

T.C.  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIP FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI



**SIÇANLARDA DENEYSEL BÖBREK İSKEMİ / REPERFÜZYON  
MODELİNDE ERDOSTEİN VE D VİTAMİNİNİN KORUYUCU  
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Hatice DOĞAN

**Danışman**  
Prof. Dr. Cemil TÜMER

**HATAY– 2017**

T.C  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIP FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA DENEYSEL BÖBREK İSKEMİ / REPERFÜZYON  
MODELİNDE ERDOSTEİN VE D VİTAMİNİNİN KORUYUCU  
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Hatice DOĞAN

**Danışman**

Prof. Dr. Cemil TÜMER

Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
16346 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

**HATAY – 2017**

## TEŞEKKÜR

Lisansüstü çalışmalarında, uygulama ve teorik derslerinde her zaman yanımda olan, yüksek lisans eğitimim boyunca yakın ilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, herkese destek olan ve her türlü olanağı sağlayan Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve aynı zamanda tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Cemil TÜMER' e,

Bilgi ve deneyimlerinden yararlanma imkânı sunan, tez çalışmalarım sırasında fikirleriyle bana her zaman yol gösteren, bu teze ait yorum ve düzeltmelerin yapılmasındaki katkılarından, hoşgörüsü ve iyi niyetiyle de destek olan değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Enver Ahmet DEMİR'e,

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini paylaştan, tez çalışmalarım boyunca destek ve yardımlarını esirgemeyen Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Elemanı değerli arkadaşım Arş. Gör. Okan TUTUK'a ve tez çalışmamın laboratuvar uygulamalarında birlikte çalıştığım Fizyoloji Bölümü Yüksek Lisans öğrencileri Gökhan AĞTÜRK, Ünal KAHRAMAN, Özlem KUTLU İSHAKOĞLU ve Duygu EGELİY'e, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencileri Sümeyye TUTUK ve Filiz KAÇMAZ'a, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Nilüfer BİLGİÇ'e, tez çalışmamı yaptığım MKÜ-DAM personeline,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim ve akademik hayatım boyunca her konudaki yardımlarından, desteklerinden, sağduyulu yaklaşımlarından ve anlayışlarından dolayı sevgili aileme sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

# İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	IX
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	X
ÖZET	XIII
ABSTRACT	XIV
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Böbrek	3
2.1.1. Böbreklerin Embriyonal Gelişimi	3
2.1.2. Böbreğin Anatomisi ve Histolojisi	4
2.1.2.1. Böbreğin Genel Yapısı	6
2.1.2.2. Böbreğin Damarları ve Sinirleri	7
2.1.2.3. Böbreğin Genel Histolojik Yapısı	8
2.1.3. Böbreğin Fizyolojisi	11
2.1.3.1. Böbreğin Metabolik Fonksiyonları	12
2.1.3.2. Böbreğin Kan Akımı	13
2.1.3.3. Böbreğin Tübüler Fizyolojik İşlevleri	14
2.2. İskemi Reperfüzyon Hasarı	16
2.2.1. İskemi	16
2.2.2. Reperfüzyon	19
2.2.3. İskemi Reperfüzyon Hasarının Fizyopatolojisi	20

2.2.3.1. Serbest Oksijen Radikalleri	20
2.2.3.2. Polimorf Nüveli Lökositler (PMNL)	23
2.2.3.3. Sitokinler ve Kompleman Sistem	24
2.2.3.4. Endotel Hücresi	25
2.3. İskemi Reperfüzyon Hasarının Böbreklere Etkisi	25
2.3.1. İskemik Faz	26
2.3.2. Reperfüzyon Fazı	27
2.4. Antioksidanlar ve Savunma Sistemleri	29
2.4.1. Endojen Antioksidanlar	30
2.4.2. Eksojen Antioksidanlar	31
2.4.3. Total Antioksidan Seviyesi (TAS)	31
2.4.4. Total Oksidan Seviyesi (TOS)	31
2.4.5. Oksidatif Stres İndeksi (OSI)	32
2.6. Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta 1 (TGF- $\beta$ 1)	32
2.7. Ürotensin-II (U-II)	33
2.8. Eritropoietin (EPO)	34
2.9. Transient Reseptör Potansiyel (TRP)	35
2.9.1. Transient Reseptör Potansiyel Melastatin (TRPM) Kanalları	36
2.10. Erdosteın	37
2.11. D Vitamini	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM	40
3.1. Deney Hayvanlarının Seçimi ve Bakımı	40
3.2. Deney Grupları	40
3.3. Böbrek İ/R Modeli	42
3.4. Böbrek Histopatolojik Preparatlarının Hazırlanması	46

3.5. Biyokimyasal Analizler	46
3.5.1. Oksidatif Stres Parametrelerinin Ölçümü	47
3.5.1.1. Böbrek Dokusu Homojenizasyonu	48
3.5.1.2. Malondialdehid (MDA) Miktarının Tayini	49
3.5.1.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enziminin Aktivite Tayini	50
3.5.1.4. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Enziminin Aktivite Tayini	50
3.5.1.5. Katalaz (CAT) Enziminin Aktivite Tayini	51
3.5.1.6. Total Oksidan Seviyesi (TOS) Analizi	52
3.5.1.7. Total Antioksidan Seviyesi (TAS) Analizi	52
3.5.1.8. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Hesaplanması	52
3.5.2. Kreatinin ve Üre Analizi	52
3.5.3. TGF- $\beta$ 1, UII ve EPO Düzeylerinin Ölçümü	52
3.6. TRPM Gen İfadelerinin Analiz İşlemleri	53
3.6.1. Dokuların Homojenizasyonu ve Total RNA izolasyonu	53
3.6.2. cDNA (Komplementer DNA) Sentezi	54
3.6.3. Kantitatif Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)	56
3.7. İstatistiksel Değerlendirmeler	58
4. BULGULAR	59
4.1. Histopatoloji İnceleme Sonuçları	59
4.2. Biyokimyasal Değerlendirme Sonuçları	62
4.2.1. Oksidatif Stres Parametrelerinin Sonuçları	62
4.2.1.1. MDA, CAT, GSH-Px, SOD	62

4.2.1.2. TAS, TOS ve OSI	63
4.2.2. Üre ve Kreatinin	66
4.2.3. TGF- $\beta$ 1, U-II ve EPO	68
4.3. Gen İfadesi Sonuçları	69
5. TARTIŞMA	72
6. SONUÇ	83
7. KAYNAKLAR	84
ÖZGEÇMİŞ	92

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Böbreğin genel yapısı	7
Şekil 2.2. Böbreğin damarları	8
Şekil 2.3. Nefronun bölümleri	11
Şekil 2.4. Böbreğin kan dolaşımı	14
Şekil 2.5. İskemi döneminde hücresel değişiklikler	19
Şekil 2.6. İskemi/Reperfüzyon hasarının şematik görünümü	23
Şekil 2.7. Ksantin oksidaz sistemi ve reperfüzyon sırasında serbest radikallerin oluşumu	28
Şekil 3.1. Böbrek İ/R modelinde iskemi uygulaması	44
Şekil 3.2. Böbrek İ/R modelinde reperfüzyon uygulaması ve iskemik böbrek	45
Şekil 4.1. Grupların böbrek dokusu histopatoloji görüntüleri	61
Şekil 4.2. Gruplar arası TAS değerlerinin karşılaştırılması	63
Şekil 4.3. Gruplar arası TOS değerlerinin karşılaştırılması	64
Şekil 4.4. Gruplar arası Oksidatif Stres İndeks (OSI) değerlerinin karşılaştırılması	65
Şekil 4.5. Gruplar arası Üre düzeylerinin karşılaştırılması	66
Şekil 4.6. Gruplar arası Kreatinin düzeylerinin karşılaştırılması	67
Şekil 4.7. Sham grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arası TRPM 6 gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması	70
Şekil 4.8. İ/R grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arası TRPM 6 gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması	70
Şekil 4.9. Sham grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arası TRPM 7 gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması	71
Şekil 4.10. İ/R grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arası TRPM 7 gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması	71



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 3.1.</b> Deney grupları ve özellikleri	42
<b>Çizelge 3.2.</b> gDNA eliminasyonu için kullanılan karışım içeriği	55
<b>Çizelge 3.3.</b> cDNA sentezi için kullanılan karışım içeriği	55
<b>Çizelge 3.4.</b> cDNA tepkime koşulları	55
<b>Çizelge 3.5.</b> Çalışmada kullanılan gen bölgelerine ait primer dizi bilgileri	56
<b>Çizelge 3.6.</b> qRT-PCR için kullanılan karışım içeriği	56
<b>Çizelge 3.7.</b> TRPM 6 genine ait qRT-PCR reaksiyon koşulları	57
<b>Çizelge 3.8.</b> TRPM 7 genine ait qRT-PCR reaksiyon koşulları	57
<b>Çizelge 3.9.</b> $\beta$ -Actin genine ait qRT-PCR reaksiyon koşulları	57
<b>Çizelge 4.1.</b> Grupların histopatoloji skorlama sonuçları	60
<b>Çizelge 4.2.</b> Grupların oksidatif stres enzimlerinin istatistiksel verileri (Ort $\pm$ SS)	62
<b>Çizelge 4.3.</b> Üre ve Kreatinin düzeylerinin istatistiki verileri (Ort $\pm$ SS)	66
<b>Çizelge 4.4.</b> U-II, TGF- $\beta$ 1 ve EPO düzeylerinin istatistiki verileri (Ort $\pm$ SS)	68

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>ADH</b>	: Antidiüretik hormon
<b>AMP</b>	: Adenozin trifosfat
<b>ATP</b>	: Adenozin monofosfat
<b>BSA</b>	: Albümin bovin serum
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>cDNA</b>	: Komplementer DNA
<b>D Vit</b>	: D Vitamini
<b>ECM</b>	: Ekstraselüler matriks
<b>ELISA</b>	: Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<b>EPO</b>	: Eritropoietin
<b>Erd</b>	: Erdosteine
<b>ERK</b>	: Ekstraselüler sinyal kinaz
<b>gDNA</b>	: genomic DNA
<b>GSH</b>	: Glutatyon
<b>GSH-Px</b>	: Glutatyon peroksidaz
<b>GST</b>	: Glutatyon S-Transferaz
<b>H&amp;E</b>	: Hematoksilen-Eozin
<b>H<sub>2</sub>O</b>	: Su
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen peroksit
<b>HIF-1</b>	: Hipoksi indüklenebilir faktör 1
<b>IL-8</b>	: İnterlökin 8
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	: İnterlökin 1 beta
<b>İ.M.</b>	: İntramusküler
<b>İ.P.</b>	: İnterperitoneal
<b>İ/R</b>	: İskemi/Reperfüzyon
<b>KDH</b>	: Ksantin dehidrojenaz

<b>KO</b>	: Ksantin oksidaz
<b>LTB4</b>	: Lökotrien B4
<b>MAPK</b>	: Mitojen aktive eden protein kinaz
<b>MCP</b>	: Monosit kemoatraktan protein
<b>MDA</b>	: Malondialdehid
<b>MIP</b>	: Makrofaj inflamatuvar protein
<b>MPO</b>	: Miyeloperoksidaz
<b>NAD<sup>+</sup></b>	: Nikotinamid adenin dinükleotidin okside formu
<b>NBT</b>	: Nitro blue tetrazoliumu
<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	: Süperoksit radikali
<b>O<sub>2</sub></b>	: Oksijen
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	: Singlet oksijen
<b>OH<sup>-</sup></b>	: Hidroksil radikali
<b>OSI</b>	: Oksidatif Stres İndeksi
<b>PAF</b>	: Platelet aktive edici faktör
<b>PCR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyon
<b>PECAM-1</b>	: Trombosit-endotel hücresi adhezyon molekülü 1
<b>PMNL</b>	: Polimorf nüveli lökosit
<b>PMN</b>	: Polimorfonükleer
<b>qRT-PCR</b>	: Kantitatif Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>SOR</b>	: Serbest oksijen radikali
<b>TAS</b>	: Total Antioksidan Seviyesi
<b>TBA</b>	: Tiobarbitürik asit
<b>TCA</b>	: Trikloroasetik asit
<b>TGF-β1</b>	: Dönüştürücü büyüme faktörü-Beta 1
<b>TNF-α</b>	: Tümör nekrozis faktör alfa

<b>TOS</b>	: Total Oksidan Seviyesi
<b>TRP</b>	: Transient Reseptör Potansiyel
<b>TRPA</b>	: Transient Reseptör Potansiyel Ankirin
<b>TRPC</b>	: Transient Reseptör Potansiyel Canonical
<b>TRPM</b>	: Transient Reseptör Potansiyel Melastatim
<b>TRPML</b>	: Transient Reseptör Potansiyel Mukolipin
<b>TRPN</b>	: Transient Reseptör Potansiyel Nompc
<b>TRPP</b>	: Transient Reseptör Potansiyel Polisistin
<b>TRPV</b>	: Transient Reseptör Potansiyel Vanilloid
<b>U-II</b>	: Ürotensin II
<b>UV</b>	: Ultraviyole
<b>VDR</b>	: D vitamini reseptörü

## ÖZET

### Sıçanlarda Deneysel Böbrek İskemi / Reperfüzyon Modelinde Erdosteine ve D Vitamininin Koruyucu Etkisinin İncelenmesi

Bu tez çalışmasında sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan böbrek iskemisi/reperfüzyon (İ/R) hasarına karşı, antioksidan ve antiinflamatuar etkilere sahip erdosteine (Erd) ve D vitamininin (VitD) histopatolojik, biyokimyasal ve genetik etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

Çalışmada 47 adet Wistar albino cinsi erkek sıçan: sham (n=7), İ/R (n=10), Erd+İ/R (n=10), VitD+İ/R (n=10), Erd+VitD+İ/R (n=10) olmak üzere 5 gruba ayrıldı. Erd, İ/R öncesi 50 mg/kg/gün olmak üzere 7 gün boyunca oral yolla verildi. D vitamini, İ/R öncesi 500 I.U/kg/gün dozunda 7 gün boyunca intramusküler olarak uygulandı. Sham grubu dışındaki tüm gruplardaki sıçanların sol böbrek damarlarına (arter ve ven) travmatik vasküler klempe ile 60 dakika iskemisi ve 24 saat reperfüzyon uygulandı. Yapılan uygulamalar sonucunda histopatolojik, biyokimyasal ve genetik değerlendirmeler için sıçanların kan örnekleri ve böbrek dokuları alındı.

Diğer gruplar ile karşılaştırıldığında İ/R grubunda tübül epitelyum hücrelerinde şişme, vakuoler dejenerasyon, deskuamasyon ve nekrozun anlamlı derecede arttığı saptandı (p<0.05). Sham, Erd+İ/R, VitD+İ/R ve Erd+VitD+İ/R grupları ile karşılaştırıldığında İ/R grubunda üre (p<0.01), kreatinin (p<0.05) ve dönüştürücü büyüme faktörü beta 1 (TGF-β1) (p<0.05) seviyelerinin anlamlı artışı görüldü. Eritropoietin (EPO) hormon düzeyinin sham, Erd+İ/R ve VitD+İ/R gruplarına kıyasla İ/R grubunda anlamlı şekilde arttığı saptandı (p<0.05). İ/R, Erd+İ/R, VitD+İ/R gruplarında ürotensin II (U-II) seviyesinin sham grubuna göre anlamlı derecede arttığı saptandı (p<0.05). Doku MDA düzeyi, TOS ve OSI değerlerinin İ/R grubunda diğer tüm gruplara kıyasla anlamlı derecede arttığı görüldü (p<0.001). İ/R grubu ile karşılaştırıldığında TAS değerinin, Erd+İ/R ve Erd+VitD+İ/R gruplarında anlamlı derecede arttığı saptandı (p<0.05). SOD, CAT ve GSH-Px enzim aktivite ölçümlerinin, sham grubuna kıyasla İ/R grubunda anlamlı derecede azaldığı saptandı (p<0.01). İ/R grubu ile karşılaştırıldığında CAT ve GSH-Px değerlerinin Erd+İ/R, VitD+İ/R, Erd+VitD+İ/R gruplarında anlamlı artışı görüldü (p<0.001). Erd+İ/R ve VitD+İ/R gruplarında SOD değerinin İ/R grubuna kıyasla anlamlı olarak artışı görüldü (sırasıyla; p<0.001, p<0.01). TRPM 6 gen ekspresyon düzeyinin sham ve İ/R grubu ile ayrı ayrı kıyaslandığında Erd+VitD+İ/R grubunda anlamlı şekilde azaldığı saptandı (sırasıyla; p<0.001, p<0.05).

İ/R öncesi Erdosteine, D vitamini ve bunların kombinasyon uygulamalarının, renal İ/R'ye neden olan durumlarda ortaya çıkan İ/R hasarının önlenmesinde koruyucu etkisi olduğunu düşünmekteyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Erdosteine, D vitamini, böbrek, iskemisi, reperfüzyon.

## ABSTRACT

### Investigation of The Protective Effect of Erdosteine And D Vitamin in Experimental Kidney Ischemia / Reperfusion Model in Rats

In this study, it was aimed to investigate the histopathological, biochemical and genetic effects of erdosteine (Erd) and vitamin D (VitD), which have antioxidant and antiinflammatory effects, against experimentally induced renal ischemia/reperfusion (IR) injury in rats.

In the study, 47 male Wistar albino rats were divided into 5 groups as sham (n=7), I/R (n=10), Erd+I/R (n=10), VitD+I/R (n=10), Erd+VitD+I/R (n=10). Erd was given orally for 7 days at a dose of 50 mg/kg/day before I/R. VitD was administered intramuscularly for 7 days at a dose of 500 IU/kg/day before I/R. For all the groups except the sham group, 60-minutes ischemia and 24-hour reperfusion was performed to the left renal vessels of animals (artery and vein) with atraumatic vascular clamp. At the end of applications, blood samples and kidney tissues of animals were taken for histopathological, biochemical and genetics evaluations.

Swelling in tubule epithelial cells, vacuolar degeneration, desquamation and necrosis were significantly increased in I/R group as compared with the other groups ( $p<0.05$ ). The significant increases of urea ( $p<0.01$ ), creatinine ( $p<0.05$ ) and transforming growth factor beta-1 (TGF- $\beta$ 1) ( $p<0.05$ ) were observed in I/R group in comparison with sham, Erd+I/R, VitD+I/R and Erd+VitD+I/R groups. Erythropoietin (EPO) significantly increased in I/R group as compared to Erd+I/R and VitD+I/R groups ( $p<0.05$ ). The level of urotensin II (UII) significantly increased in I/R, Erd+I/R, VitD+I/R in comparison to sham group ( $p<0.05$ ). Tissue level of MDA, TOS and OSI significantly increased in I/R group in comparison with all the other groups ( $p<0.001$ ). TAS significantly increased in Erd+I/R and Erd+VitD+I/R groups as compared with I/R group ( $p<0.05$ ). SOD, CAT and GSH-Px enzyme measurements significantly decreased in I/R group as compared to sham group ( $p<0.01$ ). The significant increases of CAT and GSH-Px were observed in Erd+I/R, VitD+I/R and Erd+VitD+I/R groups when compared to I/R group ( $p<0.001$ ). The significant increases of SOD in Erd+I/R ve VitD+I/R were observed as compared to I/R group (respectively;  $p<0.001$ ,  $p<0.01$ ). TRPM 6 gene expression level significantly decreased in Erd+VitD+I/R group as compared with sham and I/R groups separately (respectively;  $p<0.001$ ,  $p<0.05$ ).

We think that applications of Erd, VitD and their combination before I/R have protective effects against in renal I/R injuries.

**Keywords:** Erdosteine, vitamin D, kidney, ischemia, reperfusion.

# 1. GİRİŞ

İskemi; kan akımının azalmasına bağlı olarak organ ya da dokuya giden kan akımının durması veya yetersizliği sonucunda doku ya da organın oksijenden yoksun kalması şeklinde tanımlanmaktadır. İskemik dokunun oksijenden yoksun kalmasına bağlı olarak; hücrenel enerji depolarının tükenmesi, toksik metabolitlerin birikmesi, hücre fonksiyon bozukluğu ve hücre ölümü gerçekleşmektedir. İskemik hasarın şiddeti iskemi süresininin uzamasına bağlı olarak artış göstermektedir (Welbourn ve ark. 1991, Zimmerman ve Granger 1992). Bu nedenle hem hücrenin rejenerasyonu hem de toksik metabolitlerin uzaklaştırılması amacıyla organ ya da dokunun yeniden kanlanması yani reperfüzyonu sağlanmalıdır (Montalvo-Jave ve ark. 2008). Ancak reperfüzyon ile dokuya yeniden kan akımının sağlanması durumunda hücreye arteryel kan ile bol miktarda moleküler oksijen girişi sağlanacaktır. Hücrede reperfüzyona bağlı olarak artan moleküler oksijen, aşırı serbest oksijen radikalinin (SOR) oluşumuna yol açar ve böylece hücrede artan SOR antioksidan savunma mekanizmalarının azalmasına neden olur. Sonuçta iskemik dokunun reperfüzyonu, organ ya da dokuda sadece iskemi ile oluşan hasara göre çok daha ciddi bir hasarın oluşmasına neden olur (Şehirli ve ark. 2008, Ozcan ve ark 2015).

İskemi reperfüzyon (İ/R) hasarı, tıbbın pek çok alanında sık karşılaşılan klinik bir tablo olup böbreklerde oldukça ciddi sonuçlara neden olabilen patolojik bir süreçtir. Organ transplantasyonu, miyokard infarktüsü, serebrovasküler hastalıklar, major cerrahi girişimler, trombolitik tedavi, hemorajik şok ve resüsitasyon gibi birçok klinik durumda ortaya çıkan İ/R hasarı; vücudumuzdaki tüm organlarda kendini gösterebilen ve aynı zamanda yüksek morbidite ve mortaliteye yol açtığı düşünülen geniş patofizyolojik bir süreçtir (Ozcan ve ark. 2015). İ/R döneminde renal hasar, cerrahi ve önemli klinik sorunlar ortaya çıkarmaktadır. İskemi ve sonrasında reperfüzyonun sebep olduğu renal yetmezliğin hipoksi, enflamatuar cevap ve serbest radikal hasarı gibi birçok faktörü olup; temel olay pek çok sayıda hücrenin kaybı veya ölümü ile karakterize tübüler fonksiyon kaybıdır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda renal iskemi reperfüzyon hasarını önlemek amacıyla veya oluşan hasarı düzeltmek için farklı ajanlar kullanılmıştır. Fakat Erdosteine ve D vitamininin ayrı ayrı ve birlikte uygulamasının renal İ/R hasarına etkisini biyokimyasal,

histopatolojik ve moleküler olarak basamaklarını aydınlatmaya çalışan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Son yıllarda böbrek nakli, böbrek travması ve renal arter cerrahisi gibi böbrek kan akımını azaltan girişimlerin yaygınlaşmasıyla birlikte renal iskemi reperfüzyon (İ/R) hasarının, akut böbrek yetmezliği ile birlikte yüksek morbidite ve mortaliteye neden olduğu bilinmektedir. Bu maksatla çalışmamızda sıçanlarda deneysel böbrek iskemi reperfüzyon modeli oluşturularak antioksidan ve antiinflamatuvar etkilere sahip Erdosteine ve D vitamininin renal iskemi reperfüzyon (İ/R) hasarına koruyucu etkilerini araştırmayı amaçladık.

Erdosteine (N-(carboxymethylthioacetyl)-homosysteine thiolactone) tiyol grupları içeren balgam sökücü ajan olup, karaciğerdeki metabolik süreci takiben salınan iki bloke edilmiş sülfhidril grubu içerir. Bloke edilmiş sülfhidril gruplarının serbest radikal temizleyicisi ve antioksidan aktivitesi vardır. Erdosteine, içerdiği tiyol grupları ile ortamda bulunan serbest oksijen radikallerini inhibe eder ve Glutatyon gibi endojen antioksidanların üretimini artırarak güçlü antioksidan etki gösterir. Erdosteine'in ayrıca nitrik oksit ve ksantin oksidaz aktivitesini önleyerek serbest radikal oluşumunu azalttığı da bilinmektedir. (Fadıllıoğlu ve ark. 2003).

D vitamini ve analogları, vitamin D reseptörleriyle çeşitli dokularda anti-inflamatuvar, anti-tümoral ve pleiotropik etki göstermektedirler. D vitamini; emilim, renal atılım ve kemik mineralizasyonu gibi kalsiyum fosfor metabolizmasının çeşitli basamaklarında görevi kanıtlanmış bir moleküldür. Ayrıca farklı dokularda uygulanan İ/R hasarı çalışmalarında D vitamininin iyileştirici ve koruyucu etki sağladığı belirtilmiş olup ancak koruyucu etkisinin altında yatan mekanizmanın aydınlatılması gerektiği vurgulanmaktadır (Seif ve Abdelwahab 2014).

Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda renal İ/R hasarını azaltabilmek veya önlemek için sıçanlarda böbrek İ/R modeli oluşturularak D vitamini ve Erdosteine'in renal iskemi reperfüzyon üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca iskemi yapılan böbrek dokularındaki İ/R hasarı mekanizmasını aydınlatabilmek için hasarlı dokulardaki oksidatif stres enzimleri ile beraber TRPM 6, 7 iyon kanallarının gen seviyeleri, Eritropoetin hormonu, Ürotensin-II ile TGF- $\beta$ 1'in iskemi reperfüzyon patofizyolojisindeki rollerini araştırmayı amaçladık.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Böbrek

#### 2.1.1. Böbreklerin Embriyonal Gelişimi

Embriyolojik gelişimde birbirleriyle çok yakından ilişkili olan üriner (boşaltım) ve genital (üreme) sistemler, fonksiyonel olarak ürogenital sistemi oluşturan bölümlerdir. Ürogenital sistem, embriyonun posterior abdominal duvarı boyunca yerleşen, intermedier mezodermden köken almaktadır. İntermedier mezoderm, embriyolojik gelişimde somitlerle bağlantısını kaybederek dorsal aortun her iki yanında “ürogenital kabartı (kıvrım)”’yı meydana getirir. Daha sonra üriner ve genital sistemleri oluşturacak olan bu kabartı nefrojenik kordon (kabarıntı) ve genital (gonadal) kabarıntı kısımlarını oluşturur. Böylece üriner sistem, ürogenital kabartının nefrojenik kordon (kabarıntı) kısmından oluşarak kraniokaudal yönde gelişimini sürdürür (Moore ve Persaud 2002).

Üriner sistem, embriyolojik gelişimde pronefroz, mezonefroz ve metanefroz olmak üzere birbirini izleyen üç ayrı kademedeki bir gelişim gösterir. Pronefroz ve mezonefroz geçici, fonksiyonel olmayan yapılar olup, metanefrozlar kalıcı böbrekleri oluşturan fonksiyonel yapılardır (Moore ve Persaud 2002, Sadler 2012).

**Pronefroz:** İlk böbrek olarak adlandırılan bu yapı, insan embriyosunun servikal bölgesinde, nefrojenik kordonun kranial kısmında nefrotom adı verilen bir miktar hücre topluluğu şeklinde, gelişimin dördüncü haftasının başlangıcında ortaya çıkar. Daha sonra nefrotomlar lümen kazanarak kıvrılmış pronefrik tübüleri oluştururlar. Aynı bölgede ortaya çıkan bu pronefrik tübüllerin lateral sonları birbirleriyle birleşerek kaudale doğru uzanan pronefrik kanallarını oluştururlar. Gelişmesi körelmiş olan (rudimenter) bu pronefrik sistem yapıları dördüncü haftanın sonunda dejenere olmalarına rağmen ancak pronefrik kanalların bir kısmı kalır (Şeftalioğlu 1998, Moore ve Persaud 2002, Sadler 2012).

**Mezonefroz:** Pronefrozların kaudal kısmında üst torasik ve lumbar segmentlerin ara mezoderminden gelişen orta safha böbrek yapısı, pronefrozların gerilemeye başlamasıyla gelişimin dördüncü haftasının son dönemine doğru oluşmaya başlar. Mezonefrik tübüller medial ve lateral olmak üzere iki tarafa uzanırlar. Bu tübüllerin medial

uzantılarının ucunda glomerulus oluştuktan sonra glomerulus etrafındaki bazı tübüller bowman kapsülünün yapısına katılır. Böylece bu mezonefrik tübüllerin medial uzantılarının ucunda, glomerulus ve Bowman kapsülü ile birlikte renal korpüskül gelişir. Bu tübüllerin lateral uzantıları ise mezonefrik kanala (Wolff kanalı) açılır. Mezonefrik kanal da önce kloakaya daha sonra da ürogenital sisteme açılır. Bununla birlikte mezonefrozların dejenerasyonu ise birinci trimesterin sonuna doğru gerçekleşir ve mezonefrik tübüller, erkeklerde testisin efferent kanalcıklarını oluştururken kadınlarda ise bir kısım kalıntılar bırakarak dejenere olurlar. Böylece daha iyi gelişmiş olan mezonefrik sistem yapıları, kalıcı böbrekler oluşuncaya kadar ara (intermedier) böbrekler olarak embriyoda işlev görürler (Şeftalioğlu 1998, Moore ve Persaud 2002, Sadler 2012).

**Metanefroz:** Son böbrek olarak adlandırılan bu yapı, insan embriyosunun pelvik bölgesinde intermediyer mezodermin metanefrik kısmı (metanefrik blastemi) ile üreterik tomurcuktan (metanefrik divertikulum), beşinci haftanın erken dönemlerinde gelişmeye başlar ve dokuzuncu haftanın sonunda da fonksiyon görür hale gelir. Üreter, renal pelvis, major ve minor kaliksler ile toplayıcı kanallar üreterik tomurcuktan (metanefrik divertikulum) gelişim gösterirlerken, böbreğin yapısında bulunan nefronlar ise metanefrik blastemiden gelişim sağlarlar. Bununla birlikte renal korpüskül, proksimal ve distal tübül ile henle kulpu hep beraber böbreğin fonksiyonel birimi olan nefronu oluşturmaktadırlar. Metanefrik böbrekte, nefrogenesis doğuma kadar devam eder ve böylece gebeliğin sonunda gelişmiş her bir böbrekte, yaklaşık olarak bir milyon adet nefron bulunur. Ayrıca glomerüler filtrasyon gelişimin dokuzuncu haftasında başlamasına rağmen filtrasyon oranındaki artış ve böbreklerin tam olarak fonksiyonel olgunlaşması doğumdan sonra gerçekleşir (Şeftalioğlu 1998, Moore ve Persaud 2002).

### **2.1.2. Böbreğin Anatomisi ve Histolojisi**

Böbrekler, karın boşluğunun üst ve arka tarafında columna vertebralis'in her iki yanında retroperitoneal konumda olup, vertebral kolonun hemen lateralindeki ekstraperitoneal bağ dokusu içinde uzanırlar. Böbreklerin her biri yetişkin erkeklerde 125-170 gr, kadınlarda ise 115-155 gr ağırlığında olup, genişliği 5 cm, uzunluğu 10 cm ve kalınlığı 2,5 cm olan, kırmızı-kahverengimsi renginde bir çift organdır (Drake ve ark. 2011, Ergun ve Hayran 2014).

Şekil olarak fasulyeye benzeyen böbreklerin, *facies anterior* (öne ve dışa bakan yüz) ve *facies posterior* (iç ve arkaya bakan yüz) olmak üzere iki yüzü, *margo medialis* (konveks iç kenar) ve *margo lateralis* (konkav dış kenar) olmak üzere iki kenarı, *extremitas superior* (üst uç) ve *extremitas inferior* (alt uç) olmak üzere iki de ucu vardır. Böbreklerin üst uçları 12. torakal vertebranın üst kenarı seviyesinde yer alırken, sağ böbrek alt ucu 3. lumbal vertebra seviyesine, sol böbrek alt ucu ise 2. lumbal vertebra seviyesine kadar uzanır. Üst uçları birbirlerine daha yakın olarak yerleşim gösteren böbreklerin alt uçları *crista iliaca*'dan 2.5 cm yukarıdadır. Ancak üst kısımlarının diafragmaya dayanması dolayısıyla böbrekler derin solunum ile 1-2 cm aşağı inebilirler. Aynı zamanda 11. ve 12. kostalarla komşu olan sol böbrek üst ucu, 10. interkostal aralığa kadar ve 12. kosta ile komşu olan sağ böbrek üst ucu ise 11. interkostal aralığa kadar yer değiştirebilir. Karın boşluğunun sağ üst yanında karaciğer bulunmasından dolayı sağ böbrek sol böbreğe göre biraz daha aşağıda yer alır (Chung 2005, Ergun ve Hayran 2014).

Sağ böbrek ön yüzü; üstte sağ böbrek üstü bezi, üst ve önde karaciğer sağ lobu, alt uç medialde ince bağırsak kıvrımları ve lateralde *flexura coli dextra* ile, hilus seviyesinde de duodenumun ikinci kısmı ile komşudur. Sol böbrek ön yüzü ise; üstte sol böbrek üstü bezi, önde mide, dalak, hilum seviyesinde pankreas, altta *flexura coli sinistra* ve jejunum kıvrımları ile komşudur. Her iki böbrek arka yüzü de üstte diafragma, bunun aşağısında medialden laterale *psoas major* kası, *quadratus lumborum* kası ve *transversus abdominis* kası ile komşuluk yapar (Ergun ve Hayran 2014).

Böbreklerin medial kenarlarının orta kısmında vertikal yönde seyreden ve içinde böbreğe giren ve çıkan damarlar, sinirler, renal pelvis, üreter, renal arter ve renal venin bulunduğu yarığa "hilum renale" denir. Hilum renale'de bulunan bu yapıların yerleşimi cerrahi olarak önemli olup, önden arkaya doğru renal ven, renal arter ve renal pelvis (ya da üreter) şeklinde yerleşim gösterirler (Drake ve ark. 2011, Ergun ve Hayran 2014).

Böbrekleri dıştan içe doğru saran yapılar; *fascia renalis* (gerota fasyası; karın duvarındaki subperitoneal fascia'nın devamı olan *capsula adiposa*'yı dıştan saran yapı), *capsula adiposa* (perirenal yağ tabakası; *capsula fibrosa*'yı dıştan saran zengin yağ tabakası) ve *capsula fibrosa* (böbreği dıştan saran, ince fakat oldukça sağlam kollagen liflerden

yapılmış fibröz kılıf) olarak sıralanır. Fascia renalis ve karın arka duvarında bulunan periton arasında ise *corpus adiposum pararenale* (pararenal yağ tabakası) yer alır. Böbrekleri normal lokalizasyonunda tutan en önemli yapılardan biri fascia renalis'tir. Bununla beraber böbreğin damarları, komşu organların pozisyonu, capsula adiposa ve pararenal yağ tabakası böbreklerin karın arka duvarında normal lokalizasyonda kalmasına yardımcı olan diğer yapılardır (Ergun ve Hayran 2014).

### 2.1.2.1. Böbreğin Genel Yapısı

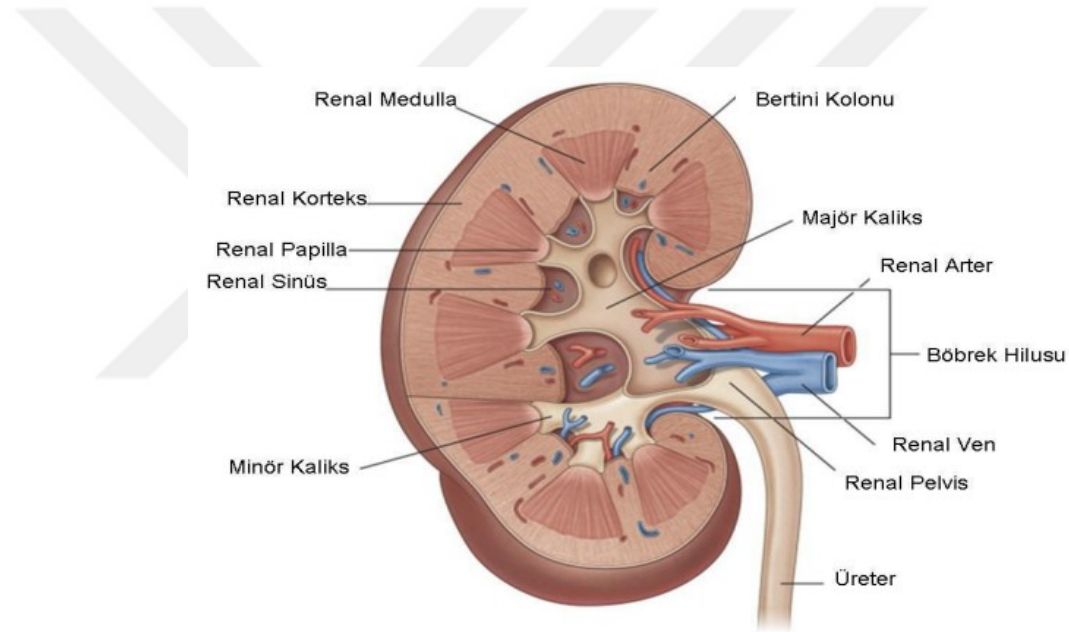
Böbrek, kenarından geçen vertikal bir kesitle ikiye ayrılarak incelendiğinde renk ve fonksiyon olarak birbirinden farklı iki bölümden oluştuğu görülür. Daha koyu renkli (kahverengi-kırmızı) ve çizgili olarak görülen iç bölüme renal medulla, daha açık renkli (kırmızı) olan dış bölüme ise renal korteks denir. Böbreğin orta kısmında bulunan ve hilum renale'ye açılan böbreğin şekline uygun boşluğa renal sinüs denir.

