

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON
ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA OLUŞTURULAN RENAL İSKEMİ
REPERFÜZYON MODELİNDE ASKORBİK ASİT VE
MAGNEZYUMUN ETKİNLİĞİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

DR. URAL CAN EKMEKÇİ

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2020

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON
ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA OLUŞTURULAN RENAL İSKEMİ
REPERFÜZYON MODELİNDE ASKORBİK ASİT VE
MAGNEZYUMUN ETKİNLİĞİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. URAL CAN EKMEKÇİ

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Saniye Deniz ÖZZEYBEK

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, hekimlik sanatının ve anesteziyolojinin temel ilkelerini öğrendiğim değerli hocalarım, Sayın Prof. Dr. Erol Gökel'e, Sayın Prof. Dr. Semih Küçükgüçlü'ye, Sayın Prof. Dr. Bahar Kuvaki Balkan'a, Sayın Prof. Dr. Ali Necati Gökmen'e, Sayın Prof. Dr. Leyla İyilikçi Karaoğlan'a, Sayın Prof. Dr. Hasan Hepağuşlar'a, Sayın Prof. Dr. Ayşe Karacı'ya, Sayın Prof. Dr. Fikret Maltepe'ye, Sayın Prof. Dr. Sevda Özkardeşler'e, Sayın Prof. Dr. Uğur Koca'ya, Sayın Prof. Dr. Çimen Olguner'e, Sayın Prof. Dr. Bülent Serhan Yurtlu'ya, Sayın Prof. Dr. Volkan Hancı'ya, Sayın Doç. Dr. Ferim Günenç'e, Sayın Doç. Dr. Yüksel Erkin'e, Sayın Doç. Dr. Aydın Taşdöğen'e, Sayın Doç. Dr. Dilek Ömür Arça'ya, Sayın Doç. Dr. Elvan Öçmen'e, Sayın Doç. Dr. Hale Aksu Erdost'a, değerli bilgilerinden yararlandığım ve eğitimime katkıda bulunan uzmanlarımız Sayın Uzm. Dr. Nilay Boztaş'a, Sayın Uzm. Dr. İçten Ezgi İnce'ye, Sayın Uzm. Dr. Gül İnan'a, Sayın Uzm. Dr. Sibel Büyükçoban'a, Sayın Uzm. Dr. Mine Sarı'ya, Sayın Uzm. Dr. Zeynep Tuncer'e,

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tez araştırmamı yapmaya başladığım ilk günden bitimine kadar tüm çalışmalarımnda yardımlarını esirgemeyen, destekleyen ve katkı sunan danışman hocam Prof. Dr. Saniye Deniz Özzeybek'e,

Tez çalışmamın her aşamasında büyük bir sabır ve özveriyle katkıda bulunan ve deneysel uygulamasında bilgi ve deneyimlerini özveri ile paylaşan Sayın Doç. Dr. Şule Özbilgin'e ve Sayın Doç. Dr. Mücahit Özbilgin'e,

Tezimde emeği geçen ve çalışmamın sonuçlarına en hızlı şekilde ulaşmamı sağlayan Sayın Prof. Dr. Semra Koçtürk'e, Sayın Prof. Dr. Güven Erbil'e, Araş. Gör. Gökçen Bilici'ye, Araş. Gör. Tuğba Erkmen'e ve Araş. Gör. Özgün Kımızıoğlu'na,

Uzmanlık eğitimi ve tez çalışmam sürecinde desteğini ve sevgisini her zaman hissettiğim Anesteziyoloji ve Reanimasyon ABD Sekreteri Emine Çetinkaya'ya,

Uzmanlık eğitimim boyunca beraber çalıştığımız tüm asistan arkadaşlarıma,

Bugünlere gelmemde büyük emekleri bulunan, her zaman yanımda olan, desteklerini ve sevgilerini hep hissettiren aileme,

Sevgi ve saygılarımla sonsuz teşekkür ederim.

URAL CAN EKMEKÇİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TABLO LİSTESİ.....	III
ŞEKİL LİSTESİ	IV
GRAFİK LİSTESİ	V
RESİM LİSTESİ	VI
KISALTMALAR.....	VII
ÖZET	1
SUMMARY	2
1.GİRİŞ VE AMAÇ	3
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1.İskemi	5
2.2.Reperfüzyon	6
2.3.Böbrek İskemi Reperfüzyon Hasarı	8
2.4.Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanlar.....	9
2.5.İskemik Önkoşullama.....	11
2.6.Farmakolojik Koşullama	12
2.7.Askorbik Asit.....	13
2.8.Magnezyum	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1.Anestezi Uygulaması.....	18
3.2.Deney Grupları ve Protokol	18
3.3.Deneysel Çalışma Modeli	20
3.4.Biyokimyasal İncelemeler.....	21
3.5.Renal Dokunun Histomorfolojik İncelemeleri	22
3.6.Dışlama Kriterleri.....	22
3.7.İstatistiksel Değerlendirme.....	22
4. BULGULAR	23
4.1.Biyokimyasal Bulgular.....	23
4.2.Histomorfolojik Bulgular	26

5. TARTIŞMA.....	32
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	36
7. KAYNAKLAR.....	37
EK: Etik Kurul Onayı	



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1. Antioksidanların Sınıflaması.....	11
Tablo 2: Biyokimyasal Bulgular	23
Tablo 3: TUNEL Sayım Sonuçları.....	30



SEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1. İskemi sonucunda hücrelerde gerçekleşen metabolik değişiklikler.....	5
Şekil 2. İskemide pürin metabolizması ve reperfüzyonda oksijen radikali oluşumu.....	7
Şekil 3. Serbest oksijen radikallerinin hücredeki etkileri	10
Şekil 4. Deney protokolünün şematik görünümü.....	19
Şekil 5. Tübüler hasarın belirlenmesi için seçilen 5 standart alan	22



GRAFİK LİSTESİ

Sayfa No

Grafik 1. Sıçanlardan alınan kan örneklerinde ölçülen BUN düzeyleri.....	23
Grafik 2. Sıçanlardan alınan kan örneklerinde ölçülen kreatin düzeyleri	24
Grafik 3. Sıçanlardan alınan böbrek dokularında ölçülen MDA düzeyleri	24
Grafik 4. Sıçanlardan alınan böbrek dokularında ölçülen GSH düzeyleri.....	24
Grafik 5. TUNEL boyamaya göre apoptotik hücre sayıları	30



RESİM LİSTESİ

Sayfa No

Resim 1. Anestezi altında laparotomi uygulanması.....	20
Resim 2. Renal pediküllerin açığa çıkarılması ve pediküllerin klemplenmesi.....	21
Resim 3. Sham grubuna ait kesitler	26
Resim 4. İskemi reperfüzyon grubuna ait kesitler	27
Resim 5. Askorbik Asit grubuna ait kesitler.....	27
Resim 6. Magnezyum grubuna ait kesitler	28
Resim 7. Askorbik Asit + Magnezyum grubuna ait kesitler.....	28
Resim 8. PAS boyaması yapılan grupların kesitleri	29
Resim 9. TUNEL incelemesi yapılan grupların kesitleri.....	31

KISALTMALAR

İR: İskemi-Reperfüzyon

İÖK: İskemik Ön Koşullama

UIÖK: Uzak İskemik Önkoşullama

O₂: Oksijen

Na⁺: Sodyum

K⁺: Potasyum

ATP: Adenozin Trifosfat

H₂CO₃: Karbonik Asit

Ca⁺²: Kalsiyum

AMP: Adenozin Monofosfat

KDH: Ksantin Dehidrogenaz

KO: Ksantin Oksidaz

NAD: Nikotinamid Adenin Dinüklotid

NADP: Nikotinamid Adenin Dinüklotid Fosfat

SOR: Serbest Oksijen Radikalleri

BUN: Kan Üre Azotu

ADP: Adenozin Difosfat

C: Kompleman

TNF: Tümör Nekroz Faktör

IL: İnterlökin

cGMP: Siklik Guanozin Monofosfat

GFH: Glomerüler Filtrasyon Hızı

NO: Nikrik Oksit

NOS: Nikrik Oksit Sentaz

cAMP: Siklik Adenozin Monofosfat

İp: İntraperitoneal

MDA: Malonil Dialdehid

GSH: Glutasyon

NMDA: N-Metil D-Aspartat

H&E: Hematoksilen&Eozin

PAS: Periyodik Asit Schiff

TUNEL: Terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP nick end labeling

ÖZET

Sıçanlarda Oluşturulan Renal İskemi Reperfüzyon Modelinde Askorbik Asit Ve Magnezyumun Etkinliğinin Karşılaştırılması

Dr.Ural Can EKMEKÇİ, DEÜTF Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD, İZMİR

Amaç: Cerrahi girişimler sırasında iskemi reperfüzyon hasarından en çok etkilenen organlardan biri böbrektir. Bu çalışmanın amacı; sıçanlarda oluşturulan renal iskemi reperfüzyon hasarı modelinde iskemi öncesi uygulanan askorbik asit ve magnezyumun ayrı ayrı ve birlikte uygulanmasının etkinliğinin araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: DEÜ Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu onayının ardından ağırlıkları 250-300 g arasında değişen 35 adet Wistar albino cinsi erkek sıçan 5 gruba ayrıldı. Sham Grubu (n=7)'na laparotomi, diğer gruplara 45 dak iskemi ve 240 dak reperfüzyon uygulandı. İR Grubu (n=7)'na ilaç uygulanmadı. Askorbik Asit Grubu(n=7)'na iskemiden 1 saat önce 250 mg/kg askorbik asit, Magnezyum Grubu (n=7)'na iskemiden 1 saat önce 200 mg/kg magnezyum sülfat, Askorbik Asit + Magnezyum Grubu) (n=7)'na iskemiden 1 saat önce aynı dozlarda askorbik asit ve magnezyum sülfat intraperitoneal olarak uygulandı. Alınan renal dokularda MDA ve GSH konsantrasyonları belirlendi, kan örneklerinde serum BUN ve Kreatin düzeyleri ölçüldü. Histolojik incelemeler için H&E ve PAS boyamaları, apoptotik hücre incelemeleri için TUNEL immünohistokimyasal boyaması yapıldı. $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular: BUN değeri Askorbik Asit + Magnezyum grubunda İR grubuna kıyasla anlamlı düşük bulundu ($p:0,021$). Kreatinin değeri Magnezyum grubunda İR grubuna kıyasla anlamlı düşük bulundu ($p:0,002$). MDA değeri Askorbik Asit ($p:0,034$) ve Askorbik Asit + Magnezyum ($p:0,001$) grubunda İR grubuna kıyasla anlamlı düşük bulundu. GSH değeri Magnezyum ($p<0.001$) ve Askorbik asit+ Magnezyum ($p<0.001$) gruplarında diğer gruplara kıyasla anlamlı olarak yüksek bulundu. H&E ve PAS boyamaları sonucunda ilaç uygulanan gruplarda daha az hasar tespit edildi ancak birlikte uygulamanın ayrı ayrı uygulamaya göre bir avantaj oluşturmadığı gözlemlendi. Askorbik Asit + Magnezyum grubunun TUNEL sayımları İR grubu sayımlarından anlamlı olarak düşük bulundu ($p:0,005$).

Sonuç: Elde edilen veriler doğrultusunda sıçan renal İR modelinde iskemi öncesi uygulanan 250 mg/kg askorbik asit ve 200 mg/kg magnezyum sülfatın ayrı ayrı ve birlikte uygulanmasının İR hasarının azalttığı kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Böbrek, İskemi Reperfüzyon Hasarı, Askorbik Asit, Magnezyum

SUMMARY

Comparison of the Effectiveness of Ascorbic Acid and Magnesium in Renal Ischemia Reperfusion Model in Rats

Dr.Ural Can EKMEKÇİ, Dokuz Eylül University, School of Medicine, Dept. of Anaesthesiology, IZMIR

Background: Kidney is one of the most affected organs of ischemia reperfusion injury during surgical procedures. The aim of this study is to determine effectiveness of ascorbic acid and magnesium administration separately or combined before ischemia on the rat model of renal ischemia and reperfusion damage.

Materials and Methods: After the approval of the DEU Local Ethics Board of Animal Experiments, 35 Wistar albino male rats ranging in weight from 250-300 g were divided into 5 groups. The Sham Group (n=7) was a laparotomy, 45 min ischemia and 240 min reperfusion were applied to other groups. No drugs were applied to the IR Group (n=7). 250 mg/kg ascorbic acid 1 hour before ischemia in the Ascorbic Acid Group (n=7), Magnesium Group (n=7) was administered to 200 mg/kg magnesium sulfate 1 hour before ischemia, ascorbic acid and magnesium sulfate intraperitoneal in the same doses 1 hour before ischemia (n=7). MDA and GSH levels were determined in the renal tissues received, serum BUN and creatine levels were measured in blood samples. H&E and PAS paintings for histological examinations, TUNEL immunohistochemical staining for apoptotic cell examinations. $p < 0.05$ value was considered statistically significant.

Results: The BUN value was found significantly lower in the Ascorbic Acid + Magnesium group compared to the IR group ($p:0.021$). The value of creatine was found significantly lower in Magnesium group compared to the IR group ($p:0,002$). The MDA value was found significantly lower in the Group of Ascorbic Acid ($p:0.034$) and Group of Ascorbic Acid + Magnesium ($p:0.001$) compared to the IR group. GSH value of Group of Magnesium ($p < 0.001$) and Group of Ascorbic Acid + Magnesium ($p < 0,001$) were significantly higher in other groups. Less damage was detected in the groups applied to the drug as a result of H&E and PAS paintings, but together it was observed that the application did not constitute an advantage over the individual application. TUNEL counts of the Group of Ascorbic Acid + Magnesium was found significantly lower than the IR group counts ($p:0,005$).

Conclusions: According to the data obtained, it was concluded that the separate and combined of 250 mg/kg ascorbic acid and 200 mg/kg magnesium sulfate applied before ischemia in the rat renal IR model reduces the damage of the kidney.

Key words: Kidney, Ischaemia Reperfusion Injury, Ascorbic Acid, Magnesium

1.GİRİŞ ve AMAC

İskemi, doku veya organa giden kan akımında bir süre azalma veya kesilme; reperfüzyon ise, iskemi sonrasında doku veya organın yeniden kanlanması olarak tanımlanır. Reperfüzyon dokulara iskemik hasardan daha fazla zarar verebilmektedir¹. Bu durum reperfüzyon hasarı şeklinde adlandırılır. İskemi-reperfüzyon (İR) hasarına maruz kalan öncelikli organlardan biri böbreklerdir ve akut böbrek hasarı yüksek morbidite ve mortaliteyle ilişkili kritik klinik bir durum olarak tanımlanır. Böbrek İR hasarı böbrek transplantasyonu, parsiyel nefrektomi, kardiyopulmoner *bypass*, sepsis, ürolojik girişimler ve hidronefroz gibi çeşitli klinik koşullarda ortaya çıkabilir². Böbreklerin İR hasarına duyarlı olmasının nedenleri arasında karmaşık mikrovasküler ağ yapısı ve yüksek enerji gereksinimi olması sayılmaktadır³.

İskemi-reperfüzyon hasarının oluşmasında reaktif oksijen radikallerinin üretimi, kompleman aktivasyonu, lökosit-endotelyal hücre adezyonu, transendotelyal lökosit migrasyonu, trombosit-lökosit agregasyonu, artmış mikrovasküler geçirgenlik ve endotele bağımlı artmış geçirgenlikle karakterize lokal ve sistemik inflamatuvar yanıtlar rol oynar⁴. Artmış olan reaktif oksijen radikalleri üretimi antioksidan sistemin disfonksiyonuna yol açar. Bu disfonksiyon tübüler hücre hasarı ve apoptoza neden olur. İnflamatuvar sitokinlerin serbestleşmesi sonucu immün yanıt başlar. Aktive olan kompleman sistemi de bir başka hasar yolu oluşturur⁵.

Strese karşı koruma mekanizmaları yoluyla dokunun adaptasyonu olarak tanımlanan iskemik önkoşullamanın, İR hasarından korunmada iyi bilinen bir mekanizma olduğu saptanmıştır⁶. İskemik önkoşullama için kullanılan yöntemler arasında uzak iskemik önkoşullama ve farmakolojik koşullama en sık tercih edilenlerdir⁷.

Böbrek İR hasarında farmvakolojik koşullama uygulanarak farklı ajanların koruyucu etkinliğinin araştırıldığı birçok çalışma yapılmıştır. C vitamini (askorbik asit)⁸⁻¹⁴, magnezyum sülfat^{2,15-18}, E vitamini⁹, hidrokortizon⁹, L-arginin¹⁰, atorvastatin¹⁹, tadalafil²⁰, monoaminooksidaz inhibitörleri²¹, deksmedetomidin²² ve mannitol²³ gibi ajanların İR hasarını azalttığı gösterildiği çalışmalar söz konusudur.

Yüksek doz askorbik asitin nikotinamid adenin NADP-oksidad ve indüklenebilir NOS aktivasyonunu inhibe ederek oksidatif hasara bağlı mikrodolaşım bozukluğunu azalttığı veya onardığı; böylece İR hasarının etkilerini hafiflettiği prelinik çalışmalarda gösterilmiştir^{9,11}. Askorbik asitin inflamatuvar hücreler ve endotelyal hücreler arasındaki oksidatif kaynaklı etkileşime müdahale edebileceği çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür. P-selektin sulu faz oksijen

radikallerinden etkilenebilirken, askorbik asitin bu radikalleri nötralize ederek bu kritik adhezyon molekülünün upregülasyonunu azaltabildiği öne sürülmüştür¹⁰. Aynı zamanda, suda çözünebilen antioksidanın, lipoprotein lipitleri etkilemeden önce sulu faz oksijen radikallerini kestiği ve böylece lipit peroksidasyonunun başlatılmasını da önleyebildiği belirtilmiştir¹⁰.

