

**T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

**RATLARDA HİDROJEN GAZI İNHALASYONUNUN  
BÖBREK İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINA ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ  
Dr. EKREM AKDENİZ**

**Samsun/ 2011**

**T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

**RATLARDA HİDROJEN GAZI İNHALASYONUNUN  
BÖBREK İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINA ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ  
Dr. EKREM AKDENİZ**

**TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Y. KAMİL YAKUPOĞLU**

**Samsun/ 2011**

## TEŞEKKÜR VE DESTEKLEYEN KURULUŞ

Bizlere her konuda cesaret verip özgüvenimizi artıran ve kliniğimizde bir aile ortamı oluşturan bölüm başkanımız sayın Prof.Dr. Őaban Sarıkaya'ya,

Gerek asistanlığım süresince gerekse tez hazırlığım boyunca her zaman ve her konuda benden desteğini esirgemeyen değerli danıőman hocam Doç Dr. Y.Kamil Yakupoğlu'na,

Bana bilimsel çalışmanın önemini öğreterek, her türlü sıkıntıda bana yardımcı olan değerli ağabeyim Yrd. Doç.Dr. Ender Özden'e,

Asistanlığım süresince bilgi ve tecrübelerini bizlerle paylaőan değerli hocalarım Prof.Dr.A.Faik Yılmaz'a, Prof.Dr. Recep Büyükalpelli'ye, Prof.Dr.Ramazan Aőçı'ya ve Yrd.Doç.Dr. Yakup Bostancı'ya,

Tez hazırlama süresinde bana yardımcı olan patoloji bölümünden değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Bilge Can'a,

Bütün asistan ve çalışma arkadaşlarıma;

Asla yeterli vakit ayıramadığım eőim Sevda ve oğlum Kerem'e teőekkürü bir borç bilirim.

Bu tez Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından desteklenmiőtir.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa Numarası</u>
Teşekkür ve Destekleyen Kuruluş	I
İçindekiler	II
Tablo listesi	III
Şekil listesi	IV
Kısaltmalar	V-VI
Özet ve Anahtar Sözcükler	VII-VIII
Abstract and Keywords	IX-X
Giriş ve Amaç	1- 2
Genel Bilgiler	3-24
Gereç ve Yöntem	25-29
Bulgular	30-32
Tartışma	33-41
Sonuç ve Öneriler	42
Kaynaklar	43-57

## TABLO LİSTESİ

	<b><u>Sayfa No:</u></b>
<b>Tablo I:</b> Deney grupları ve rat sayıları	25
<b>Tablo II:</b> TİH bulgularının yaygınlığını yüzde alan şekilde ifade eden skarlama sistemi.	28

## ŞEKİL LİSTESİ

	<b><u>Sayfa No:</u></b>
<b>Şekil-1:</b> Nefronun elektron mikroskobundan görünümü	5
<b>Şekil-2:</b> İskemide erken fazdaki değişiklikler	9
<b>Şekil-3:</b> Hücrede SOR oluşum yolları	11
<b>Şekil 4:</b> Fenton Reaksiyonu	13
<b>Şekil 5:</b> Lökositlerin iskemik bölgeye göçü	16
<b>Şekil 6:</b> Hidrojen molekülünün kimyasal yapısı ve üç boyutlu görünümü	21
<b>Şekil 7:</b> Hidrojenin çeşitli hastalık modellerinde kullanımı	23
<b>Şekil 8:</b> Sol renal pedikül	26
<b>Şekil 9:</b> Sol renal pedikülün klemlenmesi	26
<b>Şekil 10:</b> Odacık ile H <sub>2</sub> uygulanması	27
<b>Şekil 11:</b> Yüz maskesi ile H <sub>2</sub> uygulanması	27
<b>Şekil 12:</b> Akut tübüler nekroz bulguları	28
<b>Şekil 13:</b> Gruplarda ortalama TİH skorları	30
<b>Şekil 14:</b> Erken dönem gruplar arasındaki TİH skorlarının karşılaştırılması	30
<b>Şekil 15:</b> Geç dönem gruplar arasındaki TİH skorlarının karşılaştırılması	31
<b>Şekil 16:</b> Erken dönem İ/R grupları ve kontrol grubunda histopatolojik görünüm	31
<b>Şekil 17:</b> Geç dönem İ/R gruplarında histopatolojik görünüm	32

## KISALTMALAR

<b>4-HNE:</b>	4-hidroksinonenal
<b>A :</b>	Arter
<b>A<sup>0</sup>:</b>	Angstrom
<b>ADH :</b>	Antidiüretik hormon
<b>ATP:</b>	Adenozin trifosfat
<b>Br:</b>	Brom
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	Kalsiyum
<b>CCl<sub>4</sub>:</b>	Karbon tetraklorür
<b>CCl<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>:</b>	Peroksil serbest radikali
<b>Cl:</b>	Klor
<b>Cm :</b>	Santimetre
<b>CO:</b>	Karbon monoksit
<b>DNA:</b>	Deoksiribo nükleik asit
<b>e<sup>-</sup> :</b>	Elektron
<b>ELAM-1:</b>	Endotelyal lökosit adezyon molekülü-1
<b>eNOS:</b>	Endotelyal Nitrik Oksit Sentetaz
<b>E-selektin:</b>	Endotel selektin
<b>ER :</b>	Endoplazmik retikulum
<b>FAD<sup>+</sup>:</b>	Flavin adenin dinükleotit
<b>Fe<sup>+2</sup> :</b>	Ferröz demir
<b>Fe<sup>+3</sup> :</b>	Ferrik demir
<b>Gr :</b>	Gram
<b>GMP-140:</b>	Granüle membran protein-140
<b>H<sub>2</sub> :</b>	Hidrojen
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> :</b>	Hidrojen peroksit
<b>HE :</b>	Hematoksilen&Eozin
<b>HOBr :</b>	Hipobromik asit
<b>HOCl :</b>	Hipoklorik asit
<b>HOI :</b>	Hipoyodür asit

<b>H<sub>2</sub>S :</b>	Hidrojen sülfür
<b>I :</b>	İyot
<b>iCAM-1:</b>	İntersellüler adezyon molekülü-1
<b>İL :</b>	İnter lökin
<b>iNOS :</b>	İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz
<b>İ/R :</b>	İskemi-reperfüzyon
<b>L 1-2:</b>	Lumbal vertebra 1-2
<b>LAM-1 :</b>	Lökosit adezyon molekülü-1
<b>LFA :</b>	Lenfosit fonksiyonuyla ilişkili antijen
<b>Mg :</b>	Magnezyum
<b>MgOH<sub>2</sub> :</b>	Magnezyum hidroksit
<b>m<sup>2</sup> :</b>	metrekare
<b>N. :</b>	Nerves
<b>Na-K-ATPaz:</b>	Sodyum-potasyum-ATPaz
<b>NAD :</b>	Nikotinamid adenin dinükleotid
<b>nNOS:</b>	Nöronal nitrik oksit sentetaz
<b>NO :</b>	Nitrik oksit
<b>NO<sub>2</sub> :</b>	Nitrojen dioksit
<b>NOS :</b>	Nitrik oksit sentetaz
<b>NSAİ İ:</b>	Nonsteroid anti-inflamatuar ilaçlar
<b>O<sub>2</sub> :</b>	Oksijen
<b>ONOO<sup>-</sup> :</b>	Peroksinitrit
<b>PAS :</b>	Periodic Acid-Schiff
<b>P-selektin :</b>	Platelet selektin
<b>s (ICAM):</b>	Soluble intersellüler adezyon molekülü
<b>SOR :</b>	Serbest oksijen radikalleri
<b>T :</b>	Torakal vertebra
<b>TİH :</b>	Tübülointersitisyel hasar
<b>TNF-α :</b>	Tümör nekroz faktör-alfa
<b>V. :</b>	Ven



## ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER

İskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarı parsiyel nefrektomi veya böbrek nakli gibi böbreğin belli bir süre iskemik kaldığı durumlarda böbrek ve hasta sağkalımını etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Serbest radikaller, böbreklerde ve diğer organlarda gelişen iskemi/reperfüzyon hasarının patofizyolojisinde önemli rol oynarlar. Hidrojen gazı kuvvetli bir antioksidan olup, serbest oksijen radikallerinin oluşumunu engelleyici etkisi vardır. Hidrojen gazının koruyucu etkisi farklı iskemi reperfüzyon hücre ve doku modelleriyle gösterilmiştir. Ancak hidrojen gazının renal İ/R hasarı etkileri üzerine yayınlanmış bir çalışma yoktur. Bu deneysel çalışma, renal iskemi reperfüzyon hasarında, hidrojen gazının böbrek dokusundaki koruyucu etkisini araştırmak amacıyla planlanmıştır.

Çalışmada 30 adet rat kullanılmıştır. Ratlar kontrol grubu (Grup 1), İ/R grubu (Grup 2) ve İ/R+H<sub>2</sub> gazı grubu (Grup 3) olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Grup 2 ve Grup 3; erken dönem ve geç dönem olmak üzere 2 alt gruba ayrılmıştır. Ratlara orta hat laparotomi uygulandıktan sonra, kontrol grubundaki deneklere hiçbir işlem yapılmaksızın nefrektomi yapılırken, çalışma grubundaki ratlarda ise renal pedikül çevre dokulardan diseke edilerek 45 dakika tam oklüzyona uğratılmış ve reperfüze edilmiştir. Erken dönem grupları reperfüzyonun 6. saatinde; geç dönem grupları reperfüzyonun 14. gününde sol nefrektomi sonrasında sakrifiye edildiler. Grup 3'teki ratlara preoperatif dönemde 60 dakika, işlem sırasında ve postoperatif dönemde 60 dakika olmak üzere ortalama 181.1±3.6 dk (175-185 dk) hidrojen gazı inhalasyonu uygulanmıştır. Böbrekte gelişen İ/R hasarının erken döneminde ve geç döneminde, hidrojen gazının etkileri hematoksilin&eoizin (HE) ve periodic acid-schiff (PAS) yöntemiyle histopatolojik olarak değerlendirilmiştir.

Histopatolojik değerlendirmede erken dönem gruplarda; tübül epitellerinde fırçamsı-kenar kaybı, lüminal yüzeyde sitoplazmik yoğunlaşma ve ayrılmalar, basıklaşma, nadiren bazal membrandan ayrılma, lüminal dilatasyon ve hyalen silendirler mevcuttu. Geç dönem İ/R grubunda belirgin tübüler atrofi ve interstisyel fibrozis izlenmedi. Ancak tübül epitellerinde belirgin olarak rejenerasyon bulguları ve basıklaşma vardı. İnterstisyumda odaksal inflamasyon mevcuttu. Grup 3'ün erken ve geç dönem alt gruplarında bu değişiklikler daha hafif derecede izlenmiştir (p=0.006).

Bu deneysel çalışmada, hidrojen gazının renal İ/R hasarında histopatolojik olarak doku koruyucu bir etkisi olabileceği düşünölmüştür.

**Anahtar Sözcükler:** Böbrek, İskemi-reperfüzyon, Hidrojen gazı, Histopatolojik değişiklikler

## **ABSTRACT AND KEYWORDS**

Ischemia / reperfusion (I/R) injury is an important factor affecting the kidney and patient survival in situations such as partial nephrectomy or renal transplant where the kidneys remain ischemic for a certain period of time. Free radicals play an important role in the pathophysiology of ischemia/reperfusion injury on kidneys and other organs. Hydrogen gas is a strong antioxidant which has the effect of blocking the formation of free oxygen radicals. The protective effect of hydrogen gas from ischemia reperfusion injury has been shown in different cell and tissue models. However, no studies on the protective effect of hydrogen gas from renal I/R injury have been published. This experimental study was designed to investigate the protective effect of hydrogen gas on kidneys from I/R injury.

Thirty rats were divided into 3 groups; including control group (Group 1), I/R group (Group 2) and I/R+H<sub>2</sub> gas group (Group 3). Group 2 and Group 3 were further divided into early and late-term sub-groups. Following a midline laparotomy, a nephrectomy was performed in the control group without any extra intervention. However the left renal pedicles were dissected from surrounding tissues and fully occluded for 45 minutes and reperused in the study groups. Nephrectomies were performed six hours and fourteen days after reperfusion in the early and late-term groups respectively and then the rats were sacrificed. Rats in Group 3 were subjected to inhale hydrogen gas starting 60 minutes prior to procedure which was also maintained during and an extra 60 minutes after surgery. The mean hydrogen gas inhalation time was 181.1±3.6 min (175-185 min). The effect of hydrogen gas on ischemia-reperfusion injury developing in kidneys in the early and late periods was evaluated with methods of hematoxylin and eosin (H&E) and periodic acid schiff (PAS) histopathologically.

Histopathologic evaluation of the early-term I/R groups revealed the loss of brush border in tubular epithelial cells with cytoplasmic condensation and separations in luminal surface, accompanied by flattened epithelial cells and rare detachment of tubular epithelial cells from the basement membrane with luminal dilatation and hyaline casts. Late-term I/R group showed no significant tubular atrophy and interstitial fibrosis. However, there were signs of regeneration and flattening of tubular epithelium

significantly. Also areas of focal inflammation were observed in interstitium. Those changes were milder in the subgroups of Group3 ( $p=0.006$ ).

Hydrogen gas showed a protective effects on renal tissue in I/R injury as histopathologically.

**Keywords:** Kidney, Ischemia-reperfusion, Hydrogen gas, Histopathological changes

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Doğadaki en basit atom yapısına sahip olan hidrojenin çekirdeğinde bir proton ve orbitalinde bir elektron bulunur. Hidrojen evrenin temel elementidir ve evrende % 70' den fazla hidrojen bulunmaktadır. Evrende bu kadar çok olan hidrojenin atmosferdeki oranı ise milyonda birden azdır (1).

İskemi reperfüzyon hasarı sonucu hızla enerji tüketimi, toksik metabolitlerin birikimi, elektrolit hemostazında bozulma, serbest oksijen radikallerinin ortaya çıkması ve bunun sonucunda DNA hasarı lipid peroksidasyonu, protein hasarı ve inaktivasyonu görülür (2). Böbrek iskemisi; böbrek nakli, parsiyel nefrektomi, kardiyopulmoner bypass, şok, sepsis, çeşitli ürolojik girişimler gibi klinik durumlarda görülür. Transplantasyonda da iskemi reperfüzyon hasarı sonucu böbrekte primer fonksiyon kaybı, gecikmiş greft fonksiyonu, artmış akut rejeksiyon, geç dönemde allogreftte fonksiyon bozukluğu ortaya çıkabilir (3).

Hidroksil radikali ( $\text{OH}^\cdot$ ) reaktif oksijen radikallerinin en güçlüsüdür (4,5). İnvitro çalışmalarda,  $\text{OH}^\cdot$  radikalinin hücre hasarından sorumlu temel reaktif oksijen radikali olduğu bulunmuştur (6,7). Süperoksit radikali ( $\text{O}_2^\cdot$ ) süperoksit dismutaz ile endojen olarak detoksifiye edilir (8).  $\text{OH}^\cdot$  iyonunun ise vücutta nasıl bir detoksifikasyon mekanizması olduğu bilinmemektedir (9,10). Hidrojen gazının in vitro çalışmalarda  $\text{OH}^\cdot$  iyonunu azaltarak hücreyi İ/R hasarından koruduğu bulunmuştur (10).

Son yıllarda hidrojen ve hidrojen gazının iskemi reperfüzyon hasarına etkisi üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır (11). Ancak hidrojen gazının deneysel böbrek iskemi reperfüzyon modelindeki rolü üzerine ise bugüne kadar herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmada; deneysel böbrek iskemi reperfüzyon modelinde hidrojen gazının olası koruyucu etkileri, histolojik yöntemler kullanılarak araştırmak amaçlanmıştır. En güçlü serbest oksijen radikali olan  $\text{OH}^\cdot$  radikalini spesifik olarak azaltan hidrojen gazının iskemi reperfüzyon hasarını da belirgin olarak azaltacağı varsayılmıştır (10).

Çalışmamızda; hidrojen gazının böbrek İ/R hasarında reperfüzyonun altıncı saatinde ve ondördüncü gününde doku koruyucu etkileri araştırılmıştır.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. Böbreklerin Anatomisi

Böbrekler çift organlar olup, karın boşluğunun üst ve arka tarafında, retroperitoneal aralıkta, columna vertebralis'in iki yanında yer alırlar. Üst uçları 12. torakal vertebra, alt uçları ise 3. lumbal vertebra seviyesinde bulunur. Karın boşluğunun sağ üst kısmında karaciğerin bulunması nedeniyle, sağ böbrek sol böbreğe oranla biraz daha aşağıda bulunur. Fakat üst uçları birbirine daha yakındır. Her bir böbrek yaklaşık 12 –13 cm uzunluğunda, 5–7 cm genişliğinde ve 2,5 cm kalınlığındadır. Ağırlığı erişkin erkeklerde, 125 gr ile 170 gr, kadınlarda ise 115 gr ile 155 gr arası kadardır (12-13).

L1 –L2 omurlar seviyesinde aortadan çıkan A. renalislerden beslenirler. A. renalisler hilum renaleye gelince 5 segmental dala ayrılır. A.segmentalis denilen bu dallar sinus renaliste tekrar dallarına ayrılır. A. interlobaris denilen bu dallar kortikomedullar birleşim yerine kadar ilerler ve yan tarafa kıvrılarak A. arcuatayı yaparlar. A. arcuatalar birbirleriyle anastomoz yapmazlar. A.arcuatalardan dik olarak kortekse giren dallara A. interlobularis denir. A.interlobularisden çıkan dalcıklara arteriola glomerularis afferens adını alır. Bunlar bowman kapsülünün damar kutbundan girerek rete capillare glomerulare denilen kapiller yumağını oluştururlar. Bu kapiller yumak tekrar birleşerek arteriola glomerularis efferensi oluşturur. İlk önce V. interlobularisler oluşur, sonra sırasıyla V. arcuata, V. interlobaris, V. segmentalis ve sonuçta V. renalis olarak V. cava inferiora açılırlar.

Böbreklerin sempatik lifleri T 10-12 ve L1 segmentlerden gelirler. Sempatikler N.splanchnicus minor içinde seyreder. Parasempatik innervasyonunu N.vagustan alırlar. Duyu lifleri hem sempatikler hem de parasempatikler tarafından taşınır (14).

Böbreği içten dışa doğru capsula fibrosa, capsula adiposa ve fascia renalis olmak üzere üç kılıf sarar.

**Capsula fibrosa:** Böbreği saran ince fakat sağlam bu fibröz kılıf, böbreğe parlak bir görüntü verir.

**Capsula adiposa (perirenal yağ tabakası):** Capsula fibrosa'yı saran zengin yağdokusudur. Bu yağ tabakasının kalınlığı kişinin şişmanlık durumuna bağlı olarak değişir.

