizyonla sağ üreter distaline ulaşp 2.0 mersilene dikiş koyuldu ve geç dönem böbrek yetmezliği için 3 hafta beklendi. Grup P ve ÜO-P grubundaki ratlara pregabalin tek doz intraperitoneal 100 mg/kg olarak uygulandı. Yirmidört saatlik takip dönemi sonrasında ratlara intraperitoneal uygulanan ketamin (100 mg/kg) ile intraabdominal aortadan alınan kan ile sakrifiye edildi. Alınan kan örnekleri -20 derecede saklanarak serumda üre, kreatinin, MDA ve NO çalışıldı. Böbrek dokusunda da kaspaz 3, 8 enzimleri ve histopatolojik değerlendirme yapıldı.

**Bulgular:** Kaspaz 3 enzim aktivitesi ÜO gruplarında anlamlı olarak arttı. Ayrıca pregabalin uygulaması P grubuna göre ÜO-P grubunda kaspaz 3 enzim aktivitesini anlamlı olarak arttırdı. Kaspaz 8 enzim aktivitesi gruplar arasında benzer bulundu. Işık mikroskopi değerlendirmesinde ÜO gruplarında özellikle obstrüksiyon yapılan böbrek dokusunda olmak üzere anlamlı değişiklikler meydana getirdiği tespit edildi. NO ve MDA enzim aktiviteleri ÜO gruplarında anlamlı olarak arttı. Ayrıca pregabalin uygulaması P grubuna göre ÜO-P grubunda NO ve MDA enzim aktivitelerini anlamlı olarak arttırdı. Üreter obstrüksiyonu üre ve kreatinin seviyesini anlamlı olarak arttırdı. Ayrıca Pregabalin uygulaması P grubuna göre ÜO-P grubunda üre ve kreatinin seviyesini arttırdı.

**Sonuç:** Nöropatik ağrı tedavisinde sıklıkla kullanılmakta olan pregabalinin, deneysel olarak renal yetmezlik oluşturulan ratlarda meydana gelen renal hasarlanmayı artırmadığı saptanmıştır. Bulgularımızın geniş serili deneysel ve klinik araştırmalarla desteklenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

**Anahtar Sözcükler:** Üreter obstrüksiyonu, pregabalin, kaspaz 3, kaspaz 8, MDA, NO

**Geliş Tarihi:** 15.10.2018

**Kabul Tarihi:**30.10.2018

#### ABSTRACT

**Background:** Various algorithms and treatment guidelines have been established for the treatment of neuropathic pain. In summary, tricyclic antidepressants, anticonvulsants, serotonin reuptake inhibitors and opioids are used in these algorithms. Pregabalin is an anticonvulsant drug that is frequently used in the treatment of neuropathic pain. During the use of kidneys in patients with renal insufficiency due to the need to change the dose was taken attention. Therefore, in our study, we aimed to investigate the effects of pregabalin on renal tissue in rats with renal failure due to ureter obstruction.

**Materials and Methods:** After the approval of the ethics committee, 24 rats were randomly divided into four groups: Group C: Control, Group P: Pregabalin, Group UO: Ureter Obstruction, UO-P Group: Ureter Obstruction - Pregabalin. Urinary obstruction groups underwent a low abdominal incision under ketamine anesthesia to reach the distal right ureter and suture was placed with 2.0 mersilene and was waited for 3 weeks for late stage renal failure. In group P and UO-P rats, pregabalin was administered intraperitoneally at a dose of 100 mg / kg. After the twenty-four hour follow-up period, rats were sacrificed with the blood taken from the intraabdominal aorta by intraperitoneal ketamine (100 mg / kg). Blood samples were stored at -20 ° C and urea, creatinine, MDA and NO were studied. In the kidney tissue, caspase 3, 8 enzymes and histopathological evaluation were performed.

**Results:** Caspase 3 enzyme activity was significantly increased in UO groups. In addition, pregabalin administration significantly increased the activity of caspase 3 in the UO-P group compared to the P group. The enzyme activity of caspase 8 was similar between the groups. Light microscopy revealed significant changes in UO groups, especially in the kidney tissue, which was obstructed. NO and MDA enzyme activities increased significantly in UO groups. In addition, pregabalin administration significantly increased NO and MDA enzyme activities in UO-P group compared to P group. Urinary obstruction significantly increased urea and creatinine levels. Pregabalin administration also increased urea and creatinine levels in the UO-P group compared to the P group.

**Conclusion:** Pregabalin, which is frequently used in the treatment of neuropathic pain, has not been found to increase the renal damage that occurs experimentally in renal failure rats. We believe that our findings should be supported by a wide range of experimental and clinical studies.

**Key Words:** Ureter obstruction, pregabalin, caspase 3, caspase 8, MDA, NO

**Received:** 10.15.2018

**Accepted:**10.30.2018

**Yazışma Adresi / Address for Correspondence:** Dr. Mustafa Arslan, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı 06510 Ankara, Türkiye  
E-posta: mustarslan@gmail.com

©Telif Hakkı 2019 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi - Makale metnine <http://medicaljournal.gazi.edu.tr/> web adresinden ulaşılabilir.