**Renal Medulla:** İdrarın iletilmesinde görevli toplayıcı kanalları yapısında bulunduran renal medulla, 8-10 adet koni veya piramidal şekilli *pyramis renalisler* (*malpighi piramitleri*)'den oluşur. Pyramis renalis'lerin taban kısımları böbrek dış yüzüne doğru, tepe kısımları da renal sinüs'e doğru bakar. Pyramis renalis'lerin *papilla renalis* adı verilen tepe kısmında toplayıcı kanalların açıldığı çok sayıda delik (*foramina papillaria*) vardır. Pyramis renalis'lerin aralarında *columna renalis* (*Bertini sütunları*) denilen kortikal uzantılar bulunur. Her bir pyramis renalis ve etrafını saran columna renalis birlikte bir böbrek lobunu oluşturur. Bununla beraber bir böbrekte pyramis renalis sayısı kadar böbrek lobu bulunur. Her bir pyramis renalis tabanından kortekse uzanan *stria medullaris* (*Ferrein uzantıları*) denilen bu ışımsal uzantıların her biri, birkaç nefron grubu ile birlikte bir ya da daha çok sayıda toplayıcı kanaldan oluşur (Dere 2010, Ergun ve Hayran 2014, Sargon 2016).

**Renal Korteks:** Papilla renalis'ler dışında pyramis renalis'lerin etrafını saran böbrek dokusudur. Bununla birlikte idrar yapımını sağlayan anatomik oluşumlar (renal korpüsküller, kıvrımlı ve düz tübüller, toplama tübülleri ve kanalları) renal kortekste yer alır. Pyramis renalislerin taban kısımları ile capsula fibrosa arasında kalan kortikal cevher *stria medullaris* (medullar cevherin uzantısı olup koyu renkli koni şeklindeki yapılar) ve

*columna renalis* (pyramis renalis'ler arasına doğru uzanıp piramitlerin etrafını sarar) olmak üzere iki farklı yapıdan oluşur (Ergun ve Hayran 2014, Sargon 2016).

**Renal Sinüs:** Renal hilus, böbrek içinde 2.5 cm derinliğinde ve içinde renal pelvis, renal kaliks, böbreğe giren ve çıkan renal damarlar ve sinirler ile birlikte değişik miktarda yağ dokusunun da bulunduğu, hilusun merkezi girintisi olan renal sinüs olarak devam eder. Renal pelvis dallara ayrılarak iki veya üç adet major kalikse ayrılır. İki veya üç adet minör kaliks birleşerek bir adet major kaliksi oluşturur. Bir veya üç adet papilla renalis ise bir adet minör kalikse açılır. Böylece genelde her bir böbrekte iki veya üç adet major kaliks ve 10-12 adet minör kaliks bulunur (Moore 1992, Ergun ve Hayran 2014, Sargon 2016).

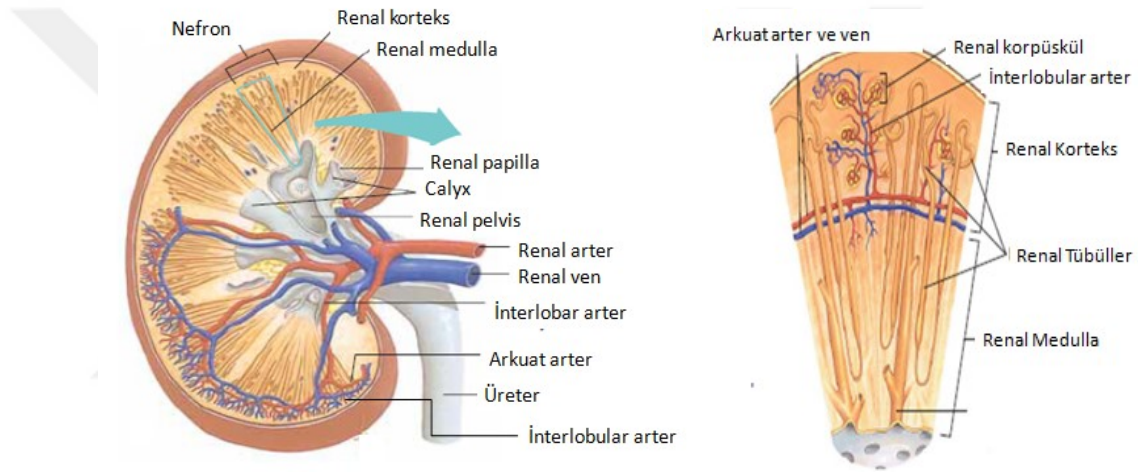


Şekil 2.1. Böbreğin genel yapısı (Anafarta 1998)

### 2.1.2.2. Böbreğin Damarları ve Sinirleri

Böbreğin kanlanması, 1. ve 2. lumbal vertebra'lar arasındaki discus intervertebralis seviyesinde aorta'dan ayrılan renal arter ile sağlanır. Renal arterler renal hilus'a girince genellikle 5 adet segmental dala ayrılır. Segmental arter denilen bu dallar, renal sinüste interlober arter dallarına ayrılır ve bu dallar *columna renalis*'e girip, *pyramides renalis* tabanında yan tarafa doğru kıvrılarak arkuat arterleri oluşturur. Böylece korteks ve medulla

arasında seyreden bu arkuat arterler birbirleriyle anastomoz yapmazlar. Arkuat arterden kortekse doğru ayrılan ve böbrek lobçukları arasında ilerleyen dallar ise interlobuler arterleri oluşturur. İnterlobuler arterlerden yana doğru çıkan ince dallar da afferent glomerüler arteri oluşturur. Böylece afferent glomerüler arter bowman kapsülünün damar kutbundan içeri girerek *rete capillare glomerulare* (glomerulus)'yi oluşturur. Bu kapiller yumaktan çıkan efferent glomerüler arter ise nefron tübüllerinin etrafında oluşturduğu *rete capillare peritubulare* (peritubuller kapiller pleksus)'dan sonra venöz dönüş başlar ve böylece pleksus dalları interlobular venlere açılır. Daha sonra sırasıyla arkuat ven, interlobar ven ve sonunda renal veni oluşturarak vena cava inferior'a açılır (Ergun ve Hayran 2014, Sargon 2016).



Şekil 2.2. Böbreğin damarları (Valerie ve Sanders 2014)

Her bir böbreğin lenf drenajı nodi lumbales (aortici laterales)'e açılır. Böbreğe gelen sempatik sinir lifleri nervus splanchnicus minor, nervus splanchnicus imus ve truncus sympathicus'un lumbal bölümünden; parasempatik lifler ise nervus vagus'tan gelir (Ergun ve Hayran 2014).

### 2.1.2.3. Böbreğin Genel Histolojik Yapısı

Karın boşluğunun arka kısmında retroperitoneal olarak yerleşim gösteren böbrekler, ince ancak kollajen fibrinlerden zengin olduğu için sağlam bir fibröz kapsül ile örtülmüş olup bu kapsülde az sayıda fibril de bulunur. Ancak yaşla birlikte elastik fibrillerin sayısı ve kapsülün kalınlığı artış gösterir.

Böbreklerde idrar oluşumunu sağlayan en küçük anatomik ve temel fonksiyonel birim nefrondur. İnsanda her böbrek yaklaşık olarak 1 milyon nefron içerir. Her bir nefron temel olarak sıvının filtre edildiği renal korpüskül (glomerül ve bowman kapsülü) ve filtre edilen sıvının böbrek pelvisine akarken idrar niteliğini kazandığı renal tübüller (proksimal tübül, henle kulpu, distal tübül ve toplayıcı tübül) olmak üzere iki bölümden oluşur (Juqueria ve ark. 1998, Singh 2011).

Kortekste yer alan renal korpüskül (malpighi cisimciği) glomerül ve bowman kapsülü olmak üzere iki yapıdan oluşur. Aynı zamanda renal korpüskülde damar kutup (afferent glomerüler arterin girip, efferent glomerüler arterin çıktığı kutup) ve idrar kutbu (bowman kapsül aralığı ile proksimal tübül lümeninin bağlandığı bölüm) olmak üzere iki kutup vardır.

Renal kortekste interlobuler arterlerden yana doğru çıkan ince dalların afferent glomerüler arteri oluşturup, bu arterin bowman kapsülünün damar kutbundan içeri girmesinden sonra afferent glomerüler arter özel bir arteriyol kılcal dönüşür. Böylece glomerül, 50 kadar paralel dala ayrılıp anastomozlar yapan arteriyol kılcal kapillerlerden oluşur. Daha sonra glomerüler kılcal kapillerler, çapı afferent glomerüler arterin çapından daha küçük olan efferent glomerüler artere dönüştükten sonra glomerülden çıkar.

Glomerül iki tabakalı epitelyal bir kapsül olan bowman kapsülü içinde yer alır. Bowman kapsülünün iç tabakası (visseral tabaka) glomerülün kapillerlerini örter, dış tabakası ise (pariyetal) renal korpüskülün en dıştaki sınırını oluşturur. Dış tabakayı tek katlı yassı epitel hücreleri oluşturur. İç tabakayı ise kılcal damarlar üzerine oturan uzunca stoplazma uzantıları olan epitel hücreleri oluşturur. Ayaksı biçimindeki bu uzantılar dolayısıyla bu epitel hücrelere podosit adı verilir. Podositlerin gövdelerinden birkaç primer uzantı şekillenir. Şekillenen bu primer uzantıların her biri ise pedisel denilen çok sayıda sekonder uzantı oluşturur. Bazal lamina ile doğrudan temas halinde olan bu sekonder uzantılar glomerül kapillerlerini sarmış durumdadırlar. Podositlerin sekonder uzantılarının birbirleriyle aralarında 25 nm'lik mesafe olacak şekilde kenetlenmeleri dolayısıyla filtrasyon yarıkları oluşur. Podositlerin stoplazmasında çok sayıda mikrofilament, mikrotübül, serbest ribozom ve bir golgi kompleksi bulunur. Visseral ve pariyetal tabakalar arasında ise bowman boşluğu denilen bir boşluk vardır. Glomerüler kılcallardan süzülen

ultrafiltrat podositler arasındaki yarıklardan ya da mikrotübüller aracılığıyla bowman boşluğuna gelir.

Glomerüler kılcal kapiller endotel hücreleri ile podositler arasında, bazal laminaların kaynaşmasıyla meydana gelmiş kalın bir bazal membran bulunur. Elektron mikroskobu yardımıyla bazal membranın ortasında lamina densa (elektron yoğun tabaka) ve her iki yanında lamina rara (daha fazla elektron geçirgen tabaka) görülür. Lamina rara, hücrelerin tutunmasını sağlayan fibronektin içerir. Lamina densa ise negatif yüklü bir glikozaminoglikan olan heparan sülfat içeren bir matriks içinde tip 4 kollajeni, entaktin ve lamininin oluşturduğu ağ şeklinde bir yapıdır. Glomerül kapillerlerinde, endotel hücreleri ve podositler ile birlikte ayrıca kapiller duvarına tutunan mezengiyal hücreler de yer alır. Mezengiyal hücrelerin sitoplazmik uzantıları kapiller lümenine ulaşacak şekilde endotel hücrelerinin arasına sokulur.

Bowman kapsülünün pariyetal tabakasının tek katlı yassı epiteli, proksimal kıvrımlı tübüllerde prizmatik epitelyum şeklinde devam eder. Çok sayıda uzamış mitokondri içeren bu epiteldeki hücrelerin apeksinde, fırçamsı kenarı oluşturan ve emilim yüzeyini arttıran çok sayıda mikrovilluslar bulunur. Kıvrımlı biçimde başlayan proksimal tübül korteksten medullaya doğru düz şekilde devam eder.

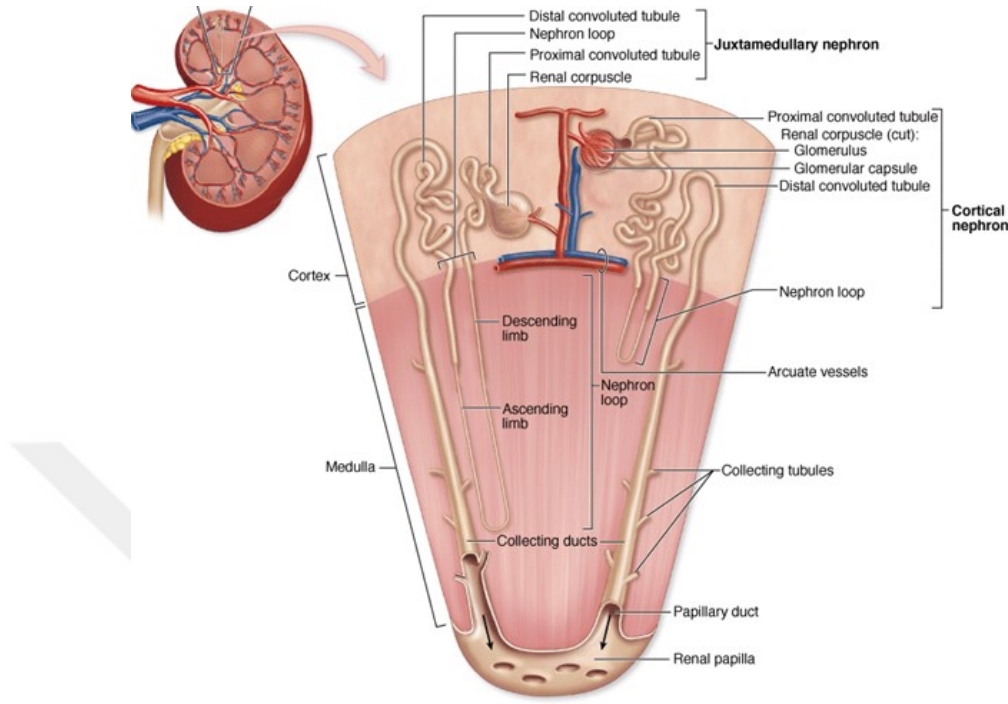
İntermedial tübül olan Henle kulpu; inen ince, çıkan ince ve çıkan kalın kol olmak üzere üç parçası olan U şeklinde bir yapıdır. Henle kulpu'nun inen ince ve çıkan ince kol tübül duvarı, yassı epitel hücreler ile çıkan kalın kol tübül duvarı ise kübik epitel ile döşelidir.

Renal kortekse yerleşmiş olan distal tübül, tek katlı kübik epitel ile döşeli olup proksimal tübülden daha kısa olduğu için histolojik preparatlarda proksimal tübüle göre daha seyrek görülür. Afferent ve efferent glomerüler arter arasında tübül lümenine doğru uzanan çıkan kalın henle kulpunun sonunda, distal tübülün başlangıcında bulunan tübül hücrelerine *makula densa* denir. Bu hücrelerin, renal korpüskülün damar kutbunda, afferent arteriyolden geçen kan miktarının düzenlenmesinde önemli rolleri vardır.

Distal tübülden sonraki kısa bağlantı kolları olan toplayıcı tübüllerin duvarları, sınırları çok belirgin olamayan kübik hücreler ile döşelidir. Toplayıcı tübüller renal korteks



ve medulla sınırında uzanıp birleşerek renal medullaya geçerler ve böylece böbreğin toplayıcı kanalcıklarını oluştururlar (Juqueria ve ark. 1998, Singh 2011, Çimen 2014).



Şekil 2.3.Nefronun bölümleri (Mescher 2009)

### 2.1.3. Böbreğin Fizyolojisi

Böbrekler, vücuttaki yaşamsal fonksiyonlardan sorumlu birçok metabolik işlevi gerçekleştiren düzenleyici ve salgılayıcı organlardır. Vücutta su ve elektrolit fazlasının idrarla birlikte vücut dışına atılmasını sağlayan böbrekler, kan basıncının ve vücut sıvılarının ozmolarite ve hacminin düzenlenmesinde rol alan hayati organlardır. Aynı zamanda böbrekler, su-elektrolit dengesinin düzenlenmesinin yanı sıra, vücutta metabolik atıkların, yabancı maddelerin ve diğer birçok metabolik ürünün idrar yoluyla vücuttan uzaklaştırılmasında önemli rol oynar. Böylece böbrekler tüm bu metabolik işlevleri, glomerüler filtrasyon, tübüler absorpsiyon, tübüler reabsorpsiyon ve salgılama işlevlerini kapsayan karmaşık bir dizi işlem aracılığı ile gerçekleştirip iç ortamın kimyasal bileşimini düzenler (Widmaier ve ark. 2014).

### 2.1.3.1.Böbreğin Metabolik Fonksiyonları

**Vücuttaki sıvı ve elektrolit dengesinin düzenlenmesi:** Vücuttaki tüm dokuların hücre hacimlerinin devamlılığının korunması için vücut sıvılarının osmolalite ve hacminin düzenlenmesi çok önemlidir. Bununla birlikte kardiyovasküler sistemin normal fonksiyonu için gerekli olan vücut sıvılarının hacim kontrolü ve regülasyonu, böbreklerin endokrin, kardiyovasküler ve sinir sistemleri ile koordineli çalışarak su ve sodyum atılımını düzenlemesiyle sağlanmış olur.

Vücut sıvı osmolalite ve hacminin düzenlenmesinin yanı sıra böbreklerin önemli bir diğer fonksiyonu da elektrolit dengesini düzenlemeleridir. Böbrekler vücuttaki sodyum, potasyum, klor, bikarbonat, hidrojen, kalsiyum ve fosfat gibi bazı inorganik iyonların miktarlarının düzenlenmesinde temel rolü üstlenirler.

**Asit-baz dengesi:** Vücuttaki metabolik olayların çoğunun pH'ya duyarlı olması dolayısıyla, vücudun metabolik fonksiyonları için pH değerinin dar bir aralıkta (7,35-7,45) bulunması gerekmektedir. Vücut sıvılarının pH değeri, böbreklerin karaciğer ve akciğer ile koordineli çalışması ve vücut sıvılarındaki tampon sistemleri aracılığıyla dengede tutulmaya çalışılır.

**Metabolik atık ürünleri ve yabancı maddelerin atılımı:** Üre, kreatinin, ürik asit, hemoglobin metabolizmasının ürünleri ile birlikte hormon metabolitleri günlük üretime uygun bir hızda böbrekler aracılığıyla vücuttan uzaklaştırılır. Böbrekler aynı zamanda ilaçlar, pestisitler, diğer kimyasal ve yabancı maddelerin vücuttan uzaklaştırılmasında da önemli rol oynarlar.

**Ekstrasellüler sıvı hacmi ve kan basıncının düzenlenmesi:** Böbrekler bu düzenleyici ve atılım fonksiyonlarının yanı sıra aynı zamanda renin, eritropoietin ve kalsitriol sentez ve salınımı yapan önemli endokrin organlardır. Böbrekler jukstaglomerüler hücrelerden salgılanan renin ile sodyum ve potasyum dengesini sağlayarak kan basıncının düzenlenmesinde önemli olan renin-anjiyotensin-aldosteron sistemini aktive ederler.

**Hormon üretimi ve metabolizması:** Bununla beraber böbreklerde renal korteksteki peritübüler kılcıl damarların endotel hücreleri tarafından salgılanan

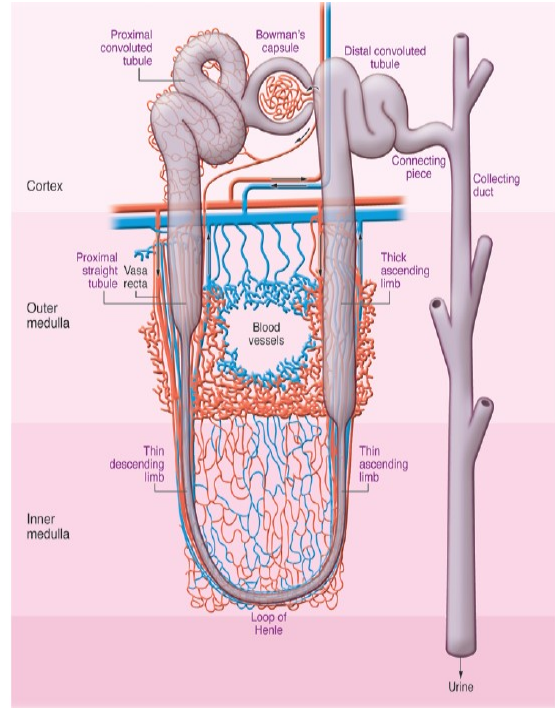
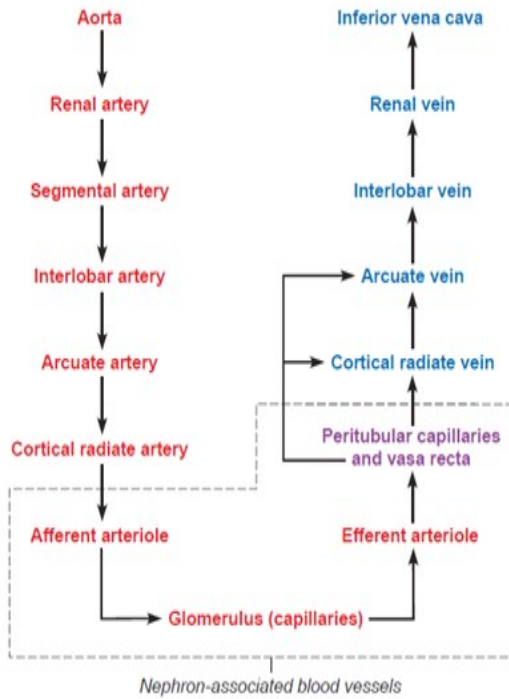
eritropoietin hormonunun, kemik iliğindeki eritrosit yapımını uyarması dolayısıyla böbrekler eritropoeziste önemli ölçüde rol üstlenirler. Kalsitriol (1,25-dihidroksikolekalsiferol ya da aktif D<sub>3</sub> vitamin), böbrekte proksimal tübüllerde 1 $\alpha$ -hidroksilaz enziminin kataliz etkisi ile 25-hidrokokolekalsiferolün 1 numaralı karbonuna bir hidroksil grubunun eklenmesi ile oluşur. Kalsitriol, kalsiyumun gastrointestinal sistemden emilimi ve kemiklerde depolanması için gereklidir.

**Metabolik etki:** Böbrekler uzun süreli açlıklarda amino asitlerden ve diğer öncüllerden glikoneojenez yaparak kan glukoz düzeyinin düzenlenmesine katkıda bulunur (Widmaier ve ark. 2014, Köylü 2016).

### 2.1.3.2. Böbreğin Kan Akımı

Böbreğin kan akımı erişkin bir bireyde ortalama olarak 1200 ml/dk kadar olup bu miktar dakikada kalp debisinin %20-25'ine karşılık gelmektedir. Böbreklerin kanlanması abdominal aorta'dan ayrılan renal arterler ile sağlanır. Renal arterler böbreğe renal hilus'tan girince; renal hilus'ta segmental dallar, segmental arterler renal sünüs'te interlobar arterler, kortikomedüller sınır düzeyinde interlobar arterler arkuat arterleri, arkuat arterlerden dik açılarla korteks içinde dallanan interlobüler arterleri ve en son olarak da interlobüler arterlerden ayrılıp glomerül kapillerlerine kan taşıyan afferent arteriyolleri oluşturur. Böylece her bir nefronun kanlanması afferent arteriol ile sağlanmış olur. Bu kılcal damarlar, daha sonra besin maddeleri ve oksijen ile nefronun geri kalan kısımlarını destekleyen ve nefron tarafından geri emilen su, moleküller ve iyonların uzaklaştırılmasını sağlayan efferent arteriyolleri oluşturmak üzere birleşirler. Böylece kan glomerül kapillerlerinden geçerek efferent arteriyollere aktarılır. Efferent arteriyoller de böbreklerin geri kalan bölümlerinin kanlanmasını sağlamak amacıyla peritübüler kapiller ağı oluşturmak üzere dallanır. Ayrıca efferent arteriyoller, renal medullanın beslenmesini ve oksijen ihtiyacını karşılamak için peritübüler kapiller ağ ile birlikte jukstaglomerüler nefronlarda, medullanın derinliklerine kadar uzanıp sonra yeniden kortikomedüller sınıra doğru geriye kıvrılıp vasa rekta adı verilen düz damarları oluşturur. Tüm bu arteryel dolaşımdan sonra efferent arteriyol daha sonra renal arterlerle aynı yolu izleyen renal venüllerle birleşerek inferior vena cava'ya açılan renal venleri oluşturur.

Böbrek kan akımının devamlığının sağlanması, böbreğin metabolik işlevleri için hayati önem taşımakla beraber ayrıca böbrek içi birtakım düzenleme mekanizmalarının desteği ile geniş kan basıncı aralıklarında sürdürülür. Böylece glomerüler kapillerlerdeki hidrostatik basıncın yüksek (60 mmHg) olması glomerüler filtrasyonun hızlı gerçekleşmesini sağlarken peritübüllerdeki düşük hidrostatik basınç (15 mmHg) sıvının çabuk geri emiliminin çok daha kolay olmasına olanak sağlayacaktır (Guyton ve Hall 2011, Köylü 2016).



Şekil 2.4. Böbreğin kan dolaşımı (Marieb ve Hoehn 2013, Bonventre ve Yang 2011)

### 2.1.3.3. Böbreğin Tübüler Fizyolojik İşlevleri

Böbreklerde idrar oluşumunu sağlayan temel fonksiyonel birim nefrondur ve insanda her iki böbrekte yaklaşık olarak 2 milyon nefron bulunur. Nefronların temel fonksiyonel işlevi istenmeyen maddeleri plazmadan uzaklaştırmak olup bu işlev için glomerüler filtrasyon, tübüler reabsorbsiyon ve tübüler sekresyon mekanizmaları ile özgün bir farklılaşma gösteren tübül sistemiyle gerçekleştirirler.

Bowman kapsülünde toplanan glomerüler filtrat kanın hidrostatik basıncına yanıt olarak oluştuktan sonra buradan sırasıyla proksimal tübül, henle kulpu, distal tübül ve en son olarak da toplayıcı kanallara ilerler. Bowman boşluğunda toplanan glomerüler filtratın

kimyasal bileşimi kan plazmasına büyük oranda benzemesine rağmen makromoleküllerin glomerül duvarını geçememeleri nedeniyle glomerüler filtratta hemen hiç protein görülmez.

Proksimal tübülün başlangıç kısmını oluşturan bowman kapsülünde bulunan glomerüler filtrattaki glukoz ve aminoasitlerin tümü, su ve sodyum korürün %85'i, küçük moleküllü proteinler ayrıca fosfat ve kalsiyum da nefronun metabolik olarak en aktif bölümü olan proksimal tübülde geri emilir. Bununla beraber proksimal tübüller kreatinin, ürik asit, safra tuzları, pek çok ilaç gibi vücuda yabancı olan maddelerin de idrara sekrete edilmesini sağlar.

Proksimal tübül önce Henle'nin aşağı doğru inen ince koluna boşalır. Henle'nin inen ince kolu, yukarı doğru uzanan ilk ince kolu ve yukarı çıkan kalın kolunun suya geçirgenlikleri ve aktif taşıma özellikleri açısından önemli farklılıkları bulunmaktadır. Henle kulpu'nun inen ince kolu suya çok fazla geçirgenlik gösterirken üre,  $\text{Na}^+$  ve diğer solütlere orta derecede geçirgenlik gösterir. Böylece renal medullaya doğru uzanan henlenin inen ince kolu glomerüler filtrata göre daha hipertondiktir. Henle kulpu'nun çıkan ince kolu üre,  $\text{NaCl}$  ve diğer solütlere orta derecede geçirgenlik gösterirken suya karşı hiç geçirgen değildir. Henle'nin çıkan kalın kolunun ise metabolik olarak aktivitesi yüksek olup; burada filtre olan  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  ve  $\text{K}^+$ un %25'inin aktif taşıma ile reabsorpsiyonu gerçekleşir. Bunlara ek olarak ayrıca  $\text{Ca}^+$ ,  $\text{Mg}^+$  ve  $\text{HCO}_3^-$  gibi iyonların geri emilimi ve  $\text{H}^+$  sekresyonu henle kulpunun bu bölümünde gerçekleşir. Sonuç olarak Henle kulpunun inen kollarının suya karşı geçirgen olmamaları dolayısıyla çıkan henle kulpunun içeriği, kortekse doğru ilerledikçe hipotonik olur.

Distal tübülde iyon değişiminin gerçekleştiği aktif bir sodyum iyonları transportu bulunur. Hormonal kontrol yoluyla aldosteron konsantrasyonu yeterince yüksek olduğunda distal tübüllerde  $\text{Na}^+$  geri emilirken  $\text{K}^+$  iyonları dışarı sekrete edilir. Bununla beraber distal tübül ayrıca idrara hidrojen ve amonyum iyonlarını salgılar. Nefronun bu bölümü vücuttaki toplam su ve tuzları kontrol etmesi yönüyle su metabolizmasının ve kandaki asit-baz dengesinin düzenlenmesinde önemli rol oynadığı için organizmada iç ortamın dengede tutulmasında büyük önem taşır.

Toplayıcı kanalların epiteli suya geçirgen değildir. Ancak su alımı azaldığında arka hipofizden salgılanan antidiüretik hormon (ADH) etkisiyle toplayıcı kanallar suya geçirgen hale gelir. Aynı zamanda bu tübüllerin asit salgılanmasında ve  $\text{HCO}_3^-$  salgılanmasında da görev alırlar.

Her iki böbrek, erişkin bir bireyde ortalama olarak 125 ml filtrat üretir ve Bowman kapsülünde üretilen bu filtratın 124 ml'si emilirken yalnızca 1 ml'si idrar olarak böbrek kalikslerine salınması neticesinde bireyde her 24 saatte ortalama olarak 1500 ml idrar oluşmaktadır.

## **2.2. İskemi Reperfüzyon Hasarı**

İskemi reperfüzyon (İ/R) hasarı, tıbbın pek çok alanında sık karşılaşılan klinik bir tablo olup böbreklerde oldukça ciddi sonuçlara neden olabilen patolojik bir süreçtir. Organ transplantasyonu, serebrovasküler hastalıklar, major cerrahi girişimler, trombolitik tedavi, hemorajik şok ve resüsitasyon, parsiyel nefrektomi ameliyatları, ürolojik bir takım girişimler, kardiyovasküler cerrahide aortik ya da periferik arteriyel klemp uygulaması sonrası gibi birçok klinik durumda ortaya çıkan İ/R hasarı; vücudumuzdaki tüm organlarda kendini gösterebilen, pek çok organ ve sistemde olumsuz etkiler yapan, klinik ya da moleküler olsun birçok basamağı yeterince aydınlatılmamış geniş patofizyolojik bir süreçtir (Sieminov ve Arslan 2004, Legrand ve ark. 2008, Ozcan ve ark. 2015).

### **2.2.1. İskemi**

İskemi, bir organ veya dokuya gelen kan akımının çeşitli nedenlerle yetersiz hale gelmesi veya durmasına bağlı olarak doku ve organın ihtiyaç duyduğu oksijen ve besin maddelerinin dolaşım tarafından sağlanamaması ve ayrıca bu süreçte oluşan atık ürünlerin yine dolaşım tarafından uzaklaştırılmaması olarak tanımlanır (Orrenius ve ark. 1992). İskemiye bağlı olarak dokulara giden oksijenin azalması sonucunda doku hipokside kalır ve böylece hipoksik doku hasarı ortaya çıkar. Bu süreçte oluşan iskemik hasar, dokunun iskemiye olan duyarlılığı ve hipoksinin şiddetine bağlı olarak, hücresel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin dokuda birikmesine yol açarak hücresel hasar ve sonrasında hücre ölümüne kadar gidebilen bir dizi biyokimyasal reaksiyona neden olur (Welbourn ve ark. 1991, Zimmerman ve Granger 1992). Dokularda gelişen iskemik hasar, dokunun iskemide kaldığı duruma göre; organın çeşitli nedenlerle kan akımından yoksun

olduğu durumlarda meydana gelen sıcak iskemi d6nemi (ilk d6nem) ve organın vücut dışında koruyucu sıvılar içinde nakline kadar olan sürede kan akımının olmadığı durumlarda oluşan soğuk iskemi d6nemi (ikinci d6nem) olmak üzere iki şekilde ortaya çıkar (Coşkunfırat ve ark. 2010).

Sağlıklı hücrelerde metabolik fonksiyonlar aerobik metabolizma ile sürdürülürken, iskemili hücrelerde dokuya gelen kan akımının azalması ya da kesilmesi ile oksidatif fosforilasyon azaldığı için enerji kaynağı olan fosfokreatin ve adenozin trifosfat (ATP) sentezinin azalması sonucunda metabolik fonksiyonlar anaerobik metabolizma ile sürdürölmektedir. Aerobik dokularda üretilen ATP adenozin monofosfat (AMP), adenozin, inozin ve hipoksantine parçalanır. Oluşan hipoksantin ise ksantin dehidrojenaz (KDH) ile ksantin ve ürik asite metabolize edilir. Aerobik dokularda hipoksantin, KDH ile olan metabolizmasında elektron alıcı olarak  $NAD^+$  (nikotinamid adenin dinökleotidin okside formu) kullanıldığı için, toksik oksijen radikalleri oluşmaz. İskemik d6nemde ise ATP üretimi durmuş olmasına rağmen kullanımı devam ettiği için ATP'den, AMP ve adenozin oluşur. Böylece oluşan adenozin hızla hücre dışına difüze edildikten sonra inozin ve hipoksantine parçalanır. Dolayısıyla iskemik d6nemde, yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin yıkımına bağlı olarak dokuda pürin metabolitlerinin birikmesi sonucu KDH, ksantin oksidaza (KO) dönüştüğü için hipoksantin, KO ile metabolize edilir. İskemik dokuda hipoksantin, KO ile olan metabolizmasında moleküler oksijen ( $O_2$ ) kullanıldığı için ara ürün olarak toksik oksijen radikaller üretilir (Parks ve ark. 1988, Li ve Jackson 2002, Yapca ve ark. 2013).

