



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
BEZMİÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL İSKEMİ REPERFÜZYON MODELİ OLUŞTURULAN VE
PARSİYEL NEFREKTOMİ YAPILAN SIÇANLARDA SAFLAŞTIRILMIŞ
MİKRONİZE FLAVONOİD FRAKSİYONU'NUN RENAL İSKEMİ REPERFÜZYON
HASARINA KORUYUCU ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr.Sina KARDAŞ
Üroloji Anabilim Dalı

TEZ DANIŞMANI
Öğr. Gör. Dr. Cevper ERSÖZ

İSTANBUL – 2016

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL İSKEMİ REPERFÜZYON MODELİ OLUŞTURULAN VE
PARSİYEL NEFREKTOMİ YAPILAN SIÇANLARDA SAFLAŞTIRILMIŞ MİKRONİZE
FLAVONOİD FRAKSİYONU'NUN RENAL İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINA
KORUYUCU ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Sina KARDAŞ
Üroloji Anabilim Dalı

TEZ DANIŞMANI
Öğr. Gör. Dr. Cevper ERSÖZ

Bu araştırma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi tarafından desteklenmiştir.

İSTANBUL - 2016

TEŞEKKÜR

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Rektörü sayın Prof. Dr. Rümeyza Kazancıoğlu'na, Tıp Fakültesi Dekanı ve Üroloji Anabilim Dalı Başkan Vekili Prof. Dr. Dilek Sema ARICI'ya, bizlere sağladıkları imkan ve asistan eğitimine verdikleri önem için çok teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimimin önemli bir kısmını birlikte geçirdiğim, hem mesleki hem de sosyal açıdan çok değerli kazanımlar elde etmemi sağlayan, eğitime olan aşk ve şevklerini bizlere de aşılayan, asistanı olmaktan mutluluk duyduğum değerli hocalarım Prof. Dr. Şinasi Yavuz Önel ve Prof. Dr. Abdullah Armağan'a teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Uzmanlık eğitime ve tıp eğitime verdikleri önemi her yaptıklarıyla gösteren, kısa çalışma süresi içerisinde bilgi ve tecrübelerinden istifade etme fırsatı bulduğum, farklı bakış açılarıyla fikir dünyamın gelişmesine katkı sağlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Mevlana Derya Balbay ve Prof. Dr. Ali İhsan Taşçı'ya teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Ben asistanlığa başladığımda tezini bitirmek üzere olan, bugün ise benim tez danışmanım olan ve asistanlığa başladığım ilk günden bugüne desteğini hiç esirgemeyen değerli abim Op. Dr. Cevper Ersöz'e, tez hazırlama sürecinde değerli katkıları bulunan Prof.Dr. Abdurrahim Koçyiğit'e, Dr. Eray Metin Güler'e, Uzm. Dr. Nurcan Ünver'e teşekkür ederim.

Asistanlık gibi zor bir süreçte mutlu, huzurlu ve samimi bir çalışma ortamında çalışmamı sağlayan, eğitimimde büyük katkıları bulunan ve her biri farklı bir ufuk olan değerli abilerim Doç. Dr. Abdulkadir Tepeler'e, Doç. Dr. Tolga Akman'a, Doç. Dr. Mesrur Selçuk Sılay'a, Yrd. Doç. Dr. Habib Akbulut'a, Op. Dr. Muzaffer Akçay'a, Op. Dr. Senad Kalkan'a, Op. Dr. Abdullah İlkaç'a ve Op. Dr. Fatih Gevher'e teşekkür ederim.

Zorlu ve yoğun mesaimizde birbirimize dayanak olduğumuz, bu ekibin bir parçası olmaktan ve acısıyla tatlısıyla asistanlık sürecini birlikte yaşamış olmaktan mutlu olduğum, değerli abilerim Op. Dr. M.Remzi Erdem’e, Op. Dr.İsmail Başıbüyük’e, Op. Dr. Fatih Elbir’e ve kardeşlerim Dr. Muhammed Tosun’a, Dr. Yunus Kayalı’ya ve Dr. Seyidali Hamidli’ye teşekkür ederim.

Hekimlik mesleğini seçmemde ve bu seviyeye gelmemde şüphesiz en fazla emeği geçen, her zaman yanımda olan, yol gösteren, hiçbir fedakarlıktan geri durmayan canım annem Zülfiye Kardaş ve babam Ömer Kardaş’a çok teşekkür ederim.

Mesleğimin zorlu şartları karşısında en çok etkilenen olmasına rağmen sevgisini, desteğini cömertçe gösteren, başarılı olmam için çabalayan, beni hep düşündüğünü bildiğim, düşünceli ve kıymetli eşim Sibel’e ve en büyük moral ve motivasyon kaynağım, mutluluğum, tez zamanda baba demesini beklediğim, evladım Ömer Yusuf’a teşekkürlerimi sunarım.

Sina KARDAŞ

ÖZET

Deneyisel İskemi Reperfüzyon Modeli Oluşturulan ve Parsiyel Nefrektomi Yapılan Sıçanlarda Saflaştırılmış Mikronize Flavonoid Fraksiyonu'nun Renal İskemi Reperfüzyon Hasarına Koruyucu Etkisi

Amaç: Parsiyel nefrektomi 4cm altı böbrek tümörlerinde standart tedavi yöntemidir. Bu cerrahi işlemde esas olarak iki stres faktörü doku ablasyonu ve iskemi-reperfüzyonudur(İ-R). Bu çalışmada, saflaştırılmış mikronize flavonoid fraksiyonu (SMFF)'nin soliter böbrekte ve bilateral böbrekte yapılan parsiyel nefrektomi olgularında I-R hasarı üzerine koruyucu etkisini incelemeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 200–250 gr ağırlığında 8 haftalık 48 adet erkek Sprague-Dawley türü ratlar soliter böbrek modeli oluşturulan (1.- 2. ve 3. Gruplar) ve soliter böbrek modeli oluşturulmayan bilateral böbrekli (4.- 5. ve 6. Gruplar) ratlardan oluşan 2 ana grup kendi içerisinde Sham grubu (1. ve 4. Grup) , iskemi-reperfüzyon(I-R) grubu (2. ve 5. Grup) ve tedavi grubu (3. ve 6. Grup) olmak üzere eşit sayıda 6 gruba ayrıldı. Soliter böbrek modeli için ilk 3 gruptaki ratlara sağ nefrektomi yapıldı. Kompansatris hipertrofi gelişmesi için 1 ay beklendi. Sham gruplarında abdomen diseke edildikten sonra sol renal pediküller açığa çıkarıldı ve renal iskemi uygulanmaksızın kapatıldı. I-R gruplarında ve tedavi gruplarında renal arter ve ven oklüzyonun ardından 45 dakika iskemi süresi içerisinde alt pol parsiyel nefrektomi yapıldı ve iskemi sonrası 24 saatlik reperfüzyon süresi tamamlandı. I-R oluşturulması amaçlı cerrahi işlemden önce, 3 gün boyunca, her gün 1 kez ve işlem günü işlemden yaklaşık 1 saat önce olacak şekilde, 80mg/kg(1ml/kg) SMFF tedavisi oral gavaj yoluyla tedavi gruplarına (3. ve 6. Grup) verildi. I-R gruplarında(2. ve 5. Grup) ise 1ml/kg(SMFF ile aynı miktarda) %0.9NaCl tedavi gruplarıyla aynı süre ve zamanda verildi. Ratlar 24. saatin sonunda kalpten kan örnekleri alınıp, sol rezidü böbrek dokuları alındıktan sonra sakrifiye edildi.

Bulgular: Doku ve serumda bakılan oksidatif stres belirteçlerinde ve inflamasyon belirteçlerinde(TAK, TOS, OSI, PON1, ARES, CAT, MDA, IL-1 β ve TNF- α) I-R gruplarında Sham gruplarına göre oluşan değişim anlamlı saptandı. Ancak tedavi gruplarında, I-R gruplarına göre değerlerde düzelme olmasına rağmen, bu düzelme istatistiksel olarak anlamlı değildi. Tedavi gruplarında, I-R gruplarına göre PCO(p<0.05) ve DNA hasarı(p<0.01)

değerlerindeki değişimler istatistiksel olarak anlamlı saptandı. Renal histopatolojik hasar skoru Sham gruplarında diğer gruplara göre anlamlı olarak düşük bulunurken, tedavi gruplarında histopatolojik hasar skorunda I-R grubuna göre göreceli düzelme olsa da istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı. Bilateral böbrek grupları ile soliter böbrek grupları birbirleri ile karşılaştırıldığında, Sham gruplarının(1. grup ve 4. grup), I-R gruplarının(2. grup ve 5.grup) ve tedavi gruplarının(3. grup ve 6. grup) arasında fark saptanmadı.

Sonuç: Parsiyel nefrektomi esnasında meydana gelen sıcak I-R'ye bağlı, geride kalan böbrek dokusundaki hasarın SMFF tedavisi ile azaltılmasının amaçlandığı çalışmamızda, SMFF tedavisi renal dokuyu I-R hasarından beklenildiği ölçüde korumamış, SMFF tedavisinin I-R'de renal dokuda meydana gelen DNA hasarını önlemede başarılı olduğu görülmüş, SMFF tedavisinin soliter veya bilateral böbrekli olduğu farketmeksizin renal I-R hasarını bir dereceye kadar azaltabildiği fakat histopatolojik değerlendirmelerde göz önüne alındığında beklenen olumlu etkilere ulaşmadığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: İskemi, Parsiyel nefrektomi, Reperfüzyon, Saflaştırılmış mikronize flavanoid fraksiyonu

SUMMARY

Protective Effect of Micronized Purified Flavonoid Fraction on Renal Ischemia Reperfusion Injury in Experimental Ischemic Reperfusion Model and Partial Nephrectomy Rats

Objective: Partial nephrectomy is the standard treatment for kidney tumors smaller than 4 cm. In this study, we aimed to investigate the protective effect of purified micronized flavonoid fraction (SMFF) on I-R injury after partial nephrectomy performed in solitary kidney and bilateral kidney.

Materials and Methods: Forty-eight male Sprague-Dawley rats weighing 200-250 g were randomly assigned to a solitary kidney model (1st- 2nd and 3rd groups) and bilateral kidney model (4-5th and 6th groups) were divided into 2 main groups. These 2 main groups were divided equally into 6 groups, namely Sham group (1st and 4th group), ischemia-reperfusion (I-R) group (2nd and 5th group) and treatment group (3rd and 6th group). Right nephrectomy was performed on the rats in the first 3 groups to establish a solitary kidney model. We waited for 1 month for the development of compensatory hypertrophy. After entering the abdomen in the Sham groups, the left renal pedicle was dissected and closed without renal ischemia. In the I-R groups and the treatment groups, partial nephrectomy of the lower pole was performed within 45 minutes of ischemia and post-ischemic 24-hour reperfusion period completed. Prior to surgery, for 3 days, Once a day and about 1 hour before the operation, 80 mg / kg (1 ml / kg) SMFF treatment was given to treatment groups (groups 3 and 6) by oral gavage. In the I-R groups (2nd and 5th groups), %0.9 NaCl was given at 1 ml / kg for the same time and same amount as SMFF. Rats were sacrificed at the end of 24 hours after blood samples from the heart and left kidney tissues were taken.

Results: Change in the oxidative stress markers and inflammatory markers (TAK, TOS, OSI, PON1, ARES, CAT, MDA, IL-1 β and TNF- α) measured in tissue and serum in the I-R groups was found to be significant in relation to the Sham group. However, despite the improvement in values in the treatment groups compared to the I-R groups, this improvement was not statistically significant. The changes in PCO (p <0.05) and DNA damage (p <0.01) values were statistically significant in the treatment groups according to I-R groups. Renal histopathological damage score was found to be significantly lower in the Sham group than in

the other groups, although there was a relative improvement in the histopathological damage score in the treatment groups compared to the I-R group, it was not statistically significant. There was no difference between the Sham groups (group 1 and 4), I-R groups (group 2 and 5) and treatment groups (group 3 and 6) when bilateral kidney and solitary kidney groups were compared with each other.

Conclusion: In our study, which we aimed to evaluate the effect of SMFF treatment in renal injury associated with warm ischemia-reperfusion occurred during partial nephrectomy, SMFF treatment did not protect the renal tissue from ischemia-reperfusion injury to the extent we expected, SMFF treatment was found to be successful in preventing DNA damage in the renal tissue in I-R, It has been concluded that SMFF treatment can reduce renal I-R damage to a certain extent, regardless of whether it is solitary or bilateral, but when histopathological evaluations were considered, we did not achieve the expected positive effects.

Key Words: Ischemia, Partial nephrectomy, Reperfusion, Purified micronized flavonoid fraction

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
TEŞEKKÜR	i
ÖZET	iii
SUMMARY	v
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
GRAFİKLER DİZİNİ	xii
RESİMLER DİZİNİ	xiii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1.İskemi	3
2.2.Reperfüzyon	6
2.3.Renal İskemi Reperfüzyon Hasarı	9
2.4.Saflaştırılmış Mikronize Flavonoid Fraksiyonu (Diosmin-hesperidin)	11
2.5.Parsiyel Nefrektomi(Nefron Koruyucu Cerrahi)	12
3.YÖNTEM VE GEREÇLER	14
3.1.Deney Grupları	14
3.2.Saflaştırılmış Mikronize Flavonoid Fraksiyonu Hazırlanışı ve Uygulanması	15
3.3. Anestezi ve Cerrahi Prosedür	15
3.3.1 Soliter Böbrek Modeli Oluşturulması	15
3.3.2. SMFF Tedavisinin Verilmesi	15
3.3.3.İskemi – Reperfüzyon Oluşturulması	16
3.3.4. Örnek Alımı ve Sakrifikasyon	18

3.4.Biyokimyasal Parametreler	18
3.4.1.Kan Analizleri	18
3.4.1.1.Comet Assay Yöntemi ile DNA Hasar Tayini	19
3.4.1.2.Total Antioksidan Kapasite (TAK)	20
3.4.1.3.Total Oksidant Seviye (TOS)	21
3.4.1.4.Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)	21
3.4.1.5.Katalaz (CAT)	21
3.4.1.6.Plazma Malondialdehit (MDA)	22
3.4.1.7.Protein Karbonilleri (PCO)	23
3.4.1.8.Paraoksonaz Aktivitesinin Ölçümü	24
3.4.1.9.Arilesteraz Aktivitesinin Ölçümü	25
3.4.1.10.Plazma Tümör Nekrozis Faktör Alfa ve İnterlökin 1 Beta Analizleri	26
3.4.2. Doku Analizleri	26
3.4.2.1.Doku Total Antioksidan Kapasite (TAK) Analizleri	26
3.4.2.2.Doku Total Oksidan Status (TOS) Analizleri	27
3.4.2.3.Doku Tümör Nekrozis Faktör Alfa ve İnterlökin 1 Beta Analizleri	27
3.5.Histopatolojik değerlendirme	27
3.6. İstatistiksel Değerlendirme	28
4. BULGULAR	29
4.1.Histopatolojik Bulgular	29
4.2.Biyokimyasal Bulgular	33
4.2.1.Kanda bakılan oksidatif stres ve inflamatuvar parametrelerin bulguları	33
4.2.2.Dokuda bakılan oksidatif stres ve inflamatuvar parametrelerin bulguları	40
5.TARTIŞMA	44

6.SONUÇLAR

50

7.KAYNAKLAR

51



SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABY	: Akut böbrek yetmezliği
ATP	: Adenozin trifosfat
CAT	: Katalaz
GPx	: Glutasyon peroksidaz
ICAM-1	: İnterselüler adhezyon molekülü-1
IL-1 β	: İnterlökin-1 beta
I-R	: İskemi-reperfüzyon
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
LT-B ₄	: Lökotrien B ₄
MDA	: Malondialdehit
NKC	: Nefron koruyucu cerrahi
OSİ	: Oksidatif Stres İndeksi
PAF	: Trombosit aktive edici faktör
PCO	: Protein Karbonilleri
PECAM-1	: Trombosit-endotel hücresi adhezyon molekülü-1
PMNL	: Polimorf nüveli lökositler
PN	: Parsiyel nefrektomi
PSGL-1	: P-selektin glikoprotein-1
RHK	: Renal hücreli kanser
SMFF	: Saflaştırılmış mikronize flavonoid fraksiyonu
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
SOD	: Süperoksid dismutaz
TAK	: Total Antioksidan Kapasite
TNF- α	: Tümör nekrozis faktör-alfa
TOS	: Total Oksidan Seviye
VCAM-1	: Vasküler hücre adhezyon molekülü-1

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil-1: Hücre sitoplazmasında kalsiyum artışı ve sonuçları	4
Şekil-2: Serbest oksijen radikallerinin etkileri	5
Şekil-3: İskemi-reperfüzyon sürecinde oluşan lökosit göçü	7
Şekil-4: İskemi reperfüzyon hasarı patofizyolojisi	9
Şekil-5: İskemik renal hasar patogenezinde rol oynayan faktörler	10



GRAFİKLER DİZİNİ

SAYFA

Grafik-1: Böbrek histopatolojik incelemesinde ortalama renal hasar skorları	29
Grafik-2: Serum TAK değeri ortalamalarının gruplara göre değişimi	33
Grafik-3: Serum TOS değeri ortalamalarının gruplara göre değişimi	34
Grafik-4: Serum TAK ve TOS değerlerine göre hesaplanan OSI ortalamalarının gruplara göre değişimi	34
Grafik-5: Serum PON1 ortalamalarının gruplara göre değişimi	35
Grafik-6: Serum ARES ortalamalarının gruplara göre değişimi	36
Grafik-7: Serum CAT ortalamalarının gruplara göre değişimi	36
Grafik-8: Serum MDA ortalamalarının gruplara göre değişimi	37
Grafik-9: Serum PCO ortalamalarının gruplara göre değişimi	37
Grafik-10: DNA Hasarı ortalamalarının gruplara göre değişimi	38
Grafik-11: Serum IL-1 β ortalamalarının gruplara göre değişimi	39
Grafik-12: Serum TNF- α ortalamalarının gruplara göre değişimi	39
Grafik-13: Doku TAK ortalamalarının gruplara göre değişimi	40
Grafik-14: Doku TOS ortalamalarının gruplara göre değişimi	41
Grafik-15: Doku TAK ve TOS değerlerine göre hesaplanan OSI ortalamalarının gruplara göre değişimi	41
Grafik-16: Doku IL-1 β ortalamalarının gruplara göre değişimi	42
Grafik-17: Doku TNF- α ortalamalarının gruplara göre değişimi	43

Resim-1: Renal arter ve venin diseksiyonu ve dönülmesi	17
Resim-2: Soldan sağa sırasıyla enjektör kapağının renal arter ve ven altına yerleştirilerek kompresyon sağlanması; Enjektör kapağının 180° döndürülmesi; Enjektör kapağının 360° döndürülmesi ile renal arter ve venin torsiyone edilmesi; Enjektör kapağının iskemi süresince cilde tesbiti	17
Resim-3: Parsiyel nefrektomi sonrası termokoter ile kanama kontrolü	18
Resim-4: Sham gruplarına ait histopatolojik kesit örnekleri	30
Resim-5: I-R gruplarına ait histopatolojik kesit örnekleri	31
Resim-6: Tedavi gruplarına ait histopatolojik kesit örnekleri	32
Resim-7: Comet-Assay yöntemi ile DNA kuyruk hasarının değerlendirilmesi	38

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Parsiyel nefrektomi 4cm altı böbrek tümörlerinde standart tedavi yöntemidir (1). Parsiyel nefrektomide renal fonksiyonlara etki eden faktörler başlıca tümöre, hastaya ve cerrahiye bağlı 3 ana başlıkta değerlendirilmiştir. Hastaya bağlı faktörler; artmış yaş, soliter böbrek, düşük operasyon öncesi glomerüler filtrasyon hızı ve erkek cinsiyet; tümöre bağlı faktör artmış tümör çapı; cerrahiye bağlı faktör sıcak iskemi süresi olarak raporlanmıştır. Bu etkenlerden sadece sıcak iskemi süresi değiştirilebilir bir faktör olma özelliği ile diğerlerinden ayrılmıştır (2). Bu cerrahi işlemde esas olan iki stres faktördoku ablasyonu ve iskemi-reperfüzyondur(İ-R) (3). Renal iskemi, kompleks bir olayı başlatarak böbrek hücrelerinin hasarına ve ölümüne neden olur. İskemik böbrek dokusunun dolaşımının yeniden sağlanması için reperfüzyon gerekli olduğu halde, reperfüzyon renal hasara ve disfonksiyona neden olan ilave bir yıkıma neden olur (4). Renal iskemiye bağlı böbrek hasarının patofizyolojisi endotel hasarının eşlik ettiği postiskemik vazokonstriksiyon, inflamasyona sekonder mikrodamarların lökosit ve trombositlerce mekanik obstrüksiyonu ile açıklanırken (5); renal reperfüzyon hasarına neden olan patofizyolojik mekanizmalar içerisinde; polimorfonüklear lökositlerin yapışma ve aktivasyonu, proinflammatuar sitokinlerin serbestleşmesi, reaktif oksijen türleri ile reaktif nitrojen türlerlerinin oluşumu sayılabilir (6,7).

Saflaştırılmış mikronize flavonoid fraksiyonu(SMFF) %90 diosmin ve %10 hesperidin içerir (8). SMFF'nin, I-R'de mikrovasküler alanda oksidanlar ve inflammatuar maddeler tarafından uyarılan makromoleküllerin ekstrasvazasyonuna karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur (9,10). Ayrıca postiskemik dönemde lökositlerin endotel hücrelerine olan adhezyonunun ve migrasyonunun SMFF tarafından azaltıldığı gösterilmiştir (9,11). Bunlarla birlikte SMFF'nin akut lenfödem modeli çalışmasında dokudaki ödemi ve inflamasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (12).

Biz bu çalışmada, SMFF'nin soliter böbrekte ve bilateral böbrekte yapılan parsiyel nefrektomi olgularında I-R hasarı üzerine koruyucu etkisini incelemeyi amaçladık. Bizim bilgilerimize göre bu çalışma SMFF'nin renal I-R hasarını korumasına ilişkin ilk deneysel çalışma olacaktır.

2.GENEL BİLGİLER

Arteriyel kan akımında oluşan patolojiye bağlı dokuların yeterli kan temin edememesine iske mi, iskemik olan doku veya organın yeniden kanlanmasına da reperfüzyon denilmektedir (13). İske mi, hücrede enerji düzeyinin düşmesine ve toksik metabolitlerin dokuda birikmesine yol açarak hücre disfonksiyonundan hücre ölümüne kadar gidebilen biyokimyasal reaksiyonları başlatır (14). Bu reaksiyonları başlatan patofizyolojik etken doku iskemisi olmasının yanında, reperfüzyon da inflamasyona yol açmaktadır (15). Dokuda oluşan inflamasyon ise, serbest oksijen radikallerinin(SOR) artmasına, endotel disfonksiyonuna, medüller mikrosirkülasyonda değişikliğe ve tübüler hasara neden olmaktadır (16).

Hipovolemik şok, yanık, sepsis, pankreatit gibi perfüzyon bozukluğuna yol açan durumlar; iskemik inme ve miyokard enfarktüsü gibi uygulanan trombolitik tedavi veya revaskülarizasyon ameliyatlarına bağlı durumlar; kardiyovasküler cerrahide aortik ya da periferik arteriyel klem p uygulamaları sonrası; vasküler, ortopedik ve rekonstrüktif cerrahilerde turnike uygulamaları sonrası gibi durumlar, tıbbın pek çok alanında sık karşılaşılan I-R klinik tablolarıdır (17,18). Tüm bu I-R modellerinde ortaya çıkan toksik ajanlar hem hedef organda hem de uzak organlarda hasara yol açabilmektedir (19).

Böbrekte; parsiyel nefrektomi ameliyatları, renal transplantasyon, sistemik hipotansiyon, hipovolemik şok, kardiyak arrest, renovasküler cerrahi, aortun klem pajı gibi klinik durumlar sırasında sıcak I-R hasarı oluşabilmektedir (20,21). Bu hasarın şiddeti iske mi süresine paralel olarak artmakta, sonuçta belirgin doku hasarı olmaksızın gelişen prerenal azotemiden, tübüler veya kortikal nekroza bağlı ciddi akut böbrek yetmezliğine kadar değişebilen farklı klinik tablolar karşımıza çıkabilmektedir (20,22).

I-R hasarının fizyopatolojisi ile ilgili çeşitli faktörler ileri sürülmüştür. Bunlar birbiriyle ilişkileri karmaşık, hücre sel ve hü moral olaylar serisidir (23,24). Özellikle; SOR oluşumu, polimorf nüveli lökositlerin rolü(PMNL), kompleman sisteminin rolü ve endotel hücrelerinin rolü I-R hasarının önemli faktörleridir.