**Fascia renalis (Gerato fasyası) :** Karın duvarındaki fasya subserosa'nın capsula adiposa'yı glandula suprarenalisle birlikte dıştan saran bölümüne fasya renalis denilir (13, 14).

### **2.1.1 Böbreklerin Yapısı**

Böbrek vertikal kesi ile kesilirse açık renkli olan dış kısmına cortex renalis, koyu renkli ve çizgili görünümlü iç kısmına medulla renalis denilir. Orta kısmında bulunan ve hilum renaleye açılan boşluk ise sinus renalis adını alır.

**Medulla renalis:** Medulla renalis, malpighi piramitleri (pyramis renalis) denilen 8-10 adet (bazen 18-20) koni şeklindeki yapı oluşturur. Bu piramitlerin basis pyramidis denilen taban kısımları böbreğin dış yüzüne, papilla renalis denilen tepe kısımları ise sinus renalise yönelmiştir. Pyramis renalisler birbirlerine değmeyecek şekilde sinus renalis etrafında dizilmişlerdir.

**Cortex renalis:** Papillalar hariç olmak üzere, pyramis renalislerin her tarafını saran böbrek dokusudur. Sinus renalise kadar uzanan bu ikinci bölüm, kesitlerde pyramis renalisler arasında bir sütun sekinde görülürler. Bunlara columnae renalis denilir.

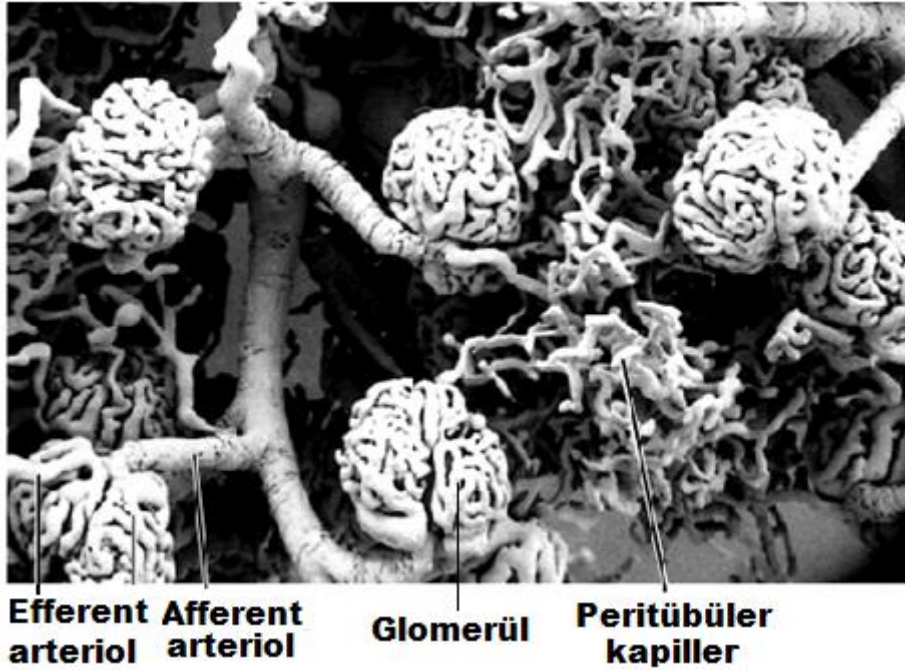
**Sinus renalis:** Hilum renale böbrek içinde bir boşlukla devam eder ve böbrek şeklinde olan bu boşluğa, sinus renalis denilir. Sinus renalisde pelvis renalisin üst bölümü, calices renales, böbrek damarları (A. segmentalisler) ve bunlar arasındaki boşlukta da yağ dokusu bulunur (13,17).



## 2.2 Böbreğin Fonksiyonel Fizyolojisi

Böbrekte idrar oluşumunu sağlayan en küçük yapısal ve anatomik birim nefrondur (şekil -1). Böbrekte, her birinin idrar yapabilme fonksiyonu olan yaklaşık bir milyon nefron bulunur ve bu sayı doğumdan sonra sabit kalır. Dolayısıyla renal bir hasar, hastalık veya normal yaşlanma ile nefron sayısında kademeli bir azalma olur. Nefronun iki kısmı vardır:

- 1) Glomerül; sıvının kandan filtre edildiği kısımdır.
- 2) Tübülüsler; filtre edilen sıvının idrara dönüştüğü proksimal tübülüs, distal tübülüs, Henle kulpu ve toplayıcı kanallardan oluşan kısımdır (18).



Şekil-1:Nefronun elektron mikroskobundan görünümü ( Tissues and Organs: A Text Atlas of Scanning Electron Microscopy 1979)

Glomerül, epitelyum bir yapı içinde (Bowman kapsülü) çevrenmiş olan afferent ve efferent arterioller arasında asılı kapiller bir ağdır. Kapiler damarlar yumaklar şeklinde dizilir. Glomerülün orta kısmında mezengiyal matriksi çevreleyen mezengiyal hücreler bulunur. Glomerülün diğer içerikleri endotel, glomerüler bazal membran ve epitel hücreleridir. Endotel hücreleri kapiller lümeni çevreler ve gözenekli

bir yapı oluşturur. Endotel hücreleri negatif yüklüdür ve filtrasyon bariyerinin yük seçici özelliklerinden sorumludur. Glomerül endotel hücreleri glomerül fizyopatolojisinde önemli bir rol oynar. Glomerül bazal membran tip IV, tip V kollajen lifler içeren glikoproteinden oluşan hidrate jel tabakasıdır. Orta kısmındaki yoğun tabaka olan lamina densa ve iki dış tabaka lamina rara internadan oluşur. Kalınlığı 315 – 373 nanometre arasında değişir. Glomerüller bazal membran gözenek büyüklüğü ve negatif yükü sebebiyle bir süzme bariyeri olarak işlev görür. Belli bir molekül büyüklüğündeki negatif yüklü parçacıklar pozitif yüklü olanlara göre daha zor süzülürler. Glomerül bazal membrandaki en büyük gözenek çapı 80 angstrom ( $A^0$ ) olduğu halde 60  $A^0$  çapındaki albümin negatif yüklü olması sebebiyle bu engeli aşamaz. Viseral epitel hücreleri, ya da podositler glomerüllerdeki en büyük hücrelerdir. Glomerüller bazal membranın üzerine ayakları çıkıntılar uzatır. Negatif yükleriyle süzme bariyerine katkıda bulunur. Parietal epitel hücreleri Bowman kapsülünün dış kısmını oluşturur. Bowman kapsülünde asılı duran glomerül kümeleri mukopolisakkarit ve glikoprotein yapısındaki mesengial destek yapı içerisinde bulunurlar. Mesengial hücrelerde bulunan aktin ve miyosin yapıları mesengial hücrelere kasılma özelliği sağlar. Mesengial hücre kasılması süzme yüzey büyüklüğünü değiştirip glomerüller süzme oranını azaltır. Mesengial hücrelerde antidiüretik hormon (ADH) ve anjiyotensin II (AII) gibi vazokonstriktör hormonların reseptörleri vardır. Bu hormonlar mesengial hücre kasılmasıyla glomerüller süzme oranını değiştirir. Mesengial hücrelerin bir diğer görevi kollajen ve glikoproteinden oluşan hücre dışı matriksi üretmek ve yeniden şekillendirmektir. Bu süreç glomerüller bazal membranın kalınlaşmasına neden olur. Özellikle diyabet gibi çeşitli glomerüller hastalıklarının patolojisinde önemli rol oynar. Mesengial hücrelerin fagositik özellikleri de vardır.

Glomerül kapsülü süzülen ultrafiltratı renal tübüle yönlendirir. Proksimal tübül glomerülün idrar ucundan başlar. Proksimal tübül iki kısımdan oluşur. Tübülün ilk kısmını korteks içinde konumlanan proksimal kıvrımlı tübül oluşturur. İkinci segment olan proksimal düz tübül medüllaya girer ve sıvıyı henle kulbuna geçirir. Kulp medulla içinde bir U kıvrımı yaparak yeniden kortekse yönelir ve distal tübülü oluşturur. Distal tübül, Henle kulbunun çıkan kalın kolu ve distal konvüle tübül olmak üzere iki kısımdan oluşmuştur. Tübül yeniden medulla içerisine girer ve toplayıcı kanala dönüşür. Renal papillaların uçlarındaki Bellini kanallarından renal pelvise dökülür.

Distal tblsn başlangıcı her nefronda afferent arteriyoln son kısmıyla ve efferent arteriyoln başlangıç kısmıyla temas halindedir. Bu bölgedeki tübül hücreleri sayıca daha fazla ve daha uzundur. Distal tübülün bu kısmına maküla densa adı verilir. Maküla densa ve damarsal yapılara jukstaglomerüler apparatus denilir. Bu yapı renin üretir ve glomerül ile tübül fonksiyonlarında önemli rolü vardır.

Kalp debisinin yaklaşık % 20'si böbreklerden geçer ve bu oran 1200 mililitre/dakika kan akımına ya da 600 ml/dk'lık renal plazma akımına eşittir. Glomerül filtrasyon sıvısı yarı geçirgen kapiller duvardan dışa doğru yönlendiren net basıncın bir sonucudur. Hidrostatik basıncı ve plazma onkotik basıncı sıvının kapiller duvardan geçmesini sağlar. Normal glomerül filtrasyon hızı 100 - 120 ml/dk/1,73 m<sup>2</sup> olup günde 150 - 250 litre ultrafiltrat oluşur. Bunun büyük bir kısmı (% 98 - 99) filtrasyondan sonra yeniden emilir.

Proksimal tblsn ana işlevi ultrafiltratın kütlesel izoozmotik emilimidir. Glomerüler filtratta en fazla bulunan bileşik sodyumdur ve proksimal tübülde oluşan taşınma işlemlerinin çoğu sodyumla ilişkilidir. Sodyum, Na-K-ATPaz pompası ile taşınır. Kalsiyum, glukoz ve aminoasitlerin emilimi sodyum emilimi ile paralel bir taşınma ile olur. Filtre edilen bikarbonatın önemli bir kısmı hidrojen iyonlarının katıldığı ters taşınma mekanizmasıyla taşınır. Potasyumun büyük çoğunluğu bu kısımda geri emilir. Solt maddelerin emilimi ile su kendiliğinden peritübüler boşluğa geçer.

Henle kulpu kortikomedüller kavşakta ince inen kol olarak başlar bir U dönüşü yapar ve ince çıkan kola dönüşür; sonra dış medullada çıkan kalın kol olur ve maküla densada sonlanır. Henle kulbunun her segmenti sodyum klorür ve suya karşı farklı geçirgenliğe sahiptir. İzoozmotik ultrafiltrat volümünün yaklaşık % 15'i, sodyum klorürün ise yaklaşık % 25'i emilir. Bu farklı emilim ile proksimal tübülden gelen izotonik sıvı distal tübüle seyrelmiş olarak gider. Kalsiyumun büyük kısmı Henle kulpunda emilir. Kalın çıkan kolun medulla kısmı, paratroid hormon kontrolü altında değilken kalın çıkan kolun korteks kısmı paratroid hormon kontrolü altındadır. Henle kulbunun kalın çıkan kolu magnezyumun geri emilimi için ana bölgedir.

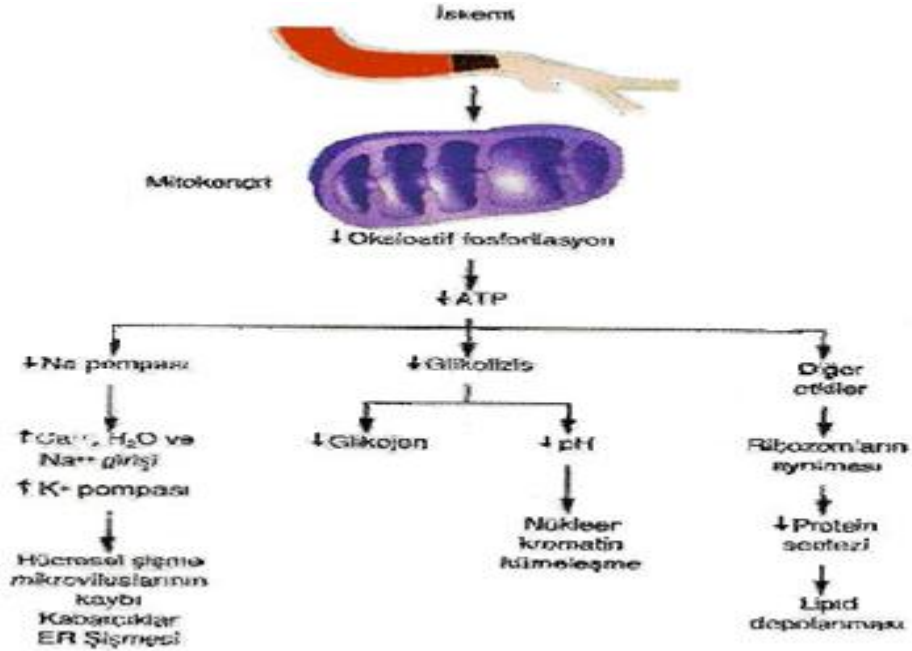
Distal kıvrımlı tübül sodyum klorürün aktif emilimini sağlayan ve suya geçirgen olmayan korteks içi bir yapıdır. Kortikal toplayıcı kanal mineralokortikoidlere duyarlı

bir mekanizma ile sodyumun geri emilimini sağlar. Volüm eksikliği tablolarında ve aşırı aldosteron üretiminde idrar sodyumdan arındırılabilir. Potasyum sekresyonu distal tübülün son kısmında başlar ve toplayıcı kanal boyunca devam eder. Ultrafiltrata süzülen potasyum proksimal tübülsten neredeyse tamamı geri emildiği için idrarda çıkan potasyum distal kısımlardan salınır. Distal nefronda proton sekresyonu bu segmentlerde bulunan bikarbonatın emilmesini sağlar. Salınan proton fosfat ile tamponlanır ya da amonyum iyonları şeklinde atılır. Toplayıcı kanallar ADH'ın başlıca etkilediği yerlerdir. Bunlar ADH yokluğunda suya karşı çok az geçirgendir ve ADH olmadan distal tübülden çıkan hipotonik sıvı hiçbir değişime uğramadan idrara verilebilir. Prostaglandinler toplayıcı kanalda ADH etkisini blokajı dahil birçok mekanizmayla distal su geri emilimini bozar. Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar prostaglandinleri bloke ederek renal su atımını bozarlar.

Böbreklerin idrar oluşumunun yanı sıra; suyun regülasyonu, vücut asit-baz ve elektrolit dengesinin sağlanması, toksik atıkların atılması, kan basıncının düzenlenmesi, hormon metabolizması ve glukoz metabolizması üzerine hemostatik işlevleri vardır. Böbrek vücuda alınan fazla sıvı ve solüt maddelerin eliminasyonundan sorumludur. Vücuttaki tüm elektrolitlerin dengesi böbrek tarafından yapılır. Tübüler sodyum, klor emilimi ile su volümü ve ozmolar denge; tübüler potasyum sekresyonu ile potasyum konsantrasyonu; tübüler proton sekresyonu ile asit-baz dengesi; tübüler kalsiyum, magnezyum ve fosfat transportu ile bu elektrolitlerin dengesi sağlanır. Üre, kreatinin gibi atık maddeler glomerüler filtrasyon; üre, laktat ve bazı ilaçlar (diüretikler) tübüler sekresyon yoluyla vücuttan uzaklaştırılır. Hipofiz hormonlarının çoğu ve insülin, glukagon gibi peptid hormonlar glomerüler filtrasyonu takiben böbrekte katabolizmaları gerçekleşir. Böbrek sodyum atılımındaki değişiklikler ile hücre dışı volüme etki ederek ve renin salınımıyla vasküler dirence etki ederek kan basıncını düzenler. Renin üretimi jukstaglomerüler hücrelerde, eritropoetin üretimi böbreğin korteks hücrelerinde yapılır ve D vitamini aktivasyonu böbrekte gerçekleşir. Böbrek uzun süren açlıkta, glukoneogenez yoluyla plazma glukozunun regülasyonunda da rol oynar (19,20).

### 2.3. İskemi Reperfüzyon Hasarının Fizyopatolojisi

Herhangi bir nedenden dolayı dokuların yeterli arteriyel kan temin edememesi haline iske mi; iskemik kalan dokunun yeniden kanlanmasına reperfüzyon denir (22). Ancak reperfüzyonun gerçekleşmesi, iskemik dokularda iskeminin dokuda oluşturduğu hasardan daha fazla hasara yol açmaktadır. İske mi ve reperfüzyon periotlarından oluşan bu zararlı etkilerin tümü İ/R hasarı olarak adlandırılmaktadır (23). Temel başlatıcı patoloji iske mi fazı olmakla birlikte dokuda asıl reperfüzyon fazı inflamasyona yol açar (24). İske mi ile oluşan O<sub>2</sub> yetersizliği sonucu anaerobik metabolizma devreye girer. Hücrelerde laktik asit ve toksik metabolitlerin birikimi ile sonuçlanır. Asidoz nedeniyle enzim kinetiği değişir ve hücre kendisi için gerekli enerjiden yoksun kalır (4, 15, 16). Kalsiyum iyon dengesi bozulur ve Ca<sup>+2</sup> stoplazmada birikir. Na-K-ATPaz pompasının fonksiyonu azalır. Sodyum hücre içine girerken potasyum hücre dışına çıkar. Suyun sodyumla beraber hücre içine girmesiyle akut hücre sel şişme gözlenir. Bu olaylar sonucunda sırasıyla mitokondrial hasar, lizozomlarda şişme, endoplazmik retikulumun dilatasyonu, enzim ve protein kaybı, hücre sel kompartmanların bozulması ve otoliz meydana gelir (şekil-2). Bunu asidoz ve ozmotik şok gibi klinik bulgular ile kromatin kümeleşmesi ve piknozis gibi histolojik bulgular takip eder (4, 15, 16, 25).



Şekil-2: İskemide erken fazdaki değişiklikler (Robin's Temel Patoloji 2008)

Reperfüzyon fazı iskemik hasarın iyileşmesi için ön koşuldur. Ancak reperfüzyon fazı paradoksal olarak dokularda daha fazla hasara yol açan bir dizi metabolik etkiye yol açar (26,27). İ/R hasarı fizyopatolojisi tam açıklanamamış, kompleks, birbiriyle ilişkileri karmaşık hücresel ve hümoral olaylar dizisidir. Burada serbest radikaller, kompleman, endotel, sitokinler ve lökositler bu olaylar dizisinde etkilidir (27-29).