Uzun süre devam eden iskemi durumunda hücre enerji depolarının boşalması, hücre membranında bulunan ATP bağımlı  $Na^+K^+$ -ATPaz pompasının inhibisyonuna yol açar. Böylece ATPaz pompa inhibisyonu,  $Na^+$  ve  $Ca^{+2}$  iyonlarının hücre içinden hücre dışına geçişini durdurur ve sonuğa hücre içinde  $K^+$  iyonları azalırken intrasellöler  $Na^+$  ve  $Ca^{+2}$  iyonlarının konsantrasyonu artmış olur. İnasellöler  $Na^+$  artışı, pasif difüzyonla suyun ( $H_2O$ ) hücrelere geçişini artırarak hücrelerde şişmeye neden olmaktadır ve daha sonra anaerobik metabolizma ürünlerinin birikimi ile bu hücrel şişme daha da artmaktadır.  $Na^+K^+$ -ATPaz pompa inhibisyonu ile beraber ATP bağımlı olmayan  $Na^+-Ca^{+2}$  pompası da intrasellöler  $Ca^{+2}$  iyon konsantrasyonunu arttırır. Böylece intrasellöler artan  $Ca^{+2}$  iyon konsantrasyonu, hücre için sitotoksik olup membran fosfolipitlerinin yapısını bozarak ve

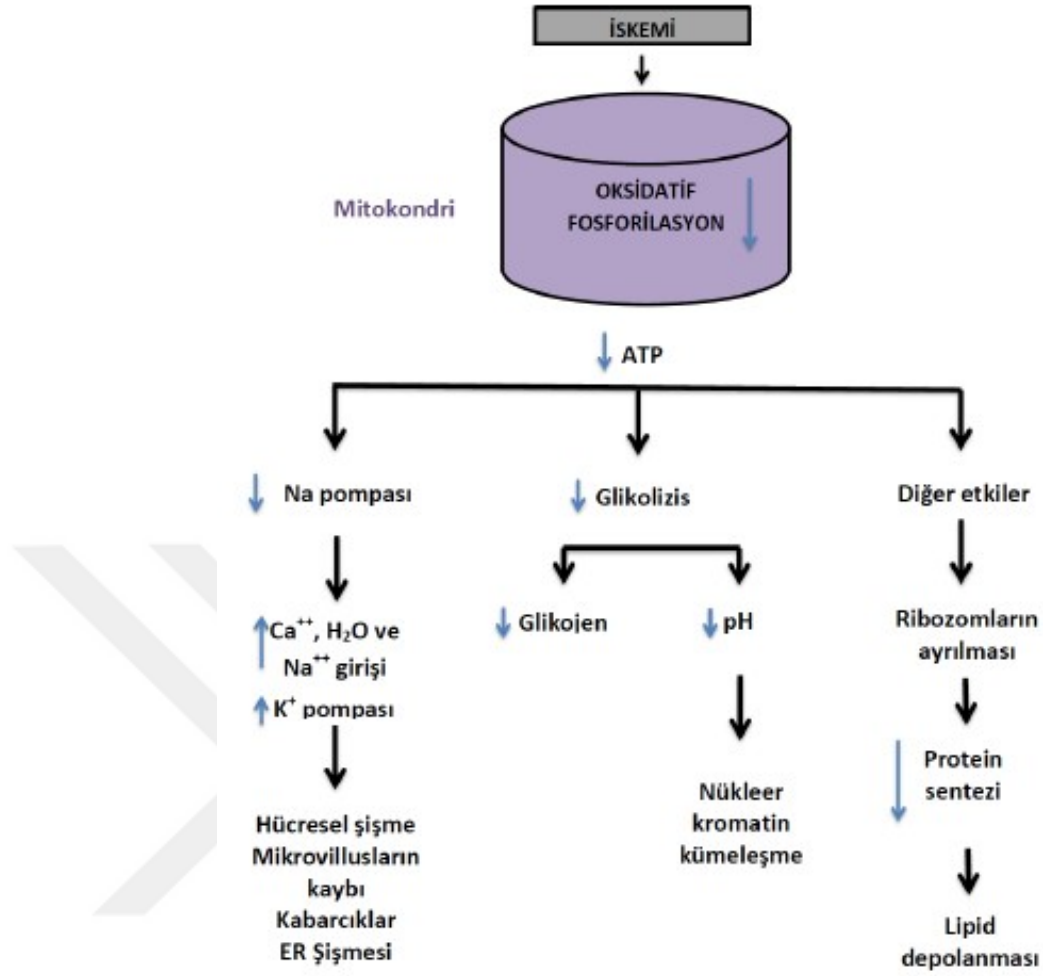
membran permeabilitesini değiştirerek hücrelerde patolojik olayların başlatılmasına sebep olur (Carini ve ark. 1999, Carden ve Granger 2000). Bununla beraber hipoksi süresi uzadıkça fosfolipazların aktivasyonu sonucu oluşan araşidonik asit, mitokondriyal enzimleri inhibe edip serbest radikal oluşumunu arttıracak hücre hasarına neden olmaktadır.

İskemi sürecinde reoksijenizasyon ile reperfüzyon sağlanmaktadır. Böylece reoksijenizasyon ile iskemi sırasında oluşan KO, O<sub>2</sub>'yi kullanarak biriken hipoksantini ksantine dönüştürüp serbest oksijen radikalının aşırı miktarda oluşmasına neden olur. Reperfüzyon mediatörleri olarak bilinen bu serbest oksijen radikalleri, hücre membran lipidlerini oksidasyona uğratarak, lipidlerden aldehid ve MDA gibi toksik ürünlerin meydana gelmesini sağlar. Ayrıca oluşan oksijen radikalleri DNA ile de tepkimeye girerek DNA'nın oksidatif hasarına yol açarak nükleik asitlerde baz değişimleri ile beraber DNA'da zincir kırılmalarına sebep olur (Carden ve Granger 2000, Yapca ve ark. 2013).

Anaerobik glikoliz ile ATP üretilerek enerji açığı giderilmeye çalışılır. Ancak glikojenin hızla tükenmesi ve biriken metabolitlerin dolaşım ile uzaklaştırılmamasına bağlı olarak hücrede laktik asit ve karbondioksit birikir ve dolayısıyla hücrede pH düşer (Kumar ve ark. 2000).

Çeşitli organların iskemiye karşı verdikleri cevap temelde aynı olmasına rağmen organlara özgü bazı farklılıklar vardır. İskemik hasarın şiddeti; doku ya da organa giden kan akımındaki azalmanın miktarına ve organ veya dokunun iskemiye maruz kaldığı süreye bağlı olarak gelişip, geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz hücre ve/veya doku zedelenmelerine neden olabilmektedir (Kandilci ve Gümüşel 2005).





Şekil 2.5. İskemi döneminde hücresel değişiklikler (Kumar ve ark. 2000).

### 2.2.2. Reperfüzyon

Sıcak veya soğuk iskemiye bağlı olarak dokuda ortaya çıkan enerji ve oksijen ihtiyacının karşılanması ve toksik metabolitlerin uzaklaştırılması için doku ya da organın yeniden kanlanması reperfüzyon olarak tanımlanır (Montalvo-Jave ve ark. 2008). Böylece hipoksik dokuya reperfüzyon ile kan akımının ve oksijenin yeniden sağlanmasıyla geri dönüşsüz hücre hasarı önlenmiş olup, iskemik doku ya da organın iskemiden önceki fonksiyonları yeniden kazandırılarak organ ya da dokunun korunması reperfüzyon ile sağlanmaya çalışılır. Ancak iskemik organda kan akışı her ne kadar normale dönse de iskemik organ, fonksiyonlarını kısmen kazanır ve ayrıca uzun süreli iskemi sonrası oluşan hasardan sonra dolaşımın tekrar restore edilmesinin, hücreyi geri dönüşsüz zedelenmeye uğratabileceği belirtilmektedir (Manson ve ark. 1983, Knight ve ark. 1991,

Frangogiannis 2007). Böylece bu durum, iskemi reperfüzyon hasarı sürecinde iskemik hasara göre dokudaki ana hasarın reperfüzyon fazı sırasında oluştuğunu göstermektedir (Parks ve Granger 1986, Şehirli ve ark. 2008). Aynı zamanda reperfüzyon döneminde, iskemi sonrası aniden artmış kan akımına bağlı olarak süperoksit iyonları, hidrojen peroksit ve hipoklorik asit gibi serbest oksijen radikal (SOR) yapımının hızlı artışı ile beraber birçok mekanizmanın dokudaki bu ana hasarın oluşmasında rol aldığı gösterilmiştir.

Reperfüzyon hasarının oluşumunda başlıca iki mekanizma etkilidir. Bu mekanizmalardan biri; SOR'un açığa çıkması, diğeri ise ATP bağımlı iyon kanallarının işlevselliğini kaybetmesi sonucu iskemik dönemde hücrede artan  $Ca^{+2}$  iyon konsantrasyonunun, fosfolipaz ve proteazları aktive ederek membranlardaki yağ asitlerini parçalamasıdır. Reperfüzyon sürecinde KO, oksijeni kullanarak iskemik dönemde dokuda biriken hipoksantini metabolize ederken çok miktarda serbest radikal oluşumuna neden olur (Jennings ve Reimer 1991, Wilhelm 1990, Udassin ve ark. 1994). Böylece artan SOR birçok molekülle doğrudan veya dolaylı olarak reaksiyona girerek hücrel hasarı oluşturur (Akkoç ve ark. 2008).

Ayrıca iskemi döneminde toksik metabolitlerin birikmesine bağlı olarak antioksidan mekanizmanın olumsuz etkilenmesi de hücrenin hasara karşı savunmasız kalmasına neden olur (Valko ve ark. 2007).

### **2.2.3. İskemi Reperfüzyon Hasarının Fizyopatolojisi**

İ/R hasarı fizyopatolojisi; iskemik süreçte başlayan hücrel hasarın reperfüzyon fazında artarak devam eden, birbirleriyle ilişkileri karmaşık olan bir dizi hücrel ve humoral olaylar serisidir. SOR, polimorf nüveli lökositler (PMNL), kompleman sistem ve endotel hücreleri bu hasarın başlıca nedenleri arasında sayılmaktadır (Homer ve ark. 1997, Monsinjon ve ark. 2001).

#### **2.2.3.1. Serbest Oksijen Radikalleri**

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron taşıyan, kimyasal olarak reaktif olan atom veya moleküllerdir. Bunlar yapılarında bulunan ortaklanmamış elektronlardan dolayı reaktiftirler. Serbest radikaller, normal metabolizmanın sürdürülmesinde birçok fizyolojik ve patolojik tepkimeler esnasında fizyolojik olarak antioksidan dengeyi koruyacak şekilde hücrelerde düşük düzeylerde

üretilmektedirler (Akkuş 1995, Çakatay ve Kayalı 2006). Bunların oluşum hızı ile inaktivasyon hızı arasında belli bir denge olduğu sürece serbest radikallerin canlı üzerinde herhangi bir etkisi olmamaktadır. Aynı zamanda oksidan moleküllerin belirli bir düzeye kadar olan artışı vücuttaki doğal antioksidan moleküller ya da enzim sistemleri tarafından etkisiz hale getirilmektedir. Yani sağlıklı bir organizmada oksidan düzeyi ve antioksidanların bu oksidanları etkisizleştirme gücü bir denge halindedir. Bu denge halindeki durum herhangi bir sebeple bozulur ya da bu bileşiklerin oluşum hızı inaktivasyon hızından yüksek olursa oksidatif stres meydana gelmekte ve serbest radikallere bağlı hücre hasarı ortaya çıkmaktadır (Çavdar ve ark. 1997, Çakatay ve Kayalı 2006).

Serbest radikallerdeki aşırı artış vücut için tehlike oluşturup hücre zedelenmesindeki en önemli mekanizmalardan biri olan serbest radikallere bağlı zedelenmeye neden olur. Serbest radikaller, yapılarındaki eşlenmemiş elektrona bağlı olarak oldukça reaktif olduklarından hücrelerin lipid, protein, deoksiribonükleik asit, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederek kolayca reaksiyona girme eğilimindedirler (Sentürk ve ark. 2008, Tümay 2010). Aynı zamanda bu radikaller yağ asidi bakımından zengin hücreler ile reaksiyona girerek lipid peroksidasyonuna neden olur ve böylece hücre membran bütünlüğünü bozarak membran permeabilitesini artırır, bu da iyon transportunda bozulmaya neden olur (Memişoğulları 2005).

İnsan vücudunda moleküler oksijenin kullanılma oranı ve dağılımı çok yüksek olduğundan serbest radikal denilince ilk akla gelen bileşikler serbest oksijen radikalleridir (SOR) (Weight, 1996). Bunların çeşitli endojen ve ekzojen kaynakları olmakla birlikte, biyolojik sistemlerde oluşan en önemli serbest radikaller oksijen kaynaklı olup bu türler arasında en sık karşılaşılanları; süperoksit radikali ( $O_2^-$ ), hidroksil radikali ( $OH^\cdot$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve singlet oksijen ( $^1O_2$ ) 'dir.

Hemen tüm aerobik hücreler mitokondriyel enerji metabolizmasında tükettikleri oksijenin %1-5 kadarını serbest süperoksit radikal anyonu şeklinde sonlandırmaktadırlar. Süperoksit direkt olarak fazla zarar vermemekle beraber bunun asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır (Akkuş ve ark. 1995). Böylece hidrojen peroksit kaynağı olarak dolaylı yoldan hem lipid peroksidasyonunu başlatır hem de antioksidanları oksitleyebilmektedir.

Hidrojen peroksit, serbest radikal değildir ancak membrandan kolayca geçebilmesi dolayısıyla çok önemli olup geçiş metallerinin varlığında çok zararlı olan hidroksil radikalini oluşturur. Aynı zamanda bu molekül proteinlerde hem grubunda bulunan demir ya da bakır ile reaksiyon vererek güçlü oksitleyici özelliği olan demir formlarını oluşturup hücre membranında lipid peroksidasyonunu başlatır (Günaydın ve Çelebi 2003, ).

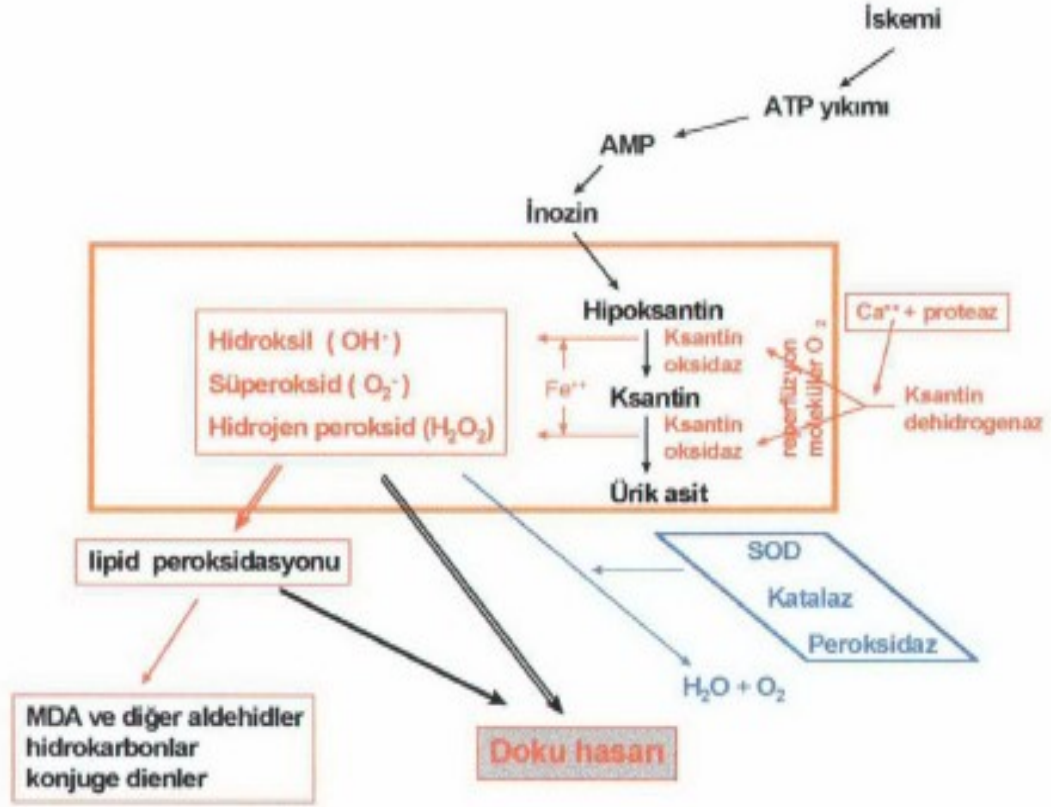
Metal iyonlarının varlığında hidrojen peroksitten oluşan hidroksil radikali, serbest radikaller içinde biyolojik sistemlere en fazla hasar yapan oksijen radikalidir. Yarılanma ömrü çok kısa olup oluşum yeri veya yakını ile reaksiyona girdiği için hasar derecesi oluşum yerine bağlı olmaktadır (Günaydın ve Çelebi 2003).

Singlet oksijen ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan ancak oldukça reaktif bir oksijen molekülüdür. Bu molekül hem serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana gelir hem de serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına neden olur (Stadler ve ark. 2007). Aynı zamanda hidroksil radikali kadar etkili bir şekilde, lipid peroksidasyonunu başlatabilmektedir (Akkuş 1995).

Aerobik koşullarda oluşan SOR, hücrenin sahip olduğu antioksidan sistemi sayesinde sitotoksik olmayan ürünlere dönüştürülür. Ancak aşırı SOR artışı ya da antioksidan sistemin yetersizliği ile oksidatif stres meydana gelmektedir (Çakatay ve Kayalı 2006).

Serbest radikallerin lipitler üzerine olan etkilerinden en önemlisi lipit peroksidasyonudur (Niki ve ark. 1987). Reperfüzyon hasarının en önemli nedeni olan lipit peroksidasyonu, yeni serbest radikallerin oluşumuna zemin hazırlar. Böylece oluşan SOR'lar hücre membranında bulunan kolesterol ve doymamış yağ asitleri ile kolayca reaksiyona girerek lipit peroksidasyonunu başlatırlar (Halliwell ve Gutteridge 1984, Younes ve Siegers 1984). Lipit peroksidasyonunda, hücre membran fosfolipitlerindeki çoklu doymamış yağ asitleri lipit hidroperoksitlerini oluşturmak için oksijen radikali ile reaksiyona girdikten sonra çoklu doymamış yağ asitlerinin oksitlenmesi ile yağ asidi radikali oluşurken, oluşan bu radikale oksijen eklenmesi ile de lipit peroksi radikali meydana gelir (Akkuş, 1995). Lipit peroksitlerinin yıkımından oluşan ürünlerden birisi de İ/R hasarında lipid peroksidasyonunun en önemli göstergelerinden biri olan malondialdehittir (MDA) (Gutteridge, 1995). MDA membran komponentlerinde polimerizasyon ve çapraz bağlanmalar yapması dolayısıyla MDA; deformasyona, membrana bağlı enzim

aktivitesinde ve iyon geçişlerinde bozulmaya, hücre yüzeyindeki bileşenlerde agregasyona sebep olarak membran yapısını bozar (Gradner 1979).



Şekil 2.6. İskemi/Reperfüzyon hasarının şematik görünümü (Can 2014).

### 2.2.3.2. Polimorf Nüveli Lökositler (PMNL)

Doku iskemisi sonrası dokudan açığa çıkan (platelet, endotel ve nötrofillerden) kemotaktik sinyaller, nötrofil adezyon ve diapedez sürecini başlatır. İ/R hasarında lökositlerin aktivasyonu ve migrasyonunu takiben lökosit endotel hücre adezyonu meydana gelmektedir. Aktive olmuş PMNL'lerin salıverdikleri yüksek orandaki SOR, sitotoksik enzimler ve sitokin salınımını, mikrosirkülasyonda oluşturdukları obstrüksiyon ve vasküler permeabilededeki artış hasara neden olmaktadır (Eltzschig ve Collard 2004, Frangogiannis 2007).

Lökositlerin dokuya yerleşebilmelerinin ön koşulu endotel hücrelerine adezyonu olup başlangıçta lökositler ve aktive olmuş endotel hücreleri arasında oluşan adezyona E-selektin, P-selektin ve L-selektin aracılık eder. Bu şekilde adezyona uğramış lökositler

C5a, Lökotrien B4 (LTB4), İnterlökin 8 (IL-8) ve platelet aktive edici faktör (PAF) aracılığı ile aktive edilirler ve yüzeylerinde CD11b/18 molekülleri belirir. Böylece CD11b/18 ve ICAM-1 etkinliği sonucu daha önce oluşan adezyon güçlenir. Daha sonra trombosit-endotel hücresi adhezyon molekülü 1 (PECAM-1) ile endotel hücre bağlantıları arasındaki etkileşim ile lökosit transmigrasyonu gerçekleşir ve böylece aktive lökositler damar dışına ulaşınca hasar bölgesine doğru göç etmeye başlarlar (diapedez) (Woodfin ve ark. 2007). Hasarlı dokuya olan lökositlerin kemotaksisi kompleman sistem unsuru (C5a), LTB4 ve IL-8 yoluyla sağlanır (Cotran ve ark. 1995). Aynı zamanda İ/R sırasında oluşan tümör nekrozis faktör alfa (TNF- $\alpha$ ), interlökin 1 beta (IL-1 $\beta$ ), PAF ve kompleman sistemi gibi inflamatuvar araçların hepsi lökosit göçünü artırır (Serizawa ve ark. 1996)

SOR oluşumu ve İ/R hasarında önemli bir kaynak olan polimorf nüveli lökositlerin aktivasyonu, sonuçta organ hasarına neden olan birçok sürecin önemli bir aşaması olup tüm bu basamaklar sonucunda dokuda hasarın genişlemesine neden olurlar (Siemionow ve Arslan 2004).

### **2.2.3.3. Sitokinler ve Kompleman Sistem**

İ/R hasarında kompleman sistemin aktivasyonu sonunda; C3a, C5a, iC3b ve C5b-9 proinflamatuvar komponentleri oluşur. C3a ve C5a lökositleri aktive eden anaflotoksinlerdir. Lökosit aktivasyonu ve kemotaksisin uyarılmasına ek olarak C5a; makrofaj inflamatuvar protein (MIP)-2, MIP-1a, MIP-1b, monosit kemoatraktan protein (MCP)-1, TNF- $\alpha$ , IL-1 ve IL-6 üretimini uyararak inflamatuvar yanıtı amplifiye eder. (Thrane ve ark 2007). C5b-9 ise; endotelde IL-1a, IL-8 ve MCP-1 salgısını uyararak lökosit aktivasyonu ve kemotaksisi artırır. Aynı zamanda endotel bağımlı vazodilatasyonu inhibe ederek ve endotelde siklik guanozin monofosfatı azaltarak vasküler tonusun bozulmasına neden olur (Zhang ve ark 1999, Şener ve Yeğen 2009).

Hastalıkların fizyopatolojisinde rol alan ve terapötik potansiyeli bulunan sitokinlerin, immün sistem hücrelerinin aktivitelerini dikkate alarak, inflamatuvar yanıtları destekledikleri ve hematopoez gibi birçok fizyolojik olayda önemli rol aldıkları gösterilmiştir. Hücresel savunmada çok önemli rolü olan sitokinler fonksiyonel olarak iki grupta sınıflandırılırlar. Bunlardan proinflamatuvar olarak nitelendirilenlerden bazıları; TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 ve antiinflamatuvar olarak nitelendirilenlerden bazıları ise IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ 'dir (Elenkov ve Chrousos 2002, Paramalingam ve ark

2007). Allogenik organ transplantasyonunu takiben oluşan böbrek inflamasyonu, enfeksiyon ve akut-kronik atılım reaksiyonlarında sitokinlerin önemli rol oynadığı bilinmektedir (Suzuki ve ark. 1991).

#### **2.2.3.4. Endotel Hücresi**

İ/R hasarı sürecinde endotel hücrelerinin önemli rolü bulunmaktadır. Bu süreçte oksidatif stres, endotel hücrelerinin aktivasyonunun ve işlevlerinin bozulmasına neden olur. Endotel hücreleri SOR için önemli bir üretim kaynağıdır. Bununla beraber ayrıca endotel hücreleri mikrovasküler homeostazdan sorumlu olan endotelin ve nitrik oksit (NO)'i üretir. NO arteriyel dolaşımında, endotelin vazokonstriktör etkisini tersine çevirme eğilimde olup venlerde ise bu durumun tam tersi söz konusudur. İ/R hasarı sürecinde NO/endotelin oranı endotelin lehine bozularak arteriyel vazokonstriksiyon venlerde vazodilatasyon olur (Garcia-Villalon ve ark. 2008, Şener ve Yeğen 2009). Böylece İ/R hasarında serbest radikallerin oluşum kaynağı olarak tanımlanan ve mikrovasküler hemostazisten sorumlu olan endotel hücreleri, NO/endotelin oranını, NO yönünde değiştirerek, reperfüzyon sırasında SOR'un hızla oluşumuna neden olarak, hücreyi reperfüzyon hasarına karşı savunmasız bırakır (Webb ve Meek 1997, Şener ve Yeğen 2009). Ayrıca endotel hücresi bunlara ek olarak vazomotor etkinlikleri düzenlemesi ve hasara cevap olarak salgıladığı mediyatörler nedeniyle son zamanlarda giderek fazla ilgi çekmeye başlamıştır.

### **2.3. İskemi Reperfüzyon Hasarının Böbreklere Etkisi**

Klinikte sık olarak karşılaşılan sorunlardan biri olan akut böbrek yetmezliğinin patogenezinde, genellikle böbreğe gelen kan akımının yeterli olmamasının önemli bir yer tuttuğu görülür. İskemik böbrek yetmezliğiyle ilgili pek çok çalışma yapılmış ve hala yapıyor olmasına rağmen tüm mekanizmalar henüz tam olarak açıklanabilmiş değildir.

Böbreklerde; kardiyak yetmezlikler, renovasküler cerrahi müdahaleler sırasında, trombozların sonucu olarak, emboli durumlarında, hipovolemik şok, ve organ transplantasyonları gibi pek çok klinik durumlar sırasında akut İ/R hasarı oluşabilmektedir (Woolfsan ve ark. 1994, Weight ve ark. 1996, Donnahoo ve ark. 2000). Bu hasarın şiddeti ise iskemi stresine bağlı olarak değişmektedir. Renal iskemi reperfüzyon, akut böbrek

yetmezliğinin en etken mekanizmalarından biri olup, böbreklerde İ/R hasarının altında yatan mekanizma hipoksi, serbest radikal hasarı ve inflamatuvar cevaplarla ilişkili olan multifaktöriyel birtakım hücrel ve humoral olayların sonucudur (Hassoun ve ark. 2007, Golab ve ark. 2009). İskemik hasardan sonra gelişen akut böbrek yetmezliğine bağlı olarak glomerüler filtrasyon hızında azalma, böbrek damarlarında direnç artışı, tübüler nekroz, vasküler endotel hücrelerinde ve tübüler epitelyum hücrelerinde değişiklik gibi birçok metabolik ve yapısal değişiklikler oluşmaktadır (Aydoğdu ve ark. 2005). Reperfüzyon döneminde oluşan hasarda ise hücre içine moleküler oksijen girişi ile hızla oluşan serbest oksijen radikal türevleri başta olmak üzere birçok mekanizmanın etkili olduğu belirtilmektedir. Nükleik asitler, proteinler, zar lipitleri ve deoksiribonükleik asit molekülleri reperfüzyon hasarına karşı en fazla duyarlı olan hücrel düzeydeki yapılar olup (Şener ve Yeğen 2009) proksimal tübül epitelyum hücreleri ise akut tübüler nekrozun görüldüğü ve akut böbrek yetmezliği patogeneğinde önemli rolleri olan hücrelerdir (Özdamar ve ark. 2010).

### **2.3.1. İskemik Faz**

Yapılan deneysel çalışmalarda böbreğe gelen kan akımı, dokunun metabolik ihtiyaçlarını karşılayamayacak düzeyde olduğunda, renal tübüler hücrelerde bazı patolojik olayların başlamasıyla beraber, iskeminin renal kan akımı ve glomerüler filtrasyon hızının (GFH) azalması ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Huet ve ark. 1997). İskemik akut renal yetersizlik; azalmış kardiyak debinin eşlik ettiği renal arter stenozu ya da tıkanıklığı veya intrarenal küçük damarların ateroskleroz, ateroemboli, vaskülit gibi nedenlerle hasarlanması sonucu gelişen yetersiz kan akımıyla başlar (Bonventre 1993).

Hücrel düzeyde bakıldığında ise; intrasellüler ATP miktarının düşmesiyle beraber aerobik metabolizmadan anaerobik metabolizmaya geçiş iskemiye bağlı olarak oluşur. Böylece hücrede enerji depolarının boşalması sonucu hücre zarında bulunan  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATP az pompası inhibe olur. Sonuç olarak hücrede  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Ca}^{+2}$  iyon konsantrasyonları artar. Hücre içi kalsiyum artışı; hücre içi yolakların aktivasyonu için önemli bir uyarıcı olup proteazlar, fosfolipazlar ve endonükleazlar gibi çok sayıda enzimi aktif hale getirir. Proteazların aktivasyonu hücre iskeletinin yapısının bozulmasına neden olurken fosfolipazların aktivasyonu ise hücre zarının yapısının bozulmasına sebep olur. Ayrıca endonükleazların aktivasyonu da kromatin parçalanmasına neden olur (Robbins ve ark.



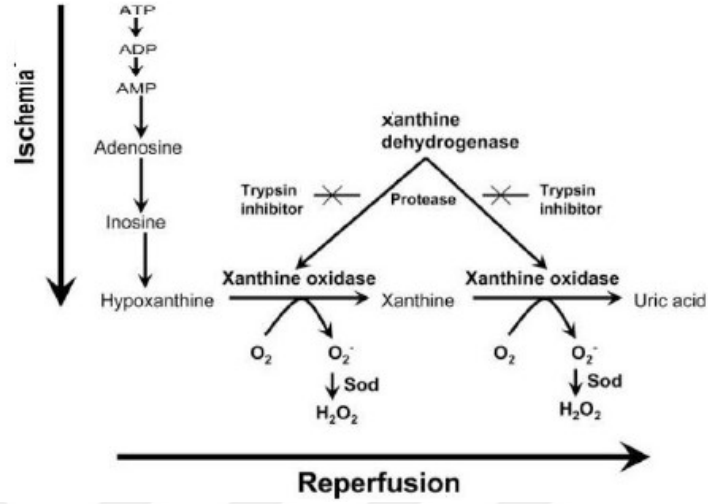
1995). Böylece hücre iskeletinin bozulması ve özellikle proksimal tübüllerdeki mikrovillusların kaybıyla devam eden süreç, tübüllerde yüzey alanının ve emilim etkinliğinin azalmasıyla tübüler disfonksiyona neden olur (Sharfuddin ve Molitorris 2011). Dolayısıyla tübüllerdeki bu fonksiyon bozukluğu, distal bölümlere ulaşan solüt miktarını artırmakla beraber glomerüler vazokonstriksiyon ve glomerüler filtrasyon hızında azalmaya sebep olan tübüloglomerüler feedback mekanizması ile böbrek medullasında kortekse göre az olan kan akımını vazokonstriksiyonla daha da azaltır (Lameire ve Vanholder 2004, Sharfuddin ve Molitorris 2011). Böylece böbrek medullasında iskemiye bağlı olarak oluşan hipoksi hem hücresel enerji depolarının azalmasına hem de endotel ve düz kas hücrelerindeki aktin hücre iskeletinin bozulmasına neden olur. Bu da hücresel şişme ve çevre dokularda hipoksinin artmasına yol açar (Friedewald ve Habb 2004). Ayrıca bu dönemde hücrede iyon konsantrasyonunun değişimi ile beraber proinflamatuvar sitokinlerin ve lökosit adhezyon moleküllerinin yapımında artış görülürken antioksidan enzimlerin yapımında bir azalış görülür. Dolayısıyla bu durum hücreyi, reperfüzyon sürecinde oluşan hasara karşı dayanıksız hale getirir (Şener ve Yeğen 2009).

### **2.3.2. Reperfüzyon Fazı**

Reperfüzyon sürecinin böbrekte daha karmaşık reaksiyonlar zincirini tetiklemesine bağlı olarak, İ/R hasarı sürecinde dokudaki ana hasarın reperfüzyon fazı sırasında olduğu kabul edilmektedir (Parks ve Granger 1986). Reperfüzyon sürecinde iskemi sonrası aniden artmış kan akımına bağlı süperoksit iyonları, hidrojen peroksit ve hipoklorik asit gibi serbest oksijen radikal yapımı artarak oksidatif hasar iyice belirginleşmektedir.

İskemik dönemde oksijen yokluğuna bağlı olarak hücresel enerji kaynağı olan ATP yeterince sentezlenemez ve hücrede var olan ATP'nin enerji gereksinimi için kullanılması sonucunda AMP ve adenozin oluşur. Adenozin daha sonra inozin ve hipoksantine, hipoksantin de ksantin dehidrojenaz (KDH) enzimi tarafından ksantin ve ürik asite dönüştürülür. KDH enzimi nikotinamid adenin dinükleotid okside formu (NAD<sup>+</sup>)'nu kullanarak normal şartlarda ksantini, ürik asite dönüştürür (Weight ve ark. 1996, Lameire ve Vanholder 2004). Ancak reperfüzyon sürecinde KDH enzimi KO'a dönüşür ve böylece toksik radikal kaynağı olan ksantin dehidrojenazın ksantin oksidaza dönüşümü, hipoksantin ksantin oluşumu ve ayrıca bu süreçte bol miktarda süperoksit radikalinin açığa

çıkması dokunun yapısal elemanlarını bozup zararlı etkilere yol açarak hasarı daha da belirginleştirmektedir. (Droge 2002, Facundo ve ark. 2007).



Şekil 2.7. Ksantin oksidaz sistemi ve reperfüzyon sırasında serbest radikallerin oluşumu (Pacher ve ark. 2006).

İskemi sonrası dokunun reperfüzyonuna bağlı olarak; arteriyollerde endotel bağımlı dilatasyonun bozulması, kapillerlerde lökosit tıkaçlarının oluşması ve sıvı filtrasyonunun artışı, post-kapiller venüllerde plazma proteinlerinin damar dışına sızması ve böylece mikrovasküler fonksiyon bozukluğu oluşur. Bununla beraber iskemik böbrek dokusunun reperfüzyonuna bağlı olarak ksantin oksidaz kaynaklı serbest oksijen radikalleri, böbrek damarlarında kapiller membranın yapısını bozarak plazma proteinlerinin damar dışına sızmasına neden olur. Kortekste bulunan kapillerde bu mekanizma ile eritrosit konjesyonu oluşurken, medulla uzun kapillerlerinde plazmanın tümüyle dışarı sızması ile oluşan tıkaçlar kan akımını engellenir (Hellberg ve ark. 1990).

Reperfüze olan dokudaki KO bakımından zengin olan endotel hücrelerinden fazla miktarda serbest oksijen radikali oluşurken nitrik asit oluşumu azalır. Böylece NO salınımında azalma; arteriollerde endotel bağımlı dilatasyonda bozulma, adhezyon moleküllerinin artışı, komplemanların aktivasyonu, platelet aktive edici faktör (PAF) ve tümör nekrozis faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) gibi inflamatuvar aracılardan artışla sonuçlanır. Aynı zamanda aktif nötrofillerin damar içinde kümeleşip aktif trombositlerle birlikte damar endoteline yapışmalarından sonra mikrovasküler tıkanmaya neden olarak o bölgeye olan kan dolaşımını engellemeleri İ/R sonrası dokulara zarar veren önemli

durumlardandır (Goligorsky ve ark. 2002, Teke ve ark. 2008, Akcay ve ark. 2009). Bununla beraber polimorfonükleer (PMN) hücreler ve makrofajlar, aktive olduklarında gerek miyeloperoksidaz (MPO) ve NADPH oksidaz yoluyla reaktif oksijen türevlerinin üretiminin artışı ile ya da inflamatuvar sitokin üretimi ile İ/R hasarını arttırdıkları gösterilmiştir (Robinson 2009).

#### **2.4. Antioksidanlar ve Savunma Sistemleri**

Organizmada gerçekleşen çeşitli tepkimeler sonucu oluşan serbest radikallere karşı vücudun savunma mekanizması antioksidan savunma sistemi ile sağlanmaktadır.

Organizmada pro-oksidan/antioksidan dengesi sağlıklı bir yaşam sürdürebilmek için çok önemlidir. Ancak reaktif oksijen türlerindeki artış ve/veya antioksidan mekanizmalarda azalma bu dengeyi bozarak pek çok hastalığın patogeneğinde rol oynayan oksidatif strese neden olmaktadır. Dolayısıyla hücrede serbest radikalleri uzaklaştırmak için çok sayıda antioksidan savunma mekanizması mevcuttur (Valko ve ark. 2006, Yu ve ark. 2006). Serbest radikal üretiminin engellenmesi, oluşan hücre hasarının giderilmesi ve oluşan aşırı serbest radikallerin detoksifikasyonu, organizmayı koruyan antioksidan savunma sistemi ile süpürücü etki, inaktif şekle dönüştürücü etki, zincir kırıcı etki, onarıcı etki ve antioksidan kapasiteyi artırıcı etki olmak üzere beş farklı mekanizma ile sağlanmaktadır.

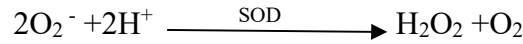
Antioksidan enzimler, küçük moleküller; süpürücü (toplayıcı) etki mekanizması ile serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma, yok etme şeklinde etki gösterirler (Reiter 1995, Karihtala ve Soini 2007). Vitaminler ve flavanoidler; serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürerek bastırıcı şekilde etki ederler (Cherubini 2008). Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller; serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyerek zincir kırıcı etki gösterirler (Mickle ve Weisel 1993). Antioksidan bileşiklerin bir kısmı birkaç mekanizmayı birden kullanarak etkilerini göstermektedir.

Antioksidanlar genel olarak endojen ve eksojen kaynaklı olmak üzere başlıca iki gruba ayrılmıştır.

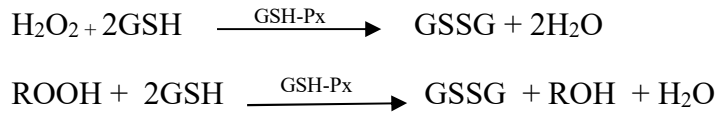
### 2.4.1. Endojen Antioksidanlar

Endojen antioksidanlar enzimatik ve non-enzimatik olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Enzim olan endojen antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon S-Transferaz (GST), katalaz (CAT), mitokondriyal sitokrom oksidaz ve hidroperoksidaz sistemden oluşmaktadır (Şehirli 2001, Valko ve ark. 2007).

Hücre içi en etkili antioksidanlardan biri olan SOD enzimi; serbest radikal hasarına karşı, oldukça reaktif olan süperoksit radikalini ( $O_2^{\cdot-}$ ) hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve moleküler oksijene ( $O_2$ ) katalizleyerek antioksidan etki göstermektedir (Zimmerman and Granger 1992, Halliwell 1991).

