



T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL RENAL İSKEMİ
REPERFÜZYON MODELİNE Gibco™ AmnioMAX™ - II Complete Medium
TEDAVİSİNİN ETKİSİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ
DR. NECATİ EKİCİ

DÜZCE-2025



T.C.

DÜZCE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL RENAL İSKEMİ
REPERFÜZYON MODELİNE Gibco™ AmnioMAX™ - II Complete Medium
TEDAVİSİNİN ETKİSİ**

DR. NECATİ EKİCİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

DR. ÖĞRETİM ÜYESİ EKREM BAŞARAN

DÜZCE-2025

TEŞEKKÜR

Tezimi oluşturmamın her aşamasında bana yol gösteren, hiçbir konuda desteğini esirgemeyen, her daim yanımda olan tez danışmanım ve değerli hocam Dr. Öğretim Üyesi Ekrem BAŞARAN'a

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi birikimiyle bana rehberlik eden değerli hocam Prof. Dr. Muhammet Ali KAYIKÇI' ya,

Asistanlık sürecim boyunca bilgi, birikim ve tecrübelerinden istifade ettiğim değerli hocalarım Dr. Öğretim Üyesi Alpaslan YÜKSEL'e, Dr. Öğretim Üyesi Yusuf ŞENOĞLU'na, Dr. Öğretim Üyesi Dursun BABA'ya, Dr. Öğretim Üyesi Arda Taşkın TAŞKIRAN'a, Dr. Öğretim Üyesi Ahmet Yıldırım BALIK'a,

Histopatolojik çalışmaların detaylı değerlendirilmesinde yardımcı olan değerli hocam Dr. Öğretim Üyesi Fatih DEMİR'e

Uzmanlık eğitimim süresince, bilgi ve deneyimlerimizi paylaştığımız, her daim birbirimize destek olarak güzel anılar biriktirdiğimiz, bu zorlu süreci daha anlamlı ve katlanabilir kıldıkları için minnettar olduğum değerli Uzman Dr.İsmail Eyüp DİLEK'e ve asistan arkadaşlarım Dr. Emre EDİZ' e, Dr. Burak AYVACIK'a, Dr.Yusuf Salih KÜÇÜK'e, Dr. Burak Mehmet GÜRPINARLI'ya, Dr. Melih BALÇIN' a ve Dr. Ali İbrahim İZULA'ya

Anabilim Dalı'mızda yer alan akademik ve cerrahi gelişimime katkısı olan, öncelikle Üroloji Anabilim Dalı bünyesinde çalışan hemşire, personel ve tüm değerli çalışma arkadaşlarıma

Meşakkatli eğitim hayatım süresince her şart ve koşulda arkamda duran, bana destek olan ve umut aşılayan kıymetli annem, babam ve kardeşime

Hayatımı her anlamda güzelleştiren, zor zamanlarımda en büyük destekçim olan sevgili eşim Serpil EKİCİ'ye, hayata bakış açımı değiştiren biricik oğlum ve göz bebeğim Uraz EKİCİ 'ye sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
ÖZET	ix
ABSTRACT	xi
ŞEKİL DİZİNİ	iv
TABLO DİZİNİ.....	iv
GRAFİK DİZİNİ.....	v
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Böbreğin Embriyolojisi	3
2.2. Böbreğin Anatomisi.....	4
2.3. Böbreğin Fizyolojisi.....	7
2.3.1. Renal Perfüzyon.....	7
2.3.2. Nefronun Rolü ve İdrar Oluşumu	10
2.3.3. Endokrin Fonksiyonlar	13
2.4. Böbrek İskemi Reperfüzyon Hasarı	15
2.4.1. İskemi Reperfüzyon Hasarı Patofizyolojisi.....	16
2.5. İskemi Reperfüzyon Hasarında Amniyotik Kök Hücre Tedavisinin Yeri	24
2.6. Gibco™ AmnioMAX™ - II Complete Medium Yapısı.....	26
3. MATERYAL VE METOT	27
3.1. Etik Kurul Onayı.....	27
3.2. Deney Hayvanları ve Deney Ortamı	27
3.3. Deney Grupları.....	27
3.4. Biyokimyasal Analiz.....	30
3.4.1. Doku MDA(Malondialdehit) Ölçümü	32
3.4.2. Doku TAS,TOS,OSI Ölçümü	32
3.4.3. Doku Superoksit Dismutaz(SOD) Aktivite Ölçümü	33
3.4.4. Doku Katalaz(CAT) Aktivite Ölçümü	33
3.4.5. Doku Glutasyon Peroksidaz(GPx) Aktivite Ölçümü	33
3.4.6. Doku Oksitlenmiş Total Glutasyon(GSH) Ölçümü	33
3.4.7. Doku Nitrik Oksit Sentaz (iNOS)Aktivite Ölçümü	34
3.4.8. Serum Üre(BUN),Kreatinin Seviye Ölçümü.....	34

3.5. Histopatolojik Değerlendirme.....	34
3.6. İstatistiksel Analiz	37
4. BULGULAR	38
4.1. Biyokimyasal Analiz.....	38
4.1.1. Doku TAS değerleri.....	38
4.1.2. Doku TOS Değerleri	39
4.1.3. Doku OSI Değerleri	40
4.1.4. Doku GSH Değerleri.....	41
4.1.5. Doku SOD Değerleri.....	42
4.1.6. Doku GPx Değerleri	43
4.1.7. Doku CAT Değerleri.....	44
4.1.8. Doku MDA Değerleri	45
4.1.9. Doku iNOS Değerleri.....	46
4.1.10. Serum Üre Değerleri	47
4.1.11. Serum Kreatinin Değerleri	48
4.1.12. Serum BUN Değerleri.....	49
4.2. Histopatolojik Analiz	50
4.2.1. Grup 1 histopatolojik değişiklikler	51
4.2.2. Grup 2 histopatolojik değişiklikler	52
4.2.3. Grup 3 histopatolojik değişiklikler	52
4.2.4. Grup 4 histopatolojik değişiklikler	53
4.2.5. Histopatolojik Değişikliklerin İstatistik Analizi.....	53
5. TARTIŞMA	57
5.1. Çalışmanın Kısıtlılıkları.....	61
6. SONUÇ	62
7. KAYNAKÇA	64

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. (A) 3. Haftadaki böbrek gelişimi (B) 3-7 haftalar arası böbrek gelişimi (14).	4
Şekil 2. Böbreğin anatomik yapısı(17).	5
Şekil 3. Nefronun bölümleri (22).	6
Şekil 4. Haber-Weiss ve Fenton Reaksiyonu(60).	18
Şekil 5. Kompleman yolaklarının şematizasyonu(66).	21
Şekil 6. Hayvan Deney Grupları ve Kafes Düzeni	29
Şekil 7. Bilateral Renal İskemi Prosedürü	30
Şekil 8. Biyokimyasal ölçümlerde kullanılan MINDRAY-BS400 cihazı	31
Şekil 9. Biyokimyasal ölçümlerde kullanılan REL ASSAY cihazı	31
Şekil 10. Doku ve Kan Örnekleri	35
Şekil 11. Kontrol grubundaki histopatolojik değişiklikler	51
Şekil 12. Hastalık grubundaki histopatolojik değişiklikler	52
Şekil 13. Tedavi grubundaki histopatolojik değişiklikler	52
Şekil 14. Profilaksi grubundaki histopatolojik değişiklikler	53

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. EGTİ Histolojik Skorlama Sistemi	36
Tablo 2. Grupların böbrek dokusu ortalama TAS değerleri	38
Tablo 3. Grupların böbrek dokusu ortalama TOS değerleri	40
Tablo 4. Grupların böbrek dokusu ortalama OSI değerleri	41
Tablo 5. Grupların böbrek dokusu ortalama GSH değerleri	42
Tablo 6. Grupların böbrek dokusu ortalama SOD değerleri	43
Tablo 7. Grupların böbrek dokusu ortalama GPx değerleri	44
Tablo 8. Grupların böbrek dokusu ortalama CAT değerleri	45
Tablo 9. Grupların böbrek dokusu ortalama MDA değerleri	46
Tablo 10. Grupların böbrek dokusu ortalama iNOS değerleri	47
Tablo 11. Grupların ortalama serum Üre değerleri	48
Tablo 12. Grupların ortalama serum Kreatinin değerleri	49
Tablo 13. Grupların ortalama serum BUN değerleri	50
Tablo 14. EGTİ Sistemine göre gruplar arası toplam skorlar	54
Tablo 15. Grupların sağ böbrek dokusu ortalama EGTİ skorları	55
Tablo 16. Grupların sol böbrek dokusu ortalama EGTİ skorları	56

GRAFİK DİZİNİ

Grafik 1. Böbrek dokusu ortalama TAS değerleri	39
Grafik 2. Böbrek dokusu ortalama TOS değerleri	40
Grafik 3. Böbrek dokusu ortalama OSI değerleri	41
Grafik 4. Böbrek dokusu ortalama GSH değerleri.....	42
Grafik 5. Böbrek dokusu ortalama SOD değerleri.....	43
Grafik 6. Böbrek dokusu ortalama GPx değerleri.....	44
Grafik 7. Böbrek dokusu ortalama CAT değerleri.....	45
Grafik 8. Böbrek dokusu ortalama MDA değerleri	46
Grafik 9. Böbrek dokusu ortalama iNOS değerleri.....	47
Grafik 10. Ortalama serum Üre değerleri	48
Grafik 11. Ortalama serum Kreatinin değerleri	49
Grafik 12. Ortalama serum BUN değerleri.....	50
Grafik 13. Sağ böbrek dokusu ortalama EGTİ skorları.....	55
Grafik 14. Sol böbrek dokusu ortalama EGTİ skorları	56

SİMGELER VE KISALTMALAR

25-OH: Kolekalsiferol

ABH: Akut Böbrek Hasarı

ABTS: 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)

ABY: Akut Böbrek Yetmezliği

ACE: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim

ADH: Antidiüretik Hormon

AS: Amniyotik Sıvı

ATP: Adenozin Trifosfat

CAT: Katalaz

Cl⁻: Klor

DTNB: Ditiyonitrobenzoik asit

EGTI: Endotelial, Glomerüler, Tübüler, İnterstisyel

FBS: Fetal Sığır Serumı

GFR: Glomerüler Filtrasyon Hızı

GPx: Glutasyon Peroksidaz

GSH: Glutasyon

GST: Glutasyon S-Transferaz

H&E: Hematoksilen-Eozin

H₂O₂: Hidrojen Peroksit

HOCl: Hipoklorik Asit

HRP: Horseradish Peroksidaz

I/R: İskemi Reperfüzyon

ICAM-1: İntraselüler adezyon molekülleri

INT: 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolium klorür

JG: Jukstaglomerüler

K⁺: Potasyum

Kalsitriol: 1,25-dihidroksikolekalsiferol

Kalsiyum: Ca⁺

MAC: Membran Saldırı Kompleksi

MDA: Malondialdehit

MODS: Çoklu Organ Disfonksiyon Sendromu

MPO: Miyeloperoksidaz

Na⁺: Sodyum

NaCl: Sodyum Klorür

NO: Nitrik Oksit

NOS: Nitrik Oksit Sentaz

O₂ : Moleküler Oksijen

O⁻²: Süperoksit

OH⁻: Hidroksil

OSI: Oksidatif Stres İndeksi

PAS: Periyodik Asit-Schiff

PMNL: Polimorf Nüveli Lökositler

PTH: Paratiroid Hormonu

RAAS: Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi

ROS: Serbest Oksijen Radikalleri

ROT: Reaktif Oksijen Türleri

SIRS: Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu

SOD: Süperoksit Dismutaz

TAS: Total Antioksidan Kapasite

TBA: Tiyoarbiturik Asit

TGF: Tübüloglomerüler Feedback

TOS: Total Oksidan Seviye

XOD: Ksantin Oksidaz



ÖZET

Giriş ve amaç: İskemi reperfüzyon hasarı; parsiyel nefrektomi, renal transplantasyon ve sepsis gibi klinik durumlarda böbreğe giden kan akımının azalması veya tamamen sonlanması sonucunda ortaya çıkan ve hayatı tehdit eden bir tablodur. Bu çalışmada amniyon hücre kültür özelliği taşıyan Gibco™ AmnioMAX™ - II Complete Medium tedavisinin iskemi reperfüzyon hasarı üzerine etkilerini araştırmayı amaçladık.

Gereç ve yöntem: Bu deneysel hayvan çalışması, Düzce Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 200-250 gram ağırlığında, 8-10 haftalık, 36 adet Wistar-Albino cinsi dişi rat kullanıldı. Ratlar 4 grubu ayrıldı. Grup 1 (n=9), sham grubu olarak belirlendi ve yalnızca laparotomi uygulandı. Grup 2 (n=9), I/R grubu olarak tasarlandı ve uygun cerrahi prosedürle yalnızca bilateral renal pedikül klemplenerek 45 dakika iskemi sonrası reperfüzyon uygulandı. Grup3 (n=9)'e 45 dakika iskemi uygulandıktan sonra reperfüzyon sağlandı ve reperfüzyondan 1 saat sonra 1 cc Gibco™ AmnioMAX™ - II Complete Medium intraperitoneal olarak uygulandı ve bu grup tedavi grubu olarak adlandırıldı. Grup 4 (n=9)'e iskemiden 1 saat önce 1 cc Gibco™ AmnioMAX™ - II Complete Medium intraperitoneal olarak uygulandı ve iskemi reperfüzyon prosedürü aynı şekilde yapıldı. Reperfüzyon tüm gruplar için 24 saat olarak belirlendi ve 24 saat sonra denekler sakrifiye edildi. Kan örneklerinden serum kan üre azotu (BUN), üre, kreatinin seviyeleri belirlendi. Renal doku kesitlerinden ise biyokimyasal olarak Malondialdehit (MDA), Katalaz (CAT), Super Oksit Dismutaz (SOD), Total Antioksidan Status (TAS), Total Oksidant Status (TOS), Glutatyon Peroksidaz (GPx), Glutatyon (GSH), Nitrik Oksit Sentaz (NOS) konsantrasyonları belirlendi. Histopatolojik incelemeler için H&E ve PAS boyamaları yapılarak EGTI skorlama sistemi kullanıldı. İstatistiksel analizde p<0,05 anlamlı olarak kabul edildi.