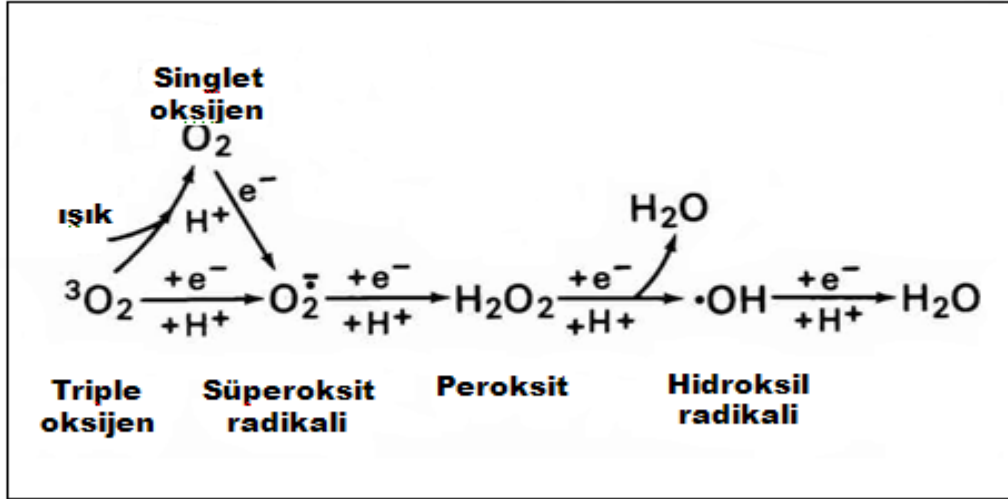
### **2.3.1 Serbest Radikaller**

Bir atom ya da molekülün yapısındaki elektronlar çekirdek etrafında orbital adı verilen uzaysal bölgede çiftler halinde bulunurlar. En dış yörüngede tek sayıda elektron ( $e^-$ ) içeren atom ya da moleküle serbest radikal adı verilir. Serbest radikaller pozitif yüklü (katyon), negatif yüklü (anyon) veya nötr olabilirler. Serbest radikaller yapısına göre oksijen merkezli olanlar, karbon merkezli olanlar, sülfür merkezli olanlar, azot merkezli olanlar, hidrojen merkezli olanlar ve demir merkezli olanlar olarak gruplandırılır. Biyolojik sistemde en önemli serbest radikaller oksijen merkezli olanlar olsa da reaktif nitrit türevleri de İ/R hasarında önemlidir (30,31). Serbest oksijen radikalleri moleküler oksijenden türemiş olan atom ya da atom gruplarıdır. Oksijenin iki elektronu eşleşmemiştir. Bu yüzden oksijen diradikal olarak değerlendirilebilir. Oksijenin bu özelliği onun diğer radikallerle kolayca tepkimeye girmesini sağlar.

Serbest radikaller hücrelerdeki biyomoleküller ile tepkimeye girerek onların yapısını bozar. Lipitler serbest radikallere karşı en hassas biyomoleküllerdir. Membranlardaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluşturur. Serbest radikallerin sebep olduğu lipit peroksidasyonuna non enzimatik lipit peroksidasyonu denir (28,32). Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, histidin gibi aminoasitler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenir. Proteinlerin yapısı bozulur ve fonksiyonlarını yerine getiremez. Özellikle oksihemoglobin, süperoksit radikali veya hidrojen peroksitle reaksiyonu sonucu methemoglobin oluşumuna neden olur (27,28). Serbest radikaller hücredeki deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girerek DNA'da mutasyon ve kırılmalara yol açar (27,28).

### 2.3.1.1 Serbest Oksijen Radikalleri

Moleküler oksijen ( $O_2$ ) iki ortaklanmamış elektrona sahiptir. Moleküler oksijenin biradikal doğasının sonucu olarak yüksek derecede reaktif oksijen türevleri oluşturma eğilimindedir (şekil-3).

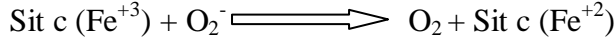


Şekil 3: Hücrede SOR oluşum yolları (Physiological Chemistry and Physics and Medical NMR 1984)

Serbest oksijen radikalleri; süperoksit radikali ( $O_2^-$ ), hidroksil radikali ( $\cdot OH$ ), alkoksil radikali ( $LO^\cdot$ ), peroksil radikali ( $LOO^\cdot$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), lipid hidroperoksit ( $LOOH$ ), hipoklorik asit ( $HOCL$ ), singlet oksijen ( $O_2$ ) ve peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) den oluşur (33, 34).

**Süperoksit radikali ( $O_2^-$ ):** Moleküler oksijenin bir  $e^-$  olarak indirgenmesi sonucu oluşur. İskemi sırasında, hücre içinde biriken hipoksantin, ksantin oksidaz enzimi ile ksantine dönüşür. Ksantin oluşumu sırasında oksijenin indirgenmesi ile süperoksit radikalleri oluşur (35). Süperoksit radikalının kendisi direkt zarar vermez. Bu radikal anyonun önemi hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır (36, 37). Süperoksit radikali hem indirgeyici hem oksitleyici özelliğe sahiptir.

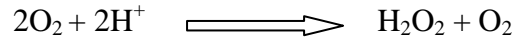
Ferrisitokrom -c ile reaksiyona girerek indirgeyici olarak davranır ve bir  $e^-$  kaybederek moleküler oksijene okside olur.



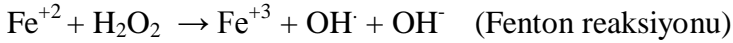
Süperoksit radikali epinefrinin oksidasyonunda oksidan olarak davranarak bir e<sup>-</sup> alır ve hidrojen peroksite indirgenir.

Süperoksit radikalının nitrit oksit (NO<sup>-</sup>) radikali ile birleşmesi sonucu reaktif oksijen türü olan peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>) meydana gelir. Peroksinitrit, nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) ve nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) oluşturmak üzere metabolize edilir. Peroksinitrit; azot dioksit (NO<sub>2</sub>), hidroksil radikali (OH<sup>-</sup>) ve nitronyum iyonu (NO<sub>2</sub><sup>+</sup>) gibi toksik ürünlere dönüşebilir (32, 37, 38).

**Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):** Hidrojen peroksit serbest bir radikal olmadığı halde reaktif oksijen radikali kapsamına girer. Biyolojik önemi OH<sup>-</sup> radikali için kaynak oluşturmasıdır. Hidrojen peroksit lipofilik yapıya sahip olduğu için hücre zarından çok çabuk geçer. İki süperoksit molekülü süperoksidan dismutasyonu reaksiyonunda iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijen oluştururlar. Bu reaksiyon süperoksit dismutaz enzimi tarafından katalizlenir.



**Hidroksil radikali (OH<sup>-</sup>):** Hidroksil radikali Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır. Fe<sup>+2</sup> veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu sonucu, süperoksit radikalının (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif serbest oksijen radikali olan OH<sup>-</sup> radikali oluşur (şekil-4). Fenton reaksiyonunun hızı ortalama 4000 kat daha fazladır (39,40) (şekil-4).

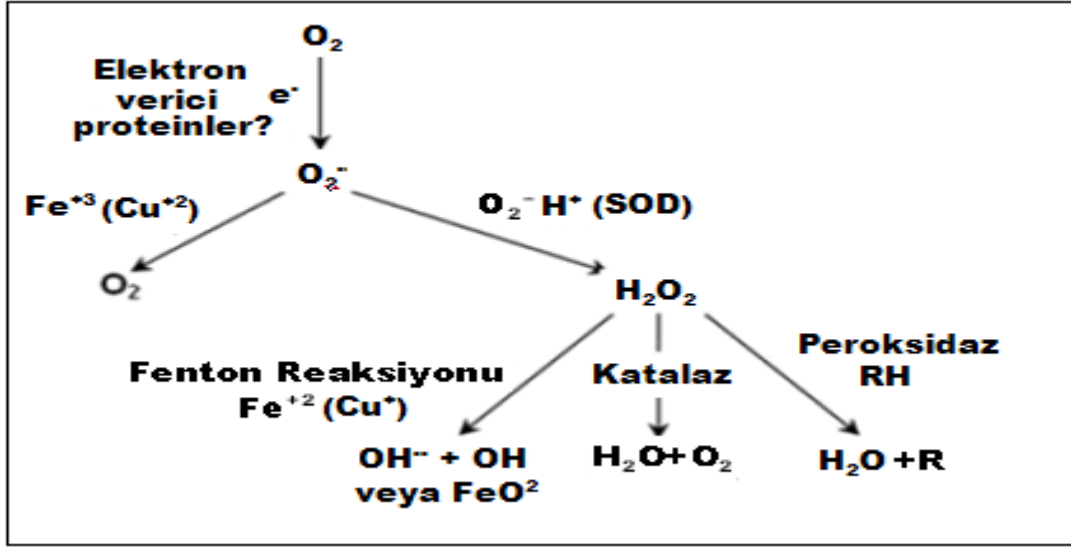


OH<sup>-</sup> radikalının yarılanma ömrü çok kısadır. OH<sup>-</sup> radikali serbest oksijen radikallerinin en güçlüsüdür (4,5). İn vitro çalışmalar OH<sup>-</sup> radikalının hücre hasarından sorumlu temel serbest oksijen radikali olduğunu göstermiştir (6,7).

OH<sup>-</sup> radikali, oluştuğu yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak tiyil radikalleri (RS<sup>-</sup>), karbon merkezli radikaller (R<sup>-</sup>), organik



peroksitler gibi ( $\text{RCOO}^\cdot$ ) yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta biyolojik hasara neden olur (38).



**Sekil 4:** Fenton Reaksiyonu (Ecological Chemistry and Engineering S 2009)

### 2.3.1.2 Reaktif Nitrit Türevleri

Reperfüzyon sırasında serbest oksijen radikallerinin yanı sıra reaktif nitrojen türevleri de önemli miktarda artış göstermektedir (30,31).

**Nitrik Oksit (NO):** NO haberci bir molekül olup, vazodilatasyon, sinirsel ileti, anti-mikrobiyal, anti-tümoral etkisi olan insan biyolojisindeki etkileri son yıllarda tanımlanan küçük molekül ağırlıklı, renksiz, kokusuz, hızlı diffüze olan ve toksik bir gazdır (41- 44). Kararlı yapı göstermeyen bu moleküle azot monoksit veya nitrojen monoksit adı da verilir (45).

NO, enzimatik olarak NO sentetaz (NOS) enzimi aracılığı ile L-Argininin oksidasyonu üzerinden üretilir (46). Üç farklı NOS türü vardır. Endotelial izoform (eNOS), nöronal izoform (nNOS) ve normal koşullarda üretilmeyen ancak inflamasyon veya enfeksiyon durumlarında sitokinler ve endotoksinler tarafından indüklenebilen (iNOS)'tur. Ayrıca iNOS endotoksemi, hemorajik şok, sepsis gibi olaylarda rol alır (46-50).

Fonksiyonları açısından her üç NOS türünün ürettiği NO görevi farklıdır. eNOS ile oluşan NO; vazodilatasyon yapar ve kan hücrelerinin fonksiyonu üzerine etkilidir

(51). iNOS ile oluşan NO konak savunmasında etkilidir. NO bu durumda serbest oksijen radikali ve özellikle peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) oluşumunu sağlar. Peroksinitrit; protein tirozin nitrasyonu yoluyla veya direkt OH ve NO ayrılarak dokuda direkt hasara neden olur (52). NO çiftleşmemiş bir elektrona sahip olduğu için bir serbest radikaldir. Oksijen, süperoksit radikali ve demir, bakır, kobalt, manganez gibi geçiş metalleri ile reaksiyona girer (53-55). Hızlı metabolize olması nedeniyle başlıca etkilerini lokalizasyonuna ve üretim oranına bağlı olarak gösterir (56).

### **2.3.1.3 Hücrelerde Serbest Radikallerin Kaynakları**

Hücrelerde normal metabolik yollardaki reaksiyonlarda serbest radikaller oluşabilir. Normal hücrelerde en büyük serbest oksijen radikali kaynağı elektron transport zincirinden sızıntıdır. Oksijenin parsiyel indirgenmesi sonucu % 1-5 oranında serbest oksijen radikali oluşmaktadır. Reperfüzyon ile gelen yüksek konsantrasyondaki moleküler oksijen iskemi sırasında birikmiş olan indirgen moleküller ( $\text{NADH}_2$ -  $\text{FADH}_2$ ) ile indirgenerek serbest oksijen radikalleri oluşur (21).

Ksantin oksidaz enzimi iskemi esnasında önemli miktarda serbest radikal üretmez. Ancak reperfüzyon fazında oksijen seviyesi artınca fazla miktarda  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve süperoksit radikali oluşur (28).

Aldehit oksidaz, flavoprotein dehidrojenaz, aminoasit oksidaz, triptofan dioksijenaz gibi enzimlerde serbest radikal oluşturabilirler. Araşidonik asitin enzimatik oksidasyonu da çeşitli serbest radikaller oluşur. Araşidonik asit metabolizması ile serbest radikal üretimine enzimatik lipid peroksidasyonu denir (9,32). Aktive olmuş makrofaj, nötrofil ve eozinofiller de serbest radikal üretebilirler.

Bazı yabancı toksik maddeler hücrede serbest radikal üretimini artırır. Örneğin toksinin kendisi bir serbest radikaldir ( $\text{NO}_2$  gazı) veya toksin bir serbest radikale metabolize edilir ( $\text{CCl}_4$  metabolizasyonundan  $\text{CCl}_3\text{O}_2^-$  radikali oluşur). Radyasyon alınması, bazı ilaçlar (doxorubicin vb) ve ksenobiyotiklerin hidroksilasyonu sırasında serbest radikaller oluşabilir (37, 57).

Sonuç olarak serbest radikal kaynakları endojen ve eksojen olmak üzere ikiye ayrılabilir.

#### **a-)Endojen kaynaklar**

- Mitokondri ve endoplazmik retikulum elektron transport zincirleri
- Ksantin oksidaz sistemi
- Araşidonik asit sistemi
- Nötrofil fagositoz sistemi
- Lenfosit, fibroblast ve endotelden moleküler olarak salınma
- diğer oksidaz enzimler

#### **b-)Eksojen kaynaklar**

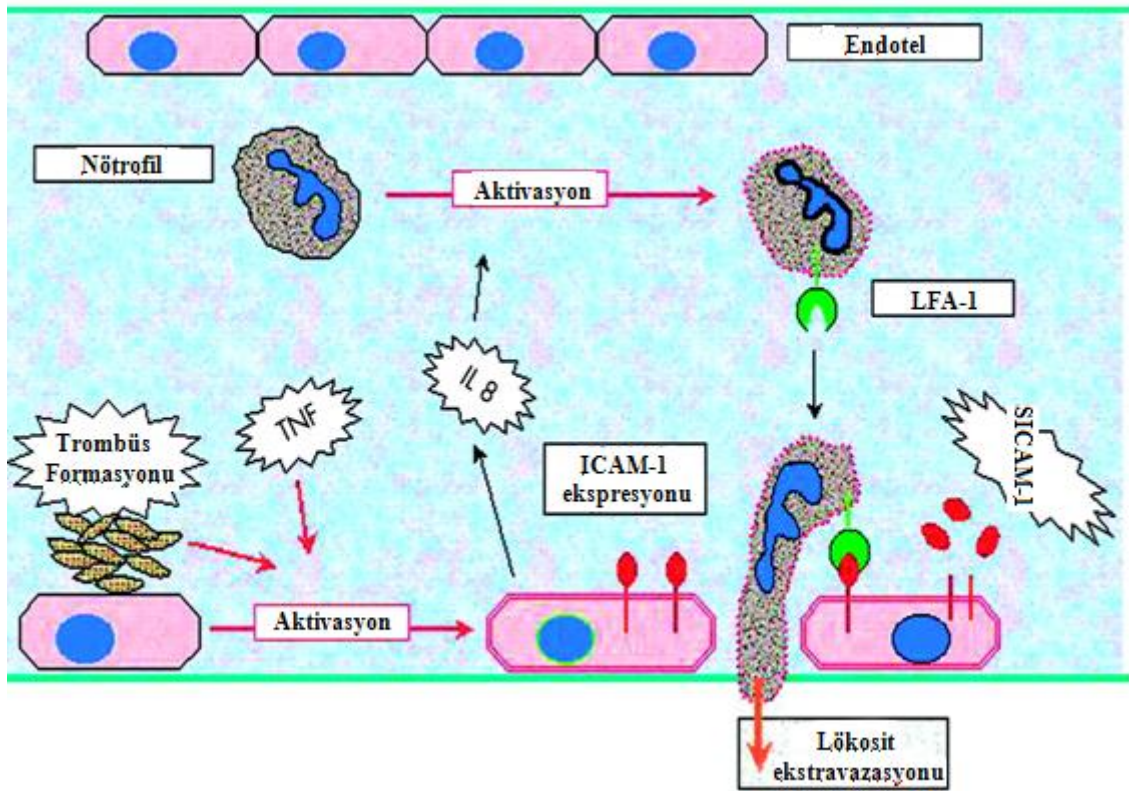
- Ksenobiyotikler
- İyonizan radyasyon
- Hepatotoksinler
- Kemoterapikler
- Redoks siklusu yapan maddeler
- Hava kirliliği
- Sigara

### **2.3.2 Lökosit Kompleman Sitokin ve Endotelin İ/R Hasarı Üzerine Etkileri**

İ/R sonrası dokularda mikrovasküler fonksiyon bozukluğu gelişir. Arteriyollerde endotele bağımlı dilatasyon bozulur. Mikrosirkülasyonun tüm segmentlerinde aktive olan endotel hücreleri daha fazla serbest oksijen radikali ve daha az NO üretir. Endotel hücrelerinde süperoksit radikali ve NO arasındaki dengesizlik inflamatuvar mediyatörlerin üretim ve salınımına öncülük ederken, adezyon moleküllerinin biyosentezinide artırır (36,58).

Nötrofillerin kemotaksisine neden olan en önemli faktör süperoksit anyon radikalleridir. Ayrıca kompleman 5a (C5a), kompleman 3a (C3a), araşidonik asit metabolitleri, lökotrien B<sub>4</sub>, NO, interlökin 1,6, 8 (İL 1-6-8) tümör nekroz faktör -alfa (TNF- $\alpha$ ) gibi sitokinlerde kemotaksiye neden olur (27, 59, 60).

Kemotaktik faktörlerin ortaya girmesiyle nötrofil ve endotel hücrelerindeki adhezyon moleküllerinin sentezi artar. Nötrofil endotel etkileşimini sağlayan adhezyon molekülleri glikoprotein yapısındadır. Lökosit üzerindeki adhezyon molekülleri, lökosit adhezyon molekülü (LAM-1 veya L-selektin) ve LFA-1(CD<sub>11</sub>/CD<sub>18</sub>) dir. Endotel hücreleri üzerinde bulunanlar ise intrasellüler adhezyon molekülü-1 (ICAM-1), endotelyal lökosit adhezyon molekülü 1 (ELAM -1 veya E-selektin) ve granüle membran protein-140 (GMP-140 veya P-selektin) dir (61) (şekil-5).