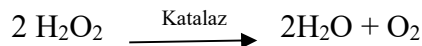


Glutatyon peroksidaz (GSH-Px); SOD tarafından oluşturulan  $H_2O_2$ 'nin veya organik hidroperoksitlerin su veya alkole indirgenmesini katalizleyerek oksidatif hasarın azaltılmasında önemli rol oynamaktadır (Demir ve Erden 1998, Koza 2010).



GSH-Px'in,  $H_2O_2$ 'ye bağlı hücre hasarında hücreyi koruyucu etkisi olmakla beraber Glutatyon (GSH), GSH-Px'in reaksiyonu esnasında oluşan okside glutatyonu (GSSG) redükte glutatyonla dönüştürerek dolaylı olarak antioksidan etki gösteren ve aynı zamanda lipid peroksidasyonunu engelleyen önemli endojen mekanizmalardan biridir (Todisco ve ark. 1985, Demir ve Erden 1998, Buonocore ve ark. 2010).

Katalaz (CAT)  $H_2O_2$ 'yi oksijen ve suya indirgeyen mambrana bağlı bir peroksidom enzimidir (Arslan 2012, Günaydın ve Çelebi 2003).



Melatonin, seruloplazmin, transferin, miyogloblin, hemogloblin, ferritin, bilirubin, glutatyon (GSH), sistein, metiyonin, urat, laktoferrin, albümin enzimatik olmayan endojen antioksidanlar olarak savunma sisteminde rol almaktadırlar (Şehirli ve ark. 2001).

#### **2.4.2. Eksojen Antioksidanlar**

Askorbik asit (C vitamini),  $\alpha$ -tokoferol (E vitamini), folik asit (folat) ve ilaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar (ksantin oksidaz inhibitörleri, sitokinler, nötrofil adezyon inhibitörleri, NADPH oksidaz inhibitörleri) bu grupta yer almaktadır (Akkuş ve ark. 1995).

#### **2.4.3. Total Antioksidan Seviyesi (TAS)**

Serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek oksidatif reaksiyonları yavaşlatan veya durduran, serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmayı koruyan pek çok ölçülebilir antioksidan bulunmaktadır. Total antioksidan kapasiteyi oluşturan bu antioksidanların büyük çoğunluğu plazmada bulunmaktadır. Serumda ölçümü yapılan TAS miktarı büyük oranda ürik asit, tiyol grubu bileşikler, C vitamini ve diğer antioksidan moleküllerden meydana gelmektedir. Aynı zamanda albümin, ürik asit ve askorbik asit plazmadaki total antioksidan kapasitenin %85'inden fazlasını oluşturmaktadır.

Antioksidanlar, plazmada bir etkileşim içerisinde bulunup genel olarak sinerjistik olarak çalışmaktadırlar. Bu etkileşimden dolayı, bileşenlerin tek başlarına yaptıkları etkinin toplamından daha fazla bir etki oluşmaktadır. Ayrıca total antioksidanların bu sinerjistik etkilerine ek olarak antioksidan miktarındaki azalışın diğer bir antioksidan miktarındaki artış ile dengelendiği dikkate alınarak, TAS'ın ölçümü antioksidanların tek tek ölçümünden daha değerli bilgiler vermektedir. Bundan dolayı son zamanlarda enzimatik ve non-enzimatik antioksidanların durumunu bir bütün olarak tespit eden TAS metodu, kandaki antioksidan seviyesini belirlemede oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. (Erel 2004, Işık ve Selek 2006).

#### **2.4.4. Total Oksidan Seviyesi (TOS)**

Serbest radikaller ve bunlara bağlı oluşan oksidatif stres ile mücadele eden kompleks bir antioksidan savunma sistemi normal fizyolojik koşullarda organizmada bulunmaktadır. Ancak canlı sistemlerde metabolik işlemler sırasında sürekli endojen ve eksojen nedenlerle oluşan serbest radikallerin seviyesi, antioksidan düzeyine göre artış

gösterirse hücrelerde oksidatif stres hasarına yol açar. Dolayısıyla vücudun bu oluşan oksidan durumlara karşı dengesini sürdürebilmesi çok önemlidir. Bilinen pek çok metod ile oksidan moleküllerinin konsantrasyonları ayrı ayrı ölçülebilmektedir fakat oksidan stresin artış gösterdiği durumlarda bu moleküllerin oksidan etkilerinin birbiri üzerine eklenmesi dolayısıyla tek tek ölçümden ziyade total oksidanların durumunu yansıtan in vitro TOS ölçümü oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır (Erel 2005, Işık 2007).

#### **2.4.5. Oksidatif Stres İndeksi (OSI)**

Canlılarda oluşabilecek oksidatif hasarın boyutu, sadece serbest radikal üretimine bağlı olmamakla beraber ayrıca antioksidan savunma kapasitesine de bağlıdır. Bundan dolayı TAS ve TOS düzeylerinin birlikte ölçülmesi ve oksidatif stres indeksinin (OSI) hesaplanması oksidatif dengenin anlaşılması açısından son derece önemlidir. Oksidatif stres artışının olduğu durumlarda, TAS ve TOS ölçümü yapılarak hesaplanan OSI, oksidatif stresin bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (Harma ve Erel 2003).

#### **2.6. Dönüştürücü Büyüme Faktörü - Beta 1 (TGF- $\beta$ 1)**

Hücre büyümesi ve farklılaşması, kemotaksis, apoptozis, anjiogenezis, immun cevap, ekstrasellüler matriks üretimi ve hematopoiezis gibi önemli hücre ve doku fonksiyonlarıyla ilgili olan TGF- $\beta$ , organizmada epitelyal, endotelyal, hematopoietik, nöronal ve konnektif doku hücreleri gibi hemen hemen her hücre tipinde üretilir (Govinden ve Bhoola 2000).

Beş izoformu olan TGF- $\beta$ 'nın, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3 formları, hücrelerden salınan latent TGF- $\beta$  komplekslerinin üretilmesini sağlayan prekürsör proteinlerden yapılırlar (Munger ve ark. 1997). TGF- $\beta$ 1, hücrel farklılaşma, proliferasyon, apoptoz ve yara iyileşmesi gibi çeşitli hücrel işlevlerin anahtar bir düzenleyicisi olarak görev yapan çok fonksiyonlu bir sitokin grubu TGF- $\beta$ 'nın prototip bir formu olup aynı zamanda TGF- $\beta$ 1, ekstraselüler matriks (ECM) sentezinin güçlü bir uyarıcısı olarak bilinmektedir. Bununla birlikte hasarlı böbrekte inflamasyon ve fibrozis kaskadlarını regüle ettiği bilinen çoklu intraselüler mekanizmaların olduğu bilinmektedir. TGF- $\beta$ 1 ise bu süreçte anahtar rol oynayan önemli mediatörlerden biridir (Choi ve ark. 2012).

Yapılan çalışmalarda TGF- $\beta$ 1'in tübüler epitelyal hücrelerde mitojen aktive eden protein kinaz (MAPK) gibi birçok sinyal transdüksiyon yollarını aktive etme yeteneği olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (Choi 2000). MAPKinaz sinyal iletimi; p38 MAPK,

ekstraselüler sinyal kinaz (ERK) ve c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinaz (JNK) olmak üzere üç gruba ayrılır. Aynı zamanda MAPK sinyal iletimi kaskadları, proliferasyon, diferansiasyon, apoptozis ve inflamatuvar ara maddelerin işlevlerinin düzenlenmesinde rol alır.

Böbrek İ/R hasarı ile ilgili yapılan deneysel çalışmalarda TGF- $\beta$ 1'in, MAPK sinyal iletiminin ERK yolağının mezengiyal hücrelerini aktif hale getirerek fibronektin ekspresyonunu arttırmasına bağlı olarak böbrek hasarında inflamasyon ve fibroziste önemli bir faktör olduğu gösterilmiştir (Huwiler ve Pfeilschifter 1994, Inoki ve ark. 2000).

## 2.7. Ürotensin-II (U-II)

Vazokonstriktör özelliği olduğu bilinen endotelin-1'den daha kuvvetli olduğu belirtilen Ürotensin-II peptidi, ilk kez balıkların spinal kordlarından izole edilmiştir (Totsune ve ark. 2001). İnsan U-II peptidi, yaklaşık olarak 130 amino asitten daha büyük bir prepro-U-II prekürsor peptidinden ayrılan, 11 amino asidin siklik bir peptididir (Balat ve Büyükçelik 2012). U-II, prepro-U-II prekürsor peptidinin C-terminalinden proteolitik olarak kesilmesiyle biyolojik aktivite kazanır. Ancak U-II peptidi; ürotensin reseptörüne bağlanarak etkisini göstermektedir. Büyük bir prekürsor molekül olan, prepro-U-II mRNA'sı esas olarak beyin ve spinal kordda eksprese edilirken; U-II peptidi ve reseptörünün böbrek, dalak, düz kas, ince bağırsak, endotel, prostat, hipofiz ve adrenal bez gibi diğer organ ve dokularda bulunduğu belirtilmektedir (Pearson ve ark. 1980, Onan ve ark. 2004, Song ve ark. 2006). U-II'nin kuvvetli vazokonstriktör etkilerini; kalsiyum kanalları, tirozin kinaz, p38 mitojen aktive eden protein kinaz (p38MAPK), ekstraselüler sinyal kinaz 1 / 2 (ERK 1 / 2) sinyal yollarının aktivasyonu ile Ca<sup>+2</sup>'un mobilizasyonu aracılığıyla gösterdiği belirtilmektedir. (Lehner ve ark. 2007, Proulx 2008). Yapılan çalışmalarda plazma U-II düzeylerinin renal yetmezlik, konjestif kalp yetmezliği, diyabet, esansiyel hipertansiyon ve portal hipertansiyonda yüksek olduğu saptanmıştır (Maguire ve ark. 2000, Lim ve ark. 2004).

Böbreklerin U-II'nin esas kaynağı olduğu belirtilmekte olup aynı zamanda ana bileşik olan prepro-U-II'nin de böbreklerde yoğun biçimde eksprese edildiği gösterilmiştir. Bununla beraber U-II, renal endotelde, düz kas hücrelerinde ve tübül hücrelerinde bulunmaktadır (Shenouda ve ark. 2002).

Yapılan çalışmalarda U-II'nin kardiyovasküler, pulmoner ve renal sistem üzerindeki etkileri ile beraber, kalpte ve böbrekte fibrotik etkileri olduğu saptanmıştır

(Matsushita ve ark. 2003, Langham ve ark. 2004). U-II'nin renal sistemde sodyum transportu, glukoz ve lipid metabolizması üzerine etkileri bulunmakta olup ayrıca tübüloglomerüler geri emilim ve glomerüler filtrasyon hızı refleks kontrolü ile glomerüler filtrasyon hızının regülasyonunda da rol oynayabilmektedir.

U-II'nin kardiyak remodeling ve fibrozisde U-II reseptörü ile etkileşerek TGF- $\beta$ 1 ekspresyonunu artırıcı role sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca yapılan başka bir deneysel çalışmada da U-II'nin kendi reseptörü olan U-II reseptörü aracılığı ile TGF- $\beta$ 1 mRNA ekspresyonunu direkt olarak upregüle ettiği gösterilmiştir (Matsushita ve ark. 2003). Yine son zamanlarda yapılan çalışmalarda sıçan akciğer fibrozisi modellerinde; fibrozis skoru ile U-II ve TGF- $\beta$ 1 düzeyleri arasında anlamlı bir korelasyon saptanmıştır (Onat ve ark. 2012).

## **2.8. Eritropoietin (EPO)**

Eritropoietin (EPO); 165 aminoasitten oluşan 30 kDal ağırlığında glikoprotein yapısında eritropoezden sorumlu önemli bir hormon olup aynı zamanda vücutta doku oksijenlenmesini kontrol eden ana hormondur (Bahlmann ve ark. 2004). EPO'nun yetişkinlerde primer olarak üretim yeri, böbrek peritübüler kapiller yataktaki interstisyel hücreler ve karaciğerdeki perivenöz hepatositler iken fetusta asıl yapım yeri karaciğerdir. EPO yapımı primer olarak hipoksi ile uyarılır ve EPO depolanmadığı için plazma EPO düzeyi aktif hormon düzeyini gösterir. Aynı zamanda kanama ve eritrosit üretiminin azaldığı durumlarda hipoksi ile uyarılması dolayısıyla salınımı artar (Bakkaloğlu ve ark. 1998). Ancak EPO'nun diğer bir çok doku tarafından lokal olarak fiziksel ve metabolik strese cevaben salınımının arttığı da gösterilmiştir (Juul ve ark. 2000).

Farklı doku ve hücrelerde uygulanan İ/R hasarı çalışmalarında, EPO'nun iskemik hasarda anti-inflamatuvar, anti-apoptotik, anti-oksidan etki göstererek koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca EPO'nun Jak2-STAT-Bcl-2 yolu, Akt/Protein Kinaz C yolu ve NFkb sinyal yolları aracılığıyla koruyucu etki gösterdiği belirtilmektedir (Yang ve ark. 2003, Sharples ve Yaqoob 2004, Sturiale ve ark. 2007) .

Bilindiği üzere iskemik dokularda EPO'nun sentezi hipoksiye yanıt olarak oluşmaktadır. Ancak hipoksi sırasında EPO ile beraber pek çok gen aktive olup hipoksi indüklenebilir faktör-1 (HIF-1) geni, akut ve kronik hipoksidede rol alarak devreye giren önemli genlerden biridir. HIF-1; oksijen düzeyine hassas bir  $\alpha$  alt biriminden ve yapısal



olarak eksprese edilen bir  $\beta$  alt biriminden oluşur. Akut hipokside renal tübüler hücrelerde HIF parçalanması durur ve bu süreçte HIF sonrası EPO ve VEGF ekspresyonlarında belirgin bir artış gözlenmektedir. Kronik hipokside ise HIF etkisi, koruyucu olmaktan uzaklaşarak renal patoloji gelişimini tetikleyici ve arttırıcı rol alabilmektedir (Stockmann ve Fandrey 2006). Böylece kronik iskemi durumunda HIF'a bağlı olarak fibrozis, matriks proteinleri arasındaki değişimin bozulması ve inflamasyonun artışı görülür. İ/R hasarı durumunda kronik hipoksi, renal epitel hücrelerinde kollajen-1'in yapımını arttırır ve TGF- $\beta$ 1 ile sinerjistik etkiye bağlı olarak VEGF ve EPO yapımını arttırır. Daha sonra bunu kollajen artışı izler. Böylece HIF'ın, SMAD3 ve trombospondin bağımlı TGF aktivasyonunu arttırarak renal fibrojenezede doğrudan rol aldığı gösterilmiştir (Hasse 2006, Yazıhan 2007).

## 2.9. Transient Reseptör Potansiyel (TRP)

Transient reseptör potansiyel (TRP) kanalları, ilk defa 1998 yılında *Drosophila Melanogaster* türü sirke sineklerinin göz hücrelerinde ışıkla aktive olan kalsiyum kanalının önemli bir bileşeni olduğunun bulunmasıyla beraber günümüze kadar memelilerde, TRP iyon kanalı ailesinin yaklaşık 30 kadar üyesi belirlenmiştir (Clapham 2003, Saygın ve Nazıroğlu 2010). TRP ailesi aminoasit benzerliklerine göre 7 farklı alt kanal aileden oluşmaktadır: TRPC (canonical, TRPC1-7), TRPM (melastatin, TRPM1-8), TRPV (vanilloid reseptör, TRPV1-6), TRPA (ankyrin zengin protein, TRPA1), TRPP (polisistin), TRPML (mukolipin), TRPN (NOMPC, no mechanoreceptor potential C) (Montell 2005).

TRP kanalları; fiziksel (sıcaklık, voltaj, mekanik faktörler), kimyasal (pH, iyonlar) ve salgısal faktörler (bradikinin, Ang II, aldosteron) ile sinyal ileti moleküllerini [fosfolipaz C (PLC), protein kinaz C (PKC)] kapsayan birçok uyarıyla aktive olduktan sonra kan basıncının düzenlenmesi, dokunma, duyma, görme, tat alma ve termal hassasiyet gibi duyuların algılanması, gen ekspresyonu ve salgılanması, apoptozis gibi hücrenel süreçlerde önemli role sahiptir (Pedersen 2005, Nilius ve ark. 2007).

TRP kanalları ya doğrudan plazma zarlarında bulunan  $Ca^{+2}$  kanalları gibi davranmakta ya da sitozolik serbest  $Ca^{+2}$  kanallarındaki değişime yardımcı olarak zar potansiyelini değiştirip  $Ca^{+2}$  giriş kanallarına etki ederek pek çok mekanizmada rol almaktadır. Bu kanalların çoğunluğu tek bir iyon kanalına seçici olmayan kanallardır. İstisnai durumlar olmakla beraber  $Na^{+}$  ve  $Ca^{+2}$ 'a aynı anda geçirgen olan bu kanallardan

özellikle, TRPM4 ve TRPM5 tek değerlikli katyonlara, TRPM6 ve TRPM7  $Mg^{+2}$ 'a, TRPV5 ve TRPV6  $Ca^{+2}$ 'a, TRPV1, TRPML6 ve TRPP3 ise  $H^{+}$ 'e oldukça geçirgendir (Miller 2006, Nilius ve ark. 2007).

### 2.9.1. Transient Reseptör Potansiyel Melastatin (TRPM) Kanalları

TRP kanallarından biri, ilk olarak keşfedilen üyesi melanomadan tanımlanmış olan gen, melastatin 1 (TRPM1) ile bağlantılı olarak TRP melastatin (TRPM) olarak adlandırılmıştır (Duncan ve ark. 1998). TRPM ailesinin üyeleri TRPM1/3, TRPM2/8, TRPM4/5 ve TRPM6/7 olmak üzere dört alt gruba ayrılırlar;

**1. Grup;** Bu grupta bulunan TRPM3'ün  $Ca^{+2}$  ile aktive olduğu bildirilmiştir. TRPM3 kanalları, hücre içi  $Mg^{+2}$  düzeyi ile düzenlenir. Bu grupta bulunan diğer kanal ise TRPM1'dir.

**2. Grup;** Bu grupta bulunan TRPM6 ve TRPM7 kanallarının karboksi ucunun ( $COOH$ ) terminal serin ve treonin ile aktive olduğu bildirilmiştir (Hecquet ve ark. 2007).  $Ca^{+2}$ 'a çok geçirgendir. Bu kanallar da TRPM3 kanalları gibi hücre içi  $Mg^{+2}$  düzeyi ile düzenlenir (Özgül ve Nazıroğlu 2010). TRPM6 ve TRPM7 fonksiyonel  $COOH$  terminal serine / treonin kinaz ile aktive olur.

**3. Grup;** Bu grupta ısıya duyarlı olan TRPM4 ve TRPM5 yer almaktadır (Özgül ve Nazıroğlu 2010). Monokovalent katyonlara oldukça geçirgen olduğu bilinen bu kanalların  $Ca^{+2}$ 'a geçirgen olmadığı bildirilmiştir. Ayrıca TRPM5'in tat hücrelerinde iletimle ilgili görevi olduğu bilinmektedir.

**4. Grup;** TRPM2 ve TRPM8 de bu sınıfta yer alıp TRPM2'nin ADP-Riboz, oksidatif stres ve ısı ile aktive olduğu; TRPM8'in de soğuk reseptörleri ile aktive olduğu bildirilmiştir (Nilius 2007).

TRP kanallarından TRPM6 ve TRPM7, bir iyon kanalını içermeleri, magnezyum geçirgen bir poru olması ve  $COOH$ - ucuna bağlı bir kinazı içermelerinden dolayı yapısal olarak benzersizdir. TRPM6 başlıca böbrek distal tübülünde ve gastro intestinal sistem epitel hücrelerinde eksprese edilirken, TRPM7 bütün hücrelerde eksprese edilir. TRPM6 ve TRPM7 magnezyum homeostazının önemli regülatörü olarak kabul görmüşler (Voets ve ark. 2004, Chubanov ve ark. 2005).

## 2.10. Erdosteine

Erdosteine (Erd) mukolitik ve ekspektoran özelliğinden dolayı klinikte yaygın olarak kullanılan, mukomodülatör ve antiinflamatuvar gibi terapötik etkileri tanımlanan farmakolojik bir ajandır (De Bernardi 1992). Erdosteine, doğal bir aminoasit olan homosisteinin, N-tiolaktonik şeklinde bir formu olup, kimyasal adı N-(karboksimetil tiyoasetil) homosisteine tiolaktondur (Dechant ve Noble 1996).

Erd, oral alımdan sonra hızla absorbe olur ve yaklaşık olarak plazma doruk konsantrasyonuna 1,4 saat sonra ulaşır. Erd alındıktan sonra bağırsaklardan emilip dolaşıma geçtikten sonra hepatik dolaşımında üç adet aktif metabolite dönüştürülür; N-tioglikolil homosisteine (Metabolit I), N-asetil homosisteine (Metabolit II) ve homosisteine (Metabolit III). Bu üç aktif metabolitin ortak özelliği tiyol (-SH) gruplarını içermesidir (Inglesi ve ark. 1994). Böylece Erd karaciğerde üç aktif metabolite dönüştürülerek başlangıçta bloke olan tiyol grupları serbestleştirilerek, mukolitik ve serbest radikal temizleyici aktivite göstermektedir.

Üç aktif metabolitin plazma doruk konsantrasyonuna ulaşması birbirinden farklı olup sırasıyla; Metabolit I: 1,1-2,2, Metabolit II: 2,5-4,6, Metabolit III: 2,3-4,8 saat sürmektedir. Bununla beraber Erd'nin atılımı için eliminasyon yarılanma ömrü ise Erd için 1,4 saat iken metabolitlerin tek tek yarılanma ömürleri birbirinden farklı olup Metabolit I ve Metabolit II'nin yarılanma ömrü 1,2 ve 2,7 saattir (Gazzani ve ark. 1989).

Erd'nin mukolitik tipte mukus modifiye edici etkisi; absorpsiyondan sonra transformasyona uğrayarak aktif metabolitlerine dönüşmesine bağlıdır. Aktif metabolitlerin yapısında bulunan -SH (tiyol) radikalleri, glikoproteinlerin birbirine bağlandıkları disülfid bağlarını kırarak, mukus elastikliğinde ve vizkozitesinde azalma oluşturarak ekspektoran etki gösterir (Dechant ve Noble 1996, Titti ve ark. 2000). Aynı zamanda Erd serbest radikal süpürücü aktivitesi nedeniyle antioksidan özelliklere sahiptir. Karaciğer metabolizması ile serbestleştirilebilen iki adet bağlı -SH grubu içeren Erd'nin temizleyici ve antioksidan mekanizmasında, bu iki tiyol grubu önemli rol almaktadır (Kukan 2004). Böylece Erd'nin, yapısında bulunan bu tiyol grupları sayesinde ortamda bulunan SOR'u inhibe ederek ve endojen antioksidanların yapımını arttırarak güçlü antioksidan özellik gösterdiği bilinmektedir (Fadillioglu ve ark. 2003).

## 2.11. D Vitamini

Kalsiyum-fosfor dengesinin düzenlenmesinde ve kemik mineralizasyonunda etkin role sahip olduğu bilinen D vitamini, fotokimyasal olarak epidermiste üretilen steroid benzeri bir moleküldür (Yılmaz ve Yılmaz 2013). D vitamininin kimyasal olarak farklı yapılarda olan D<sub>2</sub> ve D<sub>3</sub> olmak üzere iki formu vardır. D<sub>2</sub> vitamini (Ergokalsiferol) mayalar tarafından üretilir ve çoğunlukla besinlere katılır. D<sub>3</sub> vitamini (Kolekalsiferol) ise güneşe maruz kalma ile deride üretilir ve aynı zamanda hayvansal kaynaklı besinleri içeren gıdalar yoluyla diyetlerde tüketilir. Ancak D<sub>3</sub> vitamininin D<sub>2</sub> vitamininden daha güçlü ve daha kararlı bir yapıya sahip olabileceğine dair görüşler bulunmaktadır (Houghton ve Vieth 2006).

D vitamininin sentezinde; 7-dehidroksikolesterolün, 290-315 nm dalga boyundaki ultraviyole B (UV-B) ışığına maruz kalarak provitamin 9, 10 arasındaki bağın açılması ile D vitamininin inaktif formu olan kolekalsiferol oluşmaktadır (Holick 2005). Daha sonra D vitamini, plazmada özgün bir protein olan D vitamini bağlayan protein (DBP) ile depolanmak üzere ya dokulara ya da etkinleşmenin ilk adımı için karaciğere taşınır (Glennville 2007).

D<sub>3</sub> vitamin etkinleşmesinde ilk adım karaciğerde CYP2R1 enzimi ile 25-hidroksilasyon işlemi olup bu hidroksilasyonun ürünü olan 25-hidroksi vitamin D<sub>3</sub> (25(OH)D<sub>3</sub> ya da kalsifidiol) dolaşımdaki asıl D vitamini formudur ve insan plazmasındaki düzeyi 10-80 ng/ml (25-200 nmol/l)'dir (Prosser ve Jones 2004, Hollis 2005). D vitamini etkinleşmesinin ikinci adım ise CYP27B1 enzimi ile 1 $\alpha$ - hidroksilasyon işlemi sonucunda böbreklerde gerçekleşmektedir. Böylece dolaşımdaki 25(OH)D<sub>3</sub>, aktif formu olan 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (kalsitriol)'e dönüşmektedir (Jones ve ark. 1998). Daha sonra bu form hedef hücre içindeki D vitamini reseptörleri ile aktifleşir. Yani D vitamini bazı biyolojik fonksiyonlarını vitamin D reseptörü (VDR) aracılığı ile gerçekleştirmekte olup, D vitamini metabolizmasının anahtar enzimi olan D vitamini reseptörü (VDR), insan doku ve hücrelerinde yaygın şekilde bulunmaktadır (Bouillon ve ark. 2008, Özbey ve ark. 2012).

Kanda kalsiyum ve fosfor seviyelerinin düzenlenmesi, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün bilinen en temel işlevi olup raşitizm, osteomalazi, hiperparatiroidizm ve osteoporoz ise D<sub>3</sub> vitamini ile ilişkili hastalıklardır (Jones ve ark. 1998, Holick 2004). Bununla birlikte 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün kemik iliği, immün sistem, deri, prostat epiteli ve ince bağırsak gibi çeşitli hücre tiplerinde farklılaşmayı uyardığı ve hücre çoğalmasını baskılayıcı etkilerine

bağlı olarak D vitamininin psöriazis, çeşitli kanser tipleri, multipl skleroz, diyabet, kan basıncının düzenlenmesi ve kas güçsüzlüğünde etkili olabileceği ileri sürülmektedir (Glenville 2007). Ayrıca D vitamini uygulamasının, kalp fonksiyonlarını iyileştirmesi, miyokard hipertrofisini geriletmesi gibi kalp damar sisteminde de, farklı fizyolojik etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Park ve ark. 1999, Kim ve ark. 2006). Aynı zamanda yapılan deneysel çalışmalarda, kalsitriolün renin yapımını düzenlediği ve vitamin D reseptörünün eksikliğine bağlı olarak renin ve anjiotensin II yapımının artması dolayısıyla hipertansiyon ve kalpte hipertrofi gelişimine yol açtığı saptanmıştır (Li ve ark. 2002). Bununla beraber D vitamininin dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- $\beta$ ) yapımını baskılayarak ve hepatosit büyüme faktörü (HGF) yapımını artırarak böbrekte interstisyel fibrozis gelişimini önlemesi sonucunda böbrek fonksiyonlarını da koruduğu gösterilmiştir (Li ve ark. 2005). Aynı zamanda yapılan deneysel çalışmalarda elde edilen bulgulara göre İ/R hasarı ile indüklenen akut böbrek hasarında iyileşme sırasında D vitamini eksikliğinin, vasküler bozulmayı şiddetlendirdiği ve inflamasyonu artırması gibi tepkilere bağlı olarak akut böbrek hasarı sonrası kronik böbrek hastalığına geçişe katkıda bulunabileceği belirtilmektedir (de Bragança ve ark. 2016).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışma, kapsamındaki tüm yöntem ve uygulamalara ilişkin olarak Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 31/10/2016 tarihli 2016/9-3 no'lu etik kurul karar onayı alındıktan sonra Mustafa Kemal Üniversitesi Deneysel Araştırmalar ve Uygulama Merkezi'nde yapıldı.

Sunulan yüksek lisans tez çalışmasının histopatolojik incelemeleri Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Ribonükleik asit (RNA) izolasyonu ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) çalışmaları Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Moleküler Genetik Anabilim Dalı'nda, biyokimyasal analizler ise Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda, mevcut cihazlar kullanılarak gerçekleştirildi.

#### 3.1. Deney Hayvanlarının Seçimi ve Bakımı

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, Mustafa Kemal Üniversitesi Deneysel Araştırmalar ve Uygulama Merkezi'nden temin edilen 200-250 gr ağırlığında 47 adet erkek Wistar albino cinsi sıçan kullanıldı.

Tüm hayvanlar Mustafa Kemal Üniversitesi Deneysel Araştırmalar ve Uygulama Merkezi'nde, 12 saat gece ve 12 saat gündüz sirkadiyan ritimde, ortam sıcaklığı  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$  ve nem oranı %50-60 olacak şekilde ışık, ısı ve nem kontrollü odalarda tutuldular. Sıçanların beslenmesinde standart ticari pellet sıçan yemi ve şehir içme suyu kullanıldı.

#### 3.2. Deney Grupları

Deneylerin başlangıcında hayvanların ağırlıkları hassas tartı ile belirlendikten sonra toplam 47 adet sıçan, Sham grubunda 7 (*n*) ve diğer gruplarda 10'ar (*n*) sıçan bulunacak şekilde 5 gruba ayrıldı. Hayvanların genel anestezisi için 10 mg/kg ksilazin (Rompun, Bayer, Almanya) ile birlikte 60 mg/kg ketamin (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) kombinasyonu, intraperitoneal (i.p.) olarak abdominal median laparotomi öncesi kullanıldı.

**Grup I (Sham grubu):** Kontrol grubu olarak değerlendirilen bu gruptaki deneklere herhangi bir tedavi verilmedi. İskemi oluşturulmadan yalancı cerrahi prosedürü uygulanan deneklere, bu bağlamda anestezisi protokolü sonrası sadece abdominal median laparotomi yapıldı ve diğer gruplarda uygulanan iskemi süresi göz önüne alınarak 60 dakika sonra

laparotomi kapatıldı. Ardından diğer gruplardaki reperfüzyon süresi göz önüne alınarak 24 saat sonra genel anestezi tekrarlandı daha sonra kan ve böbrek dokusu örnekleri alındı.

**Grup II (İskemi/Reperfüzyon (İ/R) grubu):** Bu gruptaki deneklere herhangi bir tedavi verilmedi. Genel anestezi sonrası laparotomi yapılan deneklerin sol renal pedikülüne atravmatik vasküler klemp konularak 60 dk. boyunca iskemi uygulandı. İskemi sonlandırıldıktan sonra batın kapatıldı. Daha sonra 24 saatlik reperfüzyon uygulamasına müteakip tekrar genel anestezi altında laparotomi yapılarak kan ve böbrek dokusu örnekleri alındı. Sıçanlardan 1'inin İ/R sürecinde ölmesi neticesinde bu grup için laboratuvar incelemelerine esas örneklem boyutu 9 (n) oldu.

**Grup III (Erdosteine (Erd) + İ/R grubu):** Bu gruptaki deneklere, İ/R'den yedi gün önce başlanmak suretiyle oral yoldan 50 mg/kg/gün Erd (Cabuk ve ark. 2007) ön tedavisi verildikten sonra anestezi protokolünü takiben laparotomi sonrası, sol renal pediküle atravmatik vasküler klemp ile 60 dk. iskemi uygulandı. İskemi sonlandırıldıktan sonra batın kapatıldı. Daha sonra 24 saatlik reperfüzyon uygulamasına müteakip tekrar genel anestezi altında laparotomi yapılarak kan ve böbrek dokusu örnekleri alındı. Sıçanlardan 3'ünün İ/R sürecinde ölmesi neticesinde bu grup için laboratuvar incelemelerine esas örneklem boyutu 7 (n) oldu.

**Grup IV (Vit D + İ/R grubu):** Bu gruptaki deneklere, İ/R'den 7 gün önce başlanmak suretiyle intramuskuler (i.m.) yoldan 500 IU/kg/gün D vitamini (Seif ve Abdelwahed 2014) ön tedavisi verildikten sonra anestezi protokolünü takiben laparotomi sonrası sol renal pediküle atravmatik vasküler klemp ile 60 dk. iskemi uygulandı. İskemi sonlandırıldıktan sonra batın kapatıldı. Daha sonra 24 saatlik reperfüzyon uygulamasına müteakip tekrar genel anestezi altında laparotomi yapılarak kan ve böbrek dokusu örnekleri alındı.

**Grup V (Erd + Vit D + İ/R grubu):** Bu gruptaki deneklere, İ/R'den 7 gün önce başlanmak suretiyle oral yoldan 50 mg/kg/gün Erd ve intramuskuler yoldan 500 IU/kg/gün D vitamini kombine ön tedavisi verildikten sonra anestezi protokolünü takiben laparotomi sonrası sol renal pediküle atravmatik vasküler klemp ile 60 dk. iskemi uygulandı. İskemi sonlandırıldıktan sonra batın kapatıldı. Daha sonra 24 saatlik reperfüzyon uygulamasına müteakip tekrar genel anestezi altında laparotomi yapılarak kan ve böbrek dokusu örnekleri alındı. Sıçanlardan 2'sinin İ/R sürecinde ölmesi neticesinde bu grup için laboratuvar incelemelerine esas örneklem boyutu 8 (n) oldu.