©Copyright 2019 by Gazi University Medical Faculty - Available on-line at web site <http://medicaljournal.gazi.edu.tr/>

doi:<http://dx.doi.org/10.12996/gmj.2019.14>

**GİRİŞ**

Somatosensoryel sinir sistemini etkileyen bir lezyon veya hastalıktan kaynaklanan nöropatik ağrı, hastaların yaşam kalitesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Günümüzde çok çeşitli etyolojileri saptanmasına rağmen farklı bir klinik antite olarak kabul gören nöropatik ağrı, aynı zamanda birey ve toplum üzerinde yüksek ekonomik yük oluşturmaktadır (1).

Yapılmış birçok epidemiyolojik araştırmada nöropatik ağrılı birçok hastanın ağrıları için uygun tedavi almadığı gösterilmiştir Bu durum tanısız yetersizlik, nispeten etkisiz ilaçların kullanılması veya etkili ilaçların klinik pratikte yetersiz kullanımı ile ilgili olabilmektedir. Bu nedenle nöropatik ağrının farmakoterapisi için kanıt temelli tavsiyeler önemlidir (2, 3).

Trisiklik antidepressanlar, Serotonin geri alım inhibitörü antidepressanlardan venlafaksin ve duloksetin, opioidler, antiepileptik ilaçlar olan pregabalin ve gabapentin nöropatik ağrı tedavisi için kullanılmaktadır (4).

Presinaptik kalsiyum kanalları üzerinden etki gösteren pregabalin, plazma proteinlerine bağlanmaz, karaciğerde metabolize edilmez ve böbreklerden değişmeden atılır. Pregabalin klerensi kreatinine oldukça yakındır ve böbrek fonksiyonları bozuk hastalarda klerensi oldukça azalır (5). Çalışmamızda üreter obstrüksiyonu ile renal yetmezlik tablosu oluşturduğumuz ratlarda pregabalinin renal dokuya etkilerini araştırmayı hedefledik.

**MATERYAL ve METOD**

Gazi Üniversitesi Deneysel Hayvanları Etik Kurulu onayı alındıktan sonra Gazi Üniversitesi Deneysel Hayvanları Araştırma Merkezi (GÜDAM) Laboratuvarı'nda çalışma gerçekleştirilmiştir.

Hayvanların, patojen barındırmayan bir ortamda, 20-21°C ısıda, 12 saat gece 12 saat gündüz periyotları korunarak bakımları sağlandı. Anestezik işlemden 2 saat öncesine kadar serbest su ve gıda erişimine izin verildi.

Çalışmada ağırlıkları 300 ile 375 gr arasında değişen 24 adet erkek Wistar albino cinsi rat kullanıldı. Ratlar rastgele dört gruba ayrıldı: Kontrol Grubu (Grup K; n=6), Pregabalin Grubu (Grup P; n=6), Üreter obstrüksiyonu grubu (Grup ÜO; n=6) ve Üreter obstrüksiyonu-Pregabalin Grubu (Grup ÜO-P; n=6). Böbrek yetmezliği oluşturmak için iki grup sıçana ketamin anestezisi altında düşük abdominal insizyonla sağ üreter distaline ulaşıp 2.0 mersilenle dikiş koyuldu. Geç dönem etkilerinin gözlenebilmesi amacıyla 3 hafta ratların bakımları sağlandı (6).

Üç hafta sonunda Grup K ve Grup ÜO grubundaki ratlar intraperitoneal uygulanan 100 mg/kg ketamin enjeksiyonu ardından abdominal aortadan alınan kan ile sakrifiye edildi. Grup P ve Grup ÜO-P' deki ratlara ise pregabalin tek doz intraperitoneal 100 mg/kg (7) olacak şekilde uygulandı ve yirmidört saatlik takip dönemi sonrasında intraperitoneal uygulanan ketamin (100 mg/kg) enjeksiyonu ardından ratlar abdominal aortadan alınan kan ile sakrifiye edildi.

Dört gruptan da alınan kan örnekleri -20 derecede saklanıp serumda üre, kreatinin, MDA ve NO çalışıldı. Böbrek dokuları ise bütünlük bozulmayacak ve travmatize edilmeyecek şekilde alınıp histopatolojik inceleme için %10'luk formalin içine konuldu.

**Malondialdehid (MDA) ve Nitrik Oksit (NO) ölçümleri**

Lipid peroksidasyon ölçüm metodu olan Esterbauer metodu uygulanarak yapıldı. Tiobarbiturik asit ile 90-95°C'de reaksiyona giren malondialdehit, pembe renkli kromojen oluşturmaktadır. Onbeş dakika sonra hızla soğutulan numunelerin absorbanları 532 nm'de spektrofotometrik olarak okundu (8). NO'nin stabil oksidatif metabolitlerinin (NO<sub>2</sub> ve NO<sub>3</sub>) konsantrasyonu serumda ölçülerek NO üretimi tayin edildi. Nitrit ölçümü Griess reaksiyonu ile yapıldı (9).

**İmmünohistokimyasal değerlendirme**

Dokuların tamamından immünohistokimyasal çalışmalar için formalin fikse parafine gömülü biyopsi örneklerin bloklarından poly-L-lizin kaplı lamlara 3- 4 µ kalınlığında tam yüzey kesitler hazırlandı. Kesitler, 45 derecelik etüvde bir gece bekletildi.