**Şekil 5:** Lökositlerin iskemik bölgeye göçü (British Journal of Ophthalmology 2003 September; 87(9): 1175–1183)

Kapillerde biriken nötrofiller kapiller lümenin tıkanmasına ve reperfüzyon sonunda bazı kapillerin perfüze olamamasına neden olmaktadır. İskemi reperfüzyon sonrası kapillerin bir kısmında perfüzyonun geri dönmemesine “no-reflow fenomeni” denir (62-66). Aktive olmuş nötrofiller antimikrobiyal savunma sisteminde kullandıkları mekanizma olan NADPH oksidaz enzimi aktivasyonu ile reperfüzyondan gelen moleküler oksijenden seri reaksiyonlar sonucu süperoksit anyon radikali oluşturur.

Ayrıca nötrofiller araşidonic asit metaboliti olan lökotrien B<sub>4</sub> salgılayarak süperoksit radikali oluşturur. Aktive nötrofiller yeni serbest oksijen radikalleri oluşturmaya bu da yeni nötrofil infiltrasyonuna neden olmaktadır (63).

Nötrofillerde fagosite edilen mikroorganizmaları yok etmek için lizozomal miyeloperoksidaz enzimi bulunmaktadır. Myeloperoksidaz; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile Br, I, Cl gibi elementleri tepkimeye sokarak HOCl, HOI, HOBr gibi güçlü asitler oluşturur (67,68). Ayrıca lökositler proteaz, kollejenaz ve elastaz gibi enzimleri salgılayarak endotel hücre glikokaliksi ve bazal membranı harap ederek kapiller geçirgenliği artırarak doku hasarını artırır (64-66).

Sitokinler doğal ve spesifik immünitinin bir protein mediatör grubudur. Sitokinler İ/R hasarında inflamatuvar yanıtın başlatılmasında ve sürdürülmesinde önemli role sahiptir (69,70). Bu etkilerini otokrin, parakrin ve endokrin yollarla ve diğer inflamatuvar mediatörleri üretim aracılığı ile sağlarlar (71). TNF- $\alpha$ , İL-1, İL-6'nın geniş proinflamatuvar ve İL-10'un zayıf antiinflamatuvar etkinlikleri vardır (72,73).

TNF- $\alpha$ ; mast hücreleri, endotel hücreleri, aktive makrofajlar gibi farklı hücre tiplerinden inflamatuvar ya da immünmodülatör uyarıya yanıt olarak salınan bir sitokindir. Hücre rejenerasyonunu başlatmaktan hücre ölümüne kadar geniş bir etkinliği vardır. TNF- $\alpha$  konakçı cevabın oluşmasına yol açan ilk ve en güçlü mediatörlerden birisidir. TNF- $\alpha$  salınımı hızlı ve kısa sürelidir. TNF- $\alpha$  nın kısa süreli ortamda bulunması bile önemli metabolik ve hemodinamik değişikliklerin oluşmasına ve diğer sitokinlerin aktive olmasına neden olur. TNF- $\alpha$  ayrıca koagülasyon aktivasyonu, prostaglandin E<sub>2</sub>, platellet aktive edici faktör (PAF), glikokortikoidler ve eikazonoidler gibi maddelerin salınımını artırır (74-78).

İL-1 travma ya da enflamasyonlu bölgede makrofaj, monosit ve endotelden salınan bir polipeptittir. Hem TNF- $\alpha$  hem İL-1'in başlıca rolü endotel aktivasyonudur. Endotelden adezyon molekülü salgılanmasını artırır. İL-1 doku fibroblastlarını aktive eder ve ekstrasellüler matriksin proliferasyonuna ve yapımına neden olur.

### 2.3.3 Antioksidan Mekanizmalar

Normal koşullarda organizmada oksidan etkenler ve antioksidan mekanizmalar bir denge halindedir (79,80).

Antioksidanlar endojen ve eksojen kaynaklı olabilir.

#### a-)Endojen antioksidanlar

Endojen antioksidanlar enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki kısma ayrılabilir (79).

##### **Enzim antioksidanlar:**

- Süperoksit dismutaz (SOD)
- Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)
- Glutasyon S- transferazlar (GST)
- Katalaz (CAT)
- Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi
- Hidroperoksidaz

Süperoksit dismutaz; süperoksit radikalini ( $O_2^-$ )  $H_2O_2$  ve moleküler oksijene ( $O_2$ ) dönüşümünü katalizleyen enzimdir. Yapısında bakır, çinko ve mangan içeren bir metaloenzimdir. Katalaz,  $H_2O_2$ 'yi suya ve oksijene parçalayarak  $H_2O_2$ 'nin  $OH^-$  radikaline dönüşümünü engeller. Glutasyon peroksidaz; hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu selenyum içeren bir metaloenzimdir. Membranlarda, fagositik hücrelerde ve eritrositlerde bulunur. Gltasyon S- transferazlar lipit peroksitlerine karşı antioksidan savunma mekanizması gösterir. Mitokondrial sitokrom oksidaz solunum zincirinin son enzimidir ve süperoksidi ( $O_2^-$ ) detoksifiye eder (79).

##### **Non enzim antioksidanlar:**

- Melatonin
- Seruloplazmin
- Transferrin
- Myoglobin
- Hemoglobin

- Ferritin
- Glutasyon
- Laktoferrin
- Sistein
- Metyonin

Melatonin  $\text{OH}^-$  radikalini ortadan kaldıran çok güçlü bir antioksidandır. Lipofilik olduğu için hücrenin hemen tüm organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşarak çok geniş bir dağılımda antioksidan aktivite gösterir. Seruloplazmin ferro demiri ( $\text{Fe}^{+2}$ ) ferri demire ( $\text{Fe}^{+3}$ ) yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu engeller ve  $\text{OH}^-$  radikali oluşumunu inhibe eder. Bilirubin, süperoksit ve hidroksil radikalini; transferrin ve laktoferrin serbest demiri bağlayarak antioksidan aktivite gösterir (28). Glutasyon, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Hemoglobinin, methemoglobine dönüşümünü engeller. Proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur. Eritrosit, lökosit ve göz lensini oksidatif strese karşı korumada çok önemlidir (37).

#### **b-)Eksojen antioksidanlar**

Eksojen antioksidanlar; vitaminler, ilaçlar ve gıdalarla alınan antioksidanlar olmak üzere üç gruba ayrılabilir.

#### **Vitaminler:**

- $\alpha$  tokoferol (vitamin E)
- $\beta$  karoten (vitamin A)
- Askorbik asit (vitamin C)

#### **İlaç olarak kullanılan antioksidanlar:**

- Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopurinol, oksipürinol, pterin aldehit)
- NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezipler, kalsiyum kanal blokörleri, NSAİİ)
- Rekombinant süperoksit dismutaz
- Vitamin E analogu (Trolox C)
- Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (ebselen, asetilsistein)

- nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albumin)
- Barbütüratlar
- Demir şelatörleri

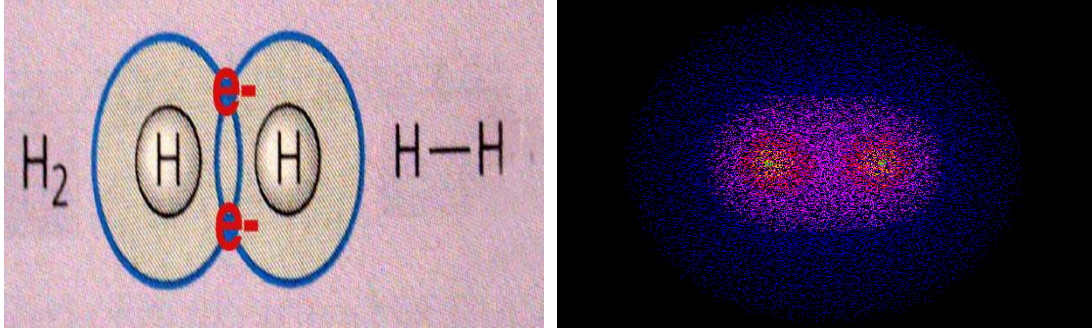
**Gıdalardaki antioksidanlar:**

- Butylated hydroxytoluene (BHT)
- Butylated hydroxyanisole (BHA)
- Propylgaleta



## 2.4 Hidrojenin Temel Özellikleri

Hidrojen renksiz, kokusuz, tatsız, metalik olmayan ve patlayıcı bir gazdır. Peryodik sistemin ilk elementi olan hidrojenin çekirdeğinde bir proton ve orbitalinde bir elektron bulunur (şekil-6). Yunanca'da su oluşturan manasındaki “hydro” ve “genes” kelimelerinin birleşmesiyle oluşmuştur. Serbest hidrojen miktarı çok düşüktür ve atmosferdeki oranı milyonda birdir. Ancak evrenin % 75'i hidrojendir. Genel olarak hidrojen suda ve organik bileşiklere bulunur. Hidrojen, oksijen ve diğer oksidanlarla hızla reaksiyona girer ve patlar. 1937 yılındaki Hindenburg Zeplin faciası hidrojen gazı patlaması sonucu oluşmuştur. Ancak % 4,6'nın altındaki konsantrasyonlarda hidrojen güvenilir bir gazdır. Sanayide fosil yakıtı ve gübre üretiminde kullanılmaktadır (11).



**Şekil 6:** Hidrojen molekülünün kimyasal yapısı ve üç boyutlu görünümü (<http://phelafel.technion.ac.il/~orcohen/h2.html> 12/ 12/ 2010).

### 2.4.1 Hidrojenin Vücuttaki Fizyolojik Rolü

Hidrojen insan vücudunda endojen olarak üretilmez ve insan vücudunda hidrojenaz enzimi bulunmaz. Ancak insan barsağında yaşayan anaerobik mikroorganizmalar, insan tarafından sindirilemeyen nişasta ve bitkisel polisakaritleri hidrojenaz enzimi sayesinde parçalar ve hidrojen gazı oluşturur. Sindirilemeyen karbonhidratların fermantasyonu yoluyla günde 12 litreden fazla hidrojen üretilir (81). Oluşan hidrojen önce dolaşım sistemine geçer ve akciğer yoluyla atılır (82). Nefesle atılan hidrojen miktarını ölçerek barsaktaki bu mikroorganizmalar hakkında bilgi sahibi olunabilir (83,84). Mide gazıyla, solunumla ve kolonik mikroorganizmaların metabolize etmesiyle hidrojen vücuttan uzaklaştırılır. Kolonik mikroorganizmalar hidrojeni, hidrojen sülfid ya da metan gazına çevirirler (85). Hidrojen, vücutta sinyal alışverişinde

sinyal molekülü olarak görev alır. NO, CO, H<sub>2</sub>S ve H<sub>2</sub> vücutta gaz şeklinde görev yapan sinyal molekülleridir (86,87).

#### **2.4.2 Hidrojenin Terapotik Etki Mekanizması**

Hidrojen gazının koruyucu mekanizması için farklı görüşler vardır. Hidrojen gazının en önemli özelliği güçlü bir antioksidan olmasıdır. Hidrojen selektif olarak OH<sup>-</sup> ve ONOO<sup>-</sup> radikalini detoksifiye eder. Bu güçlü radikallerin vücutta nasıl bir antioksidan sistemi olduğu bilinmemektedir (9,10). Hidrojen; katalaz, süperoksit dismutaz ve hemoksijenaz gibi antioksidan sistemlerin etkisini artırarak hücreyi korur (88,89). Hidrojen kaspaz 3 enzimini inhibe ederek hücreyi apoptozisten korur (90). Ayrıca hidrojen İL1, İL6, TNF- $\alpha$  gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımını engelleyerek hücreyi oksidatif stresten korur (91, 92).

#### **2.4.3 Hidrojenin Terapotik Kullanım Şekli**

Hidrojen inhale, oral veya intravenöz enjeksiyon şeklinde kullanılabilir. % 4'ün altındaki konsantrasyonlardaki hidrojen kolayca yüz maskesi veya nazal kanül aracılığıyla inhalasyon şeklinde kullanılabilir (93). Günlük yaşamda inhale hidrojen kullanılması zor olduğu için hidrojenden zengin su oral olarak içilebilir. Hidrojenden zengin su, inhale hidrojenle karşılaştırılabilir etkisi vardır (94). Hidrojenden zengin su; saf suyun elektroliz edilmesiyle, yüksek basınç altında suyun içinde hidrojenin eritilmesiyle veya suyun magnezyumla reaksiyona sokulmasıyla elde edilebilir ( $Mg + 2H_2O \rightarrow Mg(OH)_2 + H_2$ ). Hidrojenden zengin mayi doğru konsantrasyonlarda intravenöz olarak uygulanabilir (95,96).

#### **2.4.4 Hidrojenin Çeşitli Hastalıklarda Kullanılması**

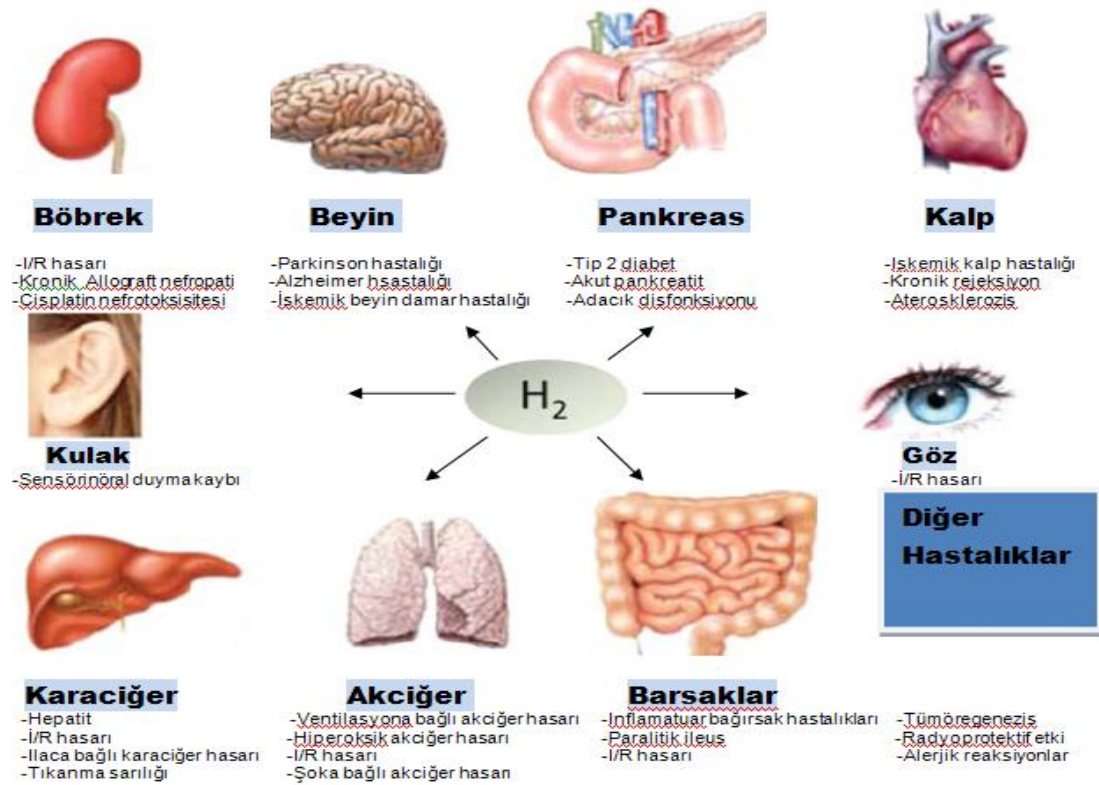
Hidrojen santral sinir sisteminde; beyin İ/R hasarında, Parkinson hastalığında, Alzheimer hastalığında, spinal kord travmalarında araştırma amaçlı kullanılmış ve hepsinde olumlu sonuçlar alınmıştır (10, 95, 97-99).

Kardiovasküler sistemde; koroner arter hastalığında, kalp naklinde, atheroskleroziste araştırma amaçlı kullanılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır (100-102).

Solunum sisteminde; inflamatuvar akciğer hastalıklarında ve akut respiratuvar distres sendromunda araştırma amaçlı yapılan çalışmalarda olumlu sonuçlar alınmıştır (103,104).

Sindirim sisteminde; karaciğer hasarında, akut pankreatitte, barsak naklinde, ülseratif kolitte hidrojenin etkisi araştırılmış ve hidrojenin hücre koruyucu etkisi gösterilmiştir (1, 62, 105-107).

Retinal İ/R hasarında, alerjik reaksiyon geliştiği sırada, tip 2 diabetes mellitusta, metabolik sendromda, hiperglisemide, sepsiste, radyasyonun zararlı etkilerinden korumada hidrojenin dokuları koruduğu gösterilmiştir (9,108-112). Yapılan araştırmalarda hidrojenin pek çok organı hastalıklardan koruduğu gösterilmiştir (şekil-7).



**Şekil 7:** Hidrojenin çeşitli hastalık modellerinde kullanımı (Free Radical Research 2010)

#### **2.4.5 Hidrojenin Yan Etkileri**

Yapılan çalışmalarda suda 0,45 – 0,57 milimol arasında hidrojen bulunması güvenli bulunmuştur (113). Deneysel rat modelinde ratlara toksik dozda oral yoldan hidrojenli su verilmiştir. Dişi ratlarda bazofili izlenmiştir. Erkek ratlarda ise aspartat aminotransferaz ve alanin aminotransferaz düzeyinde azalma görülmüştür. Ancak bu değişimler normal klinik parametreler arasında olmuştur. Bazı dişi ratlarda dalağın ağırlığının arttığı görülmüş ancak otopside ve histopatolojik incelemelerde önemli değişiklikler bulunamamıştır (113).

İnsanlarda hidrojenden zengin su verilerek yapılan çalışmada ise aspartat aminotransferaz ve alanin aminotransferaz düzeyinde düşme; gama-glutamil transferaz ve total bilirubin düzeyinde artış izlenmiştir. Bu değişimlerde normal klinik parametreler arasında olmuştur (114).

### 3.GEREÇ YÖNTEM

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından (15.01.2009 tarih 2009/1 numaralı proje) onaylanan bu proje, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, Patoloji Anabilim Dalı ve Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yapılmıştır. Araştırmamızın finansmanı Ondokuz Mayıs Üniversitesi AR-GE Birimleri, Proje Yönetim Ofisi tarafından (PYO. TIP.1904.09.031 numaralı proje) sağlanmıştır.

Çalışmada, deney hayvanı olarak Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde üretilen, 2 aylık, ortalama ağırlıkları 200-250 gr olan eşit sayıda erkek ve dişi Spraque Dawley tipi ratlar kullanılmıştır.

Ratlar çalışma boyunca, hayvan laboratuvarında hava döngüsü ve 12 saat aydınlık-12 saat karanlık ışık döngüsü sağlanan bir odada tutulmuşlardır. Bakımları laboratuvar teknisyenleri tarafında yapılmış, şehir suyu ve sıçan yemi ile beslenmişlerdir. Çalışmada 3 grup oluşturulmuş 2. ve 3. gruplar erken dönem ve geç dönem olmak üzere 2 alt gruba ayrılmıştır. Kontrol grubu ve alt gruplar için 6 adet rat kullanılmıştır (tablo-1).