**Çizelge 3.1.** Deney Grupları ve Özellikleri

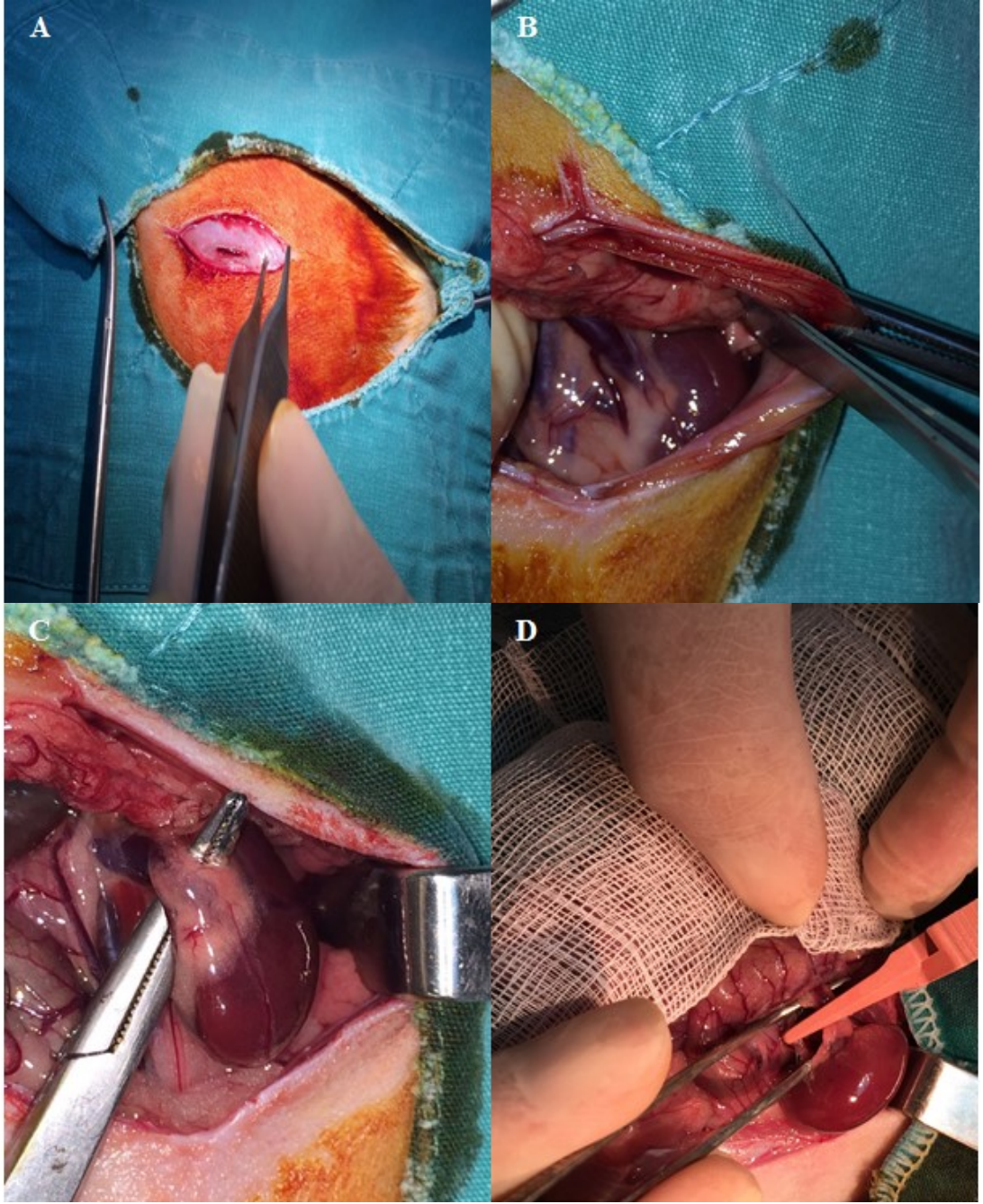
	<b>GRUPLAR</b>	<b>Başlangıç Denek Sayısı</b>	<b>Mortalite Oranı</b>	<b>Deney Sonu Denek Sayısı</b>
1. Grup	Sham grubu	7	%0	7
2. Grup	İ/R grubu ( 60 dk. İskemi / 24 saat Reperfüzyon)	10	%10	9
3. Grup	Erd + İ/R grubu (7 gün oral gavaj ile 50 mg/kg/gün Erd + 60 dk. İskemi /24 saat Reperfüzyon)	10	%30	7
4. Grup	Vit D + İ/R grubu (7 gün i.m. 500 IU/kg/gün Vit D + 60 dk. İskemi /24 saat Reperfüzyon)	10	% 0	10
5. Grup	Erd + Vit D + İ/R grubu (7 gün oral gavaj ile 50 mg/kg/gün Erd + i.m. 500 IU/kg/gün Vit D + 60 dk. İskemi /24 saat Reperfüzyon)	10	% 20	8

### 3.3. Böbrek İ/R Modeli

Bütün deneklerin anestezisi için 10 mg/kg ksilazin (Rompun, Bayer, Almanya) ve 60 mg/kg ketamin (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı. Anestezi sağlandıktan sonra deneklerin karın ön duvarındaki tüyleri tıraş edildi ve %10'luk polivinilpirolidon iyot kompleksiyle (Batticon, Adeka) abdominal bölgeleri dezenfekte edildi. Daha sonra dezenfeksiyonun sağlandığı abdominal bölgeye median hat üzerinde yaklaşık 3 cm'lik cilt insizyonu ile laparotomi yapıldı. Karın içi görünür hale getirildikten sonra karın içi organlar steril gazlı bez üzerinde kenarlara doğru alınıp renovasküler yatak görünür hale getirildi. Deneklerin sol böbrek pedikülü ortaya konulduktan sonra atravmatik vasküler klemp ile klemlenerek kan akımı kesildi ve böylece iskemi başlatıldı (Supavekin ve ark. 2003). İskemi sürecinin başında insizyon tek tabaka halinde çift sütür ile yaklaştırıldı ve iskemi süresi boyunca açıkta kalan karın bölgesi üzerine ılık serum fizyolojik ile ıslatılmış spanç örtüldü. Daha sonra 60 dakika sonunda klempler alınarak iskemi sonlandırıldı (Aydoğdu ve ark. 2005). 24 saatlik reperfüzyon safhası uygulanacak



deneklerin ise iskemi işleminin sonlandırılması ile laparotomi insizyonu, 3/0 atravmatik ipek sûtür ile kapatıldı ve %10'luk polivinilpirolidon iyot kompleksiyle tekrar dezenfekte edildi. 24 saatlik reperfüzyon sürecinin sonunda deneklere tekrar anestezi protokolü uygulanarak, laparotomi insizyonları açıldı ve klemp uygulanan sol böbrek dokuları ile kan örnekleri alındı (Şekil 3.1. ve Şekil 3.2.). Alınan kan örnekleri biyokimyasal analizler için soğutmalı santrifüjde +4 °C' de 4000 rpm'de 10 dk. satrifüj edildi ve elde edilen serum örnekleri mikrosantrifüj tüplere alınıp, önce -20 °C'de bekletildi ve daha sonra ölçüm gününe kadar -80 °C'de saklandı. Kapsül sıyrıldıktan sonra alınan sol böbrek dokuları ise, bistüri ucu yardımıyla longitudinal kesiyle ikiye ayrılıp elde edilen doku örneklerinin bir kısmı histopatolojik analiz için %10'luk formalin solüsyonuna konuldu. Diğer kısmı ise oksidatif stres enzim çalışmaları ve moleküler analizler (RNA izolasyonu ve gen ekspresyonları) yapıncaya kadar -80 °C'de saklandı.



**Şekil 3.1.** Böbrek İ/R modelinde iskemi uygulaması.

**A:** Genel anestezi sonrası sıçanların abdominal bölgeleri tıraş edildikten sonra %10'luk polivinilpirolidon iyot kompleksiyle dezenfeksiyon sağlandı ve insizyon gerçekleştirildi. **B:** Laparotomi yapılarak abdominal organlar görünür hale getirilip sol böbrek dokusu ortaya çıkarıldı. **C:** Renal arter ve renal venin geçtiği renal pedikül dissekte edildi. **D:** Renal arter ve vene klemp uygulanarak 60 dk'lık iskemi süresi başlatıldı.



**Şekil 3.2.** Böbrek İ/R modelinde reperfüzyon uygulaması ve iskemik böbrek.

**A:** 60dk sonunda klemp uzaklaştırıldı ve morfolojik olarak iskemik böbrek dokusu görüldü. **B:** 60 dk'lık iskemi süresi sonrası laparotomi insizyonu 3/0 atravmatik ipek suture ile kapatıldı. **C:** 24 saat reperfüzyon süresi sonunda iskemik böbrek dokusu. **D:** 60 dk iskemi ve 24 saat reperfüzyon süresi sonunda alınan iskemik böbrek dokusu.

### 3.4. Böbrek Histopatolojik Preparatlarının Hazırlanması

Histopatolojik analiz için %10'luk formalin solüsyonuna alınan her böbrek dokusundan koronal olarak kesilen örnekler kasetlere alındı ve fiksasyon sonrası örnekler rutin histolojik doku takip metodu kullanılarak alkol ve ksilen serilerinden geçirilmek suretiyle dokular takip edilip parafine gömüldü. Parafin bloklara gömülen dokulardan histopatolojik boyama metodu (Hematoksilen-Eozin (H&E)) için mikrotom (Leica Rotary) yardımı ile 4µm kalınlığında kesitler alındı ve alınan kesitler, standart H&E boyama protokolü uygulanarak boyandı. Daha sonra hazırlanan preparatlar, x100 büyütme ile ışık mikroskopunda incelenip değerlendirildikten sonra bu preparatların fotoğrafları çekildi.

Histopatolojik incelemeye alınan böbrek doku örneklerinde İ/R hasarı, genel doku kompozisyonu göz önünde bulundurularak semikantitatif değerlendirme yoluyla skorlandı (Walker ve ark. 2000, Wu ve ark. 2007). Buna göre “firçamsı kenar kaybı, ekstrasvazyon, vakuolik dejenerasyon, deskuamasyon, tübül epitelyum hücrelerinde şişme, tübüler cast yapıları, tübüler dilatasyon, intersitisyel lenfosit birikimi, tübüler nekroz” düzeylerine dair 0 ile 5 arasında aşağıda belirtilen koşullara göre verilen skora dayanarak böbrek hasarı belirlendi. Bu skorlamada hasarın yayılımı ve tutulan böbrek alan yüzdesi derecelendirildi ve parametrelerin değerlendirilmesinde; **0:** bakılan parametre belirtilerinin hiç olmayışı (normal doku) **1:** aranılan parametrelerin %25'den daha az seyretmesi **2:** %25-50 arası **3:** %50-75 arası **4:** %75'den fazla olması **5:** tam kortikal nekroz şeklinde tanımlandı.

### 3.5. Biyokimyasal Analizler

Deney uygulamaları sonunda biyokimyasal analizler için intrakardiyak yöntemle alınan kan örnekleri biyokimya tüplerinde yaklaşık olarak 25-30 dakika bekletildikten sonra soğutmalı santrifüjde +4°C'de 4000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen serum örnekleri biyokimyasal analizler için mikrosantrifüj tüplere alınıp, önce -20°C'de bekletildi ve daha sonra ölçüm günü gelinceye kadar -80°C'de saklandı. Bununla beraber deney uygulamaları sonunda biyokimyasal analizler için alınan sol böbrek dokusu örnekleri fizyolojik serumla yıkandıktan sonra kurutma kağıdı ile kurutulup cryo tüp içerisinde SOD, CAT, GPx ve MDA düzeylerinin analizi için ölçüm günü gelinceye kadar -80°C'de muhafaza edildi.

### 3.5.1. Oksidatif Stres Parametrelerinin Ölçümü

İ/R deney uygulamaları sonrası analiz işlemleri gününe kadar -80 °C’de muhafaza edilen döbrek dokuları, derin dondurucudan çıkarılarak tris-HCl tampon çözeltisi ile homojenize edildikten sonra böbrek dokuları enzim aktivite tayin çalışmaları için hazırlandı. Alınan böbrek dokusu homojenatlarının enzim aktivite ölçümlerinde daha önce yapılan çalışmalar referans alındı. Lipid peroksidasyon ürünü (MDA), antioksidan enzimler (SOD, CAT, GPx) ve Bradford yöntemine göre total protein miktarı, manuel spektrofotometrik (Shimadzu-UV 260, Germany) olarak ölçüldü. Analizler için kullanılan kimyasallar ve üreticileri aşağıda sunulmuştur:

#### Kullanılan Kimyasal Maddeler

Ammonium sulfate (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sigma, Almanya	SOD, GSH-Px
n-Butanol (C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O)	Merck, Almanya	MDA
Bovine Serum Albumine	Sigma, Almanya	SOD
Kloroform (CHCl <sub>3</sub> )	Merck, Almanya	SOD
Cupric chloride (CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O)	Sigma, Almanya	SOD
Na <sub>2</sub> EDTA	Sigma, Almanya	SOD, GSH-Px
Glutathione Redüktaz	Sigma, Almanya	GSH-Px
Glutathione-reduced (GSH)	Sigma, Almanya	GSH-Px
Hidrojen peroksit %30 (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck, Almanya	SOD, GSH-Px, CAT
Reduced NADPH	Sigma, Almanya	GSH-Px
Nitroblue tetrazolium (NBT)	Sigma, Almanya	SOD
Potassium dihidrogen phostphate	Sigma, Almanya	GSH-Px
Sodium azid (NaN <sub>3</sub> )	Merck, Almanya	GSH-Px
Sodium Carbonate (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Merck, Almanya	SOD
Sodium phospate dihydrate	Merck, Almanya	SOD
2-Thiobarbituric acid (TBA)	Sigma, Almanya	MDA
Xantine (C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma, Almanya	SOD

Xantine Oxidase (XO)	Sigma, Almanya	SOD
Hydrochloride acid (HCl)	Sigma, Almanya	MDA
Trichloroacetic acid (TCA)	Sigma, Almanya	MDA
Sodium phosphate monohydrate	Sigma, Almanya	Tampon
Sodium dihydrogen phosphate decahydrate	Sigma, Almanya	Tampon
Tris (NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> )	Sigma, Almanya	Tampon

### 3.5.1.1. Böbrek Dokusu Homojenizasyonu

Tüm işlemler öncesinde çalışma süresince kullanılacak malzemeler saf suda temizlendi. Doku homojenizasyonu için tris-HCl tampon çözeltisi (pH 7.5, 0.2 Mm); Tris solüsyonu (0.2 Mm) ve HCl solüsyonu 50 / 39.9 (v/v) oranında karıştırılarak hazırlandı. Daha sonra derin dondurucuda (-80 °C) muhafaza edilen böbrek dokuları alınarak buz çözülmeye bırakıldı. Bistüri ile kesilen dokular cam tüplere alındı. Cam tüp içerisindeki doku üzerine eklenecek tris-HCl tampon miktarı, kesilen böbrek dokusu miktarının 9 katı olacak şekilde hesaplandı ve cam tüpteki dokuya eklendi. Homojenizasyon işlemi sırasında dokuların bozulmaması için cam tüpler, içerisinde buz olan kaba alındıktan sonra 16.000 devir/dakika hızda homojenizatör (IKA, Germany) ile 3 dk homojenize edildi. Elde edilen homojenatın bir bölümü MDA miktarının ölçümü için mikrosantrifüj tüpe alındı ve ölçüm yapılana kadar -20 °C’de saklandı.

Homojenatın kalanı 3220 rpm / 30 dakika + 6 °C soğutmalı santrifüjde (NUVE Centrifuge 5403) santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Elde edilen süpernatantların bir kısmı CAT, GPx, SOD ve protein ölçümleri için mikrosantrifüj tüpe alındı ve ölçüm yapılana kadar -20 °C’de saklandı. Süpernatantın diğer kalanı ise 1/1 (v/v) oranında kloroform/etanol (3/5, v/v) ile (Sun Y. ve ark. 1988) vortexlenip cam tüpte 3220 rpm’de 40 dakika +4°C’de santrifüj edildi. Böylece cam tüpte üstte oluşan etanol fazı alınarak protein ve SOD enzim aktivite tayini için analiz yapılana kadar -20 °C’de saklandı.

### 3.5.1.2. Malondialdehid (MDA) Miktarının Tayini

Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA ölçümü Hammouda ve ark.'ın (1995) çalışma metoduna göre gerçekleştirildi. MDA miktarının ölçümü için mikrosantrifüj tüpte  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilen homojenat kullanılarak analiz yapıldı. Çalışma öncesinde su banyosu (Benmari; Thermomix BU)  $90^{\circ}\text{C}$ 'ye ısıtıldı ve ölçüm sırasında kullanılacak reaktifler [%10'luk trikloroasetik asit (TCA) ve % 0,675 tiobarbitürik asit (TBA)] hazırlandı.

TBA için 0,675 gr % 0,675'lik TBA alınıp üzerine 100 ml su eklendi. TCA için ise 10 gr %10'luk TCA alınıp 100 ml suda çözüldü. Aynı zamanda 1,1,3,3 Tetramethoxypropone ile farklı konsantrasyonlarda standartlar hazırlandı. Kör tüpüne 500 µl distile su, numune tüplerine ise 500 µl homojenat eklendikten sonra hem kör hem numune tüplerine 2500 µl %10'luk TCA eklendi. Daha sonra tüplerin ağızları sıkıca kapatılıp iyice karıştırıldı. Daha sonra bağlı olan MDA'nın proteinlerden serbestleştirilip proteinlerin çöktürülmesi amacıyla cam tüpler, önceden  $90^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar ısıtılmış su banyosu içinde 15 dakika bekletildi. Bu süre sonunda tüpler su banyosundan alınarak soğuk su ile soğutulduktan sonra 3.000 rpm'de  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika santrifüj edildi. Her tüpte üstte oluşan süpernatanttan 2'şer ml alınıp başka boş tüplere aktarıldı. Bu tüplerin üzerine 1 ml % 0.675 TBA çözeltisi eklenip aynı şekilde ağızları sıkıca kapatıldıktan sonra, total MDA'nın TBA ile sıcak ve asidik ortamda renkli kompleks oluşturacak şekilde reaksiyona girmesi için cam tüpler,  $90^{\circ}\text{C}$ 'lik su banyosunda tekrar 15 dakika inkübe edildi. Bu sürenin sonunda tüpler su banyosundan alınıp soğuk su ile soğutuldu ve bu soğutma işlemi sonrası spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda köre karşı her numunenin absorbanı ölçüldü.

Böylece TBA-MDA'nın oluşturduğu renkli kompleksin 532 nm dalga boyunda verdiği absorban değeriyle doğru orantılı olarak ekstinksiyon katsayısından ( $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) faydalanılarak ve dilüsyon faktörü de dikkate alınarak nmol/mL cinsinden MDA sonuçları hesaplandı (Hammouda ve ark. 1995).

**Bradford Protein Ölçümü:** MDA konsantrasyon miktarını hesaplamak için homojenattan protein tayini yapıldı. 50 mg BSA (sığır serum albumini) 50 ml suda çözülerek Bradford standart çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan standart çözeltiden 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 dilüe oranlarıyla farklı konsantrasyonlarda standart hazırlandı. Farklı konsantrasyonlardaki her bir standarttan 20 µl alınıp üzerine 1000 µl Bradford reaktanı (Brilliant Blue G-250)

eklendikten sonra 595 nm dalga boyunda standartların absorbanları ölçüldü. Böbrek doku örnekleri MDA ölçümü için 1/75 oranında, SOD, CAT ve GSH-Px ölçümü için 1/50 oranında dilüe edildi. Farklı konsantrasyonlardaki her bir örnek dokudan 20 µl alınıp üzerine 1000 µl Bradford reaktanı (Brillant Blue G-250) eklendikten sonra 595 nm dalga boyunda örneklerin absorbanları ölçüldü.

### **3.5.1.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enziminin Aktivite Tayini**

Süperoksit dismutaz (SOD) enziminin aktivite ölçümü, Sun ve ark.'nın çalışma metodu (1988) ile Durak ve ark.'ın (1993) tariflediği modifikasyonun protokollerine uygun olacak şekilde, önceden hazırlanan böbrek doku homojenat süpernatantının etanol fazında tayin edildi. Bu çalışma protokollerine göre SOD enziminin aktivite ölçümü, ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksitin nitro blue tetrazoliumu (NBT) indirgenmesi esasına dayanır. Ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile oluşan süperoksit radikalleri (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) ortamdaki NBT'yi redükte ederek renkli formasyon oluştururlar ve oluşan bu renkli formazon 560 nm'de maksimum absorbanı verir. Enzimin olmadığı ortamda bu indirgeme gerçekleşmekte ve sonuçta mavi-mor renk oluşmaktadır. Ortamda SOD enzimi varlığında ise NBT indirgenmesi gerçekleşmeden mavi-mor renk değişiminin oluşmamasıyla beraber sonuçta SOD enzim miktarı ve aktivitesine bağlı olarak açık renk oluşur. Böylece enzim bulunmayan (kör) değer ile enzim bulunan numune absorban değerleri hesaba katılmaktadır.

Sonuçların hesaplanması: Enzimin % inhibisyonu =  $(Abs_{kör} - Abs_{num}) / Abs_{kör} \times 100$   
(Abs<sub>kör</sub>: Absorbans kör; Abs<sub>num</sub>: Absorbans numune)

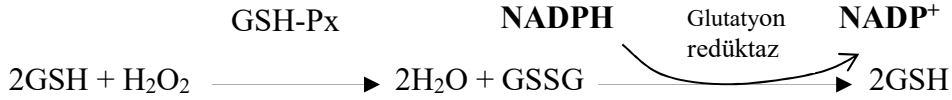
Bir SOD ünitesi; NBT redüksiyonunu % 50 oranında inhibe eden enzim aktivitesi olup sonuçlar doku için; U/mg protein, eritrosit için; U/gr Hb, plazma için; U/mL şeklinde ifade edilir.

### **3.5.1.4. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Enziminin Aktivite Tayini**

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) enziminin aktivitesi, Paglia ve Valentina'nın (1967) tarif ettikleri protokole uygun şekilde önceden hazırlanan böbrek doku homojenat süpernatantında çalışıldı. Bu yöntem, GSH-Px'in hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) varlığında redükte glutasyonun (GSH) okside glutasyon (GSSG)'a yükseltgenmesini katalizlemesi esasına dayanır. Hidrojen peroksidin bulunduğu ortamda GSH-Px'in oluşturduğu GSSG,



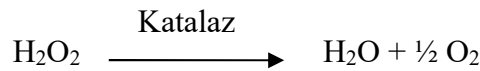
glutasyon redüktaz ve NADPH yardımı ile GSH'a indirgenir. GSH-Px enzim aktivitesi NADPH'ın NADP<sup>+</sup>'ya yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalmasının 340 nm'de okunmasıyla hesaplandı.



Enzim ünitesi, birim zamanda okside olan NADPH'ın mikromol miktarı olarak hesaplanıp sonuçlar, U/g protein olarak ifade edildi.

### 3.5.1.5. Katalaz (CAT) Enziminin Aktivite Tayini

Katalaz enzim aktivitesi Aebi'nin (1974) çalışma metodu uygulanarak önceden hazırlanan böbrek doku homojenat süpernatantında tayin edildi. Böbrek dokusu homojenatlarına ilave edilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, homojenatta bulunan katalaz enzimi tarafından su (H<sub>2</sub>O) ve oksijen (O<sub>2</sub>) moleküllerine parçalandı ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin ortamdaki uzaklaşması esasına göre ölçüm yapıldı. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin katalaz enzimi tarafından bu ayrışması, ultraviyole (UV) spektrumunda absorbans azalması şeklinde kendini gösterdi ve absorbanstaki bu azalma CAT enziminin aktivitesi ile orantılı şekilde ifade edildi. Reaksiyon şu şekildedir:



UV spektrofotometre analizinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin, maksimum absorbansı 240 nm dalga boyundadır. pH'ı 7,50 mM olan fosfat tamponunun üzerine 10-20 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ekleyerek, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 'li fosfat tampon çözeltisinin optik dansitesi (OD) 0.500 nm oluncaya kadar devam edildi. Fosfat tamponunun doku homojenatlarına eklenmesiyle 240 nm dalga boyundaki absorbans düşüşü her 10 sn'de dir defa olmak üzere 2 dk süre ile kaydedildi. Hesaplama 1 dakikalık lineer absorbans azalmasının en yüksek (OD<sub>1</sub>) ve en düşük (OD<sub>2</sub>) değerleri dikkate alındı.

$$\text{Sonuçların hesaplanması: } K = \{[2.3 \times \log (\text{OD}_1 / \text{OD}_2)] / \Delta t (\text{sn})\}$$

$$K/\text{mg protein} = k / [(\text{mg/mL protein}) \times 1000]$$

### **3.5.1.6. Total Oksidan Seviyesi (TOS) Analizi**

TOS analizi, Erel (2005) tarafından tarif edilen metodun protokolüne uygun olarak, TOS ticari kiti (Rel Assay Diagnostics; Katalog no: RL0024) kullanılarak Olympus AU 400 biyokimya otoanalizöründe çalışıldı. Erel'in TOS çalışma metodu, örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilgili olarak rengin şiddetini spektrofotometrik olarak ölçen kolorimetrik yöntem esasına dayalı olup birimi  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  Equivalent/L'dir.

### **3.5.1.7. Total Antioksidan Seviyesi (TAS) Analizi**

TAS analizi, Erel (2004) tarafından tarif edilen metodun protokolüne uygun olarak, TAS ticari kiti (Rel Assay Diagnostics; Katalog no: RL0017) kullanılarak Olympus AU 400 biyokimya otoanalizöründe çalışıldı. Erel'in TAS çalışma metodu, serbest radikallere karşı analiz örneklerindeki antioksidanların renk oluşumuyla ilgili spektrofotometrik olarak ölçülen kolorimetrik yöntem esasına dayalı olup; birimi  $\mu\text{mol Trolox Equivalent/L}$ 'dir.

### **3.5.1.8. Oksidatif Stres İndeksi (OSI) Hesaplanması**

Örneklerin TOS değerlerinin, yüzde cinsinden TAS değerlerine oranlanması [ $\text{OSI} = (\text{TOS}, \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L}) / (\text{TAS}, \mu\text{mol Trolox Eq/L}) \times 100$ ] ile organizmadaki oksidan/antioksidan dengelyi gösteren OSI değerleri hesaplandı (Aycicek ve ark. 2005).

### **3.5.2. Kreatinin ve Üre Analizi**

Serumda üre, kreatinin düzeyleri Olympus AU 400 cihaz orjinli hazır kitler kullanılarak kolorimetrik yöntemle ölçülmüştür.

### **3.5.3. TGF- $\beta$ 1, UII ve EPO Düzeylerinin Ölçümü**

Serum örneklerinde TGF- $\beta$ 1 tayini, Bioassay Technology Laboratory Rat Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 elisa kit (Katalog no: E0779Ra); UII tayini Bioassay Technology Laboratory Rat Urotensin II elisa kit (Katalog no: E0879Ra); Eritropoietin hormon düzeyi ise Bioassay Technology Laboratory Rat Erythropoietin elisa kit kullanılarak bu kitlerin çalışma protokollerine uygun olacak şekilde Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemi ile çalışıldı.

TGF-  $\beta$ 1 ve EPO ölçümleri için birim pg/ml, U-II için birim ng/ml kabul edildi.

### 3.6. TRPM Gen İfadelerinin Analiz İşlemleri

İ/R deney uygulamaları sonrası moleküler analizler (RNA izolasyonu ve gen ekspresyonları) için cryo tüplerde -80 °C'de muhafaza edilen böbrek dokuları, derin dondurucudan çıkarılarak RNeasy Mini Kit (Katalog no: 74104, QIAGEN, Germany) protokolüne uygun olacak şekilde lizis solüsyonu ile parçalanıp homojenize edildi. Daha sonra elde edilen homojenat örneklerinden kit protokolü esas alınarak RNA izolasyonu yapıldı.

QIAGEN Rotor-Gene Q cihazında yapılan qRT-PCR CT verilerinin analizi RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis v3.5 yapıldı. Artışlarda 2'nin üstündeki, azalmalarda ise 2'nin altındaki Fold regulation değerleri anlamlı kabul edildi. Beta Actin "housekeeping gen" olarak normalizasyonda kullanıldı.

#### 3.6.1. Dokuların Homojenizasyonu ve Total RNA İzolasyonu

-80 °C'de muhafaza edilen böbrek dokuları, derin dondurucudan alınıp önceden soğutulmuş olan 2 ml'lik mikrosantrifüj tüplerinin içine, yaklaşık olarak 25 mg olacak şekilde donmuş böbrek dokusu eklendi. Daha sonra tüplerin içerisinde bulunan dokuların üzerine 600 µl içinde β-mercaptoethanol bulunan Lysis Buffer parçalama solüsyonu eklendikten sonra tüpe 1 adet soğutulmuş çelik bilye konuldu ve 4 dk boyunca dokuların parçalanması (QIAGEN, TissueLyser LT, Germany) sağlandı. Dokular homojenize olmuş şekilde yeni bir 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı ve 3 dk, 10000 rpm de santrifüj (Sigma 3-30 K, Germany) edildi. Böylece santrifüj sonunda dokular homojenize olmuş bir şekilde izolasyon aşaması için hazırlandı.

#### **Homojenize olmuş doku örneklerinin RNA izolasyon işlemleri:**

Santrifüj sonunda tüp içindeki üst faz, yeni bir steril 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı. Lizata 600 µl %70 etanol eklendi ve iyice karışması için pipetaj yapıldı. 700 µl süpernatant etanol karışımı, altında 2 ml toplama tüpleri bulunan filtreli tüp (RNeasy spin column) içine pipetlendi. Daha sonra 15 sn, 8000 g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda alttaki toplama tüpleri (collection tube) yenisi ile değiştirilerek alt faz atıldı. Örneğin geri kalanı için de bir önceki adım tekrarladı.

RNeasy spin column'a 700 µl RW1 buffer eklendikten sonra, 15 sn boyunca 8000 g'de santrifüj edildi ve santrifüj sonunda alt faz atıldı. RNeasy spin column yeni bir toplama tüpüne yerleştirildikten sonra üzerine 500 µl RPE buffer eklendi ve 15 sn, 8000 g'de santrifüj edildikten sonra alt faz tekrar atıldı. RNeasy spin column'a 500 µl RPE buffer eklendi ve 2 dk, 8000 g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda alt faz atıldı. RNeasy spin column yeni toplama tüpüne yerleştirildi ve filtrenin kuruması için 1 dk, 10.000 rpm'de santrifüj edildikten sonra RNeasy spin column yeni 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpe yerleştirildi ve üzerine 50 µl RNase-free water eklenip 1 dk, 8000 g'de santrifüj edildi. RNA verimini arttırmak için RNeasy mini column'a 20 µl daha RNase-free water eklendi ve 1 dk 8000 g'de santrifüj edildi.

Elde edilen RNA'ların kalite ve miktar tayini spektrofotometrede (Thermo Scientific, Multiskan Go) yapıldı. Daha sonra her örneğe içeriğindeki RNA miktarına göre RNase free-water eklenerek RNA dilüsyonu gerçekleştirildi. Böylece izolasyon işlemleri sonunda elde edilen RNA'lar cDNA sentezi için hazırlanmış olup ölçüm yapılana kadar -80 °C' de saklandı.

### **3.6.2. cDNA (Komplementer DNA) Sentezi**

İzole edilen RNA'lardan cDNA sentezi için, cDNA sentez kiti (QuantiTect Reverse Transcription Kit, Qiagen, Germany; Katalog no: 205311) ve BİO-RAD, T100, Thermal Cycler cihazı kullanılarak reverse transkripsiyon yöntemiyle cDNA sentezi gerçekleştirildi.

cDNA sentez kiti protokolüne uygun olacak şekilde izole edilen RNA'lar 0,2'lik polimeraz zincir reaksiyon (PCR) tüplerine konularak ilk başta genomic DNA (gDNA) eliminasyonu için aşağıdaki tabloda gösterildiği gibi toplam hacim 14 µl olacak şekilde reaksiyon hazırlandı ve gDNA eliminasyon işlemi aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi.

**Çizelge 3.2.** gDNA eliminasyonu için kullanılan karışım içeriği

<b>Karışım</b>	<b>Miktar (µl)</b>
gDNA Wipeout Buffer, 7x	2 µl
Template RNA	10 µl
RNase-free water	2 µl
<b>Toplam</b>	<b>14 µl</b>

Daha sonra BİO-RAD, T100, Thermal Cycler cihazı kullanılarak 42 °C' de 2 dk inkübe edildikten sonra tüpler hemen buz bloğu üzerine alındı. Sonra cDNA sentez aşaması için kit protokolü esas alınarak toplam hacim 20 µl olacak şekilde reaksiyon hazırlandı. cDNA eldesi için bir tüp içerisinde 6 µl revers transkripsiyon karışımı hazırlandı.

**Çizelge 3.3.** cDNA sentezi için kullanılan karışım içeriği

<b>Karışım</b>	<b>Miktar (µl)</b>
<b>Reverse-transcription master mix</b>	
Quantiscript Reverse Transcriptase	1 µl
Quantiscript RT Buffer, 5x	4 µl
RT Primer Mix	1 µl
<b>Toplam</b>	<b>6 µl</b>

**Çizelge 3.4.** cDNA tepkime koşulları

<b>cDNA Tepkime Koşulları</b>	
42 °C' de	15 dk
95 °C' de	3 dk
4 °C' de	∞

Hazırlanan 6 µl cDNA sentez karışımı ile 14 µl RNA (gDNA eliminasyon işlemi uygulanan) birleştirilerek toplam 20 µl olacak şekilde cDNA sentez karışımı hazırlandı.

Uygulanan karışım ve tepkime koşullarında, izole edilen RNA'dan cDNA sentez işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra Elde edilen cDNA örnekleri üzerine 90 µl Nuclease-free water eklenip sulandırıldı ve -20 °C'de saklandı.

### 3.6.3. Kantitatif Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

RNA izolasyonu ve cDNA sentez protokollerinin uygulamaları sonunda elde edilen cDNA örneklerinden, TRPM 6, 7 ve 'ev' geni (house keeping)  $\beta$ -Actin (Ella Biotech, Deutschland) gen transkripsiyon düzeyleri 'kantitatif real time' PCR (qRT-PCR) yöntemiyle (QIAGEN Rotor-Gene Q, Germany) çalışıldı.

TRPM 6, 7 ve  $\beta$ -Actin gen transkripsiyonları, tabloda belirtilen çalışmada kullanılan gen bölgelerine ait primer dizilerine uygun olacak şekilde QuantiTect SYBR Green PCR kit ( Qiagen, Germany; Katalog no: 204143) protokolü esas alınarak QIAGEN Rotor-Gene Q (Germany) cihazında qRT-PCR yöntemiyle çalışıldı.

**Çizelge 3.5.** Çalışmada kullanılan gen bölgelerine ait primer dizi bilgileri

Gen		Kullanılan Primer Dizileri	Tm (°C)	Uzunluk (bp)
$\beta$ -Actin	Left	5'-CCC GCG AGT ACA ACC TTC T-3'	58.8	19
$\beta$ -Actin	Right	5'-CGT CAT CCA TGG CGA ACT-3'	56.0	18
TRPM6	Left	5'-GCA AGA ACT GGC TTT CCG TG-3'	59.4	20
TRPM6	Right	5'-ATC CGG GTC CTC TTG CAT CT-3'	59.4	20
TRPM7	Left	5'-AGA CGC TTT CCG ATA GAT GG-3'	57.3	20
TRPM7	Right	5'-CTA TCC AGG ATT TCT GGG ACA T-3'	58.4	22

**Çizelge 3.6.** qRT-PCR için kullanılan karışım içeriği

Karışım	Miktar ( $\mu$ l)
QuantiTect SYBR Green PCR	12,5 $\mu$ l
Master Mix*	
Forward primer	1 $\mu$ l
Reverse primer	1 $\mu$ l
RNase-Free Water	5,5 $\mu$ l
<b>Toplam</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>

Elde edilen cDNA örneklerinin her birinden 5 µl alınıp PCR-strip tüplerine aktarıldıktan sonra her bir örneğe 20 µl qRT-PCR karışımı eklendi. Toplam hacim 25 µl olacak şekilde qRT-PCR reaksiyonu QIAGEN Rotor-Gene Q cihazında gerçekleştirildi ve sonuçların analizi,  $\Delta C_t$  değerleri kullanılarak yapıldı.

**Çizelge 3.7.** TRPM 6 genine ait qRT-PCR reaksiyon koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Denaturasyon	95 °C	15 dk	
2. Denaturasyon	94 °C	15 sn	40
Bağlanma (Annealing)	53 °C	30 sn	
Uzama (Extension)	72 °C	30 sn	

**Çizelge 3.8.** TRPM 7 genine ait qRT-PCR reaksiyon koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Denaturasyon	95 °C	15 dk	
2. Denaturasyon	94 °C	15 sn	40
Bağlanma (Annealing)	52 °C	30 sn	
Uzama (Extension)	72 °C	30 sn	

**Çizelge 3.9.**  $\beta$ -Actin genine ait qRT-PCR reaksiyon koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Denaturasyon	95 °C	15 dk	
2. Denaturasyon	94 °C	15 sn	40
Bağlanma (Annealing)	53 °C	30 sn	
Uzama (Extension)	72 °C	30 sn	

### 3.7. İstatistiksel Değerlendirmeler

İstatistiksel analizler “Graphpad Prism 7” bilgisayar programı kullanılarak yapılmıştır. Parametrik veriler ortalama  $\pm$  standart sapma, parametrik olmayan veriler ise ortanca ve 25-75 persentil olarak ifade edilmiştir. Verilerin normalitesi “Kolmogrov-Smirnov testi” ve homojenitesi “Brown Forsythe testi” ile değerlendirilmiştir. Parametrik veriler için “tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi” sonrası “Tukey çoklu karşılaştırma testi” ve parametrik olmayan veriler için “Kruskal-Wallis testi” sonrası “Mann-Whitney U testi” kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı  $p < 0.05$  olarak kabul edilmiştir.





## 4. BULGULAR

Bu çalışmada, sıçanlarda İ/R uygulamasıyla deneysel iskemik akut böbrek yetmezliği modeli, 5 gruba ayrılmış 41 adet sıçan üzerinde çalışıldı. Deneysel uygulamalar sonunda, reperfüzyon sürecinin başlatılmasından 24 saat sonra bütün denekler anestezi protokolüne uygun olacak şekilde, genel anesteziye alınıp histopatolojik incelemeler, moleküler genetik ve biyokimyasal parametrelerin analizleri için deneklerin sol böbrek dokuları ve kan örnekleri alındı.

Böbrek dokusu örneklerinin histopatolojik değerlendirmesinde 0-5 arasında skorlama yapılarak örnekler değerlendirildi. Aynı zamanda elde edilen böbrek dokularında SOD, CAT ve GSH-Px antioksidan enzimlerin aktivite ölçümleri ve lipid peroksidasyonu ürünü olan MDA miktarı manuel olarak spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Bununla beraber ayrıca moleküler genetik analizler için TRPM 6, 7 ve  $\beta$ -actin genlerinin transkripsiyon düzeyleri, deneklerin alınan böbrek dokularında RNA izolasyonu ve cDNA sentez işlemleri sonrasında qRT-PCR yöntemiyle analiz edildi. Ayrıca deneklerin alınan kan örneklerinden üre, kreatinin, TGF- $\beta$ 1, UIL, EPO hormon düzeyi, TAS ve TOS parametrelerinin seviyelerinin değerlendirilmesi yapıldı.