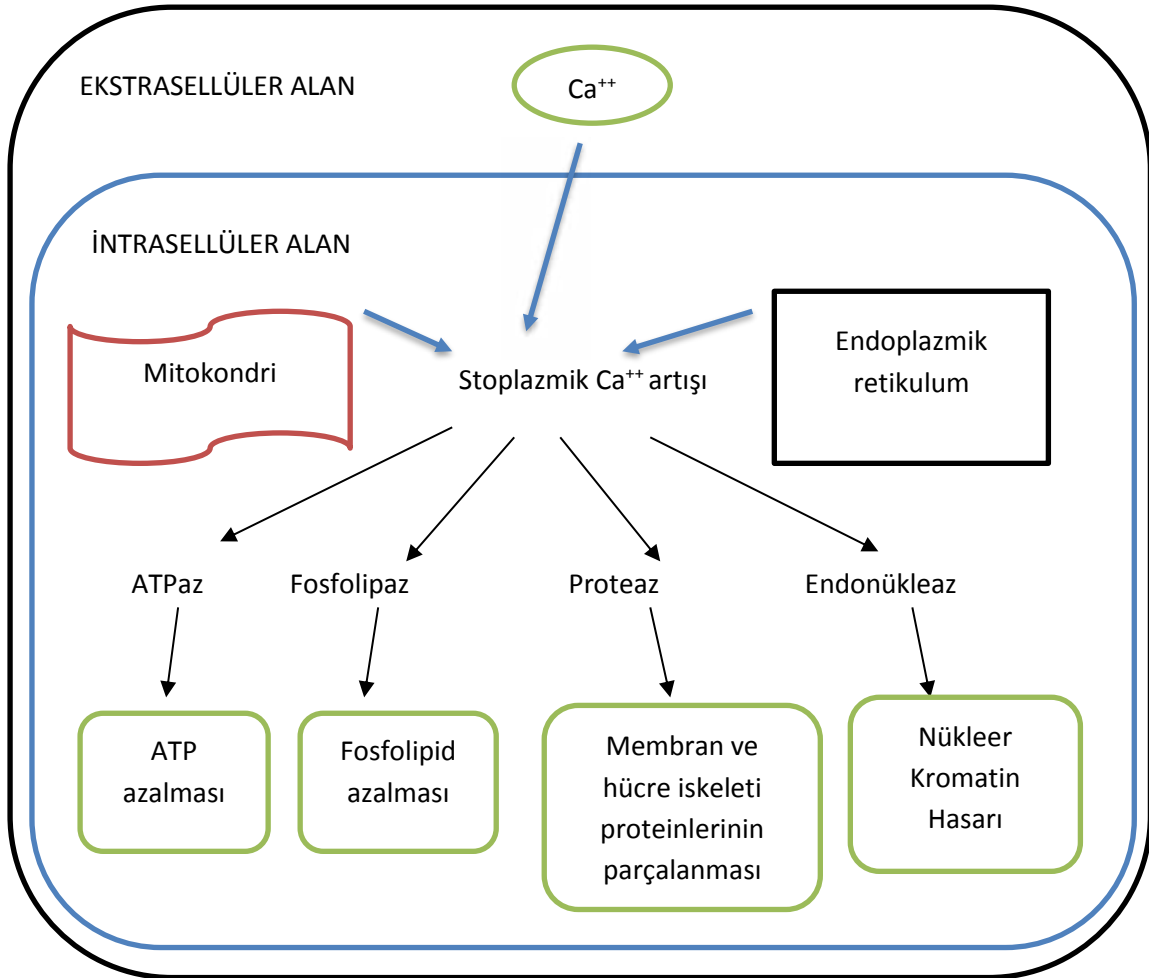
2.1.İskemi

İskemi, dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan gereksiniminin dolaşım tarafından sağlanamaması ve bu süreçte oluşan atık ürünlerin yine dolaşım tarafından uzaklaştırılamamasıdır (25). İskemik hasarın derecesi hipoksinin derinliğine ve şiddetine bağlıdır. İskemiye bağlı dokuhasarında hücresel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi hücre ölümüne yol açar (26).

İskemi sonrasında adenosintrifosfat(ATP) depolarında azalma, sitozolde serbest kalsiyum birikimi, SOR oluşumu ile mitokondri hasarı meydana gelmektedir (15). Takiben gelişen lipid peroksidasyonu ve fosfolipaz aktivasyonu, hücre membran bütünlüğünün kaybolmasına yol açarak hücre nekrozuna sebep olmaktadır (15). Oksijenin ortamda bulunmaması hücrenin ATP depolarında hızla azalmaya yol açarak, ATP bağımlı iyon kanalları ve iyon transportörlerin fonksiyon kaybı ile oksidatif fosforilasyonda görevli enzimlerin işlev kaybına neden olur (27). Bu duruma bağlı olarak hücre içi Ca^{+2} seviyeleri artar (27). Hücre içerisindeki Ca^{+2} miktarındaki artış, I-R hasarında ilk olarak göze çarpan olaylardan birisidir ve iskeminin süresi ile yakından ilişkilidir (28). Normalde hücre dışı Ca^{+2} konsantrasyonu, hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonundan 10000 kat fazladır. Bu fark plazma membranı ve endoplazmik retikulumda bulunan Ca-ATPaz ve Na/Ca değişiricisi ile korunur. Hücre enerjisinin azalması Ca-ATPaz'ların aktivitesi azaltır. Hem Ca^{+2} hücre dışına çıkışı, hemde endoplazmik retikulumdan Ca^{+2} sekestrasyonunun bozulması ile hücre içi Ca^{+2} artar. Ayrıca enerji azlığı ile Na/K ATPaz aktivitesinin inhibe olması kalsiyumun Na/Ca değişiricisi ile hücre içine girişini etkinleştirir (29). İntrasellüler Ca^{+2} artışı ile fosfolipazlar ve proteolitik enzimler aktive olurlar (Şekil-1). Fosfolipaz A₂ aktivasyonu ile membran fosfolipidleri bozulmaya başlar; plazma ve mitokondriyal membran biyoenerjetikleri ve geçirgenlikleri de değişir (30). Araşidonik asit, fosfolipazların aktivasyonu sonucu oluşur. Araşidonik asit, direkt etkiyle mitokondriyal enzimleri inhibe ederek SOR oluşumunu artırır (31).

SOR, eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküldür (32). Biyolojik sistemlerde oluşan SOR'lerin endojen kaynakları oksijen, nitrik oksit, uyarılmış nötrofil, mitokondriyal elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, peroksizom ve plazma membranı olarak

sayılabilir (32). Solunan oksijenin % 95'inden fazlası mitokondrilerde ATP şeklinde enerji oluşumunda kullanılırken, yaklaşık %5'i de son yörüngelerinde ortaklanmamış elektron içermesi nedeniyle toksik serbest radikallere dönüşmektedir (33).

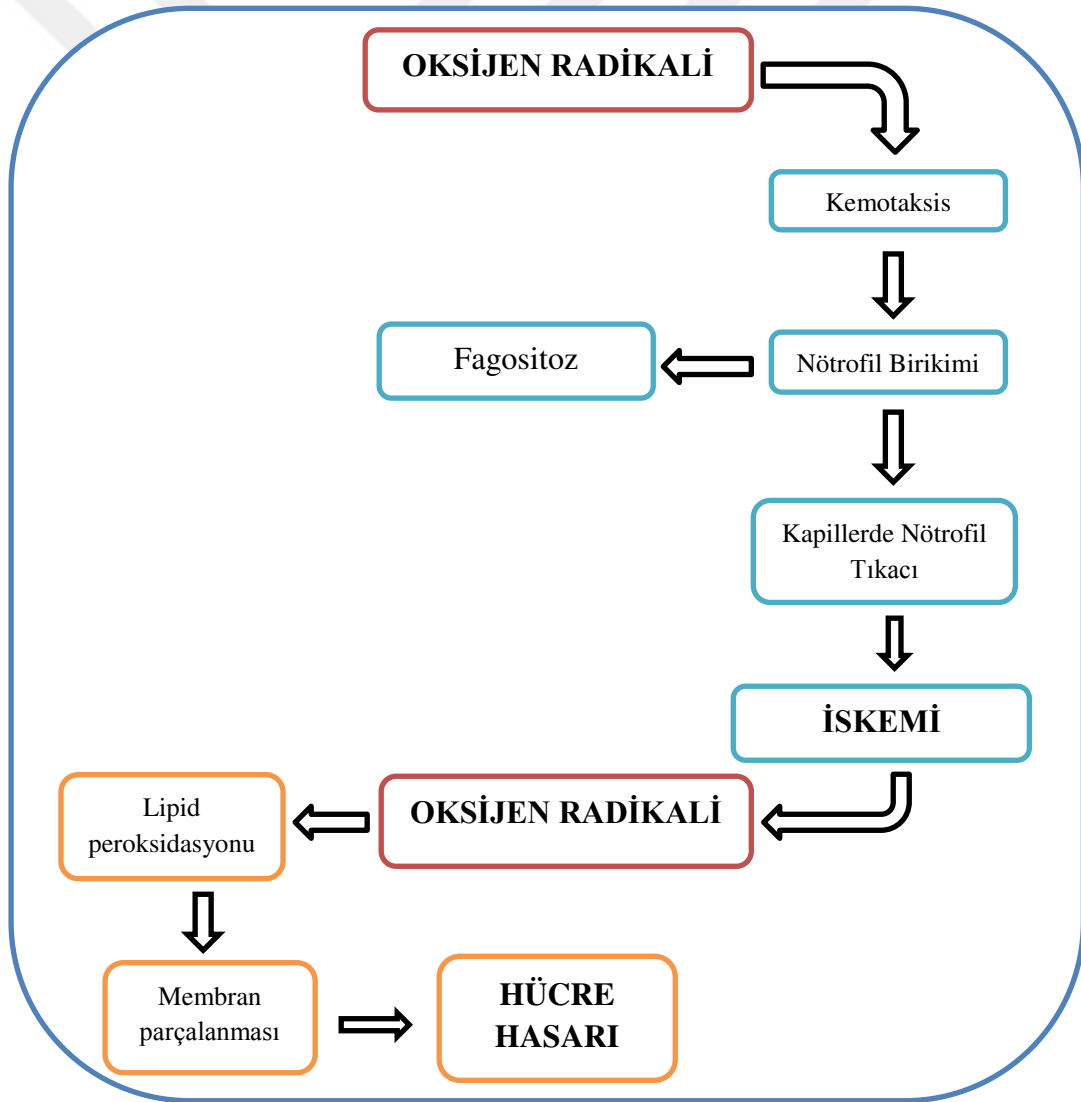


Şekil-1: Hücre sitoplazmasında kalsiyum artışı ve sonuçları (39) (Kaynaktan faydalanarak çizilmiştir)

SOR'nin hücreler üzerinde lipit peroksidasyonu, hücre proteinlerinin oksidasyonu ve DNA hasarı gibi zararlı etkileri vardır (34). Hücresel hasara yol açmada başta hidroksil radikali olmak üzere peroksinitrit ve hiperkloröz asit gibi serbest oksijen radikalleri suçlanmıştır (35).

SOR'lerin ilk oluşunu ve öncüsü genellikle stabil olmayan ve hidrojen peroksit ile oksijene dönüşen süperoksit radikalidir (36). Fagositöz görevi yapan makrofaj, nötrofil ve

monositler tarafından enzimatik olarak üretilirler (37). Hidrojen peroksit hücre membranlarından kolaylıkla geçebilen, endotelial hücreleri hasarlayabilen güçlü bir sitokindir. SOR olmadığı halde birçok reaktifin oluşum reaksiyonlarına katıldığı için hidrojen peroksitte toksik metabolitler içinde yer alır. Toksik özellik gösterebilmesi için hidroksil radikaline dönüşmek zorundadır (36)(Haber-Weiss reaksiyonu). Hidroksil radikali, bilinen serbest radikaller içinde en güçlü olan ve doku hasarında sorumlu ana radikaldir (37). Çok kısa ömürlü ve reaktif olan bu radikal, protein, polisakkarit, nükleik asit ve ansatüre yağ asitleri gibi birçok biyolojik madde ile reaksiyona girer. Bu radikalın en önemli özelliği, hidrojen atomlarını hücre membranındaki poliansatüre yağ asitlerinden ayırmasıdır. Lipit peroksidasyonunu başlatarak hücre membranında çözülmeye ve buna bağlı hücre ölümüne yol açar (38)(Şekil-2).



Şekil-2: Serbest oksijen radikallerinin etkileri (40) (Kaynaktan faydalanarak çizilmiştir)

2.2.Reperfüzyon

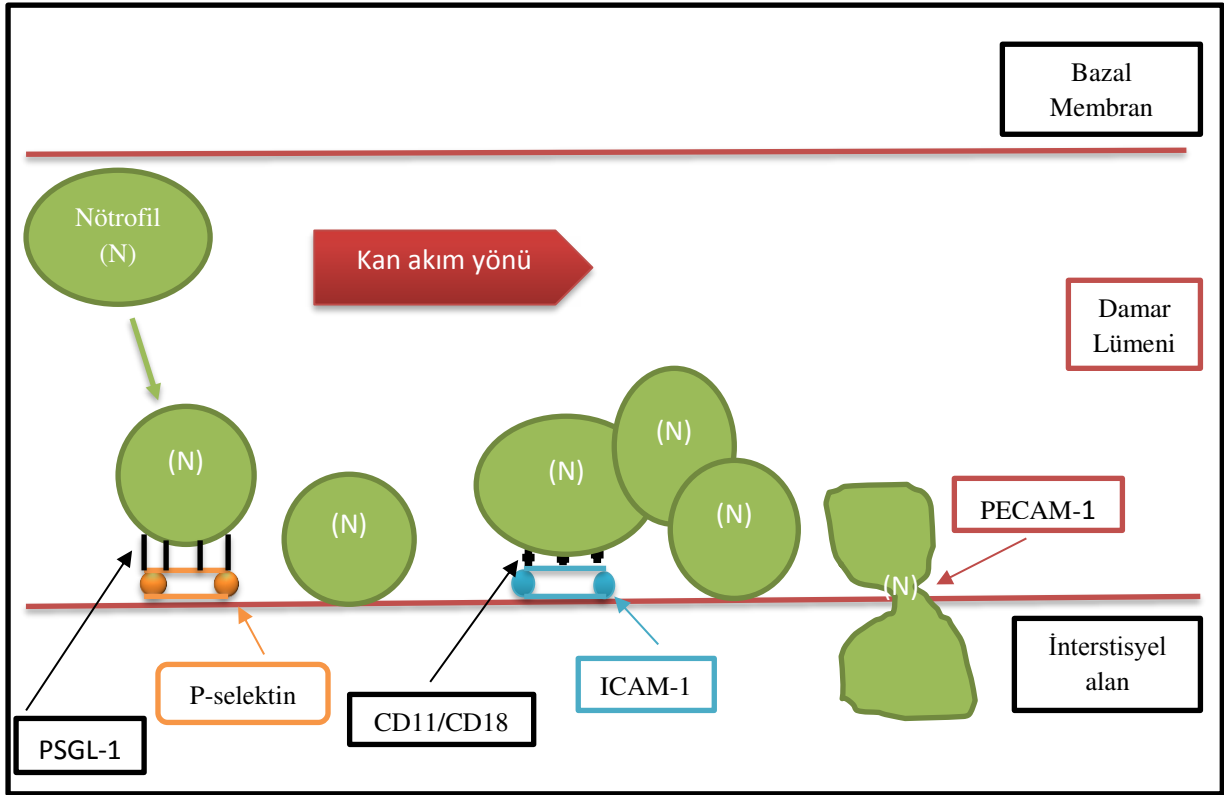
İskemik dokudaki kan dolaşımının yeniden sağlanmasına reperfüzyon denir (41). İskemi sonrası kan akımının tekrar başlaması iskeminin oluşturduğu hasardan daha fazla hasara yol açabilir (42).

Reperfüzyon hasarını önlemeye yönelik antinötrofil serumlarla ya da lökosit adhezyon moleküllerine karşı monoklonal antikorlarla yapılan çalışmalar, reperfüzyonda mikrovasküler permeabiledaki artıştan başlıca PMNL'lerin sorumlu olduğunu göstermiştir (43). İskemi reperfüzyon hasarında PMNL'nin rolü ile ilgili öne sürülen mekanizmalar: Mikrovasküler oklüzyona yol açması, yüksek miktarda SOR üretmesi, sitotoksik enzim salınması, vasküler permeabilite artışı ve sitokin salınmasında artıştır (44).

I-R ile lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit endotel hücre adhezyonu meydana gelir (45). PMNL'lerin aktivasyon ve migrasyonları endotel hücrelerinde ve lökositlerde bulunan adhezyon molekülleri aracılığıyla olur. İlk olarak PMNL'lerde bulunan P-selektin glikoprotein-1(PSGL-1) adlı reseptörü ile etkileşerek düşük afiniteli lökosit endotel bağlantısını oluşturur (lökosit rolling)(46). İkinci aşamada, lökosit beta-2 integrinler (CD11a/CD18 ve CD11b/CD18) ile endoteldeki interselüler adhezyon molekülü-1(ICAM-1) arasındaki etkileşim sonucunda lökosit adhezyonu ve agregasyonu gelişir (46). Üçüncü aşama ile, trombosit-endotel hücresi adhezyon molekülü-1 (PECAM-1) ile endotel hücre bağlantıları arasındaki etkileşim ile lökosit transmigrasyonu gerçekleşir. Aktive lökositler damar dışına ulaşınca hasar bölgesine doğru göç etmeye başlarlar (kemotaksis, Şekil-3)(46).

Nötrofillerin dokuya gelebilmeleri için gerekli kemotaktik maddeler arasında C3a ve interlökin-1(IL-1), lökotrien B₄(LT-B₄), trombosit aktive edici faktör(PAF) ve prostaglandin türleri vardır (46). Aktif lökositler, nükleer transkripsiyon faktörlerinin(NF-kB) aktivasyonuna ve tümör nekrozis faktör-alfa(TNF- α) sentezine yol açar (45). Aktif nötrofiller salıverdikleri maddelerle yol açtıkları hasarın yanı sıra, damar içinde oluşturdukları hücre toplulukları(agregatlar) ve aktif trombositlerle birlikte damar endoteline yapışarak mikrovasküler tıkanmaya da neden olurlar (48). Yapılan son çalışmalarda; nötrofillerin

aktivasyon ve dokuya infiltrasyon derecesi ile reperfüze dokudaki nekroz ve apoptozis derecesi arasında bir korelasyon olduğu bulunmuştur (49).



Şekil-3: İskemi-reperfüzyon sürecinde oluşan lökosit göçü (47) (Kaynaktan faydalananarak çizilmiştir)

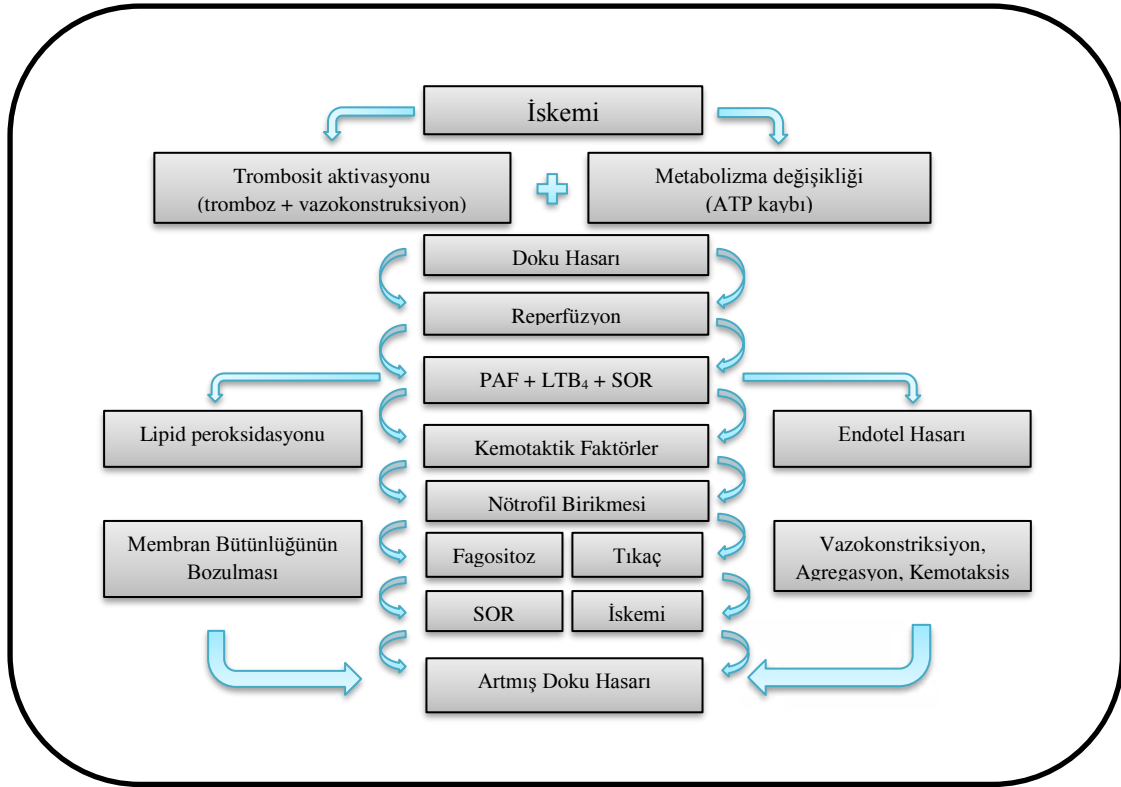
İskemik dokunun reperfüzyonu, arteriyollerde endotel bağımlı dilatasyonun bozulmasına, kapillerlerde lökosit tıkaçlarının oluşmasına ve sıvı filtrasyonunun artmasına, postkapiller venüllerde plazma proteinlerinin damar dışına sızmasına ve böylece mikrovasküler fonksiyonun bozulmasına neden olur (20). Reperfüzyonun başlangıç döneminde, endotel hücrelerinde fazla miktarda süperoksit oluşurken nitrik oksit oluşumu ise azalır ve süperoksit radikali ile nitrik oksit arasındaki dengenin bozulması, endotel hücrelerinden PAF, TNF- α gibi inflamatuvar mediyatörlerin salınmasına ve lökosit-endotel hücre adhezyonuna aracılık eden adhezyon moleküllerinin biyosentezinin artmasına neden olur (50).

SOR oluşumunda ve I-R hasarında önemli bir kaynak olan nötrofiller azurofilik granüllerinde oksidan etkili NADPH oksidaz, elastaz ve miyeloperoksidaz enzimlerini

içerirler. İskemi sonrası reperfüzyonun başlaması ile birlikte, dokuya sunulan oksijenin yaklaşık %70'i NADPH-bağımlı oksidaz ile süperoksit iyonlarına oksitlenmektedir. Süperoksit iyonları hidrojen peroksite, hidrojen peroksit ise klorür iyonlarının varlığında miyeloperoksidaz enzimi aracılığı ile hipoklorik aside indirgenir. Hipoklorik asit güçlü bir oksidandır ve birçok biyolojik molekülle kolayca reaksiyona girebilir (51).

İskemi reperfüzyon hasarında kompleman sisteminin aktivasyonu ile proinflamatuvar komponentler; C3a, C5a, C3b ve C5b-9 oluşur. Kompleman sistemi, lökosit adhezyon moleküllerinden; vasküler hücre adhezyon molekülü 1 (VCAM-1), interselüler adhezyon molekülü 1 (ICAM-1), E-selektin ve P-selektin sentezini artırır. Ayrıca TNF- α , IL-1 ve IL-6 üretimini uyararak inflamatuvar yanıtı amplifiye eder (52).