İmmünohistokimyasal olarak Kaspaz 3 (p11, C-6, 1/400, mouse monoclonal antibody) ve Kaspaz 8 (Clone, D-8, 1/205, mouse monoclonal antibody) antikorları için Bond-max immünohistokimya (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) cihazında standart antijen retrieval metodları sırasıyla; deparafinizasyon, blokaj, primer antikor (Caspaz 3 ve Caspaz 8: Sitrat 30 dakika), post-primer, polimer, DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) kullanıldı. Arka plan boyamada Hematoksilin II 6 dk, Blue reagent 4 dk uygulandı.

İmmünohistokimyasal boyama uygulanan preparatlar su ve alkolde yıkanıp ve ksilende şeffaflandırdıktan sonra balzamlı kapatıldı. İmmünohistokimyasal boyamada; seminifer tübüller, stromal hücreler ve endotelde Kaspaz 3 ve Kaspaz 8'in sitoplazmik boyanmalarının hem yaygınlığı hemde şiddeti değerlendirildi. Boyanma şiddeti 0: boyanma yok, 1: hafif ve 2: şiddetli olarak skorlandı. Yaygınlık boyanma %50'den fazla ise yaygın olarak değerlendirildi.

**Histopatolojik inceleme**

Rutin tespit işlemleri yapılan böbrekler, parafin bloklara alınıp 5 µ' luk kesitleri yapıldıktan sonra Hematoksilin & Eozin (H&E) ile boyanıp ışık mikroskobu ile incelendi. Histopatolojik değerlendirme için her böbrek preparatı tübül epitelinde dejenerasyon, ödem, dilatasyon ve atrofi; interstisyel ödem, fibrozis ve inflamasyon; glomerüler skleroz, Bowman kapsül dilatasyonu açısından değerlendirildi (10).

**İstatistiksel Analiz**

İstatistiksel analiz için SPSS 20.0 (SPSS, Chicago, IL, ABD) programı kullanıldı. Sonuçlar Kruskal-Wallis testi kullanılarak değerlendirildi. Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi, hangi grubun diğerinden farklı olduğunu belirlemek için anlamlı Kruskal-Wallis' den sonra kullanıldı. Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak ifade edildi (Ortalama ± SH). İstatistiksel anlamlılık p değeri <0,05 olarak belirlenmiştir.

**BULGULAR**

Peritübüler kapiller, Glomerül ve tübüller Kaspaz 8 enzim aktivitesi gruplar arasında benzer bulundu (Tablo-1).

<b>Tablo 1:</b> Böbrek dokusu Kaspaz 8 enzim aktivitesi [Ortalama ± SH]	<b>Grup K (n=6)</b>	<b>Grup P (n=6)</b>	<b>Grup ÜO (n=6)</b>	<b>Grup ÜO-P (n=6)</b>	<b>p**</b>
<b>Peritübüler kapiller</b>	0.33±0.21	0.50±0.22	0.50±0.22	1.00±0.00	0.107
<b>Glomerül</b>	0.50±0.22	0.50±0.22	0.50±0.22	0.50±0.22	-
<b>Tübüller</b>	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	-

\*\* p<0.05: Kruskal-Wallis testi ile anlamlılık düzeyi

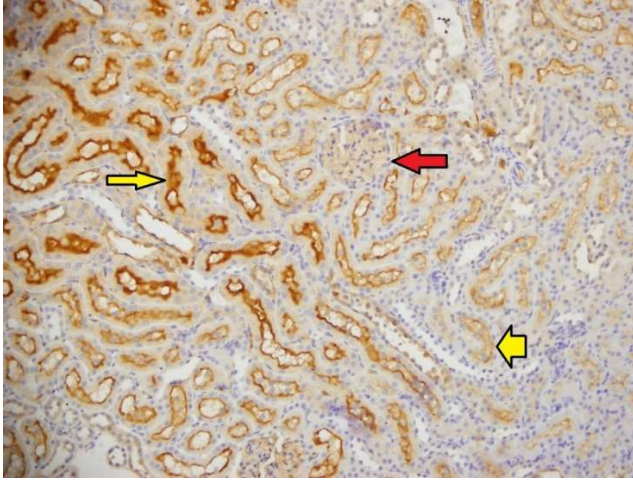
Üreter obstrüksiyonu yapılan böbrek dokusu medüller tübül stoplazmik kaspaz 3 enzim aktivitesi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı (p<0.0001). Medüller tübül stoplazmik kaspaz 3 enzim aktivitesi ÜO-P grubunda tüm gruplara göre anlamlı yüksek olarak bulundu (p<0.0001, p<0.0001, p=0.002, sırasıyla). Ayrıca medüller tübül stoplazmik

kaspaz 3 enzim aktivitesi ÜO grubunda K ve P gruplarına göre anlamlı yüksek bulundu (p=0.005, p=0.005). Kortikomedüller tübül ve glomerül stoplazmik kaspaz 3 enzim aktivitesi ÜO ve ÜO-P gruplarında K ve P gruplarına göre anlamlı yüksek olarak bulundu. Korteks tübül stoplazmik kaspaz 3 enzim aktivitesi gruplar arasında benzer bulundu (p=0.540), (Tablo-2, Şekil-1-3).