Bulgular: Serum örneklerinden çalışan BUN, üre ve kreatinin değerleri sham grubuna kıyasla I/R grubunda yüksek, tedavi grubunda ise I/R grubuna göre anlamlı derecede düşük olarak bulundu. TAS değerleri I/R grubunda kontrol grubuna göre ciddi derecede düşük belirlendi. Tedavi ve profilaksi grubunda ise I/R grubuna kıyasla yüksek saptandı. TOS/OSI seviyeleri, TAS seviyelerinin tam tersi şekilde I/R grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında I/R grubunda yüksek saptandı. Tedavi grubundaki TOS/OSI seviyeleri I/R grubunda düşük bulundu. GSH, SOD, GPx, CAT ortalama değerleri birbirine benzer şekilde I/R grubunda sham grubuna göre düşük olarak tespit edildi. Tedavi gruplarında ise I/R grubunu göre yüksek olduğu anlamlı bulundu. MDA seviyeleri

I/R grubunda kontrol grubuna göre yüksek bulundu. Diğer gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı. NOS seviyeleri arasında anlamlı farklılık tespit edilmedi. Histopatolojik incelemelerde sağ ve sol böbrek dokularını EGTI skorları arasında anlamlı fark yoktu. Sağ ve sol böbrek kesitlerinde I/R grubunda bu skor tedavi, profilaksi ve kontrol grubuna göre yüksekti. Profilaksi ve tedavi grupları kıyaslandığında biyokimyasal ve histopatolojik değerlendirmelerden sadece GSH seviyelerinde, tedavi grubunun daha yüksek olduğu anlamlı bulundu.

Sonuç: Sıçanlarda oluşturulan renal I/R hasarı modelinde Gibco™ AmnioMAX™ - II Complete Medium tedavisinin histopatolojik ve biyokimyasal araştırma sonucunda doku hasarını azalttığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: İskemi Reperfüzyon Hasarı, Gibco™ AmnioMAX™ - II Complete Medium, Amnion

ABSTRACT

Introduction and objective: Ischemia reperfusion injury is a life-threatening condition that occurs as a result of reduced or complete cessation of blood flow to the kidney in clinical conditions such as partial nephrectomy, renal transplantation and sepsis. In this study, we aimed to investigate the effects of Gibco™ AmnioMAX™ - II Complete Medium treatment, which has amniotic cell culture properties, on ischemia reperfusion injury.

Materials and Methods: This experimental animal study was conducted with the approval of the Düzce University Animal Experiments Ethics Committee. In the study, 36 female Wistar-Albino rats, weighing 200-250 grams, aged 8-10 weeks, were used. The rats were divided into 4 groups. Group 1 (n=9) was determined as the sham group and only laparotomy was applied. Group 2 (n=9) was designed as the I/R group and reperfusion was applied after 45 minutes of ischemia by clamping only bilateral renal pedicles with the appropriate surgical procedure. Group 3 (n=9) received reperfusion after 45 minutes of ischemia and 1 hour after reperfusion, 1 cc of Gibco™ AmnioMAX™ - II Complete Medium was administered intraperitoneally and this group was called the treatment group. Group 4 (n=9) received 1 cc of Gibco™ AmnioMAX™ - II Complete Medium intraperitoneally 1 hour before ischemia and the ischemia was continued until the end of the treatment period. The reperfusion procedure was performed in the same way. Reperfusion was determined as 24 hours for all groups, and the subjects were sacrificed after 24 hours. Serum BUN, urea, and creatine levels were determined from blood samples. Malondialdehyde (MDA), Catalase (CAT), Super Oxide Dismutase (SOD), Total Antioxidant Status (TAS), Total Oxidant Status (TOS), Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione (GSH), and Nitric Oxide Synthase (NOS) concentrations were determined biochemically from renal tissue sections. H&E and PAS stains were performed for histopathological examinations, and the EGTI scoring system was used. $P < 0.05$ was considered significant in statistical analysis.

Result: BUN, urea and creatinine values studied from serum samples were found to be higher in the I/R group compared to the sham group and significantly lower in the treatment group compared to the I/R group. TAS values were significantly lower in the I/R group compared to the control group. They were higher in the treatment and prophylaxis groups compared to the I/R group. TOS/OSI levels, in contrast to TAS levels,

were found to be higher in the I/R group when the I/R group and the control group were compared. TOS/OSI levels in the treatment group were found to be lower in the I/R group. Mean values of GSH, SOD, GPx and CAT were found to be similarly lower in the I/R group compared to the sham group. However, they were found to be significantly higher in the treatment groups compared to the I/R group. MDA levels were found to be higher in the I/R group compared to the control group. No significant difference was found between the other groups. No significant difference was found between the NOS levels. In histopathological examinations, there was no significant difference between the EGTI scores of the right and left kidney tissues. In the right and left kidney sections, this score in the I/R group was higher than in the treatment, prophylaxis and control groups. When the prophylaxis and treatment groups were compared, only the GSH levels were found to be significantly higher in the treatment group among the biochemical and histopathological evaluations.

Conclusion: In the renal I/R injury model created in rats, it was concluded that Gibco™ AmnioMAX™ - II Complete Medium treatment reduced tissue damage as a result of histopathological and biochemical studies.

Keywords: Ischemia Reperfusion Injury, Gibco™ AmnioMAX™ - II Complete Medium, Amnion

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Böbrek, çeşitli cerrahi girişimler veya klinik durumlar sırasında iskekiye, yani kan akımının azalmasına ve ya tamamen kesilmesine maruz kalabilen hayati bir organdır (1). İskekiye, böbrek dokusunda oksijen yoksunluğuna yol açarak hücrelerde enerji kaybı, toksik metabolit birikimi, fonksiyon bozukluğu ve hatta hücre ölümü gibi ciddi hasarlara neden olur. İskekiye süresi ne kadar uzarsa hasarın şiddeti de o doğrultuda artar (2).

Organlara giden kan akışının durması veya azalması iskekiye, kan akışının yeniden sağlanması da reperfüzyon olarak adlandırılır. İskekiye, böbrek gibi çoğu organ için çok ciddi hasarlar oluşturabilecek patofizyolojik süreçlerden birisidir. Reperfüzyon; parsiyel nefrektomi, böbrek transplantasyonu, şok, sepsis, kardiyopulmoner bypass ve bazı ürolojik işlemlerin yanında pek çok klinik durumda görülebilir. Böbrek yetmezliği ise iskekiye reperfüzyon (I/R) hasarının meydana gelmesi sonucunda ortaya çıkabilecek klinik durumlardan bir tanesidir (3).

İskekiyeyle beraber dokuların oksijenlenmesi azalırken, reperfüzyonla beraber paradoksal olarak hücreyel düzeyde şiddetli hasar gelişir. Reperfüzyon, her ne kadar gerekli olsa da, bu süreçte hasarlı dokuya bol miktarda moleküler oksijen (O_2) sunulmasıyla aşırı serbest oksijen radikalleri (ROS) oluşumu ve antioksidan savunma mekanizmalarında yetersizlik meydana gelir. Bu durum, akut böbrek hasarının (ABH) gelişiminde önemli bir rol oynar (4). Akut iskemik böbrek hasarı, böbreklere yeterli arteriyel kan akışının engellenmesi sonucunda gelişen yaygın bir komplikasyondur. Hemorajik şok, sepsis, parsiyel nefrektomi ve böbrek transplant cerrahisi gibi klinik durumlarda böbreğe giden kan akımının kesilip aniden tekrar başlaması, dokuları ciddi bir reaktif oksijen yüküne maruz bırakmaktadır. Bu durumun başlıca sebebi ROS artışı, inflamatuvar hücrelerin inflamasyon alanına göçü ve adhezyonuyla gelişen bir dizi biyokimyasal reaksiyondur. Başta lökositler olmak üzere endotel tarafından açığa çıkarılan ROS, lipid, protein ve nükleik asitlerin oksidasyonuna yol açar. Hücre zarındaki fosfolipidler de aynı oksidasyona uğrar ve bu durum zar bütünlüğüne zarar verir. Hücre içi kalsiyum artışı ve arasıdonik asit metabolitleri gibi faktörler, böbrek hücrelerindeki ROS öncülleridir. Bu öncüller vasıtasıyla mitokondriyal disfonksiyon, ATP azalması, sitokin ve kemokin salınımıyla tetiklenen inflamasyon, lökosit aktivasyonu,

mikrovasküler değişiklikler, endotel disfonksiyonu ve sonuç olarak gelişen bir dizi reaksiyon sonucu hücre membran yıkımı artar ve böbrek fonksiyonları bozulur (5).

İskemi süresince ATP düşüşü, hücre içi ve dışı arasındaki iyon dengesini bozar. Hücre içi sodyum ve kalsiyum artışı, hücrenin şişmesiyle sonuçlanır. Reperfüzyonda ise proinflatuvar sitokin artışı ve nötrofil aktivasyonu hasarı şiddetlendirmektedir. Nötrofillerin dokulara infiltrasyonu ile beraber ROS üretimi artar. Bundan dolayı reperfüzyon hasarının tedavisi için lökositlerin inflamasyon alanına infiltrasyonunu önlemek temel amaçlardan biri olarak kabul edilir.

İskemik böbrek hasarı, kan akışının yeniden sağlanması sonucunda I/R hasarı nedeniyle daha da kötüleşir. Bu patofizyolojik kaskadı yavaşlatmak veya durdurmak amacıyla, renal I/R hasarına etkisi araştırılmak üzere birçok etken madde yakın zamanda hayvan deneyi çalışmalarında kullanılmıştır. Etkinliği kanıtlanan ajanlar olmakla beraber, rutin kullanıma giren herhangi bir etken madde yoktur. Antioksidan özellik gösteren moleküllerin yanında, insan amniyon sıvısı ve kök hücrelerle ilgili yapılan çalışmalar oldukça umut vadedicidir (6).

Yakın zamanda amniyotik sıvı ile yapılan çalışmalar yüz güldürücü sonuçlar vermiştir (7). Birçok büyüme faktörünü içerisinde barındıran amniyotik sıvının özellikle yara iyileşmesi üzerine etkinliği kanıtlanmıştır (8). İskemi reperfüzyon hasarında da amniyotik sıvı kök hücreleriyle yapılan çalışmalarda benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Bu tez çalışması, deneysel renal iskemi reperfüzyon modelinde amniyon hücre kültürü özelliği taşıyan Gibco™ AmnioMAX™ - II Complete Medium tedavisinin potansiyel etkilerini araştırmayı hedeflemektedir. İnsan amniyon hücre kültürü özelliği taşıyan Gibco™ AmnioMAX™- II Complete Medium adlı preparatın renal iskemi reperfüzyon hasarına etkisini araştıracağız. Yapılan literatür taramasında bu preparatın renal I/R hasarında kullanıldığına dair literatür verisine rastlanmamıştır. İskemi öncesi ve iskemi sonrası etken madde uygulanarak bir nevi koruyucu ve tedavi edici etki araştırılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Böbreğin Embriyolojisi

Embriyolojik dönemde böbrek gelişimi 3 aşamadan oluşmaktadır (9).

- Pronefroz

Embriyolojik dönemde ilk gelişen böbrek yapısıdır. Pronefroz latince "ilk böbrek" anlamına gelmektedir. 4. haftada gözlenir. İşlevsel değildir. Servikal bölgede intermediate mezodermden gelişir. 4. haftanın sonunda kaybolur (10).