### 4.1. Histopatoloji İnceleme Sonuçları

Çalışmamızda böbrek dokularının histopatolojik incelemelerinde, doku kompozisyonu göz önünde bulundurularak semikantitatif değerlendirme sonucu 0-5 skalası kullanılarak İ/R hasarı derecesi skorlandı. Histopatolojik incelemede deneklerin böbrek dokusu örneklerinin patolojik incelenmesinde, fırçamsı kenar kaybı, ekstrasvazyon, vakuolik dejenerasyon, deskuamasyon, tübul epitelyum hücrelerinde şişme, tübular cast yapıları, tübular dilatasyon, intersitisyel lenfosit birikimi, tübular nekroz parametreleri dikkate alınarak normal böbrek dokusu ile İ/R yapılmış böbrek dokusu örnekleri karşılaştırılıp semikantitatif olarak 0-5 arasında skorlandı. Bu skorlamada hasarın yayılımı ve tutulan böbrek alan yüzdesi derecelendirildi ve parametrelerin değerlendirilmesinde; 0: bakılan parametre belirtilerinin hiç olmayışı (normal doku) 1: aranan parametrelerin %25'den daha az seyretmesi 2: %25-50 arası 3: %50-75 arası 4: %75'den fazla olması 5: tam kortikal nekroz şeklinde tanımlandı (Walker ve ark. 2000, Wu ve ark. 2007).

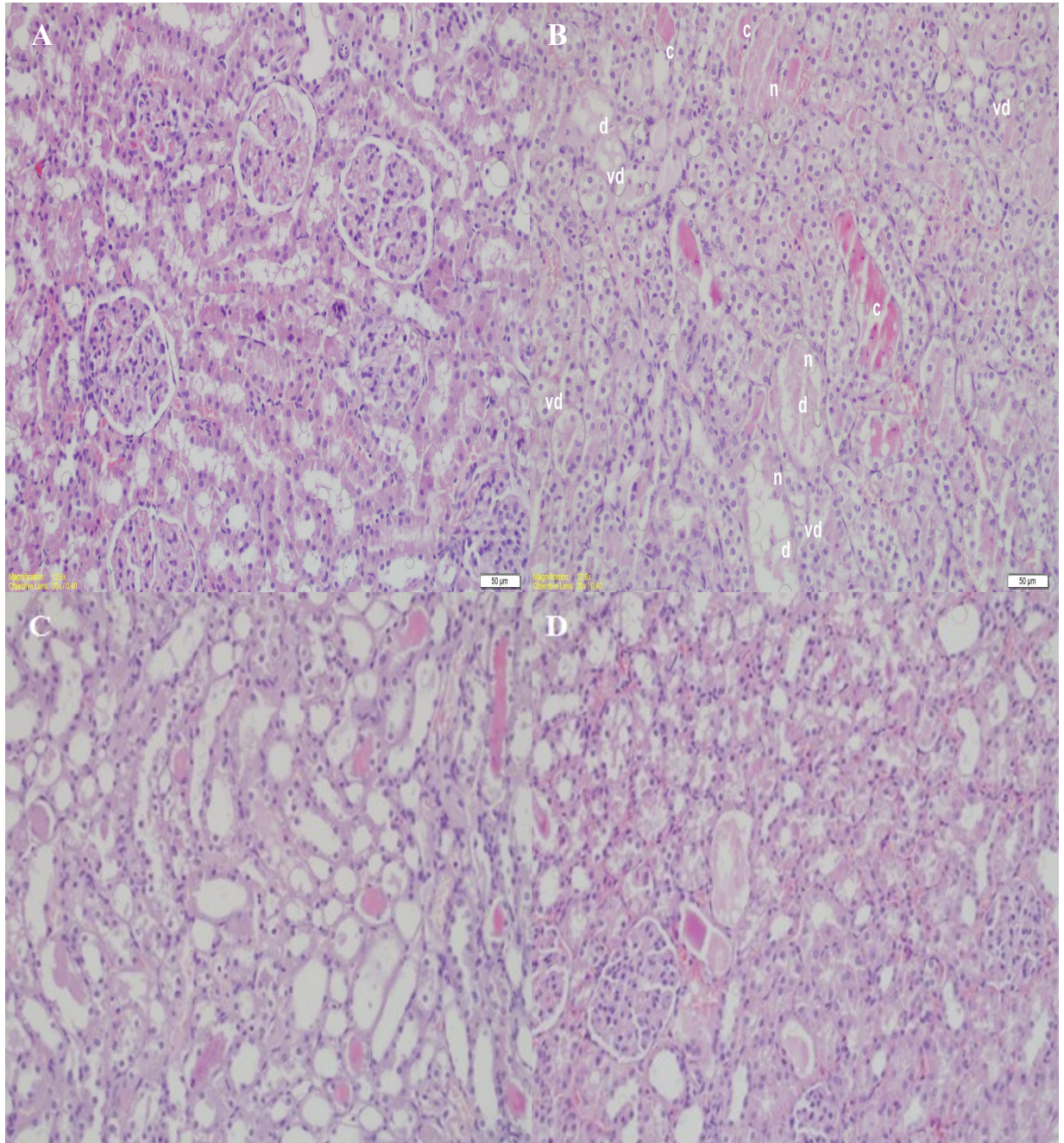
Bu skorlama tablosuna göre grupların böbrek hasarı derecesini gösteren histopatolojik skorlama sonuçları ve istatistiki veriler çizelge 4.1. ve grupların böbrek dokusu histopatolojik görüntüleri şekil 4.1’de sunulmuştur.

**Çizelge 4.1.** Grupların histopatoloji skorlama sonuçları

	<b>GI Sham</b>	<b>GII İ/R</b>	<b>GIII Erd+İ/R</b>	<b>GIV Vit D+İ/R</b>	<b>GV Erd+Vit D+İ/R</b>
<b>1</b>	0	1	3	1	0
<b>2</b>	0	2	1	2	3
<b>3</b>	0	4	0	1	1
<b>4</b>	0	3	1	0	0
<b>5</b>	0	4	2	4	2
<b>6</b>	0	5	1	2	1
<b>7</b>	0	4	1	3	1
<b>8</b>	0	3	-	3	1
<b>9</b>	0	3	-	1	-
<b>10</b>	0	-	-	1	-
<b>Median</b>	0	3	1	1,5	1
<b>(%25-%75)</b>	(0-0)*	(2,5-4)	(1-2)*	(1-3)*	(0,25-1,75)*

İ/R: İskemi/Reperfüzyon; Erd: Erdostein; Vit D: Vitamin D. \*: vs. İ/R; p <0.05

Çalışmamızda sham grubunun histopatoloji skorlarının, İ/R grubuna kıyasla daha iyi olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı (p< 0.05). Erd+İ/R, Vit D+İ/R ve Erd+Vit D+İ/R tedavi grupları ile karşılaştırıldığında İ/R grubunda, vakuolik dejenerasyon, deskuamasyon, tubül epitelyum hücrelerinde şişme ve tubülar nekroz parametrelerinin anlamlı derecede arttığı gözlemlendi (p<0.05). Bununla beraber bu histopatolojik parametrelerinin ise İ/R grubu ile karşılaştırıldığında Erd+İ/R, Vit D+İ/R ve Erd+Vit D+İ/R tedavi gruplarında anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi (p<0.05). Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise bu histopatolojik parametrelerin her üç tedavi grubunda azaldığı ancak istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı saptandı (p>0.05).



**Şekil 4.1.** Grupların böbrek dokusu histopatoloji görüntüleri

**A:** Sham grubu böbrek dokusu örneğinde normal böbrek histolojik görünümü (H&E, x200).

**B:** İ/R grubuna ait böbrek dokusu örneğinde iskemik değişiklikler; vd: vakuolik dejenerasyon, n: nekroz, d: deskuamasyon, c: tübüler kast formasyonu (H&E, x200).

**C:** İskemi öncesi Vit D verilen gruba ait doku örneklerinde kısmen düzelmiş böbrek histolojik görünümü (H&E, x200).

**D:** İskemi öncesi sadece Erd ve Vit D+Erd verilen gruba ait doku örneklerinde belirgin düzelmiş böbrek histolojik görünümü (H&E, x100).

## 4.2. Biyokimyasal Değerlendirme Sonuçları

### 4.2.1. Oksidatif Stres Parametrelerinin Sonuçları

#### 4.2.1.1. MDA, CAT, GSH-Px, SOD

Çalışma gruplarına ait doku MDA değerleri gruplar arasında incelendiğinde İ/R grubunun istatistiksel olarak en yüksek değerlere sahip olduğu belirlendi ( $p<0.001$ ). Aynı zamanda İ/R grubu ile karşılaştırıldığında Erd+İ/R, Vit D+İ/R ve Erd+Vit D+İ/R tedavi gruplarında ise MDA lmlerinin anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi (sırasıyla  $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ). Ancak tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında MDA lmlerinin her üç tedavi grubunda azaldığı ancak aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı saptandı ( $p>0.05$ ).

Deney gruplarına ait CAT ve GSH-Px enzim aktivite ölçümleri incelendiğinde; sham grubu ile karşılaştırıldığında İ/R grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü ( $p<0.001$ ). İ/R grubu ile karşılaştırıldığında Erd+İ/R, Vit D+İ/R ve Erd+Vit D+İ/R tedavi gruplarında ise bu antioksidan enzimlerinin her ikisinin seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı artışı gözlemlendi (sırasıyla  $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ). Ancak tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında CAT ve GSH-Px düzeylerinin her üç tedavi grubunda artmış olduğu ancak istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir farklılık olmadığı saptandı ( $p>0.05$ ).

Deney gruplarına ait SOD enzim aktivite ölçümleri incelendiğinde; sham grubu ile karşılaştırıldığında İ/R grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü ( $p<0.01$ ). İ/R grubu ile karşılaştırıldığında Erd+İ/R, Vit D+İ/R gruplarında SOD enzim aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı artışı gözlemlendi (sırasıyla  $p<0.001$ ,  $p<0.01$ ). Ancak Erd+Vit D+İ/R grubunda İ/R grubuna kıyasla istatistiksel olarak bir anlamlılık saptanmadı ( $p>0.05$ ).

Birbirini tamamlayıcı özelliğe sahip olan CAT, SOD ve GSH-Px antioksidan enzimlerinin spektrofotometrik yöntemle doku düzeyinde yapılan lmler sonucu elde edilen istatistiki sonuçlar izelge 4.2'de sunulmuştur.

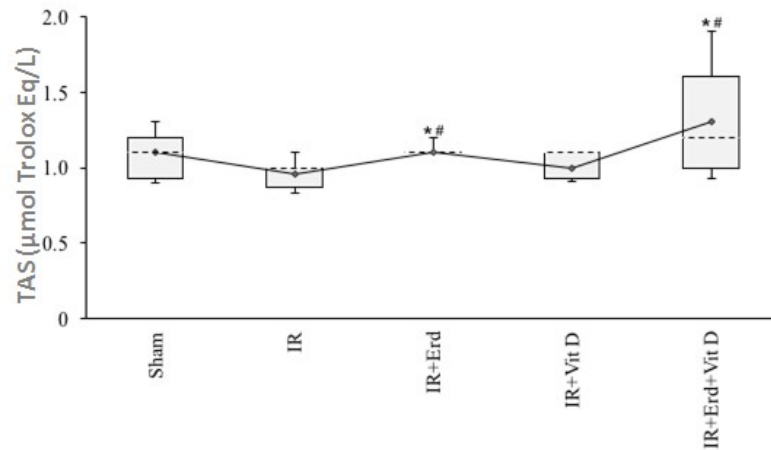
**Çizelge 4.2.** Grupların oksidatif stres enzimlerinin istatistiksel verileri (Ort±SS)

	<b>G1 Sham</b>	<b>GII İ/R</b>	<b>GIII Erd+İ/R</b>	<b>GIV Vit D+İ/R</b>	<b>GV Erd+VitD+İ/R</b>
<b>MDA (nmol/g- protein)</b>	401±24	904±47 <sup>a***</sup>	433±22 <sup>b***</sup>	439±20 <sup>b***</sup>	385±16 <sup>b***</sup>
<b>CAT (k/g-protein)</b>	106±5.1	66±2.3 <sup>a***</sup>	108±5.8 <sup>b***</sup>	96±4.2 <sup>b***</sup>	106±4.5 <sup>b***</sup>
<b>GSH-Px (U/g-protein)</b>	441±19 <sup>c*</sup>	185±6.1 <sup>a***</sup>	401±18 <sup>b***</sup>	430±20 <sup>b***c*</sup>	342±16 <sup>b***</sup>
<b>SOD (U/g-protein)</b>	943±30	781±25 <sup>a**</sup>	1006±36 <sup>b***c*</sup>	912±20 <sup>b**</sup>	885±27

İ/R: İskemi/Reperfüzyon; Erd: Erdostein; Vit D: Vitamin D;  
a: vs. Sham; b: vs. İ/R ; c: vs. Erd+Vit D+İ/R \*; p < 0.05; \*\*: p < 0.01; \*\*\*: p < 0.001

#### 4.2.1.2. TAS, TOS ve OSI

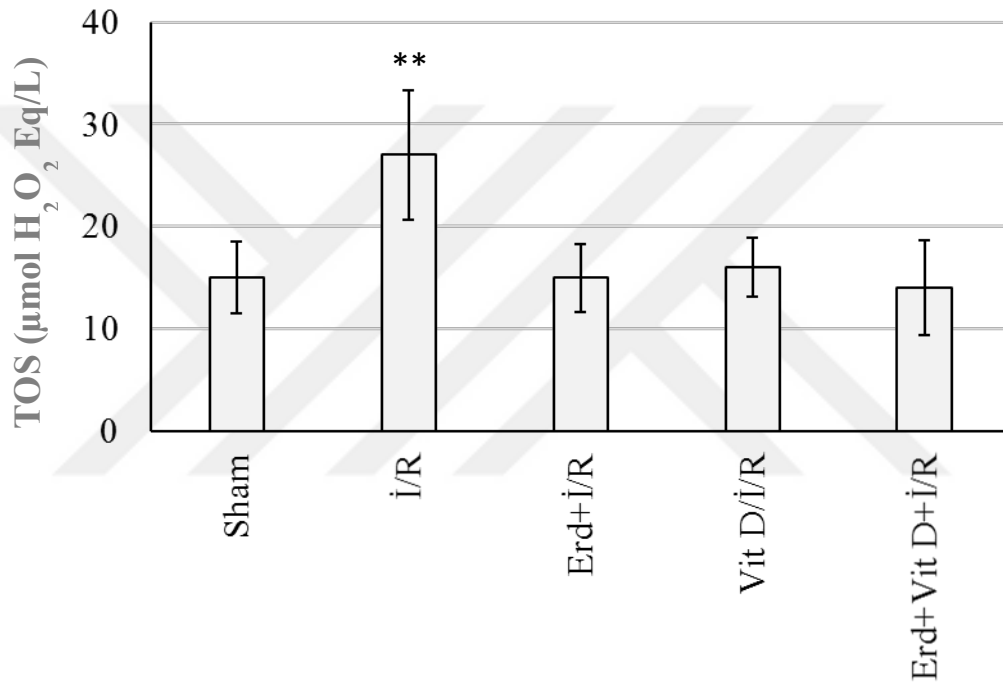
Deney gruplarına ait olan serbest radikallere karşı vücudun total antioksidan kapasitesini ölçen TAS ve oksidan dengenin totalde değerlendirilmesini sağlayan TOS ölçümü ile beraber TOS değerlerinin yüzde cinsinden TAS değerlerine oranlanmasıyla elde edilen OSI değerleri şekil 4.2., şekil 4.3. ve şekil 4.4'te gösterilmiştir.



**Şekil 4.2.** Gruplar arası TAS değerlerinin karşılaştırılması

İ/R: İskemi/Reperfüzyon; Erd: Erdostein; Vit D: Vitamin D; \*: vs. İ/R; #: vs. Vit D+İ/R, p < 0.05  
Değerler ortanca ve %25-%75 olarak sunulmuştur. Kesikli çizgiler ortancayı ifade etmektedir.

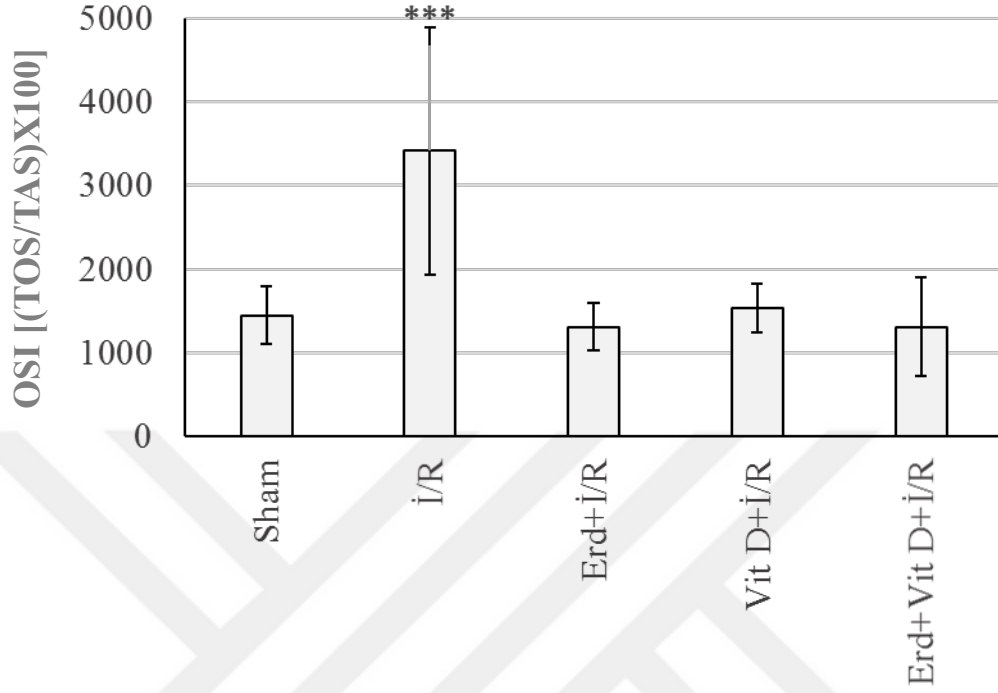
Deney gruplarına ait TAS ölçümleri incelendiğinde, sham grubu ile karşılaştırıldığında İ/R grubunda anlamlı olmayan bir azalma görüldü. İ/R grubu ile karşılaştırıldığında Erd+İ/R, Erd+Vit D+İ/R tedavi gruplarında ise TAS seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı artışı gözlemlendi ( $p<0.05$ ). Aynı zamanda tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise TAS seviyesinin Vit D+İ/R tedavi grubuna kıyasla sadece Erd tedavisi uygulanan grup ile Erd ve Vit D'nin birlikte uygulandığı tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı saptandı ( $p<0.05$ ).



**Şekil 4.3.** Gruplar arası TOS değerlerinin karşılaştırılması (Ort±SS)

İ/R: İskemi/Reperfüzyon; Erd: Erdostein; Vit D: Vitamin D; \*\*: vs. İ/R;  $p<0.01$

Çalışma gruplarına ait TOS ölçümleri gruplar arasında incelendiğinde İ/R grubunun istatistiksel olarak en yüksek değerlere sahip olduğu belirlendi ( $p<0.01$ ). Aynı zamanda İ/R grubu ile karşılaştırıldığında Erd+İ/R, Vit D+İ/R ve Erd+Vit D+İ/R tedavi gruplarında ise TOS ölçümlerinin anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi ( $p<0.01$ ). Ancak tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında TOS ölçümlerinin her üç tedavi grubunda azaldığı ancak istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı saptandı ( $p>0.05$ ).



**Şekil 4.4.** Gruplar arası Oksidatif Stres İndeks (OSI) değerlerinin karşılaştırılması (Ort±SS)  
İ/R: İskemi/Reperfüzyon; Erd: Erdostein; Vit D: Vitamin D; \*\*\*: vs. İ/R; p<0.001

OSI ölçümleri gruplar arasında incelendiğinde, tüm gruplara kıyasla İ/R grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı saptandı (p<0.001). Aynı zamanda İ/R grubu ile karşılaştırıldığında ise Erd+İ/R, Vit D+İ/R ve Erd+Vit D+İ/R tedavi gruplarında OSI ölçümlerinin anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi (p<0.001). Ancak tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında OSI değerlerinin her üç tedavi grubunda azaldığı ancak istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir farklılık olmadığı saptandı (p>0.05).

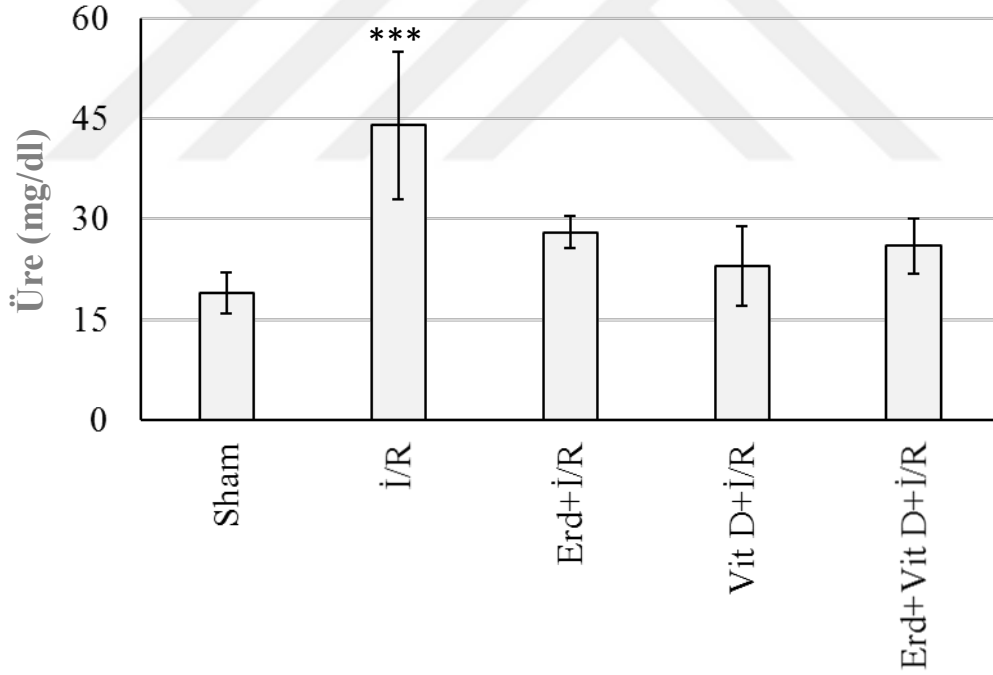
#### 4.2.2. Üre ve Kreatinin

Sıçanlardan alınan kan örneklerinde bakılan üre ve kreatinin düzeylerinin istatistiki verileri çizelge 4.3., şekil 4.5. ve şekil 4.6.'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Üre ve Kreatinin düzeylerinin istatistiki verileri (Ort±SS)

	<b>G1 Sham</b>	<b>GII İ/R</b>	<b>GIII Erd+İ/R</b>	<b>GIV Vit D+İ/R</b>	<b>GV Erd+Vit D+İ/R</b>
<b>Üre (mg/dl)</b>	19±3.1 <sup>b***</sup>	44±11.0	28±2.4 <sup>b***</sup>	23±6.0 <sup>b***</sup>	26±4.1 <sup>b***</sup>
<b>Kreatinin (mg/dl)</b>	0.52±0.047 <sup>b***</sup>	0.68±0.022	0.60±0.054 <sup>a,b*</sup>	0.58±0.041 <sup>b**</sup>	0.58±0.064 <sup>b**</sup>

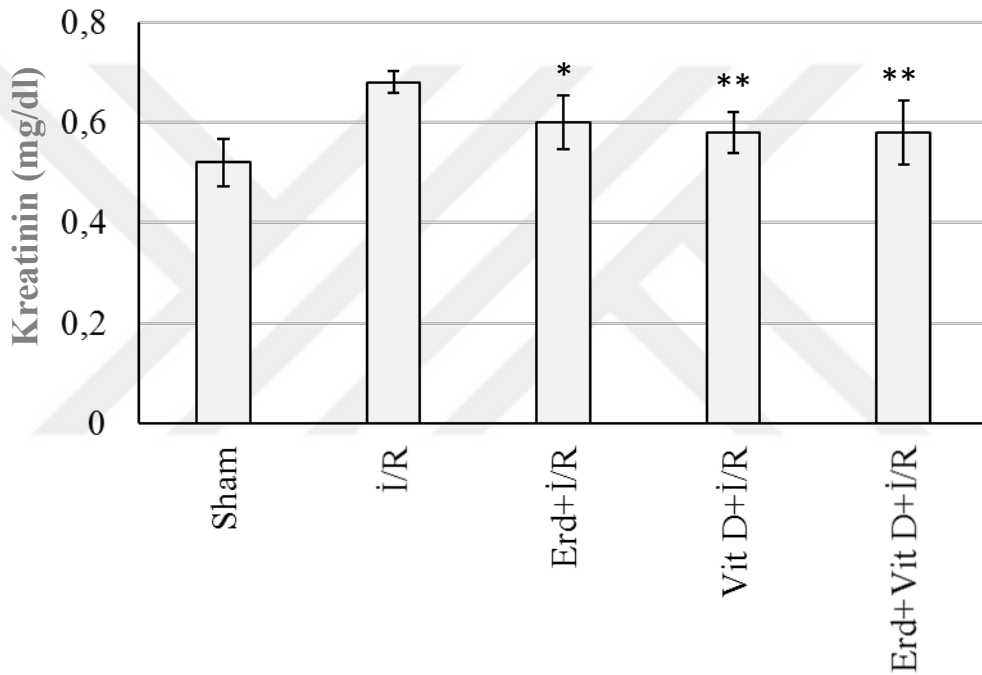
İ/R: İskemi/Reperfüzyon; Erd: Erdostein; Vit D: Vitamin D  
a: vs. Sham; b: vs. İ/R ; \*: p < 0.05; \*\*: p < 0.01; \*\*\*: p < 0.001



Şekil 4.5. Gruplar arası Üre düzeylerinin karşılaştırılması (Ort±SS)  
İ/R: İskemi/Reperfüzyon; Erd: Erdostein; Vit D: Vitamin D; \*\*\*: vs. İ/R; p < 0.001



Deney gruplarına ait üre düzeyleri incelendiğinde, tüm gruplara kıyasla İ/R grubunun istatistiksel olarak en yüksek değere sahip olduğu belirlendi ( $p<0.001$ ). Aynı zamanda İ/R grubu ile karşılaştırıldığında Erd+İ/R, Vit D+İ/R ve Erd+Vit D+İ/R tedavi gruplarında ise üre seviyesinin anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi ( $p<0.001$ ). Ancak tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise üre seviyesinin her üç tedavi grubunda azaldığı ancak aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı saptandı ( $p>0.05$ ).



**Şekil 4.6.** Gruplar arası Kreatinin düzeylerinin karşılaştırılması (Ort±SS)

İ/R: İskemi/Reperfüzyon; Erd: Erdostein; Vit D: Vitamin D; vs. İ/R; \*:  $p<0.05$ ; \*\*:  $p<0.01$

Deney gruplarına ait kreatinin düzeyleri incelendiğinde, tüm gruplara kıyasla İ/R grubunun istatistiksel olarak en yüksek değere sahip olduğu belirlendi ( $p<0.01$ ). Aynı zamanda İ/R grubu ile karşılaştırıldığında Erd+İ/R, Vit D+İ/R ve Erd+Vit D+İ/R tedavi gruplarında ise kreatinin seviyesinin anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi (sırasıyla,  $p<0.05$ ,  $p<0.01$ ,  $p<0.01$ ). Ancak tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise kreatinin seviyesinin her üç tedavi grubunda azaldığı ancak istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir farklılık olmadığı saptandı ( $p>0.05$ ).

### 4.2.3. TGF-β1, U-II ve EPO

Sıçanlardan alınan kan örneklerinde bakılan EPO hormon düzeyleri, U-II ve TGF-β1 düzeylerinin istatistiki verileri çizelge 4.4'te gösterilmiştir.

**Çizelge 4.4.** U-II, TGF-β1 ve EPO düzeylerinin istatistiki verileri (Ort±SS)

	<b>G1 Sham</b>	<b>GII İ/R</b>	<b>GIII Erd+İ/R</b>	<b>GIV Vit D+İ/R</b>	<b>GV Erd+Vit D+İ/R</b>
<b>U-II (ng/ml)</b>	0.473±0.258	1.46±0.311 <sup>a**</sup>	1.29±0.365 <sup>a**</sup>	1.15±0.266 <sup>a*</sup>	1.12±0.172 <sup>a*</sup>
<b>TGF-β1 (pg/ml)</b>	179±40	286±72 <sup>a***</sup>	211±24 <sup>b*</sup>	208±26 <sup>b**</sup>	194±31 <sup>b***</sup>
<b>EPO (pg/ml)</b>	242±41	295±36 <sup>a*</sup>	236±19 <sup>b**</sup>	249±27 <sup>b*</sup>	264±28

İ/R: İskemi/Reperfüzyon; Erd: Erdostein; Vit D: Vitamin D  
a: vs. Sham; b: vs. İ/R ; \*: p < 0.05; \*\*: p < 0.01; \*\*\*: p < 0.001

Çalışma gruplarına ait U-II düzeyleri gruplar arasında incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu (p < 0.05). Sham grubu ile karşılaştırıldığında İ/R grubu ve diğer tedavi gruplarında U-II düzeyinin anlamlı derecede arttığı saptandı (p < 0.05). Ayrıca İ/R grubu ile karşılaştırıldığında Erd+İ/R, Vit D+İ/R ve Erd+Vit D+İ/R tedavi gruplarında U-II düzeyinin azaldığı ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlendi (p>0.05).

Deney gruplarına ait TGF-β1 düzeyleri gruplar arasında incelendiğinde tüm gruplara kıyasla istatistiksel olarak en yüksek değer İ/R grubunda olduğu belirlendi (p < 0.001). Ayrıca İ/R grubu ile karşılaştırıldığında ise Erd+İ/R, Vit D+İ/R ve Erd+Vit D+İ/R tedavi gruplarında TGF-β1 düzeylerinin anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi (sırasıyla, p<0.05, p<0.01, p<0.001). Ancak tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında TGF-β1 değerlerinin her üç tedavi grubunda azaldığı ancak aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı saptandı (p>0.05).

Deney gruplarına ait EPO hormon düzeyleri gruplar arasında incelendiğinde tüm gruplara kıyasla istatistiksel olarak en yüksek değer İ/R grubunda olduğu belirlendi (p < 0.05). Ayrıca İ/R grubu ile karşılaştırıldığında ise Erd+İ/R, Vit D+İ/R tedavi gruplarında EPO hormon düzeylerinin anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi (sırasıyla, p<0.001, p<0.05). Ancak hem Erd hem de Vit D tedavisinin birlikte uygulandığı grup ile diğer

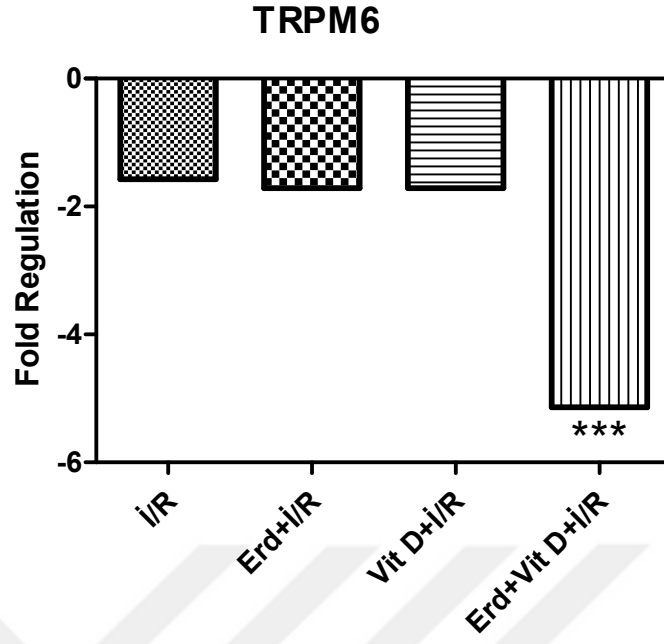
tedavi grupları karşılaştırıldığında EPO değerlerinin her üç tedavi grubunda azaldığı ancak aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı saptandı ( $p>0.05$ ).

### 4.3. Gen İfadesi Sonuçları

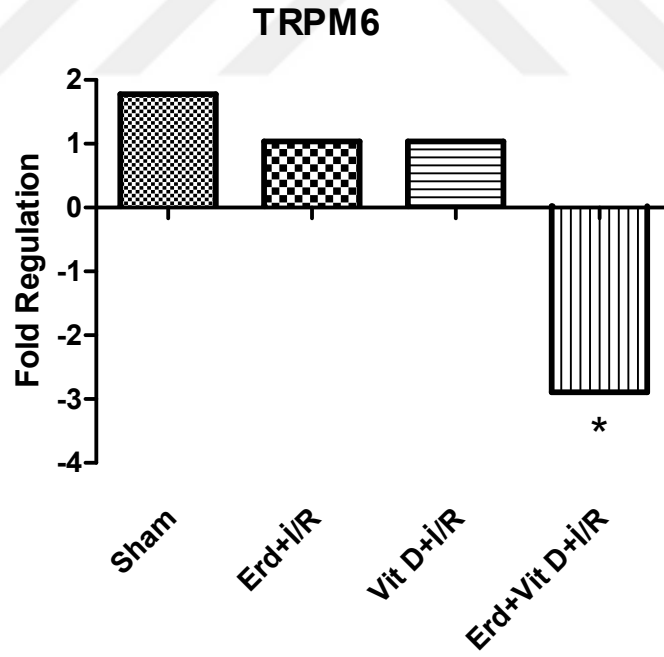
qRT-PCR yöntemi ile ekspresyon düzeyleri ölçülen TRPM 6, TRPM 7 genine ait sonuçların istatistiksel verileri şekil 4.7., 4.8., 4.9. ve şekil 4.10.'da gösterilmiştir.

Deney gruplarına ait TRPM 6 gen ekspresyon düzeyleri gruplar arasında incelendiğinde; sham grubu ile karşılaştırıldığında İ/R, Erd+İ/R, Vit D+İ/R gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma saptandı ( $p>0.05$ ) ancak Erd+Vit D+İ/R grubunda anlamlı bir azalış görüldü ( $p<0,001$ ). Ayrıca İ/R grubu ile karşılaştırıldığında sadece Erd+Vit D+İ/R grubunda anlamlı bir azalış görüldü ( $p<0,05$ ).

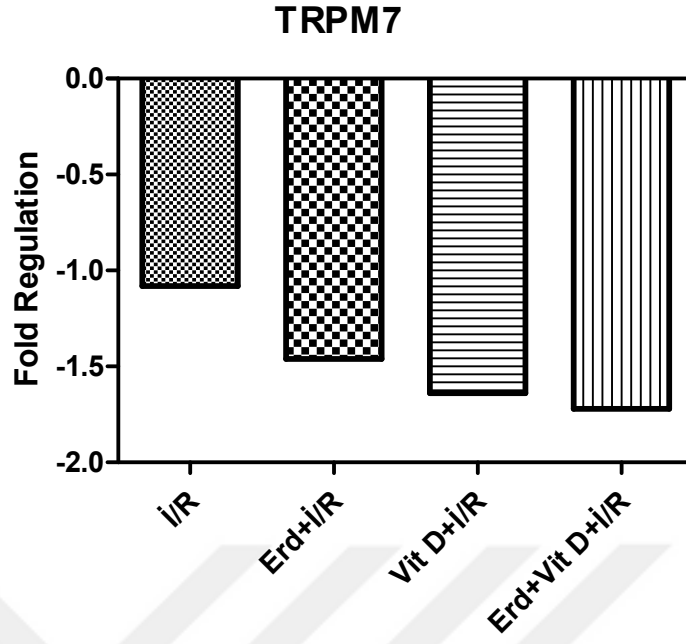
Deney gruplarına ait TRPM 7 gen ekspresyon düzeyleri gruplar arasında incelendiğinde; sham grubu ile karşılaştırıldığında İ/R, Erd+İ/R, Vit D+İ/R, Erd+Vit D+İ/R gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma saptandı ( $p >0.05$ ). Ayrıca İ/R grubu ile karşılaştırıldığında ise Erd+İ/R, Vit D+İ/R ve Erd+Vit D+İ/R tedavi gruplarında herhangi bir anlamlılık saptanmadı ( $p< 0.05$ ).