Magnezyum hem intrasellüler hem de ekstrasellüler alanlarda büyük miktarlarda bulunan bir elektrolittir. Aynı zamanda protein sentezi, kas ve sinir iletimi, nöromusküler sinyal iletimi, kan şekeri kontrolü ve kan basıncı regülasyonu dahil olmak üzere vücutta biyokimyasal reaksiyonları düzenleyen 300'den fazla enzim sisteminde yer alan bir kofaktördür. İyon kanal düzenleyicisidir, hücrel iyon dengesinin korunmasına katkıda bulunur. Hücre zarları boyunca kalsiyum ve potasyum iyonlarının aktif taşınmasında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir¹⁶.

L tipi kalsiyum kanallarının uyarılmasıyla ortaya çıkan hücre içi kalsiyum artışının inflamatuvar yanıtı arttırdığı; mitokondriyal fonksiyonlarda bozulma, hücrede nekroz ya da apoptoza yol açtığı saptanmıştır². L tipi kalsiyum kanal blokeri olan magnezyum ile oluşturulan L tipi kalsiyum kanal blokajının İR hasarından korumada etkili olabileceği belirlenmiştir². Magnezyum ayrıca iyi bilinen bir NMDA reseptör antagonistidir¹⁵. Lipit peroksidasyonunu direkt inhibe ederek endotelial ve nöronal reperfüzyon hasarını azalttığı gösterilmiştir¹⁸.

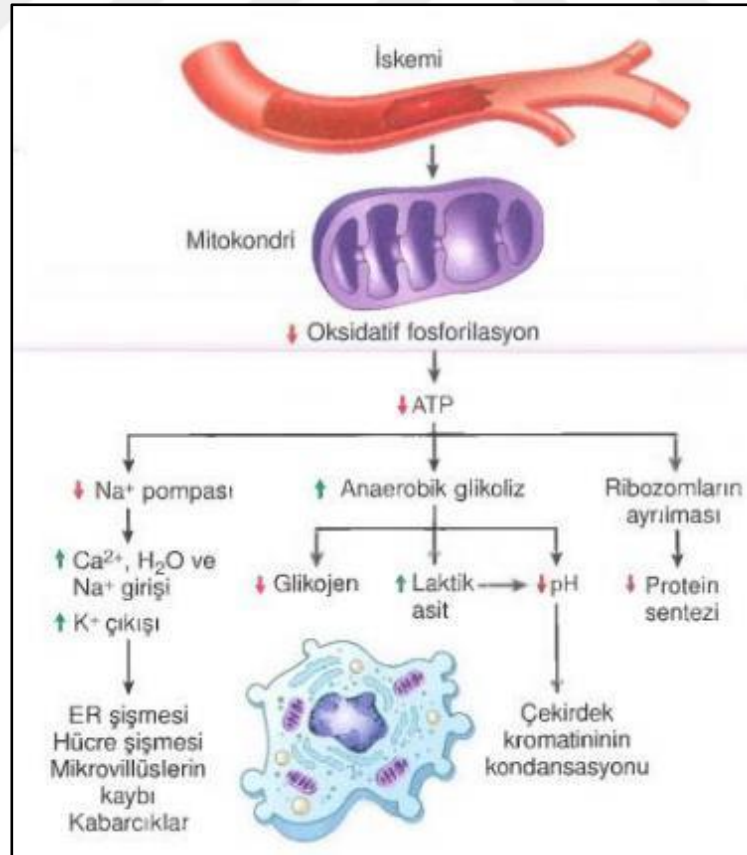
Bugüne dek askorbik asitin veya magnezyumun İR hasarı üzerindeki etkinliğinin araştırıldığı çok sayıda çalışma bulunmasına karşın bu iki ajanın birlikte kullanılmasının etkilerinin irdelendiği bir araştırmaya ulaşılamamıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 İskemi

İskemi, dokunun kanlanmaması yani oksijen (O_2) ve diğer metabolitlerin dokulara dolaşım tarafından yeterli düzeyde sağlanamaması ve bu süreçte oluşan atık ürünlerin yine dolaşım tarafından uzaklaştırılamaması olarak tanımlanır. Bu durum geri dönüşümlü veya dönüşümsüz hücre hasarı ile sonuçlanır²⁴.

Oksijen hücre fonksiyonlarının devamı için temel gereksinimdir. İskemi sonucu dokulara yeterli O_2 sağlanamaması ile hücre ölümüne kadar giden bir dizi kimyasal olay başlar. Oluşan anaerobik metabolizma ile laktik asit artar ve asidoz normal hücre işleyişini bozarak yüksek enerjili bağların azalmasına ve hücre dengesinin korunması için gereken enerjinin yetersiz kalmasına sebep olur^{25,26}. Sodyum (Na^+)/Potasyum (K^+) pompasının çalışması bozulur. Potasyum iyonları hücre dışına çıkarken Na^+ ve klor iyonları da hücre içine girerler. Anaerobik glikolizle adenosin trifosfat (ATP) üretilmeye çalışılır. Karbondioksit birikimi H_2CO_3 üretimi ile sonuçlanır, böylece asidoz artar (Şekil-1)²⁷.



Şekil-1: İskemi sonucunda hücrelerde gerçekleşen metabolik değişiklikler

Adenozin trifosfat bağımlı çalışan diğer bir pompa ise ekstrasellüler ve intrasellüler kalsiyum (Ca^{+2}) dengeleyici pompadır. İntrasellüler Ca^{+2} artışı ile proteolitik enzimler ve fosfolipazlar aktive olur. Fosfolipaz A₂ aktivasyonu ile membran fosfolipitleri bozulmaya başlar, plazma ve mitokondriyal membran biyoenerjetikleri ve geçirgenlikleri de değişir²⁸.

2.2 Reperfüzyon

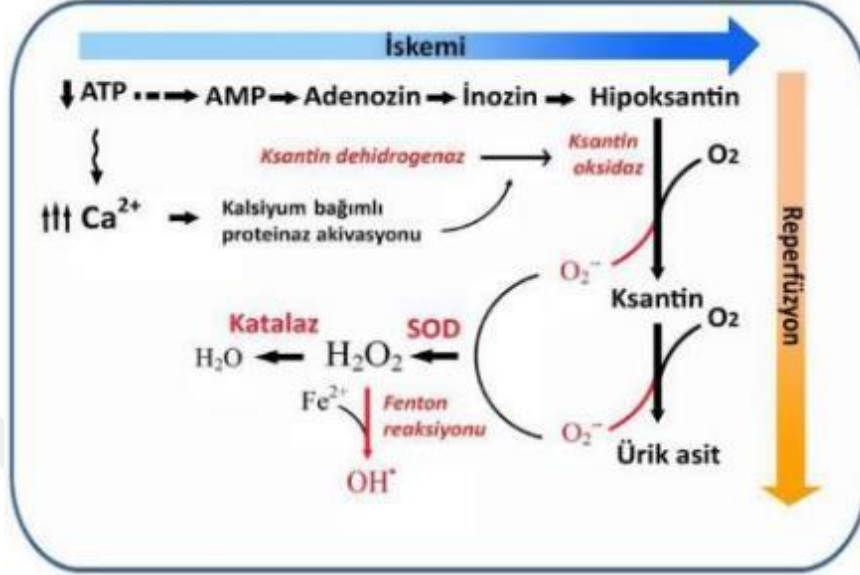
İlaçlarla veya mekanik olarak iskemik dokunun kan akımının yeniden sağlanmasına reperfüzyon adı verilir. İskemik dokuda kan akımının yeniden sağlanmasının, enerji gereksiniminin yeniden yapılanması ve toksik metabolitlerin ortadan kaldırılması gibi yararlı etkileri olmaktadır²⁵. Ancak kan akımının tekrar başlaması paradoksal bir şekilde iskeminin oluşturduğu hasarı artırır ve dokuda iskeminin yarattığı hasardan daha fazla hasara da yol açabilir^{29,30}.

Reperfüzyon hasarından serbest O₂ radikalleri, kompleman (C) sistemi ve polimorf nüveli lökositler ve endotel hücreleri sorumlu tutulmaktadır¹.

Reperfüzyon ile dokuya tekrar ulaşan O₂ nedeniyle oluşan toksik O₂ radikalleri, hücre membranında lipit peroksidasyonuna neden olarak direkt hücre hasarına yol açmakta ve araşidonik asit üretimiyle prostoglandin oluşumunu artırarak lökositleri aktive etmektedir³¹. Süperoksit radikalleri ile aktive olan lökositler vasküler endotel ile etkileşime girerek transmigrasyonla sonuçlanan yolağı başlatır. Lökosit yüzeyindeki P-selektin glikoprotein I ile endoteliyal P-selektin etkileşimi lökosit göçündeki ilk adımı oluşturur. Dokuya gelen aktive lökositler toksik oksijen radikalleri, proteaz, elastaz, kollajenaz, laktoferrin ve katyonik proteinleri açığa çıkarırlar. Bu da mikrovasküler geçirgenlik artışı, ödem, tromboz ve parankimal hücre ölümü ile sonuçlanır^{4,32}.

Hipoksi sırasında ATP üretiminin durmasına rağmen kullanımı devam eder. Yüksek enerjili ATP'nin fosfat bağlarının kopmasıyla AMP oluşur ve ATP adenozine kadar indirgenir. Adenozin, inozin üzerinden hipoksantine indirgeneceği ekstrasellüler aralığa hızla dağılır^{28,33,34}. İskemi sonucu yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin yıkımı, dokuda ksantin ve hipoksantin gibi pürin metabolitlerinin birikimine ve KDH'nın KO dönüşümüne yol açar. Adenozin A₁ reseptörleri üzerinden sinaptik transmisyonu ve presinaptik Ca^{+2} 'nin geçişini inhibe ederek intrasellüler Ca^{+2} artışına neden olur, K⁺ ilişkili glutamat salınımını azaltır³⁵. Normal şartlarda hipoksantin ürik asite metabolize olur ve bu reaksiyonda elektron alıcı nikotinamid adenin dinükleotidin okside formudur. Ancak hipoksi ya da iskemi nedeniyle KDH

KO'ya dönüştüğünden hipoksantinün ürik asite dönüşümü KO tarafından gerçekleşir ve bu reaksiyonda ise elektron alıcı olarak moleküler oksijen kullanılır³³. Reperfüzyonun başlaması ile KO hipoksantini ksantine, ksantini de ürik aside dönüştürür ve bu sırada serbest oksijen radikalleri oluşur^{28,33,34} (Şekil-2).



Şekil-2: İskemide purin metabolizması ve reperfüzyonda oksijen radikali oluşumu³⁶

Serbest oksijen radikallerinin ilk oluşumu ve öncüsü genellikle stabil olmayan ve hidrojen peroksit ile oksijene dönüşen süperoksit (O₂^{•-}) radikalidir²⁵. Fagositoz görevi yapan makrofaj, nötrofil ve monositler tarafından enzimatik olarak üretilirler. Hidrojen peroksit hücre membranlarından kolaylıkla geçebilen, endotelial hücreleri hasarlayabilen güçlü bir sitokindir. Hidroksil radikali bilinen serbest radikaller içinde en güçlü olan ve doku hasarından sorumlu olan radikaldir³⁷. Bu radikal hidrojen atomlarını hücre membranındaki poliansatüre yağ asitlerinden ayırır, lipid peroksidasyonu ile hücre membranında çözülme ve buna bağlı hücre ölümü olur³⁸. Hidroperoksil radikali ise O₂^{•-} radikalinin protonlanmasıyla oluşan ve O₂^{•-}'den daha güçlü bir ajandır. Biyolojik membranlardan kolay geçer ve yağ asitleriyle direkt olarak reaksiyona girer³⁹.

Reperfüzyon ile aynı zamanda kompleman sistemi aktive olarak birçok proinflamatuvar mediyatör salınır. En potent mediyatör olan C5a inflamatuvar cevabı artırarak monosit kemoatraktan protein 1, TNF-alfa, interlökin (IL)-1 ve IL-6 gibi sitokinlerin üretilmesine neden olur. C5b-9 kompleksi ise endotel bağımlı relaksasyon ve endotelial cGMP'yi azaltarak vasküler tonusu artırır⁴⁰.

2.3 Böbrek İskemi Reperfüzyon Hasarı

Böbrek yüksek enerji gereksinimi ve karmaşık mikrovasküler damar ağı nedeniyle İR hasarına çok duyarlıdır. Renal İR hasarı transplantasyon sonrası gecikmiş greft fonksiyonu, şok komplikasyonu ve kardiyak veya aortik cerrahide artmış mortalite ve morbidite ile ilişkilidir⁴¹⁻⁴⁴.

İskemik böbrekte vazodilatör maddelerin etkisine karşı bir direnç, vazokonstriktör maddelerin etkisine karşı da aşırı duyarlılık vardır. Oksijenlenmenin bozulması ile artan intrasellüler Ca^{+2} , afferent arteriollerde direnç artışına neden olur⁴⁵.

Fizyolojik şartlarda oksijen basıncı korteksten medullaya doğru inildikçe azalır. Böbreğin İR hasarı öncelikle hipoksiye duyarlı olan medulladan başlar. Böbreğin kan akımının büyük kısmı renal korteksten geçer ve renal medullanın kanlanmasını sağlayan vaza rektaya çok az kan gider. Bu da renal medullayı hipoksiye daha duyarlı hale getirir^{45,46}.

İskemik hasar tübüler disfonksiyona ve Na^+ geri emiliminde azalmaya neden olur; böylece distal kısımlara giden Na^+ miktarı artar, glomerüler vazokonstriksiyon ve glomerüler filtrasyonda azalmaya sebep olan tübüloglomerüler *feedback* denilen refleksin aktifleşmesine neden olur. Medüller hipoksi ayrıca hücresel enerji depolarının azalmasına, endotel ve düz kas hücrelerindeki aktin hücre iskeletinin bozulmasına yol açar. Bunların sonucunda hücresel şişme meydana gelir ve çevre dokularda hipoksik etkilenme artar⁴⁷.

Apoptoz, organizmada genetik olarak programlanmış bir hücre ölümü şeklindedir. Renal hasarın bir sonucu olan tübüler hücre apoptozu renal İR patofizyolojine primer ve majör bir katkıda bulunur. Renal İR hasarında inflamasyon ve apoptoz bir arada bulunmaktadır. Hipoksi sırasında intrasellüler Ca^{+2} birikimine bağlı kaspaz aktivitesi artar. Kaspaz iskemik dokuda aktive olur ve iskemik hücre ölümünün bir göstergesidir⁴⁸. Kaspaz 3'ün aktifleşmesi hücrenin apoptoza gideceğini gösterir. Tübüler hücrelerde izlenen değişiklikler proksimal tübül hücrelerinin fırçamsı kenarlarının kaybına, hücrelerin bazal membrandan koparak tübül lümenine dökülmesine ve tübül lümeninde tıkanmaya sebep olur^{45,47}. Oksidatif stres de İR hasarında rol oynayan diğer bir hasar mekanizmasıdır. Tübül hücrelerinin metabolik açıdan yoğun olmaları nedeniyle İR hasarında mitokondriyal hasar ve intrasitoplazmik Ca^{+2} artar, buna bağlı olarak da oksidatif moleküller fazla miktarda oluşur^{45,47}.

Preglomerüler vazokonstriksiyon glomerüler filtrasyon hızı (GFH)'nın azalmasındaki en önemli nedendir. Nörohumoral cevabın uyarılması ile renin anjiyotensin aldosteron sistemi

aktive olur ve vazopressin salgılanması artar. Glomerüler plazma akımı % 30-50 oranında azalır. Katekolaminler, anjiyotensin II ve endotelin seviyesi artar, bu artış da vazokonstriksiyon gelişimine yol açar⁴⁵.

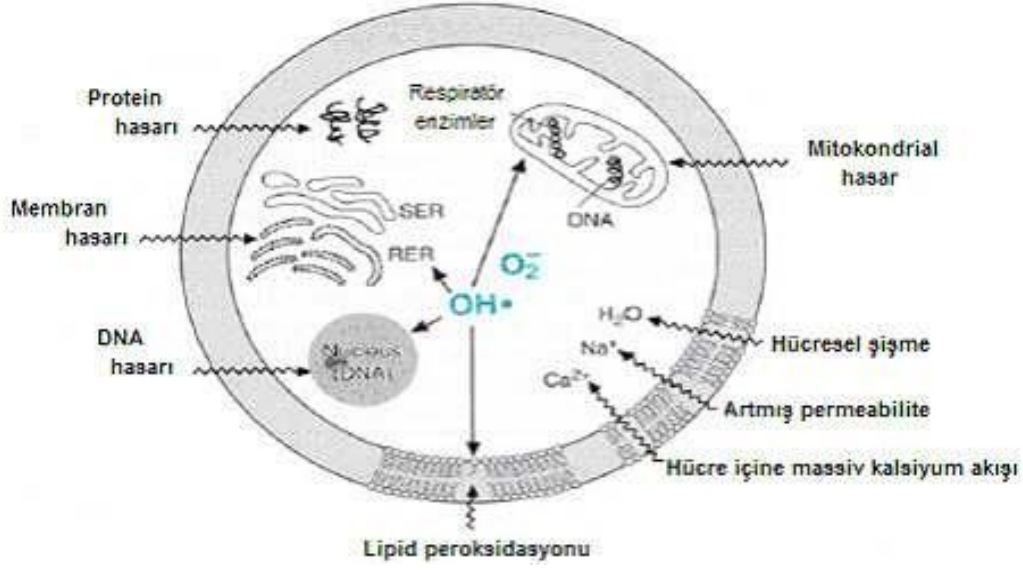
Reperfüzyon sırasında kan akımında % 40-50 oranında azalma gözlemlendiği belirtilmiştir. Kan akımındaki bu azalmanın nedeni tam açıklanamamış; ancak, birlikte endojen vazokonstriktörlere karşı antagonistler kullanıldığı zaman kan akımının düzeldiği bildirilmiştir. Gelişen interstisyel ödem medulladaki damarlara bası uygulayarak kan akımını bozabilir. Bu durum lökositlerin endotel hücreleri ile karşılaşma olasılığını artırır. Eritrositler ve lökositlerin medullada biriktikleri deney hayvanlarında gösterilmiştir^{45,49,50}. Ayrıca renal İR'ye maruz bırakılan hayvanlarda azalmış GFH'ye glomerüllerde biriken fibrin depozitleri de katkıda bulunur^{51,52}.