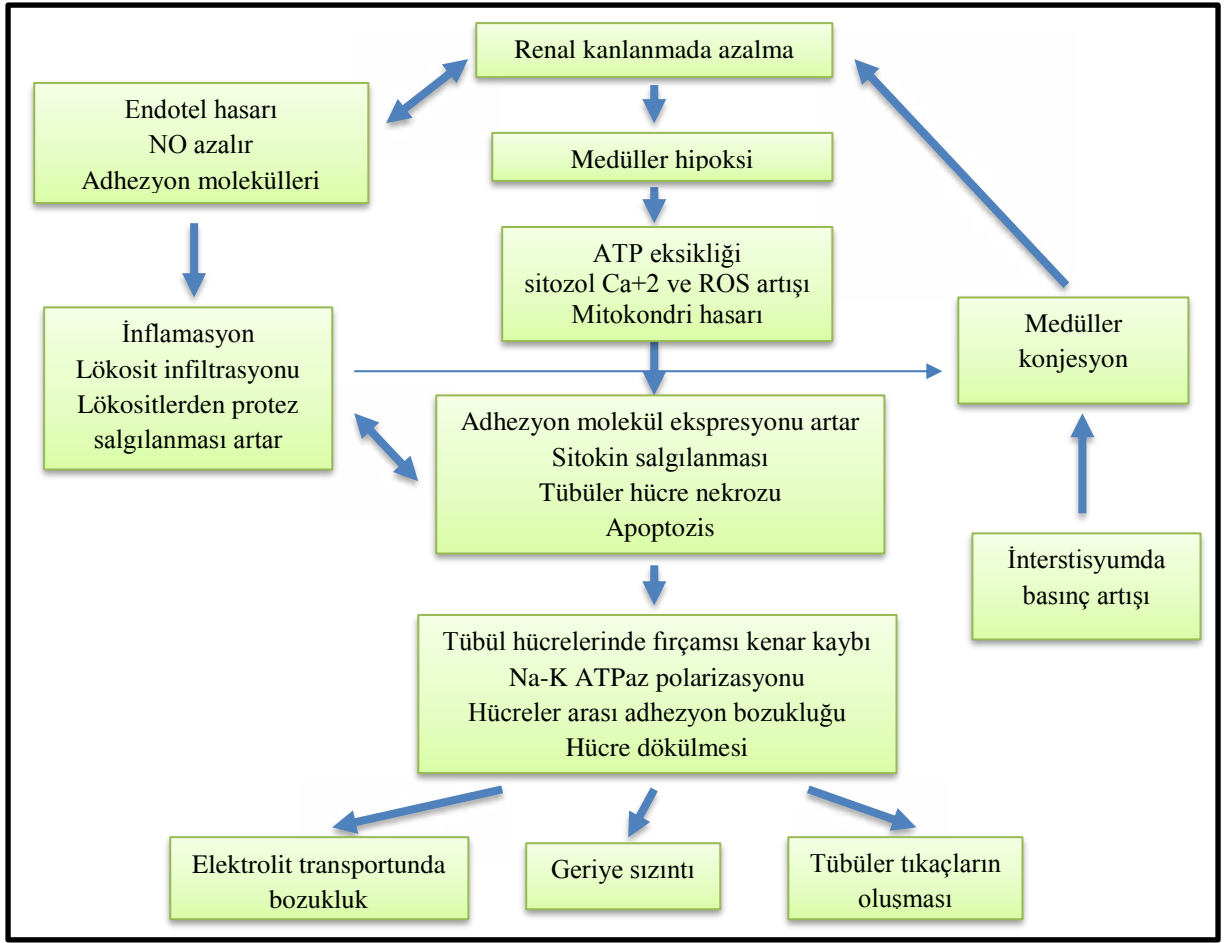
I-R hasarının oluşmasında endotel hücreleri önemli role sahiptir. Oksidatif stres endotel hücrelerinin aktivasyonuna ve işlevlerinin bozulmasına neden olur. Endotel hücreleri SOR için potansiyel hedef konumundayken diğer taraftan da SOR üretim kaynağıdır. Endotel, mikrovasküler homeostazdan sorumlu olan endotelini ve nitrik oksidi üretir. I-R hasarında endotelin/NO oranı endotelin lehine bozulur. Sonuçta arteriyel vazokonstriksiyon, venlerde vazodilatasyon olur (53). Nitrik oksitlerin radikal olarak reaktivitesi düşüktür, ancak metal içeren bileşikler ve radikaller ile büyük bir hızla tepkimeye girerler. Özellikle lipid radikallerle tepkimeye girmesi nitrik okside antioksidan bir etki kazandırır. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz(iNOS) enziminin indüksiyonu sırasında nitrik oksit derişiminin artması ile oksidasyonu da hızlanır ve çeşitli reaktif nitrojen oksit türleri oluşur. Bu reaktif türler nitrik oksidin dolaylı etkilerinden sorumludur ve hücrel moleküllerin nitrozilasyonuna, nitrasyonuna, nitrozasyonuna yol açarak, proteinlerin ve enzimlerin aktivitelerinin sonlanmasına neden olabilirler (54).



Şekil-4: İskemi reperfüzyon hasarı patofizyolojisi (55) (Kaynaktan faydalanarak çizilmiştir)

2.3.Renal İskemi Reperfüzyon Hasarı

Böbreklerdeki I-R hasarının mekanizması multifaktöriyel ve birbirine bağlı hipoksi, serbest radikal hasarı ve inflamatuvar cevaplarla ilişkilidir (56). Prerenal faktörlere bağlı gelişen iskemik hasarda preglomerüler vazokonstriksiyon, glomerüler filtrasyon hızının azalmasındaki en önemli sebep olarak gözükmektedir (57). Nörohormonal cevabın uyarılması ile renin anjiyotensin aldosteron sistemi aktive olur. Glomerüler plazma akımı %30-50 oranında azalır. Katekolaminlerin, anjiyotensin II'nin ve endotelinin seviyeleri artar ve vazokonstriksiyon gelişir (26). Preglomerüler sebepler sonucu makula densaya ulaşan solütlerin miktarının artması ile tübüloglomerüler feedback mekanizması da aktive olur ve bu aktivasyon vazokonstriksiyonun devam etmesine sebep olur (58). İskemik böbrekte vazokonstriktör maddelerin etkisine karşı aşırı bir hassasiyet ve vazodilatör maddelerin etkisine karşı da direnç söz konusudur (59). Oksijenlenmenin bozulması ile artan intraselüler kalsiyum birikiminin afferent arteriyollerdeki direnç artışı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (60).



Şekil-5: İskemik Renal hasar patogenezinde rol oynayan faktörler (56) (Kaynaktan faydalanarak çizilmiştir.)

Hipoksinin devam etmesi ve inflamatuvar cevap, akut böbrek yetmezliğinde rol oynamaktadır. İskemik olay düzelse bile reperfüzyon sırasında kan akımında %40-50 oranında azalma devam eder (27). Kan akımındaki bu azalma, endojen vazokonstriktörler ve iskemi sonrası endotel geçirgenliğindeki artış ile ilişkili olduğu düşünülmüştür (61,62). Gelişen interstisyel ödem kan akımını, medulladaki damarlara bası uygulayarak daha da bozabilmektedir (63). Endotel hücrelerinde P ve E selektin ekspresyonu arttığından, lökositlerin endotel hücrelerine adhezyonu artar (64). Aynı şekilde ICAM-1 ekspresyonu da artmaktadır (65). Bu olayları takiben lökosit adhezyonu ve infiltrasyonu ile vazokonstriksiyon ve lokal kan akımındaki azalma bir kısır döngü halinde devam eder. Sonuçta glomerüler filtrasyon hızında azalma ile birlikte subletal hasardan apoptozise ve nekroza kadar gidebilen bir tablo gelişir (66).

Tübüler hasar gelişimindeki bir diğer mekanizma da oksidatif strestir. Özellikle proksimal tübül hücrelerinin metabolik açıdan yoğun olmaları, akut tübüler nekroz sırasında mitokondriyal hasar ve intrasitoplazmik kalsiyum artışı nedeniyle oksidatif moleküller fazla miktarlarda oluşur. Oluşan hidroksil radikalleri gibi SOR'ler, lipid peroksidasyonuna sebep olarak, hücre proteinlerini okside ederek, plazma ve mitokondri membranını bozarak ve DNA'ya hasar vererek hücre zedelenmesine sebep olur (67).

Tübüler hasarın gelişmesine katkıda bulunan bir diğer molekülde iNOS'dur. Hipoksi de iNOS protein düzeyleri ve nitrik oksit seviyeleri artmaktadır (68). Salgılanan nitrik oksidin oksijen radikalleri ile uzaklaştırılması sırasında oluşan peroksinitrit, tübül hasarına yol açmaktadır (69). iNOS blokajı sağlandığında ise lökosit infiltrasyonu ve iskemi-reperfüzyon hasarı engellenebilmektedir (70).

İskemik akut tübüler nekrozda inflamasyonu başlatan en önemli basamak, tübüler hasar sonucu tübül hücrelerinden inflamasyonu tetikleyen TNF- α , IL-6, IL-1 α , ve TGF- β gibi sitokinlerle, monosit kemoatraktan protein-1, interlökin-8 ve RANTES gibi kemokinlerin salgılanmasıdır (71). İskemi-reperfüzyon hasarı sırasında kompleman sistemi de aktive olur, lökotrienler ve PAF gibi faktörler de salgılanır (72). Endotel ve lökositler arasındaki adhezyon sonrası lökositler hasarlı bölgeyi infiltre ederler. Kemokinler, SOR, IL-1 ve TNF- α gibi sitokinler de lökositleri bu bölgeye çekerler (73). Hasarlı bölgeye infiltre olan lökositler SOR, miyeloperoksidaz, elastaz, lökotrienler gibi enzimlerin salgılanmasına sebep olarak iskemik dokuda direkt hasara sebep olurlar (74).

2.4.Saflaştırılmış Mikronize Flavonoid Fraksiyonu (Diosmin-hesperidin)

SMFF %90 diosmin ve %10 hesperidin olarak ifade edilen flavonoid içerir (75). Günümüzde hemoroidal atak ve venöz yetmezlik hastalarının tedavisinde kullanılmaktadır (76). Diosmin oral yolla uygulandıktan sonra intestinal florada diosmetine dönüştürülerek ince bağırsaktan emilir (77). Maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşma süresi 1 saattir. Plazma konsantrasyonu 2 saat sonra yavaşça düşmeye başlar. 48 saat sonra bile kanda

saptanabilir (78). Mikronize diosmin eliminasyonunun idrar ve feçes yoluyla ilk 24 saatte %34'ü, ilk 48 saatte ise %86'sı tamamlanır (75).

SMFF son derece güvenli görülmekte ve hiçbir ciddi yan etkisi bulunmamaktadır. Ratlarda yapılan çalışmada 26 hafta boyunca SMFF verilmesi sonrası ölüm, kilo değişimi, standart fonksiyonel testlerde herhangi bir değişim gözlenmemiştir (79). İnsan çalışmalarında, SMFF-plasebo karşılaştırılmasında minör yan etkiler SMFF grubunda %10, plasebo grubunda %13.9 gözlenmiştir (80). Yan etki insidansı 70 yaş üstü hastalarda veya ek hastalığı bulunanlarda (hipertansiyon, diyabet, ateroskleroz, nörolojik hastalık, alkolizm) toplumdan farklı saptanmamıştır. Ayrıca bu eşlik eden hastalıklarda kullanılan ilaçlarla herhangi bir etkileşimi de saptanmamıştır (81). Sistolik veya diyastolik kan basıncı ve laboratuvar değerleri izlenen bir klinik araştırmada, bu parametreler her 4 ayda 1 kontrol edilmiş ve 1 yıl boyunca SMFF 500 mg günde 2 tablet ile tedavi sırasında kan basıncı değerleri değişmemiştir. Laboratuvar değerleri (lökositler, hemoglobin, karaciğer enzimleri, üre, kreatinin, kan şekeri ve lipidler) normal fizyolojik aralık içinde kalmıştır (81).

SMFF, nitrik oksit sentezi üzerine etkileri ile kılcal hiperpermeabiliteyi azaltır ve inflamatuvar hasar oluşturan süreçlerden mikrosirkülasyonu koruyarak kılcal damar direncini artırır (82). Ayrıca endotel hücreleri adhezyon molekülleri (ICAM-1, VCAM-1) ve lökositlerin adhezyon moleküllerinin (L-selektin, VLA-4, CD 11b) ekspresyonunu azaltır ve kılcal damar seviyesinde lökositlerin adhezyon, migrasyon ve aktivasyonunu inhibe eder (83,84). Enflamatuvar mediyatörlerin, esas olarak serbest oksijen radikallerinin ve prostoglandinlerin (PGE2, PGF2a) salınımında azalma sağlar (11,85).

2.5.Parsiyel Nefrektomi (Nefron Koruyucu Cerrahi)

Modern görüntüleme yöntemlerinin yaygın olarak kullanılması ile asemptomatik, küçük böbrek tümörlerinin saptanma oranı artmıştır (86). Küçük renal kitlelerin %83 kadarını renal hücreli kanserlerin (RHK) oluşturduğu bildirilmektedir (87). Lokalize RHK tedavisinde, 4cm'den küçük lezyonlar için parsiyel nefrektomi (PN), daha büyük lezyonlar için radikal

nefrektomi altın standart tedavidir (88). Son 10-15 yıllık süre içerisinde 4 cm'den küçük lezyonlar için PN tercih edilen yaklaşım olurken, zamanla uygun vakalarda 7 cm'den büyük lezyonlar için de tercih edilebilir bir yöntem olmuştur (89).

“Nefron koruyucu” terimi Cleveland Klinik'ten Licht ve Novick tarafından 1993 yılında yayınlanan bir makalede kullanılmış ve bu makalede 1967-1991 yılları arasında karşı taraf böbreği normal olan 241 hastada renal tümör rezeksiyonu bildirilmiştir (90). Bundan sonra açık parsiyel nefrektominin yaygın olarak kullanıma girmesi ile klinik bilgi artmıştır. Günümüzde açık, laparoskopik ve robot yardımlı olarak parsiyel nefrektomi yapılabilmektedir.

Parsiyel nefrektomide tümör rezeksiyonu, renorafı ve hemostaz gibi ameliyatın en önemli kısımlarını böbrekte kalıcı hasar yapmadan tamamlamak için çalışılabilecek maksimum sıcak iskemik zamanı 30 dakika olarak bildirilmektedir (91). Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar bu sürenin 20 dakika olması gerektiğini bildirmekte, bu sürenin altında dahi olsa her iskemik dakikanın zarar verici olduğu vurgulanmaktadır (92,93).

Parsiyel nefrektomi ile sağlanan nefron koruyucu yaklaşımın renal tümörü olan hastalardaki kronik böbrek yetmezliği riskini azalttığı ve onkolojik sonuçların radikal nefrektomi ile karşılaştırılabilir olduğu gösterilmiştir (94,95). Kardiyovasküler morbidite ile kronik böbrek yetmezliği arasındaki bağlantının gösterilmesi ile nefron koruyucu yaklaşımların önemi daha da artmış ve nefron koruyucu yaklaşımın genel sağ kalım üzerine olumlu etkisi kanıtlanmıştır (97,99).

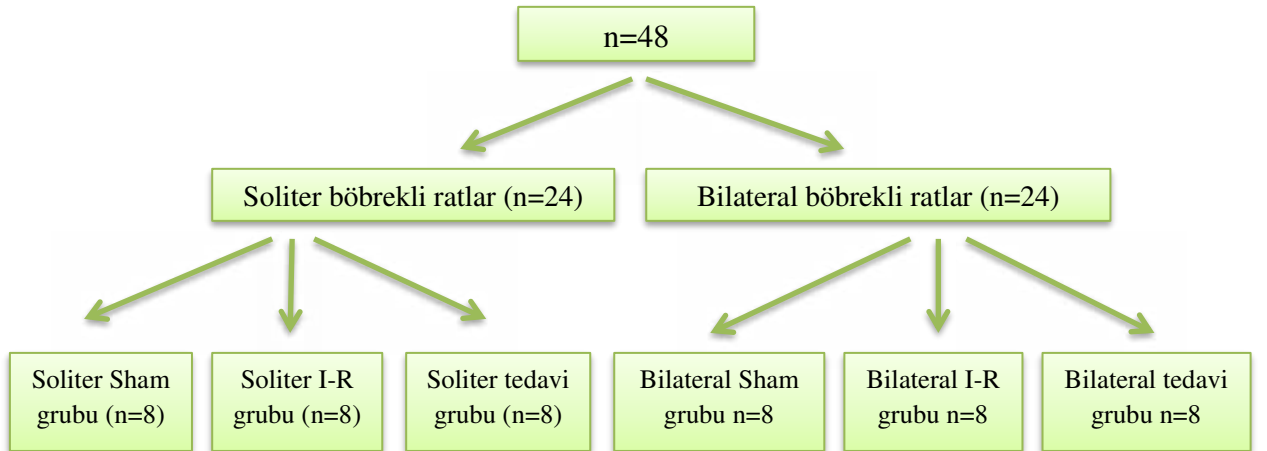
3.YÖNTEM VE GEREÇLER

Deney protokolü Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deneysel Hayvan Etik Kurulu tarafından onaylandıktan sonra çalışmaya başlandı. Deney öncesi iki haftalık sürede laboratuvar koşullarına ($22^{\circ}\text{C} \pm 2$, 12 saat aydınlık/ 12 saat karanlık, %45-50 nem, 1 atmosfer basınca) alıştırılan denekler kuru kafeslerde barındırılacaklardır. Beslenmelerinde standart sıçan yemi ve şehir şebeke suyu kullanılacaktır.

3.1.Deney Grupları

Çalışmada 200–250 gr ağırlığında 8 haftalık 48 adet erkek Sprague-Dawley türü ratlar soliter böbrek modeli oluşturulan(1.- 2. ve 3. Grup) ve soliter böbrek modeli oluşturulmayan bilateral böbrekli(4.- 5. ve 6. Grup) ratlardan oluşan 2 ana grup kendi içerisinde Sham grubu (1. ve 4. Grup), iskemi-reperfüzyon(I-R) grubu(2. ve 5. Grup) ve tedavi grubu(3. ve 6. Grup) olmak üzere 3'er gruptan toplamda eşit sayıda 6 gruba ayrıldı.

- 1.Grup: Soliter böbrek modeli olan sıçanlarda Sham operasyonu(soliter Sham grubu)
- 2.Grup: Soliter böbrek modeli olan sıçanlarda I-R + %0.9NaCl(soliter I-R grubu)
- 3.Grup: Soliter böbrek modeli olan sıçanlarda I-R + SMFF tedavisi(soliter tedavi grubu)
- 4.Grup: Bilateral böbrekli sıçanlarda Sham operasyonu(bilateral Sham grubu)
- 5.Grup: Bilateral böbrekli sıçanlarda I-R + %0.9NaCl (bilateral I-R grubu)
- 6.Grup: Bilateral böbrekli sıçanlarda I-R + SMFF tedavisi (bilateral tedavi grubu)



3.2.Saflaştırılmış Mikronize Flavonoid Fraksiyonu Hazırlanışı ve Uygulanması

SMFF, çözelti olarak 25ml distile su içerisine 2gr daflon(Daflon 500 mg, Servier, Türkiye)konularak hazırlandı (98). Homojen çözünmenin tam olarak sağlanabilmesi amacıyla distile su içerisine katılmadan önce daflon havanda dövülerek toz haline getirildi. Ardından 2500 devirde 2 dakika karıştırıldı. Son olarak, sonic titreşim uygulandı. SMFF, 80mg/kg(1ml/kg) olacak şekilde oral gavajla verildi (98). I-R gruplarında %0,9NaCl'de, SMFF ile aynı miktar(1ml/kg) ve aynı yolla(oral gavaj) uygulandı.

3.3. Anestezi ve Cerrahi Prosedür

Anestezi için 70mg/kg ketamin hidroklorid ve 10mg/kg xylazin hidroklorid intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı. Gerekğinde ratların anestezi derinliğini sabit tutmak için ketamin (yarı dozda, 35 mg/kg) refleks yanıtlara (pensetle ayağa ağırlı uyaran verilmesi-pedal refleks, palpebral ve korneal refleksler) bakılarak tekrarlandı.

3.3.1 Soliter Böbrek Modeli Oluşturulması

Soliter böbrek modeli oluşturmak için 1. 2. ve 3. Gruplar tarif edildiği şekilde anestezi altına alındıktan sonra, karın cildi traş edilerek % 10 povidoniyod ile temizlenerek abdomen 2cm'lik üst orta hat insizyonu ile açılarak batına girildi. Bağırsaklar ekarte edilerek sağ renal pedikül bulundu. Sağ böbrek pararenal yağlı dokudan serbestlendikten sonra renal pedikül bağlanıp kesildi ve sağ nefrektominin tamamlanması suretiyle soliter böbrek modeli oluşturuldu. Batın açıkken zorunlu kaybedilen sıvıyı yerine koymak amacıyla 2-3ml steril serum fizyolojik intraperitoneal olarak verildi. İnsizyon kas ve cilt ayrı ayrı sütüre edilerek kapatılıp, %10 povidoniyod ile dezenfeksiyon yapıldı. İşlem sonrası karşı böbrekte hipertrofi gelişiminin olabilmesi amacıyla 30 gün beklendi.

3.3.2. SMFF Tedavisinin Verilmesi

I-R oluşturulması amaçlı cerrahi işlemden önce, 3 gün boyunca, her gün 1 kez ve işlem günü işlemden yaklaşık 1 saat önce olacak şekilde, daha önce tarif edildiği şekilde, hazırlanmış 80mg/kg(1ml/kg) SMFF tedavisi oral gavaj yoluyla tedavi gruplarına(3. ve 6.Grup) verildi (82). I-R gruplarında(2. ve 5.Grup) ise 1ml/kg(SMFF ile aynı miktarda) %0.9NaCl tedavi gruplarında olduğu gibi cerrahi işlemden önce 3 gün boyunca, her gün 1 kez ve işlem günü işlemden yaklaşık 1 saat önce olacak şekilde, oral gavaj yoluyla verildi.

3.3.3.İskemi – Reperfüzyon Oluşturulması

Soliter böbrek modellerinin oluşturulmasından 30 gün sonra aynı anestezi protokolü kapsamında tüm gruplara işlem yapıldı. İlk cerrahi işlemde farklı olarak rektus kası sol lateral kenarına denk gelecek şekilde yaklaşık 2-3cm'lik abdominal insizyon yapılarak batına girildi. Böylece bağırsakların daha kolay ekartasyonu ve sol renal pediküle daha kolay ulaşılması sağlandı.

İskemi sağlanması için pararenal yağlar serbestlenmeden sol renal pedikül diseke edildi (Resim-1). Sol renal pedikülün posteriorundan 10cc'lik enjektör kapağı geçilerek renal arter ve venin kompresyonu sağlandı. Ardından enjektör kapağı 360° döndürülerek renal arterin torsiyone edilmesi suretiyle iskemi sağlandı (Resim-2).

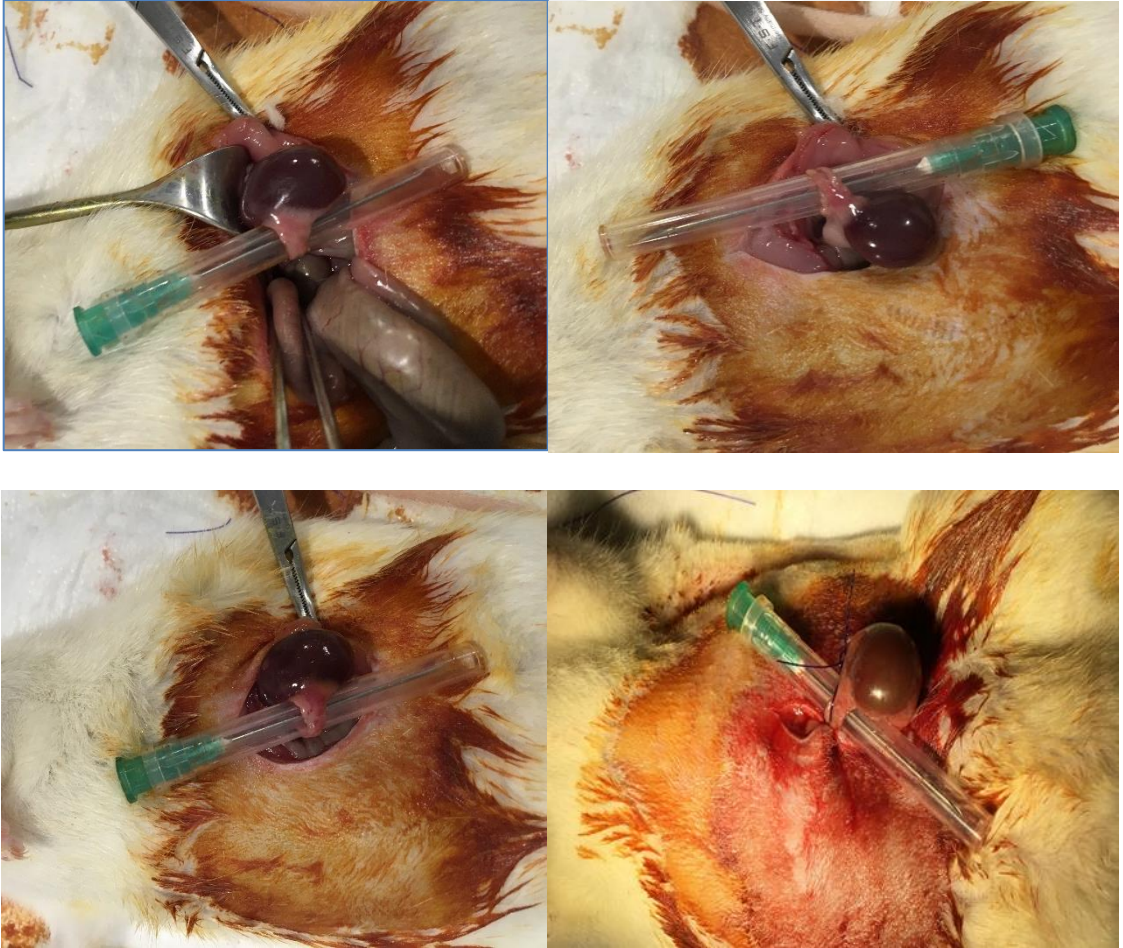
Sham operasyonu gruplarında(1.grup ve 4.grup) iskemi yapılmaksızın, 45dk iskemi süresince cerrahi stres oluşumu sağlanılıp sonrasında insizyon kapatıldı. 24 saat reperfüzyon süresi beklendi.