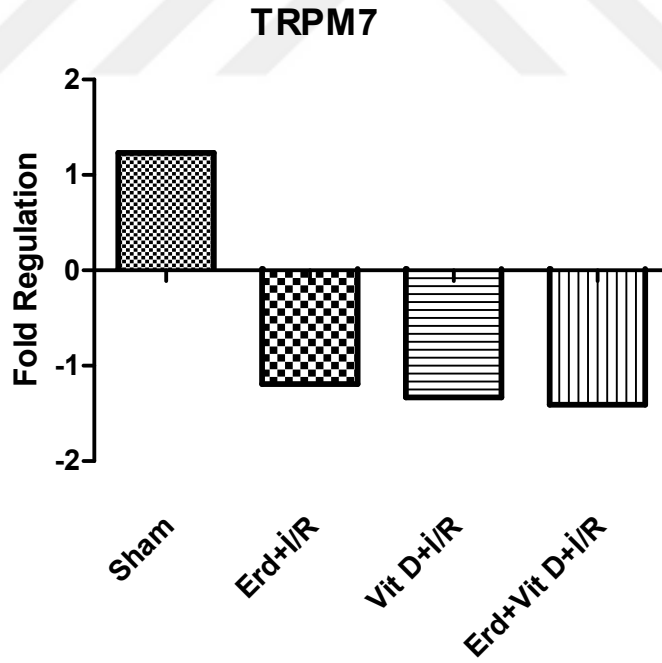
**Şekil 4.7.** Sham grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arası TRPM 6 gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması  
 İ/R: İskemi/Reperfüzyon; Erd: Erdostein; Vit D: Vitamin D. \*\*\*:  $p < 0.001$



**Şekil 4.8.** İ/R grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arası TRPM 6 gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması  
 İ/R: İskemi/Reperfüzyon; Erd: Erdostein; Vit D: Vitamin D. \*:  $p < 0.05$



**Şekil 4.9.** Sham grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arası TRPM 7 gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması  
İ/R: İskemi/Reperfüzyon; Erd: Erdostein; Vit D: Vitamin D



**Şekil 4.10.** İ/R grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arası TRPM 7 gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması  
İ/R: İskemi/Reperfüzyon; Erd: Erdostein; Vit D: Vitamin D

## 5. TARTIŞMA

Böbreklerde İ/R sonrası oluşan hasarın fizyopatolojisi oldukça karışıktır. İ/R hasarı sonrasında aşırı miktarda oluşan serbest oksijen reaktif ürünleri, oksidatif strese neden olur. Hücre içi kalsiyum artışı, hücre iskeleti ve membran fosfolipidlerinin bozulmasına öncülük eden proteaz ve fosfolipazların aktive olması, mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun değişmesi ve ATP'nin azalması hücrede oksidatif strese yol açan nedenler arasında sayılmaktadır (Aydoğdu ve ark. 2005).

İ/R hasarının çeşitli komponentleri bulunmasına karşın iskemi safhasında hipoperfüzyon ve ilişkili şekilde metabolik atıkların birikiminin, reperfüzyon safhasında ise hızlı O<sub>2</sub> artışına bağlı aşırı oluşan serbest oksijen radikallerinin (SOR) membran akışkanlığını bozarak hücreyi fonksiyonel açıdan yıkmasının kilit rol oynadığı düşünülmektedir (Tong ve ark. 2017). Böylece renal transplantasyon, parsiyel nefrektomi, renal arter cerrahisi gibi renal kan akımını durudran veya azaltan cerrahi girişimler sırasında ortaya çıkan İ/R hasarında reaktif oksijen türevleri artış gösterirken antioksidan savunma sistemi yetersiz kalarak bu durum sonuçta hücrede oksidatif strese neden olur.

Oksidatif stres durumunda serbest oksijen türevleri ve antioksidanlar arasındaki denge serbest radikaller lehine bozulur (Erdogan ve ark. 2006). Böylece hipoksiye bağlı böbrek hasarının patogenezinde serbest oksijen radikallerinin ve antioksidanların rolünün belirlenmesi, antioksidan tedavi denemelerini gündeme getirmiştir. Yapılan deneysel çalışmalarda böbrek İ/R hasarının engellenmesinde N-Asetilsisteinin, apelin, mannitol gibi çeşitli antioksidan maddeler denenmiş ve deneysel olarak İ/R hasarını önlemede etkili oldukları gösterilmiştir (Aydoğdu ve ark. 2005, Bircan ve ark. 2016, Özlülerden ve ark. 2017).

Mevcut çalışmada, sıçan renal iskemi/reperfüzyon (İ/R) modelinde erdosteine (Erd) ve D vitamininin (Vit D) renal fonksiyon ve İ/R hasarına etkileri değerlendirilmiştir. Bu kapsamda lipid peroksidasyonunun önemli göstergesi olan malondialdehit (MDA) ve birbirini tamamlayıcı özelliğe sahip antioksidan enzimlerin (SOD, CAT ve GSH-Px) renal doku düzeyleri ölçülmüştür. İlâveten serbest radikallere karşı vücudun total antioksidan kapasitesini gösteren TAS ve total oksidan düzeyini ifade eden TOS değerleri incelenerek

oksidatif stres indeksi belirlenmiştir. Ayrıca renal fonksiyonu değerlendirmek amacıyla üre ve kreatinin düzeyleri ölçülmüş, iskemi/reperfüzyon hasarıyla ilişkileri sebebiyle ise TGF- $\beta$ 1 ve ürotensin-II düzeyleri değerlendirilmiştir. Bunlarla beraber apoptotik süreçlere katkıları göz önünde bulundurularak TRPM 6 ve 7 gen ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır.

Çalışma bulgularımız renal İ/R'nin, lipid peroksidasyonu belirteci MDA'nın artışına yol açarken antioksidan enzim aktivitelerinde (SOD, CAT ve GSH-Px) düşüşe sebep olduğunu göstermektedir. İlaveten total oksidan kapasitenin artması ve aynı zamanda total antioksidan kapasitenin azalması neticesinde oksidatif stres indeksinin (OSI) arttığı gözlemlenmiştir. Böylece oksidan/antioksidan dengesinin prooksidanlar yönünde kayması, üre ve kreatinin seviyelerinin artışıyla izlendiği üzere renal fonksiyonların bozulmasıyla sonuçlanmıştır. Söz konusu fonksiyon bozukluğu histopatolojik değişikliklerle (deskuamasyon, vakuolik dejenerasyon, tübül epitel hücrelerinde şişme, nekroz) birliktelik göstermiştir. Erd ve D vit ön tedavileri hem tek başlarına hem de kombine uygulamada bahsedilen histopatolojik bulgularda iyileşme sağlamıştır. Aynı zamanda U-II ve TGF- $\beta$ 1 seviyelerinde de azalma sağladığı görülmüştür. U-II ve TGF- $\beta$ 1'in iskemik patolojilerde yükseldiği ve İ/R hasarına katkı sunuyor olabileceği (Alan ve ark. 2011, Gao ve ark. 2012) hakikatinden hareketle bahse konu azalma Erd ve D vit ön tedavilerinin iskemi/reperfüzyon hasarı açısından koruyucu etkiye sahip olabileceği fikrini desteklemektedir. Her ne kadar tek başlarına uyguladıklarında ekspresyon düzeylerini değiştirmemişlerse de Erd ve D vit'in kombine uygulamaları TRPM6 iyon kanalının gen ekspresyon düzeyini anlamlı şekilde düşürmüştür. Dolayısıyla kombine tedavinin iskemi/reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkisinde TRPM6 kanal ekspresyonunu modifiye edici özelliğinin katkıda bulunduğu düşünülebilir.

Böbreklerde deneysel olarak İR hasarının etkilerini ortaya çıkarmak adına belirli bir İ/R süresine ihtiyaç vardır. Ancak literatürdeki mevcut çalışmaları incelediğimizde renal İ/R hasarını oluşturmaya yönelik karşımıza oldukça çeşitli iskemi/reperfüzyon süreleri çıkmaktadır. Buna bağlı olarak bizler de literatürdeki benzer çalışmaları inceleyerek çalışmamızın İ/R süresini belirledik (Supavekin ve ark. 2003, Aydogdu ve ark. 2005, Gonullu ve ark. 2014).

Aydogdu ve ark. (2005) renal iskemi reperfüzyon hasarı oluşturdukları ratlarda N-asetilsistein'in renoprotektif etkisine baktıkları çalışmada, iskemi süresini 60 dakika

reperfüzyon süresini ise 24 saat olarak uygulamışlardır. Gonullu ve ark. (2014) iskemi reperfüzyon hasarına karşı dexmedetomidine'nin etkilerini araştırdıkları çalışmada serbest oksijen radikallerinin etkinliğini göstermişlerdir ve mevcut çalışmada 60 dakikalık iskemi ve 24 saat reperfüzyon süresini tercih etmişlerdir. Gonullu ve ark. (2014), daha önce yapılan çalışmalara değinerek (Williams ve ark. 1997, Billings ve ark. 2008) interstisyel ödem, bozulmuş vazoregülasyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, parankimal hücre disfonksiyonu, akut tubular nekroz ve mikrovasküler geçirgenliğin artışı gibi histopatolojik değişikliklerin reperfüzyon sonrası 24. saatte en üst düzeye çıktığını ve aynı zamanda bu değişikliklerin klinik süreçlerde renal fonksiyon bozukluğunun göstergesi olan serum kreatinin ve üre düzeyleri ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Bununla beraber Gonullu ve ark. (2014) aynı çalışmalarında 60 dakikalık iskemi süresinden sonra renal hasarın ortaya çıktığını göstermişlerdir. Bu bağlamda biz de çalışmamızda 60 dakikalık iskemi ve 24 saatlik reperfüzyon süresini tercih ettik.

İ/R hasarının fizyopatolojisinin aydınlatılması ve önlenmesi için klinik denemeler öncesi yeni tedavi protokollerinin bulunmasında deneysel modellerin önemi son derece büyüktür. Klinik çalışmalar öncesinde, ön tedavide etkinliği araştırılan ajanların hayvan deneylerinde mutlaka denenmesi ve incelenmesi gerekmektedir. Bu tür modellerde test edilen ve İ/R hasarına karşı protektif etkileri olduğu saptanan antioksidan ajanların kliniğe uygulanması uzun süreçlere dayansa da, çeşitli patolojik durumlarda ya da cerrahi işlemlerde organ koruyucu olarak tedavi protokollerinde pek çok antioksidan bulunmaktadır (Şener ve Yeğen, 2009).

Literatürdeki mevcut çalışmaları incelediğimizde böbrek iskemi reperfüzyon hasarının önlenmesinde birçok ajan kullanılmıştır. Böbrekte oluşabilecek İ/R hasarının önlenmesinde bu ajanların deneysel çalışmalarda fayda sağlayabileceği gösterilmiştir (Aydoğdu ve ark. 2005, Bircan ve ark. 2016, Özlülerden ve ark. 2017). Bu tür maddelerin deneysel çalışmalardaki olası koruyucu etkileri göz önüne alındığında denenerek kullanılması, farklı antioksidan özellikteki maddelerin kullanımının iskemi reperfüzyon hasarında etkili olacağı düşüncesi ile çalışmamızda antioksidan ve antiinflamatuvar özelliğe sahip erdosteine (Erd) ve D vitamininin (Vit D) İ/R hasarına karşı olası koruyucu etkilerini araştırmayı hedefledik.



Çalışmamızda etkinliğini araştırdığımız Erd, yapısında bulunan tiyol grupları sayesinde ortamda bulunan serbest oksijen radikallerini (SOR) inhibe ederek ve endojen antioksidanların yapımını arttırarak güçlü antioksidan özellik göstermektedir (Sirmali ve ark. 2007). Lee ve ark. (2010) renal İ/R hasarı çalışmalarında, Erd'in glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) düzeylerini arttırarak İ/R hasarını azalttıkları ve İ/R grubuna kıyasla üre ve kreatinin seviyelerini düşürerek renal fonksiyonu koruduğunu bildirmişlerdir (Lee ve ark. 2010). Tutanc ve ark. (2012) Siklosporin-A ile oluşturdukları nefrotoksisiteye karşı, Erd'in enzimatik antioksidan sistem ile SOR'u inhibe ederek böbrekteki toksik etkiyi azalttığını aynı zamanda üre ve kreatinin seviyelerini düşürerek renal fonksiyonu koruduğunu bildirmişlerdir (Tutanc ve ark. 2012). Saritas ve ark. (2014) asetaminofen ile oluşturdukları hepatotoksisiteye karşı; Erd ve N-asetilsistein'in uygulandıkları grupta total oksidan kapasiteyi (TOS), histopatolojik değişikliklerle beraber anlamlı şekilde düşürdükleri ve total antioksidan kapasiteyi (TAS) anlamlı derecede arttırarak karaciğerdeki toksik etkiyi azalttıklarını bildirmişlerdir. Aynı zamanda hepatotoksisiteye karşı tek doz Erd ön tedavisinin, N-asetilsistein ön tedavisinden daha etkili olduğunu belirtmişlerdir (Saritas ve ark. 2014). Ugurel ve ark (2017) over İ/R hasarı çalışmalarında, İ/R grubunda histopatolojik değişikliklerle birlikte MDA düzeyinin anlamlı artış gösterdiğini belirterek, Erd'in uygulandığı grupta MDA düzeyini anlamlı düzeyde düşürüp katalaz aktivitesini arttırması ile oksidatif stresi azalttığını göstermişlerdir (Ugurel ve ark. 2017).

Çalışmamızda etkinliğini araştırdığımız diğer bir ajan ise antiinflamatuvar özelliğe sahip ve kemik metabolizmasında önemli etkinliği olan D vitamindir (Vit D). Ekici ve ark.'ın (2009) yaptığı beyin İ/R hasarı çalışmalarında, dihidroaskorbik asit (DHA) ve D vitamini kombine uygulamasının, MDA seviyesini önemli derecede azalttığını ve glutatyon (GSH), süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitelerini attırması ile SOR üretimini inhibe edip iskemik serebral hastalıkta etkili olduğunu göstermişlerdir (Ekici ve ark. 2009). Sinanoglu ve ark. (2012) 45 dk iskemi 45 dk reperfüzyon uygulaması ile ratlarda oluşturdukları renal İ/R hasarına karşı melatonin ve D vitamini ön tedavilerinin, ayrı ayrı ve iki ajanın birlikte uygulandığı grupta serum üre, kreatinin düzeylerini histopatolojik değişiklikler ile beraber anlamlı olarak azalttıklarını ifade ederek renoprotektif etkisini değerlendirmişlerdir (Sinanoglu ve ark. 2012). Seif ve Abdelwahab (2014) hepatik iskemi reperfüzyon hasarı çalışmalarında D vitamini takviyesinin çoğunlukla inflamatuvar

apoptotik yanıtı azaltarak koruyucu etki gösterdiğini ancak İ/R hasarına karşı D vitamininin nasıl koruyucu etki gösterdiğinin daha ileri çalışmalar ile araştırılarak moleküler basamaklarının aydınlatılması gerektiğini belirtmişlerdir (Seif ve Abdelwahab 2014). de Bragança ve ark. (2015) diyet uyguladıkları (30 gün) ratlarda 45 dk iskemi ve 48 saat reperfüzyon ile oluşturdukları renal İ/R hasarına bağlı olarak görülen akut böbrek hasarında, D vitamini eksikliğinin renal inflamasyon, hücre proliferasyonu ve hasarını arttırdığını bildirmişlerdir (de Bragança ve ark. 2015).

Böbrek fonksiyon testleri; böbrek hastalıklarının teşhisi, takibi ve tedavisinde kullanılan laboratuvar bulgularını, böbrek hasarını, böbreğe ilişkin patolojileri ve böbreğin fonksiyonel durumunu göstermektedir (Govda ve ark. 2010). Çalışmamızda İ/R hasarının böbrekte oluşup oluşmadığını ve glomerüler fonksiyonu değerlendirmede, böbrek fonksiyonu belirteci olan serum üre ve kreatinin düzeylerini inceledik. Çalışmada sham grubuna göre İ/R grubunda serum üre ve kreatinin düzeylerinin anlamlı şekilde artışı, İ/R hasarı sonrası böbreklerde akut hasarın gerçekleştiğini göstermektedir. Aynı zamanda İ/R grubu ile karşılaştırıldığında Erd ve D vitamininin, ayrı ayrı ve birlikte uygulandıkları kombine grupta serum üre ve kreatinin düzeylerini anlamlı derecede azaltmış olduklarını saptadık. Böylece bu durum Erd ve D vitamininin, renal İ/R hasarına olumlu etki ettiklerini bize göstermektedir. Bununla beraber yapılan benzer çalışmaların da bulgularımızla benzerlik gösterdiğini tespit ettik (Aydoğdu ve ark. 2005, Şentürk ve ark. 2010, Chen ve Wu 2012, Sezgin ve ark. 2013, Gonullu ve ark. 2014, Cakir ve ark. 2017).

Cakir ve ark. (2017) sıçanlarda 60 dk. iskemi ve 23 saat reperfüzyon uyguladıkları çalışmalarında İ/R grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; doku MDA düzeyi, serum üre ve kreatinin düzeyleri ile beraber böbreklerde glomeruler hasar, konjesyon, vakuolizasyon, deskuamasyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonu gibi histopatolojik değişikliklerin İ/R grubunda anlamlı düzeyde arttığını rapor etmişlerdir. Şentürk ve ark. (2010) sıçanlarda 45 dk. iskemi 6 saat reperfüzyon süresini inceledikleri çalışmalarında böbreklerde tübül hücrelerinde şişme, tübüler deformasyon tübüler lümen içerisinde nekrotik hücrelerin artışı gibi histopatolojik değişiklikler, serum üre ve kreatinin düzeylerinin anlamlı artışı ile beraber doku MDA düzeyinin de anlamlı artışı ile böbrek hasarının arttığını göstermişlerdir. Aynı zamanda bu çalışmada antioksidan özelliği olan silimanın İ/R ile oluşan akut böbrek hasarına karşı koruyucu etkisi olduğunu

göstermişlerdir. Yurdakul ve ark (2010) sıçanlarda 40 dk iskemi ve 1 saat reperfüzyon uyguladıkları renal İ/R hasarı çalışmalarında; Erd (oral yolla, 10 mg/kg) ve  $\alpha$ -tocoferol'in (intraperitoneal, 10 mg/kg) kombine uygulamalarının ayrı ayrı uygulamalarına göre üstünlüklerini değerlendirmişlerdir. İ/R grubu ile karşılaştırıldığında, Erd ve  $\alpha$ -tocoferol'in, doku MDA düzeyi ve histopatolojik değişiklikleri ayrı ayrı ve birlikte uygulandıkları tedavi gruplarında anlamlı şekilde düşürdüklerini göstermişlerdir. Aynı zamanda Erd ve  $\alpha$ -tocoferol'in birlikte uygulandıkları kombine grupta İ/R hasarına karşı sinerjistik etki göstererek daha etkili olduklarını göstermişlerdir. Sezgin ve ark (2013) sağ böbrek nefrektomisi sonrası sıçanlarda sol renal pedikülü klemplayerek 45 dk iskemi sonrası 45 dk reperfüzyon uyguladıkları çalışmalarında Vit D<sub>3</sub> (intraperitoneal, 0.5  $\mu$ g/kg) ve melatonin'i (intraperitoneal, 10 mg/kg) ayrı ayrı ve kombine şekilde uygulayarak İ/R hasarına karşı etkilerini incelemişlerdir. İ/R grubu ile karşılaştırıldığında, ayrı ayrı ve birlikte uygulandıkları tedavi gruplarında Vit D<sub>3</sub> ve melatonin'in, doku MDA düzeyi, serum kreatinin ve üre düzeylerini, histopatolojik değişiklikleri anlamlı şekilde düşürdüklerini göstermişlerdir. Vit D<sub>3</sub> ve melatonin'in, hem ayrı ayrı hem de kombine uygulamalarının İ/R hasarına karşı etkili olduklarını ancak kombine uygulamanın ayrı ayrı uygulamaya göre bir üstünlüğü olmadığını ifade etmişlerdir.

İfade edilen geçmiş çalışma sonuçları mevcut çalışmamızın verileri ile benzerlik göstermektedir. İ/R sonrası serum üre ve kreatinin düzeyi ile lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA düzeyinin, sham grubuna kıyasla İ/R grubunda anlamlı şekilde arttığı bulundu. Bununla birlikte deney gruplarımızda uyguladığımız Erd ve D vitamininin, ayrı ayrı ve kombine şekilde uygulamaları doku MDA düzeyini anlamlı şekilde düşürmelerine bağlı olarak bu iki ajanın, renal İ/R hasarda lipid peroksidasyonunu azaltıcı yönde etki göstererek oluşabilecek hasar üzerine önleyici yönde katkılarının olabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda serum üre, kreatinin ve MDA düzeyi ile ilgili bulgular açısından Erd ve D vitamininin birlikte uygulandığı kombine grubu, ayrı ayrı uygulandıkları gruplar ile karşılaştırdığımızda, kombine uygulamanın ayrı ayrı uygulamaya göre bir üstünlüğü olmadığını saptadık.

İ/R esnasında birçok metabolik değişiklikler olduğu bilinmektedir. İskemik dokunun reperfüzyonu ile reaktif oksijen türlerinin üretiminde artış ile birlikte antioksidan savunma sistemi etkisizleşmeye başlar ve bu durum sonuçta hücrede oksidatif strese neden

olur. Böylece serbest oksijen türevleri ve antioksidanlar arasındaki denge serbest radikaller lehine bozulur.

Aydoğdu ve ark. (2005) N-asetilsisteinin uyguladıkları çalışmalarında 60 dk iskemi ve 24 saat reperfüzyon sonrası İ/R grubunda CAT, SOD ve GSH-Px aktivitelerinde diğer gruplara göre anlamlı azalma kaydetmişlerdir. Rasoulia ve ark. (2008), yaptıkları çalışmada erkek wistar albino sıçanlarda renal İ/R (40 dk/24 saat) sonrası İ/R grubunda CAT, SOD seviyelerinde anlamlı bir artış kaydetmişlerdir. Benzer bir çalışmada Kapan ve ark. (2009), aortik İ/R sonrası İ/R grubunda SOD, CAT aktivitelerinde anlamlı derecede yükselme bulmuşlardır. Sezgin ve ark (2013) sağ böbrek nefrektomisi sonrası sıçanlarda sol renal pedikülü klemplayerek 45 dk iskemi sonrası 45 dk reperfüzyon uyguladıkları çalışmalarında Vit D<sub>3</sub> (intraperitoneal, 0.5 µg/kg) ve melatonin'i (intraperitoneal, 10 mg/kg) ayrı ayrı ve kombine şekilde uygulayarak İ/R hasarına karşı etkilerini incelemişlerdir. Vit D<sub>3</sub> ve melatonin'in ayrı ayrı ve kombine uygulamalarında SOD enzim aktivite düzeyini arttırdıklarını tespit etmişlerdir.

Yurdakul ve ark (2010) sıçanlarda 40 dk iskemi ve 1 saat reperfüzyon uyguladıkları renal İ/R hasarı çalışmalarında; Erd (oral yolla, 10 mg/kg) ve α-tocoferol'in (intraperitoneal, 10 mg/kg) kombine uygulamalarının ayrı ayrı uygulamalarına göre üstünlüklerini değerlendirmişlerdir. Erd ve α-tocoferol'in ayrı ayrı ve kombine uygulamalarında SOD enzim aktivite düzeyini arttırdıklarını tespit etmişlerdir. Aynı zamanda Erd ve α-tocoferol'in birlikte uyguladıkları kombine grupta İ/R hasarına karşı daha etkili olduklarını göstermişlerdir. Bircan ve ark. (2016) apelin hormonu uyguladıkları çalışmalarında 45 dk iskemi ve 3 saat reperfüzyon sonrası İ/R grubunda CAT, SOD ve GSH-Px aktivitelerinde diğer gruplara göre anlamlı azalma kaydetmişlerdir. Cakir ve ark. (2017) sıçanlarda sağ böbrekte nefrektomi sonrası sol böbrekte 45 dk iskemi ve 3 saat reperfüzyon uygulaması sonrası hypericum perforatum'un İ/R hasarına karşı etkilerini araştırdıkları çalışmada, SOD, CAT ve GSH-Px aktivite düzeylerinin İ/R grubuna kıyasla hypericum perforatum verdikleri grupta anlamlı şekilde artış göstererek İ/R hasarına karşı olası koruyucu etkilerini göstermişlerdir.

Bu çalışmaların verileri bizim çalışmamızın verileri ile benzerlik göstermekte olup İ/R sonrası doku CAT, SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerinin, sham grubuna kıyasla İ/R grubunda anlamlı şekilde azaldığı saptandı. Bununla birlikte deney gruplarımızda

uyguladığımız Erd ve D vitamininin, ayrı ayrı uygulamaları doku CAT, SOD ve GSH-Px enzim aktivite düzeyini anlamlı şekilde arttırmışlardır. Aynı zamanda Erd ve D vitamininin kombine uygulamaları doku CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerinin düzeyini anlamlı derecede arttırdıkları tespit edilmiş olup Erd ve D vitamininin antioksidan enzim aktivite düzeylerini arttırarak İ/R hasarına karşı koruyucu etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir.

Oksidan ve antioksidan kapasitelerinin totalde değerlendirilmesi ile oksidatif stres artışında, oksidatif stresin bir göstergesi olarak OSI değerleri hesaplanarak oksidatif hasar ile ilgili değerlendirme yapılmaktadır (Harma ve Erel 2003). Biz de çalışmamızda toplam oksidan kapasiteyi gösteren serum TOS değeri ile toplam antioksidan kapasiteyi gösteren serum TAS değerlerini inceleyerek OSI değerlerini hesapladık. Çalışmamızda sham grubuna kıyasla total oksidan kapasitenin artması ve aynı zamanda total antioksidan kapasitenin azalması neticesinde oksidatif stres indeksinin (OSI) İ/R grubunda arttığı gözlemlenmiştir. Aynı zamanda Erd, D vitamini ve kombine grupta TOS ve OSI değerlerinin anlamlı şekilde azaldığı saptandı. Gruplar arasında TAS değerini incelediğimizde Erd ve kombine grupta, İ/R grubuna kıyasla anlamlı şekilde artmış olduğu saptandı. Bununla beraber yapılan benzer çalışmaların da bulgularımızla benzerlik gösterdiğini tespit ettik (Tas ve ark. 2013, Saritas ve ark. 2014, Sancak ve ark. 2016).

İskemiye yanıt olarak gerçekleşen bir diğer olay, vücutta doku oksijenlenmesini kontrol eden Eritropoietin (EPO) artışıdır. Hipoksiyle beraber ortamda O<sub>2</sub> konsantrasyonu azaldığında böbrek peritübüler interstisyel hücrelerden EPO sentezi başlamaktadır. EPO'nun, farklı stres ve patolojik koşullar altında sitoprotektif, anti-apoptotik, anti-inflamatuar ve antioksidan fonksiyonlara sahip olduğu bilinmektedir (Yılmaz ve ark. 2015). Kiris ve ark. (2008) aortik İ/R hasarına karşı EPO'nun, MDA düzeyini azaltıp antioksidan enzimlerin aktivite düzeylerini arttırarak İ/R hasarına karşı koruyucu etki ettiklerini göstermişlerdir. Ates ve ark. (2005) 45 dk iskemi sonrası iki farklı reperfüzyon süresinde (45 dk ve 24 saat) EPO'nun renal hasara karşı koruyucu olduğunu ve bu etkisine tirozin kinaz aktivasyonunun aracılık ettiğini göstermişlerdir. Joyeux-Faure M ve ark. (2005) EPO'nun, apopitozu ve nekrozu azaltarak miyokardı, İ/R hasarına karşı koruduğunu göstermişlerdir. Sepodes ve ark. (2006) ratlarda EPO'nun oksidatif stresi azaltarak karaciğeri İ/R hasarından koruduğunu göstermişlerdir. Zhang ve ark. (2015) 30 dk iskemi

24 saat reperfüzyon ile ratlarda uyguladıkları İ/R hasarına karşı EPO'nun inflamasyonu baskılayarak İ/R hasarını önlediğini göstermişlerdir.

Çalışmamızda İ/R grubunda, sham grubuna göre EPO hormon düzeyinin anlamlı şekilde artmış olduğunu bulduk. Erd ve D vitamininin ayrı ayrı ve kombine uygulamalarının ise, EPO hormon düzeylerini önemli derecede azalttıklarını saptayarak Erd ve D vitamininin oksidatif stres durumunda, EPO düzeyini arttırmada etkisiz olduklarını saptadık.

Tıbbi literatüre göre plazma U-II düzeylerinin renal yetmezlikte, konjestif kalp yetmezliğinde, diyabette, hipertansiyonda ve portal hipertansiyonda yüksek olduğu belirtilmektedir. (Maguire ve ark. 2000, Lim ve ark. 2004, Langhman ve ark. 2004). Onat ve ark. (2012) sıçanlarda uyguladıkları deneysel akciğer fibrozisi modelinde serum U-II, TGF-β1, endotelin-1 düzeylerinde artış saptamışlardır. Tian ve ark. (2008), U-II'nin diyabette TGF-β1 upregulasyonuna yol açarak renal fibrozis ve hatta diyabetik nefropatiye sebep olabileceğini belirtmektedirler. Langhamm ve ark. (2004) ve Matsushita ve ark. (2003), U-II'nin kalpte ve böbrekte fibrotik etkilerinin olduğunu göstermişlerdir. Dai ve ark. (2007) ise U-II'nin TGF-β1 üzerinden kardiyak remodeling ve fibroziste önemli bir role sahip olduğunu ifade etmektedirler.

Çalışmamızda, sham grubuna göre diğer tüm gruplarda, U-II düzeyinin anlamlı şekilde artmış olduğunu bulduk. Erd ve D vitamininin ayrı ayrı ve kombine uygulamalarının oksidatif stres durumunda, U-II düzeylerini azaltmada herhangi bir etkileri olmadığını saptadık.

Böbrek İ/R hasarı ile ilgili yapılan deneysel çalışmalarda TGF-β1'in, MAPK sinyal iletimi ile fibronektin ekspresyonunu arttırmasına bağlı olarak böbrek hasarında inflamasyon ve fibroziste önemli bir faktör olduğu gösterilmiştir (Huwiler ve Pfeilschifter 1994, Inoki ve ark. 2000). Alan ve ark. (2010) sıçanlarda böbrekte uyguladıkları 60 dk iskemi ve 9 gün reperfüzyon hasarı sonrası İ/R grubunda TGF-β1 düzeyinin artmış olduğunu göstermişlerdir. Mary ve ark. (2012) çalışmalarında TGF-β1'in ilerleyici böbrek hastalığı ile ilişkili renal fibroziste önemli bir faktör olduğunu belirtmişlerdir. Chen ve ark. (2015) çalışmalarında apelin'in TGF-β1'i inhibe ederek akut renal hasara karşı koruyucu etkisi gösterilmiştir.

Çalışmamızda İ/R grubunda, sham grubuna göre TGF-β1 düzeyinin anlamlı şekilde artmış olduğunu saptadık. Oksidatif stres durumunda, Erd ve D vitamininin ayrı ayrı ve kombine uygulamalarının ise İ/R grubuna kıyasla TGF-β1'i önemli şekilde azalttıklarını tespit ettik.

Çalışmamızın histopatolojik incelemelerinin sonuçları değerlendirildiğinde diğer tüm gruplara kıyasla İ/R grubunda tübüler dilatasyon, tübül epitelyum hücrelerinde nükleus kaybı, vakuolik dejenerasyon, deskuamasyon ve tübüler nekroz parametrelerinin anlamlı derecede arttığı saptandı. İ/R grubu ile karşılaştırıldığında ise tedavi gruplarında bu histopatolojik parametrelerin anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi. Ancak Erd ve D vitamininin ayrı ayrı ve kombine uygulandıkları grupları kendi aralarında karşılaştırdığımızda, kombine uygulamanın ayrı ayrı uygulamaya göre herhangi bir üstünlüğü olmadığını saptadık.

Bu histopatolojik parametrelerin özellikle İ/R grubunda önemli şekilde artış göstermiş olması daha önceki çalışmalarda elde edilen histopatolojik skorlama değerleri ile paralellik göstermektedir (Walker ve ark. 2000, Erdogan ve ark. 2005, Wu ve ark. 2007, Şentürk ve ark. 2010, Sezgin ve ark. 2013, Cakır ve ark. 2017).

Çalışmamızın moleküler analizinde qRT-PCR sonucu elde edilen gen ekspresyonlarının istatistiksel verileri incelendiğinde, TRPM 6 ve 7 iyon kanallarının gen ekspresyonları sham grubu ile karşılaştırıldığında, İ/R grubunda istatistiksel olarak bir anlamlılık saptanmadı.

İskemi/reperfüzyon sürecinde kanal aktivasyonunu incelediğimizde, hücrede moleküler düzeyde ilk düzenlemenin TRPM kanal sayısının artışı şeklinde görülmektedir. Ancak reperfüzyon esnasında hücre ölümünün başlaması sebebi ile TRPM kanal ekspresyonlarının azaldığı karşımıza çıkmaktadır. Thomas ve ark. (2004) intestinal ve renal sistem üzerine yapmış oldukları çalışmalarında magnezyum akışı üzerine TRPM 6 iyon kanalının önemli rol aldığını ifade etmişlerdir. Bununla beraber Mingjiang ve ark. (2006) araştırmalarında TRPM 6 aktivitesinin artırılması ile magnezyum ve kalsiyum iyon akışında anlamlı derecede artış olduğunu bildirmişlerdir. Meng ve ark. (2012) renal İ/R hasarı ile ilgili çalışmalarında 45 dk iskemi 24 saat reperfüzyon sonrası TRPM 7 kanal ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir. Demir ve ark. (2014) miyokardiyal İ/R

çalışmalarında TRPM 6 gen ekspresyon düzeylerinin değişmediğini ancak TRPM 7 gen ekspresyon düzeyinin arttığını belirterek TRPM 7 ve miyokardiyal İ/R arasında pozitif bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir.

Araştırmamızda deney gruplarına ait TRPM 6 ve 7 gen ekspresyon analizlerinde elde ettiğimiz bulgulara göre; İ/R grubu ile karşılaştırıldığında sadece Erd ve D vitamininin birlikte uygulandıkları kombine grupta TRPM 6 kanalı gen ekspresyonunun anlamlı bir şekilde azaldığını tespit ettik.





## 6. SONUÇ

Sonuç olarak çalışmamızda böbrek iskemisi reperfüzyon modelinde ortaya çıkan hasarın, Erdosteine ve D vitamini'nin hem ayrı ayrı hem de kombine ön tedavisi ile biyokimyasal ve histopatolojik olarak düzeldiğini aynı zamanda bu duruma oksidatif stres parametrelerinin azalmasının da eşlik ettiğini tespit ettik. Bununla beraber çalışmamızın moleküler analizleri sonucunda elde ettiğimiz TRPM 6 ve 7 gen ekspresyon düzeylerinin, farklı iskemisi reperfüzyon sürelerinde yapılacak daha ileri çalışmalarla değerlendirilmesinde bulgularımızın önemli rol oynayacağı düşünülmektedir. Ayrıca çalışma sonucu elde ettiğimiz verilerin renal İ/R hasarı ile ilgili prelinik çalışmalara zemin hazırlaması açısından katkıda bulunabileceğini düşünmekteyiz.

İ/R öncesi Erdosteine, D vitamini ve bunların kombinasyon uygulamalarının, kısmi nefrektomi, renal transplantasyon, renal travmaya cerrahi müdahale gibi İ/R'ye neden olan durumlarda ortaya çıkan İ/R hasarının, önlenmesinde koruyucu etkisi olduğunu düşünmekteyiz.