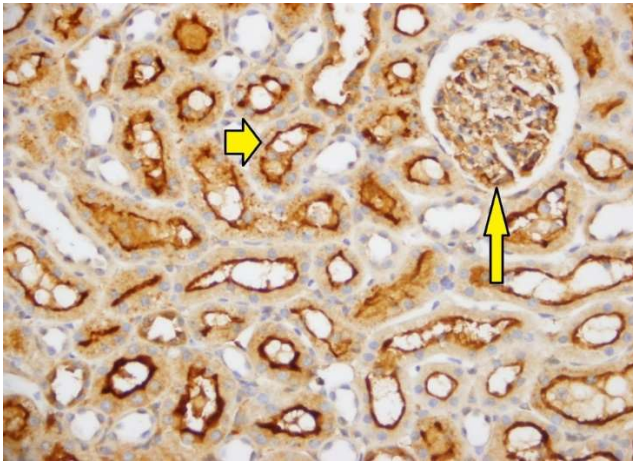
<b>Tablo 2:</b> Böbrek dokusu stoplazmik Kaspaz 3 enzim aktivitesi [Ortalama ± SH]	<b>Grup K (n=6)</b>	<b>Grup P (n=6)</b>	<b>Grup ÜO (n=6)</b>	<b>Grup ÜO-P (n=6)</b>	<b>p**</b>
<b>Korteks tübül</b>	1.00±0.00	1.17±0.17	1.17±0.17	1.33±0.21	0.540
<b>Kortikomedüller tübül</b>	0.50±0.22	0.83±0.17	1.50±0.22*,&	1.83±0.17*,&	<0.0001
<b>Medüller tübül</b>	0.00±0.00	0.00±0.00	0.67±0.21*,&	1.33±0.33*,&,+	<0.0001
<b>Glomerül</b>	0.00±0.00	0.17±0.17	1.00±0.26*,&	1.50±0.,22*,&	<0.0001

\*\* p<0.05: Kruskal-Wallis testi ile anlamlılık düzeyi

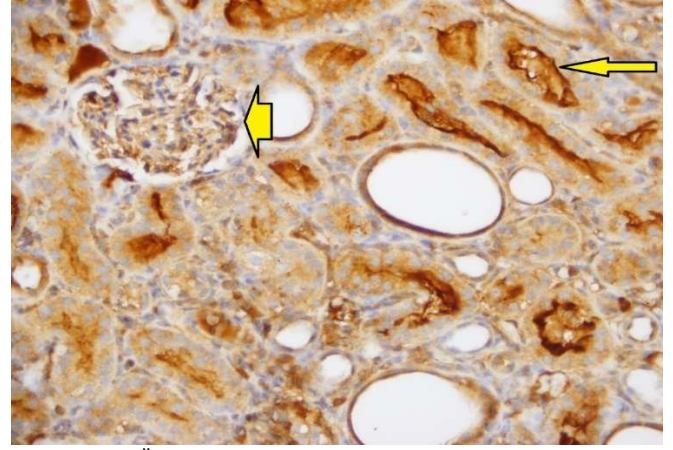
\* p<0.05: Grup K ile karşılaştırıldığında; & p<0.05: Grup P ile karşılaştırıldığında; + p<0.05: Grup ÜO ile karşılaştırıldığında



**Şekil 1:** Grup K, Kaspaz 3 ile kortikal tübül epitel hücrelerinde lüminal zayıf boyanma (kısa sarı ok) ve kortikomedüller tübül epitel hücrelerinde lüminal kuvvetli boyanma (uzun sarı ok) izlenirken glomerüllerde (kırmızı ok) boyanma gözlenmemiştir (x200).



**Şekil 2:** Grup P, Kaspaz 3 ile kortikal tübüllerde lüminal ve sitoplazmik zayıf (kısa sarı ok) boyanma, glomerülde sitoplazmik şiddetli boyanma gözlenmiştir (x400).



**Şekil 3:** Grup ÜOP, Kaspaz 3 ile kortikal tübül epitel hücrelerinde kuvvetli lüminal ve sitoplazmik (uzun sarı ok) boyanma izlenirken ve glomerüllerde de (kısa sarı ok) sitoplazmik şiddetli boyanma gözlenmiştir (x200).