- Mezonefroz

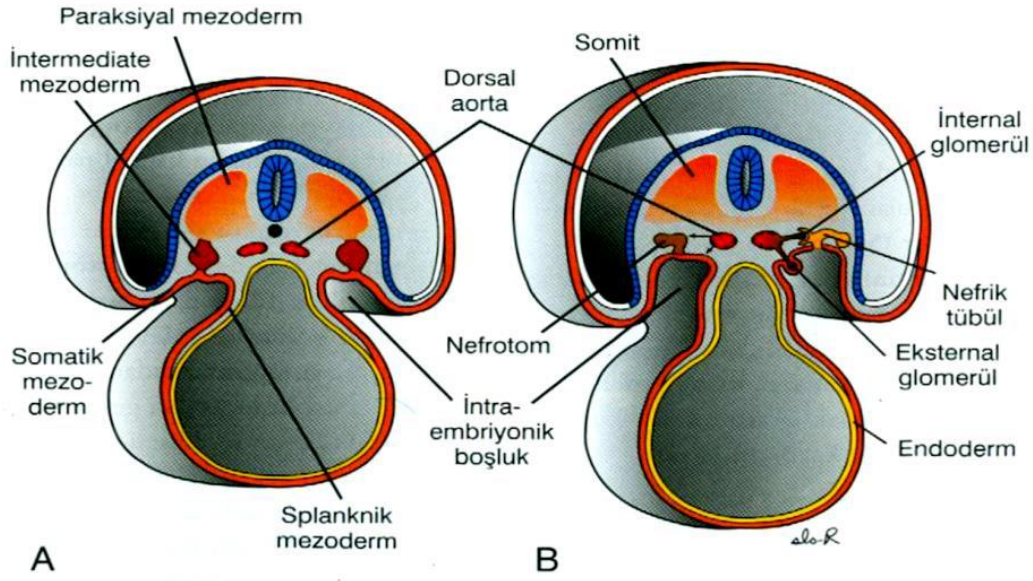
Pronefrozun dejenerasyonu ile eş zamanlı olarak, dördüncü haftanın sonlarına doğru torasik ve lomber bölgelerdeki ara mezodermden mezonefroz gelişmeye başlar. Mezonefrik tübüller, glomerüllerle ilişki kurarak böbrek cisimcikleri (Bowman kapsülü ve glomerül) oluşturur. Bu tübüller, yanal olarak uzanarak mezonefrik kanala (Wolff kanalı olarak da bilinir) açılır. Mezonefroz, embriyonik dönemde kısa bir süre için işlevsel bir boşaltım organı görevi görür ve fetal idrarın oluşumuna katkıda bulunur. Ancak, altıncı haftanın sonunda mezonefrozun büyük bir kısmı dejenere olur. Erkeklerde mezonefrik kanalın kalıntıları, epididimis, vas deferens ve seminal veziküller gibi genital sistemin bazı yapılarını oluştururken, dişilerde rudimenter kalıntılar olarak kalır (11).

- Metanefroz

Böbrek gelişiminin son ve kalıcı aşamasıdır. 5. haftada gelişmeye başlayan bu yapı 4 hafta sonra işlevsel hale gelir. Metanefrozun gelişiminde iki embriyolojik oluşum etkileşim halindedir. Bu yapılar, üreterik tomurcuk ve metanefrik mezodermdir.

Üreterik Tomurcuk: Mezonefrik kanalın kaudal ucundan çıkan bir divertikül olan üreterik tomurcuk, gelecekteki üreter, böbrek pelvisi, kaliksler ve toplayıcı kanalları oluşturacaktır (12). Üreterik tomurcuk, metanefrik mezoderme doğru büyür ve bu etkileşim, böbrek gelişiminin anahtarını oluşturur.

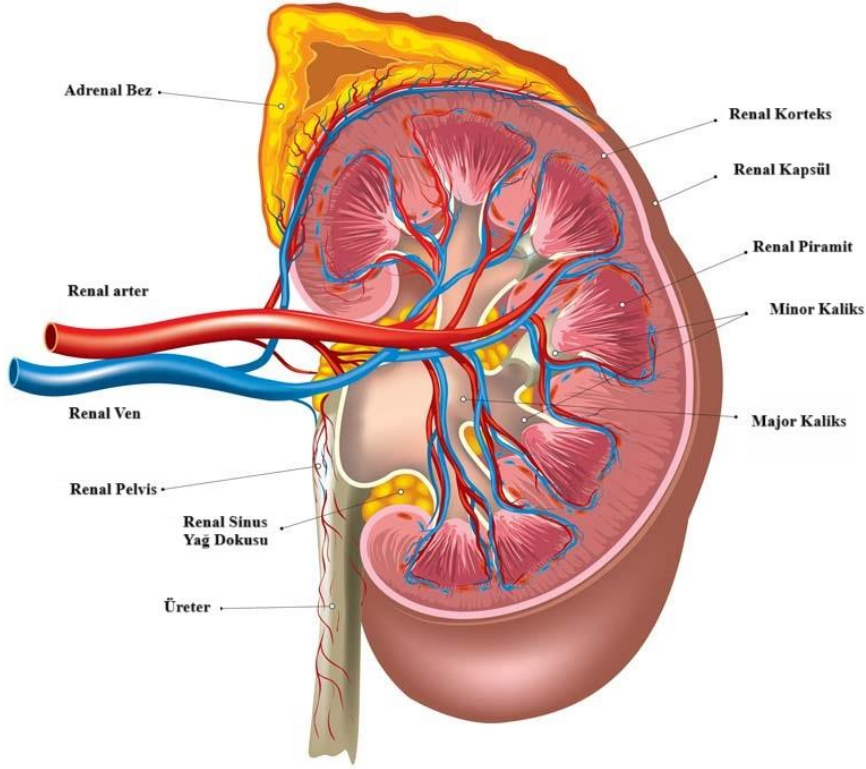
Metanefrik Mezoderm: Üreterik tomurcukla etkileşime girerek böbreğin temel fonksiyonel kısımları olan nefronları oluşturur (13).



Şekil 1. (A) 3. Haftadaki böbrek gelişimi (B) 3-7 haftalar arası böbrek gelişimi (14).

2.2. Böbreğin Anatomisi

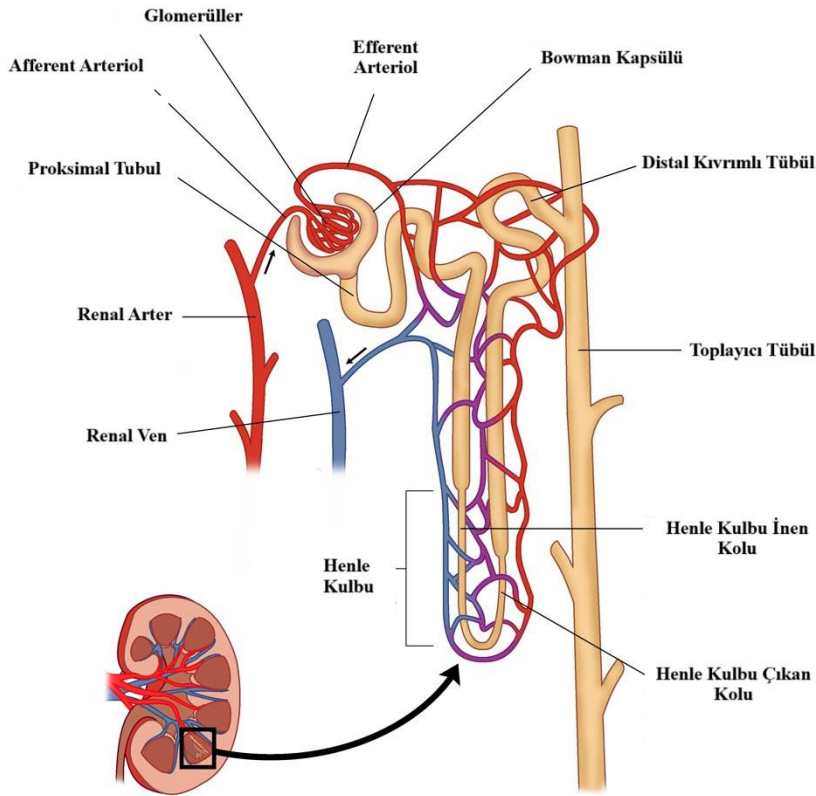
Böbrekler, retroperitonel alanda, karın arka duvarında, omurganın her iki yanında, 12. torasik vertebra ile 3. lomber vertebra seviyeleri arasında bilateral yerleşim gösteren end organlardır. Ortalama olarak, her bir böbrek 120 ila 200 gram ağırlığında olup, yaklaşık 12-13 cm uzunluğa, 6-7 cm ene ve 2.5-3 cm derinliğe sahiptir. Sağ böbrek, karaciğerin sağ lobunun varlığı ve basısı nedeniyle sol böbreğe kıyasla 1-2 cm daha aşağıda konumlanır (15). Her bir böbreğin uzun eksenini inferior ve lateral olarak yönelmiş, üst kutupları alt kutuplara kıyasla orta hatta daha yakındır. Böbreklerin anterior ve posterior yüzeyleri, lateralde konveks, medialde ise konkav bir kenar ile birbirinden ayrılır (16).



Şekil 2. Böbreğin anatomik yapısı (17).

Böbreğin medial kenarında bulunan renal hilus yapısı, böbreğin giriş ve çıkış noktasıdır. Böbreğin arter ve venleri, renal pelvis, üreter, lenfatik yapılar ve organa ait sinirler bu bölgeden geçer. Renal hilus, böbrek içinde renal sinüs adı verilen, içerisinde renal pelvis, kaliksler, damarlar ve sinirler ile değişen miktarda yağ dokusu barındıran bir boşlukla devam eder (18). Böbrekler, dıştan içe doğru sırasıyla fibröz kapsül, perirenal yağ dokusu, Gerota fasyası ve pararenal yağ dokusu gibi tabakalarla çevrilidir. Sagittal kesitte böbrek, dıştan içe doğru korteks, medulla ve papilla olmak üzere başlıca üç anatomik bölgeye ayrılır. Granüllü bir görünüme sahip olan korteks tabakası, böbrek kapsülünün hemen altında yer alır ve tüm glomerülleri, tübüllerin kıvrımlı bölümlerini ve kortikal toplayıcı kanalları barındırır (19). Korteks aynı zamanda, medüller piramitler arasına uzanarak Bertini kolonlarını oluşturur. Medulla ise, iç ve dış medulla olmak üzere ikiye ayrılır ve yaklaşık 10-15 adet renal piramitten oluşur; bu piramitlerin tabanları korteks-medulla sınırında başlar ve apikal uçları (papilla renalis) kaliks boşluğuna doğru uzanır (20). Renal papillalardan idrar süzüldüğünde, ilk olarak minör kaliks yapılarına boşalır; minör kaliksler birleşerek majör kaliksleri oluşturur ve oluşan idrar doğrudan bu yapılara iletilir. Majör kaliksler ise birleşerek böbrek hilusunda yer alan huni şeklindeki renal pelvisi

meydana getirir ve bunun devamı olan üreter, idrarı mesaneye taşır. Kaliksler, renal pelvis ve üreterlerin duvarları, idrar akışını sağlayan peristaltik hareketlerden sorumlu kasılabilir elemanlar içerir. Böbreğin idrar oluşturma yeteneğine sahip ünitesi nefronlardır. Böbreğin temel yapısal ve fonksiyonel birimi olan nefron, her bir böbrek için toplamda 1 ila 3 milyon arasında bulunur ve idrarın oluşumunu gerçekleştiren bağımsız bir ünedir (21).



Şekil 3. Nefronun bölümleri (22).

Nefronlar, damarsal yapılar (glomerül) ve tübüler yapılardan oluşur; kanı süzerler (filtrasyon), vücudun ihtiyaçları doğrultusunda maddelerin bir kısmını geri emerler (reabsorbsiyon) ve kalanları idrar olarak vücuttan atılmasını sağlarlar (ekskresyon) (23). Nefronlar, yerleşimleri itibariyle üç ana tipe ayrılır: süperfisyal, mid-kortikal ve jukstamedüller nefronlar. Süperfisyal ve mid-kortikal nefronlar kısa henle kulplarına sahipken, jukstamedüller nefronlar iç medullaya kadar inebilen uzun henle kulplarına sahiptir (24). Oluşan idrar, ortak açılma kanalları aracılığıyla böbrek papillalarına, oradan da kalikslere ve pelvise boşaltılır. Böbreklerin kanlanması, aortadan köken alan birer adet majör renal arter ile sağlanır. Renal arterler, böbrek hilusundan geçerek sırasıyla

segmental, interlobar, arkuat ve interlobüler arter ismini alır. Glomerüllere giden afferent arteriyoller, interlobüler arterlerden köken alır ve glomerülü oluşturan kapillerler, efferent arteriyollerini meydana getirir. Efferent arteriyoller, tübüleri saran peritübüler kapiller ağını veya jukstamedüller nefronlarda vasa recta'yı oluşturur (25). Venöz kan ise, interlobüler ven, arkuat ven, interlobar ven ve renal ven yoluyla toplanarak inferior vena kava'ya drene olur. Böbrekler, otonom sinir sisteminin etkisi altındadır; plexus renalis aracılığıyla innervasyon alırlar. Adrenerjik sistem aktive olduğunda, böbreğin vasküler yapıları kasılır ve dolayısıyla kan akımı azalır. Azalan kan akımı idrar oluşumunu da azaltır. Parasempatik nörolojik aktivite hala tam olarak anlaşılamamıştır. Lenfatik drenaj açısından, proksimal üreter, kaliksler ve renal pelvisin lenfatik akımı lumbar lenf nodlarına; orta üreterin drenajı internal iliak ve common iliak lenf nodlarına; distal üreterin drenajı ise vezikal ve hipogastrik lenf nodlarına gerçekleşir (26).