I-R gruplarında(2.grup ve 5.grup) ve SMFF tedavisi gruplarında(3.grup ve 6.grup) 45dk iskemi süresi içerisinde sol böbrek alt pol parsiyel nefrektomi yapıldı (Resim-3). 45dk iskemi süresi sonunda enjektör kapağı alınıp, renal arter detorsiyone edildikten sonra, reperfüzyonun başlaması ile birlikte alt pol rezeksiyonunun olduğu kısımda meydana gelen hemoraji, termokoter kullanılarak koagüle edilmek suretiyle kontrol edildi (Resim-3). Kanama olmadığından emin olunduktan sonra insizyon hattı kapatılarak, 24 saat reperfüzyon süresi beklendi.

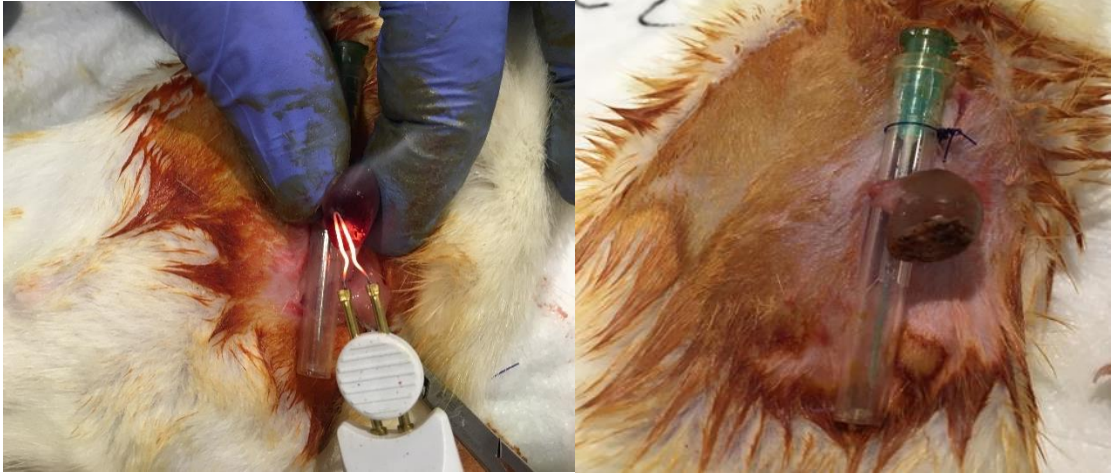
3.Gruptan bir rat anestezi altında iken solunum depresyonu ile ex oldu. 2.grup, 5.grup ve 6.gruptan 1'er rat, uyandıktan sonra 24 saatlik reperfüzyon süresini doldurmadan ex oldu. 2. – 5. ve 6.Gruptaki ratlara ölüm nedeni hakkında fikir sahibi olmak amacıyla otopsi yapıldı. 2 ratta akciğer ödemi, 1 ratta ise akciğer ödemiyle birlikte alt pol çevresinde minimal renal hematoma saptandı.



Resim-1: Renal arter ve venin diseksiyonu ve dönülmesi



Resim-2: Soldan sağa sırasıyla enjektör kapağının renal arter ve ven altına yerleştirilerek kompresyon sağlanması; Enjektör kapağının 180°döndürülmesi; Enjektör kapağının 360° döndürülmesi ile renal arter ve venin torsiyoune edilmesi;Enjektör kapağının iskemi süresince cilde tesbiti



Resim-3: Parsiyel nefrektomi sonrası termokoter ile kanama kontrolü

3.3.4. Örnek Alımı ve Sakrifikasyon

Tüm gruplardan, 24 saatlik reperfüzyon süresini tamamladıktan sonra anestezi altında, parsiyel nefrektomi sonrası kalan rezidü böbrek dokusu ve intrakardiyak kan alındı. Örneklerin alınması tamamlanan rat anestezi altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi.

3.4. Biyokimyasal Parametreler

3.4.1. Kan Analizleri

Tüm hayvanlardan oksidatif stres, DNA hasarı ve enflamasyonu belirlemek için heparinize tüplere intrakardiyak alınan kan örnekleri hemen buzlu su içine konularak laboratuara ulaştırıldı. Örnekler öncelikle DNA hasar ölçümü için mononükleer lökositlerin seperasyonunda kullanıldı. Kalan örnekler daha sonra 3000 rpm de 5 dakika santrüfuj edilerek ayrılan plazma oksidatif stres parametrelerinin ölçümünde kullanılmak üzere 80°C derin dondurucuda saklandı.

Mononükleer Lökositlerin Seperasyonu

Bir ml histopaque-1077 üzerine bir ml taze heparinize kan yavaşça konup 2100 rpm ve 250°C'de 30 dakika santrifuj edildi. Orta tabakada biriken mononükleer lökositler pipet yardımıyla alınıp bir ml tuzlu fosfat tamponu (pH=7.4) ile karıştırıldıktan sonra 170 rpm ve 250°C'de 10 dakika santrifuj edildi. Üstteki süpernatant atılıp pellet tuzlu fosfat tamponu (pH=7,4) ile 106 mononükleer lökosit/μl olacak şekilde dilüe edildi.

3.4.1.1.Comet Assay (alkali mononükleer hücre elektroforezi) Yöntemi ile DNA Hasar Tayini

Yöntemin Prensibi

Comet assay yöntemi alkali pH da farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı göç etmeleri esasına dayanmaktadır. Tek hücreler veya çekirdekçikler agarozta yerleştirilir ve lizisten sonra zarar görmemiş DNA'lar taşınma sırasında comet (kuyruk) oluşturmazlar. Oysa DNA fragmente olmuşsa fragmentler (nükleik asitler) farklı moleküler ağırlıklara ve farklı elektrik yüklerine sahip olacaklarından elektriksel alanda farklı hızlarda hareket ederek kuyruk şeklinde bir görüntü oluştururlar (99,100).

Yönteminin Uygulanışı

Slaytların Hazırlanması

%1,0 'lık NMP agaroz jel hazırlanarak 80µl jel kenarları buzlanmış lam üzerine damlatıldı ve üzeri lamel ile kapatılarak buzdolabında (2-4 °C) 5 dakika bekletildikten sonra lamelleri kaldırıldı. PBS (Fosfat buffered saline) ile mm³ te 104 hücre olacak şekilde dilüe edilmiş mononükleer hücrelerden 10 µl alınarak 80 µl %0,5'lik low melting point (LMP) agaroz jel (37°C) ile karıştırılarak birinci tabaka üzerine tabakalandırıldı ve tekrar lamel ile kapatılarak buzdolabında donması için 5 dakika bekletildi. Üçüncü aşamada da aynı konsantrasyonda LMP agaroz jel hazırlanarak ikinci tabakanın üzerine ince bir tabaka halinde tabakalandırılarak slaytların hazırlanması tamamlandı (99,100).

Lizis aşaması

Hazırlanan lamalar yaklaşık bir saat süre ile yüksek konsantrasyonda tuz ve deterjan içeren soğuk lizis solüsyonunda bekletildi. Lizis solüsyonunun içeriği 100 mM EDTA, 2,5 M NaCl, 10 mM trizma base ve %1 oranında triton X-100'den oluşmaktadır. Bu solüsyonun pH 'sı 10'a ayarlandı. Lizis tamponu ile hücre ve çekirdek zarı lizise uğratıldı (99,100).

Elektroforez Tamponu

Elektroforezde yürütmeden önce DNA zincirlerinin ayrılması için slaytlar alkali elektroforez tamponunda (1mM EDTA ve 300 mM sodyum hidroksit pH <13) 20–30 dakika inkübasyona bırakıldı (99,100).

Elektroforezde Yürütme

Alkali elektroforez tamponunda inkübasyon tamamlandıktan sonra DNA'lar bu tampon çözeltisi içerisinde 300 mA, 14 volt'luk elektriksel alanda ve 5–25°C'de 30 dakika yürütüldü (99,100).

Nötralizasyon

Elektroforezde yürütme işlemi tamamlandıktan sonra alkali tampon çözeltisini ortamdaki uzaklaştırmak için slaytlar 3 dk süre ile 3 kez nötralizasyon tamponu ile (0.4 M Tris-HCL, pH 7.5) yıkandı (99,100).

Boyama

Nötralizasyon tamamlandıktan sonra etidyum bromit boyası ile (5mg/ml) boyandı(3-4). Herbir slayt için 20 mL boya slayt üzerine damlatıldıktan sonra lamel ile üzeri kapatılarak 20 büyütme floresan mikroskop ile (Eksitasyon DB: 546 nm, Emisyon DB: 20 nm) DNA görüntüsü değerlendirildi.

Analiz

DNA'daki hasarların kuyruklu yıldız görüntüleri floresan mikroskopunda ortalama 50 hücre sayılarak comet ölçüm programı ile değerlendirildi.

3.4.1.2.Total Antioksidan Kapasite (TAK)

Prensip:

Erel tarafından(101) geliştirilen tam otomatik bir yöntem olup, güçlü serbest radikallere karşı vücudun total antioksidan kapasitesini ölçen bir metoddur. Fe^{2+} -o-dianisidine kompleksi hidrojen peroksit ile Fenton tipi reaksiyon oluşturarak OH radikalini oluşturur. Bu güçlü reaktif oksijen türü indirgen düşük pH'da renksiz o-dianisidine molekülü ile reaksiyona girerek sarı-kahverengi dianisidyl radikallerini oluştururlar. Dianisidyl radikalleri ileri oksidasyon reaksiyonlarına katılarak renk oluşumu artmaktadır. Ancak örneklerdeki antioksidanlar bu oksidasyon reaksiyonlarını bastırarak renk oluşumunu durdurmaktadırlar. Bu reaksiyon otomatik analizörde spektrofotometrik olarak ölçülerek sonuç verilmektedir (101).

3.4.1.3.Total Oksidant Seviye (TOS)

Prensip:

Örnekte bulunan oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidine kompleksini ferrik iyonla oksitlerler. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık üç katına çıkarmaktadır. Ferrik iyonlar asidik ortamda xlenol orange ile renkli bir kompleks oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülmektedir ve tam otomatik kolorimetrik bir yöntemdir (102).

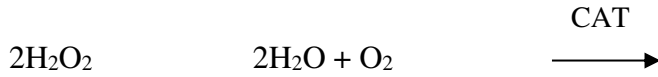
3.4.1.4.Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

Total Oksidatif Stres (TOS) / Total Antioksidan Kapasite (TAK) şeklinde bölünerek Oksidatif Stres indeksi (OSİ) hesaplandı (103).

3.4.1.5.Katalaz (CAT)

Prensip

Katalaz H₂O₂'nin su ve moleküler oksijene yıkımını katalizler. H₂O₂'nin ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak 230 nm'de H₂O₂'nin yıkım hızı spektrofotometrik olarak ölçülür (104).



Ayırçılar

- Tris-EDTA tamponu (1 M tris-HCl-5 mM EDTA, pH 8.0): 12.1 g tris, 168 mg disodyum-EDTA 80 ml suda çözülür, HCl ile pH 8'e ayarlanır ve hacim 100 ml'ye tamamlanır.
- 10 mM hidrojen peroksit
- % 95 etanol

Deneyin Yapılışı

Deneyin yapılmasından hemen önce 1:20 eritrosit hemolizati, □-merkaptotanol-EDTA çözeltisi ile 100 kez sulandırıldı. Katalaz ve hidrojen peroksitin oluşturabileceği katalazın inaktif şekli olan kompleks II'nin yıkımını sağlamak üzere, sulandırılmış hemolizata 0.02 ml/1 ml hemolizat olacak şekilde etanol eklendi. Bir reaksiyon küvetine, 0.05 ml tris-

EDTA tamponu, 0.9 ml 10 mM hidrojen peroksit, 0.03 ml distile su konulup karıştırıldıktan sonra 37°C de 10 dakika tutuldu. Daha sonra bu karışıma 0.02 ml etanollü hemolizat eklendi ve 230 nm’de absorbans değişimi izlendi. Ayrıca körü için hidrojen peroksit yerine su kullanıldı.

Hesap

Enzim aktivitesi hidrojen peroksitin 230 nm’deki ekstinksiyon katsayısı ($0.071 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak hesap edildi. Sonuçlar, gram hemoglobin başına enternasyonal ünite (IU/g Hb) olarak belirtildi.

$$\text{CAT Aktivitesi (U/ml)} = \frac{\Delta\text{OD/ dak}}{0,071} \times \frac{V_{\text{Toplam}}}{V_{\text{Örnek}}}$$

$\Delta\text{OD} = \text{Optik Dansite Değişimi}$

0,071 = 1 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ’nin 1 cm’lik ışık yolunda verdiği OD değeri

$V_{\text{Toplam}} = \text{Toplam hacim}$

$V_{\text{Örnek}} = \text{Hemolizat hacmi}$

$$\text{CAT Spesifik Aktivitesi} = \frac{\text{CAT Aktivitesi}}{\text{Hb değeri}}$$

3.4.1.6.Plazma Malondialdehit (MDA)

Prensip

Lipit peroksidasyonu ürünleri ile (başlıca MDA) tiyobarbitürik asit (TBA) arasındaki reaksiyon sonucu oluşan kırmızı renk spektrofotometrik olarak ölçüldü. TBA ile reaksiyona girerek aynı rengi veren suda çözünür maddelerin ortamdan uzaklaştırılması için, serum lipidleri proteinlerle birlikte fosfotungstik asit/sülfürik asit ile çöktürülür.

Ayır  lar

- 0.084N H₂SO₄
- %10 Fosfotunstik Asit (PTA)
- TBA Reaktifi: Eşit hacimde %0.67 TBA ve Asetik asit karşımı.
- N – Bütanol
- TMP (Tetrametoksipropan std.)

Deneyin Yapılış

Cam bir tüpe 0,3 mL serum konularak üzerine 2.4 ml 0.084 N H₂SO₄ ilave edildi. 0.3 ml %10 PTA eklenerek 5dk beklenir. 1600 g de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılır ve sedimente 4mL distile su ve 1 mL TBA eklenir. Su banyosunda 95  C’de 60dk tutulduktan sonra soğutulup 3 ml N-bütanol ilave edildi. İyice karıştırıldıktan sonra 1600g’de 15dk santrifüj edildi ve bütanol fazının absorbandsı 532 nm de okundu. Blank olarak distile su ile TBA karşımı kullanıldı.

Hesap

MDA için saptanmış optik dansite değeri (1,56 x 10⁶ M⁻¹ cm⁻¹) kullanılı olarak sonuçlar hesaplandı ve nmol MDA/mL plazma olarak ifade edildi (105).

3.4.1.7. Protein Karbonilleri (PCO)

Prensip

Oksidan etki sonucu protein yapılarında olu    an karbonil grupları 2,4-dinitrofenilhidrazin ile reaksiyona sokulup olu    an ürünün verdiği absorbands spektrofotometrik olarak hesaplanır.

Ayır  lar

- %20 Trikloroasetik asit (TCA) ve %10 TCA
- 2,4-DNPH (19,8 mg/ 10 ml 2 N HCl içinde)
- 1N NaOH     zeltisi

Deneyin Yapılışı

İlk önce 250µl örnek alınır ve 500µl %20 TCA ile karıştırılır. 11,000 x g 'de santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı. Çökelti üzerine 500µl DNPH ilave edildi. Oda sıcaklığında ara sıra karıştırılarak 1 saat inkübe edildi. Üzerine 500µl %20 TCA eklendi, 2-3 dakika bekletildikten sonra, 11,000 x g' de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı, çökelti %10 TCA ile yıkandı. Tekrar santrifüj edilerek, bu işlem iki kez tekrarlandı. Pellete 1 ml 1N NaOH eklendi ve 37°C'de tutularak çözülmesi sağlandı. Oluşan rengin absorbansı 360 nm'de okundu. Kör olarak DNPH yerine 2 N HCl kullanıldı.

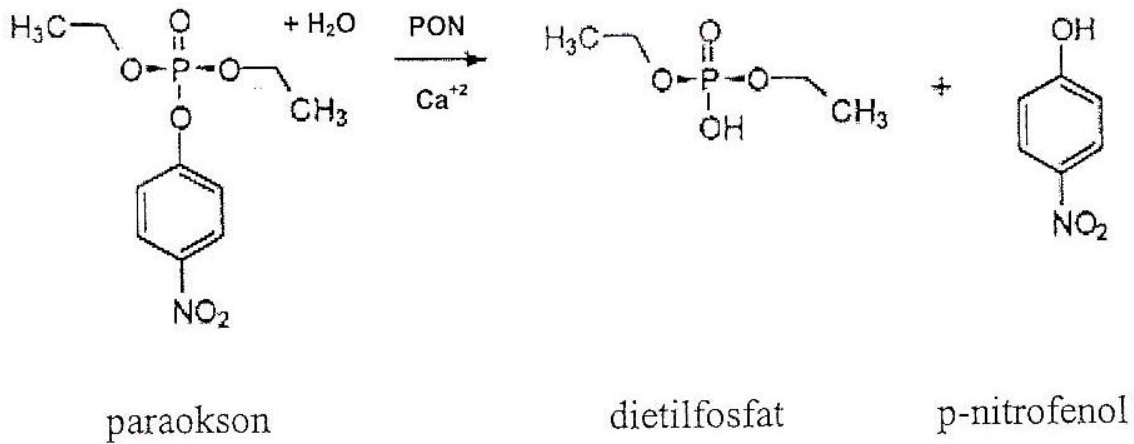
Hesap

Sonuçlar protein karbonilleri için ekstinksiyon kat sayısı olan 22,000 M⁻¹ cm⁻¹ kullanılarak µmol/mg protein olarak ifade edildi (106).

3.4.1.8. Paraoksonaz Aktivitesinin Ölçümü(PON1)

Paraoksonazaktivitesi(PON1) , Furlong(107,108)ve Mackness'in(109) metodları kullanılarak ölçüldü. Paraoksonaz'ın katalizlediği reaksiyon aşağıda görüldüğü gibidir.

Aril dialkil fosfat + H₂O → Dialkil fosfat + aril alkol



Paraoksonaz enzim aktivitesi ölçümünde substrat olarak paraokson (0,0- diethy -0-nitropheny phosphate), arilesteraz ölçümünde ise substrat olarak fenil asetat kullanılmıştır.

Paraoksonaz aktivite ölçümünde 5 mM CaCl₂ ve 7 mM paraokson ihtiva eden pH=8 olan 100 mM Tris- Cl tamponu kullanıldı ve Reaktif 1 (R₁) olarak kabul edildi. Numune hacminden 10µL reaktif 'den 220µL alınarak abbott aeroset otoanalizör cihazına tatbik edilerek çalışıldı. Paraoksonaz'ın enzimatik hidrolizi sonucu oluşan p-nitrofenol'ün 412 nm deki dakikalık absorbans oluşumu kaydedildi. Molar absorbsiyon katsayısı 18290 (ε) alınarak (107,108), aktivite için 1 ünite, 1 mikromol p-nitrofenol/ml serum/dk olarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$IU / lt (\mu mol / dk/L) = \frac{\Delta A/dk \times T.V (ml) \times 10^6}{\epsilon \times Işık yolu \times N.V (ml)} = \frac{\Delta A/dk \times (T.V \times 10^6)}{\epsilon \times Işık yolu \times N.V}$$

A: Absorbans

ΔA/dk : Dakikalık absorbans artışı

T.V: Deney tüpündeki toplam sıvı miktarı

10⁶: Sonuçları µmol /dk/L = U/L'ye çevirme katsayısıdır.

ε : Ekstinsiyon katsayısı: Reaksiyon sonunda okunan maddenin molar absorbtivite katsayısı olup sabit bir değerdir.

ε = A/l x C'dir. A= çözeltinin gerçek absorbansı, l= ışık yolu (cm), C= çözeltinin konsantrasyonu (mol/L) dir.

Işık yolu: Okuma küvetinin çapı (cm cinsinden)

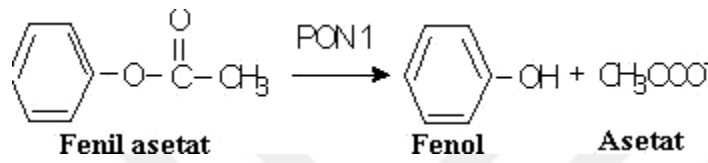
N.V: Reaksiyona katılan numune hacmi.

3.4.1.9.Arilesteraz(ARES) Aktivitesinin Ölçümü

Arilesteraz aktivitesi(ARES) ölçümleri için ise 2 mM CaCl₂ ihtiva eden 100 mM Tris- HCl; pH=8 tamponu kullanılarak; substrat olarak paraokson yerine son konsantrasyonu 13 mM olacak şekilde fenilasetat ilave edilmistir ve arilesteraz'ın enzimatik hidrolizi sonucu oluşan fenol 270 nm de Jasco V-530 UV/VİS spektrofotometresinde dakikalık fenol oluşum absorbansı ölçülmüştür. Molar absorbsiyon katsayısı 1310 (ε) alınarak (107,108,109), arilesteraz aktivitesi için 1 ünite, 1 mikromol fenol/ml serum/dk. olarak tanımlanmıştır. Bu

çalışmada numune volümü 400 kat dilüe edilerek çalışılmıştır. Sonuçlar yine paroksanazdaki enzim aktivitesi formülüne göre hesaplandı ve U/L olarak değerlendirildi.

Reaktif 1 tekrar hazırlanıp fenotipik ayırım için içerisine 1M NaCl ilave edilerek paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesi için tekrar çalışıldı. Sonuçlar yine yukarıdaki gibi hesaplandı.



3.4.1.10. Plazma Tümör Nekrozis Faktör Alfa ve İnterlökin 1 Beta Analizleri

Plazma örnekleri, Rat İnterlökin 1 Beta(IL-1 β) (Eastbiopharm, Cat. No: CK-E30419), ve Rat Tümör Nekrozis Faktör Alfa(TNF- α) (Eastbiopharm, Cat. No: CK-E30635) ticari ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) kitleri kullanılarak Thermo marka Varioskan Multireader'da spektrofotometrik olarak ölçümleri yapıldı.

3.4.2. Doku Analizleri

Deney sonunda; sıçanlardan alınan doku örnekleri tartılıp, 1/5 oranında soğuk %1,15 M KCl solüsyonu ile 14000 devirde 30 dakika homojenize edildi. Daha sonra +4 °C'de 10000 x g'de 30 dakika santrifüj edilerek süpernatantları ayrıldı. Süpernatantlarda interlökin 1 beta, interlökin 6, tümör nekrozis faktör alfa ile total antioksidan kapasite ve total oksidan düzeyleri ölçüldü. Protein tayini Lowry yöntemine göre yapıldı.

3.4.2.1. Doku Total Antioksidan Kapasite (TAK) Analizleri

Total antioksidan durum ölçümü Erel yöntemine göre yapıldı. Yöntemin prensipi, örnekteki antioksidanların, koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikalini, renksiz ABTS formuna indirgemesine dayanır (102). Standartlar, doku yerine 0 (standart 1) ve 1 (standart 2) milimolar Trolox ekivalan/ litre (mmol Trolox Eq/L) konsantrasyonlarındaki standart çözeltileri kullanılarak çalışıldı. İkinci ve ilk ölçümler arasındaki farktan absorbans değişimi

(Δ Abs) hesaplandı. Dokulardaki TAS düzeyleri (mmol Trolox Eq/L) kitte belirtilen aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\text{TAS} = (\Delta\text{Abs standart 1}) - (\Delta\text{Abs numune}) / (\Delta\text{Abs standart 1}) - (\Delta\text{Abs standart 2})$$

3.4.2.2.Doku Total Oksidan Status (TOS) Analizleri

Total oksidan durum ölçümü ölçümü Erel yöntemine göre yapıldı. Yöntemin prensipi, örnekteki oksidanların ferröz iyon-şelatör kompleksini ferrik iyonlara okside etmesine ve oluşan ferrik iyonların asidik ortamda kromojen madde ile renk oluşturması esasına dayanır (103). Standart, doku yerine 20 mikromolar hidrojen peroksit (H_2O_2) ekivalan/ litre (mmol H_2O_2 Eq/L) içeren dilue standart çözeltisi kullanılarak çalışıldı. İkinci ve ilk ölçümler arasındaki farktan absorbans değişimi (Δ Abs) hesaplandı. Dokulardaki TOS düzeyleri (mmol H_2O_2 Eq/L) kitte belirtilen aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\text{TOS} = (\Delta\text{Abs doku}) / (\Delta\text{Abs standart}) \times 20$$

Doku Oksidatif Stresi İndeks Analizi (OSI)

$$\text{OSI} = [(\text{TOS, 1mol H}_2\text{O}_2\text{Eq. g1 protein}) / (\text{TAS, 1mol Trolox Eq. g1 protein})].$$

3.4.2.3.Doku Tümör Nekrozis Faktör Alfa ve İnterlökin 1 Beta Analizleri

Homojenize edilmiş doku örneklerinde Rat İnterlökin 1 Beta (Eastbiopharm, Cat. No: CK-E30419), ve Rat Tümör Nekrozis Faktör Alfa (Eastbiopharm, Cat. No: CK-E30635) ticari ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) kitleri kullanılarak Thermo marka Varioskan Multireader'da spektrofotometrik olarak ölçümleri yapıldı.