Reperfüzyon sonrası artmış lökosit endotel adezyonu, trombosit-lökosit agregasyonu ve azalmış endotel bağımlı relaksasyon mekanik olarak kan akımını azaltabilir. Bu klinik olarak transplante greft veya reperfüze olmuş miyokard iskemisinde devam eden organ disfonksiyonu ile ilişkilidir^{53,54}.

2.4 Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanlar

Serbest oksijen radikalleri dış yörüngelerinde bir veya daha fazla ortaklaşmamış elektron içeren molekül veya atomlardır. Bunlar stabil olmadığından çok kısa ömürlüdürler. Elektriksel yükleri pozitif, negatif veya nötr olabilir. Aerobik canlılarda serbest radikaller için en önemli kaynağın moleküler oksijen olduğu kabul edilmektedir. Normal metabolizma sırasında oksijenin %98'i suya indirgenmektedir. Geriye kalan %2'lik kısım ise süperoksit ve hidroksil radikaline dönüşür (Tablo-1) ⁵⁵.

Reperfüzyon sırasında dokuda iskemi süresince biriken hipoksantin atılmaya çalışılır. Oksijen varlığında ksantin oksidaz enzimi aktive olarak SOR'u oluşturur (Şekil-3). Artan SOR'un başlattığı lipid peroksidasyonu ve protein hasarı sonucu hücre fonksiyonları bozularak doku nekrozu ortaya çıkar^{1,56}. SOR hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki eder. Sitoplazma, mitokondri, nukleus ve endoplazmik retikulum membranlarında lipid peroksidasyonuna sebep olur. Lipid peroksidasyonu sırasında, karbon bağlarının kopması ile aldehit yapısında yıkım ürünleri ortaya çıkar. Bu ürünlerden en önemlisi MDA'dır.



Şekil-3: Serbest oksijen radikallerinin hücredeki etkileri

İskemi reperfüzyon olayında lipit peroksidasyonunun yıkım ürünü olan MDA, proteinlerin amino grupları ile şift bazı oluşturur ve tiyol grupları ile etkileşir. Bu şekilde oluşturduğu protein fragmentasyonu ve prolimerizasyonunun yanı sıra MDA'nın mutajenik etkisi de gösterilmiştir^{57,58}. Lipit peroksidasyonu, ortamda doymamış yağ asitleri, oksijen ve metal katalizörler bulunduğu sürece logaritmik olarak artarken yeni serbest radikallerin oluşumuna neden olur. Bu nedenle reperfüzyon dönemi, lipit peroksidasyonu için gerekli koşulları sağlaması bakımından çok uygundur⁵⁹. Lipit peroksidasyonu reperfüzyonsuz iskemide ve spesifik antioksidanlar tarafından oksijen radikalleri inaktifleştirildiğinde gözlenmez⁵⁷.

Serbest oksijen radikallerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek üzere çok sayıda savunma mekanizması olduğu saptanmıştır. Bu mekanizmalar “antioksidan savunma sistemleri” veya kısaca “antioksidanlar” olarak bilinirler. Organizmada bu savunma sistemleri vasıtasıyla ortadan kaldırıldan daha fazla reaktif oksijen bileşiklerinin meydana gelmesi de oksidatif stres olarak tanımlanır. Reperfüzyon hasarında sıklıkla görülür. Antioksidanlar toplayıcı, bastırıcı, zincir kırıcı ve onarıcı olmak üzere dört ayrı şekilde etki ederler. Antioksidanlar, endojen kaynaklı veya egzojen kaynaklı olabilirler (Tablo-1)⁶⁰.

Tablo-1: Antioksidanların Sınıflaması.

ENDOJEN ANTIÖKSİDANLAR		
ENZİMATİK ANTIÖKSİDANLAR	NONENZİMATİK ANTIÖKSİDANLAR	
Süperoksit dismutaz (SOD) Katalaz Glutasyon Peroksidaz (GPx) Glutasyon Redüktaz (GR)	Glutasyon Melatonin Ürik asit Bilirubin Albumin	Koenzim Q10 Selenyum Alfa lipoik asit Transferrin Seruloplazmin
EGZOJEN ANTIÖKSİDANLAR		
VİTAMİN EKSOJEN ANTIÖKSİDANLAR	İLAÇ OLARAK KULLANILAN EKSOJEN ANTIÖKSİDANLAR	
α -Tokoferol (Vitamin E) Karoten (Vitamin A) Askorbik asit (Vitamin C) Folik asit (Vitamin B9)	Ksantin oksidaz inhibitörleri NADPH oksidaz inhibitörleri Rekombinant süperoksit dismutaz Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar Nötrofil adezyon inhibitörleri Sitokinler Demir şelatörleri	

Glutasyon hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan hücre içindeki en önemli antioksidan bileşiktir. Karaciğer ve böbrek başta olmak üzere pek çok dokuda glutamat, sistein ve glisinden sentezlenir. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır. Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril gruplarını redükte halde tutarak oksidasyona karşı korur. Böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. GSH yabancı bileşiklerin detoksifikasyonunu ve aminoasitlerin membrandan transportunu da sağlar. GSH hücreleri oksidatif strese karşı korumada hayati öneme sahiptir^{61,62}.

2.5 İskemik Önkoşullama

Uzamış iskeminin zararlı etkilerinden korunmak amacıyla dokuların kısa süreli olarak iskemiye maruz bırakılması ile İR sonrası oluşan hasara karşı adaptasyon sağlanmış olur. Bu İÖK olarak adlandırılır⁶³. İlk kez 1986 yılında Murry ve ark.⁶⁴ tarafından kalpte tarif edilmiştir. Kalpte 40 dak'lık tek bir iskemiye takiben ciddi bir ATP düşüşü ve hücre ölümü olduğu halde, dört kez tekrarlanan 10 dak'lık İR periyodunun İR hasarını azalttığı gösterilmiştir. Bu koruyucu etkinin mekanizması tam olarak açıklanamamakla birlikte takip eden iskemi periyotlarında ilk iskemi dönemine göre ATP düşüşünde azalma olduğu, ayrıca laktat, hidrojen ve amonyak gibi zararlı maddelerin her perfüzyonla birlikte ortamdan uzaklaştırıldığı gösterilmiştir^{65,66}.

İskemik önkoşullama mekanik veya farmakolojik olarak uygulanabilir. Mekanik olarak yapılan İÖK direkt veya UIÖK şeklinde ikiye ayrılır. Direkt İÖK’de hedef organın kendisi iskemi süresi öncesinde kısa aralıklarla İR periyotlarına maruz bırakılarak İR hasarından korunmuş olur. Ancak bu yöntemin büyük damarlara travma ve organa stres oluşturması gibi dezavantajları vardır. Uzak İÖK ise hedef organdan farklı bir dokunun kısa aralıklarla İR periyotlarına maruz bırakılarak hedef organın hasardan korunması yöntemidir. Böylece hedef organ direkt olarak strese maruz kalmaz⁶⁷.

İskemik önkoşullamanın koruyucu etkisinde fosfolipaz C veya D’nin aktifleşmesini sağlayan adenozin veya alfa-1 adrenerjik reseptör aktivasyonu kritik başlangıç basamağını oluşturmaktadır. Önkoşullamanın akut yararlı etkileri ATP duyarlı K⁺ kanallarının Protein kinaz C’ye bağımlı fosforilasyonuna bağlıdır. Protein kinaz C bağımlı, 5’nükleotidazın hücre yüzeyine translokasyonu artarak, hücresel adenozin üretimi artar ve hücresel enerji depoları korunur, lökosit tutunması azalır⁶⁸. Önkoşullamanın uzamış etkileri ise artmış gen ekspresyonuna bağlı yeni protein (antioksidan enzimler, NO sentaz, ısı şok proteinleri) sentezine bağlıdır⁴. İskemik önkoşullamanın hem cGMP, hem de cAMP düzeylerinde artışa neden olduğu gösterilmiş olup, İÖK’de bunların tetikleyici rolleri olabileceği düşünülmüştür⁶⁹. Dokuda İÖK sonrası ATP’nin stabil kaldığı, adenozin, ksantin ve inozinin ise arttığı bulunmuştur⁷⁰.

2.6 Farmakolojik Koşullama

İskemi reperfüzyon hasarını azaltmak veya önlemek için kullanılan diğer yöntem farmakolojik koşullamadır. Farmakolojik koşullama koruyucu (önkoşullama) ve/veya tedavi edici (ardkoşullama) olarak uygulanabilir⁴. Bu amaçla böbrek İR hasarında farklı ilaçların kullanıldığı birçok çalışma yapılmıştır. Aktive protein C, alfa melanosit stimüle edici hormon, statin ve deksmedetomidin gibi ajanların İR hasarını azalttığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir⁷¹⁻⁷³.

Farklı birçok farmakolojik ajanın sinyal yollarını farklı noktalarda aktive ettiği ve böylece İÖK’yi taklit ettiği gözlemlenmiştir⁷⁴. Bu gözlemler İÖK’nin sağladığı etkileyici korumanın terapötik ajanlarla da sağlanabileceği düşüncesini doğurmuştur^{75,76}.

2.7 Askorbik Asit

C vitamini yapıca, glukoz ve diğer altı karbonlu monosakkaritlere benzeyen bir ketolaktondur. İnsan, kobay ve diğer primatlarda sentez edilemediği halde incelenen diğer memeli türlerinde glukozdan başlayarak L-glukronik asit üzerinden sentez edilir. Dokularda bir enzimin katalitik aracılığı olmadan bile kolayca dehidroaskorbik aside oksitlenir. Dehidro şekline dönüşmesi molekül başına iki hidrojen atomunun serbest kalmasına neden olur. Bu özelliği nedeniyle askorbik asit, indirgeyici nitelik gösterir. Dehidroaskorbik asit, ortamda iki H⁺ almak suretiyle kolaylıkla askorbik aside indirgenir. Bu kimyasal özelliklerinden dolayı askorbik asit ve dehidroaskorbik asit vücut sıvılarında denge halinde bulunurlar, birbirlerine kolayca dönüşürler ve böylece redoks niteliği gösterirler. Her iki formu da eşit derecede fizyolojik etkinlik gösterir⁷⁷.

Vitaminler içinde kimyaca en labil olan askorbik asittir. Ortamın asit olması askorbik asitin dayanıklılığını arttırır. Askorbik asit mide-bağırsak kanalından doyurulabilir bir transport olayı ile kolayca absorbe edilir. Kanda lökosit ve trombositlerin içerisinde plazmadaki konsantrasyonundan çok daha yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Bu nedenle lökositlerin askorbik asit içeriğinin ölçümü C vitamini eksikliğinin teşhisinde kullanılır. Günde 75 mg veya daha yüksek dozlarda askorbik asit verilmesi halinde vücudun bu vitamene doyduğu kabul edilir. Doygunluk halinde plazma askorbik asit konsantrasyonu 1,4 mg/dl veya bunun üzerindedir. Böbreklerden atılımında eşik değeri söz konusudur ki bu eşik değer aşağı yukarı sözü edilen doygunluk miktarı ile eşittir. Normal alım halinde C vit.nin vücuttan eliminasyonu için yarılanma ömrü yaklaşık 16 gün olarak saptanmıştır. Askorbik asit kısmen karaciğerde oksalik aside dönüştürülerek kısmen de sülfatlanarak elimine edilir⁷⁷.

C vitamini dehidroaskorbik asit ile aralarında oluşturduğu oksidasyon-redüksiyon reaksiyonunun yanı sıra vücutta pek çok oksidasyon-redüksiyon reaksiyonuna da katılır. Askorbik asit hematopoetik dokuda tetrahidrofolik asitin oksitlenmeden kalmasını sağlar⁷⁷.

Askorbik asit ekstraselüler sıvıda bulunan en önemli antioksidan maddedir. Hücrelerin içerisinde de antioksidan özellik gösterir. O²-, H₂O₂, OH. gibi pek çok radikali güçlü bir şekilde bağlayarak inaktive eder, lipit peroksidasyonunu inhibe eden en önemli plazma komponentlerindedir. Böylece biyomembranları ve DNA'yı peroksidatif zedelenmeden koruyabilir. Ayrıca tokoferolün antioksidan etkinliğini güçlendirir. Folik asitin tetrahidrofolik aside ve midede non-hem ferrik demirin ferro demire indirgenmesine katkıda bulunur. C vitamininin diğer bir önemli fonksiyonu, belirli hidroksilasyon ve amidasyon reaksiyonlarının koenzimi olmasıdır. Bu özelliği nedeniyle kollajen sentezinde, zenobiyotiklerin mikrozomal

metabolizmasında, hemoglobin sentezinde, nörohipofiz hormonlarının biyosentezinde ve muhtemelen adrenal korteksteki steroid hormon sentezinde rol oynar. Askorbik asit ayrıca lipid peroksidasyonunu önleyen antioksidan bir molekül olan karnitinin biyosentezini olumlu yönde etkiler⁷⁷.

Ergin ve ark.⁸ askorbik asitin renal mikrosirkülatuar oksijenizasyon üzerine etkisini İR hasarı oluşturdukları rat modelinde araştırmışlardır. Çalışmacılar, iskemiden 15 dakika önce 100mg/kg bolus ve ardından 2 saatlik reperfüzyon döneminde 50 mg/kg/saat dozunda infüzyon halinde askorbik asit uygulamışlar ve bu tedavinin oksidatif stres ile inflamatuvar parametreleri baskıladığı sonucuna varmışlardır⁸.

Azari ve ark.⁹ ratlarda renal İR hasarı modelinde reperfüzyondan hemen sonra 50 mg/kg C vitamini intravenöz, 50mg/kg hidrokortizon intravenöz, 20mg/kg E vitamini intramüsküler ya da her üç ajanı uygulamışlar; her üçünün uygulandığı grupta İR hasarının anlamlı olarak azaldığını göstermişlerdir.

Mohamed ve ark.¹⁰ ratlarda renal İR modelinde C vitamini ve L-argininin koruyucu rolünü karşılaştırmışlardır. İskemiden 24 saat önce 500mg/kg ip C vitamini, iskemiden önceki 3 gün boyunca her gün 400mg/kg L arginine i.p. ve her iki ilacı da uyguladıkları üç gruba karşılaştıran bu çalışmacılar; L arginine'in tek başına bir etki oluşturmadığını, C vitamininin uygulandığı gruplarda ise renal İR hasarından koruyucu etki oluştuğunu saptamışlardır¹⁰.

Korkmaz ve ark.¹³ ratlarda renal İR hasarını değerlendirdikleri çalışmalarında, iskemiden 1 saat önce uyguladıkları 250mg/kg askorbik asitin renal İR hasarından koruyucu etkisi olduğunu göstermişlerdir.

Seo ve ark.¹⁴ ratlarda hepatik İR hasarını değerlendirdikleri çalışmalarında, iskemiden 5dak önce 30mg/kg, 100mg/kg, 300mg/kg ve 1000mg/kg dozlarını dört farklı gruba uygulamışlardır. Düşük dozlarda antioksidan etkinlik gösterilmişken, yüksek doz uygulamada ise preoksidan etkilerinin olduğu göstermişlerdir.

2.8 Magnezyum

Magnezyum insan vücudunda hücre içi sıvıda potasyumdan sonra ikinci en çok bulunan, total olarak da vücutta kalsiyum, sodyum ve potasyumdan sonra dördüncü sırada yer alan bir katyondur. Hücre büyüme ve çoğalması, enerji metabolizması, protein ve nükleik asit (DNA-RNA) sentezi gibi adenozin fosfat içeren üç yüzden fazla enzimatik reaksiyonda kofaktör olarak görev alan bir elementtir.

İnsan vücudu Mg üretemediğinden, bu elementi besin yolu ile almaktadır. Vücut gerekli Mg'yi besin ile alamazsa, kemiklerdeki Mg'yi kullanmaya başlamaktadır. Bireylerin Mg gereksinimi yaşam tarzına ve yaşa göre değişmekte olup; günlük gereksinim kadınlarda 300 mg/gün, erkeklerde 350 mg/gündür⁷⁸.

Vücutta ortalama 20-30 g Mg bulunur. Bunun %60'ı kemiklerde, %39'u intraselüler alanda ve kalan %1'i ekstraselüler alanda bulunmaktadır. Mg'nin beyin ve kalpte daha yoğun olarak bulunduğu bilinmektedir. Normal Mg plazma değeri 1,7-2,4 mg/dl (0.7-0.99 mmol/L) olup ve toplam vücut miktarının % 0,3'ünü oluşturur. Mg vücutta, iyonize (serbest form) (serum Mg miktarının %62'si); proteinlere bağlı (serum Mg miktarının %33'ü) (özellikle albümine); kompleks anyonik çiftler (serum Mg miktarının %5'i) (Mg sitrat ve Mg fosfat) olmak üzere üç farklı şekilde bulunabilir⁷⁸.

Magnezyumun homeostazında gastrointestinal sistem ve kemik dokusu rol oynamaktadır, ancak temel organ böbrektir. Mg, böbrekte filtrasyon ve reabsorbsiyon işlemlerinden geçer. Serum Mg'nin yaklaşık % 75'i glomerüler membrandan filtrasyona uğrar, bunun % 15'i proksimal tübüllerden, % 50-60'luk kısmı ise Henle kulpunun çıkan kolu tarafından reabsorbe edilir. Normal şartlar altında filtrasyona uğrayan Mg'nin % 3-5'i idrarla atılır. Böbrek metabolizması ile idrarla atılan günlük ortalama Mg miktarı erkekler için 150 mg, kadınlar için ise 120 mg'dir⁷⁹.