2.3. Böbreğin Fizyolojisi

Böbrekler, organizmanın homeostazisinin sürdürülmesinde kritik öneme sahip, multifonksiyonel organlardır. Geleneksel olarak en bilinen görevi metabolik atık maddelerin vücuttan uzaklaştırılması olsa da, böbrekler idrar oluşumu ve endokrin aktiviteleri de dahil olmak üzere birçok hayati fizyolojik süreci yürütürler (27). İdrar oluşumu süreciyle böbrekler, özellikle protein metabolizması sonrasında ortaya çıkan üre, kreatinin, ürik asit, fosfatlar ve sülfatlar gibi atık ve toksik maddelerin etkin bir şekilde vücuttan atılımını sağlar. Bu mekanizma, vücuttaki su ve elektrolit dengesinin yanı sıra asit-baz dengesinin sürdürülmesinde de kritik ve hayati bir rol oynamaktadır. Böbrekler, vücut sıvısının ve inorganik maddelerin dengesini koruyarak homeostazı sürdürür (28). Ayrıca, çeşitli ilaçlar ve metabolizma için toksisite oluşturan maddeler ile organizma için gereksiz veya potansiyel olarak zararlı yabancı maddelerin atılımı da böbreklerin önemli metabolik görevleri arasındadır. İdrar oluşumunun temel basamakları; dolaşımdaki kanın süzülmesi (filtrasyon), metabolizmanın ihtiyacı olan maddelerin geri emilimi, atık maddelerin sekresyonu ve oluşan idrarın vücuttan uzaklaştırılmasıyla süreç tamamlanır (29).

2.3.1. Renal Perfüzyon

Böbrekler, toplam vücut kütlelerinin yalnızca küçük bir bölümünü oluşturmalarına rağmen, kardiyak debinin yaklaşık %20'sini, yani sağlıklı bir insanda dakikada ortalama 1200 ml

kanı süzerek yüksek düzeyde perfüzyon gösterirler (30). Bu yoğun kan akımı, böbrek metabolik gereksinimlerinin çok ötesinde olup, esasen kanın atık ürünlerden temizlenmesi ve plazma hacmi ile bileşiminin hassas bir şekilde ayarlanması gibi filtrasyon ve düzenleme fonksiyonları için gereklidir. Atık ürünler, fazla sıvı ve elektrolitler bu süreçte idrar yoluyla vücuttan uzaklaştırılır (31). Renal kan temini, doğrudan abdominal aortadan köken alan renal arter aracılığıyla sağlanır. Bu ana arter hilustan böbreğe girerek segmental arterlere, ardından interlobar arterlere dallanır. Böbrekte, interlobar arterler korteks ve medullanın birleştiği kortikomedüller bölgede, renal piramitlerin tabanına paralel olarak kavis yaparak arkuat arterleri oluşturur. Arkuat arterlerden dik açılarla ayrılan çok sayıda küçük interlobüler radyal arter, kanı kortekse taşır. Bu interlobüler arterler, her bir glomerüle kan sağlayan kısa yan dallar olan afferent arteriyollere ayrılır. Afferent arteriyoller, glomerüler hidrostatik basıncın düzenlenmesinde kritik bir rol oynar (32). Glomerül, afferent arteriyol ile efferent arteriyol arasında yer alan, yüksek basınçlı ve son derece özelleşmiş bir kapiller ağ olmasıyla dikkat çeker; bu durum, onu normal arteriyol-venül arasındaki kapiller ağlardan ayırır (33).

Glomerulustan ayrılan kan, efferent arteriyole geçer. Efferent arteriyol, glomerül tarafından filtre edilen plazma fraksiyonunun düzenlenmesine katkıda bulunur. Efferent arteriyoldeki kanın seyri, nefronun kortekste konumuna bağlıdır:

- Efferent arteriyoller, nefron yapısındaki hücrelere oksijen desteği sağlamak, ultrafiltrat sırasında geri emilen atık maddeleri uzaklaştırmak ve sekresyon yapılacak maddeleri taşımak amacıyla kapiller bir ağa dönüşür. Bu vasküler yapıya peritübüler kapillerler adı verilir.
- Jukstamedüller nefronlarda ise efferent arteriyoller, medullaya doğru inen ve henle kıvrımlarına paralel olarak daha derine ilerleyen özelleşmiş bir kapiller sistem olan vasa rekta'ya dallanır (34). Vasa rekta, medullada yoğun bir kapiller ağ oluşturur ve böbreklerin konsantre idrar oluşturmada temel rol oynayan ters akım değiştirici görevini üstlenerek medüller interstisyum ile madde alışverişini osmotik gradyanı bozmadan gerçekleştirir.

Venöz drenaj, yüzeysel korteksteki stellat (yıldız şekilli) sinüslerden kaynaklanan radyal (interlobüler) venler ile başlar. Bu venler kortekse nüfuz ederek böbrek piramitleri üzerinde kavis yapan arkuat venlere katılır. Arkuat venler, interlobar venleri oluşturmak

üzere birleşir ve bu vasküler yapılarda tek renal veni meydana getirmek üzere filtrasyona uğramış kanı inferior vena kava'ya drene eder.

Böbrek kan akımının ve glomerüler filtrasyon hızının (GFR) fizyolojik kontrolünde birçok kompleks mekanizma rol oynar. Böbreklerin iç otoregülasyon mekanizmaları, arteriyel kan basıncındaki 75 mmHg'ye varan düşüşler veya 160 mmHg'ye varan yükselişler gibi önemli değişikliklere karşın, böbrek kan akımını ve GFR'yi oldukça sabit bir düzeyde korur. Böylelikle, GFR'de yalnızca %1-2'lik ihmal edilebilecek düzeyde bir değişim meydana gelir (35).

Otoregülasyonun önemli bir bileşeni de, tübüloglomerüler feedback (TGF) mekanizmasıdır. Bu feedback mekanizma, distal tübülün başlangıcındaki makula densa hücreleri (sodyum klorür konsantrasyonundaki değişiklikleri algılar) ile afferent ve efferent arteriyollerin duvarlarındaki jukstaglomerüler hücreler arasında bir bağlantı kurar. Sodyum klorür yoğunluğundaki azalma, makula densadan afferent arteriyol direncini azaltarak glomerüler hidrostatik basıncı artıran ve GFR'nin normale dönmesine yardımcı olan bir uyarı başlatır. Ek olarak, renin'in jukstaglomerüler hücrelerden salınmasını artırır (36).

Böbreğin vasküler yapısı, özellikle sempatik sinir liflerinden zengindir. Böbrek sempatik sinirlerinin güçlü aktivasyonu, renal arteriyollerde kasılma gerçekleştirerek böbrek kan akımını ve GFR'yi önemli ölçüde azaltabilir; bu savunma reaksiyonu özellikle beyin iskemisi veya ağır hemoraji gibi durumlarda epinefrin ve norepinefrin aracılığıyla ortaya çıkabilir. Endotelin ve Anjiotensin II gibi güçlü vazokonstriktörler de GFR'yi etkileyen diğer faktörlerdendir; örneğin, Anjiotensin II efferent arteriyollerin kasılmasına sebep olurken, hasar görmüş endotel hücrelerinden salınan endotelin böbrek vazokonstriksiyonuna katkıda bulunarak GFR'yi azaltır.

Sonuç olarak, böbreklerin fazla miktarda kanlanması ve bu akımın kompleks regülasyonu, atık ürünlerin temizlenmesi, plazma hacmi ve bileşiminin hassas ayarlanması için esastır. Nefronlardan toplanan idrar, düz kas içeren bir tüp olan üreter aracılığıyla aktif olarak mesaneye iletilir. Mesane, idrarı depolar ve işeme eylemi sırasında, mesanenin aktif olarak kasılması ve üriner sfinkterlerin gevşemesiyle idrar,

üretra vasıtasıyla vücut dışına gönderilir. Bu süreç, böbreklerden üreterler yardımıyla mesaneye taşınan idrarın vücuttan atılımını sağlar (37).

2.3.2. Nefronun Rolü ve İdrar Oluşumu

Böbreğin en temel fizyolojik görevi idrar oluşumudur. Bu karmaşık süreç, glomerüler filtrasyon, tübüler reabsorbsiyon ve tübüler sekresyonun birbirleriyle entegre bir şekilde çalışması sonucunda meydana gelir.

1. Glomerüler Filtrasyon

İdrar oluşumunun ilk adımı olan ultrafiltrasyon, kanın glomerülde süzülmesiyle başlar. Glomerül, Bowman kapsülü ile birlikte ultrafiltrat plazma oluşturan, dallanan ve anastomoz yapan kılcıl damarlardan oluşan bir yumaktır. Yaklaşık 70 mmHg seviyesindeki oldukça yüksek hidrostatik basınç, glomerüllerdeki ultrafiltrasyonu sağlayan başlıca etmendir. Bu basıncın etkisiyle, plazmadaki tüm şekilli elemanlar ve molekül ağırlığı 70.000 kDa'nun üzerindeki proteinler dışındaki tüm maddeler bowman kapsülüne geçmeye çalışır. Glomerül membranı, yüksek geçirgenliğine rağmen molekül büyüklüğü açısından aşırı seçicilik gösterir; 70.000 kDa üzerindeki maddelerin geçişi mümkün değildir. Bu seçicilik, porların çeperlerinde bulunan çok kuvvetli ve elektriksel negatif yüklere sahip glukoz ve protein kompleksleri ile plazma proteinlerinin yine kuvvetli negatif yüklere sahip olması sayesinde sağlanır, bu da protein moleküllerinin elektrostatik olarak itilerek geçişinin engellenmesine yol açar (36). İdrar oluşum mekanizmasının ilk basamağını oluşturan glomerüler filtrasyon sırasında, kanın süzülmesine karşı etki gösteren önemli güçler bulunmaktadır. Bu güçler arasında plazmadaki proteinlerin oluşturduğu onkotik basınç, yaklaşık 25-30 mmHg aralığında yer alır. Ayrıca, bowman kapsülü içindeki hidrostatik basınç da yaklaşık 10-15 mmHg civarındadır. Birbirinin tersi yönde etki gösteren bu zıt güçler arasındaki yaklaşık 30 mmHg'lik basınç farkı, etkili filtrasyon basıncını oluşturmaktadır. Glomerülden bowman kapsülüne geçen sıvıda protein bulunmadığından, bu sıvının onkotik basıncı sıfır olarak kabul edilir. Bu durum, glomerüler membranın, proteinlerin filtrasyonunu etkin bir şekilde sağlamasından kaynaklanmaktadır (38).

Sistemik basınç 70 mmHg'nin altına indiğinde veya intrakapsüler basınç 45-50 mmHg'nin üstüne çıktığında, efektif filtrasyon sıfıra düşer ve glomerüler filtrasyon

durur. Üreter obstrüksiyonu gibi durumlarda intrakapsüler basınç artışı da glomerüler filtrasyonun durmasına neden olabilir (18).

Glomerüler filtrasyon hızı, bir dakikada her iki böbreğin nefronlarının tümünden oluşan glomerüler filtrat miktarının tamamına denir. Normal şartlarda GFR yaklaşık 110-120 ml/dk'dır, bu da 24 saatte 180 litre filtrat oluştuğu anlamına gelir. Bu filtratın %98,5'u tübüllerden geri emilir ve kalan 1350–1500 ml idrar olarak atılır. İnülin, bir karbonhidrat polimeri olarak, kanın böbrekten süzülmesi sırasında sadece glomerülden filtre olarak ultrafiltrata geçer. Böbrek tübüllerindeki ilerleyişi sırasında, geri emilmez ve sekrete edilmez. Bu özelliği ile beraber, inülin klirensinin, gerçek GFR'ye eşit olduğu kabul edilir. Bu bilimsel gerçek, inülini GFR'nin doğru bir göstergesi haline getirir. Endojen kreatinin klirensi de GFR ölçümünde sıkça kullanılır, çünkü kreatinin plazma düzeyi sabittir ve glomerüler filtrasyona uğrayıp tübüler reabsorbsiyona uğramaz, ancak bir miktar sekresyona uğrayabilir. Ortalama kreatinin klirensi, 120 ml/dk'dır (39).

2. Tübüler Reabsorbsiyon ve Sekresyon

Glomerüler filtrat tübüllere girdikten sonra, proksimal tübül, henle kulpu, distal tübül ve toplayıcı kanallarda önemli değişikliklere uğrayarak idrar haline gelir. İdrar oluşumunda reabsorbsiyon, sekresyondan daha baskın bir rol oynar ve glomerüler filtratın yaklaşık %90'ı tübüllerden geri emilir. İdrar oluşumunun önemli aşamalarını oluşturan tübüler reabsorbsiyon ve sekresyon, temel olarak aktif transport ve pasif transport olmak üzere iki ana biyokimyasal mekanizma sayesinde gerçekleşir. Tübülleri örten epitel tabakasının lümene bakan yüzeyinde yer alan çok sayıda villus, "fırçamsı kenar" adı verilen bir yapı oluşturur. Bu fırçamsı kenar, hücrenin lümene dönük yüzey alanını genişleterek tübüler reabsorbsiyonu kusursuz şekilde kolaylaştırır (40). Sodyum, potasyum, klor, kalsiyum, demir, hidrojen, bikarbonat, ürat, fosfat iyonları, su, glikoz, protein ve amino asitler gibi maddeler enerji harcanarak aktif transporta uğrar. Aktif transport, ATP enerjisi kullanan hücre membranı proteinleri aracılığıyla madde taşınmasına dayanır. Sodyum-potasyum pompası gibi mekanizmalarla sodyum (Na^+) hücre dışına, potasyum (K^+) hücre içine taşınır (41). Aktif sekresyon, hücre membranı yoluyla gerçekleşen ve enerji harcayan bir süreç olup, özellikle hidrojen iyonları, potasyum iyonları ve ürat gibi belirli moleküllerin, normal emilimin tersi yönde tübülün lümenine taşınmasıyla gerçekleşir. Bu mekanizma, aktif transporta benzer şekilde çalışır ancak maddelerin lümene doğru yer değiştirmesini amaçlar. Potasyum sekresyonu genellikle distal tübülün son kısmında başlar ve toplayıcı kanal boyunca devam ederken, hidrojen iyonlarının sekresyonu da bu segmentlerde ve

medüller toplayıcı kanallarda gerçekleşir. Pasif transportta enerji ihtiyacı yoktur; su ozmoz ile reabsorbe edilirken, tübüler sıvıdaki ürenin yaklaşık yarısı tübül lümeninde kalır ve konsantrasyonu artarak interstisyel sıvıya difüzyona uğrar. Kreatinin, inülin, mannitol ve sakaroz gibi maddelerin tübüler membrandan geçirgenliği sıfırdır, bu maddeler %100 oranında idrara geçer (18).