3.5.Histopatolojik değerlendirme

Histomorfolojik inceleme için sıçanlardan elde edilen böbrek dokuları, ışık mikroskopik inceleme için %10'luk tamponlu formaldehid içinde fikse edildikten sonra parafine gömüldü. Daha sonra hazırlanan parafin bloklardan 4-5 μm kalınlığında kesitler alındı. Elde edilen kesitler hematoksilin-eozin boyası ile boyandı. Boyama işleminden sonra kesitler ışık mikroskopik olarak incelendi. Deney gruplarına ait böbrek dokusu kesitlerinde

ışık mikroskopik olarak; mononükleer hücre infiltrasyonu, eritrosit ekstrasvazasyonu, renal korpüskül morfolojisi, proksimal tübüluslarda vakuolizasyon, fırçamsı kenar kaybı, tübüler dilatasyon, kast formasyonu değerlendirildi.

Kesitlerden elde edilen görüntüler değerlendirilirken semikantitatif olarak tübülointertisyel hasar için (mononükleer hücre infiltrasyonu, eritrosit ekstrasvazasyonu, renal korpüskül morfolojisi, proksimal tübüluslarda vakuolizasyon, fırçamsı kenar kaybı, tübüler dilatasyon, kast formasyonuparametreleri için) skorelama yapıldı. Skorelama 0 = hiç yok, 1 = % 0-10, 2 = % 11-25, 3 = % 26-45, 4 = % 46-75, 5 = % 76-100 olarak uygulandı (110). Her grup, bütün parametreler için ayrı ayrı yapılan hasar skorelamasının toplamının ortalaması üzerinden değerlendirildi.

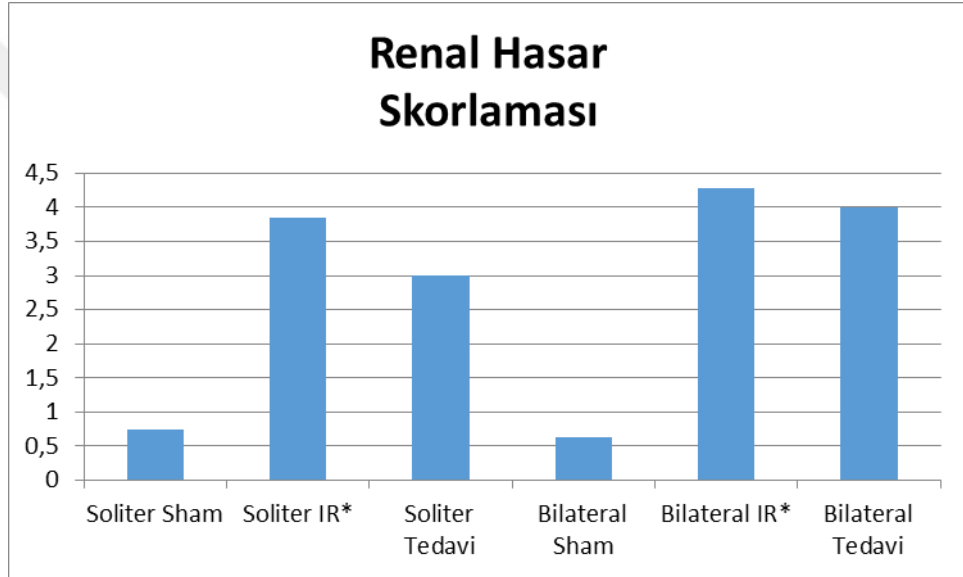
3.6. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmamız sonucunda elde edilen verilerin değerlendirmesinde SPSS programı kullanılmış, gruplar arası $p < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edilmiştir. Histopatolojik hasar skorunun değerlendirilmesinde Kruskal-Wallis non-parametrik varyans analizi kullanıldı. Doku ve serum örneklerinin sonuçları ile ilgili diğer biyokimyasal değerlerin yorumlanmasında ise One way ANOVA-posthocTukey testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1.Histopatolojik Bulgular

Soliter böbrek gruplarının kendi içinde karşılaştırılmasında Sham grubuyla(1.Grup), I-R grubu(2.grup) arasında iskemiye bağlı renal hasar skorlamasında, I-R grubundaki daha yüksek hasar skoru klinik anlamlı saptandı ($p<0.014$). Ancak tedavi grubunda(3.Grup) I-R grubuna(2.Grup) göre hasar skorunda azalma saptanmasına karşın, bu değişim klinik olarak anlamlı saptanmadı ($p>0.05$).

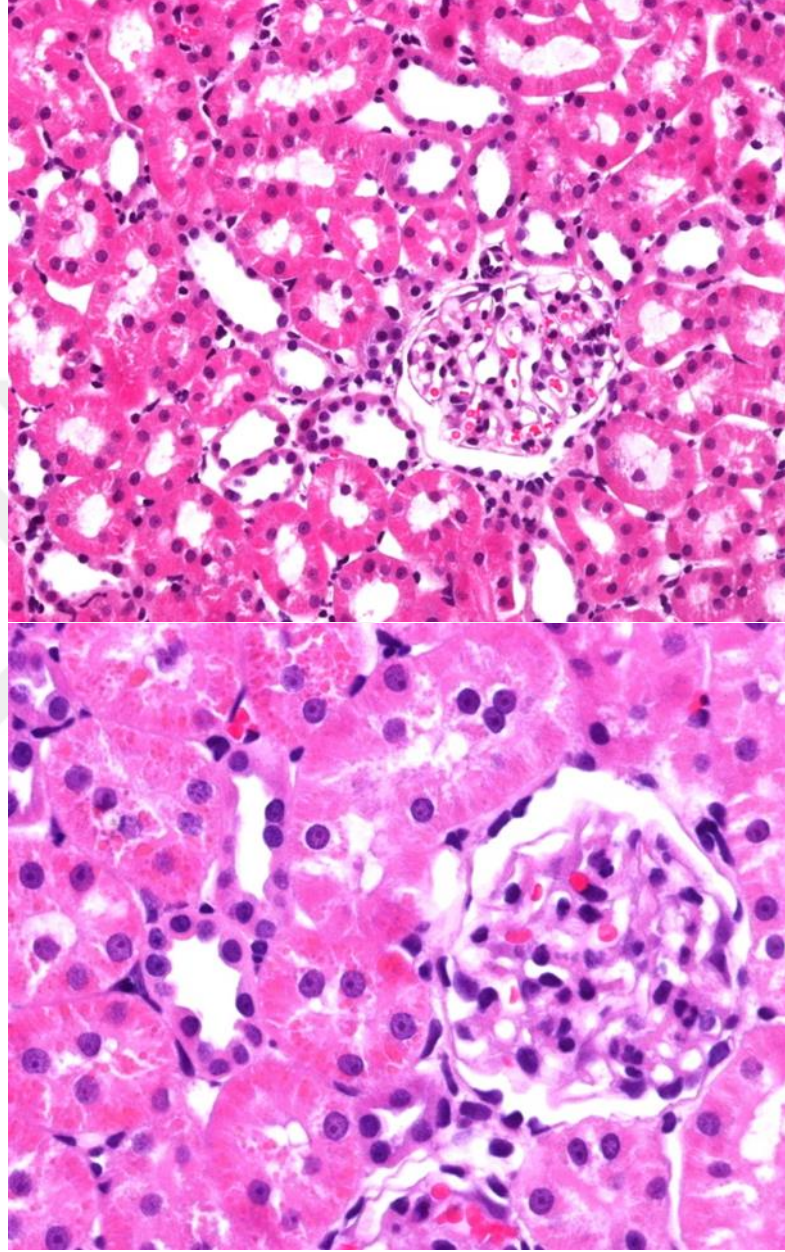


Grafik-1: Böbrek histopatolojik incelemesinde ortalama renal hasar skorları

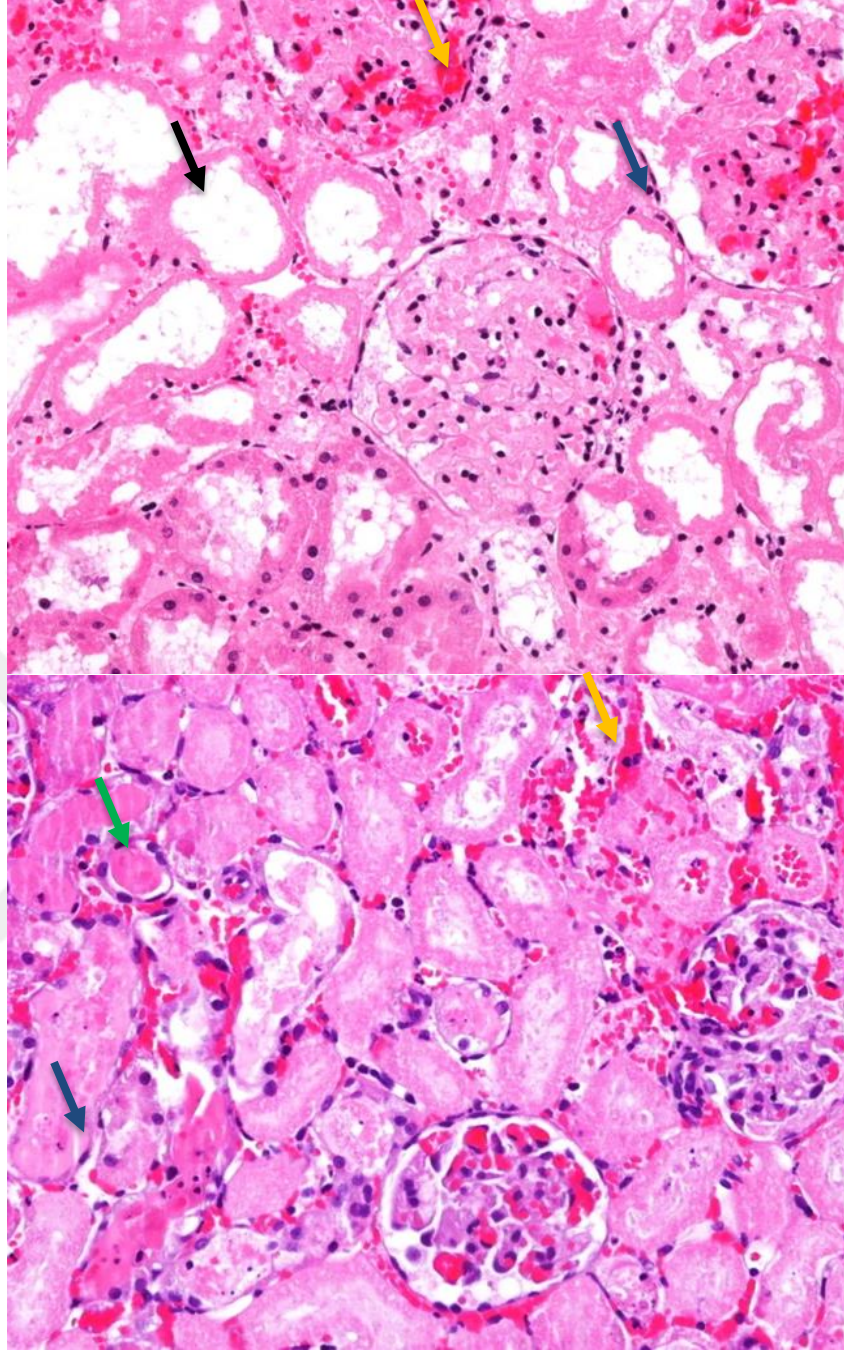
(*) →SoliterI-R grubu ile Soliter Sham grubu karşılaştırıldığında ($p<0.05$), Bilateral I-R grubu ile Bilateral Sham grubu karşılaştırıldığında ($p<0.01$)

Bilateral böbrek gruplarının kendi içerisinde karşılaştırılmasında, soliter böbrek gruplarıyla benzer olarak Sham grubuyla(4.Grup), I-R grubu(5.grup) arasında iskemiye bağlı renal hasar skorlamasında I-R grubunda elde edilen daha yüksek hasar skoru klinik anlamlı saptandı ($p<0.001$). Ancak tedavi grubunda(6.Grup) I-R grubuna(5.Grup) göre düşük olan hasar skoruklinik olarak anlamlı saptanmadı ($p>0.05$).

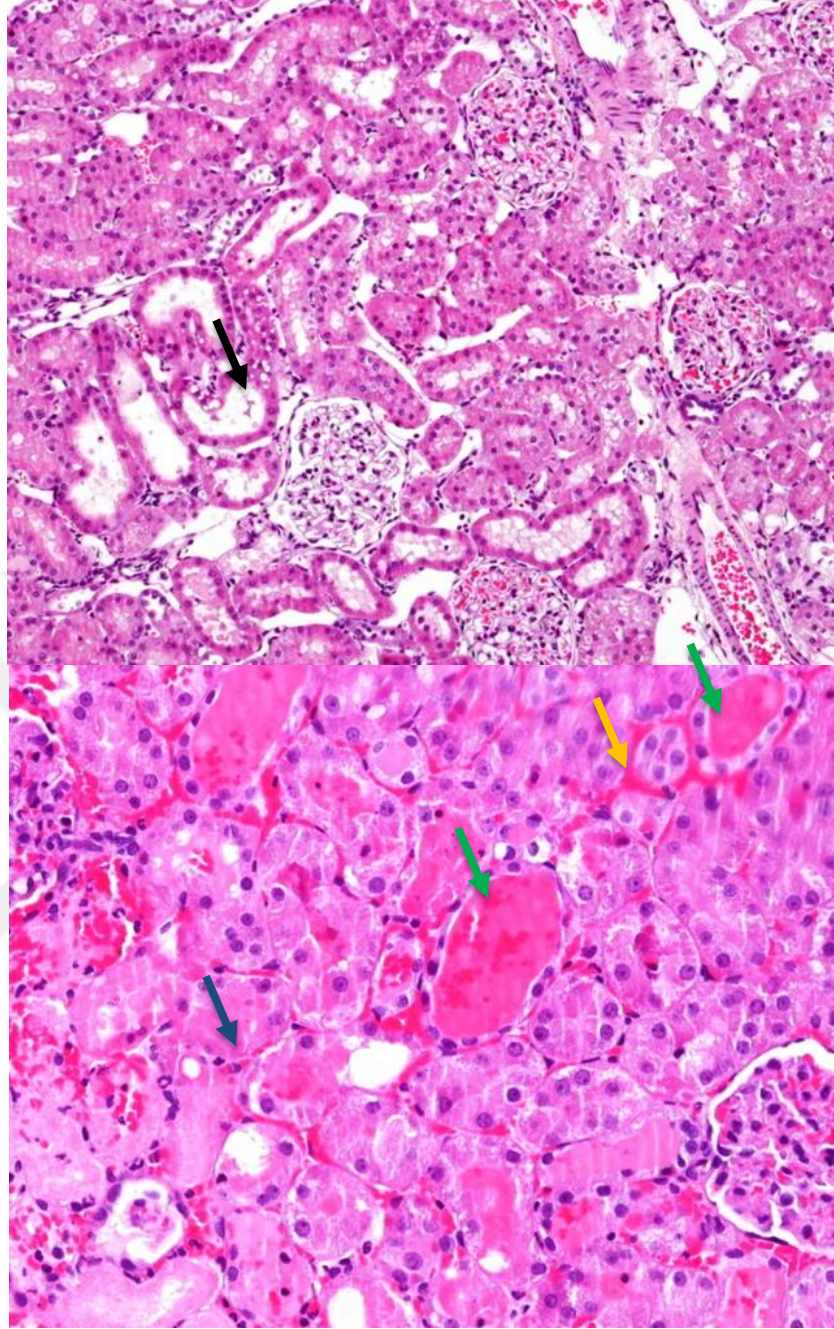
Bilateral böbrek grupları ile soliter böbrek grupları birbirleri ile karşılaştırıldığında, Sham gruplarının(1.Grup ve 4.Grup), I-R gruplarının(2.grup ve 5.Grup) ve tedavi gruplarının(3.Grup ve 6.Grup) arasında fark saptanmadı(p:1, p:1, p:1).



Resim-4: Sham gruplarına ait histopatolojik kesit örnekleri (Kesitlerde herhangi bir hücre infiltrasyonu, tübüler değişim ve fırçası kenar kaybı gözlenmedi)



Resim-5: I-R gruplarına ait histopatolojik kesit örnekleri (Tübüllerde gözlenen ileri derecede tübüler atrofi(mavi ok), tübüler dilatasyon ve vakuolizasyon(siyah ok) ile tübüllerde belirgin proteinöz madde birikimi(yeşil ok) ile tübül lümeninde hücre debrisleri ve eritrosit ekstrasvazasyonu(sarı ok))

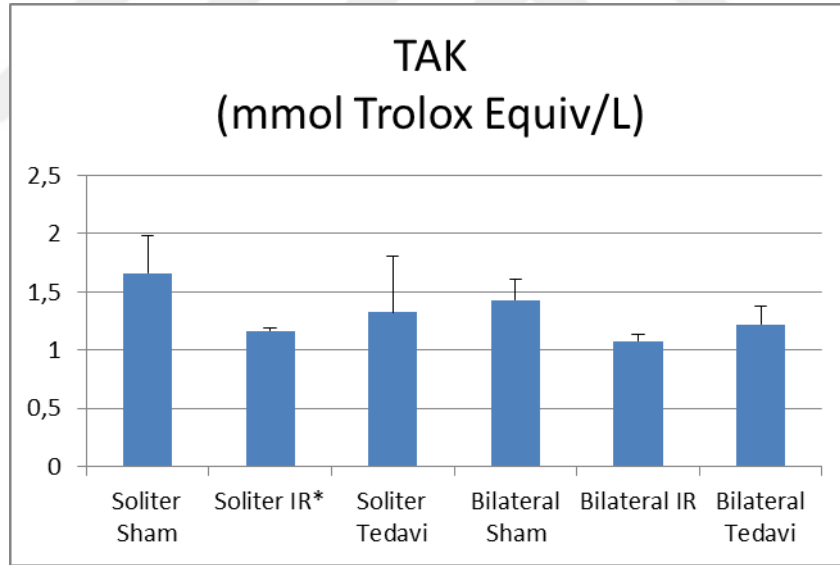


Resim-6: Tedavi gruplarına ait histopatolojik kesit örnekleri (Tübüllerde I-R gruplarına göre daha hafif derecede tübüler atrofi(mavi ok), tübüler dilatasyon ve vakuolizasyon(siyah ok) ile tübüllerde görece azalmış proteinöz madde birikimi(yeşil ok) ve eritrosit ekstrasvasyonu(sarı ok))

4.2.Biyokimyasal Bulgular

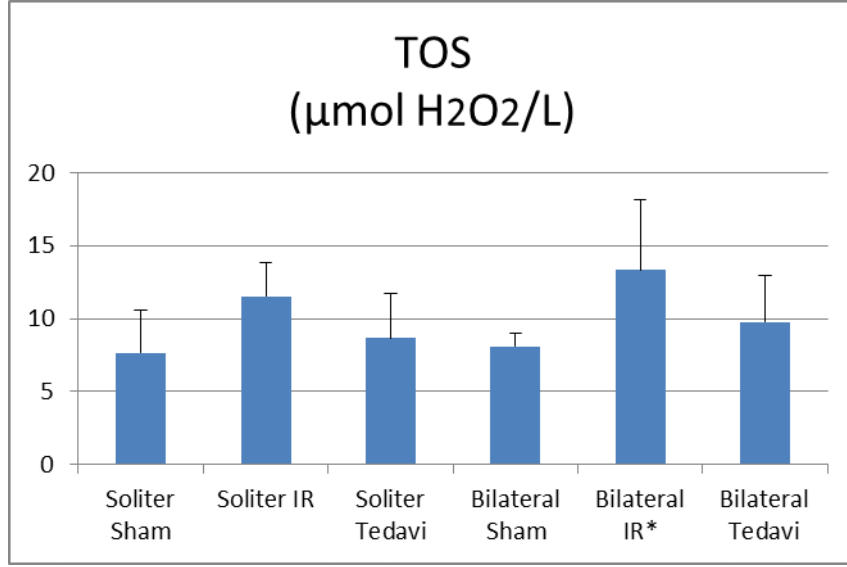
4.2.1.Serumda bakılan oksidatif stres ve inflamatuvar parametrelerin bulguları

Soliter böbrek gruplarının kendi içinde karşılaştırılmasında I-R grubunda(2.grup) TAK(p:0.007), OSI(p:0.015), PON1(p<0.001), ARES(p<0.001) CAT(p:0.006), MDA(p:0.002), PCO(p<0.001), DNA hasarı(p<0.001) IL-1 β (p<0.001) ve TNF- α (p:0.001) değerlerindeki değişim Sham grubuna(1.Grup) göre anlamlı saptanırken, TOS(p:0.166) değerindeki değişim anlamlı saptanmamıştır. Tedavi grubunda (3.grup) I-R grubuna(2.grup) göre TAK(p:0.840), TOS(p:0.5), OSI(p:0.705),PON1(p:0.426), CAT(p:0.424), MDA(p:0.669) ve TNF- α (p:0.275)değerlerinde beklenen anlamlı düzelme gerçekleşmemiştir. Tedavi grubunda ARES(p:0.018), PCO(p:0.017), DNA hasarı(p<0.001) ve IL-1 β (p:0.021) değerlerindeki değişim klinik olarak anlamlı düzeyde saptanmıştır.



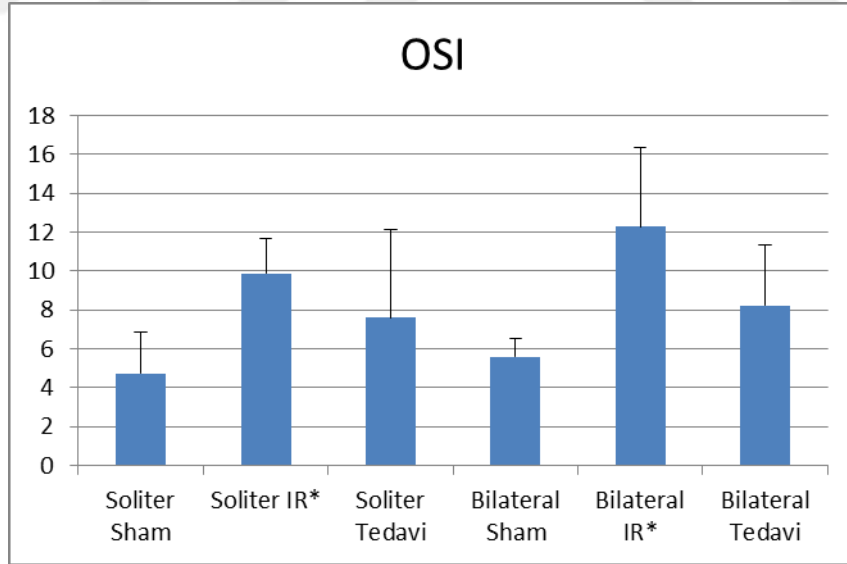
Grafik-2: Serum TAK değeri ortalamalarının gruplara göre değişimi

(*) → Soliter I-R ve soliter Sham grubu karşılaştırıldığında (p<0.01)



Grafik-3: Serum TOS değeri ortalamalarının gruplara göre değişimi

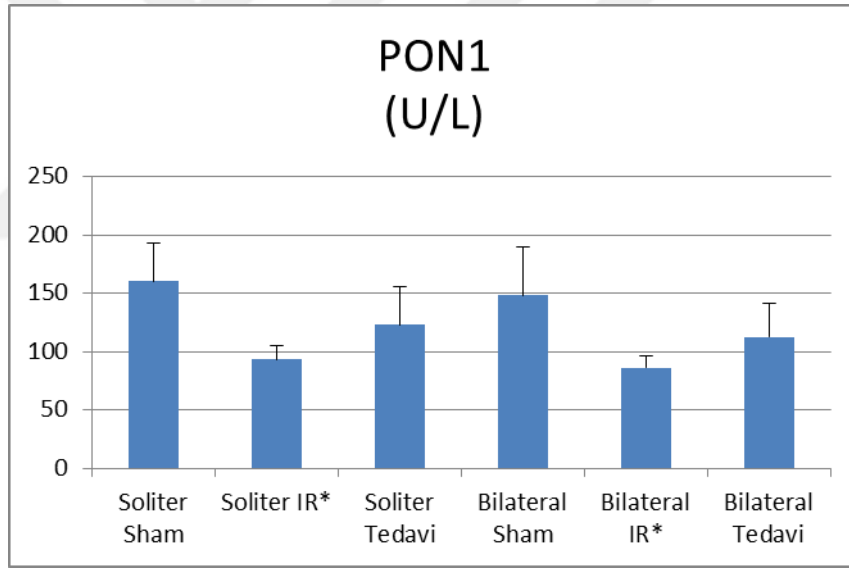
(*) → Bilateral I-R ve bilateral Sham grubu karşılaştırıldığında ($p < 0.05$)



Grafik-4: Serum TAK ve TOS değerlerine göre hesaplanan OSI ortalamalarının gruplara göre değişimi

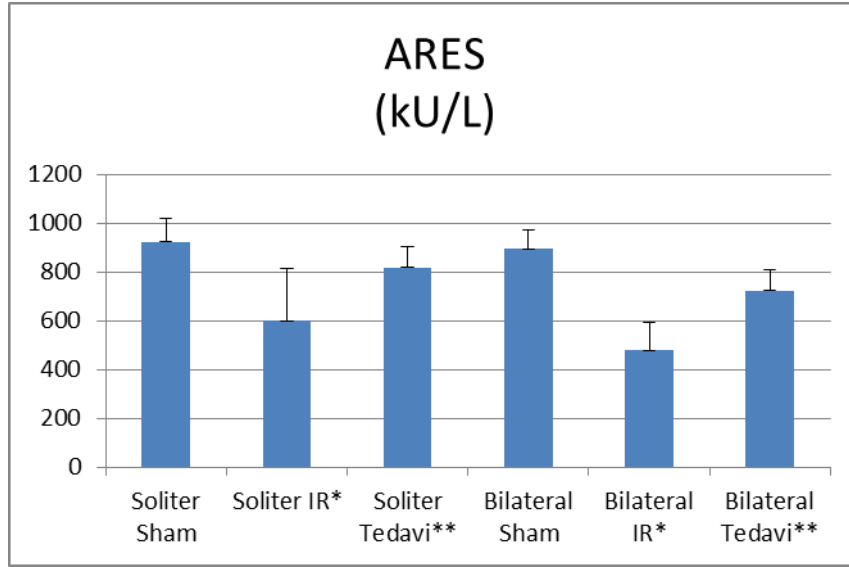
(*) → Soliter I-R ve Soliter Sham grubu karşılaştırıldığında ($p < 0.05$), bilateral I-R ve bilateral Sham grubu karşılaştırıldığında ($p < 0.01$)

Bilateral böbrek gruplarının kendi içinde karşılaştırılmasında I-R grubunda(5.grup) TOS(p:0.023), OSI(p<0.001), PON1(p:0.003), ARES(p<0.001), CAT(p<0.001), MDA(p<0.001), PCO(p<0.001), DNA hasarı(p<0.001) IL-1 β (p<0.001), ve TNF- α (p<0.001) değerlerindeki değişim Sham grubuna(4.Grup) göre anlamlı saptanırken, TAK(p:0.110) değerindeki değişim anlamlı saptanmamıştır. Tedavi grubunda(6.Grup) I-R grubuna(5.grup) göre TAK(p:0.902), TOS(p:0.259), OSI(p:0.139), PON1(p:0.546), CAT(p:0.387), MDA(p:0.085), IL-1 β (p:0.110) ve TNF- α (p:0.238) değerlerinde beklenen anlamlı düzelme gerçekleşmemiştir. Tedavi grubunda(6.grup) ARES(p:0.005), DNA hasarı(p<0.001) ve PCO(p<0.001) değerindeki yükselme klinik olarak anlamlı düzeyde saptanmıştır.