Magnezyum, hücre membran potansiyelini etkileyerek birçok hormonun, gıdanın ve nörotransmitterin alınmasını ve salgılanmasını kontrol eder. Mineral ve elektrolitlerin, hormonların, nörotransmitterlerin iletilmesinde rol oynar⁷⁸.

Vücudun kalsiyum, fosfor, sodyum, potasyum ve C vitaminini daha etkili bir şekilde kullanabilmesi için Mg gereklidir. Mg, sinir sisteminin ve kasların gevşemesine yardımcı olduğu için "anti-stres minerali" olarak da tanımlanır. Kalp damarlarının esnekliğini sağlayarak kan basıncının regülasyonunda görev alır, olası bir kalp krizini önleyici etki gösterir⁸⁰.

Na-K ATPaz ve Ca-ATPaz aktivasyonunda görev alır. Her iki pompa için gerekli olan ATP, Mg varlığında hidrolize olarak pompa için gerekli enerjiyi sağlar⁸¹. Mg eksikliğinde Mg'ye bağımlı bir enzim olan Na-K ATPaz aktivitesi azalarak, hücrenin potasyum tutma kapasitesinde azalmaya neden olur⁷⁸.

Enerji metabolizmasındaki ve nükleik asit sentezindeki hekzoinaz, protein kinaz, kreatin kinaz, fosfofruktokinaz enzimleri gibi üç yüzden fazla enzimin kofaktörüdür⁸².

Protein sentezi, oksidatif fosforilasyon, glikoliz, hücre replikasyonu, nükleotid metabolizması gibi birçok metabolik olayda fonksiyon görmektedir⁸³.

Kalsiyum antagonisti gibi davranarak nöromusküler uyarılabilirliği artırır. Vasküler tonus, kardiyak uyarılabilirlik, kas kasılması, nöronal aktivitede görev alır. Kardiyak kasılma ve periferik vasküler tonusun devamlılığı için gerekli olan düz kas hücrelerindeki kalsiyum hareketini düzenler⁸⁴.

Hücre proliferasyonu ve apoptoz, hücrel ve hümoral immün reaksiyonlar, iyon kanallarının düzenlenmesi, hücre permeabilitesi ve mitokondriyal fonksiyonlarda fonksiyonu vardır⁸⁵.

Magnezyumun hücre içine giriş ve çıkışı hücre içi cAMP aracılığı ile olmaktadır. Hücre içi cAMP azaldığında Mg hücre içine girerken, hücre içi cAMP artınca Mg hücre dışına çıkar. Mg cAMP sentezinde görev yapan adenilat siklazın aktivasyonunda rol alır. Ayrıca adenilat siklaz aktivasyonu, hücre içi cAMP artışı ile mast hücrelerinin degranülasyonunu durdurarak, anaflaktik reaksiyonlarda fonksiyon görür. Mg eksikliğinde ise cAMP üretiminin inhibisyonu ile mast hücrelerinden histamin salınımı uyarılmaktadır^{81,86}.

Magnezyum lipit metabolizmasında rol alan önemli bir kofaktördür. Kolesterol biyosentezinde hız kısıtlayıcı enzimin düzenleyicisidir. HDL seviyelerini arttıran ve trigliserid seviyelerini azaltan lipoprotein lipaz ve lesitin kolesterol açıl transferaz enzim aktivitelerini düzenlemektedir⁸⁷.

Egzersize bağlı oluşan hasarda, hücre ve organel membranlarındaki fosfolipitlerin fosfat grubuna bağlanarak membran stabilizasyonu sağlanmasında rol alır⁸⁸.

Akan ve ark.² diyabetik rat renal İR hasarı modelinde magnezyum sülfatın koruyucu etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında, iskemiden 5 dak önce 200mg/kg ip magnezyum sülfat vermişler ve bilateral renal İR hasarına bağlı akut böbrek hasarını azalttığını göstermişler.

Pundir ve ark.¹⁵ bilateral renal İR hasarı modeli oluşturdukları ratlarda NMDA reseptör agonist ve antagonistlerinin akut böbrek hasarı üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında iskemi döneminden 1 saat önce ve önceki 4 gün boyunca, toplam 5 gün olacak şekilde 600mg/kg i.p. magnezyum sülfat vermişler ve akut böbrek hasarını azalttığını göstermişlerdir.

Ming-Chang ve ark.¹⁸ bilateral alt ekstremite IR hasarına bağlı akciğer zedelenmesinde Mg sülfatın koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, reperfüzyondan hemen sonra 100 mg/kg intravenöz Mg sülfat vermişler ve magnezyum sülfat ile bilateral alt ekstremite IR hasarına bağlı akut akciğer hasarının azaldığını göstermişlerdir.

Kaptanođlu ve ark.⁸⁹ intrauterin İR hasarında magnezyum sülfatın fetal deride koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmalarında ratlara İR hasarından 20 dak önce 600 mg/kg Mg sülfat i.p. olarak vermişler ve magnezyum sülfatın koruyucu etkisi olduğunu göstermişlerdir.

Xiao ve ark.⁹⁰ tavşan renal İR modelinde Mg sülfatın koruyucu etkisini araştırmışlardır. alışmalarında renal iskemiden önce ve iskemi sırasında 1ml/kg/sa (25mg/kg) Mg sülfat vermişler ve sonuç olarak Mg sülfatın renal iskemide koruyucu etkinlik gösterdiğini belirtmişlerdir.



3.GEREC VE YÖNTEM

Sıçanlarda Renal İR modelinde askorbik asit ve Mg'un etkinliğinin araştırıldığı bu çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 01/09/2018 tarih ve 47/2018 protokol numaralı onayı (EK 1) alınmasının ardından Dokuz Eylül Üniversitesi Multidisipliner Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Çalışmaya Wistar cinsi, ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen, 35 adet erkek sıçan alındı. DEÜTF Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan sağlanan denekler standart sıçan yemi ve su ile beslendiler. Sıçanlar standart laboratuvar koşullarında (12 saat gündüz- 12 saat gece olacak şekilde ışıklandırma, 20-22 °C oda ısısı, % 50-60 nem) izlendi. Deneysel uygulama sırasında laboratuvar hayvanlarının bakılmasına yönelik uluslararası kılavuzlara bağlı kalındı.

3.1 Anestezi Uygulaması

Deneklere anestezi i.p. 50 mg/kg ketamin (Ketalar flk., *Pfizer Pharma GMBH, Germany*) ve 5-10 mg/kg arası ksilazin hidroklorid (Alfazyne % 2, *Alfasan International, Holland*) ile sağlandı. Gerektiğinde sıçanların anestezi derinliğini sabit tutmak için ketamin (yarı dozda, 25 mg/kg) refleks yanıtına (pensetle ayağa ağırlı uyaran verilmesi-pedal refleks, palpebral ve korneal refleksler) bakılarak tekrarlandı.

3.2 Deney Grupları ve Protokol

Sham Grubu (Grup 1, n=7): Laparotomi sonrası sağ ve sol renal pediküller açığa çıkarıldı. Başka bir girişim yapılmadan anestezi altında 285 dak bekletildi.

İskemi Reperfüzyon Grubu (Grup 2, n= 7): Laparotomi sonrası sağ ve sol renal pediküller açığa çıkartılarak her iki pediküle atravmatik klemp yerleştirilerek 45 dak iskemi uygulandıktan sonra klempler açılarak 240 dak reperfüzyon uygulandı.

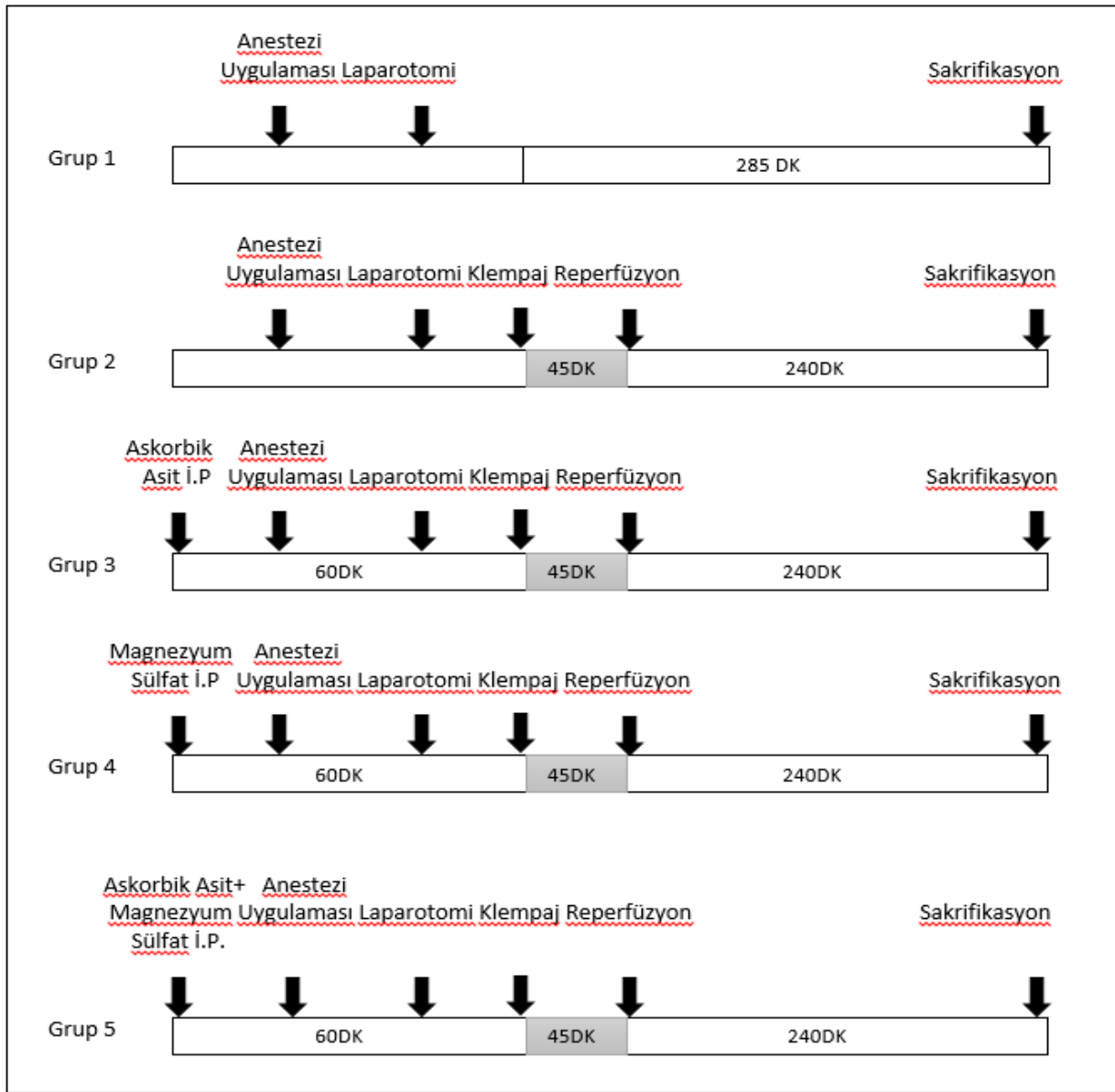
Askorbik Asit Grubu (Grup 3, n= 7): Laparotomi öncesi 250 mg/kg askorbik asit toplam volüm 1ml olacak şekilde %0,9'luk NaCl ile sulandırılarak intraperitoneal (İP) yolla uygulandı. Laparotomi sonrası sağ ve sol renal pediküller açığa çıkartılarak (ilaç uygulamasından 1 saat sonra) her iki pediküle atravmatik klemp konuldu. 45dak iskemi uygulandıktan sonra klempler açılarak 240 dak reperfüzyon uygulandı.

Magnezyum sülfat Grubu (Grup 4, n= 7): Laparotomi öncesi 200 mg/kg magnezyum sülfat toplam volüm 1ml olacak şekilde %0,9'luk NaCl ile sulandırılarak İP yolla uygulandı. Laparotomi sonrası sağ ve sol renal pediküller açığa çıkartılarak (ilaç uygulamasından 1 saat

sonra) her iki pediküle atravmatik klemp konuldu. 45dak iskemi uygulandıktan sonra klempleser açılarak 240 dak reperfüzyon uygulandı.

Askorbik Asit + Magnezyum sülfat Grubu (Grup 5, n= 7): Laparotomi öncesi 250 mg/kg askorbik asit ve 200 mg/kg magnezyum sülfat toplam volüm 1ml olacak şekilde %0,9'luk NaCl ile sulandırılarak İP yolla uygulandı. Laparotomi sonrası sağ ve sol renal pediküller açığa çıkartılarak (ilaç uygulamasından 1 saat sonra) her iki pediküle atravmatik klemp konuldu. 45 dak iskemi uygulandıktan sonra klempleser açılarak 240 dak reperfüzyon uygulandı.

Gruplara uygulanacak deneysel modelin ayrıntılı şematik görünümü Şekil-4'da sunulmuştur.



Şekil-4. Deney modelinin şematik görünümü

3.3 Deneysel Çalışma Modeli

Tüm sıçanlar anestezi uygulamasından sonra supin pozisyonda operasyon masasına sabitlenerek abdomen orta hat insizyonu ile açıldı (Resim-1).



Resim-1: Anestezi altında laparotomi uygulanması

Sol ve sağ böbrek açığa çıkarıldı ve pediküller diseke edildi. Sıçanları hipotermiden korumak için çalışma süresince operasyon masası ısıtıcı bir lamba ile ısıtıldı ve rektal prob ile ölçülen vücut sıcaklığı 37-37,5 °C arasında tutuldu. Dehidratasyonu önlemek amacıyla subkutan serum fizyolojik solüsyonu saat başı 3 ml/kg dozda uygulandı. Bekleme süreleri boyunca batın ıslak steril tamponlar ve cerrahi pens ile kapatıldı. Çalışma boyunca sıçanların normotermik kalması için, çalışma ortamının sıcaklığı ısıtıcı bir lamba ile korundu.

Sol ve sağ renal total iskemisi; atravmatik klemp ile renal pediküller sıkıştırılarak oluşturuldu (Resim-2). Yeterli oklüzyon renal solukluk oluşması ile gözlendi. İskemi süresi tamamlandıktan sonra klempler serbestleştirilip reperfüzyon sağlandı.



Resim-2: Renal pediküllerin açığa çıkarılması ve pediküllerin klemlenmesi

Tüm gruplardaki sıçanlara anestezi uygulanarak laparotomi tamamlandıktan sonra histopatolojik inceleme için sağ ve sol nefrektomi uygulandı, biyokimyasal testler için kardiyak ponksiyon ile tüm kanları alındı, aynı zamanda bu yöntemle çalışma sonlandırılıp sıçanların eksanguinasyon ile sakrifiye edilmesi sağlandı.

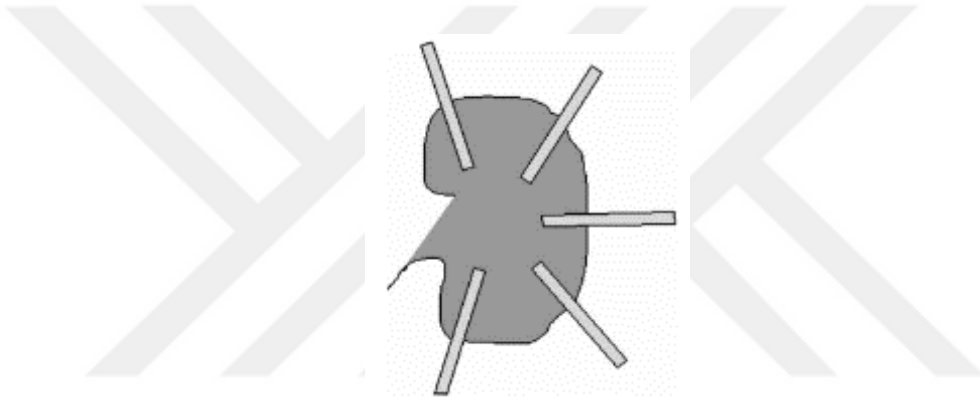
3.4 Biyokimyasal Değerlendirme

Oksidatif stres parametresi olarak MDA ile antioksidan parametrelerden GSH değerlendirme amacıyla kullanıldı. Alınan sağ ve sol böbrek örnekleri -80 °C de saklandıktan sonra homojenize edildi. Homojenizasyondan sonra numuneler santrifüj edilerek süpernatantta MDA (ng/mg prot) ve GSH (ng/mg prot) konsantrasyonları belirlendi. Bu biyokimyasal parametre kitlerinin değerlendirilmesi DEÜTF Tıbbi Biyokimya Anabilimdalı'nda gerçekleştirildi. Kan örneklerinde serum BUN (mg/dl) ve Kreatin (mg/dl) değerlerinin çalışılması için DEÜTF Hastanesi Merkez Laboratuvarı'ndan hizmet alındı.

3.5 Renal Dokunun Histomorfolojik Değerlendirilmesi

Deneklerin sakrifikasyonu sonrası alınan böbrekler renal pelvisten horizontal olarak kesilerek %10'luk formol solüsyonu içine alınacak ve dokuların fiksasyonu sağlandı. 48 saat fikse olan dokular rutin doku takibi işleminden geçirilerek parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklara gömülen dokulardan 5µm kalınlığında kesitler alınarak histolojik ve immünohistolojik boyamalar yapıldı. Histolojik incelemeler için Hematoksilin&Eozin (H&E) ve Periyodik Asit Schiff (PAS) boyamaları, apoptotik hücre incelemeleri için TUNEL immünohistokimyasal boyaması yapıldı.

H&E boyama ile genel doku morfolojisi değerlendirildi. PAS boyama ile tüm glomerüller, tübüler, interstisyel ve vasküler lezyonlar incelendi. Kortikal bölgeden seçilecek 5 farklı standart randomize alan x20 büyütmede ışık mikroskobu ile incelendi (Şekil-5).