Tübül segmentlerinin absorpsiyon yetenekleri farklılık gösterir:

- Proksimal Tübül: Metabolik olarak son derece aktif hücrelerden oluşur ve tüm tübüler reabsorpsiyonun yaklaşık %65'ini sağlar (42). Tübül hücrelerini birbirine bağlayan sıkı bağlantılar suya ve birçok küçük moleküle karşı geçirgen özellik gösterir.
- Henle Kulpu İnce Segmenti: Epiteli çok ince olup suya oldukça geçirgen, ancak sodyum ve diğer iyonlara orta derecede geçirgendir. İnce segmentin çıkan kolunun üreye olan geçirgenliği oldukça fazladır. Suyu çok daha az geçirgen özellik gösterir.
- Henle Kulpu Kalın Segmenti: Bu segmentin epitel hücreleri proksimal tübül hücrelerine benzerlik gösterir ancak ilkel ve fonksiyonunu yitirmiş fırçası kenarı ile daha sıkı hücreler arası bağlantı sağlar. Na^+ , K^+ ve Klor (Cl^-) iyonlarının aktif transportunda önemli rol oynar. Suyu ve üreye karşı geçirgenliği hemen hemen hiç yoktur. Sonuç olarak, iyonların yaklaşık dörtte üçü interstisyuma taşınırken, su ve üre tübül lümeninde kalır; bu da çıkan kolda tübül sıvısının çok dilüe edilmiş ancak üre konsantrasyonunun yüksek olmasına yol açar. Bu segment, nihai idrarın konsantrasyon ve dilüsyon derecesinin düzenlenmesinde son derece önemli bir rol oynar.
- Distal Tübül ve Kortikal Toplayıcı Tübül: Distal tübülün iki ana fonksiyonel bölümü vardır: Dilüe edici segment ve distal bölümün son kısmı ile kortikal toplayıcı tübül. Dilüe edici segment, distal tübülün ilk yarısı ve henle kulbunun çıkan kalın kolunu içine alır ve iyonları absorbe ederken üre ve suya hemen hiç geçirgen değildir, bu da tübül sıvısının seyreltilmesine sebep olur. Distal tübülün son bölümü ve kortikal toplayıcı tübül epiteli de üreyi neredeyse hiç geçirmez, böylece idrarla atılacak ürenin tamamı toplayıcı tübüle geçer. Bu segmentler sodyum iyonlarını kolayca reabsorbe eder ve bu süreç büyük ölçüde aldosteron tarafından kontrol edilir. Sodyum iyonları lümeniden peritübüler interstisyuma pompalanırken, potasyum iyonları ters yönde lümene taşınır; bu mekanizma ile

ekstraselüler potasyum iyon konsantrasyonu denetlenir. Distal tübülün son bölümü ve kortikal toplayıcı tübül, antidiüretik hormon (ADH) varlığında suya geçirgendir; bu hormon yokluğunda ise suyu geçirmez, böylece idrarın dilüsyon derecesini kontrol eder (43).

- Toplayıcı Kanal Epiteli: Böbreklerde idrar oluşumunun son aşamalarında görev alan toplayıcı kanal epiteli, ADH etkisi altında suya karşı geçirgen hale gelir. ADH seviyesindeki artış durumunda, suyun medüller interstisyuma büyük miktarda geri emilimi gerçekleşir, bu da idrar hacminin azalmasına ve idrardaki çözünmüş madde konsantrasyonunun artmasına yol açar. Toplayıcı kanal epiteli ayrıca, hidrojen iyonlarını çok yüksek bir gradyana karşı tübül lümenine salgılama yeteneğine sahiptir ve bu özelliği sayesinde metabolizmadaki asit-baz dengesinin kontrolünde hayati bir rol oynar. Bu segment, son idrarın konsantrasyon derecesini düzenlemede kritik bir öneme sahiptir. Glomerülden süzülen sıvı, idrar oluşumu sürecinde belirlenmiş bir akış yolunu takip eder. İlk olarak proksimal tübülden geçer. Ardından henle kulbunu takip eder; bu kulp inen ince, çıkan ince ve çıkan kalın kollardan oluşur. Henle kulbundan sonra sıvı distal tübüle ulaşır. Distal tübülün devamında, birleştirici (connecting) tübül ve kortikal toplayıcı tübül yer alır. Sıvı buradan kortikal toplayıcı kanala geçer. Son olarak, yaklaşık 8 ila 10 adet kortikal toplayıcı kanalın başlangıç kısımları birleşerek, medullada seyreden daha geniş yapılar olan medüller toplayıcı kanalları oluşturur. Bu toplayıcı kanallar, sonunda renal papillaların uçlarındaki Bellini kanalları aracılığıyla böbrek pelvisine boşalır. Toplayıcı kanallar sonunda papillanın tepesi aracılığıyla renal kalikse açılır, oradan da renal pelvis ve üretere geçerek mesaneye ulaşır (42).

2.3.3. Endokrin Fonksiyonlar

Böbrekler, vücut sıvılarının homeostazisine temel katkı sağlayan ve plazma hacmi ile bileşimini düzenlemenin yanı sıra, çeşitli önemli hormonların üretimi ve aktivasyonundan da sorumludur. Böbreklerin endokrin fonksiyonları başlıca üç hormonun salgılanmasını içerir: renin, eritropoietin ve kalsitriol (1,25-dihidroksikolekalsiferol) (44).

Renin Salgılanması:

Renin, böbreğin kan basıncı düzenleme ve kompanzasyonu sağlama sistemi olan renin-anjiyotensin-aldosteron (RAAS) sisteminin ilk basamağını oluşturan enzimdir. Her nefronda, çıkan kalın henle kulbunun glomerüler arteriyol duvarıyla temas ettiği özel bir bölge olan jukstaglomerüler aparat bulunur. Bu aparat; tübüler sıvıdaki sodyum klorür (NaCl) miktarına yanıt veren makula densa hücrelerini, mezenjial hücreleri ve jukstaglomerüler (JG) hücreleri içerir. JG hücreleri, reninin inaktif formu olan prorenini üretir ve kan basıncı sensörü olarak görev yaparak prorenini aktif renine dönüştürür ve sitoplazmik veziküllerde depolar. Azalan renal perfüzyon basıncı ve hiponatremi, renin salınımını tetikleyen ana etmenlerdir.

Renin hormonu, hücre içi artan cAMP düzeyine bağlı olarak ekzositoz yoluyla dolaşıma karışır. Dolaşıma giren renin, üretimi karaciğerde yapılan anjiyotensinojen adlı plazma proteinini anjiyotensin I'e dönüştürür. Anjiyotensin I daha sonra, özellikle akciğer kapiller endotelinde yüksek oranda bulunan ve işlev gösteren anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) tarafından anjiyotensin II'ye dönüştürülür. Anjiyotensin II, güçlü bir vazokonstriktör eleman olmasının yanı sıra, metabolizmada birçok önemli fizyolojik etkiye sahiptir. Bu etkilerden böbrekler için en önemli olanı, adrenal korteksin glomeruloza hücrelerinden aldosteron salınımını uyarmasıdır. Aldosteron ise, distal tübül hücrelerinden sodyum ve suyun geri emilimini sağlar ve dolaşımdaki kan hacminde artışa sebep olur. Anjiyotensin II ayrıca ADH salınımını ve susamayı uyararak sıvı hacminin artışına yardımcı olur, proksimal tübülden doğrudan sodyum geri emilimini uyarır ve efferent arteriyollerde vazokonstriksiyona yol açarak GFR'yi etkiler. Bu karmaşık mekanizmalar sayesinde böbreklerin kan basıncı ve sıvı homeostazisi oldukça hassas bir şekilde düzenlenmiş olur (45).

Eritropoietin Hormonu Üretimi:

Böbrekler, hipoksik koşullara yanıt olarak eritropoietin salgılar. Eritropoietin, eritrositlerin oluşum hızını (eritropoez) uyararak kemik iliğinde kırmızı kan hücresi üretimini arttıran bir hormondur ve renal kortikal peritübüler interstisyel hücreler tarafından üretimi sağlanır. Bu durum, negatif bir feedback oluşturur. Böbreklere yetersiz oksijen sağlanması eritropoietin salgılanmasını uyarırken, bu da eritrosit oluşumunu hızlandırarak böbreğe oksijen tedarikini artırır (46).

D Vitamini Aktivasyonu (Kalsitriol Üretimi):

Böbrekler, D vitamininin aktif formu olan 1,25-dihidroksikolekalsiferol üretiminden sorumlu organlardır. D vitamini deride sentezlendikten sonra iki adet hidroksilasyon reaksiyonuna uğrar. Birincisi karaciğerde gerçekleşir ve sonucunda 25-hidroksi (25-OH) kolekalsiferol üretilir. İkinci hidroksilasyon reaksiyonu ise böbrek proksimal tübül hücrelerinin mitokondrilerinde meydana gelir ve 25-hidroksikolekalsiferol, 1 α -hidroksilaz enzimi ile D vitamininin dolaşımdaki aktif formu olan 1,25-dihidroksi (1,25-(OH)₂) kolekalsiferole hidroksile edilir. Böbrekteki bu hidroksilasyon reaksiyonu, paratiroid hormonu (PTH) ve plazmadaki düşük fosfat seviyeleri tarafından uyarılır. Aktifleştirilmiş D vitamininin, kalsiyum ve fosfor metabolizmasında ciddi bir fonksiyonu vardır. Bağırsaktan kalsiyum ve fosfat emilimini uyarır. Böbrekler, kalsiyum (Ca⁺) konsantrasyonundaki değişikliklere doğrudan cevap verir; düşük Ca⁺ konsantrasyonlarına cevaben PTH artar ve böbreklerde 1,25-dihidroksikolekalsiferol üretimini indükler. Tersine, Ca⁺ konsantrasyonları arttığında PTH baskılanır ve böbrekler D vitamininin inaktif formu olan 24,25-dihidroksikolekalsiferole dönüşümünü gerçekleştirir (47).

2.4. Böbrek İskemi Reperfüzyon Hasarı

I/R hasarı, bir doku veya organ kan akımının ani bir biçimde azalıp sonlanması (iskemi) ve ardından hızlı bir şekilde yeniden sağlanması (reperfüzyon) ile ortaya çıkan kompleks bir patofizyolojik süreçtir. Bu durum, renal transplantasyon, parsiyel nefrektomi, aort cerrahisi gibi çeşitli cerrahi girişimler ile ani kalp durması, şok gibi klinik koşullar sonucunda meydana gelebilen, potansiyel olarak ciddi bir komplikasyondur (48). İskemik dokuların yaşamsal fonksiyonlarını sürdürebilmesi ve toksik metabolitlerden arınabilmesi için kan akımının yeniden başlaması zorunlu olsa da, paradoksal bir şekilde, reperfüzyonun kendisi iskeminin neden olduğu orijinal hasarı daha da şiddetlendirebilmektedir. I/R hasarının patogeneğinde mikrovasküler disfonksiyon erken ve belirleyici bir faktördür. Bu hasar, hücre düzeyinde reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi, mitokondriyal disfonksiyon, hücre içi ATP azalması, apoptozis ve nekroz gibi programlanmış hücre ölümü yollarının aktivasyonu ile yoğun bir inflamatuvar yanıtı tetikleyen sitokin ve kemokin salınımını içerir (49). Mikrovasküler yapılarda, özellikle de endotel hücrelerinde meydana gelen değişiklikler, hasarın şiddetlenmesine doğrudan katkıda bulunur. İskeminin süresi, reperfüzyon sonrası gelişen hasarın boyutunu etkileyen kritik bir faktördür. İskemi süresinin belirli bir eşiğin üzerine çıkması veya uzaması, hücre

hasarına ve ölümüne yol açarak ciddi işlev bozukluğuna neden olur. Buna karşılık, kısa iskemi periyotları, dokuların sonraki uzun süreli iskeminin zararlı etkilerine karşı direnç kazanmasını sağlayan koruyucu mekanizmaları aktive edebilir (50). I/R'nin etkileri lokal doku hasarıyla sınırlı kalmayıp, Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu (SIRS) ve çoklu organ disfonksiyon sendromu (MODS) gibi sistemik komplikasyonlara, özellikle böbrek, akciğer ve kardiyovasküler sistemde hasara neden olabilir (51). I/R hasarının altında yatan karmaşık mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamış olup, etkin tedavi stratejilerinin geliştirilmesi yönündeki araştırmalar devam etmektedir.