Grafik-5: Serum PON1 ortalamalarının gruplara göre değişimi

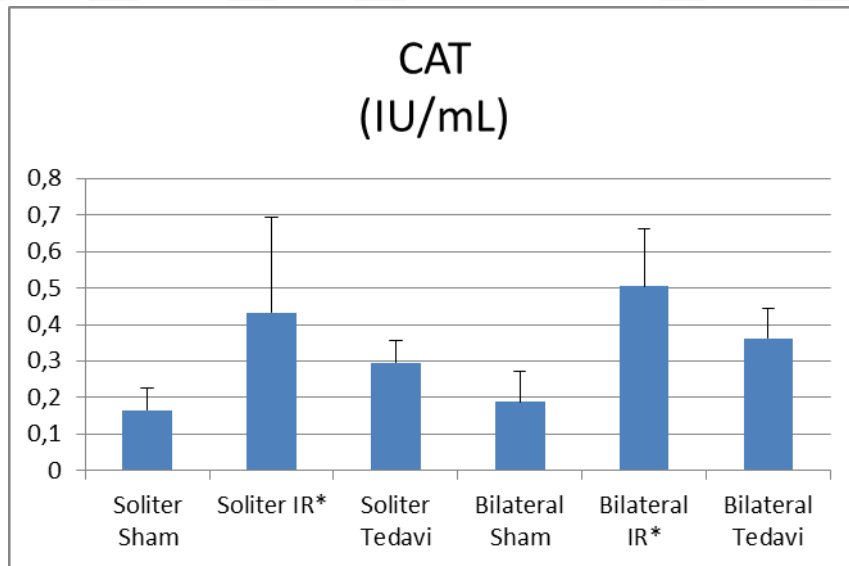
(*) → Soliter I-R ve soliter Sham grubu karşılaştırıldığında (p<0.01), bilateral I-R ve bilateral Sham grubu karşılaştırıldığında (p<0.01)



Grafik-6: Serum ARES ortalamalarının gruplara göre değişimi

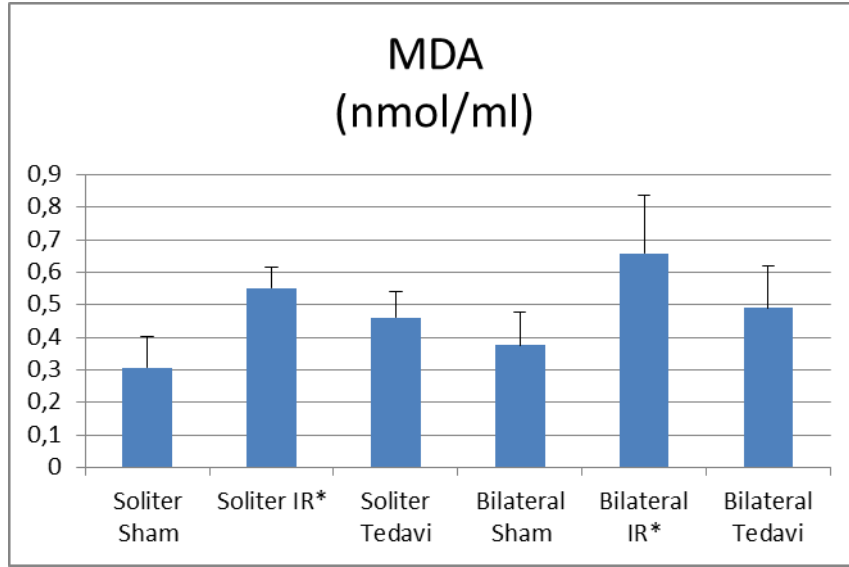
(*) → Soliter I-R ve soliter Sham grubu karşılaştırıldığında ($p < 0.01$), bilateral I-R ve bilateral Sham grubu karşılaştırıldığında ($p < 0.01$)

(**) → Soliter I-R ve soliter tedavi grubu karşılaştırıldığında ($p < 0.05$), bilateral I-R ve bilateral tedavi grubu karşılaştırıldığında ($p < 0.01$)



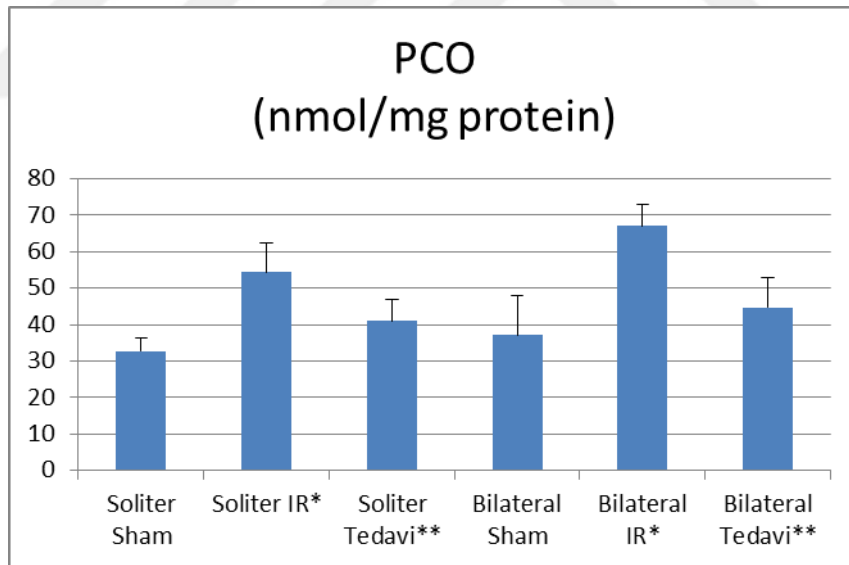
Grafik-7: Serum CAT ortalamalarının gruplara göre değişimi

(*) → Soliter I-R ve soliter Sham grubu karşılaştırıldığında ($p < 0.01$), bilateral I-R ve bilateral Sham grubu karşılaştırıldığında ($p < 0.01$)



Grafik-8: Serum MDA ortalamalarının gruplara göre değişimi

(*) → Soliter I-R ve soliter Sham grubu karşılaştırıldığında ($p < 0.01$), bilateral I-R ve bilateral Sham grubu karşılaştırıldığında ($p < 0.01$)

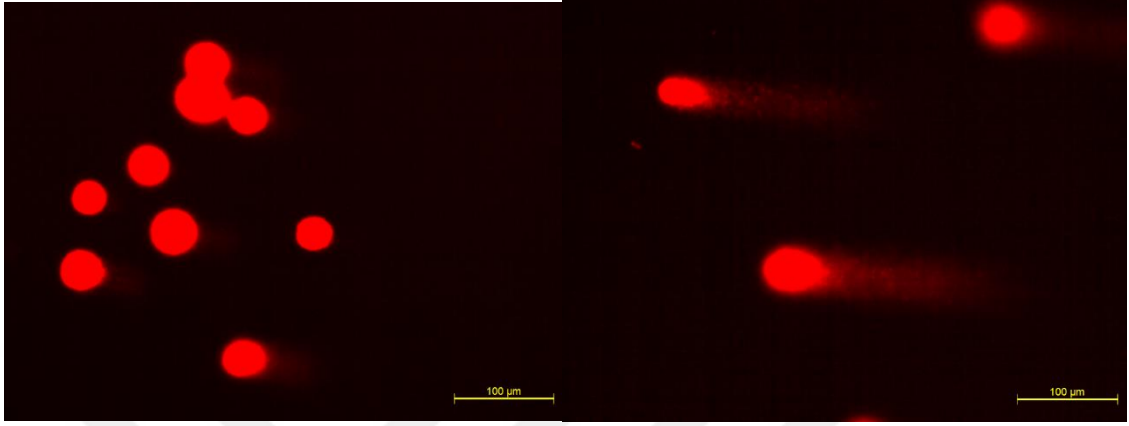


Grafik-9: Serum PCO ortalamalarının gruplara göre değişimi

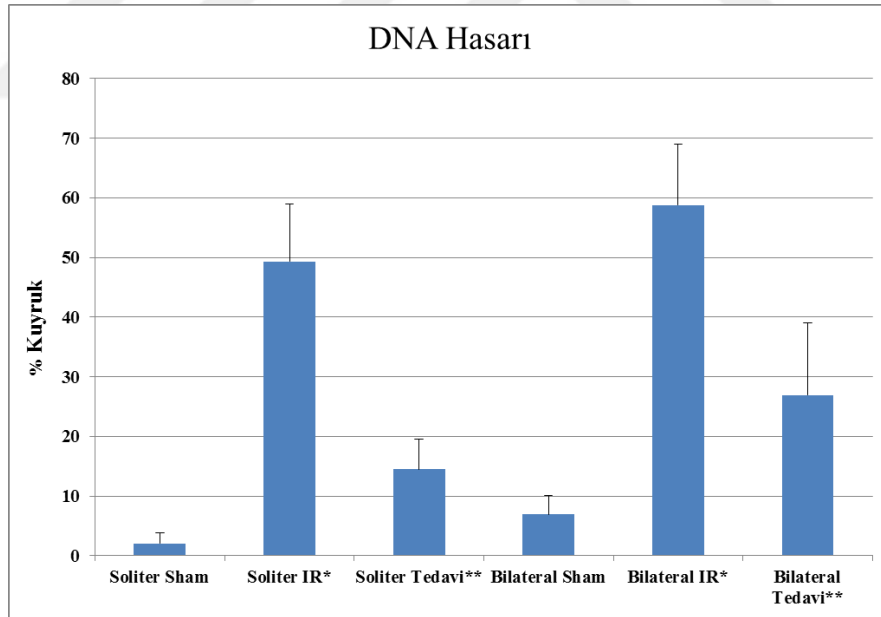
(*) → Soliter I-R ve soliter Sham grubu karşılaştırıldığında ($p < 0.01$), bilateral I-R ve bilateral Sham grubu karşılaştırıldığında ($p < 0.05$)

(**) → Soliter I-R ve soliter tedavi grubu karşılaştırıldığında ($p < 0.01$), bilateral I-R ve bilateral tedavi grubu karşılaştırıldığında ($p < 0.01$)

Bilateral böbrek grupları ile soliter böbrek grupları birbirleri ile karşılaştırıldığında, Sham gruplarının (1.grup ve 4.grup), I-R gruplarının (2.grup ve 5.grup) ve tedavi gruplarının (3.grup ve 6.grup) arasında kanda bakılan oksidatif stres ve enflamatuvar parametrelerin hiçbirisinde anlamlı fark saptanmadı.



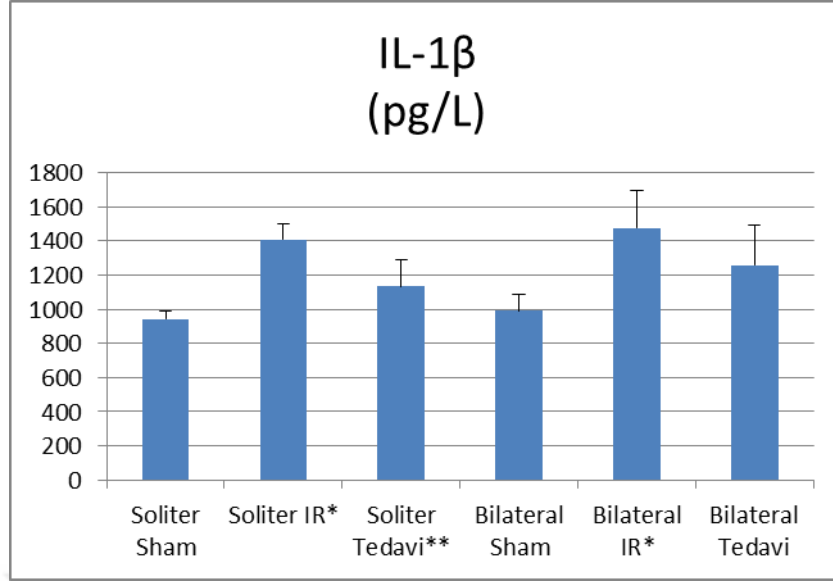
Resim-7: Comet-Assay yöntemi ile DNA kuyruk hasarının değerlendirilmesi(sağda Sham grubuna aitminimal kuyruk hasarı, solda iskemi grubuna ait belirgin DNA kuyruk hasarı)



Grafik-10: DNA Hasarı ortalamalarının gruplara göre değişimi

(*) → Soliter I-R ve soliter Sham grubu karşılaştırıldığında ($p<0.01$), bilateral I-R ve bilateral Sham grubu karşılaştırıldığında ($p<0.01$)

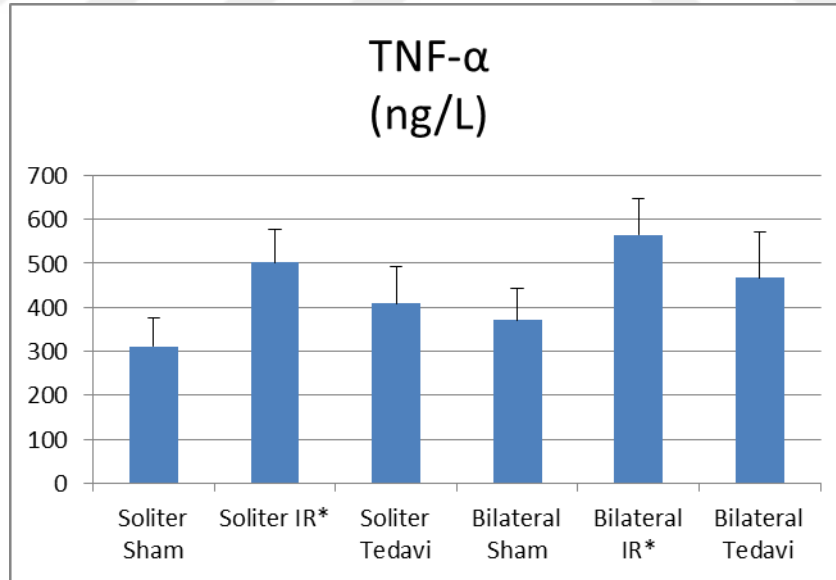
(**) → Soliter I-R ve soliter tedavi grubu karşılaştırıldığında ($p<0.01$), bilateral I-R ve bilateral tedavi grubu karşılaştırıldığında ($p<0.01$)



Grafik-11: Serum IL-1 β ortalamalarının gruplara göre değişimi

(*) → Soliter I-R ve soliter Sham grubu karşılaştırıldığında ($p<0.01$), bilateral I-R ve bilateral Sham grubu karşılaştırıldığında ($p<0.01$)

(**) → Soliter I-R ve soliter tedavi grubu karşılaştırıldığında ($p<0.05$)

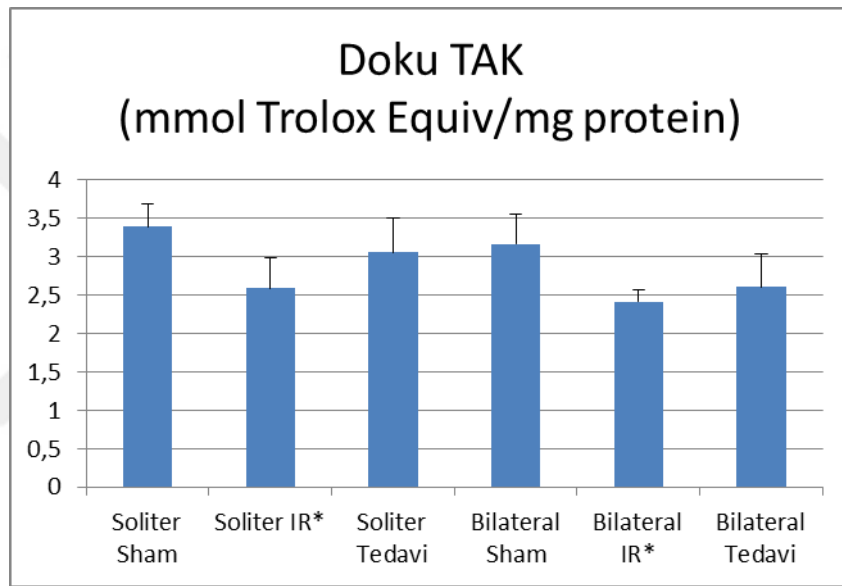


Grafik-12: Serum TNF- α ortalamalarının gruplara göre değişimi

(*) → Soliter I-R ve soliter Sham grubu karşılaştırıldığında ($p<0.01$), bilateral I-R ve bilateral Sham grubu karşılaştırıldığında ($p<0.01$)

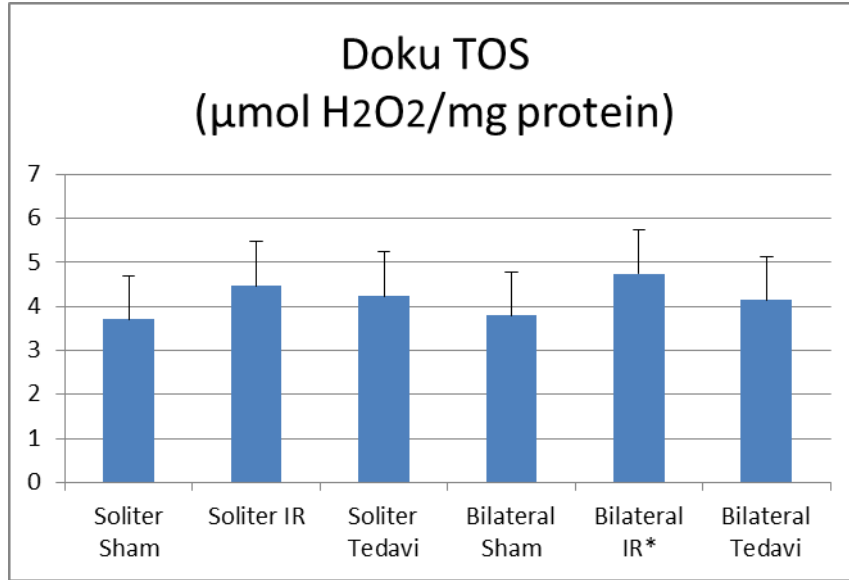
4.2.2. Dokudabakılan oksidatif stres ve inflamatuvar parametrelerin bulguları

Soliter böbrek gruplarının kendi içinde karşılaştırılmasında I-R grubunda(2.grup) böbrek dokusunda bakılan TAK(p:0.002), OSI(p<0.001), IL-1 β (p<0.001) ve TNF- α (p:0.006) değerlerindeki değişim Sham grubuna(1.grup) göre anlamlı saptanmışken, TOS(p:0.17) değerindeki değişim anlamlı saptanmamıştır. Tedavi grubunda (3.grup) I-R grubuna(2.grup) göre TAK(p:0.19), TOS(p:0.95), OSI(p:0.102), IL-1 β (p:0.878) ve TNF- α (p:0.728) değerlerinde beklenen anlamlı düzelme gerçekleşmemiştir.