**Tablo I:** Deney grupları ve rat sayıları

	<b>Grup 1</b> <b>(kontrol)</b>	<b>Grup 2</b> <b>(İ/R)</b>	<b>Grup 3</b> <b>(İ/R+ H<sub>2</sub>)</b>
<b>Erken (E)</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>
<b>Geç (G)</b>	<b>-</b>	<b>6</b>	<b>6</b>

### 3.1 Böbrek İskemi/Reperfüzyon Modelinin Oluşturulması

Ratlara 100mg/kg ketamin ve 20 mg/kg ksilazin hidroklorür (Rompun®) intraperitoneal olarak uygulanarak genel anestezi sağlandı. Daha sonra operasyon masasına alınan ratlara median abdominal laparotomi uygulandı. Geç dönem alt grubundaki ratlara operasyondan 30 dakika önce 25mg/kg dozunda intramusküler seftriakson uygulandı. Postoperatif aneljezi, 3 gün süreyle içme suyuna 2 mg/ml olacak şekilde parasetamol eklenerek sağlandı.

#### Grup 1: Kontrol

Bu gruptaki ratlara median abdominal laparotomi uygulandıktan sonra hiçbir işlem yapılmaksızın sol nefrektomi yapıldı.

#### Grup 2: İ/R Grubu

Bu gruptaki ratlarda sol renal pedikül bulunarak çevre dokulardan diseke edildi (şekil 8). Renal pedikül içerisinden renal arteri diseke etmek sempatik sistemi hasara uğratarak sonuçları değiştirebileceği için sol renal pedikül, non-travmatik mikrovasküler klemp (bulldog klemp) ile 45 dakika klemlendi ve böbrek dokusu iskemiye uğrattıldı (şekil 9). Takiben klemp kaldırılarak böbrek reperfüze edildi. Erken dönem gruptaki ratların, reperfüzyonun 6.saatinde; geç dönem gruptaki ratların reperfüzyonun 14. gününde sol böbrekleri çıkartıldı.



Şekil 8: Sol renal pedikül



**Şekil 9:** Sol renal pedikülün klemplenmesi

### **Grup 3: İ/R + H<sub>2</sub> Gazı Grubu**

Bu gruptaki ratlara, sol böbrek arterine klemp konulmadan 1 saat önce pleksiglas bir odacık içerisinde %2'lik hidrojen gazı 2 L/dk hızında verildi. İşlem sırasında ratlara yüz maskesi yoluyla 2 L/dak akım hızıyla hidrojen gazı inhalasyonuna devam edildi. İşlemden sonra yine odacık içerisinde %2'lik hidrojen gazı 1 saat süreyle 2 L/dk hızında verilerek ortalama 181.1±3.6 dk (175-185 dk) hidrojen gazı alması sağlandı (şekil 10-11). Erken dönem gruptaki ratlara, reperfüzyonun 6.saatinde; geç dönem gruptaki ratlara reperfüzyonun 14. gününde sol nefrektomi uygulandı.



**Şekil 10:** Odacık ile H<sub>2</sub> uygulanması



**Şekil 11:** Yüz maskesi ile H<sub>2</sub> uygulanması

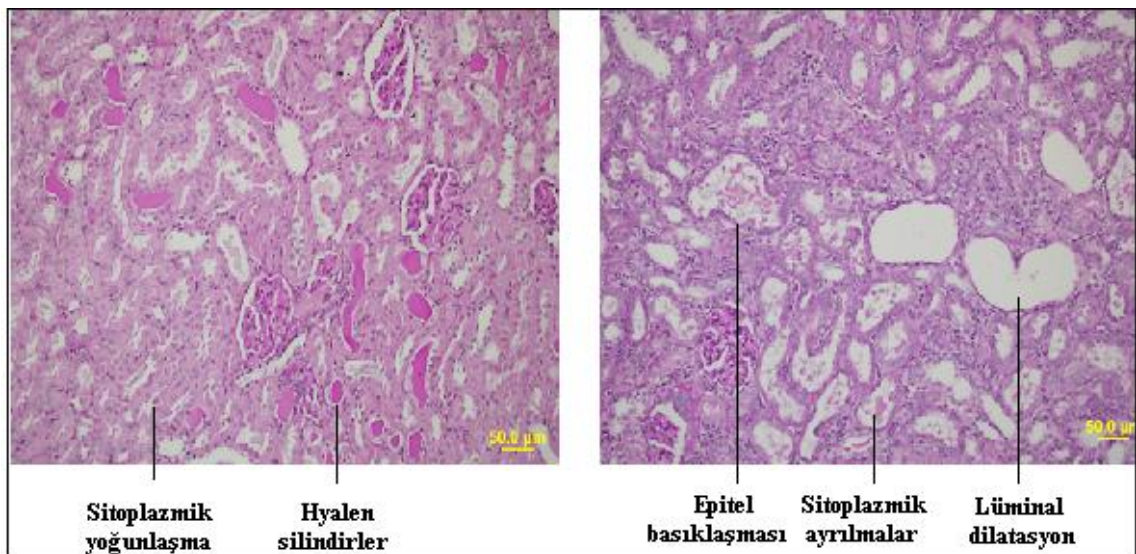
### 3.2 Dokuların Alınması

Deney süresi sona erince anestezi altında laparotomi kesisi açıldı. Ratlara hızlıca sol nefrektomi yapıldıktan sonra ekzanguinasyon uygulandı. Histoloji için alınan sol böbrek nötral formolin içinde muhafaza edildi.

### 3.3. Histopatolojik Değerlendirme

Sol böbrek çıkarılıp hilus seviyesinde koronal olarak kesilerek %10'luk formaldehit içinde 24 saat tespit edildi. Doku takip işlemleri sonrası parafine gömülen dokudan 4 mikronluk kesitler hazırlandı. Her böbrekten en az 40 kesit alınarak HE ve PAS ile boyandıktan sonra kesitler çalışma grupları hakkında bilgisi olmayan patolog tarafından ışık mikroskobu (Olympus BX50, Olympus CO, Japonya) ile değerlendirildi ve kesitlere ortalama puan verildi.

Tübülointerstisyel hasar (TİH), x200 büyütme ile tüm renal kortekst incelendi. Akut ve kronik tübüler hasar için fırçası-kenar kaybı, epitelde basıklaşma, tübüler epitelin bazal membrandan ayrılması, lüminal dilatasyon, hyalen silindir varlığı ve tübüler atrofi, interstisyel hasar için ödem, fibrozis ve inflamasyon varlığı değerlendirildi (şekil 12). Yang ve arkadaşlarının çalışmasından modifiye edilerek TİH bulgularının yaygınlığı semikantitatif olarak yüzde alan ifadesiyle 0-4 skalasında skorlandı (116) (Tablo II). Her alan için belirlenen skorların ortalaması hesaplanarak o denek için toplam skor verildi. Histopatolojik değerlendirme gruplardan haberi olmayan patolog tarafından yapıldı.



Şekil 12: Akut tübüler nekroz bulguları



**Tablo II:** TİH bulgularının yaygınlığını yüzde alan şekilde ifade eden skorum sistemi.

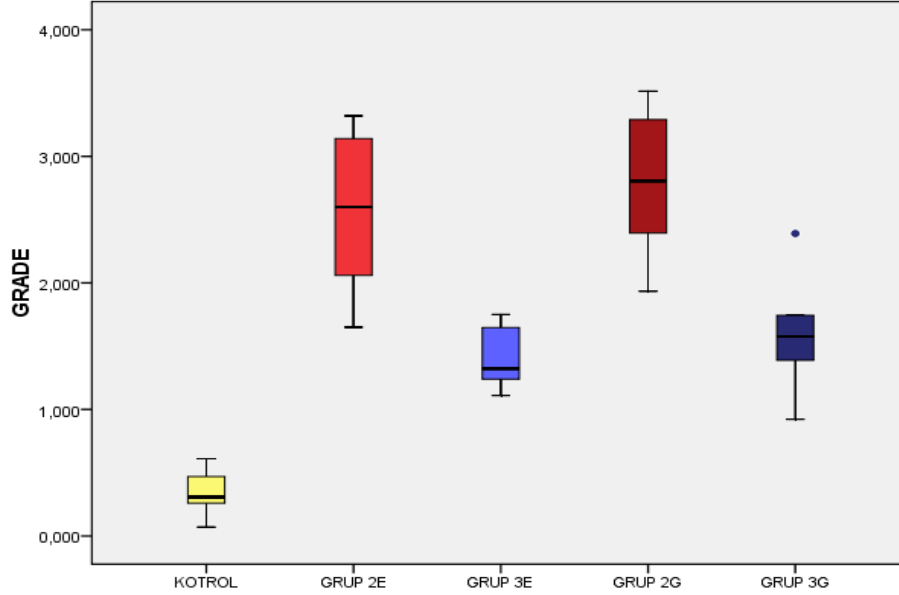
Skor	Yüzde
0	Normal (hiç izlenmedi)
1	<10%
2	10-25%
3	26-75%
4	>75%

### 3.5 Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler

İstatistiksel değerlendirme için Statistical Package of Social Sciences 15 ( SPSS 15,0, Chicago, IL, USA ) programı kullanıldı. Verilerin analizinde Kruskal-Wallis varyans analizi uygulandı. Grupların ikili karşılaştırmaları için Mann-Witney U testi kullanıldı. Tüm değerler ortalama  $\pm$  standart sapma (ort  $\pm$  ss) olarak gösterildi. İstatistiksel olarak  $p < 0,05$  değeri anlamlı kabul edildi.

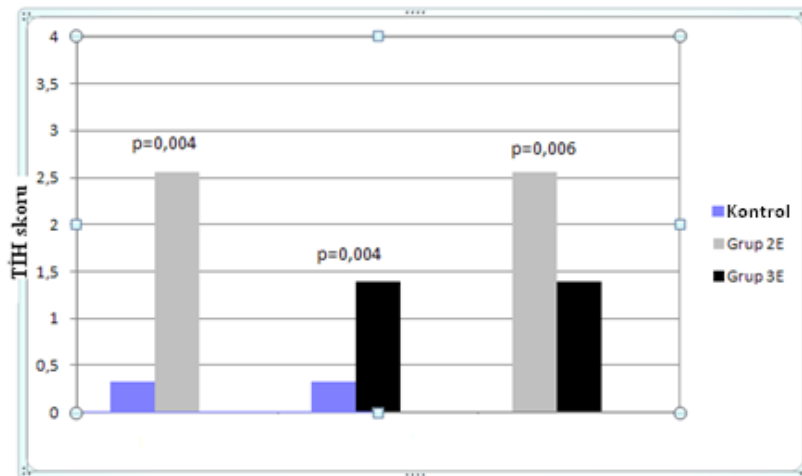
## 4.BULGULAR

Grupların ortalama skor değerleri kontrol grubu için  $0,33\pm0,18$ ; Grup 2E için  $2,56\pm0,63$ ; Grup 3E için  $1,39\pm0,25$ ; Grup 2G için  $2,79\pm0,57$ ; Grup 3G için  $1,59\pm0,48$  olarak bulundu (şekil 13).



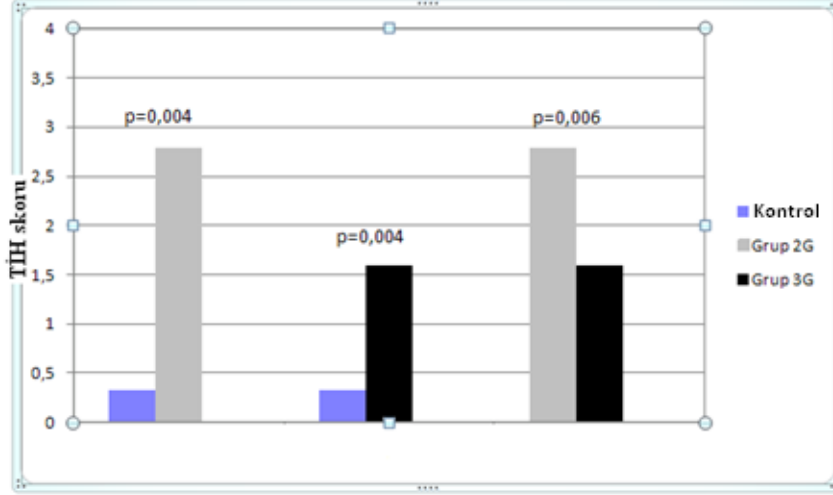
Şekil 13: Gruplarda ortalama TIH skorları.

Kontrol grubunun ortalama skor değeri; Grup 2E'ye ve Grup 3E'ye göre anlamlı olarak farklılık saptandı ( $P=0,004$ ). Grup 3E'nin ortalama skor değeri Grup 2E'ye göre anlamlı olarak farklıydı ( $P=0,006$ ) (şekil-14).



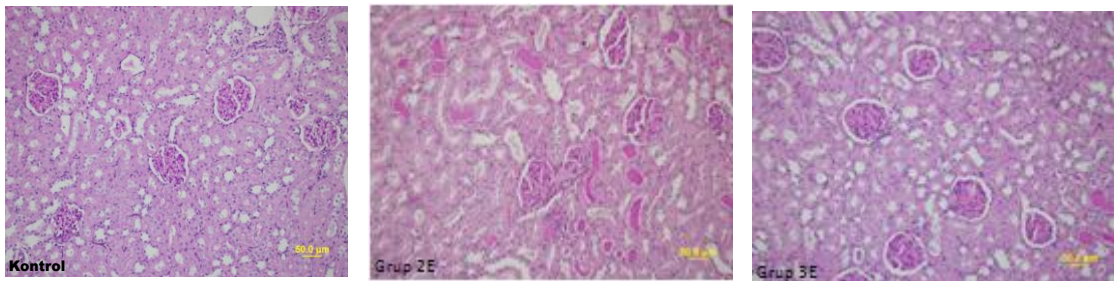
Şekil 14: Erken dönem gruplar arasındaki TIH skorlarının karşılaştırılması

Kontrol grubunun ortalama skor değeri; Grup 2G ve Grup 3G'ye göre anlamlı olarak farklılık saptandı (P=0,004). Grup 3G'nin ortalama skor değeri Grup 2G'ye göre anlamlı olarak farklıydı (P=0,006) (şekil-15).



**Şekil 15:** Geç dönem gruplar arasındaki T1H skorlarının karşılaştırılması

Kontrol grubundaki böbrek doku kesitlerinin mikroskopik değerlendirilmesinde herhangi bir histopatolojik değişiklik saptanmadı. Grup 2E'de; böbrek dokusunda medulla etkilenmemiştir. Glomerüller hasar saptanmadı. Bu grupta orta ve yüzeysel renal kortekste özellikle proksimal tübüllerde akut tübül nekroz benzeri bulgular belirgindi. Tübül epitellerinde fırçamsı-kenar kaybı, lümenal yüzeyde sitoplazmik yoğunlaşma ve ayrılmalar, basıklaşma, nadiren bazal membrandan ayrılma, lümenal dilatasyon ve hyalen silindirler mevcuttu. Grup 3E'de bu değişiklikler daha hafif derecede izlendi (Şekil13). Erken dönem İ/R hasarında, gruplar arasında anlamlı farklılık saptandı (P<0,05).



**Şekil 16:** Erken dönem İ/R grupları ve kontrol grubunda histopatolojik görünüm (x200, PAS)

Grup 2G’de belirgin túbüler atrofi ve interstisyel fibrozis izlenmedi. Ancak túbül epitellerinde belirgin olarak rejenerasyon bulguları ve basıklaşma, interstisyumda odaksal inflamasyon mevcuttu. Grup 3G’de bu değişiklikler daha hafif derecede izlendi (Şekil 14). Bu iki grup arasında anlamlı fark saptandı ( $p<0.05$ ).



**Şekil 17:** Geç dönem İ/R gruplarında histopatolojik görünüm (x200, PAS)

## 5.TARTIŞMA

Böbrek kan akımı renal transplantasyon, parsiyel nefrektomi, renal arter anjioplasti, aortik anevrizma cerrahisi gibi klinik durumlarda geçici olarak sağlanamayabilir (117,118). Kan akımının kesilmesi ve yeniden başlatılması İ/R hasarına neden olmaktadır. İ/R hasarı klinik olarak prerenal azotemi, tübüler veya kortikal nekroza bağlı akut böbrek yetmezliği gibi farklı şekillerde ortaya çıkabilir (119). Histopatolojik olarak geniş tübülointerstisyel hasar, tübül hücrelerinde nekroz, glomerüler hasar, tübüler obstrüksiyon izlenir (120). Pek çok tübüler ve glomerüler hasar iskemi sırasında değil, anoksi sonrası gelişen reperfüzyon fazında görülür.

Anoksi sırasında ATP azalır, SOR konsatrasyonu artar, intrasellüler asidoz gelişir, sitozoldeki kalsiyum konsatrasyonu artar, fosfolipaz ve proteaz aktivitesi artar (121). Böbrek dokusunda İ/R hasarını oluşturan SOR kaynağı mitokondrial elektron transport zinciri, araşidonik asit metabolitleri, hücre içi kalsiyum artışı, ksantin oksidaz sistemi, demir iyonu vb. etkenlerdir (122,123). SOR; biyolojik membranlarda lipid peroksidasyonu yapmakta, hücre iyon pompası ve diğer enzimatik reaksiyonları etkilemekte, DNA tamirini ve transkripsiyonunu engelleyerek hücreyi ölüme götürmektedir (124,125). İ/R hasarının önlenmesinde serbest oksijen radikallerinin oluşumunun engellenmesi ve blokajı için çeşitli yöntemler denenmiştir. Bu amaçla atrial natriüretik peptit, allopurinol, melatonin, pargyline, cepharantine gibi pek çok ilaç kullanılmıştır (126-130).  $\text{OH}^-$  ve  $\text{ONOO}^-$  en aktif serbest oksijen radikalleridir (66).  $\text{OH}^-$  iyonu biyolojik sistemde; süperoksit anyonu, Haber-Weiss reaksiyonu ve Fenton reaksiyonundan oluşur (131).  $\text{OH}^-$  radikallerinin temizlenmesi önemlidir. Çünkü  $\text{OH}^-$  radikallerini detoksifiye edecek endojen bir antioksidan bir sistem yoktur (10). Süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit gibi radikaller süperoksit dismutaz, süperoksit peroksidaz ve glutatyon peroksidaz gibi endojen antioksidan sistemlerle temizlenebilir. Glukoz, mannitol, dimetil sülfoksit gibi ajanların  $\text{OH}^-$  radikallerini azalttığı bildirilmiştir (132,133).