2.4.1. İskemi Reperfüzyon Hasarı Patofizyolojisi

I/R hasarı, hem humoral hem de hücresele düzeyde bir dizi komplike olayı içerir. İskemi, dokuların oksijenden yoksun kalmasına, hücresele enerji depolarının tükenmesine ve toksik metabolitlerin birikmesine yol açarak hücre ölümünü tetikler. İskemi sırasında oksijenli solunumun azalması, yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin sentezini engeller. Bunun sonucunda, hücre içi AMP ve adenosin konsantrasyonu artar ve bu maddeler, pürin metabolitleri olarak hücre dışı ortama yayılır (52, 53). İskemi süresinin ve şiddetinin renal tübüler epitel hücrelerinin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğü üzerinde farklı etkileri olduğu gözlemlenmiştir; tam düzelme, apoptoz veya nekroz ile sonuçlanabilir (54).

İskemi sonrası, ATP depolarında azalma, sitozolde serbest kalsiyum Ca^{+2} birikimi ve ROT oluşumu ile mitokondri hasarı meydana gelir. Reperfüzyonun başlaması, iskemik dokudaki toksik metabolitlerin uzaklaştırılması ve hücrenin yenilenmesi için elzemdir (55). Ancak iskemi süresinin uzadığı durumlarda yeniden kanlanma, tek başına iskemiden kaynaklanan hasardan daha ciddi bir histopatolojik etkiye yol açabilir. Bunun temelinde, intrasellüler alana moleküler oksijenin ani girişi ile oluşan serbest oksijen radikali türevleri yatar. Reperfüzyon döneminde oksijenin tekrar dokuya ulaşmasıyla, KO enzimi, hipoksantini ürik aside dönüştürürken moleküler oksijeni elektron alıcısı olarak kullanarak serbest oksijen radikalleri üretimine neden olur. Bu radikaller, nükleik asitler, proteinler ve zar lipidleri gibi hücresele yapıları hedef alarak hasara yol açar.

Reperfüzyonla birlikte şiddetli bir inflamatuvar yanıt ortaya çıkar. Bu inflamasyona makrofajlar, endotel hücreleri, nötrofiller, lenfositler, trombositler, kompleman sistemi, koagülasyon kaskadı, ROT, NO (Nitrik Oksit) ve inflamatuvar cevaptan sorumlu sitokinler katılarak mikrovasküler perfüzyonun bozulmasına neden olurlar. Hasarlı

hücreler veya bozulan doku matriksi inflamatuvar yanıtı başlatabileceği gibi, I/R ile aktive olan endotel hücreleri ve makrofajlar da inflamasyonu tetikleyebilir. Özellikle erken reperfüzyon fazında görülen hücre hasarı, doğrudan iskemik fazda oluşan hücre içi değişikliklerin bir sonucudur. Proinflamatuvar sitokinlerin ve lökosit adezyon moleküllerinin yapımı hızlanır, takiben antioksidan enzimlerin üretimi azalır. Bu durum, hücreyi kan akımının yeniden sağlandığı dönemdeki yıkıcı etkilere karşı savunmasız bırakır. I/R hasar fizyopatolojisinin karmaşık ve multifaktöriyel sürecinde başlıca dört temel faktör rol oynamaktadır. Bu faktörler şunlardır: Serbest oksijen radikalleri, polimorf nüveli lökositler (PMNL), kompleman sistemi ve endotel hücreleridir (56).

2.4.1.1. İskemi Reperfüzyon Hasarında Hücre İçi Kalsiyum Artışının Etkisi

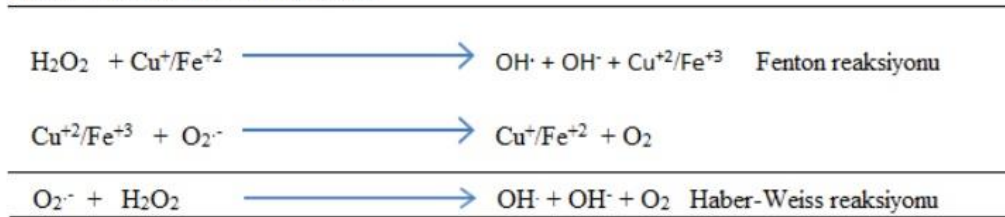
Hücrelere gelen oksijen miktarındaki azalma ilk etapta sentezlenen ATP'nin hızlı kaybıyla sonuçlanır. ATP sentezindeki azalma (oksidatif fosforilasyonun durması) ve var olan ATP'nin hızlı bir şekilde kaybedilmesi, ATP bağımlı iyon kanalları olan Na^+ , K^+ -ATPaz pompasının ve Ca-ATPaz'ların aktivitesini azaltır. Bu kanalların başlıca görevi hücre dışı konsantrasyonu hücre içi konsantrasyonundan çok daha fazla olan ve apoptoz sürecinde anahtar rol oynayan Ca^{+2} iyonunu hücre dışında tutmaktır. İyon kanallarının harabiyeti ve hücre içi Ca^{+2} miktarını artırır ve hücre hasarı ile sonuçlanacak olan kaskat başlamış olur. Mitokondriyal hasarın gelişmesi enerji açığını daha da şiddetlendirir. Artan sitoplazmik Ca^{+2} konsantrasyonları, lipid peroksidasyonu ve fosfolipaz aktivasyonu süreçlerini başlatarak, hücre membran bütünlüğünün yitirilmesine ve hücre sel nekrozun gelişmesine katkıda bulunur. Böbrekte proksimal tübüler hücreleri mitokondriyal yapılardan zengin hücreler olduğu için iskemiden en çok etkilenen morfolojik yapılar bunlardır (57).

2.4.1.2. İskemi Reperfüzyon Hasarında Serbest Oksijen Radikallerinin Rolü

Moleküler pencereden bakıldığında, bileşiklerin yapısında bulunan atomlar kararlı haldedir ancak yapı bozulduğunda ortaya çıkan atomlar kararsız ve yüklü halde bulunurlar. Oksijen atomunu bünyesinde barındıran bileşik yapılarının bozulmasıyla yüklü oksijen atomları taşıyan ve hücre permeabilitesine oldukça toksik etkisi bulunan radikaller açığa çıkar. Reperfüzyonla beraber pürin yapıları ksantin oksidaz aracılığıyla

oksidasyona uğrar ve süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) radikalleri oluşur. Endojen antioksidan enzimlerin süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon (GSH) vb. devreye girmesiyle süperoksit radikali, süperoksit dismutaz enzimi sayesinde hidrojen peroksit (H_2O_2) molekülüne dönüşür (58). I/R sırasında oluşan aşırı ROS yükü antioksidan yapıları azaltır ve hücreyi oksidatif strese karşı savunmasız bırakır. Böylece H_2O_2 demir metallerinin katalizörlüğünde en toksik formu olan Hidroksil ($OH^{\cdot}$) radikaline dönüşür. Bu biyokimyasal reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu denir. ROS artışı hücre membranında bulunan lipidlerin peroksidasyonuna yol açarak hücre geçirgenliğini artırır. Hücre permeabilitesinin bozulması nekroza zemin hazırlar. ROS aynı zamanda DNA yapısına da zarar vererek tek veya çift zincir kırıklarına yol açar. Etkilenen gen ekspresyonu hücre disfonksiyonunu ve apoptozisi tetikler. ROS, proinflamatuar sitokinlerin ve kemokinlerin salınımını tetikler. Bu mediyatörler, nötrofil ve diğer inflamatuvar hücrelerin hasarlı dokuya infiltrasyonunu artırır. Lökositlerin endotel hücreleriyle olan adezyonu ve transmigrasyonu, mikrovasküler obstrüksiyona ve dolaşım bozukluğuna yol açarak doku hasarını daha da artırır. Özetlemek gerekirse, oksijen radikalleri I/R hasarının hem başlatıcısı hem de şiddetlendiricisi konumundadır. Hücresel ATP'nin tükenmesinden membran bütünlüğünün bozulmasına, DNA hasarından inflamatuvar kaskadın aktive olmasına kadar geniş bir yelpazede patolojik etkilere aracılık ederler. Bu mekanizmaların anlaşılması, I/R hasarını önlemeye veya tedavi etmeye yönelik terapötik stratejilerin geliştirilmesi için kritik öneme sahiptir (59).

Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonu



Şekil 4. Haber-Weiss ve Fenton Reaksiyonu (60).

2.4.1.3. İskemi Reperfüzyon Hasarında PMNL Göçü

I/R hasarında inflamasyon alanına lökosit migrasyonu, doku hasarını önemli derecede şiddetlendiren oldukça kritik bir inflamatuvar süreçtir. İskemiye takiben gelişen reperfüzyona sekonder gelişen karmaşık hücresel ve humoral biyokimyasal olaylar zinciri, sistemik ve lokal inflamatuvar cevabı tetikler. Bu cevabın anahtar bileşenlerinden

biri özellikle nötrofillerden oluşan lökositlerin endotel hasarı olan bölgeye yerleşmesi ve ardından dokuya infiltre olmasıdır (61).

Lökosit g    basitçe 4 aşamadan oluşmaktadır:

- Kemotaksis ve Aktivasyon: Reperfüzyon sonrası endotel, makrofaj ve mast hücrelerinden salgılanan proinflatuvar sitokinler (IL-1, TNF-alfa vs.) ve kemokinler vücut dolaşımındaki lökositleri inflamasyon alanına yönlendiren sinyal görevini üstlenirler. Bu mediyatörler lökositleri aktive ederek yüzeylerindeki adezyon moleküllerinin ekspresyonunu indükler.
- Yuvarlanma (Rolling): İnfamasyonun merkezindeki endotel hücrelerinin yüzeyinde bulunan glikoprotein yapıdaki P-Selektin ve E-Selektin sayesinde lökositler kendi yüzeylerindeki ilgili yapılarla düşük afiniteli etkileşim kurarak damar duvarı boyunca yuvarlanmaya başlar. Bu geçici ve düşük afiniteli bağlantılar lökositlerin dolaşımdaki kan akımına karşı endotel yüzeyinde yavaşlamasına ve yakalanmasına olanak sağlar (62).
- Stabil Adezyon: Yuvarlanma aşamasından sonra, lökositlerin membran yüzeyinde bulunan integrin adı verilen glikoproteinler(integrinler) ile endotel hücrelerindeki hücre içi adezyon molekülleri (ICAM-1) arasında daha güçlü ve stabil etkileşimler meydana gelir. Yüksek afiniteye sahip bu etkileşim lökositlerin endotele sıkı bir şekilde bağlanmasını sağlar.
- Diapedez (Transmigrasyon) ve Dokuya İnfiltasyon: Lökositler, endotel duvarını geçerek vasküler olmayan dokuya infiltre olarak transmigrasyonla hasarlı bölgeye yerleşirler (63).

Son c olarak hasarlı bölgeye infiltre olan lökositler, doku harabiyetinin daha da artmasına neden olacak sitotoksik ajanlar salgırlar. Bunlar arasında ROS, miyeloperoksidaz (MPO), proteazlar ve katyonik proteinler bulunur. Bu maddeler nekroz ve apoptozise ivme kazandırır. Ayrıca, lökosit agregatları ve trombositlerle olan etkileşimler, mikrovasküler oklüzyona neden olarak kan akışını daha da bozabilir. Bu süreçler, I/R hasarının şiddetini artırır ve organ disfonksiyonuna zemin hazırlar.

2.4.1.4. İskemi Reperfüzyon Hasarında Komplemanın Etkisi

I/R hasarı sürecinde, kompleman sistemi hasarın artmasında ve inflamatuvar yanıtın güçlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Kompleman, doğuştan gelen immün sistemin bir bileşeni olup, proteolitik kaskatlar aracılığıyla aktive olan çeşitli plazma proteinlerinden oluşur.

I/R hasarında kompleman aktivasyonu genellikle mikrobiyal patojenlerin yokluğunda, yani "steril inflamasyon" koşullarında gerçekleşir. Bu aktivasyonun mekanizması hala net olarak aydınlatılamamış olsa da, iskemik dokudaki değişiklikler ve reperfüzyonla ortaya çıkan hasar sinyalleri komplemanı tetikleyebilir. Kompleman sistemi, klasik, alternatif ve lektin yolları aracılığıyla aktive olabilmektedir. I/R hasarında bu üç yolun da aktive olduğuna dair kanıtlar mevcuttur (64).

Kompleman aktivasyonunun başlıca sonuçları şunlardır:

Anafilatoksin Üretimi: Kompleman kaskadının aktivasyonu sonucunda C3a ve C5a gibi güçlü anafilatoksinler oluşur. Bu peptid parçaları, kemotaktik özelliklere sahip olup, nötrofiller, monositler ve makrofajlar gibi inflamatuvar hücreleri hasar bölgesine çeker. Ayrıca, bu hücreleri aktive ederek reaktif oksijen türleri, lizozomal enzimler ve proinflamatuvar sitokinlerin (IL-1, IL-6, TNF-alfa gibi) salınımına yol açar.

Lökosit Adezyonu ve İnfiltrasyonu: Kompleman ürünleri, endotel hücrelerinin yüzeyinde adezyon moleküllerinin (örneğin, ICAM-1, VCAM-1, E-selektin, P-selektin) ekspresyonunu artırır. Bu durum, lökositlerin damar duvarına sıkıca bağlanmasını ve ardından dokunun içine doğru yer değiştirmesini (transmigrasyon/diapedez) kolaylaştırır. Dokuya giren lökositler, açığa çıkardıkları sitotoksik mediyatörlerle parankimal hücre hasarını daha da şiddetlendirirler.