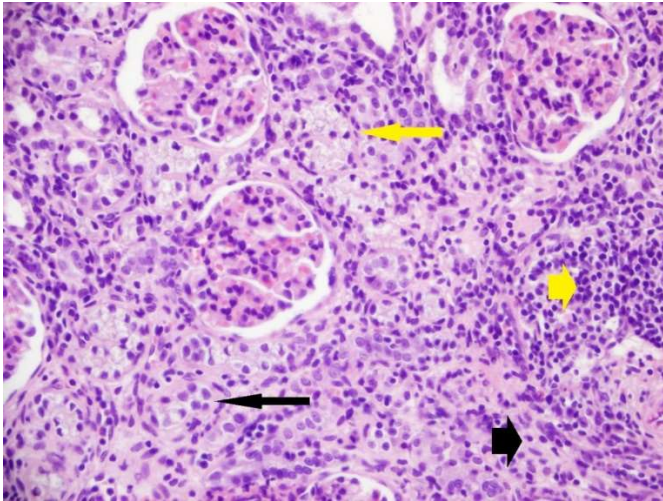
Işık mikroskopisinde; üreter obstrüksiyonu yapılan böbrek tübül epitelinde dejenerasyon düzeyi gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulunmuştur ( $p < 0.0001$ ). ÜO ve ÜO-P gruplarında kontrol ve P gruplarına göre tübül epitelinde dejenerasyon daha fazla görülmüştür, (Tablo-3, Şekil-4,5). Tübül epitelinde ödem gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulunmuştur ( $p < 0.0001$ ). ÜO ve ÜO-P gruplarında kontrol ve P gruplarına göre tübül epitelinde ödem daha fazla görülmüştür (Tablo-3, Şekil-4,5). Üreter obstrüksiyonu yapılan böbrek tübül dilatasyon düzeyi gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulunmuştur ( $p < 0.0001$ ). ÜO ve ÜO-P gruplarında kontrol ve P gruplarına göre tübül dilatasyon daha fazla görülmüştür, (Tablo-3, Şekil-4,5). İnterstitial ödem gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulunmuştur ( $p < 0.0001$ ). ÜO-P grubunda tüm gruplara göre interstitial ödem daha fazla görülmüştür. Ayrıca ÜO grubunda P grubuna kıyasla interstitial ödem daha fazla görülmüştür (Tablo-3, Şekil-4,5). İnterstitial fibrozis gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulunmuştur ( $p < 0.0001$ ). ÜO ve ÜO-P gruplarında kontrol ve P gruplarına göre interstitial fibrozis daha fazla görülmüştür (Tablo-3, Şekil-4,5). Üreter obstrüksiyonu yapılan böbrek interstitial inflamasyon düzeyi gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulunmuştur ( $p < 0.0001$ ). ÜO ve ÜO-P gruplarında kontrol ve P gruplarına göre interstitial inflamasyon daha fazla görülmüştür, (Tablo-3, Şekil-4,5). Benzer şekilde; Üreter obstrüksiyonu yapılan böbrek tübül atrofi düzeyi gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulunmuştur ( $p < 0.0001$ ). ÜO ve ÜO-P gruplarında kontrol ve P gruplarına göre tübül atrofi daha fazla görülmüştür, (Tablo-3, Şekil-4,5). Üreter obstrüksiyonu yapılan böbrek glomerül skleroz (Global/Segmental), Bowman kapsül dilatasyon gruplar arasında benzer bulunmuştur (Tablo-3, Şekil-4,5).

**Tablo 3:** Üreter obstrüksiyonu yapılan böbrek dokusu histolojik değerlendirme [Ortalama  $\pm$  SH]

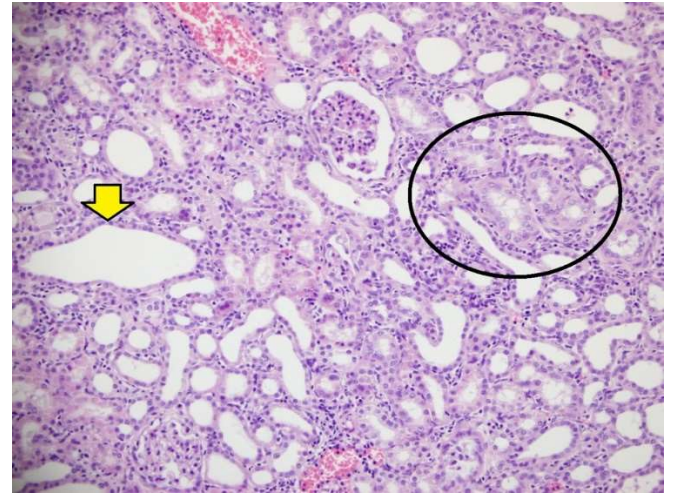
	Grup K (n=6)	Grup P (n=6)	Grup ÜO (n=6)	Grup ÜO-P (n=6)	p**
Tübül epitelinde dejenerasyon	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	2.67 $\pm$ 0.21*,&	2.83 $\pm$ 0.17*,&	<0.0001
Tübül epitelinde ödem	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	1.83 $\pm$ 0.40*,&	2.17 $\pm$ 0.40*,&	<0.0001
Tübül dilatasyon	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	3.00 $\pm$ 0.00*,&	3.00 $\pm$ 0.00*,&	<0.0001
İnterstitial ödem	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00*,&	1.33 $\pm$ 0.21*,&,+	<0.0001
İnterstitial fibrozis	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	1.67 $\pm$ 0.33*,&	1.67 $\pm$ 0.33*,&	<0.0001
İnterstitial inflamasyon	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	3.00 $\pm$ 0.00*,&	3.00 $\pm$ 0.00*,&	<0.0001
Glomerüller (Global/Segmental)	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	-
Bowman kapsül dilatasyon	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	-
Tübül atrofi	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	2.83 $\pm$ 0.17*,&	2.83 $\pm$ 0.17*,&	<0,0001

\*\* p<0.05: Kruskal-Wallis testi ile anlamlılık düzeyi

\* p<0.05: Grup K ile karşılaştırıldığında; & p<0.05: Grup P ile karşılaştırıldığında; + p<0.05: Grup ÜO ile karşılaştırıldığında



**Şekil 4:** Grup ÜOP, Tübül epitelinde ödem (uzun sarı ok), tübüler atrofi (uzun siyah ok), interstisyel inflamasyon (kısa sarı ok) ve interstisyel fibrozis (kısa siyah ok) şiddetli derecede izlenmektedir (H&Ex400)



**Şekil 5:** Grup ÜOP, Tübül lümenlerinde dilatasyon (sarı ok) ve tübül epitellerinde dejenerasyon sonrası rejenerasyonu düşündürülen nükleol belirginliği dikkati çekmektedir (oval şekil); H&Ex200