Şekil 5: Tübüler hasarın belirlenmesi için seçilen 5 standart alan⁹¹

TUNEL immünohistokimyasal boyamanın değerlendirilmesi için hazırlanan preparatlar incelendi. Apoptotik hücrelerin kantitatif değerlendirmesi her kesitte, x20 büyütmede, rastgele 10 alan, yaklaşık 200 hücre sayılarak değerlendirildi. Yukarıda açıklanan tüm histomorfolojik analizler deney gruplarına karşı kör iki histolog tarafından yapıldı.

3.6 Dışlama

Resüsitasyon gereksinimi olan sıçanların çalışma dışında bırakılması planlandı.

3.7 İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel değerlendirme için *Statistical Package of Social Sciences 15 (SPSS 15.0, Chicago, IL, USA)* programı kullanıldı. Gruplararası karşılaştırmalar için Kruskal-Wallis analizi; grup içi karşılaştırmalar için Mann-Whitney *U* testi kullanıldı. Değerler ortalama \pm Standart Sapma (Ort \pm SS) olarak sunuldu. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Dokuz Eylül Üniversitesi Multidisipliner Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda gerçekleştirilen bu çalışmaya Wistar cinsi ortalama ağırlıkları 281.65 (± 15.77) gr olan toplam 35 adet erkek sıçan dâhil edildi. Resüsitasyon gereksinimi olan sıçan olmadı, tüm sıçanlar çalışmayı tamamladı.

4.1. Biyokimyasal Bulgular

Tüm gruplardaki sıçanlara ait biyokimyasal değerlendirmeler Tablo 3'te, Grafik 1, 2, 3 ve 4'te sunulmuştur.

Tablo-2: Biyokimyasal Bulgular (Değerler ortalama \pm SS olarak sunuldu)

	Sham (n=7)	İR (n=7)	Askorbik Asit (n=7)	Magnezyum (n=7)	Askor Asit + Magnezyum (n=7)	p
BUN (mg/dl)	34,35 \pm 11,41*	54,41 \pm 4,49†	52,97 \pm 4,55‡	49,38 \pm 4,07	48,04 \pm 3,71	0,003
KREATİNİN (mg/dl)	0,32 \pm 0,07§	0,97 \pm 0,07	0,88 \pm 0,11	0,68 \pm 0,14	0,86 \pm 0,20	<0,001
MDA (ng/mg prot)	3,05 \pm 1,11¶	5,40 \pm 2,54	3,32 \pm 1,43#	5,92 \pm 1,88	3,10 \pm 1,03**	<0,001
GSH (ng/mg prot)	0,013 \pm 0,004††	0,011 \pm 0,003‡‡	0,011 \pm 0,002§§	0,039 \pm 0,004	0,037 \pm 0,004	<0,001

*İR (p: 0.009), Askorbik Asit (p: 0.006) ve Magnezyum (p: 0.025) Grubuna kıyasla anlamlı fark.

† Askorbik Asit+Magnezyum Grubuna kıyasla anlamlı fark (p: 0.021).

‡ Askorbik Asit+Magnezyum Grubuna kıyasla anlamlı fark (p: 0.035).

§İR, Askorbik Asit, Magnezyum ve Askorbik Asit+Magnezyum Grubuna kıyasla anlamlı fark (p: 0.002).

||İR (0.002) ve Askorbik Asit (0.035) Grubuna kıyasla anlamlı fark.

¶İR (p: 0.008) ve Magnezyum (p: 0.001) Grubuna kıyasla anlamlı fark.

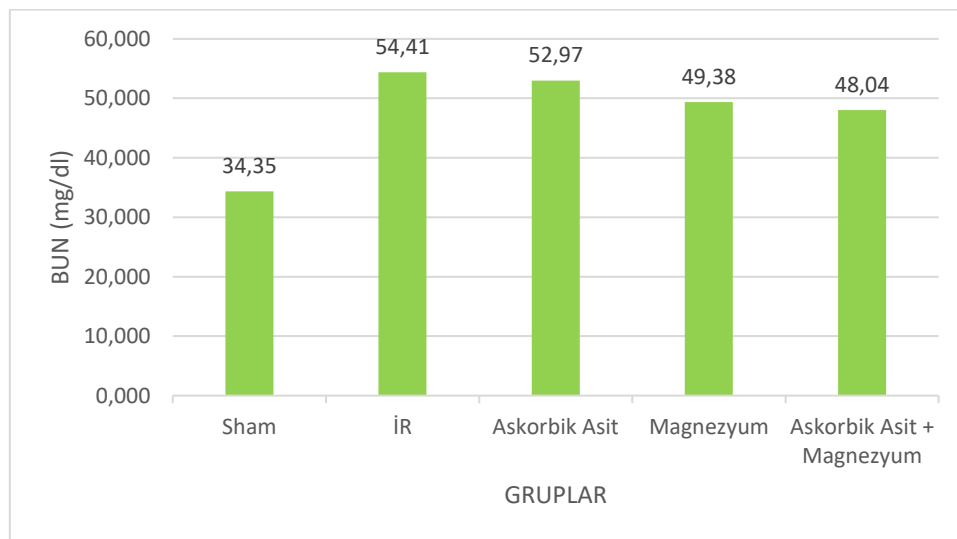
#İR (p: 0.034) ve Magnezyum (p: 0.003) Grubuna kıyasla anlamlı fark.

**İR (p: 0.014) ve Magnezyum (p: 0.001) Grubuna kıyasla anlamlı fark.

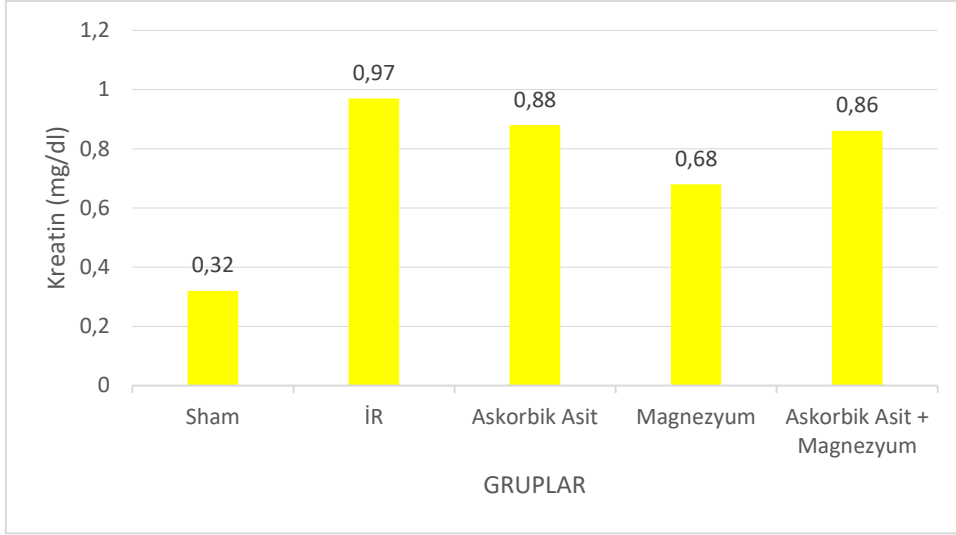
††Magnezyum (p<0.001) ve Askorbik Asit+Magnezyum (p<0.001) Grubuna kıyasla anlamlı fark.

‡‡Magnezyum (p<0.001) ve Askorbik Asit+Magnezyum (p<0.001) Grubuna kıyasla anlamlı fark.

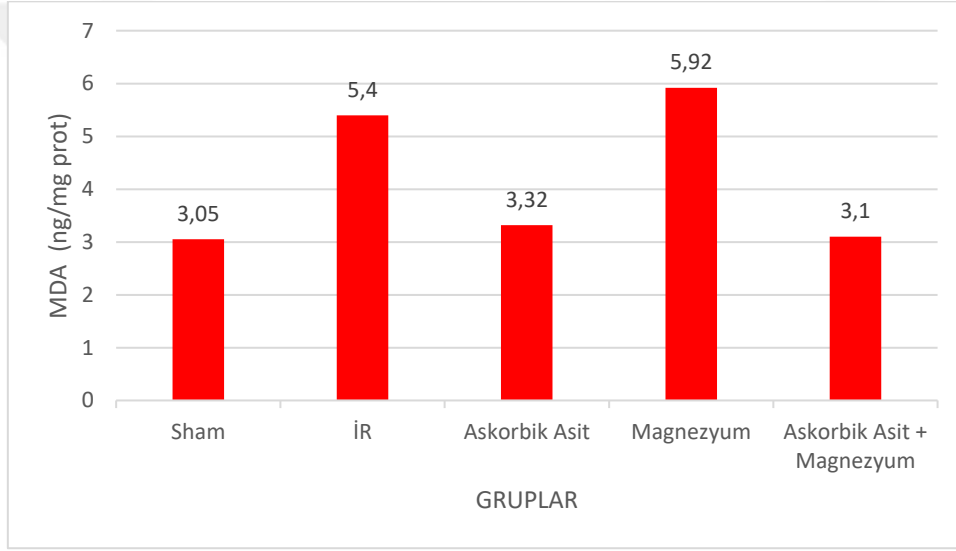
§§Magnezyum (p<0.001) ve Askorbik Asit+Magnezyum (p<0.001) Grubuna kıyasla anlamlı fark.



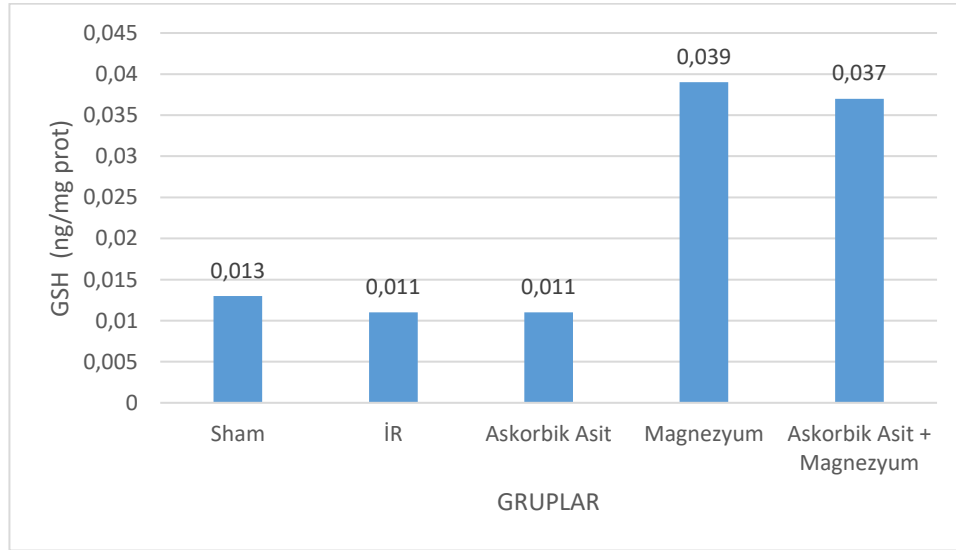
Grafik-1: Sıçanlardan alınan kan örneklerinde ölçülen BUN düzeyleri



Grafik-2: Sıçanlardan alınan kan örneklerinde ölçülen kreatin düzeyleri



Grafik-3: Sıçanlardan alınan böbrek dokularında ölçülen MDA düzeyleri



Grafik-4: Sıçanlardan alınan böbrek dokularında ölçülen GSH düzeyleri

Kan üre azotu değerleri karşılaştırılan Sham, İR, Askorbik Asit, Magnezyum ve Askorbik Asit + Magnezyum grupları arasında ortaya çıkan fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p:0,003). Sham grubundaki BUN değerinin İR (p:0,009), Askorbik Asit (p:0,006) ve Magnezyum (p: 0,025) gruplarından anlamlı olarak daha düşük olduğu belirlendi. Bu sonuç İR hasarının oluştuğu, böylece deney şartlarının sağlandığı şeklinde yorumlandı.

Askorbik Asit + Magnezyum grubundan elde edilen BUN değerinin, hem İR (p:0,021), hem de Askorbik Asit (p:0,035) grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük bulunması da askorbik asit ve Mg'un birlikte BUN değerini düşürmede daha başarılı olduğunu düşündürdü.

Kreatinin değerleri açısından değerlendirilen Sham, İR, Askorbik Asit, Magnezyum ve Askorbik Asit + Magnezyum grupları arasında ortaya çıkan fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0,001). Sham grubundaki kreatinin değerinin diğer dört deney grubundan anlamlı olarak düşük olduğu belirlendi (p:0,002). Bu sonuç da BUN için elde edilen sonuca benzer şekilde İR hasarının oluştuğu ve deney şartlarının sağlandığı şeklinde yorumlandı. Magnezyum grubunda kreatinin değerinin hem İR (p:0,002) hem de Askorbik Asit (p:0,035) Grubuna kıyasla daha düşük bulunması Magnezyumun en azından deneyde kullanılan doz ve sürelerde Kreatinin yükselmesini azaltabildiği şeklinde yorumlandı.

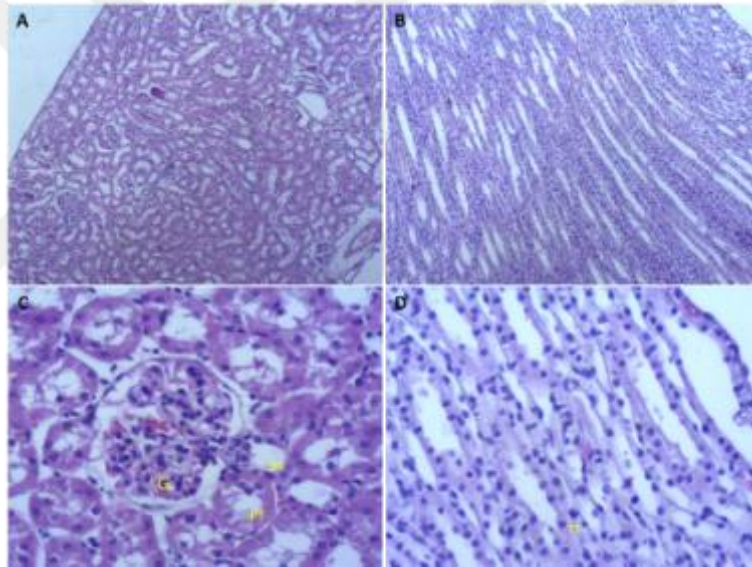
Malondialdehit değerleri açısından Sham, İR, Askorbik Asit, Magnezyum ve Askorbik Asit + Magnezyum grupları karşılaştırıldığında gruplar arası ortaya çıkan fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0,001). Askorbik Asit grubu MDA değerleri İR (p:0,034) ve Magnezyum (p:0,003) grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu. Benzer şekilde Askorbik Asit + Magnezyum grubu MDA değeri de İR (p:0,014) ve Magnezyum (p:0,001) grubundan istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu. Askorbik Asit verilen iki grupta da MDA değerlerinin Sham Grubu düzeyine düşmesi, askorbik asitin MDA düzeyini düşürmede tek başına yeterli olduğunu düşündürmüştür.

Glutasyon değerleri açısından Sham, İR, Askorbik Asit, Magnezyum ve Askorbik Asit + Magnezyum grupları karşılaştırıldığında gruplar arası ortaya çıkan fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0,001). Magnezyum ve Askorbik Asit grubunda diğer gruplara kıyasla anlamlı fark saptanmış olması (p<0.001), Magnezyumun tek başına GSH düzeyini yükseltmede yararlı olduğu şeklinde yorumlandı.

4.2. Histomorfolojik Bulgular

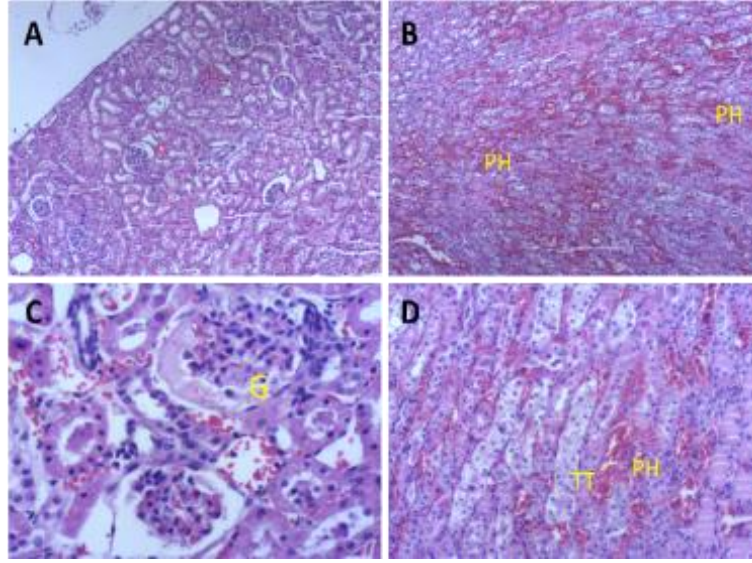
Histolojik incelemeler için Hematoksilen&Eozin (H&E) ve Periyodik Asit Schiff (PAS) boyamaları ile doku morfolojisi, glomerüller, tübüler, interstisyel ve vasküler lezyonlar incelendi. Bu değerlendirmeler farklı iki uzman tarafından kör bir şekilde yorumlanarak yapıldı. Her iki uzman görüşü de değerlendirilen gruplardaki sıçanlar içinde uyumluydu. Askorbik Asit ve Magnezyum ayrı ayrı ve birlikte uygulamasının İR hasarını önleyici etkisi tüm örneklerde görülerek tespit edildi.

Sham grubuna ait renal kesitler incelendiğinde, korteksin dışında fibröz kapsülün sağlam olarak bulunduğu, kortekste renal korpusküllerin normal yapıda olduğu belirlendi. Proksimal tübül ve distal tübül ve toplayıcı tübüllerin yapılarının normal olduğu gözlemlendi. Epitel hücreleri karakteristik yapı ve özelliklerini korumaktaydı, glomerül normal yapıda izlendi (Resim-3).