Deneyssel renal İ/R modelinde böbreğin verdiği yanıt ratlarda çok iyi belirlenmiş ve literatürde çalışmaların çoğunda ratlar kullanılmıştır. Kennedy ve arkadaşları insan akut böbrek yetmezliğini anlamada deneyssel rat modelinin çok önemli olduğunu belirtmiştir. Tübüler hasar, İ/R hasarında önemli bir gösterge olduğunu ve histopatolojik

olarak incelenmesi gerektiğini bildirmiştir (115). Bonventre ve arkadaşları deneysel rat İ/R hasarında; reperfüzyon fazında hücre iskelet yapısında bozulma, hücre içi iyon dengesinin bozulması, proteolitik ve fosfolipolitik yolların oluşması, hücre içi asidoz, SOR üretilmesi, inflamatuvar mediatörlerin salınması, lökosit infiltrasyonun oluşması ve sonuçta apoptozis ya da nekrozla rat hücresinin öldüğünü bildirmiştir (134). Chatterjee ve arkadaşları deneysel rat akut böbrek yetmezliğinde SOR ve inflamatuvar hücrelerin önemli rol oynadığını belirtmiştir (135). Forbes ve arkadaşları İ/R hasarından haftalar ya da aylar sonra böbreğin idrar konsantrasyonunu azaltma yeteneğinde azalma olduğunu ve tübülointerstisyel hasarın gittikçe arttığını bildirmişlerdir (136). Jain ve arkadaşları ratlarda İ/R hasarından onaltı hafta sonra progresif proteinüri oluştuğu ve yirmidördüncü haftadan sonra fibrozis göstergesi olan transforming growth faktör- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ve profibrotik sitokinlerin böbrek dokusunda arttığını bildirmişlerdir (137). Bu literatür bilgilerinden yola çıkılarak çalışmamızda Sprague-Dawley cinsi ratlar kullanılmıştır.

Literatürde böbrek İ/R hasarının ortaya çıkması için gerekli süre minimum otuz dakika olarak belirtilmiştir (22,138). Humphreys ve arkadaşları; Orvieto ve arkadaşları ise böbreğin doksan dakikaya kadar iskemiye dayanabileceğini bildirmiştir (139,140). Çalışmamızda kırk beş dakikalık iskemi süresi tercih edilmiştir. Literatürde, renal İ/R hasarının biyokimyasal ve doku örneklerindeki etkisi en erken 4 saatte ortaya çıktığı, tepe noktasına da 24 saatte ulaştığı rapor edilmiştir (70). Seok ve arkadaşları İ/R hasarının 14. gününde böbrekte fibrozis geliştiğini belirtmiştir (141). Çalışmamızda; İ/R hasarının böbrek üzerindeki erken dönem histolojik etkilerini araştırmak amacıyla reperfüzyonun 6. saatinde ve uzun dönem histolojik etkilerini araştırmak amacıyla reperfüzyonun 14.gününde doku örnekleri incelenmiştir.

İ/R modeli Kennedy ve arkadaşlarının tarif ettiği metodla uygulanmıştır (115). Tam oklüzyon atravmatik vasküler klemplerle sağlanmıştır. Kennedy ve arkadaşları renal pedikül içerisinden arter diseke edildiği zaman sempatik sinirin zarar göreceği böylece fonksiyonel sempatektomi oluşup sonuçları etkileyeceğini bildirmiştir (115). Çalışmamızda renal arter yerine perihilar yağ dokuları diseke edildikten sonra renal pedikül klemplenmiştir. Postoperatif ağrı kontrolü için NSAİİ böbrek üzerine olan negatif etkilerinden dolayı parasetamol tercih edilmiştir.

Hidrojen evrende % 70 oranında bulunurken atmosferdeki oranı ancak milyonda birdir. Hidrojen hafif, küçük ve patlayıcı bir gazdır. Ortamdaki konsantrasyonu % 5'i geçtiği zaman patlayıcı özelliği vardır. Patlayıcı özelliğinden dolayı araştırmacılar hidrojen gazından uzak durmuşlardır. Ohsawa ve arkadaşları % 4,7'nin altındaki konsantrasyonlar da bulunan hidrojen gazının patlayıcı özelliği olmadığını ve % 2 – 4 arası kullanılan hidrojen gazının önemli koruyucu etkileri olduğunu bildirmiştir (10). Çalışmamızda % 2 konsantrasyondaki hidrojen gazı kullanılmıştır. Kennedy ve arkadaşları ratlara yüz maskesi ile 2L/dak hızıyla oksijen verilebileceğini belirtmiştir (115). Çalışmamızda ratlara 2 L/dak hızında yüz maskesi ile hidrojen verilmiştir. Fukuda ve arkadaşları toplam 180 dakika hidrojen gazı vermiştir (142). Buchholz ve arkadaşları ise işlemde 1 saat önce; işlem sırasında ve işlemde 1 saat sonra hidrojen gazı vermiştir (1). Çalışmamızda ratlara; iskemiden 1 saat önce ve reperfüzyondan 1 saat sonraya kadar odacık içinde; işlem sırasında ise yüz maskesi aracılığı ile toplam 180 dakika süreyle hidrojen gazı verilmiştir.

Hidrojen nötral bir moleküldür. Oksijene göre oldukça küçüktür. Hücre zarından ve intrasellüler membranlardan kolayca geçer. Mitokondri zarından hızlıca geçerek SOR'un ana kaynağına ulaşır. Hidrojen, OH<sup>-</sup> radikalini daha hücreye zarar vermeden detoksifiye eder. Çekirdek zarından geçerek OH<sup>-</sup> radikalinin DNA üzerindeki olası etkilerini engelleyerek DNA'yı korur. Mitokondriye ve DNA'ya çok çabuk ulaşması nedeniyle hidrojen en hızlı etki gösteren eksojen antioksidan olabilir.

Ohsawa ve arkadaşları inhale edilen hidrojen gazının kana geçtiğini bulmuşlardır. Takiben yaptıkları iki çalışmada hidrojen gazının OH<sup>-</sup> radikalini azalttığını in vitro olarak ve hidrojen gazının İ/R hasarında doku koruyucu etkisi olduğunu rat serebral iskemide in vivo olarak göstermişlerdir (10). Ohsawa ve arkadaşlarının hidrojen gazı inhalasyonunun İ/R hasarından hücreyi koruduğunu göstermesi üzerine araştırmacıların hidrojen gazı üzerine ilgisi artmıştır. Buchholz ve arkadaşları deneysel rat modelinde hidrojen gazının ince barsak transplantasyonu sırasında oksidatif stresi azaltıcı etkilerini araştırmıştır. Çalışmada hidrojen gazının jejunum transplantasyonu nedeniyle oluşan oksidatif stresi histolojik ve biokimyasal olarak azalttığı gösterilmiştir. Hidrojen gazının barsak mukozasında epitelyal erozyonu belirgin olarak azalttığını bulmuşlardır. Çalışmalarında hidrojen gazının dokularda

proinflamatuvar moleküller olan TNF-  $\alpha$ , İL-1 ve İL-6' yı azalttığı görülmüştür. Aynı çalışmada hidrojen gazının ince barsaklarda intestinal dismotiliteyi önlediği ve jejunum greftindeki düz kas kontraktilesini de belirgin olarak artırdığı izlenmiştir. Böylece hidrojen gazının doku koruyucu etkisiyle beraber klinik etkileri de ortaya çıkmıştır (1).

Fukuda ve arkadaşları deneysel rat modelinde hidrojen gazının karaciğer İ/R hasarı üzerine etkisini araştırmıştır. Hidrojen gazının histolojik ve serum alanin aminotransferaz düzeyini azaltarak biokimyasal olarak karaciğer dokusunu koruduğunu bulmuşlardır (142).

Kawamura ve arkadaşları da hidrojen gazının akciğer transplantasyonunda proinflamatuvar sitokinlerin üretimini belirgin olarak azalttığını ve greft hücrelerini apoptozisten koruduğunu göstermişlerdir (143).

Zhang ve arkadaşları deneysel miyokart iskemi reperfüzyon modelinde hidrojenin miyokardial dokulardaki nötrofil infiltrasyonunu, TNF- $\alpha$  ve İL-1 seviyelerini azaltarak doku koruyucu etki yaptığını belirtmiştir (100). Hayashida ve arkadaşları hidrojen gazının miyokardial dokuları oksidatif strese karşı koruduğunu rapor etmişlerdir (144).

Xie ve arkadaşları % 2 konsantrasyondaki hidrojen gazının sepsis üzerindeki etkilerini araştıran çalışmalarında hidrojen gazının miyeloperoksidaz aktivitesini artırdığı, bronkalveolar lavajdaki protein konsantrasyonunu ve serum oksidatif stres ürünlerini azalttığını, ayrıca histolojik olarak dokuları koruduğunu ortaya koymuşlardır (145).

Huang ve arkadaşları ventilatör nedeniyle gelişen akut akciğer hasarında hidrojen gazının etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, ratlara % 2 konsantrasyonda hidrojen gazı inhalasyonu uygulamışlardır. Çalışmalarının sonunda hidrojen gazının akciğerde gelişen ödemi ve inflamatuvar sitokinleri azaltarak akciğer dokusunu ventilatör hasarından önemli ölçüde koruduğunu bildirmişlerdir (146).

Taura ve arkadaşları hidrojen gazının işitme üzerine etkilerini araştırmış ve vestibüler tüy hücrelerinde deneysel oksidatif stres oluşturmuşlardır. Hidrojen gazının



morfolojik olarak vestibüler dokuları koruduğu gibi, vestibüler tüy hücrelerinde oluşan mekano-elektrik sinyal iletim aktivitesini de koruduğunu bulmuşlardır (147).

Huang ve arkadaşları deneysel tavşan modelinde spinal kordda iskemi reperfüzyon hasarı oluşturmuş ve hidrojen gazının İ/R hasarı üzerine etkilerini araştırmıştır. Çalışmalarında hidrojen gazının prostaglandin F-2 $\alpha$  ve malondialdehit gibi inflamatuvar stres ürünlerini ve motor nöronlarda apoptozisi azalttığını bulmuşlardır. Çalışmalarını ayrıcalıklı kılan ise hidrojen gazının süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan sistemlerin serum ve spinal korttaki aktivitesini artırdığını belirtmiş olmalarıdır (148).

Ji ve arkadaşları deneysel travmatik beyin hasarında % 2 konsantrasyondaki hidrojen gazının oksidatif stres üzerine etkisini araştırmıştır. Hidrojen gazının kan beyin bariyeri geçirgenliğini, beyindeki ödemi ve nörolojik disfonksiyonu azaltırken, beyinde endojen antioksidan enzim sistemlerinin aktivitesini artırdığını ortaya koymuşlardır (149).

Qian ve arkadaşları ince barsaklarda akut radyasyon hasarı oluşturdukları deneysel rat modelinde hidrojen gazının etkilerini araştırmıştır. Radyasyona bağlı gelişen ince barsak hasarında hidrojen, serum laktat dehidrojenaz miktarını azaltmakla beraber hücrelerdeki villus kaybını engelleyip, hücre morfolojisi üzerinde doku koruyucu etki yaptığını belirtmişlerdir. Ayrıca çalışmalarında hidrojen alan grupta süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinin plazma konsantrasyonunun arttığını bildirmişlerdir (9). Dokulardaki en güçlü SOR, OH<sup>-</sup> radikalidir. Hidrojen ise OH<sup>-</sup> radikalinin etkilerini selektif olarak inhibe etmektedir. Liu ve arkadaşları akut radyasyon hasarında en fazla OH<sup>-</sup> radikali üretildiği için hidrojenin akut radyasyon hasarında doku koruyucu etkisi olabileceği hipotezine varmıştır (112).

Bizim bilgilerimize göre literatürde, böbrek İ/R hasarında hidrojen gazının etkilerini inceleyen çalışma yoktur. Çalışmamız bu yönüyle bir ilk olma özelliğini taşımaktadır.

Histopatolojik değerlendirmede kontrol grubu böbrek kesitlerinde herhangi bir histopatolojik değişiklik saptanmamıştır. Erken dönem gruplarda glomerüler hasar saptanmazken, böbrek medullası etkilenmemiş olarak izlendi. Tübül epitellerinde ise fırçamsı-kenar kaybı, lüminal yüzeyde sitoplazmik yoğunlaşma ve ayrılmalar, basıklaşma, lüminal dilatasyon ve hyalen silendirler mevcuttu. Bu bulgular Grup 2E’de daha fazla idi ve Grup 3E’ye göre anlamlı fark vardı. Bu histopatolojik bulgular bize hidrojen gazının İ/R hasarının erken döneminde doku koruyucu etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Shingu ve arkadaşları deneysel rat İ/R modelinde intravenöz yolla kullanılan hidrojenin antioksidan etkisini araştırmış ve böbrek dokusunda tübüler hücre nekrozu, stoplazmik vakuol ve tübüler dilatasyon bulgularının hidrojen tedavisi alan grupta belirgin olarak azaldığını belirterek hidrojenin histopatolojik olarak doku koruyucu etkisi olduğunu belirtmişlerdir (150). Medeiros ve arkadaşları sildenafilin renal İ/R hasarı üzerine etkisini araştırmıştır. Sildenafil böbrek dokusunda histopatolojik olarak sellüler nekroz ve tübül dilatasyonunu engellerken; sellüler vakuolizasyon ve intratübüler silindirler üzerine bir etki göstermemiştir (151). Hayashi ve arkadaşları rat İ/R hasarında karvedilolün antioksidatif etkisini araştırmıştır. Karvedilol alan grupta daha az fırçamsı kenar kaybı, tübüler nekroz, tübüler dilatasyon ve hyalin silendirler izlemiş ve karvedilolün dokuları iskemi reperfüzyon hasarından koruduğunu bildirmiştir (152). Fukuda ve arkadaşları karaciğer İ/R hasarı modelinde hidrojen gazının doku koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmalarında hidrojen gazı kullanımının karaciğer hücrelerinde sitoplazmik vakuolizasyonları azaltarak doku koruyucu etki yaptığını belirtmiştir (142). Buchholz ve arkadaşları hidrojen gazının barsak transplantasyonu sırasındaki doku koruyucu etkilerini araştırmış ve hidrojen gazının ince barsak dokularında daha az mukozal erozyon ve epitelyal hasar oluşturarak histopatolojik olarak greft koruyucu etkisi olduğunu belirtmiştir (1).

Geç dönem gruplarda tübül epitellerinde belirgin olarak rejenerasyon bulguları ve basıklaşma, interstisyumda odaksal inflamasyon mevcuttu. Bu bulgular Grup 3G’de daha hafifti ve Grup 2G’ye göre anlamlı fark vardı. Bu da bize hidrojen gazının İ/R hasarının önlenmesinde geç dönemde de etkili olabileceğini göstermektedir. Chaaya ve arkadaşları deneysel rat İ/R modelinde antidepressan ilaç olan pargyline kullanmış ve etkilerini araştırmıştır. Reperfüzyonun 28. gününde yapılan histopatolojik incelemede pargyline verilen grupta tübüler nekroz ve interstisyel fibrozis bulgularına daha az

rastlanmış ve pargylinenin renal iskemide reperfüzyon hasarında doku koruyucu etkisini bildirmişlerdir (129). Seok ve arkadaşları kendi bölgelerine özel Wen-Pi-Tang-Hab-Wu-Ling-San adlı fitoterapik bir ajanın böbrek İ/R hasarı üzerine etkisini araştırmıştır. Reperfüzyonun 14. gününde fitoterapik ajan verilen grupta daha az tübüler atrofi, kollajen artışı ve daha az interstisyel hücre artışı gördüklerini bildirmişlerdir (141). Pereira ve arkadaşları deneysel rat İ/R hasarında sirolimusun doku koruyucu etkisini araştırmıştır. Reperfüzyonun 7. gününde yaptıkları histopatolojik incelemede gruplar arasında belirgin bir fark bulamamıştır (153).

Çalışmamızda geç dönem gruplarda böbrek dokusunda interstisyel fibrozis izlenmemiştir. Seok ve arkadaşları reperfüzyonun 14. gününde fibrozis görülebileceğini bildirmiştir (141). Pereira ve arkadaşları İ/R hasarında fibrozis görülebilmesi için 15 günden daha uzun bir süre gerekli olduğunu açıklamıştır (153). Forbes ve arkadaşları yaptığı çalışmada İ/R hasarından 16 gün sonra fibrozis izlememiş ve fibrozis bulguları 64. gün belirginleşmiştir (136). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda geç dönem gruplarda fibrozis bulgularının görülmemesi deney gruplarının 14. gün ile sınırlanması ile açıklanabilir.

Çalışmamızda glomerüllerin yapısında bir değişiklik olmamıştır. Benzer biçimde Basile ve arkadaşları böbrekte İ/R modelini araştırdıkları çalışmalarında glomerüler yapının değişmediğini bildirmişlerdir (154).

Çalışmamızda önemli bir eksiklik İ/R hasarının belirlenmesinde önemli belirteçler olan TNF- $\alpha$ , 4-hidroksinonenal (4-HNE) gibi moleküllerin çalışması planlanmasına rağmen teknik yetersizlikler nedeniyle doku seviyesinde çalışılmamış olmasıdır. Buchholz ve arkadaşları hidrojen gazının barsak transplantasyonu sırasındaki etkilerini araştırırken barsak dokusunda Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) yöntemiyle TNF-  $\alpha$  ekspresyonunu değerlendirmişler ve hidrojen gazı alan grupta daha az TNF-  $\alpha$  düzeyi olduğunu bildirmiştir (1). Kawamura ve arkadaşları hidrojen gazının akciğer nakli sırasındaki antioksidan etkisini ratlar üzerinde araştırmış ve real time RT-PCR yöntemiyle dokulardan eksprese edilen TNF-  $\alpha$  düzeylerini ölçmüştür. Hidrojen gazı alan gruptaki ratların akciğer dokusundaki TNF-  $\alpha$  ekspresyonu belirgin olarak düşük bulunmuştur (143). Liu ve arkadaşları Toll-like reseptör 4 (TLR-4) inhibitörü olan eritoranın ratlarda böbrek İ/R hasarı üzerine

etkilerini araştırırken Ribonuclease Protection Assay (RPA) yöntemiyle böbrek dokusundaki TNF-  $\alpha$  düzeyini ölçmüş ve eritoran alan grupta TNF-  $\alpha$  seviyesini düşük bulmuştur. Ayrıca eritoran histopatolojik olarak böbrek dokusunu iskemi İ/R hasarından korumuştur (155). Huber ve arkadaşları deneysel rat İ/R hasarında proteazom inhibitörü olan bortezomibin etkilerini araştırmış real time RT-PCR yöntemiyle böbrek dokusunda TNF-  $\alpha$  düzeyine bakmıştır. Bortezomib, TNF-  $\alpha$  ekspresyonunu azaltarak dokuyu iskemi reperfüzyon hasarından korumuştur (156).