Membran Saldırı Kompleksi (MAC) Oluşumu: Kompleman kaskadının son ürünü olan C5b-9, membran saldırı kompleksi (MAC) olarak adlandırılır. Hücre zarlarında porlar oluşturarak hücre ölümüne (litik etki) neden olabilir. Özellikle reperfüzyon sırasında endotel hücrelerinin hasar görmesine ve mikrovasküler disfonksiyona katkıda bulunabilir.

Mikrovasküler Disfonksiyon: Kompleman aktivasyonu, mikrovasküler geçirgenliği artırarak interstisyel ödem ve kan akışında bozulmalara yol açabilir. Bu durum, "no-

- Endojen Antioksidan Mekanizmalar

Vücut, hücresel hasara karşı birincil savunma olarak çeşitli endojen antioksidanlar kullanır. Bu antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olmayan sistemler olarak gruplandırılabilir:

1. Enzimatik Antioksidanlar:

- Süperoksit Dismutaz (SOD): Süperoksit radikalini ($O_2^{\cdot-}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüştüren ilk savunma sistemi enzimlerinden biridir. Hücre içindeki O_2 konsantrasyonunu düşük tutar.
- Katalaz (CAT): Bu enzim hücrede genellikle peroksizom adı verilen organellerde bulunur. H_2O_2 'yi suya ve oksijene dönüştürerek hidroksil ($OH^{\cdot}$) radikali oluşumunun önüne geçer.
- Glutasyon Peroksidaz (GPx): GSH'ı kullanarak H_2O_2 'yi suya dönüştüren bir enzimdir. Selenyum bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki türü vardır.
- Glutasyon S-Transferaz (GST): Farklı endojen ve eksojen bileşenleri GSH ile birleştirerek detoksifikasyonda rol oynar (68, 69).
- Nitrik Oksit Sentaz (NOS): L-arjinin oksidasyonu ile nitrik oksit oluşturan ve vücutta birçok hayati fonksiyonu düzenleyen önemli bir enzimdir. NO, gaz halinde bulunan ve dokular arası difüzyonunu kolaylaştıran özel bir yapıya sahiptir. Başlıca görevi vazodilatasyon olan ve birçok biyokimyasal aktiviteye aracılık eden NO, hücresel fonksiyonların denetiminde otokrin ve parakrin etkilere sahiptir. Üç tip NOS izole edilmiştir: nöronal NOS (nNOS), endotelial NOS (eNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS). Böbrekte eNOS, arteriyollerde ve nNOS, makula densada bulunurken, iNOS makrofaj ve diğer hücrelerin aktivasyonu amacıyla afferent arteriyollerden eksprese olur ve fonksiyonları açısından farklılık gösterirler. Böbrekte eNOS, vazodilatatör etkiye sahiptir ve böbrek kan akımı ile glomerüler perfüzyonu düzenleyerek I/R hasarını önlemede koruyucu bir rol oynar. Buna karşılık, iNOS, I/R sırasında aktive olarak yüksek konsantrasyonlarda NO üretimini indükler ve süperoksit anyonu ile birleşip güçlü bir oksidan olan peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşumuna neden olur. Bu nedenle, NO'nun I/R hasarındaki

rolü oldukça karmaşıktır; düşük konsantrasyonlarda koruyucu etki gösterirken, aşırı üretimi (özellikle iNOS kaynaklı) hasarı şiddetlendirebilir (70).

2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar:

- Glutatyon (GSH): Hücre içindeki en önemli antioksidan bileşiktir; glutamat, sistein ve glisinden sentezlenir. Proteinlerdeki sülfhidril gruplarını koruyarak oksidatif hasarı önler. GSH eksikliği ciddi oksidatif strese neden olur (71).
- Melatonin: Epifiz bezinden salgılanan bu hormon, hücrelere kolayca geçebilir ve dolaylı olarak antioksidan etkiler gösterir; GSH-Px ve SOD enzimlerini aktive ederken nitrik oksit sentaz (NOS) enzimini inhibe eder. I/R gibi birçok deneysel modelde olumlu etkileri saptanmıştır.
- Ürik Asit: Pürin metabolizmasının son ürünü olan bu bileşik, güçlü bir O^{-2} ve hipoklorik asit (HOCl) süpürücüsüdür (72).

Albümin, seruloplazmin, transferrin, ferritin, bilirubin, sistein, metiyonin ve laktoferrin gibi moleküller de serbest radikalleri bağlayarak veya etkisiz hale getirerek antioksidan savunmaya katkıda bulunur.

• Eksojen Antioksidan Mekanizmalar

Beslenme veya farmakolojik yollarla alınan antioksidanlar da I/R hasarının önlenmesi ve azaltılmasında önemli bir rol oynamaktadır:

1. Vitamin Kaynaklı Antioksidanlar:

- Askorbik Asit (C Vitamini): Suda çözünebilen en güçlü antioksidanlardan biridir O^{-2} ve OH^{-} gibi radikalleri bağlayarak inaktive eder, lipid peroksidasyonunu engeller ve E vitamininin antioksidan etkinliğini artırır.
- Alfa-Tokoferol (E Vitamini): Yağda çözünebilen yapıya sahiptir. Hücre zarı fosfolipitlerini serbest radikallerin etkilerinden koruyarak oldukça etkili bir antioksidan fonksiyon gösterir. Süperoksit ve hidroksil radikallerini indirgeme yeteneğine sahiptir.
- Karotenoidler (A Vitamini ve Ön Maddeleri): Hidroksil, alkoksil ve peroksil radikallerine karşı koruyucu bir antioksidan rolü üstlenir (73).

2. Farmakolojik Antioksidanlar:

- Ksantin Oksidaz İnhibitörleri (Allopürinol): Reperfüzyon sırasında ROS oluşumunda rol oynayan ksantin oksidaz enzimini inhibe ederek etki ederler.
- Demir Şelatörleri (Desferroksamin): Fenton reaksiyonunda OH^- radikali oluşumuna aracılık ederek serbest demir iyonlarını bağlar ve hasarın önüne geçer.
- N-Asetilsistein: Glutasyon sentezinde önemli bir öncü olan sisteinin prekürsörü olarak GSH düzeylerini artırarak antioksidan savunmaya katkıda bulunur (74).

Antioksidanlar, etki mekanizmalarına bağlı olarak radikalleri süpürme, zincir kırıcı, onarıcı ve inaktif forma dönüştürücü etkiler gösterebilir. Organizmadaki oksidan/antioksidan dengesinin oksidan yönünde bozulması oksidatif stres olarak tanımlanır ve bu durum I/R hasarında sıkça görülmektedir. Bu dengesizliği ölçmek için Total Antioksidan Kapasite (TAS) ve Total Oksidan Seviye (TOS) gibi biyokimyasal belirteçler ile bunların oranı olan Oksidatif Stres İndeksi (OSI) kullanılmaktadır. I/R hasarına karşı koruyucu terapötik yaklaşımların geliştirilmesinde antioksidan mekanizmaların derinlemesine anlaşılması oldukça önemlidir (75, 76).

2.5. İskemi Reperfüzyon Hasarında Amniyotik Kök Hücre Tedavisinin Yeri

Akut iskemik böbrek hasarı, böbreklerdeki yeterli arteriyel kan akışının engellenmesi sonucunda gelişen yaygın bir komplikasyondur. Hemorajik şok, sepsis, parsiyel nefrektomi ve böbrek nakli gibi çeşitli klinik durumlarda böbreğe giden kan akışının kesilmesi ve sonrasında aniden yeniden başlaması, dokuları ciddi bir reaktif oksijen yüküne maruz bırakır. Bu durum, böbrek hasarını daha da kötüleştirir. Bu patofizyolojik süreci yavaşlatmak veya durdurmak amacıyla, renal I/R hasarı üzerindeki etkileri incelemek için yakın zamanda birçok etken madde hayvan deneylerinde test edilmiştir. Etkinliği kanıtlanmış bazı ajanlar mevcut olsa da, henüz rutin klinik uygulamaya geçmiş bir ürün bulunmamaktadır. Antioksidan özellikler gösteren moleküllerin yanı sıra, insan amniyon sıvısı ve kök hücrelerle ilgili yapılan çalışmalar umut verici sonuçlar sunmaktadır.

Amniyotik sıvı (AS), hamilelik süresince fetüs için koruyucu ve izole edici bir ortam sağlayan, su ve elektrolitleri bünyesinde barındıran temel bir biyolojik ortamdır. Bu sıvı,

temel yapı taşlarından daha karmaşık moleküller ve hücresel yapılar içerir. Bu küçük bileşenler glikoz, lipidler, proteinler, farklı enzimler, hormonlar, mezenşimal hücreler, büyüme faktörleri ve farklılaşmış hücrelerden oluşur (77). AS'daki hücre tipleri sadece embriyon dışı dokulardan değil, aynı zamanda fetal ve embriyonik dokulardan da türemiştir. Bu hücre tipi morfolojik ve büyüme özelliklerine göre birkaç alt gruba ayrılır. Amniyotik sıvı, sırasıyla yaklaşık %33,5 epiteloid hücrelerden, %60 amniyotik sıvı hücrelerinden ve %5,3 fibroblastik hücrelerden oluşur. Amniyotik sıvı kök hücreleri son yıllarda özellikle rejeneratif tıpta büyük ilgi görmektedir. Bu hücreler iki alt grupta incelenir: amniyotik sıvı kaynaklı mezenkimal kök hücreler ve amniyotik sıvı kök hücreleri. Kök hücre türlerinin her biri rejeneratif tıp uygulamaları için ilgi çekici özelliklere sahiptir.

Amnion, ilk olarak ciltteki yaraların kapanmasında steril bir ortam yaratmak için kullanılmıştır (78). Daha sonra amniyotik sıvının çok çeşitli hücre tedavileri için ayrıca bir kaynak oluşturabileceği fikri ortaya atılmıştır. Son dönem araştırmalar, amniyotik sıvının ve türevlerinin çeşitli doku hasarı modellerinde olumlu sonuçlar verdiğini göstermektedir. Örneğin, Vital ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği in vitro I/R modelinde, insan akciğer alveoler hücrelerinin hem soğuk iskemi hem de reperfüzyon nedeniyle önemli ölçüde zarar gördüğü belirlenmiştir (79). Reperfüzyondan önce uygulanan insan amnion türevi mezenkimal/stromal kök hücre tabanlı tedavi, hücrelerin apoptoza girmesini geciktirmiş, hücre canlılığını ve membran bütünlüğünü korumuş, inflamatuvar süreci kısmen baskılamış ve kontrollü hücre ölüm yolunu engelleyerek iskemik olarak hasar görmüş akciğer hücreleri üzerinde koruyucu etkiler göstermiştir.

Ayrıca, Özgenel ve arkadaşlarının yaptığı bir hayvan deneyinde, insan amnion sıvısının sıçanlarda periferik sinir skarlaşması ve rejenerasyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Sağ siyatik siniri kesilip onarıldıktan sonra, onarım bölgesine uygulanan amnion sıvısının, tuzlu su ile tedavi edilen gruba kıyasla fonksiyonel sinir rejenerasyonunu anlamlı derecede daha hızlı bir şekilde iyileştirdiği kanıtlanmıştır (8).

Yakın zamanda amniyotik sıvı ile gerçekleştirilen bu tür çalışmaların genel olarak olumlu sonuçlar vermesi, amniyotik sıvının içerdiği pek çok büyüme faktörü sayesinde özellikle yara iyileşmesi ve I/R hasarında umut vaat ettiğini göstermektedir.

2.6. Gibco™ AmnioMAX™ - II Complete Medium Yapısı

Amniyotik sıvı, doğum öncesi tanı testlerinde kullanılan bir fetal materyaldir. Amniyotik sıvı örnekleri, kromozom analizi için metafaz hücrelerinin bir kaynağı olarak biyokimyasal ve DNA tabanlı testler için ek materyal sağlamak amacıyla kültürlenebilir.

Gibco™ AmnioMAX™ - II Complete Medium, hücre bağlanmasını ve büyümesini en üst düzeye çıkarmak için Fetal Sığır Serumı (FBS), gentamisin ve L-glutamin içeren optimize edilmiş bazal bir ortam içerir. Bu steril filtrelenmiş ürün optimize edilmiş ortam ve kültür manipülasyonları sırasında daha fazla pH stabilitesi sağlayan gelişmiş bir tamponlama sistemine sahiptir. Sitogenetik çalışmalar ve in vitro diagnostik prosedürler için insan amniyotik sıvı hücrelerinin kısa süreli kültürü için geliştirilmiş bir besiyeridir. Bu besiyeri, hücre morfolojisini iyileştirmek amacıyla antibiyotik (gentamisin), L-glutamin ve FBS içeren, kullanıma hazır ve kullanışlı bir formatta daha temiz kültürler elde edilmesini sağlayan bir formüldür.

Çalışmamızda, insan amniyon hücre kültürü özelliği taşıyan Gibco™ AmnioMAX™- II Complete Medium adlı preparatın renal iskemi reperfüzyon hasarına etkisini araştırdık. Yapılan literatür taramasında Gibco™ AmnioMAX™ - II Complete Medium'un renal I/R hasarında kullanıldığına dair literatür verisine rastlanmamıştır. Daha önce bu preparatla yapılan çalışmalarda kullanılan doz baz alınarak deney hayvanı üzerinde uygulandı (80). Aynı dozu hem iskemi öncesi hem de iskemi sonrası uygulayarak bir nevi koruyucu ve tedavi edici etki araştırıldı.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Etik Kurul Onayı

Bu deneysel hayvan çalışması Düzce Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurul onayı (Proje no: 2024.04.01.1521 Tarih:21.08.2024, Karar No: 2024-08-01) alındıktan sonra, deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak yürütüldü.