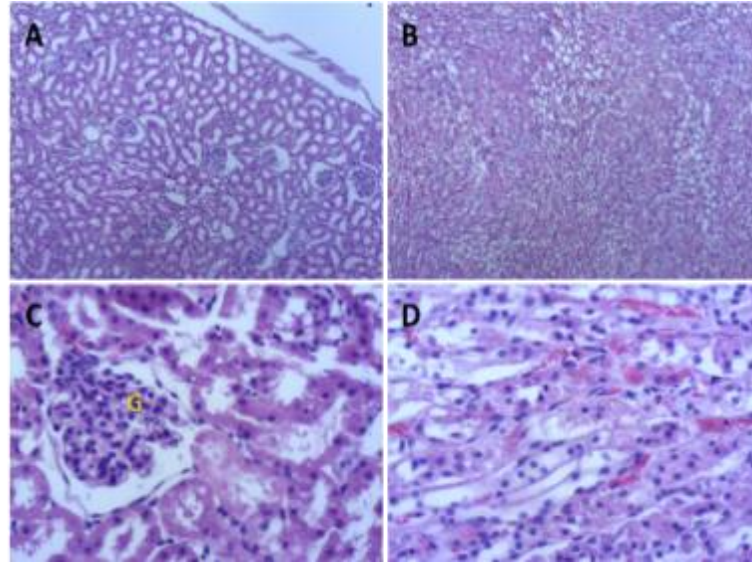
Resim-3. Sham grubuna ait kesitler (G: Glomerül, DT: Distal Tübül, PT: Proksimal Tübül, TT: Toplayıcı Tübül)

İskemi Reperfüzyon grubuna ait renal kesitler incelendiğinde kortikal damarlarda genişleme gözlemlendi. Kortikal bölgede daha fazla olmak üzere peritübüler alanda mononükleer hücre infiltrasyonu, proksimal tübül hücrelerinde fırçamsı kenar kaybı, tübüler atrofi, tübüler dilatasyon gözlemlendi. Özellikle kortikomedullar bileşkede peritübüler eritrosit ekstravazasyonu izlendi (Resim-4).



Resim-4. İskemi reperfüzyon grubuna ait kesitler (G: glomerül,TT: toplayıcı tübül, PH: peritübüler hemoraji)

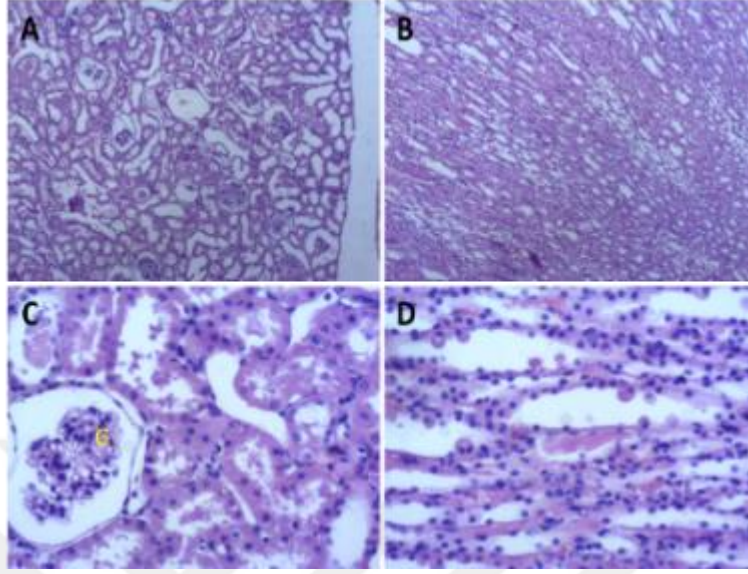
Askorbik asit grubuna ait kesitler incelendiğinde kortikal peritübüler alanda mononükleer hücre infiltrasyonunda, tübül hücrelerinde gözlenen dejenerasyonlarda ve kortekste eritrosit ekstravazasyonunda İR grubuna göre belirgin azalma gözlemlendi. Ayrıca tübülüslerde gözlenen fırçamsı kenar kaybı, tübüler atrofi, tübüler dilatasyon askorbik asit grubunda daha az oranda gözlemlendi (Resim-5).



Resim-5. Askorbik asit grubuna ait kesitler (G: Glomerül)

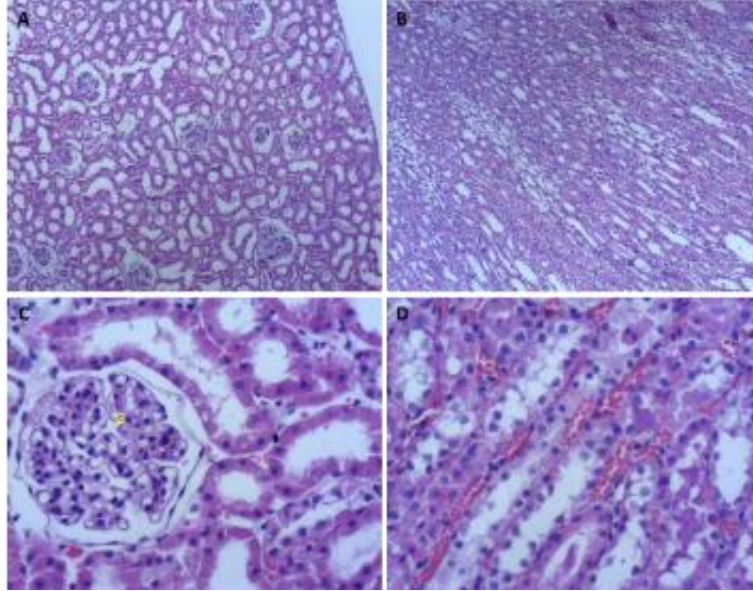
Magnezyum grubu'na ait kesitler incelendiğinde kortikal peritübüler alanda mononükleer hücre infiltrasyonunda, tübül hücrelerinde gözlenen dejenerasyonlarda ve kortekste eritrosit ekstravazasyonunda İR grubuna göre belirgin azalma gözlemlendi. Ayrıca

tübülüslerde gözlenen fırçamsı kenar kaybı, tübüler atrofi, tübüler dilatasyon askorbik asit grubunda daha az oranda gözlendi (Resim-6).



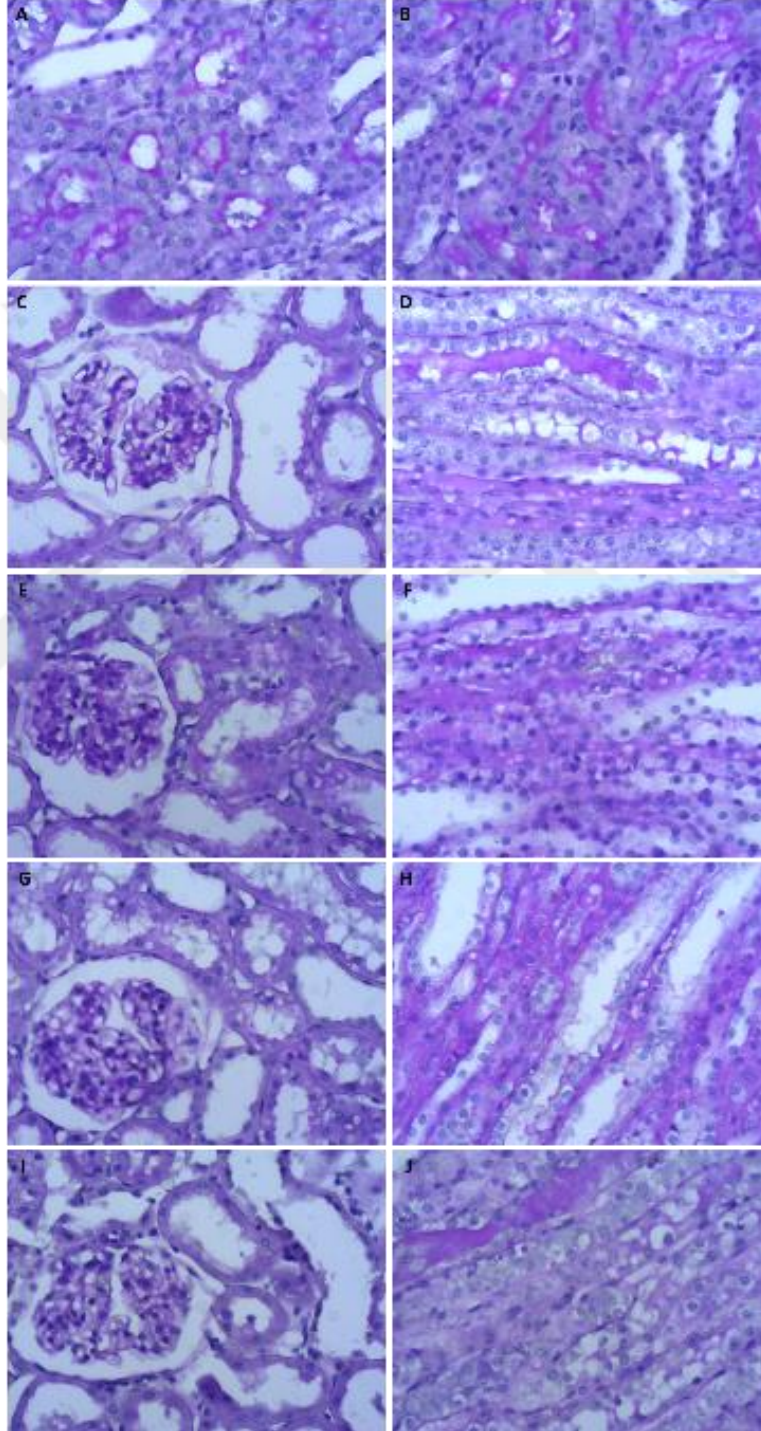
Resim-6: Magnezyum grubuna ait kesitler (G: glomerül)

Askorbik Asit + Magnezyum grubuna ait kesitler incelendiğinde daha önce ayrı ayrı uygulama sonucu oluşan değişikliklerden farklı özellikte preparat yapısına rastlanmadı. Birlikte uygulamanın, ayrı ayrı uygulamaya karşı bir üstünlüğü gözlenmedi (Resim-7).



Resim-7: Askorbik asit + magnezyum grubuna ait kesitler (G: glomerül)

PAS boyamasında İR grubunda villus kaybı olduğu gözlemlendi. Özellikle medullar hücrelerde vakuolizasyon ve PAS+ yoğun alanlar gözlemlendi. Askorbik asit, magnezyum sülfat ve askorbik asit+magnezyum sülfat gruplarında belirgin iyileşmeler olsa da villusların düzelmediği, medulladaki PAS+ birikimlerin varlığını koruduğu gözlemlendi. Medullar hücrelerdeki vakuolizasyonda yer yer azalmalar gözlemlendi (Resim-8).



Resim-8: PAS boyaması yapılan grupların kesitleri (A,B: Sham; C,D: İR; E,F: Askorbik Asit; G,H: Magnezyum; J,K: Askorbik Asit + Magnezyum)

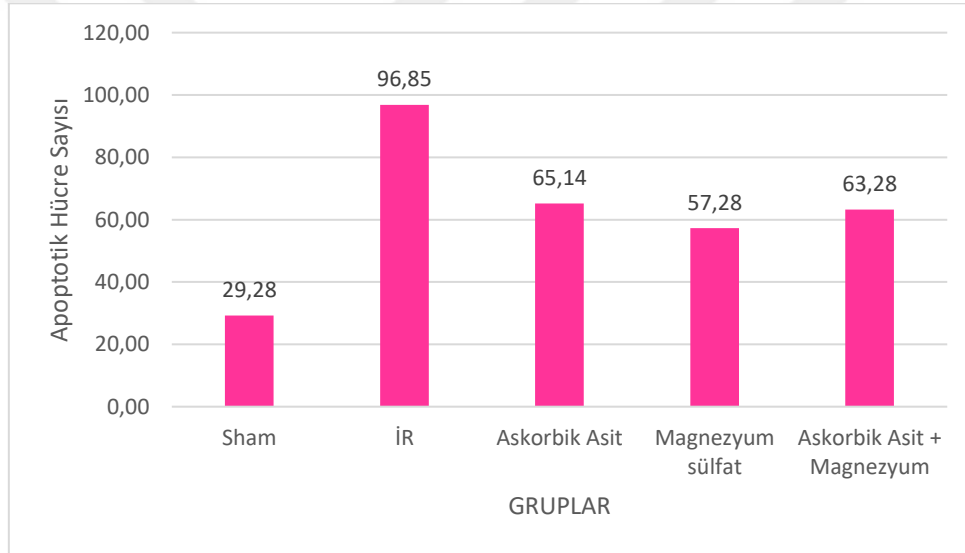
Renal doku incelemesi sonucunda elde edilen TUNEL immünohistokimyasal boyama sonuçlarına göre apoptotik hücre sayıları ortalamaları aşağıdaki Tablo-3'te ve Grafik-5'te sunulmuştur.

Tablo-3: TUNEL Sayım Sonuçları (Değerler ortalama \pm SS, olarak sunuldu)

	Sham Grubu (n=7)	İR Grubu (n=7)	Askorbik Asit Grubu (n=7)	Magnezyum Grubu (n=7)	Askorbik Asit + Magnezyum Grubu (n=7)	p
Apoptotik Hücre Sayısı	29,28 \pm 4,49 *	96,85 \pm 12,4†	65,14 \pm 29,72	57,28 \pm 11,04	63,28 \pm 20,53	<0,001

* İR (p: 0.002), Askorbik Asit (p: 0.04), Magnezyum (p: 0.002) ve Askorbik Asit+Magnezyum Grubuna (p: 0.007) kıyasla anlamlı fark.

† Askorbik Asit (p: 0.002), Magnezyum (p: 0.002) ve Askorbik Asit+Magnezyum Grubuna (p: 0.005) kıyasla anlamlı fark.

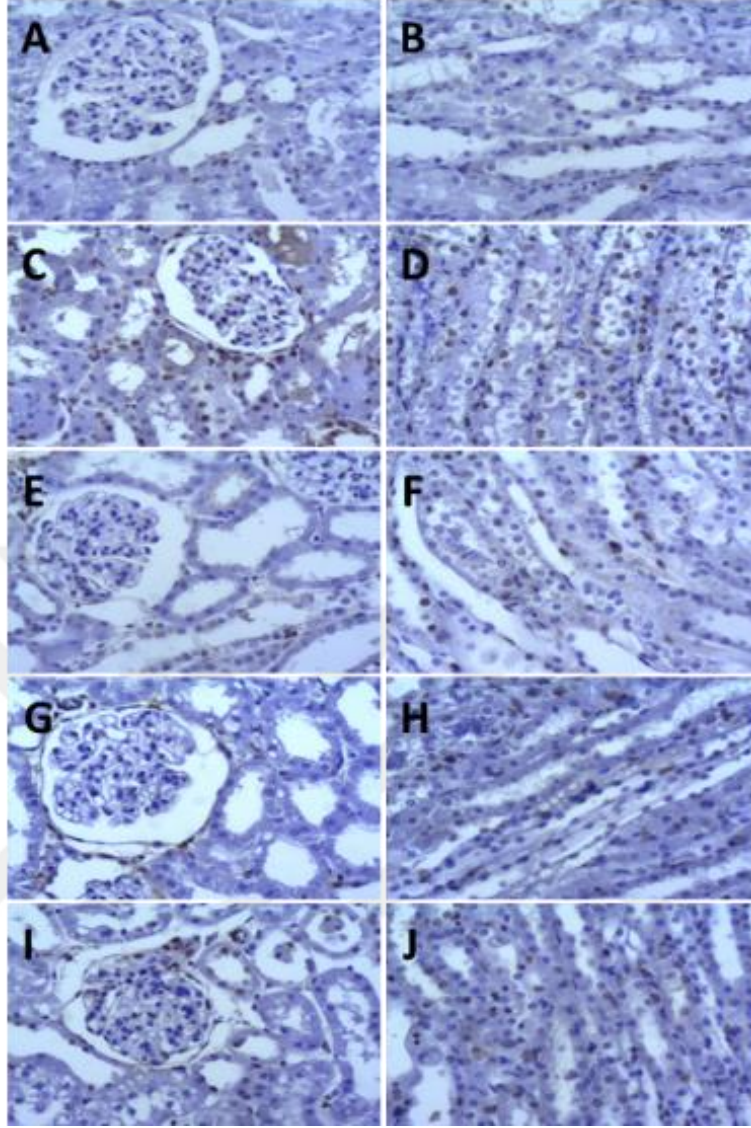


Grafik-5: TUNEL boyamaya göre apoptotik hücre sayıları

TUNEL boyamaya göre apoptotik hücre sayı ortalamaları karşılaştırıldığında Sham, İR, Askorbik Asit, Magnezyum ve Askorbik Asit + Magnezyum grupları arasında ortaya çıkan fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,001$). Sham grubundaki ortalama hücre sayılarının İR ($p: 0,002$), Askorbik Asit ($p: 0,04$), Magnezyum ($p: 0,002$), Askorbik Asit + Magnezyum ($p: 0,007$) gruplarından anlamlı olarak daha düşük olduğu belirlendi. Bu sonuç İR hasarının oluştuğu, böylece deney şartlarının sağlandığı şeklinde yorumlandı.

Askorbik Asit ($p: 0,02$), Magnezyum ($p: 0,002$) ve Askorbik Asit + Magnezyum ($p: 0,005$) gruplarının apoptotik hücre sayıları ortalamaları İR grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük saptandı. Bu da uygulanan Askorbik Asit ve Magnezyumun apoptotik hücre sayısını benzer derecede azalttığını düşündürdü.

TUNEL boyası inceleme kesitleri Resim-9'da gösterilmiştir.