4-hydroxynonenal (4-HNE) lipit peroksidasyonun temel ürünü olan aldehit türü bir organik bileşiktir. Normalde vücutta sinyal iletiminde görevlidir ve konsantrasyonu 1 mikromolün altındadır (157). İ/R hasarında hücrede lipit içerikli bileşikler parçalandığı zaman 4-HNE oluşacaktır. İskemi reperfüzyon hasarının şiddeti arttıkça 4-HNE miktarıda artacaktır. Ohsawa ve arkadaşları hidrojen gazı inhalasyonunun İ/R hasarından hücreyi koruduğunu gösterdikleri ilk çalışma olan rat serebral iskemi modelinde, hidrojen gazının dokulardaki 4-HNE miktarını da azalttığını bildirmiştir (10). Ohazawa ve arkadaşları hidrojenin rat retina İ/R hasarındaki etkisini araştırmış ve retina dokusundaki 4-HNE miktarını belirgin olarak az bulmuştur (108). Kawamura ve arkadaşları hidrojen gazının akciğer nakli üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, hidrojen gazı alan grubun akciğer dokulardaki 4-HNE miktarını belirgin olarak düşük bulmuştur (143). Chen ve arkadaşları deneysel rat modelinde hidrojen gazının beyin İ/R hasarı üzerine etkisini araştırmış ve hidrojen gazı alan grupta beyin dokusunda 4-HNE miktarını belirgin olarak daha düşük bulmuştur (158). Lesgards ve arkadaşları SOR'un endojen antioksidan sistemler üzerine etkisini araştırmış ve 4-HNE miktarına bakmıştır. Glutasyon peroksidaz (GPx), glutasyon S-transferaz (GST) ve glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G-6-PDH) antioksidan sistemlerini ayrı ayrı bloke ederek kültür hücrelerinde SOR'un etkisini araştırmış ve sonuçta hepsinin eksikliğinde 4-HNE miktarının arttığını bildirmiştir (159).

Hidrojen gazının inhalasyon yoluyla kullanımından sonra sistemik etkilerini ortaya koyabilmek için özellikle akciğer dokusu değerlendirilmeli, akciğer üzerindeki potansiyel etkileri belirlenmelidir. Benzer şekilde bu aşamada çalışmamızda gerçekleştirilememiş olup, çalışmanın diğer bir eksik yönüdür. Buchholz ve arkadaşları deneysel barsak transplantasyon modelinde hidrojen gazı kullanmış ve hidrojen gazının

akciğer dokusunda nötrofil sayısını, İL-6 ve TNF- $\alpha$  düzeyini anlamlı olarak azaltarak akciğer dokusunu inflamasyondan koruduğunu bildirmiştir (1). Huang ve arkadaşları deneysel ventilatör bağımlı akciğer hasarı modelinde % 2 oranında hidrojen gazı kullanmış ve hidrojen gazının akciğer dokusundaki etkilerini araştırmıştır. Hidrojen gazı, akciğer dokusunda interstisyel ödem, alveolar hemoraji ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunu anlamlı olarak azaltmış ve % 2 konsantrasyondaki hidrojen gazı, akciğerlerde doku koruyucu etki yapmıştır (146).

Hidrojen; böbrek İ/R hasarı, karaciğer İ/R hasarı, kalp İ/R hasarı, ince barsak nakli, kalp nakli, Parkinson, sepsis gibi pek çok hastalık modelinde deneysel olarak kullanılmış ve hepsinde başarılı sonuçlar alınmıştır. Ucuz, kullanımı kolay, yan etkisi çok az olan hidrojen gazı renal İ/R modelinde de hücre koruyucu etkisini göstermiştir. Yeryüzünün hayat kaynağı güneşin enerji kaynağı olan hidrojen üzerinde terapotik amaçlı daha ileri çalışmalar gerekmektedir. Kolay bulunması, basit uygulanması, ucuz olması, farklı mekanizmalarla doku koruyucu etki yapması ve hepsinden önemlisi yapılan deney modellerinde mükemmel sonuçlar alınması nedeniyle klinik uygulamaya girmeyi hak etmektedir. Bu çalışmada hidrojenin deney modelinde İ/R hasarını histopatolojik olarak azalttığı görülmüştür. Bu histopatolojik bulgulardan yola çıkılarak klinikte parsiyel nefrektomi, böbrek nakli ve böbrek vasküler cerrahisi gibi işlemlerde, hidrojen gazı kullanımı ile ameliyat esnasında gelişen İ/R hasarının azaltılabilir olduğunu düşünmekteyiz. Bu çalışma hidrojen gazının doku koruyucu etkisi üzerine yapılacak diğer çalışmalara bir rehber çalışma olması umudu taşımaktadır.

## 6.SONUÇ VE ÖNERİLER

- 1-) Deneysel İ/R modelinde renal pedikülü klemplemekle başarılı iskemi oluşturulabilir.
- 2-) Hidrojen gazı bulunması kolay, ucuz, uygulaması basit ve oldukça etkili antioksidan ajandır.
- 3-) Hidrojen gazının % 2 oranındaki konsantrasyonda patlayıcı etkisi yoktur.
- 4-) Hidrojen gazı operasyondan bir saat önce, operasyon sırasında ve operasyondan bir saat sonra inhalasyon yoluyla kullanılabilir.
- 5-) Çalışmamızda kontrol grubu histopatolojik olarak normal bulunmuştur.
- 6-) Hidrojen gazının deneysel İ/R hasarında histopatolojik olarak doku koruyucu etkisi vardır.
- 7-) Hidrojen gazının sistemik etkilerinin belirlenmesi ve klinik uygulamaya girmesi için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

## KAYNAKLAR

1. Buchholz BM, Kaczorowski DJ, Sugimoto R, Yang R, Wang Y, Billiar TR, McCurry KR, Bauer AJ, Nakao A. Hydrogen inhalation ameliorates oxidative stress in transplantation induced intestinal graft injury. *Am J Transplant* 2008;8: 2015–2024.
2. Snoeijs MG, van Heurn LW, Buurman WA. Biological modulation of renal ischemia-reperfusion injury. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010 Apr;15(2):190-9.
3. Yang B, Jain S, Pawluczyk I Z, Imtiaz S, Bowley L, Ashra S Y, Nicholson M L. Inflammation and caspase activation in long-term renal ischemia/reperfusion injury and immunosuppression in rats. *Kidney Int* 68, (2005) 2050-67
4. Gardès-Albert M. Physico-chemical aspects of reactive oxygen species. *Ann Pharm Fr*. 2006 Nov;64(6):365-72.
5. Setsukinai K, Urano Y, Kakinuma K, Majima HJ, Nagano T. Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J Biol Chem*. 2003 Jan 31;278(5):3170-5.
6. Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*. 2009 Aug 15;47(4):333-43.
7. Barbouti A, Doulias PT, Nouis L, Tenopoulou M, Galaris D. DNA damage and apoptosis in hydrogen peroxide-exposed Jurkat cells: bolus addition versus continuous generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Free Radic Biol Med*. 2002 Sep 1;33(5):691-702.
8. Turrens J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol. (Lond.)* 552, 335–344 (2003).
9. Qian L, Cao F, Cui J, Huang Y, Zhou X, Liu S, Cai J. Radioprotective effect of hydrogen in cultured cells and mice, *Free Radical Research*, March 2010; 44(3): 275–282
10. Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, Watanabe M, Nishimaki K, Yamagata K, Katsura K, Katayama Y, Asoh S, Ohta S. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med* 2007;13: 688–694.

11. Huang CS, Kawamura T, Toyoda Y, Nakao A. Recent advances in hydrogen research as a therapeutic medical gas. *Free Radic Res.* 2010 Sep;44(9):971-82.
12. Gökmen FG, Ertürk M, Bilge O editor: Gövsa FG Üriner sistem Sistematik Anatomi. İzmir Güven Kitapevi 2003. S.531-37
13. Arıncı K, Elhan A. Üriner sistem. Anatomi cilt1 Güneş Kitapevi. pp. (2001) 311-14
14. Dere F Genitoüriner Sistem. Anatomi Atlası ve Ders Kitabı Cilt 2 pp. (1999) 957-976. Adana Nobel tıp Kitapevi
15. Semenza GL. Cellular and molecular dissection of reperfusion injury ROS within and without. *Circ Res.* 2000;86: 117-118.
16. Lin E, Lowry SF, Calvano SE. The systemic response to injury. Schwartz SI (ed). *Principles of Surgery.* Mc Graw-Hill 7th Edition 1999; Vol I: 13-32
17. Cumhuri M, Yener N, Tuncel M. Üriner sistem. Temel Anatomi Ankara Metu press. 2002 S. 257-60
18. Guyton AC, Hall JE: Urine Formation by the Kidneys: I. Glomerular Filtration, Renal Blood Flow, and Their Control: *Textbook of Medical Physiology.* Dokuzuncu baskı. WB Saunders Company Philadelphia, Pennsylvania 1996, S. 315-330
19. Tierney LM, McPhee SJ, Papadakis MA: *Current Medical Diagnosis and Treatment.* Fourty-fifth edition. Watnick S, Morrison G (ed). Lange Medical Books, New York 2006, S.898.
20. Carpenter CCJ, Griggs RC, Loscalzo J: *Cecil Essentials of Medicine.* Beşinci baskı. Chatoth DK (ed). WB Saunders Company Philadelphia, Pennsylvania 2002, S. 223-231.
21. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB: Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg* 161: 488-503, 1991
22. Michell RN, Cotran N, Hücre zedelenmesi, ölümü ve adaptasyonu (H. Aker) Nobel tıp kitapevi yayınları, 2000 S. 3-25.
23. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations and preventations of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* 2001;94: 1133-1138.



24. Gueler F, Park JK, Rong S. Statins attenuate ischemia-reperfusion injury by inducing heme oxygenase-1 in infiltrating macrophages. *Am J Pathol.* 170(4): 192-199,2007.
25. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res.* 2000; 39: 1529-1542.
26. Kuzu MA, K ksoy C, Kale T, Tanık A, Terzi C, Elhan AH, Reperfusion injury delays healing of intestinal anastomosis in a rat. *Am J of Surgery* 1998; 176: 348-351.
27. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN. *Robins Basic Pathology.* Eighth edition. Saunders Elsevier Philadelphia 2007, S.13-58.
28. Akkuş İ. *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik etkileri.* 1. Baskı Konya: Mimoza Yayınları. 1995:3-95.
29. Abu-Amara M, Yang SY, Tapuria N, Fuller B, Davidson B, Seifalian A. Liver ischemia/reperfusion injury: processes in inflammatory networks--a review. *Liver Transpl.* 2010 Sep;16(9):1016-32.
30. Viñas JL, Sola A, Genescà M, Alfaro V, Pí F, Hotter G. NO and NOS isoforms in the development of apoptosis in renal ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med.* 2006 Mar 15;40(6):992-1003.
31. Çakan M, Çakan T, Aydos T, Yilmazer D, Öğüş E, Kılıç AS. Sıçan testisindeki iskemi-reperfüzyon hasarı sonucu oluşan oksidatif stres ve histopatolojik değişiklikler üzerine ketoprofenin koruyucu etkisi, *Türk Üroloji Dergisi,* 2007,33(1): 50-55.
32. Luczaj W, Skrzydlewska E. The present-day look at lipid peroxidation. *Postepy Biochem.* 2006;52(2):173-9.
33. Usmar VD, Radomski M. Free radicals in the vasculature: the good, the bad and the ugly. *The Biochemist.* 1994; 15-18.
34. Halliwell B. and Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine,* Oxford University Press, Oxford, (1999) p. 783.
35. Ono T, Tsuruta R, Fujita M, Aki HS, Kutsuna S, Kawamura Y, et all. Xanthine oxidase is one of the major sources of superoxide anion radicals in blood after reperfusion in rats with forebrain ischemia/reperfusion. *Brain Res.* 2009 Dec 11;1305:158-67.

36. Furuichi K, Wada K, Iwata Y, Kitagawa K, Kobayashi K, Hashimoto H. CCR2 Signaling Contributes to Ischemia-Reperfusion Injury in Kidney. *J Am Soc Nephrol* 2003;14: 2503-2515.
37. Wall J. Antioxidants In Prevention Of Reperfusion Damage Of Vascular Endothelium. *TSMJ* May 2000;1: 67-70.
38. Armstrong D. Oxygen Consumption Methods. *Free Radical and Antioxidant Protocols*, Humana press, Totova, New Jersey, 1998:1-5.
39. Lee JC, Son YO, Choi KC, Jang YS. Hydrogen peroxide induces apoptosis of BJAB cells due to formation of hydroxyl radicals via intracellular iron-mediated Fenton chemistry in glucose oxidase-mediated oxidative stress. *Mol Cells*. 2006 Aug 31;22(1):21-9.
40. Koppenol WH. The Haber-Weiss cycle--70 years later. *Redox Rep*. 2001;6(4):229-34.
41. Contestabile A. Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. *Brain Res Rev*. 2000; 32(2-3): 476-509.
42. Hetrick EM, Schoenfisch MH. Analytical chemistry of nitric oxide. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*. 2009; 2: 409-33.
43. Faraci FM, Brian JE Jr. Nitric oxide and the cerebral circulation. *Stroke* 1994; 25(3):692-703.
44. Weerateerangkul P, Chattipakorn S, Chattipakorn N. Roles of the nitric oxide signaling pathway in cardiac ischemic preconditioning against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Med Sci Monit*. 2011 Feb 1;17(2):RA44-52.
45. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. 2001; 357(Pt 3): 593-615.
46. Wu G, Bazer FW, Davis TA, Kim SW, Li P, Marc Rhoads J, et al. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids*. 2009 May;37(1):153-68.
47. Wang LM, Tian XF, Song QY, Gao ZM, Luo FW, Yang CM. Expression and role of inducible nitric oxide synthase in ischemia reperfusion liver in rats, *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, 2003, 2: 252-258.

48. Sasaki M, Takashi J, Oxidative stress and ischemia-reperfusion injury in gastrointestinal tract and antioxidant, protective agents, 2006 *J. Clin. Biochem. Nutr.* 40: 1-12.
49. Cuzzocrea S, Salvemini D. Molecular mechanisms involved in the reciprocal regulation of cyclooxygenase and nitric oxide synthase enzymes, *Kidney International*, 2007, 71: 290-297.
50. Cauwels A. Nitric oxide in shock, *Kidney International*, 2007, 72: 557-565.
51. Kosonen O, Kankaanranta H, Malo-Ranta U: Nitric oxide-releasing compounds inhibit neutrophil adhesion to endothelial cells. *Eur J Pharmacol.* Oct 382: 111-117,1999.
52. Mark LA, Robinson AV, Schulak JA. Inhibition of Nitric Oxide Synthase reduces Renal Ischemia/Reperfusion Injury, *Journal of Surgical Research*, 2005, 129:236-241.
53. Fotiou S, Fotiou D, Deliconstantinos G. Formation of heme-iron complexes with nitric oxide (NO) and peroxynitrite (ONOO-) after ultraviolet radiation as a protective mechanism in rat skin. *In Vivo.* 2009 Mar-Apr;23(2):281-6.
54. Zhu J, Meeusen J, Krezoski S, Petering DH. Reactivity of Zn-, Cd-, and apo-metallothionein with nitric oxide compounds: in vitro and cellular comparison. *Chem Res Toxicol.* 2010 Feb 15;23(2):422-31.
55. Hanmura T, Ichihashi M, Watanabe Y, Isomura N, Kondow T. Reactions of nitrogen monoxide on cobalt cluster ions: reaction enhancement by introduction of hydrogen. *J Phys Chem A.* 2007 Jan 25;111(3):422-8.
56. Grisham MB, Jour'd'Heuil D, Wink DA. Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol.* 1999; 276(2 Pt 1): G315-21.
57. Evans CAR, Diplock AT, Symons MCR. Introduction to free radicals and mechanisms of radical production *Techniques in free radical research volume 22*, Elsevier, London, New York, Tokyo, 1991:1-49.
58. Chamoun F, Burne MO, Donnel M, Rabb H: Pathophysiological role of selectins and their ligands in ischemia reperfusion injury. *Front. Biosci.* 2000(5): 103-109.

59. Koyama S, Sato E, Masubuchi T, Takamizawa A, Kubo K, Nagai S, Izumi T. Alveolar type II-like cells release G-CSF as neutrophil chemotactic activity. *Am J Physiol.* 1998 Oct;275(4 Pt 1):L687-93.
60. Beeh KM, Kornmann O, Buhl R, Culpitt SV, Giembycz MA, Barnes PJ. Neutrophil chemotactic activity of sputum from patients with COPD: role of interleukin 8 and leukotriene B4. *Chest.* 2003 Apr;123(4):1240-7.
61. Lemay S, Rabb H, Postler G, Singh AK: Prominent and sustained up-regulation of gp130-signaling cytokines and of the chemokine MIP-2 in murine renal ischemia reperfusion injury. *Transplantation* 69: 959-963, 2000.
62. Vrints CJ. Pathophysiology of the no-reflow phenomenon. *Acute Card Care.* 2009;11(2):69-76.
63. Menger MD, Rucker M, Vollmar B. Capillary dysfunction in striated muscle ischemia/reperfusion: On the mechanisms of capillary “no-reflow”. *Shock* 8: 2-7,1997.
64. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, et al: Ischemia/Reperfusion injury. *J Surg Res* 105: 248-258, 2002.
65. Orlinksky M, Shoemaker W, Reis ED, et al: Current controversies in shock and resuscitation. *Surg Clin North Am* 81: 1217-1262, 2001.
66. Childs EW, Udopi KF, Wood JG, et al: In vivo visualization of reactive oxidants and leukocyte-endothelial adherence following hemorrhagic shock. *Shock* 8: 16-25, 2002.
67. Winterbourn CC, Hampton MB, Livesey JH, Kettle AJ. Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: implications for microbial killing. *J Biol Chem.* 2006 Dec 29;281(52):39860-9.
68. Chapman AL, Skaff O, Senthilmohan R, Kettle AJ, Davies MJ. Hypobromous acid and bromamine production by neutrophils and modulation by superoxide. *Biochem J.* 2009 Feb 1;417(3):773-81.
69. Siriussawakul A, Zaky A, Lang JD. Role of nitric oxide in hepatic ischemia-reperfusion injury. *World J Gastroenterol.* 2010 Dec 28;16(48):6079-86.
70. Lakhan SE, Kirchgessner A, Hofer M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med.* 2009 Nov 17;7: 97. Review

71. Park P, Haas M, Cunningham PN, Bao L, Alexander JJ, Quigg RJ: Injury in renal ischemia- reperfusion is independent from immunoglobulins and T lymphocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 282: 352-357, 2002.
72. Patel NSA, Chatterjee PK, Di Paola R, Mazzon E, Britti D, De Sarro A, Cuzzocrea S, Thiemermann C: Endogenous Interleukin-6 Enhances the Renal Injury, Dysfunction, and Inflammation Caused by Ischemia/Reperfusion. *J Pharmacol and Exper Ther* 312: 1170-1178, 2005.
73. Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G: Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 364: 1814-1827, 2004.
74. Zager RA, Johnson AC, Hanson SY, Lund S. Ischemic proximal tubular injury primes mice to endotoxin-induced TNF-alpha generation and systemic release. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005 Aug;289(2):F289-97.
75. Derwesh IH, Novick AC. Mechanism of renal ischaemic injury and their clinical impact. *BJU International* 2005;95: 948-950.
76. Esposito E, Cuzzocrea S. TNF-alpha as a therapeutic target in inflammatory diseases, ischemia-reperfusion injury and trauma. *Curr Med Chem*. 2009;16(24):3152-67.
77. Sahna E, Parlakpınar H, Oztürk F, Cigremis Y, Acet A: The protective effects of physiological and pharmacological concentrations of melatonin on renal ischemiareperfusion injury in rats. *Urol Res* 31: 188-193, 2003.
78. Donnahoo KK, Shames BD, Harken AH, Meldrum DR. Review article: the role of tumor necrosis factor in renal ischemia-reperfusion injury. *J Urol*. 1999 Jul;162(1):196-203.
79. Iannitti T, Palmieri B. Antioxidant therapy effectiveness: an up to date. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2009 Jul-Aug;13(4):245-78.
80. Cross CE, Halliwell B, Borish ET. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med*. 1987; 107:526-545.
81. Strocchi A, Levitt MD. Maintaining intestinal H<sub>2</sub> balance: credit the colonic bacteria. *Gastroenterology* 1992;102: 1424 – 1426.
82. Levitt MD, Bond JH, Jr. Volume, composition, and source of intestinal gas. *Gastroenterology* 1970;59: 921 – 929.