Gruplar serum MDA enzim aktivitesi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı ( $p<0.0001$ ). MDA enzim aktivitesi ÜO ve ÜO-P gruplarında K grubuna göre anlamlı yüksek olarak bulundu ( $p<0.0001$ ,  $p<0.0001$ , sırasıyla). Ayrıca, ÜO ve ÜOP gruplarında P grubuna göre anlamlı yüksek olarak bulundu ( $p<0.0001$ ,  $p<0.0001$ , sırasıyla). MDA enzim aktivitesi ÜO ve ÜO-P grubunda benzer olarak bulundu ( $p=0.119$ ) (Tablo-4). Gruplar serum NO enzim aktivitesi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı ( $p=0.003$ ). NO enzim aktivitesi ÜO ve ÜO-P gruplarında K grubuna göre anlamlı yüksek olarak bulundu ( $p=0.001$ ,  $p<0.0001$ , sırasıyla). Ayrıca, ÜO ve ÜO-P gruplarında P grubuna göre anlamlı yüksek olarak bulundu ( $p=0.004$ ,  $p<0.0001$ , sırasıyla). NO enzim aktivitesi ÜO ve ÜO-P grubunda benzer olarak bulundu ( $p=0.141$ ) (Tablo-4).

**Tablo 4.** Oksidatif stres durum parametreleri [Ortalama  $\pm$  SH]

	Grup K (n=6)	Grup P (n=6)	Grup ÜO (n=6)	Grup ÜO-P (n=6)	P**
Malondialdehid (MDA) (nmol/mL)	4.97 $\pm$ 0.86	8.02 $\pm$ 0.90	17.46 $\pm$ 1.02*,&	19.98 $\pm$ 1.43*,&	<0.0001
Nitrik oksit (NO) (umol/L)	15.08 $\pm$ 3.17	19.25 $\pm$ 3.47	40.08 $\pm$ 5.22*,&	51.92 $\pm$ 7.43*,&	<0.0001

\*\*  $p<0.05$ : Kruskal-Wallis testi ile anlamlılık düzeyi

\*  $p<0.05$ : Grup K ile karşılaştırıldığı; &  $p<0.05$ : Grup P ile karşılaştırıldığı

Gruplar serum Üre seviyesi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı ( $p<0.0001$ ). Serum üre seviyesi ÜO ve ÜOP gruplarında K grubuna göre anlamlı yüksek olarak bulundu ( $p<0.0001$ ,  $p<0.0001$ , sırasıyla). Ayrıca, ÜO ve ÜO-P grubunda P grubuna göre anlamlı yüksek olarak bulundu ( $p=0.012$ ,  $p=0.002$ , sırasıyla). Serum üre seviyesi ÜO ve ÜO-P grubunda benzer olarak bulundu ( $p=0.471$ ) (Tablo-5).

Gruplar serum kreatinin seviyesi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı ( $p=0.005$ ). Serum kreatinin seviyesi ÜO ve ÜO-P gruplarında K grubuna göre anlamlı yüksek olarak bulundu ( $p=0.010$ ,  $p=0.002$ , sırasıyla). Ayrıca, ÜO ve ÜO-P grubunda P grubuna göre anlamlı yüksek olarak bulundu ( $p=0.034$ ,  $p=0.008$ , sırasıyla). Serum kreatinin seviyesi ÜO ve ÜO-P grubunda benzer olarak bulundu ( $p=0.509$ ) (Tablo-5).

**Tablo 5.** Üreter obstrüksiyonu oluşturulan ratlarda Üre ve kreatinin değerleri [Ortalama  $\pm$  SH]

	Grup K (n=6)	Grup P (n=6)	Grup ÜO (n=6)	Grup ÜO-P (n=6)	P**
Üre (mg/dL)	31.46 $\pm$ 2.53	37.06 $\pm$ 2.48	51.44 $\pm$ 2.97*,&	54.80 $\pm$ 4.20*,&	<0.0001
Kreatinin (mg/dL)	0.39 $\pm$ 0.03	0.41 $\pm$ 0.03	0.66 $\pm$ 0.12*,&	0.87 $\pm$ 0.13*,&	0.002

\*\*  $p<0.05$ : Kruskal-Wallis testi ile anlamlılık düzeyi

\*  $p<0.05$ : Grup K ile karşılaştırıldığı; &  $p<0.05$ : Grup P ile karşılaştırıldığı

## TARTIŞMA

Tek taraflı üreteral obstrüksiyon (ÜO), kronik obstrüktif nefropatinin karmaşık patofizyolojisini hızlandırılmış şekilde taklit eden renal hasarın deneysel bir hayvan modelidir. Tıkanıklıktan kaynaklanan hidrostatik basınç, apoptoz ve nekroz ile tübüler hücre ölümünü tetikler (11).

Kronik obstrüktif nefropatide tübüler, interstisyel ve glomerüler hücreler için farklı hücre proliferasyonu ve apoptoz paternleri tanımlanmıştır. Hipoksi, iskemi, çeşitli sitokinler, büyüme faktörleri, reaktif oksijen türleri ve mekanik gerilme gibi birçok nedene bağlı olarak obstrüktif nefropatilerde apoptoz tetiklenebilir (12).