Resim-9. TUNEL inceleme yapılan grupların kesitleri(A,B: Sham; C,D: İR; E,F: Askorbik Asit; G,H: Magnezyum; J,K: Askorbik Asit + Magnezyum)

5. TARTIŞMA

Sıçan renal İR modelinde iskemi öncesi uygulanan askorbik asit ve magnezyumun ayrı ayrı ve birlikte uygulanmasının etkinliğinin araştırıldığı bu deneysel çalışmada, her iki ajanın da biyokimyasal parametreler, histomorfolojik ve immünohistolojik sonuçları olumlu yönde değiştirdiği saptanmıştır.

Renal İR hasarı deneysel olarak iki farklı yöntemle oluşturulabilir. Bunlardan biri tek taraflı nefrektomi ve karşı taraf renal arter ya da renal pedikül klemplenmesi, diğeri ise bilateral renal pedikül ya da renal arterlerin klemplenmesidir. En çok tanımlanan yöntemlerin sadece renal arterin ya da renal arter ve venin beraber geçici olarak kapatılması olduğu saptanmıştır. Çalışmalardan elde edilen sonuçlar renal arter ve venlerin birlikte klemplenmesinin iskemi hasarını oluşturmada ideal yöntem olduğunu telkin etmektedir^{92,93}. Bu çalışmada bilateral renal iskemi atravmatik mikrovasküler klemplerle oluşturulmuştur. Akımın durduğu böbrek renginde solukluk ve arteriyel nabzın ortadan kalktığı izlenmesiyle doğrulanmış; iskemi süresinin sonunda klemplerin açılmasıyla kan akımının yeniden başladığı da benzer şekilde fizik muayenede renal pediküllerde arter nabzının alınması ve solukluğun geçmesi ile belirlenmiştir.

İskemi reperfüzyon yöntemi kadar renal iskemi süresinin de önemli olduğu belirtilmiştir. Yapılan kaynak taramasında İR hasarı oluşturmak için farklı süreler kullanıldığı, kullanılan sürenin organa göre de değişiklik gösterdiği saptanmıştır. Kritik iskemi süresi organ bağımlı olup beyinde 5dak'dan daha fazla iskemi dikkate değer ölçüde nöron ölümü ve infarktüse neden olurken, karaciğer ve böbrek için bu sürenin 15-20 dak olduğu bildirilmiştir¹¹. Böbrekteki iskemi süresi genellikle 30 ile 60 dakika ile sınırlandırılmıştır. Altmış dakikadan fazla olan bir renal iskemi süresinin akut tübüler nekroza ve renal yetmezliğe neden olabildiği öne sürülmüştür. Renal iskemi süresi 30 dakikadan kısa olduğunda ise tübüler epitel hücrelerinin hızlı proliferasyonu ile hasarlanmış renal tübüllerinin onarılabildiği ve buna renal fonksiyonların iyileşmesinin eşlik edebildiği saptanmıştır⁹⁴⁻⁹⁶. İskeminin böbrekte hasara yol açması için gereken süre konusunda farklı veriler elde edilmiştir⁹⁷⁻¹⁰⁴. Bu çalışmada, literatürden elde edilen bilgiler ışığında 45 dakikalık iskemi süresi uygulanmıştır.

Williams ve ark.⁹⁶ renal İR hasarının etkilerini 45 dak'lık iskemiye takiben reperfüzyonun 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 9 ve 24. saatler ile 1 hafta sonrasındaki kan ve doku örneklerinde araştırmışlardır. Bu çalışmacılara göre renal İR hasarının etkileri en erken 4. saatte başlamakta ve 24. saatte de pik yapmaktadır. Cochrane ve ark.¹⁰⁵ ise reperfüzyon sonrası renal hasarın en

erken 4. saatte görüldüğünü belirtmişlerdir. Bu veriler ile uyumlu olarak çalışmamızdaki deneysel modelde 4 saatlik reperfüzyon süresi yeğlenmiştir.

Çalışmamızda elde edilen histomorfolojik, immünohistolojik, biyokimyasal verilerin Sham Grubunda İR Grubuna kıyasla anlamlı bir fark sergilemesi de seçilen iskemi ve reperfüzyon sürelerinin hasar oluşturmaya yetecek düzeyde olduğunu ve İR modelinin doğru uygulandığını göstermiştir.

Literatürde sıçan renal İR hasarında koruyucu olarak farmakolojik ajanların ayrı ayrı veya birlikte kullanıldığı çalışmalar söz konusudur. Ancak, hem renal İR hasarını önlemede araştırılan ajanlar çok çeşitlidir hem de çalışmalarda belli bir standart bulunmamaktadır. E vitamini⁹, hidrokortizon⁹, L-arginin¹⁰, atorvastatin¹⁹, tadalafil²⁰, monoaminooksidaz inhibitörleri²¹, deksmedetomidin²² ve mannitolun²³ İR hasarına kısmen olumlu etkileri olduğu araştırmalar yapılmış; askorbik asit ve magnezyumun renal İR hasarını önlemek amacıyla birlikte uygulandığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

İR sonucunda oluşan mitokondriyal hasarlanmanın patogenezinde SOR'nin aşırı üretiminin ve antioksidan enzimlerin rolünün belirlenmesi antioksidan ve serbest radikal yakalayıcı tedavileri gündeme getirmiştir. Renal İR hasarını önlemek veya tedavi etmek amacıyla uygulanan yöntemlerden biri olan askorbik asitin İR hasarındaki olumlu etkileri daha önce yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir. Seo ve ark.¹⁴ ratlarda hepatik iskemi reperfüzyon hasarını değerlendirdikleri çalışmalarında, iskemiden 5dak önce 30 mg/kg, 100 mg/kg, 300 mg/kg ve 1000 mg/kg dozlarını dört farklı gruba uygulamışlardır. Düşük dozlarda antioksidan etkinlik gösterilmişken, yüksek doz uygulamada ise preoksidan etkilerinin olduğu göstermişlerdir. Bu çalışmada da askorbik asit dozu 250 mg/kg olarak seçilmiştir.

Mohamed ve ark.¹⁰ sıçan renal İR modelinde C vitamini ve L-argininin koruyucu rolünü araştırdıkları bir çalışma yapmışlardır. 30dak iskemi ve 30 dak reperfüzyon süresi planladıkları bu çalışmada iskemiden 24 saat önce 500 mg/kg i.p. C vitamini, iskemiden önce 3 gün boyunca her gün 400 mg/kg L arginine i.p. ve her iki ilacı da uyguladıkları 3 grup oluşturmuşlardır. C vitamini ve her iki ilacı uyguladıkları gruplarda BUN, kreatinin ve MDA ölçümlerinde renal İR hasarından koruyucu etki ortaya çıktığını göstermişlerdir. Ji ve ark.¹⁰⁶ yine aynı modelde, renal iskemi belirteci olarak kabul edecekleri süreyi saptamaya çalışmışlardır. Bu amaçla 0. 6. 12. 24. 48. ve 72. saatlerde alınan kan örneklerinde serum BUN ve kreatinin değerlerini belirlemişler ve 24. saatteki artışın daha anlamlı olduğu sonucuna varmışlardır. Shokeir ve ark.⁶ yaptığı bir çalışmada renal hasar için bakılan BUN ve kreatinin değerlerini 2. 24. ve 48. saatte

incelemişler, en yüksek değerlere 24.saatte ulaşan BUN ve kreatininin 48.saatte düşmüş olduğunu saptamışlardır. Bizim çalışmamızda askorbik asit verilen gruplarda BUN ve Kreatinin değerlerinde anlamlı bir düşme saptanmamış olması, sözü edilen çalışmalardakinin aksine 24 saatlik sürenin beklenmemesinden kaynaklanabileceği kanısına varılmıştır.

Ergin ve ark.⁸ sıçanlarda İR hasarı modelinde askorbik asitin etkisini araştırdıkları çalışmalarında iskemiden 15 dakika önce 100 mg/kg bolus ve ardından 2 saat süren reperfüzyon döneminde ise 50 mg/kg/saat dozunda infüzyon halinde askorbik asit uygulamışlardır. Uyguladıkları askorbik asitin doku MDA düzeylerinde İR hasarını azaltıcı etkisini göstermişlerdir. Benzer şekilde çalışmamızda da renal doku örneklerindeki MDA sonuçlarına göre İR grubunda MDA düzeylerinde artış saptanmış ve bu veri İR hasarının lipid peroksidasyonunu artırdığı şeklinde yorumlanmıştır. Uygulanan askorbik asitin MDA düzeyini düşürdüğü, oysa magnezyum uygulamasının etki etmediği saptanmıştır. Askorbik asit ve Magnezyumun birlikte uygulandığı grupta görülen MDA düzeylerindeki azalışın askorbik asit uygulanan gruba benzerlik göstermesi de MDA azalışının askorbik asite bağlı olduğunu doğrulamaktadır. Çalışmamızla aynı iskemi süresinin uygulandığı bir çalışmada Korkmaz ve ark.¹³ 3 saatlik reperfüzyon süresinin ardından İR Grubunda GSH değerlerinin anlamlı olarak düştüğünü saptamışlardır. Benzer iskemi süresine karşın 48 saatlik reperfüzyon uygulayan Zhu ve ark.¹² da İR grubunun GSH değerlerinin düştüğünü belirlemişlerdir. Farklı reperfüzyon sürelerine karşın GSH değerlerinin düştüğünün saptandığı bu çalışmaların tersine çalışmamızdaki İR grubunda GSH değerinde bir düşüş gözlenmemiştir. Bunun olası nedeninin uygulanan modelde oluşan oksidatif stresi GSH'ın kompanze edebilme kapasitesi içinde olduğu düşünülmüştür. Azari ve ark.⁹ sıçanlarda hidrokortizon, C Vitamini ve E Vitamini'nin renal İR hasarına karşı tek başına veya birlikte koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmalarında dört grup oluşturmuşlar. Reperfüzyondan hemen sonra 50 mg/kg C vitamini intravenöz, 20mg/kg E vitamini intramüsküler, 50 mg/kg hidrokortizon intravenöz ve son gruba da her üç ajanı uygulamışlardır. Kombinasyon tedavisinin uygulandığı grupta tübüler dejenerasyon, nekroz ve dokudaki inflamasyon derecesine göre histomorfolojik verileri bir skorla formüle ederek histolojik değerlendirmelerini yapmış ve renal dokuda İR hasarlarının anlamlı olarak azaldığını göstermişlerdir. Çalışmamızda da Hematoksilin&Eozin (H&E) ve Periyodik Asit Schiff (PAS) boyamaları kesitlerini iki uzman histolog yorumları sonucunda değerlendirilmiştir. Histomorfolojik inceleme sonrası askorbik asit ve magnezyumun İR hasarını önleyici etkisi olduğu gösterilmiştir.

Renal İR hasarını önlemek veya tedavi etmek amacıyla araştırılan ajanlardan diğeri olan magnezyumun İR hasarındaki olumlu etkileri de daha önce yapılan birçok çalışmada

gösterilmiştir. Bu çalışmada yeğlenen 200 mg/kg'lık magnezyum dozu, literatürde önerilen dozlardan seçilmiştir^{2,18,90,107,108}. Akan ve ark.² in diyabetik sıçan renal İR hasarı modelinde magnezyum sülfatın koruyucu etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında, iskemiden 5 dakika önce 200 mg/kg ip magnezyum sülfat uygulanmış ve bilateral renal İR hasarını tespit için BUN, kreatinin değerleri ve histomorfolojik skorlamadan yararlanılmıştır. Magnezyumun her üç parametrede de anlamlı değişiklik oluşturduğunun saptandığı bu çalışmada veriler akut böbrek hasarını azalttığı yönünde değerlendirilmiştir. Çalışmamızda da magnezyumun kreatinin değerlerinde İR grubuna kıyasla anlamlı bir düşme oluşturduğu saptanmıştır. Hematoksilin&Eozin (H&E) ve Periyodik Asit Schiff (PAS) boyamaları ile TUNEL immün boyama sonuçları da İR hasarında anlamlı bir azalmaya yol açtığını telkin etmiştir. Sıçanlarda renal dokuda apoptotik hücrelerin tespit edilmesinde DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlayan TUNEL testi çoğu histolog tarafından kabul edilen bir göstergedir.¹⁰⁹ Yoon Kyung ve ark.¹¹⁰ oluşturdukları renal İR modelinde apoptotik hücre sayılarının ortalamalarını değerlendirerek TUNEL boyamanın apoptozu gösterdiğini öne sürmüştür. Diğer yandan Yang ve ark.¹¹¹ renal İR modelinde apoptotik hücreleri değerlendirirken sayıların ortalamaları yerine apoptotik indeks hesaplayarak karşılaştırma yapmışlardır. Bu çalışmada Yoon Kyung ve ark.¹¹⁰'nin öne sürdüğü sayıların ortalaması alınarak değerlendirme yapılmış ve İR grubundaki TUNEL pozitif hücrelerde sham grubuna göre belirgin bir artış olduğu gözlenmiş; askorbik asit ve magnezyum uygulamasının apoptotik hücre sayısında İR grubuna kıyasla anlamlı bir azalmaya yol açtığı saptanmıştır. Apoptozda saptanan bu anlamlı azalma İR hasarında önemli bir yolak olan apoptozun magnezyum ve/veya askorbik asit uygulayarak önlenebileceğini telkin etmiştir. Pundir ve ark.¹⁵ bilateral renal İR hasarı modeli oluşturdukları sıçanlarda NMDA reseptör agonist ve antagonistlerinin akut böbrek hasarı üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında iskemiden 1 saat önce ve önceki 4 gün boyunca (toplam 5 gün) 600 mg/kg i.p. magnezyum sülfat vermişlerdir. Çalışmada kreatinin ve GSH değerlerinde anlamlı azalma saptayan araştırmacılar magnezyumun akut böbrek hasarını azalttığını göstermişlerdir. Çalışmamızda da magnezyum grubunun kreatinin değerleri İR grubuna göre anlamlı olarak azalmış ve böbrekleri İR hasarından koruduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda ayrıca magnezyum grubu ile askorbik asit + magnezyum gruplarında GSH düzeylerinde artış saptanmış, askorbik asit uygulanan grupta ise GSH değişim göstermemiştir. GSH'in magnezyum grubu ile askorbik asit + magnezyum grubunda artış göstermesi, uygulanan magnezyuma bağlı olarak GSH 'in arttığını, bunun da magnezyumun GSH sentezinde anahtar enzim olan GSH sentetazın kofaktörü olmasına bağlı olabileceğini düşünülmüştür¹¹²

6. SONUC VE ÖNERİLER

Sıçanlarda oluşturulan İR modelinde 250 mg/kg askorbik asit ve 200 mg/kg magnezyum sülfatın etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada, doku MDA ve doku GSH, kan BUN ve kan Kreatinin ölçümleri ile histomorfolojik ve immünohistolojik inceleme sonuçları değerlendirilmiştir.

Sıçan renal İR modelinde iskemi öncesi uygulanan 250 mg/kg askorbik asit ve 200 mg/kg magnezyumun ayrı ayrı ve birlikte uygulanması ile İR hasarının azaldığı saptanmıştır.

İR hasarını önlemek için iskemi öncesi askorbik asit ve magnezyum sülfat uygulamasının basit, noninvaziv ve güvenli bir yöntem olabileceği düşünülmektedir. Ancak bu uygulamanın etki mekanizmaları ve etkinlikleri açısından farklarının ortaya konacağı, insandaki doz ve sürelerinin belirleneceği daha ayrıntılı çalışmalara gereksinim vardır.

7.KAYNAKLAR

1. Collard CD, Gelman S. Prevention of Ischemia – Reperfusion Injury. *Anesthesiology*. 2001;94(6):1133-1138.
2. Akan M, Ozbilgin S, Boztas N, et al. Effect of magnesium sulfate on renal ischemia-reperfusion injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(8):1642-1655.
3. Wever KE, Menting TP, Rovers M, et al. Ischemic preconditioning in the animal kidney, a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2012;7(2):1-10.
4. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia–reperfusion injury. *J Pathol*. 2000;190(3):255-266.
5. Khajuria A, Tay C, Shi J, et al. Anesthetics attenuate ischemia-reperfusion induced renal injury: Effects and mechanisms. *Acta Anaesthesiol Taiwanica*. 2014;52(4):176-184.
6. Shokeir AA, Hussein AM, Awadalla A, et al. Protection against renal ischaemia/reperfusion injury: A comparative experimental study of the effect of ischaemic preconditioning vs. postconditioning. *Arab J Urol*. 2012;10(4):418-424.
7. Bagcik E, Ozkardesler S, Boztas N, et al. Effects of dexmedetomidine in conjunction with remote ischemic preconditioning on renal ischemia–reperfusion injury in rats. *Brazilian J Anesthesiol (English Ed.)* 2014;64(6):382-390.
8. Ergin B, Zuurbier CJ, Bezemer R, et al. Ascorbic acid improves renal microcirculatory oxygenation in a rat model of renal I/R injury. *J Transl Intern Med*. 2016;3(3):116-125.
9. Azari O, Kheirandish R, Azizi S, et al. Protective Effects of Hydrocortisone, Vitamin C and E Alone or in Combination against Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Rat. *Iran J Pathol*. 2015;10(4):272-280.
10. Mohamed AEHA, Lasheen NN. Comparative study on the protective role of vitamin C and L-arginine in experimental renal ischemia reperfusion in adult rats. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2014;6(3):153-165.
11. Oudemans-van Straaten HM, Spoelstra-de Man AME, de Waard MC. Vitamin C revisited. *Crit Care*. 2014;18(4):1-13.