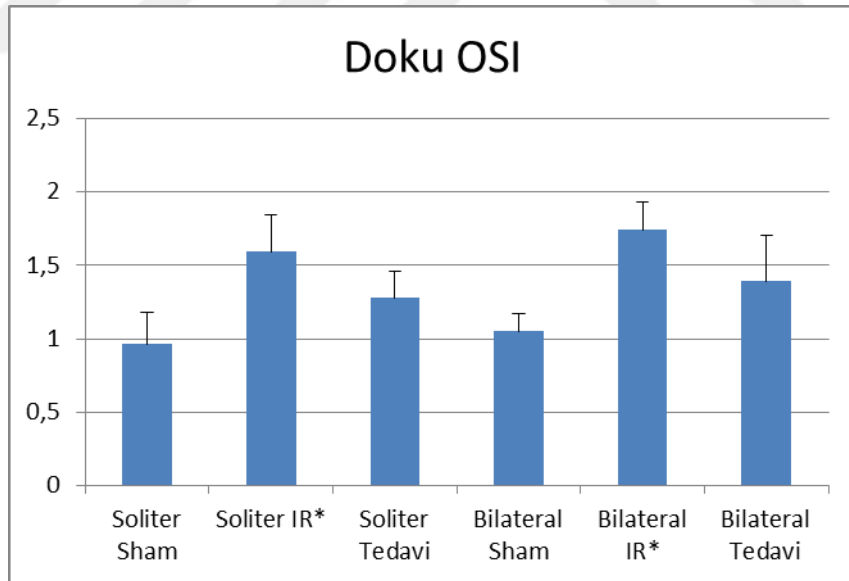
Grafik-13: Doku TAK ortalamalarının gruplara göre değişimi

(*) → Soliter I-R ve soliter Sham grubu karşılaştırıldığında (p<0.01), bilateral I-R ve bilateral Sham grubu karşılaştırıldığında (p<0.01)



Grafik-14: Doku TOS ortalamalarının gruplara göre değişimi

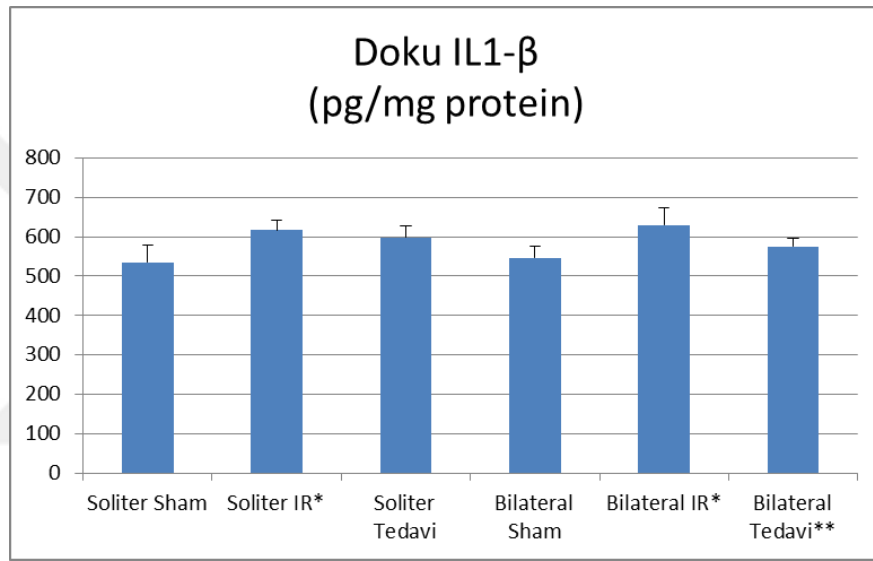
(*) → Bilateral I-R ve bilateral Sham grubu karşılaştırıldığında ($p<0.01$)



Grafik-15: Doku TAK ve TOS değerlerine göre hesaplanan OSI ortalamalarının gruplara göre değişimi

(*) → Soliter I-R ve soliter Sham grubu karşılaştırıldığında ($p<0.01$), bilateral I-R ve bilateral Sham grubu karşılaştırıldığında ($p<0.01$)

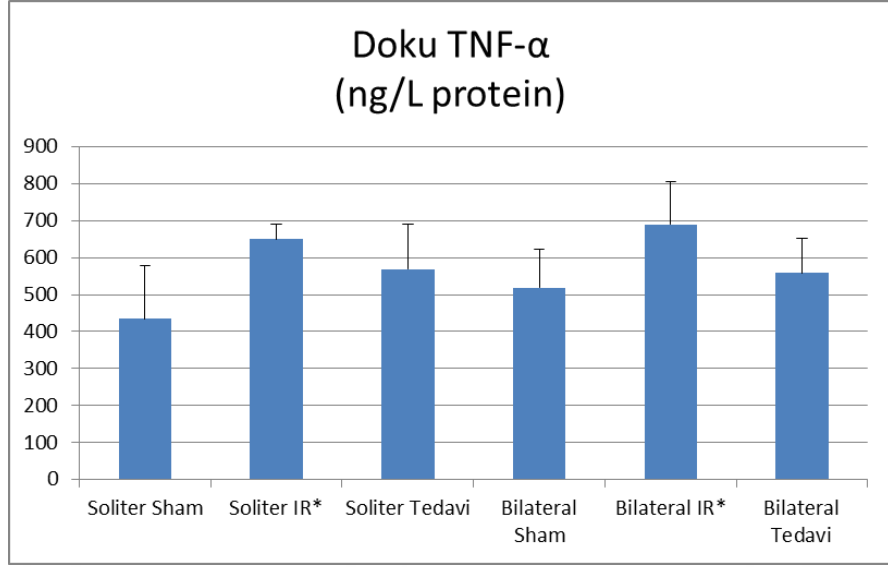
Bilateral böbrek gruplarının kendi içinde karşılaştırılmasında I-R grubunda(5.grup) böbrek dokusunda bakılan TAK(p:0.004), TOS(p:0.037), OSI(p<0.001), IL-1 β (p<0.001), ve TNF- α (p:0.046) değerlerindeki değişim Sham grubuna (4.grup) göre anlamlı saptanmıştır. Tedavi grubunda(6.grup) I-R grubuna(5.grup) göre TAK(p:0.916), TOS(p:0.404), OSI(p:0.052) ve TNF- α (p:0.238) değerlerinde beklenen anlamlı düzelme gerçekleşmemiştir. Yalnızca IL-1 β (p:0.048) değerindeki değişim anlamlı saptanmıştır.



Grafik-16: Doku IL-1 β ortalamalarının gruplara göre değişimi

(*) → Soliter I-R ve soliter Sham grubu karşılaştırıldığında (p<0.01), bilateral I-R ve bilateral Sham grubu karşılaştırıldığında (p<0.01)

(**) → Bilateral I-R ve bilateral tedavi grubu karşılaştırıldığında (p<0.05)



Grafik-17: Doku TNF- α ortalamalarının gruplara göre değişimi

(*) → Soliter I-R ve soliter Sham grubu karşılaştırıldığında ($p<0.01$), bilateral I-R ve bilateral Sham grubu karşılaştırıldığında ($p<0.05$)

5.TARTIŞMA

Böbrek I-R hasarı, hücre içi haberleşme sisteminin ve hücrelerde meydana gelen zincirleme reaksiyonların sonucu, hipoksi kaynaklı akut böbrek yetmezliğine neden olan karmaşık bir durumdur (111). Böbrek I-R hasarı, nedeniyle oluşan ABY artmış mortalite ve morbidite ile ilişkilidir. Böbrek transplantasyonu, renal anjiyoplasti, renal pedikül veya renal arterlerin üzerinden aortun klemplenmesinin sık olduğu ürolojik ya da vasküler cerrahiler, renal perfüzyonun geçici olarak durdurulması veya azaltılmasını gerektirir. İskemik dokuya kan akışının yeniden başlaması, normal fonksiyonları geri dönmesini sağlayabileceği gibi dokunun paradoksal bir şekilde hasarlanmasına da yol açabilir (112). Reperfüzyon hasarı olarak tanımlanan bu durum, özellikle hücreye zarar veren SOR ile ilişkilidir (48).

Oksidan molekül artışı, vücutta daima belirli bir düzeyde bulunan, doğal antioksidan moleküller tarafından etkisizleştirilmek suretiyle dengelenmektedir. Oksidanlar, belirli düzeyin üzerine çıkar veya antioksidanlar yetersiz olursa; oksidan moleküller, organizmanın yapı elemanları olan protein, lipid, karbonhidrat, nükleik asitler ve yararlı enzimlerini bozarak zararlı etkilere yol açarlar. Artmış SOR düzeyleri çoğu zaman hastalığın ana sebebi değildir. Primer bozukluğu sekonder olarak ortaya çıkarlar ve patofizyolojide önemli rol oynarlar (113).

Renal I-R modellerinde allopurinol, vitamin E, melatonin ve zinc aspartat gibi çeşitli antioksidan maddeler; glutatyon peroksidaz, glutatyon reduktaz, superoksid dismutaz ve katalaz gibi çeşitli antioksidan enzimler; ginkgo biloba, zencefil, sarımsak, karnosin, çörek otu, ısırgan otu, üzüm çekirdeği gibi çok sayıda bitkisel kaynaklı eksojen antioksidan maddeler kullanılmıştır (114-123, 145).

SMFF olan diosmin-hesperidin İnan ve ark. tarafından kolon anostomozlarının iyileşmesinde, Yıldız ve ark. tarafından ise karaciğerin I-R hasarından korunmasında ve karaciğer iskemisine sekonder meydana gelen ileum ve dalak hasarının düzeltilmesinde kullanmış, hem kolon anostomozlarının iyileşmesinde hem de karaciğerin I-R hasarının azaltılmasında başarılı sonuçlar elde edilmiştir (82, 98, 124). Lipidlerde çözünen

antioksidanlar sınıfından olan flavonoidler serbest radikal yakalayıcısı olmaları, enzim aktivitelerini düzenlemeleri, hücre çoğalmasını inhibe etmeleri, antibiyotik, antiallerjen, antidiyareik, antiülser ve antiinflamatuvar ilaç gibi işlev görmeleri dolayısı ile I-R'den koruyucu özellik kazanmaktadır. Ayrıca flavonoidler endojen antioksidanların korunup ve güçlendirilmesi yolu ile de etkili olabilirler (125, 126, 127, 128). Bizde çalışmamızda flavonoidlerin özelliklerini ve daha önce çalışılmış diğer solid organlardaki I-R hasarına koruyucu etkisini gözönüne alarak parsiyel nefrektomide meydana gelen I-R hasarından böbreğin korunması amacıyla SMFF olan diosmin-hesperidini uyguladık.

Yapılan çalışmalarda böbrek I-R hasar modeli oluşturmak için farklı iskemi ve reperfüzyon süreleri uygulanmıştır. Bhalodia ve ark. renal I-R hasarı oluşturdukları ratlarda inceledikleri Benincasa Cerifera isimli meyve ekstresinin böbrek üzerine koruyucu etkisine baktıkları çalışmada iskemi süresi 60 dakika olarak tutulmuştur (129). Foglieni ve ark. yapmış olduğu EDTA'nın renal I-R hasarı üzerine etkilerini inceledikleri çalışmada ise yine iskemi süresi 60 dakika ve reperfüzyon zamanı 60 dakika olarak belirlenmiştir (130). Williams ve ark. ise, bilateral renal arter ve veni klempleyerek oluşturdukları iskemi modelinde iskemi süresini 45 dk. tutup reperfüzyondan sonraki 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 9, 24. saatlerde ve 1 hafta sonra I-R hasarının kan kreatin düzeyleri ile böbrek histolojisine etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmacılar renal hasarın 45 dk.lık iskemiye takiben en erken 4. saatte başladığını; hasarın 24. saatte pik yaptığını bildirmişlerdir (131). Bizde çalışmamızda Williams ve ark.'nın çalışmasını model alarak 45dk iskemi süresini takiben, hasarın pik etkiye ulaştığı 24 saatlik reperfüzyon süresini uyguladık.

Yıldız ve ark. karaciğer I-R modeli üzerinde yaptıkları çalışmada SMFF'nin antioksidan ve antiinflamatuvar etkisi ile karaciğeri I-R hasarından koruduğu belirtilmiştir (82). Ancak literatürde SMFF'nin renal I-R modeli üzerindeki antioksidan etkisi üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Önceleri renal I-R modellerinde lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA miktarı ölçümü yapılırken günümüzde doku ve serumdaki total oksidan ve antioksidan düzeylerine bakılmaktadır. Yıldız ve ark. bir başka çalışmasında deneysel renal I-R modelinde eksojen antioksidan maddelerden çörek otunu(Nigella sativa) kullanmışlar ve çörek otu verildikten sonra yapılan deneysel renal I-R hasarında TOS seviyeleri anlamlı

olarak azalmış bulunmuş ve TAK seviyelerinde de anlamlı artış olduğu tespit edilmiştir (132). Çalışmamızda hem serum hem de dokuda TAK, TOS, ve OSI düzeylerini karşılaştırdık. Soliter böbrekli ve bilateral böbrekli gruplar kendi içlerinde sham grubu, I-R grubu ve tedavi grubu olarak ayrılmıştır. SMFF verilen tedavi gruplarının, I-R gruplarına göre TAK değerlerinde artış, TOS ve OSI düzeylerinde ise beklenildiği üzere azalma olmuştur. Ancak SMFF tedavisi meydana gelen bu değişimlerin hiçbirisi istatistiksel olarak anlamlı saptanmamıştır.

Renal I-R hasarı sırasında üretilen SOR'ler lipid peroksidasyonu ile yapısal ve fonksiyonel olarak hücre hasarına neden olurlar. SOR'ler oldukça reaktif olmalarından dolayı direkt olarak ölçülememekte, lipid peroksidasyonu esnasında açığa çıkan daha stabil moleküllerin ölçümü yapılmaktadır. 1980'li yıllardan beri oksidatif doku hasarının göstergesi olarak, lipid peroksidasyonu ile ortaya çıkan serum ve doku MDA değerlerine bakılmakta olduğunu belirten Singh ve Chopra ratlarda yaptıkları renal I-R'de renal oksidatif doku hasarının göstergesi olarak doku MDA düzeylerine bakmışlardır (133). Şener ve ark. flavonoid içeriği olan ginkgo bilobanın renal I-R hasarı üzerindeki etkileri ile ilgili çalışmasında oksidatif stresi gösteren MDA'nın, I-R sonrası artmış olduğu tespit edilirken ginkgo biloba verilen deney grubunda MDA düzeyinde anlamlı bir düşüş saptamışlardır (122). Çalışmamızda Şener ve ark. çalışmasındakine benzer şekilde I-R gruplarında sham gruplarına göre klinik anlamlı düzeyde artmış, SMFF verilen gruplarda MDA düzeyinde düşüş saptanmıştır fakat SMFF tedavisi ile meydana gelen düşüş klinik anlamlı seviyede olmamıştır.

Süperoksit radikallerinin yol açtığı oksidatif hasara karşı antioksidan savunmada görev alan ilk enzim, süperoksid dismutaz(SOD)dır. SOD, süperoksit radikallerini hidrojen peroksit ve oksijene dönüştürür. Katalaz(CAT) veya glutatyon peroksidaz(GPx) ise hidrojen peroksidi zararsız yan ürünlere dönüştürür (134).Dobashi ve ark.sol böbrekteiskemi (30, 60, 90 dk) ve reperfüzyonu (2, 24, 72, 120 saat) farklı sürelerde yaptıkları çalışmada; 60 dk iskemi 24 saat reperfüzyon uyguladıkları grupta, SOD, CAT ve GPx aktivitelerinde anlamlı azalma ve lipid peroksidasyon düzeyinde artma olduğu bildirilmiştir(135). Aydoğdu ve ark. N-asetilsistein'nin renal I-R hasarına koruyucu etkisinin değerlendirildiği 60 dk iskemi 24 saat

reperfüzyon sonrası, I-R grubunda kontrol grubuna göre SOD, CAT ve GPx aktivitelerinde anlamlı azalma saptanmış, N-asetilsitein grubunda ise anlamlı değişim görülmemiştir (136). Şentürk ve ark. Slimarinin Renal I-R hasarına etkisini değerlendirdikleri çalışmada ise I-R grubu böbrek dokularının homojenatından elde edilen CAT ve SOD aktivitelerinin, kontrol grubuna göre yüksek tespit edilmesi mevcut çalışmalar ile uyumluluk göstermemekte olup, bu durumun I-R sırasında CAT ve SOD enzimlerinin indüklenmesinden kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir (134). Bizim çalışmamızda eritrositte CAT aktivitesine bakılmış olup, slimarin çalışmasındakine benzer olarak I-R gruplarında kontrol grubuna göre CAT aktivitesi klinik anlamlı seviyede artmış, tedavi gruplarında ise azalmıştır. Ancak tedavi gruplarındaki azalma düzeyi klinik olarak anlamlı saptanmamıştır.

PON-1, hem paraoksonaz hem de arilesteraz aktivitesine sahip, kalsiyum bağımlı bir ester hidrolazdır. Başlıca karaciğerde sentezlenip dolaşıma salınan serum paraoksonaz-1 (PON-1) enzimi, organofosfatlar, arilesterler ve laktonlar dahil bir çok substrat üzerine hidrolitik etkiye sahip bir proteindir (137). PON-1'in, primer fizyolojik rolü hala tam olarak bilinmemesine rağmen, lipid peroksidasyonunu engellediği, antioksidan ve antiinflamatuvar özellik gösterdiği belirtilmektedir (138). PON-1'in, hücre membranları ve lipoproteinler üzerine serbest radikallerin yol açtığı lipid peroksidasyonuna karşı antioksidan etki gösterdiği gözlenmiştir (139). Çalışmamızda antioksidan etkinliğin göstergesi olarak bakılan PON1 ve ARES değerleri I-R gruplarında anlamlı derecede düşmüş, SMFF tedavisi verilen gruplarda beklenildiği üzere yükselmiştir. SMFF tedavisi verilen gruplarda ARES düzeyindeki yükseliş istatistiksel olarak anlamlı saptanırken, PON1 düzeyindeki yükseliş istatistiksel olarak anlamlı saptanmamıştır.

I-R hasarının oluşmasında SOR önemli bir role sahiptir. SOR, DNA yapısındaki deoksiriboz fosfat iskeletinde hasara, purin ve pirimidin bazların spesifik modifikasyonuna ve DNA-protein çapraz bağlanmalarına neden olur. Tek hücreli jel elektroforezi veya sıklıkla tercih edilen diğer adıyla Comet Assay yöntemi son yıllarda genişleyen uygulama alanı, güvenilirliği ve uygulaması kolay olması bakımından kimyasal ve fiziksel etmenlerin canlılar üzerinde yol açtığı genotoksik ve sitotoksik etkilerin bir göstergesi olan DNA hasar seviyelerinin ölçülmesini sağlayan önemli bir metottur. Hasar miktarı arttıkça kuyruk

yoğunluk bakımından artmaktadır. Rölatif kuyruk yoğunluğu en kullanışlı parametre olarak kullanılmaktadır. Dias ve ark. renovasküler hipertansiyon modeli oluşturdukları farelerde sildenafilin oksidatif stres, DNA hasarı ve renal fonksiyonlar üzerine etkilerini araştırmışlardır (140). Çalışmalarında sol renal arteri 2 hafta boyunca klipleyerek renal arter stenozu oluşturduktan sonra 2 hafta boyunca sildenafil ve plasebo verilmesi sonrası etkilerini karşılaştırmışlardır. Comet örnekleme incelemesinde kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti ölçümleri karşılaştırıldığında plasebo grubunda DNA hasar oranında belirgin bir artış(2 kat) saptanırken, sildenafil verilen grupta bu hasarın minimal seviyede olduğu saptanmıştır. SOR'nin proteinlerle etkileşimi sonucunda histidin, prolin, arginin, ve lizin gibi çok sayıda aminoasit kalıntısında veya peptid omurgasında meydana gelen hasar sonucunda protein karbonil (PCO) ürünleri meydana gelir. Protein oksidasyonunun en yaygın olarak ölçülen ürünü protein karbonilleridir. PCO düzeylerinin saptanması, oksidatif protein hasarını belirlemede duyarlı bir yöntemolmasına rağmen belirli bir aminoasit için spesifik değildir (141). Çalışmamızda I-R gruplarında hem DNA hasarı hem de PCO düzeyleri sham grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptanmıştır. SMFF tedavisi verilen gruplarda, DNA hasarı ve PCO düzeyleri sham gruplarından daha fazla, I-R gruplarından ise daha az olarak ölçülmüştür. Tedavi gruplarında DNA hasarının ve PCO düzeylerinin daha az olmasının istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Bu durum bize SMFF tedavisinin, renal I-R hasarında meydana gelen DNA ve protein hasarından renal hücreleri koruyabildiğini göstermektedir.

SOR üretimi hem reperfüze olan dokularda hemde makrofajlardan salınan proinflamatuvar sitokinlerle dokuya çekilen nötrofillerde olmaktadır. TNF- α ve IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinler, PMNL aktivasyonunu ve infiltrasyonunu indükleyerek hem dokuda hem de uzak organlarda meydana gelen I-R hasarında önemli rol oynamaktadır (142, 143). Çalışmamızda serumda ve böbrek dokusunda TNF- α ve IL1- β düzeyleri ölçülmüştür. Sham gruplarına göre I-R gruplarındaki TNF- α ve IL1- β düzeylerindeki yükselme anlamlı düzeyde saptanmıştır. Tedavi gruplarının tamamında da, IL1- β ve TNF- α düzeyleri I-R gruplarına göre azalma göstermiştir. Ancak bu gerileme sadece soliter böbrek gruplarında serum IL1- β düzeyinde ve bilateral böbrek gruplarında doku IL1- β düzeyinde anlamlı olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar SMFF'nin antiinflamatuvar etkinliğinin renal I-R hasarında sınırlı düzeyde olabileceğini, inflamasyonu yeterince geriletemeyebileceğini düşündürmektedir.

Sayhan ve ark. bir flavonoid olan ısırgan otu tohumu (*Urtica dioica*) ile yaptıkları çalışmada ısırgan otu tohumunun özellikle proksimal ve distal tübül hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü inhibe ederek renal I-R sonucu oluşan tübüler hasar üzerinde koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (121). Bu çalışmada tübüler hasarın *Urtica dioica* (UD) verildikten sonra I-R yapılan grupta sadece I-R yapılan gruba göre anlamlı olarak daha az olduğu tespit edilmiştir (121). Singh ve ark. naringin (naranciye ekstresi)'nin renal iskemi reperfüzyon modeli üzerinde oksidatif hasardan koruyucu etkisi üzerine yaptıkları çalışmada, I-R öncesi naringin verilen grupta tübüler hasarın sadece I-R yapılan gruba göre anlamlı olarak daha az olduğunu tespit etmiştir (144). Bizim çalışmamızda ışık mikroskopik olarak; mononükleer hücre infiltrasyonu, eritrosit ekstrasvazasyonu, renal korpüskül morfolojisi, proksimal tübüluslarda vakuolizasyon, fırçamsı kenar kaybı, tübüler dilatasyon, kast formasyonuna göre ayrı ayrı skorlanarak ortalama tübülointerstisyel hasar skoru hesaplandı. I-R gruplarındaki ve SMFF tedavi gruplarındaki tübülointerstisyel hasar skorları sham gruplarına göre anlamlı olarak yüksekti. Ancak tedavi gruplarındaki hasar skorundaki azalma, I-R gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmadı.

Çalışmamızda doku ve serumda bakılan oksidatif stres belirteçlerinde ve inflamasyon belirteçlerinde düzelme olduğu görülmüş ancak bu düzelme istatistiksel anlamlı seviye de olmamıştır. 45dk iskemi süresinden daha kısa iskemi sürelerinde hem yeterli iskemiye bağlı hasar oluşurken hem de SMFF tedavisi klinik anlamlı sonuçlar verebilir. Termokoter kullanımı, direk etki veya enzimatik reaksiyonlar üzerinde oluşturabileceği muhtemel etkiler ile I-R hasarını amplifiye etmiş olabilir. SMFF'nin oral gavaj yoluyla uygulanan ilaç olması ve anestezide aspirasyondan kaçınmak için hemen iskemi öncesi uygulanamaması gibi nedenlerin yanında her ne kadar böbrek dışı diğer SMFF tedavisi ile I-R hasarı çalışmalarında 3 günlük tedavi sonrası başarı elde edilmişse de minimum etki konsantrasyonuna ulaşmak için daha uzun tedavi modelleri başarı şansını arttırabilir. İskemi süresi, termokoter kullanımı, SMFF dozu ve uygulama süresi ile ilgili farklı uygulamalar çalışmamızın limitasyonlarıdır ve bu limitasyonlar dikkate alınarak planlanacak çalışmalarda farklı sonuçlar elde etme ihtimali olabilir.

6.SONUÇLAR

Parsiyel nefrektomi esnasında meydana gelen sıcak I-R'ye bağılı, geride kalan böbrek dokusundaki hasarın SMFF tedavisi ile azaltılmasının amaçlandığı çalışmamızda şu sonuçlara ulaşıldı:

1- Soliter böbrekli gruplarla, bilateral böbrekli gruplar arasındaki bütün sonuçlar benzer saptanmıştır. Çalışmamız, kompensatris hipertrofi gelişmiş böbrekte ya da bilateral sağlıklı böbrekte; I-R hasarında fark olmadığını ve bu böbreklerdeki renal hasar üzerine SMFF tedavisinin etkinliği açısından da fark olmadığını göstermiştir.

2- Doku ve serumda bakılan oksidatif stres belirteçlerindeki, inflamasyon belirteçlerindeki ve histopatolojik bulgulardaki değişim; I-R gruplarında Sham gruplarına göre anlamlı düzeyde saptanmış olup, hem soliter böbrek gruplarında hem bilateral böbrek gruplarında sıcak iskemiye bağılı renal hasarın olduğu gözlenmiştir.

3- SMFF tedavisi alan gruplarda I-R gruplarına göre, doku ve serumda bakılan oksidatif stres belirteçlerinde, inflamasyon belirteçlerinde ve histopatolojik bulgularda düzelme gözlenmiş olsa da; bu düzelme istatistiksel olarak anlamlı saptanmamış olup, SMFF tedavisi renal dokuyu iskemi-reperfüzyon hasarından beklenildiği ölçüde korumamıştır.

4- SMFF tedavisi alan gruplarda I-R gruplarına göre, DNA hasarı ve protein karbonilleri(PCO) düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düzelme saptanmış olup, SMFF tedavisinin I-R'de renal dokuda meydana gelen DNA hasarını önlemede başarılı olduğu görülmüştür.

5- Renal I-R oluşturulan ratlarda kullandığımız SMFF tedavisi, soliter veya bilateral böbrekli olduğu farketmeksizin renal I-R hasarına karşı beklediğimiz koruyucu etkiyi oluşturmamıştır.