Sitoplazmada normalde inaktif formda bulunan kaspaz enzim ailesi (Kaspaz 1-9), aktif halde apoptoz sürecinde merkezi öneme sahiptir (13). Truong ve ark. ratlarda üreteral obstrüksiyon oluşturduklarında, etkilenmiş böbreklerde, kaspazların artmış olarak saptamışlar ve hem tübüler hem de interstisyel hücrelerin apoptozunu indüklediğini göstermişlerdir (14).

Biz de çalışmamızda literatüre paralel olarak kaspaz 3 enzim aktivitesini ÜO yapılan gruplarda artmış olarak saptadık. Kaspaz 8 enzim aktivitesi ise gruplar arasında benzerdi. Bu sonuçlar ışığında kaspaz 3 enziminin programlı bir hücre ölümü olan apoptoz sürecinde aktif rolü olduğu düşünülebilir.

Üreter obstrüksiyonu sonrasında meydana gelen intralüminal basınç artışı nedeniyle renal parankim hasarı ve fonksiyon kaybı olmaktadır. Bu süreçte artan reaktif oksijen ürünlerinin özellikle lipid ve protein oksidasyonuna neden olabileceği gösterilmiştir (15,16). Çalışmamızda lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA enzim aktivitesi ve üreter obstrüksiyonunda karmaşık rolü bulunan NO aktivitesi değerlendirilmiştir. Cırrık ve ark. yapmış oldukları çalışmada, tek taraflı parsiyel ve komplet obstrüksiyon oluşturdukları böbrek dokularında MDA enzim aktivitesini artmış olarak saptamışlar ve obstrüksiyon oluşturulan böbreklerde oksidatif stresin arttığını düşünmüşlerdir (17). Biz de çalışmamızda MDA enzim aktivitesini ÜO oluşturduğumuz gruplarda (ÜO ve ÜO-P) oluşturulmayan gruplara (Grup K ve P) göre anlamlı şekilde yüksek bulduk. Bunun yanı sıra obstrüksiyon yapıp pregabalin uygulanan ratlarla sadece obstrüksiyon yapılanlardaki MDA seviyesi benzerdi.

Bu bulgularla obstrüksiyon modelinde artan lipid peroksidasyonuna, pregabalinin ilave kötüleştirici bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

Nitrik oksitin üreter obstrüksiyonu prosesinde anti-apoptotik etkileri olmasına rağmen renal oksidatif streste etkisi karmaşıktır. Tübül epitelyal hücrelerdeki mekanik gerilme ile indüklenen apoptoz nonspesifik NO sentaz inhibitörleriyle agreeve olurken NO prekürsörü olan l-arginin ile de inhibe olduğu saptanmıştır (14, 18). Aynı zamanda NO' nun vazodilatör etkilerinden dolayı, üreter obstrüksiyonu sonrasındaki geç dönemde arttığı ve buna bağlı renal hemodinamik etkilerinin olduğu saptanmıştır (19). Çalışmamızda ÜO uygulanan gruplarda (ÜO ve ÜO-P) uygulanmayan gruplara (Grup K ve P) göre NO anlamlı şekilde yüksek bulundu. Literatüre uyumlu olarak ÜO oluşturulan ratlarda NO' nun geç dönem renal hemodinamik değişikliklere neden olduğunu düşünmekteyiz. Bunun yanı sıra obstrüksiyon yapıp pregabalin uygulanan ratlarla sadece obstrüksiyon yapılanlardaki NO seviyesi benzer saptandığı için pregabalin uygulamasının obstrüksiyonun tetiklediği renal apoptoz sürecini şiddetlendirmedeğini düşünmekteyiz.

Histopatolojik olarak, üreter obstrüksiyonuna bağlı olarak artan hidrostatik basınç apoptoz ve nekroz ile tübül hücre ölümünü tetikler. Işık mikroskopisinde interstisyel inflamatuvar infiltrasyon ve progresif renal parankim kaybı, miyofibroblast aktivasyonu ve hücre dışı matris birikimi ile birlikte fibrozis dikkati çekebilmektedir (11, 20, 21). Dursun ve ark. deneysel olarak üreter obstrüksiyonu oluşturdukları çalışmalarında histopatolojik olarak amorf hücre erupsyonları, hücresel şişme ve vakuolizasyon, glomerüllerde nötrofil hakimiyeti, tübül dilatasyon ve artmış vasküler konjesyon saptamışlardır (22). Literatürle benzer olarak çalışmamızda ÜO yapılan gruplarda (Grup ÜO ve ÜO-P) ÜO yapılmayan gruplarla kıyaslandığında tübül epiteline dejenerasyon, ödem ve dilatasyon; interstisyel ödem, fibrosis ve inflamasyon belirgin düzeyde yüksek oranda saptanmıştır. Üreter obstrüksiyonu ile meydana gelen kronik renal yetmezlik tablosunda tübül epiteli dejenerasyonu ve interstisyel fibrozisin tanısız anlamda yardımcı parametreler olabileceğini düşünmekteyiz.

Üreteral obstrüksiyon renal vazokonstrüksiyon nedeniyle böbrek kan akımında ve glomerüler filtrasyon hızında azalışa neden olmaktadır (10, 23). Çalışmamızda literatüre uyumlu olarak obstrüksiyon yapılan gruplarda serum kreatinin değerleri obstrüksiyon yapılmayan gruplara göre yüksek saptanmıştır. Bu artışın obstrüksiyona bağlı fonksiyonel azalışa işaret etmekte olduğunu düşünmekteyiz.