12. Zhu Y Bin, Zhang YP, Zhang J, et al. Evaluation of Vitamin C supplementation on kidney function and vascular reactivity following renal ischemic injury in mice. *Kidney Blood Press Res.* 2016;41(4):460-470.
13. Korkmaz A, Kolankaya D. The protective effects of ascorbic acid against renal ischemia-reperfusion injury in male rats. *Ren Fail.* 2009;31(1):36-43.
14. Seo MY, Lee SM. Protective effect of low dose of ascorbic acid on hepatobiliary function in hepatic ischemia/reperfusion in rats. *J Hepatol.* 2002 Jan;36(1):72-77.
15. Pundir M, Arora S, Kaur T, et al. Effect of modulating the allosteric sites of N-methyl-D-aspartate receptors in ischemia-reperfusion induced acute kidney injury. *J Surg Res.* 2013;183(2):668-677.
16. Gröber U, Schmidt J, Kisters K. Magnesium in prevention and therapy. *Nutrients.* 2015;7(9):8199-8226.
17. Kavak EC, Bulmus FG, Bulmus O, et al. Magnesium: Does it reduce ischemia/reperfusion injury in an adnexal torsion rat model? *Drug Des Devel Ther.* 2018;12:409-415.
18. Kao MC, Jan WC, Tsai PS, et al. Magnesium sulfate mitigates lung injury induced by bilateral lower limb ischemia-reperfusion in rats. *J Surg Res.* 2011;171(1):e97-e106.
19. Marques dos Santos CH, Dourado DM, Kato da Silva BA, et al. Atorvastatin Protects Kidney from Remote Reperfusion Injury. *Ann Vasc Surg.* 2018.
20. Wietzikoski EGG, Foiatto JC, Czezko NG, et al. Tadalafil protector effect during ischemia-reperfusion in rats. *Acta Cir Bras.* 2017.
21. Tsutsui H, Shimokawa T, Miura T, et al. Effect of monoamine oxidase inhibitors on ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury in rats. *Eur J Pharmacol.* 2018;818:38-42.
22. Si Y, Bao H, Han L, et al. Dexmedetomidine protects against renal ischemia and reperfusion injury by inhibiting the JAK/STAT signaling activation. *J Transl Med.* 2013.
23. Özlülerden Y, Toktaş C, Aybek H, et al. The renoprotective effects of mannitol and udenafil in renal ischemia-reperfusion injury model. *Investig Clin Urol.* 2017.

24. Atila K, Çoker A, Sagol O, et al. Protective effects of carnitine in an experimental ischemia-reperfusion injury. *Clin Nutr.* 2002.
25. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg.* 1994.
26. Rhodes RS DR. Mitochondrial dysfunction of the liver and hypoglycemia in hemorrhagic shock. *Surg Gynecol Obs.* 1980;150(3):347-352.
27. Best BP. Vascular and Neuronal Ischemic Damage in Cryonics Patients. *Rejuvenation Res.* 2012.
28. McMichael M, Moore RM. Ischemia-reperfusion injury pathophysiology, part I. *J Vet Emerg Crit Care.* 2004.
29. Huang SS, Wei FC HL. Ischemic preconditioning attenuates postischemic leukocyte--endothelial cell interactions: role of nitric oxide and protein kinase C. *Circ J.* 2006;70:1070-1075.
30. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 1986;250(6).
31. Toyokuni S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int.* 1999;49(2):91-102.
32. Panés J, Perry M, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell adhesion: Avenues for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol.* 1999;126(3):537-550.
33. Göksel Ş, Yeğen B. *Klinik Fizyopatoloji.*; 2009.
34. Zelenock GB. *Clinical Ischemic Syndromes: Mechanisms and Consequences of Tissue Injury.* The CV Mosby Company; St. Louis; 1990.
35. Heurteaux C, Lauritzen I, Widmann C, et al. Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, and ATP-sensitive K⁺ channels in cerebral ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(10):4666-4670.
36. Schoenberg MH BH. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med.* 1993;21(9):1376-1386.

37. Kılınç K. Oksijen radikalleri: üretilmeleri, fonksiyonları ve toksik etkileri. *Biyokim Derg.* 1985;2:60-89.
38. Günel E, Çağlayan F, Çağlayan O, et al. Treatment of intestinal reperfusion injury using antioxidative agents. *J Pediatr Surg.* 1998.
39. Oostenbrug GS, Mensink RP, Hardeman MR, et al. Exercise performance, red blood cell deformability, and lipid peroxidation: effects of fish oil and vitamin E. *J Appl Physiol.* 1997;83(3):746-752.
40. Collard CD, Lekowski R, Jordan JE, et al. Complement activation following oxidative stress. In: *Molecular Immunology.* Vol 36. ; 1999:941-948.
41. Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, Port FK SR. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation.* 1997;63(7):968-974. doi:10.1097/00007890-199704150-00011
42. Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet.* 2004;364(9447):1814-1827. doi:10.1016/S0140-6736(04)17406-0
43. Gonwa TA, Mai ML, Klintmalm GB, et al. Chronic Renal Failure after Transplantation of a Nonrenal Organ. *N Engl J Med.* 2003;349(26):2563-2565.
44. Nigwekar SU, Kandula P, Hix JK, et al. Pathogenesis and Treatment of Kidney Disease Off-Pump Coronary Artery Bypass Surgery and Acute Kidney Injury: A Meta-analysis of Randomized and Observational Studies. 2009.
45. Noiri E, Gailit J, Sheth D, et al. Cyclic RGD peptides ameliorate ischemic acute renal failure in rats. *Kidney Int.* 1994.
46. Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J.* 1984;222(1):1-15.
47. Friedewald JJ, Rabb H. Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. In: *Kidney International.* ; 2004.
48. Faubel S, Edelstein CL. Caspases as drug targets in ischemic organ injury. *Curr Drug Targets Immune, Endocr Metab Disord.* 2005;5(3):269-287.

49. Chamoun F, Burne M, O'Donnell M, Rabb H. Pathophysiologic role of selectins and their ligands in ischemia reperfusion injury. *Front Biosci.* 2000;5.
50. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi İç Hastalıkları ABD -Nefroloji Bilim Dalı-İZMİR. Hastalıkların patogenez ve tedavisinde reaktif oksijen partikülleri ve antioksidanlar. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi.* Vol 3.; 1997.
51. Losonczy G Jr. Early postischaemic renal fibrin deposition and reduction of glomerular filtration rate in the rat: effect of the defibrinating agent Arwin. *Acta Physiol Hung.* 1985;66:183-187.
52. Druid H, Eneström S, Rammer L. Effect of anticoagulation upon nephron obstruction in experimental acute ischaemic renal failure. A morphological study. *Int J Exp Pathol.* 1998;79(1):55-66.
53. Maxwell SRJ, Lip GYH. Reperfusion injury: A review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *Int J Cardiol.* 1997.
54. Romson JL, Hook BG, Kunkel SL, et al. Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation.* 1983;67(5):1016-1023.
55. Dormandy TL. Approach To Free Radicals. *Lancet.* 1983;322(8357):1010-1014.
56. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, et al. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev.* 2001;53:135-159.
57. Becker LB. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res.* 2004;61(3):461-470.
58. Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hata T, et al. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2000;47(3):446-456.
59. Rathore N, Kale M, John S, et al. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in isoproterenol induced oxidative stress in rat erythrocytes. *Indian J Physiol Pharmacol.* 2000;44(2):161-166.
60. Sen S, Chakraborty R. The role of antioxidants in human health. *ACS Symp Ser.* 2011;1083:1-37.

61. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, et al. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res.* 1995;18(1):1-11.
62. Ross D. Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents. Mechanisms of free-radical induced toxicity and glutathione-dependent protection. *Pharmacol Ther.* 1988;37(2):231-249.
63. Laurikka J, Wu ZK, Iisalo P, et al. Regional ischemic preconditioning enhances myocardial performance in off-pump coronary artery bypass grafting. *Chest.* 2002;121(4):1183-1189.
64. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986;74(5):1124-1136.
65. Avi R, Hadhani T, Anuel M, et al. Medical progress acute renal failure. *N Engl J Med.* 1996;334:1448-1460.
66. Bouchard JF, Lamontagne D. Mechanisms of protection afforded by preconditioning to endothelial function against ischemic injury. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 1996;271(5 40-5).
67. Tapuria N, Kumar Y, Habib MM, et al. Remote Ischemic Preconditioning: A Novel Protective Method From Ischemia Reperfusion Injury-A Review. *J Surg Res.* 2008.
68. Jerome SN, Akimitsu T, Gute DC. Ischemic preconditioning attenuates capillary no-reflow induced by prolonged ischemia and reperfusion. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 1995;268(5 37-5).
69. Lochner A, Marais E, Genade S, et al. Nitric Oxide: A Trigger for Classic Preconditioning? *Am J Physiol.* 2000;279:2752-2765.
70. Peralta C, Closa D, Xaus C, et al. Hepatic preconditioning in rats is defined by a balance of adenosine and xanthine. *Hepatology.* 1998;28(3):768-773.
71. Mizutani A, Okajima K, Uchiba M, et al. Activated protein C reduces ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats by inhibiting leukocyte activation. *Blood.* 2013;122(2):302.

72. Chiao H, Kohda Y, McLeroy P, et al. α -Melanocyte-stimulating hormone protects against renal injury after ischemia in mice and rats. *J Clin Invest*. 1997; 99: 1165–1172
73. Curtis FG, Vianna PT VR. Dexmedetomidine and S(+)-ketamine in ischemia and reperfusion injury in the rat kidney. *Acta Cir Bras* . 2011;26(3):202-206.
74. Kloner RA, Bolli R, Marban E, et al. Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: An NHLBI workshop. In: *Circulation*. Vol 97. Lippincott Williams and Wilkins; 1998:1848-1867.
75. Kloner RA, Rezkalla SH. Preconditioning, postconditioning and their application to clinical cardiology. *Cardiovasc Res*. 2006;70(2):297-307.
76. Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the myocardium: From cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev*. 2003;83(4):1113-1151.
77. Kayaalp O. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. 25th ed. ANKARA: Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti; 2002.
78. Işık Z EN. Magnezyumun klinik önemi. *Genel Tıp Derg* . 2004;14(2).
79. Musso CG. Magnesium metabolism in health and disease. *Int Urol Nephrol*. 2009;41(2):357-362.
80. Salem M, Munoz R CB. Hypomagnesemia in critical illness: a common and clinically important problem. *Crit Care Clin*. 1991;7(1):225-252.
81. Özgürtaş T KT. Magnezyumun Absorbsiyonu, Ekskresyonu ve Hormonal Kontrolü. *Turkiye Klin J Med Sci*. 2002;22(5):530-534.
82. Swaminathan R. Magnesium metabolism and its disorders. *Clin Biochem* . 2003;24(2):47-66.
83. Burtis CA, Ashwood ER BD. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 5th ed.; 2012.
84. Chaudhary DP, Sharma R, Bansal DD. Implications of magnesium deficiency in type 2 diabetes: A review. *Biol Trace Elem Res*. 2010;134(2):119-129.

85. Pham P-CT, Pham P-MT, Pham S V, et al. Mini-Review Hypomagnesemia in Patients with Type 2 Diabetes. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007;2:366-373.
86. Weston J. Biochemistry of Magnesium. In: *The Chemistry of Organomagnesium Compounds*. 2008:315-367.
87. Inoue I. Lipid metabolism and magnesium. *Clin Calcium*. 2005;15(11):65-76.
88. Fawcett WJ, Haxby EJ, Male DA. *Magnesium: Physiology and Pharmacology*. Vol 83.; 1999.
89. Kaptanoglu AF, Arca T, Kilinc K. Magnesium sulfate protects fetal skin from intrauterine ischemia reperfusion injury. *Arch Dermatol Res*. 2012;304(7):529-532.
90. XIAO Bo, MA Lu-lin XC. Protective effect of heat shock protein and magnesium sulfaate supplementation on renal ischemia reperfusion injury. *J Pekin Univ*. 2011;43(4):525-530.
91. Yenicierioglu Y, Yilmaz O, Sarioglu S, et al. Effects of N-acetylcysteine on radiocontrast nephropathy in rats. *Scand J Urol Nephrol*. 2006.
92. Orvieto MA, Zorn KC, Mendiola F, et al. Recovery of Renal Function After Complete Renal Hilar Versus Artery Alone Clamping During Open and Laparoscopic Surgery. *J Urol*. 2007;177(6):2371-2374.
93. Simmons MN, Schreiber MJ, Gill IS. Surgical Renal Ischemia: A Contemporary Overview. *J Urol*. 2008;180(1):19-30.
94. Kocoglu H, Ozturk H, Ozturk H, et al. Effect of dexmedetomidine on ischemia-reperfusion injury in rat kidney: A histopathologic study. *Ren Fail*. 2009;31(1):70-74.
95. Fouad AA, Al-Mulhim AS, Jresat I, Morsy MA. Protective effects of captopril in diabetic rats exposed to ischemia/reperfusion renal injury. *J Pharm Pharmacol*. 2013;65(2):243-252.
96. Williams P, Lopez H, Britt D, et al. Characterization of Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1997;Feb:37(1):1-7.
97. Singbartl K, Ley K. Protection from Ischemia-Reperfusion Induced Severe Acute Renal Failure by Blocking E-Selectin. *Crit Care Med*. 2000;28:2507-2514

98. Hammad FT, Ojha S, Azimullah S, et al. Does β -Caryophyllene Protect against Renal Dysfunction Following Ischemia-Reperfusion Injury in the Rat? *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2018;10(6):163–171.
99. Yang S, Chou WP, Pei L. Effects of propofol on renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Exp Ther Med*. 2013;6(5):1177-1183.
100. Li YW, Zhang Y, Zhang L, et al. Protective effect of tea polyphenols on renal ischemia/reperfusion injury via suppressing the activation of TLR4/NF- κ B p65 signal pathway. *Gene*. 2014;542(1):46-51.
101. Yamaki VN, Goncalves TB, Coelho JV. et al. Protective effect of remote ischemic preconditioning in the ischemia and reperfusion-induced renal injury in rats. *Rev Col Bras Cir*. 2012;39:529-533.
102. Yılmaz Selçuk N, Yakan B, San A, et al. Deneysel sıcak renal iskemi ve reperfüzyonda lipid peroksidasyonu ve alpha-tocopherol tedavisinin değerlendirilmesi. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*. Vol 1.; 1996.
103. Luo LN, Xie DQ, Zhang XG, et al. Osthole decreases renal ischemia-reperfusion injury by suppressing JAK2/STAT3 signaling activation. *Exp Ther Med*. 2016;12(4):2009-2014.
104. Zhang J, Tang L, Li G Sen, Wang J. The anti-inflammatory effects of curcumin on renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Ren Fail*. 2018;40(1):680-686.
105. Cochrane J, Williams BT, Banerjee A, et al. Ischemic preconditioning attenuates functional, metabolic, and morphologic injury from ischemic acute renal failure in the rat. *Ren Fail*. 1999;21(2):135-145.
106. Ji Xiang, MA Lu-Lin, LU Jian. Expression of kidney injury molecule-1 in renal ischemic postconditioning and its protective effect against renal ischemia-reperfusion injury in rats. *J Peking Univ*. 2012;44:511-517.
107. Zhao Z, Tang Z, Zhang W, et al. Magnesium isoglycyrrhizinate protects against renal-ischemia-reperfusion injury in a rat model via anti-inflammation, anti-oxidation and anti-apoptosis. *Mol Med Rep*. 2017;16(3):3627-3633.

108. Chen S da, Chen Y bin, Peng Y, et al. Role of PI3K/Akt signaling in the protective effect of magnesium sulfate against ischemia-perfusion injury of small intestine in rats. *Chin Med J (Engl)*. 2010;123(11):1447-1452.
109. Kressel M, Groscurth P. Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labelling of fragmented DNA. *Cell Tissue Res*. 1994;278(3):549-556.
110. Chang YK, Choi H, Jeong JY, et al. Dapagliflozin, SGLT2 Inhibitor, Attenuates renal ischemia-reperfusion injury. *PLoS One*. 2016;11(7):1-14.
111. Yang K, Li WF, Yu JF, et al. Diosmetin protects against ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury in mice. *J Surg Res*. 2017;214(86717):69-78.
112. Herrera K, Cahoon RE, Kumaran S, Jez JM. Reaction mechanism of glutathione synthetase from *Arabidopsis thaliana*: Site-directed mutagenesis of active site residues. *J Biol Chem*. 2007;282(23):17157-17165.

K: Etik Kurul Onayı

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ MULTİDİSİPLİN LABORATUVARI HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

35340 Inciraltı İzmir-232 4122234

Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 01/19/2018
Toplantı Tarihi : 31 Ekim 2018

Sayın, Prof.Dr.Saniye Deniz ÖZZEYBEK
DEÜ Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı

47/2018 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Sıçanlarda Oluşturulan Renal İskemi Reperfüzyon Modelinde Askorbik Asit ve Magnezyumun Etkinliğinin Karşılaştırılması" isimli; Ural Can Ekmekçi, Şule Özbilgin, Efsun Kolatan, Güven Erbil, Gökçen Bilici, Semra Koçtürk, Tuğba Erkmen'in araştırmacı olduğu 35 adet erkek Wistar Albino sıçanın verildiği projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.


Prof. Dr. Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Başkanı


Prof. Dr. Safiye AKTAŞ
Üye

Prof. Dr. Gülgün OKTAY
Üye (Topl. Katılmadı)

Prof. Dr. Türkan ERTAY
Üye (Topl. Katılmadı)

Prof. Dr. Nergiz DURMUŞ
Üye

Doç. Dr. Nermin Nüket GÖÇMEN MAS
Üye


Zehra KINAM
Üye


Prof. Dr. Ali Necati GÖKMEN
Başkan Vekili
Üye

Prof. Dr. Hatice Nur OLGUN
Üye (Topl. Katılmadı)


Prof. Dr. Güray KIRKIM
Üye

Prof. Dr. Pembe UYGUN KESKİNOĞLU
Danışman (Topl. Katılmadı)


Prof. Dr. Zekiye Sultan ALTUN
Üye

Doç. Dr. Orhan KALEMÇİ
Üye (Topl. Katılmadı)


Vet. Hekim Adnan SERPEN
Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin başvuru formunda bold karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.