7.KAYNAKLAR

1. Renal cell carcinoma. European Association of Urology (EAU) Guidelines, 2015 edition.
2. Lane BR, Babineau DC, Poggio ED, Weight CJ, Larson BT, Gill IS, Novick AC. Factors predicting renal functional outcome after partial nephrectomy J Urol. 2008;180:2363-8;discussion 2368-9.
3. Tyritzis SI, Zachariades M, Evangelou K et al. Effects of prolonged warm and cold ischemia in a solitary kidney animal model after partial nephrectomy: an ultrastructural investigation. Ultrastruct Pathol. 2011 Apr;35(2):60-5.
4. Lien YHH, Lai LW, Silva AL. Pathogenesis of renal ischemia reperfusion injury: lessons from knock out mice. Life Sci. 2003;74:542-52.
5. Derweesh IH, Novick AC. Mechanisms of renal ischaemic injury and their clinical impact. BJU Int. 2005; 95: 948-50.
6. Nath KA, Norby SM. Reactive oxygen species and acute renal failure. Am J Med. 2000;109:655-78.
7. Chatterjee PK, Patel NS, Kvale EO, Cuzzocrea S, Brown PA, Stewart KN, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury. Kidney Int. 2002;61:862-71.
8. Boisseau MR. Leukocyte involvement in the signs and symptoms of chronic venous disease. Perspectives for therapy. Clin Hemorheol Microcirc. 2007;37(3):277-290.
9. Korthuis RJ, Gute DC. Postischemic leukocyte/endothelial cell interactions and microvascular barrier dysfunction in skeletal muscle: Cellular mechanisms and effect of Daflon 500mg. Int J Microcirc 1997;17(Suppl 1):11-7.
10. Bouskela E, Donyo KA, Verbeuren TJ. Effects of Daflon on increased microvascular permeability in the hamster cheek pouch. Int J Microcirc 1995;15(Suppl 1):22-6.
11. Friesenecker B, Tsai AG, Allegra C, Intaglietta M. Oral administration of purified micronized flavonoid fraction suppresses leukocyte adhesion in ischemia-reperfusion injury: In vivo observations in the hamster skin fold. Int J Microcirc 1994;14:50-5.
12. Casley-Smith JR, Casley-Smith J. Pharmacological activity of Daflon 500mg on experimental lymphedema. Lymphology 1998;31(Suppl):7-11.

13. Michell RN, Cotran N, Hücre zedelenmesi,ölümü ve adaptasyonu (H. AKER) Nobel tıp kitapevi yayınları , 2000 s. 3-25
14. Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. Br J Surg 1991;78:651-5.
15. Gueler F, Park JK, Rong S :Statins attenuate ischemia-reperfusion injury by inducing heme oxygenase-1 in infiltrating macrophages. Am J Pathol. 170(4): 192-199,2007.
16. Dagher PC. Apoptosis in ischemic renal injury: roles of GTP depletion and p53. Kidney Int.66: 506-509, 2004.
17. Kumbul K. Deneysel intestinal iskemi ve reperfüzyon modelinde caffeic acid phenethylester’ in akciğer hasarını önlemedeki etkinliği. S.D.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D. uzmanlık tezi 2007.
18. Mathru M, Dries DJ, Barnes L, Herbert ME ve ark. Tourniquet-induced exsanguination in patients requiring lower limb surgery. An ischemia-reperfusion model of oxidant and antioxidant metabolism. Anesthesiology 1996; 84: 14-22.
19. Kam PCA, Kavanagh R, Yoong FF, Kavanaugh R. The arterial tourniquet: pathophysiological consequences and anaesthetic implications. Anaesthesia 2001; 56: 534-45.
20. Weight SC, Bell PR, Nicholson ML. Renal ischaemiareperfusion injury. Br J Surg 1996;83:162-70.
21. Woolfson RG, Millar CG, Neild GH. Ischaemia and reperfusion injury in the kidney: current status and future direction. Nephrol Dial Transplant 1994;9:1529-31.
22. Dosluoglu HH, Aktan AO, Yegen C, Okboy N, Yalcin AS, Yahn R, et al. The cytoprotective effects of verapamil and iloprost (ZK 36374) on ischemia/reperfusion injury of kidneys. Transpl Int 1993;6:138-42.
23. Homer-Vanniasinkam S, Crinnion JN, Gough MJ. Post-ischaemic organ dysfunction: a review. Eur J Vasc Endovasc Surg 1997 ;14:195-203.
24. Monsinjon T, Richard V, Fontaine M. Complement and its implications in cardiac ischemia/reperfusion: strategies to inhibit complement. Fundam Clin Pharmacol 2001; 15: 293-306.
25. Donna L, Carden D, Granger N. Pathophysiology of ischeamia-reperfusion injury. J Pathol 2000; 190: 255-66.

26. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 2002; 105: 248-58.
27. Lieberthal W: Biology of acute renal failure: therapeutic implications. *Kidney Int* 52:1102- 1115, 1997.
28. Sakon M, Ariyoshi H, Umeshita K, Monden M. Ischemia-reperfusion injury of the liver with special reference to calcium-depended mechanism, *Surgery Today* 2002; 32: 1-12.
29. Edelstein CL, Alkhunnaizi AA, Schrier RW: the role of calcium in the patogenesis of acute renal failure , *RenFail* 19:199-207,1997.
30. McMichael M, Moore MRM. Ischemia–reperfusion injury pathophysiology, part I. *J Vet Emerg Crit Care* 2004; 14: 231-41.
31. Murata M, Monden M, Umeshita K, Nakano H ve ark. Role of intercellular calcium in superoxide-induced hepatocyte injury, *Hepatology* 1994; 19: 1223-28.
32. Acworth IN, Bailey B. Reactive Oxygen Species. In: *The handbook of oxidative metabolism*. Massachusetts: ESA Inc., 1997, p. 1-1 to 4-4.
33. Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidant defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J*, 1995; 9: 526-533.
34. Laurent B, Ardaillou R: Reactive oxygene species: production and role in the kidney. *Am.J Physiol* 251: 765-776, 1986.
35. Beckman JS, Kopponel WH: Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite. The good, the bad, the ugly. *AM J. Physiol* 271:424–437, 1996.
36. Grace PA. Ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1994; 81: 637-47.
37. Kılınç K. Oksijen radikalleri: üretilmeleri, fonksiyonları ve toksik etkileri. *Biyokimya Dergisi* 1985; 2: 60-89.
38. Günel E, Çağlayan F, Çağlayan O, Dilsiz A ve ark. Treatment of intestinal reperfusion injury using antioxidative agents. *J Pediatr Surg* 1998; 33: 1536-39.
39. Kumar V, Cotran R, Robbins SL. *Basic Pathology*. 6th edition 2000; 10: 30-36.
40. Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 1993; 21: 1376-86.
41. Huang SS, Wei FC, Hung LM. Ischemic preconditioning attenuates postischemic leukocyte – endothelial cell interactions role of nitric oxide and protein kinase C. *Circ J* 2006; 70: 1070–75.

42. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol* 1986 ;250: 749-53.
43. Lopez-Neblina F, Paez-Rollys AJ, Toledo-Pereyra LH. Mechanism of Protection of Verapamil by Preventing Neutrophil Infiltration in the Ischemic Rat Kidney. *J SurgRes* 1996; 61: 469-472.
44. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull* 2004; 70: 71-86.
45. Frangogiannis NG. Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thromb Haemost.* 2007; 97: 738-747.
46. Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 2514-2523.
47. Şener, G. İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim*. 2009. Vol. 3 (22): 5-13.
48. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surg Clin North Am* 1992; 72: 65-83.
49. Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2004; 61: 481-497.
50. Chatterjee PK. Novel pharmacological approaches to the treatment of renal ischemia-reperfusion injury: a comprehensive review. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2007; 376): 1-43.
51. Korthuis RJ, Granger DN. Reactive oxygen metabolites, neutrophils, and the pathogenesis of ischemic-tissue/reperfusion. *Clin Cardiol.* 1993; 16(4 Suppl 1): I19-26.
52. Thrane AS, Skehan JD, Thrane PS. A novel interpretation of immune redundancy and duality in reperfusion injury with important implications for intervention in ischaemic disease. *Med Hypotheses* 2007; 68: 1363-1370.
53. García-Villalón AL, Amezcua YM, Monge L, Fernández N, Salcedo A, Diéguez G. Endothelin-1 potentiation of coronary artery contraction after ischemia-reperfusion. *Vascul Pharmacol.* 2008; 48:109-114.
54. Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *J Invest Surg* 2009; 22: 46-55.

55. Sener G, Sakarcı A, Yegen BC. Role of garlic in the prevention of ischemia-reperfusion injury. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51: 1345- 1352.
56. Koç M, Arıkan H, Odabaşı Z, Akoğlu E. İskemik ve toksik akut tübüler nekroz patofizyolojisi. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi/Office Journal of the Turkish Association* 2006; 15: 13-24.
57. Oken DE. Hemodynamic basis for human acute renal failure (vasomotor nephropathy). *Am J Med* 1984;76:702-10.
58. Sutton TA, Molitoris BA. Mechanisms of cellular injury in ischemic acute renal failure. *Semin Nephrol* 1998;18:490-7.
59. Conger JD, Weil JV. Abnormal vascular function following ischemia- reperfusion injury. *J Investig Med* 1995;43(5):431-42.
60. Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest* 2004;114:5-14.
61. Chan L, Chittinandana A, Shapiro JJ, Shanley PF, Schrier RW. Effect of an endothelin-receptor antagonist on ischemic acute renal failure. *Am J Physiol* 1994;266:F135-8.
62. Sutton TA, Mang HE, Campos SB, Sandoval RM, Yoder MC, Molitoris BA. Injury of the renal microvascular endothelium alters barrier function after ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285:F191-8.
63. Klingebiel T, von Gise H, Bohle A. Morphometric studies on acute renal failure in humans during the oligoanuric and polyuric phases. *Clin Nephrol* 1983;20:1-10.
64. Molitoris BA, Marrs J. The role of cell adhesion molecules in ischemic acute renal failure. *Am J Med* 1999;106:583-92.
65. Kelly KJ, Williams WW Jr, Colvin RB, Bonventre JV. Antibody to intercellular adhesion molecule 1 protects the kidney against ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:812-6.
66. Castaneda MP, Swiatecka-Urban A, Mitsnefes MM, Feuerstein D, Kaskel FJ, Tellis V, Devarajan P. Activation of mitochondrial apoptotic pathways in human renal allografts after ischemia- reperfusion injury. *Transplantation* 2003;76:50-4.
67. Brady HR, Clarkson MR, Lieberthal W. Acute renal failure. In Brenner BM (eds): *Brenner and Rector's The Kidney*, 7th ed. Philadelphia, Saunders, 2004, pp 1215-1292.

68. Noiri E, Peresleni T, Miller F, Goligorsky MS. In vivo targeting of inducible NO synthase with oligodeoxynucleotides protects rat kidney against ischemia. *J Clin Invest* 1996;97: 2377-83.
69. Noiri E, Nakao A, Uchida K, et al. Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;281:F948-57.
70. Chiao H, Kohda Y, McLeroy P, Craig L, Housini I, Star RA. Alpha-melanocyte-stimulating hormone protects against renal injury after ischemia in mice and rats. *J Clin Invest* 1997;99: 1165-72.
71. Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int* 2004;66:480-5.
72. Ishibashi N, Weisbrot-Lefkowitz M, Reuhl K, Inouye M, Mirochnitchenko O. Modulation of chemokine expression during ischemia/reperfusion in transgenic mice overproducing human glutathione peroxidases. *J Immunol* 1999;163:5666-77.
73. Donnahoo KK, Meng X, Ayala A, Cain MP, Harken AH, Meldrum DR. Early kidney TNF-alpha expression mediates neutrophil infiltration and injury after renal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1999;277:R922-9.
74. Lieberthal W. Biology of ischemic and toxic renal tubular cell injury: role of nitric oxide and the inflammatory response. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998;7:289-95.
75. Garner RC, Garner JV, Gregory S, et al. Comparison of the absorption of micronized (Daflon 500 mg) and non-micronized ¹⁴C-diosmin tablets after oral administration to healthy volunteers by accelerator mass spectrometry and liquid scintillation counting. *J Pharm Sci.* 2002; 91: 32-40.
76. Bouskela E, Donyo KA. Effects of oral administration of purified micronized flavonoid fraction on increased microvascular induced by various agents and on ischemia/ reperfusion in the hamster cheek pouch. *Angiology* 1997;48:391-9.
77. Messmer K. Daflon 500 mg: expert report on the preclinical documentation. Courbevoie Cedex, France: Institut de Recherches Internationales Servier, 1997 oct 68.
78. Cova D, De Angelis L, Giavarini F, et al. Pharmacokinetics and metabolism of oral diosmin in healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol.* 1992; 30: 29-33.
79. Damon M, Flandre O, Michel F, et al. Effect of chronic treatment with a purified flavonoid fraction on inflammatory granuloma in the rat: study of prostaglandin E2

- and F2a and thromboxane B2 release and histological changes. *Arzneimittelforschung*. 1987; 37:1149-1153.
80. Meyer O. Safety of use of Daflon 500 mg confirmed by acquired experience and new research. *Phlebology*. 1992; 7(Suppl 2): 64-68.
 81. Guillot B, Guilhou JJ, de Champvallins M, et al. A long term treatment with a venotropic drug: results on efficacy and safety of Daflon 500 mg in chronic venous insufficiency. *Int Angiol*. 1989; 8(Suppl 4): 67-71.
 82. Yildiz F, Terzi A, Coban S, Bitiren M, Celik H, Aksoy N, Ozdogan MK, Cakir H. Purified micronized flavonoid fraction ameliorates the injury of spleen and ileum secondary to hepatic ischemia-reperfusion in rats. *Dig Dis Sci*. 2010 Aug;55(8):2237-43.
 83. Shoab SS, Porter J, Scurr JH, Coleridge-Smith PD. Endothelial activation response to oral micronized flavonoid therapy in patients with chronic venous disease. A prospective study. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1999;17:313.
 84. Cospite M, Cospite V. Treatment of hemorrhoids with DAFILON 500 mg. *Phlebology*. 1992;7(suppl 2):53-56.
 85. Longchamp M. Protective effect of purified flavonoid fraction against reactive oxygen radicals. In vivo and in vitro study. *Arzneimittelforschung/Drug Res*. 1989;39:882-885.
 86. Hollingsworth JM, Miller DC, Daignault S, Hollenbeck BK. Rising incidence of small renal masses: A need to reassess treatment effect. *J Natl Cancer Inst* 2006 Sep 20; 98 (18): 1331-34.
 87. Pahernik S, Ziegler S, Roos F, Melchior SW, Thüroff JW. Small renal tumors: Correlation of clinical and pathological features with tumor size. *J Urol* 2007 Aug; 178 (2): 414-17.
 88. Rini B, Campbell S, Escudier B. Renal cell carcinoma. *Lancet* 2009 Mar 28; 373 (9669): 1119-32.
 89. Leibovich B, Blute M, Cheville J, Lohse CM, Weaver AL, Zincke H. Nephron sparing surgery for appropriately selected renal cell carcinoma between 4 and 7 cm results in outcome similar to radical nephrectomy. *J Urol* 2004 Mar; 171 (3): 1066-70.

90. Licht MR, Novick AC. Nephron sparing surgery for renal cell carcinoma. *J Urol* 1993 Jan; 149 (1): 1–7.
91. Margreiter M, Marberger M. Current status of open partial nephrectomy. *Curr Opin Urol* 2010 Sep; 20 (5): 361-4.
92. Marberger M. Renal ischaemia: Not a problem in laparoscopic partial nephrectomy? *BJU Int* 2007 Jan; 99 (1): 3–4.
93. Shikanov S, Lifshitz D, Chan AA, Okhunov Z, Ordonez MA, Wheat JC, Matin SF, Landman J, Wolf JS Jr, Eggener SE, Shalhav AL. Impact of ischemia on renal function after laparoscopic partial nephrectomy: a multicenter study. *J Urol* 2010 May; 183 (5): 1714–8.
94. Ljungberg B, Cowan N, Hanbury DC, Hora M, Kuczyk MA, Merseburger AS, Patard JJ, Mulders PF, Sinescu IC; European Association of Urology Guideline Group. EAU guidelines on renal carcinoma: the 2010 update. *Eur Urol*. 2010 Sep; 58 (3): 398-406.
95. Novick AC, Campbell SC, Belldegrun A, Blute ML, Chow GK, Derweesh IH, Faraday MM, Kaouk JH, Leveillee RJ, Matin SF, Russo P, Uzzo RG; Practice Guidelines Committee of the American Urological Association. Guideline for management of the clinical T1 renal mass. *J Urol* 2009 Oct; 182 (4): 1271–79.
96. Thompson RH, Boorjian SA, Lohse CM, Leibovich BC, Kwon ED, Cheville JC, Blute ML. Radical nephrectomy for pT1a renal masses may be associated with decreased overall survival compared with partial nephrectomy. *J Urol* 2008 Feb; 179 (2): 468–71; discussion 472-3.
97. Miller DC, Schonlau M, Litwin MS, Lai J, Saigal CS; Urologic Diseases in America Project. Renal and cardiovascular morbidity after partial or radical nephrectomy. *Cancer* 2008 Feb 1; 112 (3): 511–20.
98. Inan A, Sen M, Koca C, Akpinar A, Dener C. The effect of purified micronized flavonoid fraction on the healing of anastomoses in the colon in rats. *Surg Today*. 2006;36(9):818-22.
99. Singh NP, Danner DB, Tice RR, Pearson JB, Brant LJ, Schneider EL. DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *J. Mutat Res*. 1990; 237(8):123-30.
100. Demirbag R, Yilmaz R, Gur M, Kocyigit A, Celik H, Guzel S, Selek S. Lymphocyte DNA damage in patients with acute coronary syndrome and its

- relationship with severity of acute coronary syndrome J. Mutation Research 2005; 135(4) 22–35.
101. Erel Ö. A novel Automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical Biochemistry* 37:2004 112-119.
 102. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *J. Clinical Biochemistry* 2005; 47(5): 119– 29.
 103. Harma M, Harma M, Kocyigit A, Erel O. Increased DNA damage in patients with complete hydatidiform mole. *J. Mutation Research* 2005; 23: 49–54.
 104. Beutler E. Red cell metabolism – A manual of biochemical. Grune&Stratton (1975e), 2 Ed: pp, 89-90.
 105. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *AnalBiochem* 1979., 95(2): 351-358.
 106. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahr BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth. Enzymol.* (1990). 186: 464-473.
 107. Furlong C E, Li W F, Brophy VH, Jarvik G P, Richter R J, Shih D M, Lusi A L, Costa L G: The PON1 gene and detoxication. *Neurotoxicology* 2000; 21:581-587.
 108. Furlong CE, Richter RJ., Seidel S L, Motulsky AG. Role of genetic polymorphism of human plasma paraoxonase/arylesterase in hydrolysis of the insecticide metabolites chlorpyrifos oxon and paraoxon. *Am J Hum Genet* 1998; 43:230-238.
 109. Mackness M I, Arrol S, Durrington P N, Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett.* 1991; 286: 152-154.
 110. Feng L, Xiong Y, Cheng F, Zhang L ve ark. Effect of ligustrazine on ischemia-reperfusion injury in murine kidney. *Transplant Proc* 2004; 36: 1949–51.
 111. J. M. Thurman, Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion, *Clinical Immunology* 123 (2007), 7-13.
 112. Cakir, M., et al., The effect of dexmedetomidine against oxidative and tubular damage induced by renal ischemia reperfusion in rats. *Renal failure*, 2015. 37(4): p. 704-708.
 113. Costanzo LS. Renal functions. In:Winghager EE, Ellison DH. *Physiology*. 5th ed. NewYork: McGraw-Hill; 2003.p.182-93.

114. Akgür FM, Kiliç K, Aktuğ T, Olguner M. The effect of allopurinol pretreatment before detorting testicular torsion. *J Urol.* 1994;151:1715-17.
115. Akhter S, Sridher S, Katlowitz NM, et al. Immune response to testicular ischemia and reperfusion. *J Urol.* 1990;143:62.
116. Greenstein A, Smith-Harrison LI, Wakely PE, Kololgi S, Salzberg AD, Koontz WW. The effect of polyethylene glycolsuperoxide dismutase administration on histological damage following spermatic cord torsion. *J Urol.* 1992;148:639-41.
117. Ozkan KU, Boran C, Kiliç M, Garipardiç M, Kurutaş EB. The effect of zinc aspartate pretreatment on ischemiareperfusion injury and early changes of blood and tissue antioxidant enzyme activities after unilateral testicular torsiondetorsion. *J Pediatr Surg.* 2004;39:91-5.
118. Kehinde EO, Anim JT, Mojiminiyi OA, Al-Awadi F, Shihab- Eldeen A, Omu AE, et al. Allopurinol provides long-term protection for experimentally induced testicular torsion in a rabbit model. *BJU Int* 2005;96:175-80.
119. Maghsoudi S, Gol A, Dabiri S, Javadi A. Preventive effect of ginger (*Zingiber officinale*) pretreatment on renal ischemia-reperfusion in rats. *Eur Surg Res* 2011;46(1):45-51.
120. Fujii T, Takaoka M, Muraoka T, Kurata H, Tsuruoka N, Ono H et al. Preventive effect of L carnosine on ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. *Eur J Pharmacol* 2003;474(23):261-7.
121. Sayhan MB, Kanter M, Oguz S, Erboğa M. Protective effect of *Urtica dioica* L. on renal ischemia/reperfusion injury in rat. *J Mol Hist* 2012;43(6):691-8.
122. Sener G, Sener E, Şehirli O, Oğünç AV, Cetinel S, Gedik N et al. Ginkgo biloba extract ameliorates ischemia reperfusion-induced renal injury in rats. *Pharmacol Res* 2005;52(3):216-22.
123. Bagheri F, Gol A, Dabiri S, Javadi A. Preventive effect of garlic juice on renal reperfusion injury. *IJKD* 2011;5:194-200.
124. Yildiz F, Coban S, Terzi A, Aksoy N, Bitiren M. Protective Effect of Micronized Purified Flavonoid Fraction on Ischemia/Reperfusion Injury of Rat Liver. *Transplant Proc.* 2015 Jun;47(5):1507-10.
125. Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr* 2002;22:19-34.

126. Meister KA, Whelan EM, Kava R. The health effects of moderate alcohol intake in humans: an epidemiologic review. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2000; 37: 261-96.
127. Beecher GR. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr* 2003;133,3248-54.
128. Knekt P, Jarvinen R, Seppanen R. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am J Epidemiol* 1997;146:223-30.
129. Bhalodia, Y., Kanzariya, N., Patel, R. Renoprotective Activity of Benincasa Cerifera Fruit Extract on Ischemia/Reperfusion-Induced Renal Damage in Rat. *IJKD* 2009;3:80-5.
130. Foglieni, C., Fulgenzi, A., Ticozzi, P. Protective effect of EDTA preadministration on renal ischemia. *BMC Nephrology* 2006; 7:5.
131. Williams P, Lopez H, Britt D, Chan C ve ark. Characterization of renal ischemiareperfusion injury in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1997; 37: 1-7.
132. Yıldız F, Coban S, Terzi A, Savas M, Bitiren M, Celik H et al. Protective effects of Nigella sativa against ischemia-reperfusion injury of kidneys. *Ren Fail* 2010;32(1):126-31.
133. Singh D, Chopra K. Effect of trimetazidine on renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Pharmacological Research* 2004;50 :623–9.
134. Senturk H, Kolankaya D, Sahin Y. Renal Iskemi-Reperfüzyonu Sırasında Sıçan Böbreğinde Oluşan Oksidatif Stres Hasarına Silimarin Etkisi. *Cankaya University Journal of Science and Engineering Volume 7 (2010), No. 1, 59-74.*
135. Dobashi K, Ghosh B, Orak JK, Singh I, Singh AK. Kidney ischemia-reperfusion: Modulation of antioxidant defenses. *Mol Cell Biochem* 2000; 205: 1-11.
136. Aydogdu N, Kaymak K, Yalcin O. Sıçanlarda Böbrek İskemi/Reperfüzyon Hasarında N-Asetilsisteinin Etkileri. *Fırat Tıp Dergisi* 2005;10(4): 151-155.
137. Rosenblat M, Karry R, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) is a more potent antioxidant and stimulant of macrophage cholesterol efflux, when present in HDL than in lipoprotein-deficient serum: relevance to diabetes. *Atherosclerosis* 2006; 187: 74-81.
138. Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochem Pharmacol* 2005; 69: 541-50.

139. Ferretti G, Bacchetti T, Moroni C, Vignini A, Curatola G. Copper-induced oxidative damage on astrocytes: protective effect exerted by human high density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1635: 48-54.
140. Dias AT, Rodrigues BP, Porto ML, Gava AL, Balarini CM, Freitas FP, et al. Sildenafil ameliorates oxidative stress and DNA damage in the stenotic kidneys in mice with renovascular hypertension. *Journal of translational medicine* 2014;12:35.
141. Evans P, Lyras L, Halliwell B. Measurement of protein carbonyls in human brain tissue. *Methods Enzymol.* 1999; 300: 145-156.
142. Pompermayer K, Souza DG, Lara GG et al.: The ATP-sensitive potassium channel blocker glibenclamide prevents renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Kidney Int.* 2005; 67: 1785–1796.
143. Kher A, Meldrum KK, Hile KL et al.: Aprotinin improves kidney function and decreases tubular cell apoptosis and proapoptotic signaling after renal ischemia–reperfusion. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2005; 130: 662–669.
144. Singh D, Chander V, Chopra K. Protective effect of naringin, a bioflavonoid on glycerol-induced acute renal failure in rat kidney. *Toxicology* 2004;201(1-3):143-51.
145. Yurtçu M, Abasıyanık A, Avunduk MC, Muhtaroğlu S: Effects of melatonin on spermatogenesis and testicular ischemia-reperfusion injury after unilateral testicular torsion detorsion. *J Pediatr Surg.* 2008;43:1873-78.