## 7. KAYNAKLAR

1. **Aebi H.** Catalase In: Bergmeyer U, ed. Methods of enzymatic analysis, New York and London Academic Press, **1974**; pp.673-677.
2. **Akçay A, Nguyen Q, & Edelstein C. L.** Mediators of inflammation in acute kidney injury, *Mediators of inflammation*, **2009**.
3. **Akkoç H.** Miyokardiyal İskemi Reperfüzyon Hasarı, Dicle Tıp Dergisi, **2008**, 35 (3):211- 215.
4. **Akkuş İ.** Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları. **1995**; 157.
5. **Akkuş İ.** Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, 1.Baskı, Mimoza Yayınları, **1995**; 1-60.
6. **Alan C, Kocoglu H, Altintas R, Allci B, Ersay AR.** Protective effect of decorin on acute ischaemia-reperfusion injury in the rat kidney. *Archives of medical science: AMS*, **2011**,7(2); 211.
7. **Anafarta, K. (Ed.).** *Temel Üroloji*.Güneş Kitabevi, Ankara, **1998**.
8. **Ates E, Yalcin AU, Yilmaz S, Koken T, Tokyol C.** Protective effect of erythropoietin on renal ischemia and reperfusion injury, *ANZ journal of surgery*, **2005**, 75(12);1100-1105.
9. **Aycicek A, Erel O, Kocuyigit A.** Decreased total antioxidant capacity and increased oxidative stres in passive smoker infants and their mothers, *Pediatr Int*, **2005**; 47: 635-639.
10. **Aydoğdu N, Kaymak K VE Yalçın Ö.** Sıçanlarda böbrek iskemi/reperfüzyon hasarında nasetilsisteinin etkileri, *Fırat Tıp Dergisi*, **2005**, 10(4): 151-155.
11. **Aydoğdu N, Kaymak K, Yalçın Ö.** Effects of N-Acetylcysteine in Renal Ischemia/Reperfusion Injury in the Rats, *Fırat Tıp Derg*, **2005**; 10(4): 151-55.
12. **Bakkaloğlu S, Tümer N, Ekim M, Yalçınkaya F.** Kronik böbrek yetmezliğinde anemi ve eritropoetin kullanımı, *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, **1998**; 2: 54- 8.
13. **Balat A, Büyükelik M.** Urotensin-II: more than a mediator for kidney. *International journal of nephrology*, **2012**.
14. **Bahlmann FH, de Groot K, Haller H, Fliser D.** Erythropoietin is it more than correcting anaemia? *Nephrol Dial Transplant*, **2004**; 19:20- 2.
15. **Billings FT, Chen SW, Kim M, et al.** Alpha-2 adrenergic agonistsprotect against radiocontrast-induced nephropathy in mice, *Am J Physiol Renal Physiol.*, **2008**;295(3):741-748
16. **Bonventre JV, Yang L.** Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury, *The Journal of clinical investigation*, 2011,121(11): 4210-4221.
17. **Bonventre JV.** *Mechanisms of ischemic acute renal failure*. *Kidney Int*, **1993**, 43(5):1160-78.
18. **Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, et al.** Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice, *Endocr. Rev.*, **2008**; 29: 726 – 776.
19. **Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML.** Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species, *Sem Fetal Neonatal Med*, **2010**, 15:186-190.
20. **Cabuk M, Gurel A, Sen F, Demircan N.** Renoprotective effect of erdosteine in rats against gentamicin nephrotoxicity: a comparison of 99mTc-DMSA uptake with biochemical studies. *Molecular and cellular biochemistry*, **2008**, 308(1-2); 35-42.
21. **Cakir M, Duzova H, Baysal I, Gül CC, Kuşcu G, et al.** The effect of hypericum perforatum on kidney ischemia/reperfusion damage. *Renal Failure*, **2017**, 39(1); 385-391.
22. **Can S.** Sıçanlarda Uzun Süreli Böbrek İskemi/Reperfüzyon Hasarına Karşı Geraniol'ün Koryucu Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, **2014**.
23. **Carden DL, Granger DN.** Pathophysiology of İschaemia-Reperfusion İnjury, *The journal of pathology*, **2000**, 190: 255-266
24. **Carini R, et al.** Alterations of cell volume regulation in the development of hepatocyte necrosis. *Experimental cell research*, **1999** ; 248(1): 280-293.
25. **Cherubini A, Ruggiero C, Morand C, Lattanzio F, Dell'aquila G., et al.** Dietary antioxidants as potential pharmacological agents for ischemic stroke, *Curr Med Chem*, **2008**; 15:1236-48.
26. **Chen, Hong, et al.** "Apelin protects against acute renal injury by inhibiting TGF-β1." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1852.7 **2015**: 1278-1287.
27. **Choi ME, Yan D, Sung II Kim.** TGF-β signaling via TAK1 pathway: role in kidney fibrosis." *Seminars in nephrology*, **2012**, 32(3): WB Saunders.
28. **Choi ME.** Mechanism of transforming growth factor-beta1 signaling, *Kidney Int*, **2000**, Suppl 77: 53–58.
29. **Chung, K.W.** *Gross Anatomy*. 5. baskı, Lippincott Williams and Wilkins, United States, **2005**.

30. **Clapham DE.** TRP channels as cellular sensors. *Nature*. **2003**; 426, 517-524.
31. **Cotran RS, Kumar V, Robbins SL.** Robbins pathologic basis of disease. 4th Ed. Philadelphia. W.B. Saunders company **1995**;3-12.
32. **Coşkunfirat N, Cengiz M, Yılmaz M.** Akut böbrek yetersizliği üzerine hayvan modelleri, *Türk Yoğın Bakım Derneği Dergisi*, **2010**; 8 Suppl. 1:38-45.
33. **Çakatay U, Kayalı R.** Serbest radikal biyokimyasının tarihsel süreçteki gelişimi, *Cerrahpaşa tıp dergisi*, **2006**, 37(4): 162-167.
34. **Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T.** Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma, *Türk Nefroloji Diyaliz ve Trasplantasyon Dergisi*, **1997**, 3(4):92-95.
35. **Chubanov V, Gudermann T, Schlingmann KP.** Essential role for TRPM6 in epithelial magnesium transport and body magnesium homeostasis. *Pflugers Arch* **2005**;451:228–234
36. **Çimen V.,** *Fizyoloji-Histoloji ve Embriyoloji*. Klinisyen Tıp Kitabevleri, 6. Baskı, Ankara, **2014**, s. 274-277.
37. **Dai HY, Kang WQ, Wang X, et al.** The involvement of transforming growth factorbeta1 secretion in urotensin II-induced collagen synthesis in neonatal cardiac fibroblasts, *Regul Pept*, **2007**, 140: 88–93.
38. **De Bragança AC, Volpini RA, Mehrotra P, Andrade L, Basile DP.** Vitamin D deficiency contributes to vascular damage in sustained ischemic acute kidney injury. *Physiological reports*, **2016**, 4(13); e12829.
39. **de Bragança AC, Volpini RA, Canale D, Gonçalves JG, Shimizu MHM, et al.** Vitamin D deficiency aggravates ischemic acute kidney injury in rats. *Physiological reports*, **2015**, 3(3); e12331.
40. **De Bernardi VM.** Pharmacokinetics of erdosteine in fasting and unfasting healthy volunteers after single and oral treatments, *Medical Praxis*, **1992**; 13: 77-98.
41. **Dechant K, Noble S.** Erdosteine, *Drugs*, **1996**; 52: 875-881.
42. **Demir S, Erden M.** Pentoxifylline and N-acetylcysteine in hepatic ischemia/reperfusion injury, *Clinica Chimica Acta*, **1998**, 275(2): 127-135.
43. **Dere F.** *Anatomi Atlası ve Ders Kitabı*.6. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, Adana, **2010**.
44. **Drake R. L., Vogl W., Mitchell A. W. M.** *Gray's Tıp Fakültesi Öğrenciler için Anatomi*.2. Baskı, Güneş Kitabevi, Ankara, **2011**, s. 320-324.
45. **Droge W.** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.*, **2002**, 82(1):47-95.
46. **Duncan LM, Deeds J, Hunter J, Shao J, Holmgren LM, et al.** Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res*, **1998**;58:1515–1520.
47. **Durak I, Yurtaslan Z, Canbolat O, Akyol O.** A methodological approach to superoxide dismutase (SOD) activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction, *Clin Chim Acta*, **1993**, 214:103-104.
48. **Elenkov IJ, Chrousos GP.** Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines and autoimmunity, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **2002**;966:290-303.
49. **Eltzschig HK, Collard CD.** Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull*, **2004**; 70:71- 86.
50. **Erdogan H, Fadillioglu E, Yagmurca M, Uçar M, Irmak MK.** Protein oxidation and lipid peroxidation after renal ischemia-reperfusion injury: protective effects of erdosteine and N-acetylcysteine, *Urol. Res.*, **2006**, 34; pp. 41–46
51. **Erel O.** A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status, *Clinical Biochemistry*, **2005**; 9:1-9.
52. **Erel O.** A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation, *Clinical Biochemistry*, **2004**; 37:277-285
53. **Erel O.** A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status, *Clin Biochem*, **2005**;38(12):1103-11.
54. **Ergun K. M., Hayran M.** *Anatomi*.1. Baskı, MN Medikal & Nobel Tıp Kitabevi, Ankara, **2014**, s. 465-470.
55. **Eric P. Widmaier, Hershel Raff, Kevin T. Strang.** *Vander's Human Physiology: The Mechanisms of Body Function*. 13th Edition, Mc Graw Hill, **2014**, s. 491-494.
56. **Facundo HT, De Paula JG, Kowaltowski AJ.** Mitochondrial Atp-Sensitive K<sup>+</sup> Channels Are Redox-Sensitive Pathways That Control Reactive Oxygen Species Production, *Free Radic Biol Med.*, **2007**, 1;42(7):1039-48.
57. **Fadillioglu E, Erdogan H, Sogut S, Kuku I.** Protective effects of erdosteine against doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *J Appl Toxicol* **2003**, 200; 23(1): 71-74.
58. **Frangogiannis NG.** Chemokines in ischemia reperfusion, Trombosis and Haemostasis-Stuttgart, **2007**, 97(5):738-747.

59. **Friedewald JJ, Rabb H.** Inflammatory cells in ischemic acute renal failure, *KidneyInt.*, **2004**, 66(2): 486-491.
60. **Gao S, Oh YB, Park BM, Park WH, Kim SH.** Urotensin II protects ischemic reperfusion injury of hearts through ROS and antioxidant pathway. *Peptides*, **2012**, 36(2); 199-205.
61. **García-Villalón AL, Amezcua YM, Monge L, Fernández N, Salcedo A, et al.** Endothelin-1 potentiation of coronary artery contraction after ischemia-reperfusion. *Vascul Pharmacol*, **2008**; 48:109-14.
62. **Gazzani G, Fregnan GB, Vandoni G.** In vitro protection by erdoesteine against oxidative inactivation of alpha-1- anti-trypsin by cigarette smoke. *Respiration*, **1989**; 55: 113-118
63. **Glennville J.** Expanding role for vitamin D in chronic kidney disease: importance of blood 25-OH-D levels and extra-renal 1 $\alpha$  -hydroxylase in the classical and nonclassical actions of 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D3. *Seminars in Dialysis*, **2007**; 20:316-324.
64. **Goligorsky MS, Sergey VB, Eisei N.** Nitric oxide in acute renal failure: NOS versus NOS, *Kidney International*, **2002**, 61(3): 855-861.
65. **Gonullu E, Ozkardesler S, Kume T, Duru LS, Akan M, et al.** Comparison of the effects of dexmedetomidine administered at two different times on renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, **2014**, 64(3); 152-158.
66. **Govinden R, Bhoola KD.** Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor -beta, *Pharmacol Ther.*, **2000**;98:257 -65.
67. **Guyton AC, Hall JE.** *Textbook of Medical Physiology*. Urine Formation by the Kidneys: Glomerular Filtration, Renal Blood Flow and Their Control. 12. edition, Philadelphia: WB Saunders company, **2011**, s.303-319.
68. **Gutteridge JM.** Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage, *Clinical Chemistry*, **1995**, 41(12): 1819-28.
69. **Günaydın B, Çelebi H.** Genel Anesteziklerin Serbest Radikaller ve Antioksidanlarla İlişkileri, *Anestezi Dergisi* **2003**; 11 (2):87-98.
70. **Halliwell B.** Drug antioxidant effects a basis for drug selection, *Drugs*, **1991**, 42:569- 605.
71. **Halliwell B, Gutteridge JM.** Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage, *Lancet*, **1984**, p. 8411, 1095.
72. **Harma M, Erel O.** Increased oxidative stress in patients with hydatidiform mole. *Swiss Med Wkly* **2003**; 133(41- 42):563-6.
73. **Hammouda A. e.-R, Khalil MM, ve Salem A.** Lipid peroxidation products in pleural fluid for separation of transudates and exudates, *Clin Chem*, **1995**, 41(9): 1314-1315.
74. **Hecquet CM, Ahmmed, Gias U.; Vogel, Stephen M.; Malik, Asrar B.** Role of TRPM2 Channel in Mediating H2O2-Induced Ca<sup>2+</sup> Entry and Endothelial Hyperpermeability, **2007**.
75. **Hellberg PO, Kallskog OT, Ojteg G, Wolgast M.** Peritubular capillary permeability and intravascular RBC aggregation after ischemia: effects of neutrophils, *Am J Physiol.*, **1990**, 258(4 Pt 2):F1018-1025.
76. **Holick MF.** Chapter 3: Photobiology of vitamin D. In: Feldman D, Pike JW, Glorieux FH (eds). *Vitamin D*, 2nd Edition. New York: Elsevier Academic Press, **2005**:37-46.
77. **Holick MF.** Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *The American journal of clinical nutrition*, **2004**, 80(6); 1678S-1688S.
78. **Hollis BW.** Chapter 58: Detection of vitamin D and its major metabolites. In: Feldman D, Pike JW, Glorieux FH (eds). *Vitamin D*, 2nd Edition. New York: Elsevier Academic Press, **2005**:931-950.
79. **Homer -Vanniasinkam S, Crinnion JN, Gough MJ.** Post-ischaemic organ dysfunction: a review. *European journal of vascular and endovascular surgery*, **1997**, 14(3):195-203.
80. **Houghton LA, Vieth R.** The case against ergocalciferol (vitamin D2) as a vitamin supplement. *American Journal of Clinical Nutrition*, **2006**; 84: 694-697.
81. **Huet F, Gouyon JB, Guignard JP.** *Prevention of hypoxemia-induced renal dysfunction by perindoprilat in the rabbit*, *Life Sciences*, **1997**, 61(22): 2157-65.
82. **Huwiler A, Pfeilschifter J.** Transforming growth factor beta 2 stimulates acute and chronic activation of the mitogen-activated protein kinase cascade in rat renal mesangial cells, *FEBS Lett*, **1994**, 354: 255-258.
83. **İşık A, Selek Ş.** Total Antioxidant Response and Oxidative Stress in Patients with Behçet's Disease, *F. Ü. Sağ. Bil. Derg.*, **2006**;20(6):415-421.
84. **İşık A, Selek Ş.** Total Antioxidant Response and Oxidative Stress in Patients with Rheumatoid Arthritis, *F. Ü. Sağ. Bil. Derg.*, **2007**;21(2):67-73.

85. **Inglesi M, Nicola M, Fregnan G, Bradamante S, Pagani G.** Synthesis and free radical scavenging properties of the enantiomers of erdosteine, *Farmaco*, **1994**; 40: 703-708
86. **Jennings RB, Reimer KA.** The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med* **1991**, 42: 225-246
87. **Juqueria L.C., Carnerio J., Kelley R.O.** *Temel Histoloji*. 8. Baskı, Barış Kitabevi/Appleton&Lange, İstanbul, **1998**, s. 360-377.
88. **Juul SE.** Nonerythropoietic roles of erythropoietin in the fetus and neonate, *Clin Perinatol.*, **2000**, 27(3):527-41.
89. **Jones G, Strugnell SA, DeLUCA HF.** Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiological reviews*, **1998**, 78(4): 1193-1231.
90. **Joyeux-Faure M, Godin-Ribuot D, Ribuoat C.** Erythropoietin and myocardial protection: what's new? *Fundam Clin Pharmacol.* **2005**, 19(4): 439- 46.
91. **Kandilci HB, Gümüsel B.** Akciğerlerde iskemi-reperfüzyon hasarı ve iskemik önkoşullama, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, **2005**, 25:35-49.
92. **Kapan Ş, Kiriş İ, Kılbaş A, Altuntaş İ, Karahan N, et al.** Eritropoietinin sıçan aortik iskemi reperfüzyonunda akciğer hasarı üzerine etkisi, *Turkish J Thorac Cardiovasc Surg.*, **2009**,17; 110-116
93. **Karihtala P, Soini Y.** Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies, *APMIS*, **2007**; 115:81-103.
94. **Kim HW, Park CW, Shin YS, et al.** Calcitriol regresses cardiac hypertrophy and QT dispersion in secondary hyperparathyroidism on hemodialysis. *Nephron Clin Pract*, **2006**; 102:c21–c29.
95. **Kiris I, Kapan S, Kılbas A, Yılmaz N, Altuntas I, et al.** The protective effect of erythropoietin on renal injury induced by abdominal aortic-yschemia-reperfusion in rats. *J Surg Res.* **2008**;149:206–13.
96. **Knights KR, Angel MF, Lepore DA, Abbey PA, Arnold LI, et al.** Secondary ischaemia in rabbit skin flaps: the roles played by thromboxane and free radicals, *Clinical Science*, **1991**, 80(3):235-240.
97. **Köylü H.** *Klinik Anlatımlı Tıbbi Fizyoloji*. Nobel Tıp Kitabevleri. 2. baskı, İstanbul, **2016**, s. 283-312.
98. **Kumar V, Cotran R, Robbins SL.** *Basic Pathology*. 6th edition **2000**; p: 6-10, 30-36
99. **Kukan M.** Emerging roles of proteasomes in ischemia-reperfusion injury of organs, *J Physiol Pharmacol*, **2004**; 55: 3-15.
100. **Lameire NH, Vanholder R.** Pathophysiology of ischaemic acute renal failure, *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, **2004**, 18(1): 21–36.
101. **Langham RG, Kelly DJ, Gow RM, et al.** Increased expression of urotensin II and urotensin II receptor in human diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis*, **2004**;44:826–831.
102. **Lee JY, Kim HS, Park CS, Kim MC.** Erdosteine in renal ischemia-reperfusion injury: an experimental study in pigs. *J Vet Med Sci.* **2010**;72(1):127-30.
103. **Legrand M, Mik EG, Johannes T, Payen D, Ince C.** Renal Hypoxia and Dysoxia After Reperfusion of the Ischemic Kidney, *Molmed*, **2008**; 14 (7-8), 502-516.
104. **Li C, Jackson RM.** Reactive Species Mechanisms of Cellular Hypoxia-Reoxygenation Injury, *Cell Physiology - American Journal of Physiology*, **2002**, 282:227-241.
105. **Lim M, Honisett S, Sparkes CD, et al.** Differential effect of urotensin II on vascular tone in normal subjects and patients with chronic heart failure, *Circulation*, **2004**;109:1212–1214.
106. **Lehner U, Velić A, Schröter R, Schlatter E, Sindić A.** Ligands and signaling of the G-protein-coupled receptor GPR14, expressed in human kidney cells, *Cellular Physiology and Biochemistry*, **2007**, 20(1): pp. 181–192.
107. **Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP.** Orphanreceptor ligand human urotensin II: receptor localization human tissues and comparison of vasoconstrictor responses with endothelin-1, *British Journal of Pharmacology*, **2000**, 131(3): 441–446.
108. **Marieb EN., Hoehn K.** *Human Anatomy&Physiology*. Urinary System: Kidney Anatomy, 10th edition, Pearson Education, **2013**, s. 963-964
109. **Manson PN, Anthenelli RM, Im MJ, Bulkley GB, Hoopes JE.** The role of oxygen-free radicals in ischemic tissue injury in island skin flaps, *Annals of surgery*, **1983**, 198(1):87-90.
110. **Matsushita M, Shichiri M, Fukai N, Ozawa N, et al.** Urotensin II is an autocrine/paracrine growth factor for the-porcine renal epithelial cell line, LLCPK1, *Endocrinology*, **2003**, 144: 1825–1831.
111. **Memişoğulları R.** Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi, *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, **2005**, 3:30-39.
112. **Meng, Z., Wang, X., Yang, Z., & Xiang, F.** Expression of transient receptor potential melastatin 7 up-regulated in the early stage of renal ischemia-reperfusion. In *Transplantation proceedings*, **2012**, 44(5):1206-1210.

113. **Mescher AL.** *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas*. 12th Edition: <http://www.accessmedicine.com/> The McGraw-Hill Companies, **2009**.
114. **Mickle DA, Weisel RD.** Future directions of vitamin E and its analogues in minimizing myocardial ischemia-reperfusion injury, *Can J Cardiol*, **1993**; 9:89-93.
115. **Miller BA.** The role of TRP channels in oxidative stress-induced cell death. *J. Membr. Biol.* **2006**, 209: 31-41.
116. **Montalvo-Jave, Eduardo E, et al.** Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury, *Journal of Surgical Research*, **2008**, 147(1): 153-159.
117. **Montell C.** The TRP superfamily of cation channels, *Science Signaling*, **2005**, 272 (2005): re3-re3.
118. **Monsinjon T, Richard V, Fontaine M.** Complement and its implications in cardiac ischemia/reperfusion: strategies to inhibit complement. *Fundamental & clinical pharmacology*, **2001**, 15(5): 293-306.
119. **Moore KL.** *Clinically Oriented Anatomy*. 3. baskı, T. Satterfield, ed., Baltimore, Md: Williams & Wilkins **1992**, s.127-242.
120. **Moore KL, Persaud TVN.** *Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi*. 6. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, **2002**, s. 304-310.
121. **Munger JS, Harpel JG, Gleizes PE, Mazziere R, Nunes I, ve ark.** Latent transforming growth factor -beta: structural features and mechanisms of activation, *Kidney Int.*, **1997**;51:1376 -82.
122. **Niki E.** Antioxidants in relation to lipid peroxidation, *Chem Phys Lipids*, **1987**,44(6): 227-253.
123. **Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA.** Transient Receptor Potential cation channels in disease. *Physiol Rev.* **2007**, 87; 165-217.
124. **Orrenius S, Burkitt MJ, Kass GE, Dybukt JM, Nicotera P.** Calcium ions and oxidative cell injury, *Ann Neurol*, **1992**; 32 Suppl: 33-42
125. **Ozcan O, Erdal H, Yonden Z.** İskemi-Reperfüzyon Hasarı ve Oksidatif Stress İlişkisine Biyokimyasal Bakış, *Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi*, **2015**; 6(23).
126. **Onan D, Hannan RD, Thomas WG.** Urotensin II: the old kid in town, *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **2004**, 15( 4):175-182.
127. **Onat M, Turkbeyler IH, Pehlivan Y, Demir T, et al.** The efficiency of a urotensin II antagonist in an experimental lung fibrosis model, *Inflammation*, **2012**, 35(3):1138-43.
128. **Özbey İ, Ziypak T, Adanur Ş.** Vitamin D ve üreme sistemi. *Türkiye Klinikleri J Pediatr Sci*, **2012**; 8: 134-7.
129. **Özdamar MY, Yurtçu M, Toy H, Aköz M, Günel E.** Renal iskemide reperfüzyon hasarında üzüm çekirdeği proantosiyanidin ekstresinin etkisi, *Genel Tıp Dergisi*, **2010**;20(1):1-5.
130. **Özgül C, Nazıroğlu M.** Nörolojik Hücrelerde TRPM2 Katyon Kanallarının Moleküler Mekanizmalardaki Roller; *Journal of Experimental and Clinical Medicine, Derleme*, **2010**.
131. **Özlülerden Y, Toktaş C, Aybek H, Küçükataş V, Şen TN, et al.** The renoprotective effects of mannitol and udenafil in renal ischemia-reperfusion injury model. *Investigative and Clinical Urology*, **2017**, 58(4); 289-295.
132. **Pacher P, Nivorozhkin A, Szabo C.** Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacological reviews*, **2006**, 58(1):87-114.
133. **Paglia DE, Valentine WN.** Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase, *J Lab & Clin Med*, **1967**, 70:158-169.
134. **Paramalingam SS, Thumboo J, Vasoo S, Thio ST, Tse C, Fong KY.** In vivo pro- and anti-inflammatory cytokines in normal and patients with rheumatoid arthritis, *Ann Acad Med Singapore*, **2007**;36:96 -9
135. **Park CW, Oh YS, Shin YS, et al.** Intravenous calcitriol regresses myocardial hypertrophy in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *Am J Kidney Dis*, **1999**; 33:73-81.
136. **Parks DA, Williams TK, Beckman JS.** Conversion of Xanthine Dehydrogenase to Oxidase in Ischemic Rat Intestine: A Reevaluation, *American Journal of Physiology*, **1988**, 254: 768-774.
137. **Parks DA, Granger DN.** Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **1986**, 250(6):749-753.
138. **Pearson D, Shively JE, Clark BR.** Urotensin II: a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1980**, 77(8 1): 5021-5024.
139. **Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B.** TRP channels: an overview, *Cell Calcium*, **2005**;38:233-252.
140. **Prosser DE, Jones G.** Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends in Biochem Sci*, **2004**; 29:664-673.

141. **Proulx CD, Holleran BJ, Lavigne P, Escher E, et al.** Biological properties and functional determinants of the urotensin II receptor, *Peptides*, **2008**, 29(5): pp. 691–699.
142. **Rasoulia B, Jafari M, Noroozadeh A, Mehrani H, Wahhah-Aghai H, et al.** Effects of Ischemia-Reperfusion on Rat Renal Tissue Antioxidant Systems and Lipid Peroxidation, *Acta Medica Iranica*, **2008**, 46(5): 353-360
143. **Reiter RJ.** Oxidative processes and antioxidant defense mechanisms in the aging brain, *FASEB J*, **1995**; 9:526-33.
144. **Robinson JM.** Phagocytic leukocytes and reactive oxygen species. *Histochem Cell Biol.*, **2009**, 131 (4); 465-469.
145. **Robbins SL, Kumar V, Cotran RS.** *Temel Patoloji*, 2. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., İstanbul, **1995**.
146. **Sadler TW.** *Langman's Medical Embryology*. 12 th . Ed., Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, **2012**. s.232-236.
147. **Sargon M.F.** *Anatomi Akıl Notları*. Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara, **2016**, s. 267-270.
148. **Saritas A, Kandis H, Baltacı D, Yildirim U, Kaya H, et al.** N-Acetyl cysteine and erdosteine treatment in acetaminophen-induced liver damage. *Toxicology and industrial health*, **2014**, 30(7); 670-678.
149. **Sancak EB, Akbas A, Silan C, Cakir DU, Turkon H, et al.** Protective effect of syringic acid on kidney ischemia-reperfusion injury. *Renal failure*, **2016**, 38(4), 629-635.
150. **Saygın M, Nazıroğlu M.** TRPM2 Katyon kanallarının aktivasyonunda rol oynayan moleküler mekanizmalardaki son gelişmeler. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*. **2010**; 27 : 42-45
151. **Senturk H, Kabay S, Bayramoglu G, Ozden H, Yaylak F et al.** Silymarin attenuates the renal ischemia/reperfusion injury-induced morphological changes in the rat kidney, *World journal of urology*, **2008**, 26(4):401-407.
152. **Seif AA, Abdelwahed DM.** Vitamin D ameliorates hepatic ischemic/reperfusion injury in rats. *Journal of physiology and biochemistry*, **2014**, 70(3); 659-666.
153. **Sepodes M, Maio R, Pinto R, Sharples E, Oliveira P, et al.** Recombinant human erythropoietin protects the liver from hepatic ischemia reperfusion injury in the rat. *Transpl int*, **2006**;19(11): 919- 26.
154. **Serizawa A, Nakamura S, Suzuki, et al.** Gnvovement of platelet activating for in cytokine producion and neutrophil activation after hepatic ischemia reperfusion. *Hepatology* **1996**;23:1656-1663.
155. **Sezgin G, Öztürk G, Güney Ş, Sinanoğlu O, Tunçdemir M.** Protective effect of melatonin and 1, 25-dihydroxyvitamin D3 on renal ischemia–reperfusion injury in rats. *Renal failure*, **2013**, 35(3); 374-379.
156. **Siemionow M, Arslan E.** İschemia/reperfusion injury: a rewiw in relation to free tissue transfers, *Microsurgery*, **2004**; 24(6): 468-475.
157. **Sirmali M, Uz E, Sirmali R, Kilbaş A, Yilmaz HR, et al.** Protective effects of erdosteine and vitamins C and E combination on ischemia-reperfusion-induced lung oxidative stress and plasma copper and zinc levels in a rat hind limb model, *Biol Trace Elem Res.*, **2007**;118:43–52.
158. **Singh I.** *Human Histology*. 6. baskı, Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd, India, **2011**, s. 274-289.
159. **Sinanoglu O, Sezgin G, Ozturk G, Tuncdemir M, et al.** Melatonin with 1, 25-dihydroxyvitamin D3 protects against apoptotic ischemia–reperfusion injury in the rat kidney. *Renal failure*, **2012**, 34(8); 1021-1026.
160. **Sharfuddin AA, Molitoris BA.** Pathophysiology of ischemic acute kidney injury, *Nat Rev Nephrol.*, **2011**, 7 (4); 189-200.
161. **Sharples EJ, Yaqoob MM.** Erythropoietin and acute renal failure, *Semin Nephrol.*, **2006**, 26(4):325-31.
162. **Shenouda A, Douglas SA, Ohlstein EH, Giaid A.** Localization of urotensin-II immunoreactivity in normal human kidneys and renal carcinoma, *J Histochem Cytochem*, **2002**;50:885–889.
163. **Song W, Abdel-Razik AES, Lu W, et al.** Urotensin II and renal function in the rat, *Kidney International*, **2006**, 69(8):1360–1368.
164. **Sturiale A, Campo S, Crasci E, Aloisi C, Buemi M.** Experimental models of acute renal failure and erythropoietin: what evidence of a direct effect? *Ren Fail.*, **2007**, 29(3):379-86.
165. **Stockmann C, Fandrey J.** Hypoxia-induced erythropoietin production: a paradigm for oxygen-regulated gene expression. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, **2006**; **33(10)**:968-79.
166. **Sun Y, Oberley LW, Ying L.** A simple method for clinical assay of superoxide dismutase, *Clin Chem* **1988**, 34:497-500.

167. Supavekin S, Zhang W, Kucherlapati R, Kaskel FJ, Moore LC ve ark. Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion, *Kidney international*, **2003**, 63(5). 1714-1724.
168. Suzuki M, Asako H, Kubes P, Jennings S, Grisham MB, Granger DN. Neutrophil derived oxidants promote leukocyte adherence in postcapillary venules. *Microvasc Res* **1991**; 42: 125-138.
169. Stadler M, Nuyens V, Boogaerts JG. Intralipid Minimizes Hepatocytes Injury After Anoxia-Reoxygenation in An Ex Vivo Rat Liver Model, *Nutrition*, **2007**, 23(1): 53-61.
170. Şeftalioğlu A. *Medikal Embriyoloji*. 3. Baskı, Tıp&Teknik yayını, **1998**. s.327-335.
171. Şehirli Ö, Özel Y, Dulundu E, Topaloglu U, Ercan F ve ark. Grape seed extract treatment reduces hepatic ischemia-reperfusion Injury in rats. *Phytother. Res.* **2008**, 22: 43-48.
172. Şehirli AO. Renal İskemi/Reperfüzyon Hasarında Melatonin'in Koruyucu Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, T.C. Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, **2001**.
173. Şener G, Yeğen, BÇ. İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Klinik Gelisim.* **2009**, 22 (3) 5-13.
174. Şentürk H, Kolankaya D, Şahin Y. Renal İskemi-Reperfüzyonu Sırasında Sıçan Böbreğinde Oluşan Oksidatif Stres Hasarına Silimarin Etkisi, *Cankaya University Journal of Science and Engineering*, **2010**, 7(1).
175. Tas HA, Toprak G, Akkoc H, Evliyaoglu O, Ozekinci S, et al. Oxytocin ameliorates remote liver injury induced by renal ischemia-reperfusion in rats. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, **2013**, 17(2); 169-173.
176. Teke Z, Kabay B, Özden A. İskemi-reperfüzyon hasarının patofizyolojisi, *Pam Tıp Derg.*, **2008**; 1, 65-72.
177. Titti G, Lizzio A, Temrini C, Negri P, Fazio S, Mancini C. A controlled multicenter pediatric study in the treatment of acute respiratory tract diseases with the aid of a new specific compound, erdosteine. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* **2000**; 38(8):402-7.
178. Todisco T, Polidori R and Rossi F. Effect of N-acetylcysteine in subjects with slow pulmonary mucociliary clearance, *Eur J Respir Dis*, **1985**, 139: 136-141.
179. Tong F, Tang X, Luo L, Li X, Xia W, Lu C, Liu D. Sustained delivery of insulin-loaded block copolymers: Potential implications on renal ischemia/reperfusion injury in diabetes mellitus. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **2017**, 91, 534-545.
180. Totsune K, Takahashi K, Arihara Z, et al. Role of urotensin II in patients on dialysis, *Lancet*, **2001**, 358(9284): 810–811.
181. Tutanc M, Arica V, Yilmaz N, Nacar A, Zararsiz I, et al. Effects of erdosteine on cyclosporin-A-induced nephrotoxicity, *Human & Experimental Toxicology*, **2012**, 31 (6); 565-573.
182. Tümay A. Retinitis Pigmentosa'da Serbest Radikallerin Rolü. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, **2010**.
183. Udassin R, Vromen A, Haskell Y. The time sequence of injury and recovery following transient reversible intestinal ischemia. *J Surg Res* **1994**; 56: 221-25.
184. Ugurel V, Cicek AC, Cemek M, Demirtas S, Kocaman AT, et al. Antioxidant and antiapoptotic effects of erdosteine in a rat model of ovarian ischemia-reperfusion injury. *Iranian journal of basic medical sciences*, **2017**, 20(1); 53
185. Valerie CS, Sanders T. *Essentials of Anatomy and Physiology*. 7. baskı, F.A. Davis Company, Philadelphia, **2014**, s.464.
186. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, **2006**; 160:1-40.
187. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* **2007**; 39: 44-84.
188. Voets T, Nilius B, Hoefs S, van der Kemp AW, Droogmans G, et al. TRPM6 forms the Mg<sup>2+</sup> influx channel involved in intestinal and renal Mg<sup>2+</sup> absorption. *J Biol Chem* **2004**; 279:19–25.
189. Walker LM, Walker PD, Imam SZ, Ali SF, Mayeux PR. Evidence for Peroxynitrite Formation in Renal Ischemia-Reperfusion Injury: Studies with the Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibitor-L-N 6-(1-Iminoethyl) lysine, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **2000**, 295(1): 417-422.
190. Webb ML, Meek TD. Inhibitors of endothelin. *Med Res Rev* **1997**; 17:17-67.
191. Welbourn CRB, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, et al. *Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil*. *British Journal of Surgery*, **1991**, 78(6): 651-655.
192. Weight SC, Bell PRF, Nicholson ML. Renal ischaemia-reperfusion injury, *British Journal of Surgery*, **1996**, 83(2): 162-170.



193. **Wilhelm J.** Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. *Acta Univ Carol Med Monogr* **1990**, 137: 1-53.
194. **Williams P, Lopez H, Britt D, et al.** Characterization of renal ischemia-reperfusion injury in rats, *J Pharmacol Toxicol Methods*, **1997**;37:1.
195. **Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S.** PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **2007**; 27:2514-23.
196. **Wu L, Gokden N, and Mayeux PR.** Evidence for the role of reactive nitrogen species in polymicrobial sepsis-induced renal peritubular capillary dysfunction and tubular injury, *Journal of the American Society of Nephrology*, **2007**, 18(6): 1807-1815.
197. **Yang CW, Li C, Jung JY, Shin SJ, Choi BS, et al.** Preconditioning with erythropoietin protects against subsequent ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *FASEB J.*, **2003**, 17(12):1754-5.
198. **Yang YY, Lin HC, Lee WC, Huang YT, Hou MC, et al.** Plasma erythropoietin level in patients with cirrhosis and its relationship to the severity of cirrhosis and renal function. *Gastroenterol Hepatol*. **2003**;18(10): 1156- 61.
199. **Yapca OE, Borekci B, Suleyman H.** Ischemia-Reperfusion Damage, *The Eurasian Journal of Medicine*, **2013**, 45: 126-127.
200. **Yazihan N.** Renal İskemi Reperfüzyon Hasarında Eritropoietinin Koruyucu Etkisine K-ATP Kanallarının Katılımı. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, 2007.
201. **Yilmaz TU, Yazihan N, Dalgic A, Kaya EE, Salman B, et al.** Role of ATP-dependent K channels in the effects of erythropoietin in renal ischaemia injury, *The Indian journal of medical research*, **2015**, 141(6); 807.
202. **Yılmaz M, Yılmaz N.** D Vitamininin beyindeki rolü ve ilişkili nörolojik hastalıklar. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, **2013**; 4: 411-415.
203. **Younes M, Siegers CP.** Interrelation between lipid peroxidation and other hepatotoxic events, *Biochem Pharmacol*, **1984**, 33: 2001–2003.
204. **Yu BP, Chung HY.** Adaptive mechanisms to oxidative stress during aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, **2006**; 127(5):436-443.
205. **Yurdakul T, Kulaksizoglu H, Pişkin MM, Avunduk MC, Ertemli E, et al.** Combination antioxidant effect of  $\alpha$ -tocopherol and erdosteine in ischemia–reperfusion injury in rat model. *International urology and nephrology*, **2010**, 42(3); 647-655.
206. **Zhang J, Zou YR, Zhong X, Deng HDF, Pu L, et al.** Erythropoietin pretreatment ameliorates renal ischaemia-reperfusion injury by activating PI3K/Akt signalling, *Nephrology*, **2015**, 20(4); 266-272.
207. **Zimmerman BJ, and Granger DN.** *Reperfusion injury*. *Surg Clin North Am*, **1992**;72(1): p. 65-83.

## ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Hatay’da doğdu. 2004 yılında Dokuz Eylül Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2009 yılında mezun oldu. 2012 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Fizyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2013 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı’na Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) ile araştırma görevlisi olarak atandı. 2013 yılından beri Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak görevine devam etmektedir.