83. Schneider AR, Jepp K, Murczynski L, Biniek U, Stein J. The inulin hydrogen breath test accurately reflects oro-caecal transit time. *Eur J Clin Invest* 2007;37: 802 – 807.
84. Di Camillo M, Marinaro V, Argnani F, Foglietta T, Vernia P. Hydrogen breath test for diagnosis of lactose malabsorption: the importance of timing and the number of breath samples. *Can J Gastroenterol* 2006;20: 265 – 268.
85. Thauer RK, Jungermann K, Decker K. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol Rev* 1977;41: 100 – 180.
86. Nakao A, Sugimoto R, Billiar TR, McCurry KR. Therapeutic antioxidant medical gas. *J Clin Biochem Nutr* 2009; 44: 1 – 13.
87. George JF, Agarwal A. Hydrogen: another gas with therapeutic potential. *Kidney Int* 2010; 77: 85 – 87.
88. Kajiyama S, Hasegawa G, Asano M, Hosoda H, Fukui M, Nakamura N, Kitawaki J, Imai S, Nakano K, Ohta M, Adachi T, Obayashi H, Yoshikawa T. Supplementation of hydrogen-rich water improves lipid and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes or impaired glucose tolerance. *Nutr Res*. 2008; 28: 137–143.
89. Xie K, Yu Y, Zhang Z, Liu W, Pei Y, Xiong L, Hou L, Wang G. Hydrogen gas improves survival rate and organ damage in zymosan-induced generalized inflammation model. *Shock*, 2010 mar 23.
90. Sun Q, Kang Z, Cai J, Liu W, Liu Y, Zhang JH, Denoble PJ, Tao H, Sun X. Hydrogen-rich saline protects myocardium against ischemia/reperfusion injury in rats. *Exp Biol Med*(Maywood) 2009;234:1212 – 1219.
91. Chen XL, Zhang Q, Zhao R, Medford RM. Superoxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and iron are required for TNF- $\alpha$ -induced MCP-1 gene expression in endothelial cells: role of Rac1 and NADPH oxidase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286:1001 – 1007.
92. Mao YF, Zheng XF, Cai JM, You XM, Deng XM, Zhang JH, Jiang L, Sun XJ. Hydrogen-rich saline reduces lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;381:602 – 605.

93. Suzuki Y, Sano M, Hayashida K, Ohsawa I, Ohta S, Fukuda K. Are the effects of alpha-glucosidase inhibitors on cardiovascular events related to elevated levels of hydrogen gas in the gastrointestinal tract. *FEBS Lett* 2009;583:2157 – 2159.
94. Nakashima-Kamimura N, Mori T, Ohsawa I, Asoh S, Ohta S. Molecular hydrogen alleviates nephrotoxicity induced by an anti-cancer drug cisplatin without compromising anti-tumor activity in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009; 64: 753 – 761.
95. Cai J, Kang Z, Liu K, Liu W, Li R, Zhang JH, Luo X, Sun X. Neuroprotective effects of hydrogen saline in neonatal hypoxia-ischemia rat model. *Brain Res* 2009;1256:129 – 137.
96. Chen H, Sun YP, Hu PF, Liu WW, Xiang HG, Li Y, Yan RL, Su N, Ruan CP, Sun XJ, Wang Q. The effects of hydrogen-rich saline on the contractile and structural changes of intestine induced by ischemia-reperfusion in rats. *J Surg Res* 2009; Aug 27.
97. Fujita K, Seike T, Yutsudo N, Ohno M, Yamada H, Yamaguchi H, Sakumi K, Yamakawa Y, Kido MA, Takaki A, Katafuchi T, Tanaka Y, Nakabeppu Y, Noda M. Hydrogen in drinking water reduces dopaminergic neuronal loss in the 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *PLoS One* 2009;4:e7247.
98. Guglielmotto M, Tamagno E, Danni O. Oxidative stress and hypoxia contribute to Alzheimer's disease pathogenesis: two sides of the same coin. *Sci World J* 2009;9: 781 – 791.
99. Chen C, Chen Q, Mao Y, Xu S, Xia C, Shi X, Zhang JH, Yuan H, Sun X. Hydrogen-rich saline protects against spinal cord injury in rats. *Neurochem Res* 2010; 35: 1111–1118.
100. Zhang Y, Sun Q, He B, Xiao J, Wang Z, Sun X. Anti-inflammatory effect of hydrogen-rich saline in a rat model of regional myocardial ischemia and reperfusion. *Int J Cardiol.* 2010 Sep 17.

101. Nakao A, Kaczorowski DJ, Wang Y, Cardinal JS, Buchholz BM, Sugimoto R, Tobita K, Lee S, Toyoda Y, Billiar TR, McCurry KR. Amelioration of rat cardiac cold ischemia/reperfusion injury with inhaled hydrogen or carbon monoxide, or both. *J Heart Lung Transplant* 2010; 29: 544–553.
102. Ohsawa I, Nishimaki K, Yamagata K, Ishikawa M, Ohta S. Consumption of hydrogen water prevents atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;377:1195 – 1198.
103. Yoshimi N, Ikura Y, Sugama Y, Kayo S, Ohsawa M, Yamamoto S, Inoue Y, Hirata K, Itabe H, Yoshikawa J, Ueda M. Oxidized phosphatidylcholine in alveolar macrophages in idiopathic interstitial pneumonias. *Lung* 2005;183:109 – 121.
104. Whidden MA, McClung JM, Falk DJ, Hudson MB, Smuder AJ, Nelson WB, Powers SK. Xanthine oxidase contributes to mechanical ventilation-induced diaphragmatic oxidative stress and contractile dysfunction. *J Appl Physiol* 2009;106:385 – 394.
105. Liu Q, Shen W, Sun H, Fan D, Nakao A, Cai J, Yan G, Zhou W, Shen R, Yang J, Sun X. Hydrogen-rich saline protects against liver injury in rats with obstructive jaundice. *Liver Int* 2010; May 21.
106. Chen H, Sun YP, Li Y, Liu WW, Xiang HG, Fan LY, Sun Q, Xu XY, Cai JM, Ruan CP, Su N, Yan RL, Sun XJ, Wang Q. Hydrogen-rich saline ameliorates the severity of l-arginine induced acute pancreatitis in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 393:308–313.
107. Clapper ML, Cooper HS, Chang WC. Dextran sulfate sodium-induced colitis-associated neoplasia: a promising model for the development of chemopreventive interventions. *Acta Pharmacol Sin* 2007;28: 1450 – 1459.
108. Oharazawa H, Igarashi T, Yokota T, Fujii H, Suzuki H, Machide M, Takahashi H, Ohta S, Ohsawa I. Protection of the retina by rapid diffusion of hydrogen administration of hydrogen-loaded eye drops in retinal ischemia/reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51: 487 – 492.



109. Itoh T, Fujita Y, Ito M, Masuda A, Ohno K, Ichihara M, Kojima T, Nozawa Y. Molecular hydrogen suppresses FcεRI-mediated signal transduction and prevents degranulation of mast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;389:651 – 656.
110. Grundy SM, Brewer HB, Jr, Cleeman JI, Smith SC, Jr, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 2004;109:433 – 438.
111. Holvoet P, Lee DH, Steffes M, Gross M, Jacobs DR, Jr. Association between circulating oxidized low-density lipoprotein and incidence of the metabolic syndrome. *JAMA* 2008;299:2287 – 2293.
112. Liu C, Cui J, Sun Q, Cai J. Hydrogen therapy may be an effective and specific novel treatment for acute radiation syndrome. *Med Hypotheses* 2009;74: 145 – 146.
113. Saitoh Y, Harata Y, Mizuhashi F, Nakajima M, Miwa N. Biological safety of neutral-pH hydrogen-enriched electrolyzed water upon mutagenicity, genotoxicity and subchronic oral toxicity. *Toxicol Ind Health* 2010; 26: 203–216.
114. Nakao A, Toyoda Y, Sharma P, Evans M, Guthrie N. Effectiveness of hydrogen rich water on antioxidant status of subjects with potential metabolic syndrome-an open label pilot study. *J Clin Biochem Nutr* 2010;46: 140 – 149.
115. Kennedy E S, Erlich H J. Murine renal ischaemia-reperfusion injury. *Nephrology* 2008; 13, 390–396.
116. Yang B, Jain S, Ashra SY, Furness PN, Nicholson ML. Apoptosis and caspase-3 in long-term renal ischemia/reperfusion injury in rats and divergent effects of immunosuppressants. *Transplantation*. 2006 May 27;81(10):1442-50.
117. Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure. *N Engl J Med*. 1996;334:1448-60.
118. Paller MS. Acute renal failure: controversies, clinical trials, and future directions. *Semin Nephrol*. 1998;18: 482-9.

119. Woolfson R G, Millar C G, Neild G H (1994) Ischaemia and reperfusion injury in the kidney: current status and future direction. *Nephrol Dial Transplant* 9, 1529-31.
120. Chatterjee PK, Cuzzocrea S, Thiemeermann C. Inhibitors of poly (ADP-ribose) synthetase protect rat proximal tubular cells against oxidant stress. *Kidney Int.* 1999;56: 973-84.
121. Lameire N, Van Biesen W, Vanholder R. Acute renal failure. *Lancet* 365: 417–430, 2005.
122. Andreoli SP: Reactive oxygen metabolites, oxidant injury and renal disease. *Pediatr Nephrol* 1991; 5: 733-742.
123. Greene EL, Paller MS: Oxygen free radicals in acute renal failure. *Miner Electrolyte Met* 1991; 17: 124-132.
124. Chatterjee PK, Cuzzocrea S, Brown PA, et al. Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces oxidant stress-mediated renal dysfunction and injury in the rat. *Kidney Int.* 2000;58: 658-73.
125. Singh D, Chander V, Chopra K. The effect of quercetin, a bioflavonoid on ischemia/reperfusion induced renal injury in rats. *Arch Med Res.* 2004;35: 484-94.
126. Koga H, Hagiwara S, Kusaka J, Matsumoto S, Nishida T, Yokoi I, Noguchi T. Human Atrial Natriuretic Peptide Attenuates Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *J Surg Res.* 2010 Nov 4.
127. Peglow S, Toledo AH, Anaya-Prado R, Lopez-Neblina F, Toledo-Pereyra LH. Allopurinol and xanthine oxidase inhibition in liver ischemia reperfusion. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2010 Sep 29.
128. Kanter M. Protective effects of melatonin on testicular torsion/detorsion-induced ischemia-reperfusion injury in rats. *Exp Mol Pathol.* 2010 Dec;89(3):314-20.
129. Chaaya R, Alfarano C, Guilbeau-Frugier C, Coatrieux C, Kesteman AS, Parini A, Fares N, Gue M, Schanstra JP, Bascands JL. Pargyline reduces renal damage associated with ischemia-reperfusion and cyclosporin. *Nephrol Dial Transplant.* 2010 Jul 28.

130. Kusaka J, Hagiwara S, Hasegawa A, Kudo K, Koga H, Noguchi T. Cepharanthine Improves Renal Ischemia-reperfusion Injury in Rats. *J Surg Res.* 2010 Feb 11.
131. Jaeschke H, Smith CV, Mitchell JR, Reactive oxygen species during ischemia-reflow injury in isolated perfused rat liver, *J. Clin. Invest.* 81 (1988) 1240–1246.
132. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 1–85.
133. Bektasoglu B, Celik SE, Ozyurek M, Guclu K, Apak R, Novel hydroxyl radical scavenging antioxidant activity assay for watersoluble antioxidants using a modified CUPRAC method, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345 (2006) 1194–1200.
134. Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003; 14: 2199–210.
135. Chatterjee PK, Thiemermann C. An in vivo model of ischemia/reperfusion and inflammation of the kidneys of the rat. *Methods Mol Biol.* 2003;225:223-37.
136. Forbes JM, Hewitson TD, Becker GJ, Jones CL. Ischemic acute renal failure: Long-term histology of cell and matrix changes in the rat. *Kidney Int.* 2000; 57: 2375–85.
137. Jain S, Bicknell GR, Nicholson ML. Molecular changes in extracellular matrix turnover after renal ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg.* 2000 Sep;87(9):1188-92.
138. Desai MM, Gill IS, Ramani AP, Spaliviero M, Rybicki L, Kaouk JH. The impact of warm ischaemia on renal function after laparoscopic partial nephrectomy. *BJU Int* 95 (2005); 377-83.
139. Humphreys MR, Castle EP, Lohse CM, Sebo TJ, Leslie KO, Andrews PE. Renal ischemia time in laparoscopic surgery: an experimental study in a porcine model. *Int J Urol.* 2009;16: 105–9.
140. Orvieto MA, Tolhurst SR, Chuang MS, Lyon MB, Ritch CR, Rapp DE, Shalhav AL. Defining maximal renal tolerance to warm ischemia in porcine laparoscopic and open surgery model. *Urology.* 2005;66: 1111–5.

141. Seok YM, Kim J, Park MJ, Boo YC, Park YK, Park KM. Wen-pi-tang-Hab-Wu-ling-san attenuates kidney fibrosis induced by ischemia/reperfusion in mice. *Phytother Res.* 2008 Aug;22(8):1057-63.
142. Fukuda K, Asoh S, Ishikawa M, Yamamoto Y, Ohsawa I, Ohta S. Inhalation of hydrogen gas suppresses hepatic injury caused by ischemia/reperfusion through reducing oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;361:670–674.
143. Kawamura T, Huang CS, Tochigi N, Lee S, Shigemura N, Billiar TR, Okumura M, Nakao A, Toyoda Y. Inhaled Hydrogen Gas Therapy for Prevention of Lung Transplant-Induced Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. *Transplantation.* 2010 Nov 2.
144. Hayashida K, Sano M, Ohsawa I, Shinmura K, Tamaki K, Kimura K, Endo J, Katayama T, Kawamura A, Kohsaka S, Makino S, Ohta S, Ogawa S, Fukuda K. Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Aug 15;373(1):30-5.
145. Xie K, Yu Y, Pei Y, Hou L, Chen S, Xiong L, Wang G. Protective effects of hydrogen gas on murine polymicrobial sepsis via reducing oxidative stress and HMGB1 release. *Shock.* 2010 Jul;34(1):90-7.
146. Huang CS, Nakao A, Lee S, Wang Z, Shigemura N, Billar TR, Luketich J, and Toyoda Y. Hydrogen Gas Inhalation Attenuates Ventilator-Induced Lung Injury In Mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 15 Dec 2010; 181: A3751.
147. Taura A, Kikkawa YS, Nakagawa T, Ito J. Hydrogen protects vestibular hair cells from free radicals. *Acta Otolaryngol Suppl.* 2010 Nov;(563):95-100.
148. Huang Y, Xie K, Li J, Xu N, Gong G, Wang G, Yu Y, Dong H, Xiong L. Beneficial Effects of Hydrogen Gas against Spinal Cord Ischemia-Reperfusion Injury in Rabbits. *Brain Res.* 2010 Dec 30.
149. Ji X, Liu W, Xie K, Liu W, Qu Y, Chao X, Chen T, Zhou J, Fei Z. Beneficial effects of hydrogen gas in a rat model of traumatic brain injury via reducing oxidative stress. *Brain Res.* 2010 Oct 1;1354:196-205.
150. Shingu C, Koga H, Hagiwara S, Matsumoto S, Goto K, Yokoi I, Noguchi T. Hydrogen-rich saline solution attenuates renal ischemia-reperfusion injury. *J Anesth.* 2010 Aug;24(4):569-74.

151. Medeiros PJ, Villarim Neto A, Lima FP, Azevedo IM, Leão LR, Medeiros AC. Effect of sildenafil in renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Acta Cir Bras.* 2010 Dec;25(6):490-5.
152. Hayashi T, De Velasco MA, Saitou Y, Nose K, Nishioka T, Ishii T, Uemura H. Carvedilol protects tubular epithelial cells from ischemia-reperfusion injury by inhibiting oxidative stress. *Int J Urol.* 2010 Dec;17(12):989-95.
153. Pereira BJ, Castro I, Burdmann EA, Malheiros DMA and Yu L. Effects of sirolimus alone or in combination with cyclosporine A on renal ischemia/reperfusion injury. *Braz J Med Biol Res*, August 2010, Volume 43(8) 737-744.
154. Basile DP, Donohoe D, Roethe K, Osborn JL. Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function. *Am J Physiol Renal Physiol* 281:F887-F889, 2001.
155. Liu M, Gu M, Xu D, Lv Q, Zhang W, Wu Y. Protective effects of Toll-like receptor 4 inhibitor eritoran on renal ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc.* 2010 Jun;42(5):1539-44.
156. Huber JM, Tagwerker A, Heininger D, Mayer G, Rosenkranz AR, Eller K. The proteasome inhibitor bortezomib aggravates renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009 Aug;297(2): F451-60.
157. Petersen DR, Doorn JA. Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free Radic Biol Med.* 2004 Oct 1;37(7):937-45.
158. Chen CH, Manaenko A, Zhan Y, Liu WW, Ostrowki RP, Tang J, Zhang JH. Hydrogen gas reduced acute hyperglycemia-enhanced hemorrhagic transformation in a focal ischemia rat model. *Neuroscience.* 2010 Aug 11;169(1):402-14
159. Lesgards JF, Gauthier C, Iovanna J, Vidal N, Dolla A, Stocker P. Effect of reactive oxygen and carbonyl species on crucial cellular antioxidant enzymes. *Chem Biol Interact.* 2011 Jan 7.