## SONUÇ

Tek taraflı üreter obstrüksiyonu oluşturulan ratlarda histopatolojik olarak meydana gelen fibrozis, tetiklenen apoptoz süreci ve artan oksidatif ürünler nedeniyle kronik renal fonksiyonel kayıp meydana gelmektedir. Günümüzde nöropatik ağrı tedavisinde sıklıkla kullanılmakta olan pregabalinin, deneysel olarak renal yetmezlik oluşturulan ratlarda meydana gelen hasarlanmayı artırmadığı saptanmıştır. Bulgularımızın geniş serili deneysel ve klinik araştırmalarla desteklenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

## Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

## KAYNAKLAR

1. Finnerup NB, Attal N, Haroutounian S, McNicol E, Baron R, Dworkin RH, et al. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* 2015;14:162-73.
2. Attal N, Lanteri-Minet M, Laurent B, Fermanian J, Bouhassira D. The specific disease burden of neuropathic pain: Results of a French nationwide survey. *Pain* 2011;152:2836-43.
3. Murnion BP. Neuropathic pain: current definition and review of drug treatment. *Aust Prescr* 2018;41:60-3
4. Attal N, Cruccu G, Baron R, Haanpaa M, Hansson P, Jensen TS, et al. EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. *Eur J Neurol* 2010;17:1113-23
5. Ben-Menachem E. Pregabalin pharmacology and its relevance to clinical practice. *Epilepsia* 2004;45:13-8
6. Uceroglu AC, Martin AB, Izquierdo MC, Sanchez-Nin M, Sanz AB, Ramos AM, et al. Unilateral ureteral obstruction: beyond obstruction. *Int Urol Nephrol* 2014;46:765-76
7. Kumar N, Laferriere A, Yu JS, Leavitt A, Coderre TJ. Evidence that pregabalin reduces neuropathic pain by inhibiting the spinal release of glutamate. *J Neurochem* 2010;113:552-61
8. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990;186:407-21
9. Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990;36:1440-3.
10. Güneş İ, Süngü N, Kılıçarslan A, Sıvın V, Alkan M, Küçük A, et al. Effects of hydroxyethyl starch 130/0.4 on the kidney tissue of rats with ureteral obstruction. *Drug Des Devel Ther* 2018;12:3061-70
11. Cachat F, Lange-Sperandio B, Chang A.Y, Kiley SC, Thornhill BA, Forbes MS, et al. Ureteral obstruction in neonatal mice elicits segment-specific tubular cell responses leading to nephron loss. *Kidney Int* 2003;63:564-75.
12. Klahr S, Morrissey J. Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;283:861-75
13. Choi YJ, Mendoza L, Rha SJ, Sheikh-Hamad D, Bara-nowska-Daca E, Nguyen V, et al. Role of p53-dependent activation of caspases in chronic obstructive uropathy: evidence from p53 null mutant mice. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:983-92
14. Truong LD, Choi YJ, Tsao CC, Ayala G, Sheikh-Hamad D, Nassar G, et al. Renal cell apoptosis in chronic obstructive uropathy: the roles of caspases. *Kidney Int* 2001;60:924-34
15. Manucha W. Biochemical-molecular markers in unilateral ureteral obstruction. *Biocell* 2007;31:1-12
16. Small DM, Coombes JS, Bennett N, Johnson DW, Gobe GC. Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease. *Nephrology (Carlton)* 2012;17:311-21
17. Cırrık S, Ayyıldız SN, Benli E, Ayyıldız A, Noyan T, Germiyanoglu RC, et al. Oxidative Stress Induced by Ureteral Obstruction and Tadalafil. *JAREM* 2017;7:11-15.
18. Dendooven A, Ishola DA Jr, Nguyen TQ, Van der Giezen DM, Kok RJ, Goldschmeding R, et al. Oxidative stress in obstructive nephropathy. *Int J Exp Pathol* 2011;92:202-10
19. Polat EC, Besiroglu H, Ozcan L, Otuncemur A, Erucar AT, Somay A, et al. Beneficial effects of oltipraz, nuclear factor-erythroid-2-related factor 2 (Nrf2), on renal damage in unilateral ureteral obstruction rat model. *Int Braz J Urol*. 2018;44: Ahead of print, (doi: 10.1590/S1677-5538.IBU.2018.0232)
20. Schreiner G, Harris K.P, Purkerson M.L, Klahr S. Immunological aspects of acute ureteral obstruction: immune cell infiltrate in the kidney. *Kidney Int* 1988;34:48-93.
21. Vaughan E.D. Jr, Marion D, Poppas D.P, Felsen D. (2004) Pathophysiology of unilateral ureteral obstruction: studies from Charlottesville to New York. *J Urol* 2004;172:2563-69
22. Dursun KA, Akyol İ, Karademir K, Baykal KV, Erden D. The role of free oxygen radicals in ureteral obstructions and the effects of verapamil and alfa-tocopherol for treatment. *Türk Üroloji Dergisi*. 2000;26:437-43.
23. Liu D, YING Liu Y, Xia Z, Dong H, Yi Z. Reactive oxygen species modulator 1 regulates oxidative stress and induces renal and pulmonary brosis in a unilateral ureteral obstruction rat model and in HK-2 cells. *Mol Med Rep* 2017;16:4855-62.