3.2. Deney Hayvanları ve Deney Ortamı

Bu çalışmada 36 adet Wistar-Albino cinsi dişi rat kullanıldı. Deneysel çalışma Düzce Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarında yapıldı. Çalışmaya 8-10 haftalık ve ortalama ağırlıkları 200-250 gram civarında genç yetişkin dişi ratlar dahil edildi. Hayvanlar rastgele 4 gruba ayrılarak her bir grupta 9 rat olacak şekilde laboratuvar ortamında izlendi. Çalışma süresince ratlara limitsiz şekilde musluk suyu ve standart kemirgen yemi verildi. Hayvanlar kontrollü sıcaklık (23-25°C) ve 12/12 saatlik açık/karanlık döngüsü %50-60 nem olan bir odada ve kafeslerde olacak şekilde takip edildi.

3.3. Deney Grupları

Ratlar 4 eşit gruba ayrıldıktan sonra operasyon öncesi 6 saat açlığı takiben 90 mg/kg ketamin hidroklorür ve 10 mg/kg Ksilazin intraperitoneal (i.p.) kullanılarak genel anestezi aldılar. Operasyon öncesi ratların batin cildi tıraşlandı ve %10'luk povidin iyot çözeltisi ile antisepsi sağlandıktan sonra abdominal median laparotomi uygulandı. Renal I/R modeli esnasında kullanılan AmnioMAX dozları Aydoğdu ve arkadaşlarının çalışması baz alınarak oluşturuldu (80).

1.Grup (Sham grubu): Laparotomi sonrası sağ ve sol renal pediküller açığa çıkarıldı. Ek bir girişim yapılmadan batin kapatıldı. 24 saatlik reperfüzyon uygulandı.

2.Grup (Renal I/R grubu/Hastalık grubu): Laparotomi sonrası bilateral renal pediküle atravmatik damar klempleri (Bulldog klempleri) konularak iskemi oluşturuldu ve iskeminin gerçekleştiği böbrek dokusunda meydana gelen renk

değişikliği ile teyit edildi. 45 dakikalık iskeminin ardından atravmatik vasküler klempler (Bulldog klempleri) çıkarıldı. 24 saatlik reperfüzyon uygulandı.

3. Grup (I/R'den sonra Gibco™ AmnioMAX™ - II Complete Medium verilen grup/Tedavi grubu): Laparotomi sonrası bilateral renal pediküle atravmatik damar klempleri (Bulldog klempleri) konularak iskemi oluşturuldu ve iskeminin gerçekleştiği böbrek dokusunda meydana gelen renk değişikliği ile teyit edildi. 45 dakikalık iskemiden sonra atravmatik vasküler klempler çıkarıldı ve reperfüzyon sağlandı. Reperfüzyonu takiben 1 saat sonra 1 cc Gibco™ AmnioMAX™ - II Complete Medium i.p. olarak uygulandı. Reperfüzyon süresi 24 saat olarak belirlendi.

4. Grup (I/R'den önce Gibco™ AmnioMAX™ - II Complete Medium verilen grup/Profilaksi grubu): Operasyon öncesi 1 cc Gibco™ AmnioMAX™ - II Complete Medium i.p. olarak uygulandı. Enjeksiyondan 1 saat sonra laparotomi uygulandı. Laparotomi sonrası bilateral renal pediküle atravmatik damar klempleri (Bulldog klempleri) konularak iskemi oluşturuldu ve iskeminin gerçekleştiği böbrek dokusunda meydana gelen renk değişikliği ile teyit edildi. 45 dakikalık iskemiden sonra atravmatik vasküler klempler çıkarıldı. Reperfüzyon süresi 24 saat olarak belirlendi.

Ratlar postoperatif dönemde de aynı ortam koşullarında (23-25°C sıcaklık, %50-60 nem, 12/12 saatlik açık/karanlık döngüsü) kafeslerde takip edildi. Çalışma süresince ratlara limitsiz şekilde musluk suyu ve standart kemirgen yemi verildi. Biyolojik ritim göz önünde bulundurularak tüm cerrahi işlemler her gruba 1 gün ayrılarak yapıldı ve tüm gruplar 24 saat sonra tekrar opere edilip sağ ve sol böbrek dokuları çıkarıldı. Tüm ratların bilateral nefrektomisinin ardından ratlar anestezi altında kardiyak ponksiyon ile sakrifiye edildi.

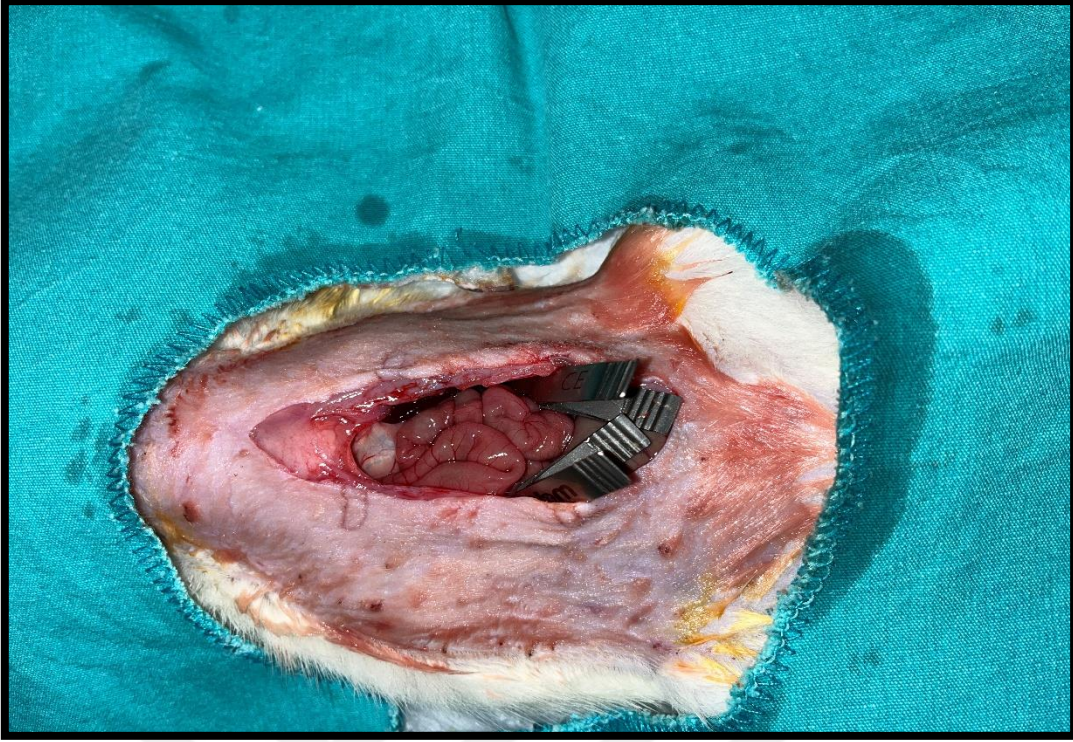
Alınan kan örnekleri 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen heparinize plazma örnekleri Eppendorf® tüplerine aktarıldı. Eppendorf® tüpler kliniğimizde bulunan -80 °C dolapta biyokimyasal ölçümler için saklandı. Kan serum örneklerinde serum BUN (mg/dl), üre (mg/dl) ve kreatinin (mg/dl) seviyeleri ticari kitin yönergelerine uygun şekilde belirlendi.

Çalışma sonrasında çıkartılan sağ böbrek dokusu uzun eksenine boyunca 2 eşit parçaya bölünerek bir yarısı biyokimyasal diğer yarısı da histopatolojik incelemeler için ayrıldı. Sol böbrek dokusu yine uzun eksenine boyunca 2 eşit parçaya bölünerek bir yarısı histopatolojik değerlendirmeler için ayrıldı.

Biyokimyasal inceleme yapılacak böbrek dokuları saklandıktan sonra homojenize edildi ve homojenizasyondan sonra numunelerden ticari uygun kitler ile dokulardan antioksidan stres parametreleri olan Malondialdehit (MDA), Katalaz (CAT), Super Oksit Dismutaz (SOD), Total Antioksidan Status (TAS), Total Oksidant Status (TOS), Glutasyon Peroksidaz (GPx), Glutasyon (GSH), Nitrik Oksit Sentaz (NOS) konsantrasyonları tayin edildi.



Şekil 6. Hayvan Deney Grupları ve Kafes Düzeni



Şekil 7. Bilateral Renal İskemi Prosedürü

3.4. Biyokimyasal Analiz

Sıçanlarda oluşturulan I/R modeli çalışmasından elde edilen böbrek doku örnekleri 1/9 oranında (0,1 gr doku: 0,9 ml 140 mmol/L'lik KCl) Potasyum Klorür tamponu ile homojenize edildikten sonra 7000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. TAS, TOS, GSH, SOD, MDA, CAT, GPx, kreatinin, üre, BUN değerlerini ölçmek için MINDRAY-BS400 cihazı, doku MDA seviyelerini ölçmek için REL ASSAY-Microplate Reader cihazı ve iNOS seviyelerini ölçmek için BIO-TEK EL X 800-Auto strip washer: BIO TEK EL X 50 cihazı kullanıldı.



Şekil 8. Biyokimyasal ölçümlerde kullanılan MINDRAY-BS400 cihazı



Şekil 9. Biyokimyasal ölçümlerde kullanılan REL ASSAY cihazı

3.4.1. Doku MDA (Malondialdehit) Ölçümü

MDA seviyesi, 90-100°C'de tiyobarbiturik asit (TBA) ile reaksiyona dayalı bir yöntemle belirlendi. TBA test reaksiyonunda, MDA veya MDA benzeri maddeler ve TBA, 532 nm'de maksimum emilim gösteren pembe bir pigment üreterek reaksiyona girer. Reaksiyon, 60 dakika boyunca 90°C'de pH 2-3'te gerçekleştirilir. Örnek, proteini çöktürmek için soğuk trikloroasetik asitle karıştırılır. Çökelti santrifüjleme ile peletlenir ve reaksiyon, üstteki sıvının eşit hacimde TBA ile soğuk su banyosunda 10 dakika soğutulmasıyla durdurulur. Soğutulduktan sonra, absorbans 532 nm'de okunur.

3.4.2. Doku TAS, TOS, OSI Ölçümü

TAS, TOS ve OSI değerlendirmeleri, oksidatif dengeyi belirlemek amacıyla kullanılan önemli biyokimyasal yöntemlerdir.

Total Antioksidan Kapasite (TAS) Ölçümü: TAS'ın değerlendirilmesi için yaygın olarak ABTS (2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)) yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemde, ABTS radikal katyonları antioksidanlarla reaksiyona girerek bir renk değişikliği meydana getirir ve bu değişim spektrofotometrik olarak ölçülür. ABTS+ radikal katyon testi, antioksidan kapasitenin belirlenmesinde sıklıkla tercih edilen bir yaklaşımdır. Ölçüm sonuçları, mmol Trolox eşdeğeri/L biriminde ifade edilmektedir (75).

Total Oksidan Seviye (TOS) Ölçümü: TOS seviyelerinin belirlenmesinde, numunede bulunan oksidanların ferröz iyon kompleksini ferrik iyonla oksitlemesi prensibine dayanan bir yöntem uygulanır. Bu oksidasyon reaksiyonu, ortamda bol miktarda bulunan gliserol molekülleri ile desteklenir. Test, hidrojen peroksit ile kalibre edilmekte olup, sonuçlar mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/L) olarak rapor edilmektedir (76).

Oksidatif Stres İndeksi (OSI) Hesaplaması: OSI, organizmadaki oksidan ve antioksidan dengesini gösteren bir parametre olarak kabul edilir ve TOS'un TAS'a oranı ile hesaplanır (81-83).

“OSI= TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ eşdeğeri/L) / TAS ($\mu\text{mol Trolox}$ eşdeğeri/L)”

3.4.3. Doku Superoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Ölçümü

SOD'un rolü, oksidatif enerji süreçlerinde üretilen toksik süperoksit radikalini hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştüren reaksiyonu hızlandırmaktır. Bu yöntem, süperoksit radikalleri üretmek için ksantin ve ksantin oksidaz (XOD) kullanır ve bu radikaller, kırmızı bir formazan boyası oluşturmak için 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolium klorür (INT) ile reaksiyona girer. SOD aktivitesi, tam otomatik bir cihaz yardımıyla ölçülür.

3.4.4. Doku Katalaz (CAT) Aktivite Ölçümü

Bu kolorimetrik analiz iki adımdan oluşur. Örnek önce bilinen miktarda hidrojen peroksit ile inkübe edilir. Örnek hidrojen peroksidi suya ve oksijene dönüştürür. Oran katalaz konsantrasyonuyla orantılıdır. Enzim durdurulur ve kalan hidrojen peroksit, sabit bir inkübasyon süresinin ardından bir kromojen kullanılarak belirlenir. Ortaya çıkan absorban 405 nm'de ölçülür ve elde edilen sonuçlar U/ml olarak ifade edilir.

3.4.5. Doku Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivite Ölçümü

Bu yöntem Paglia ve Valentine'in yöntemine dayanmaktadır. GPx, hidroperoksit tarafından glutasyonun oksidasyonunu katalize eder. Glutasyon varlığında, NADPH'nin NADP'ye eş zamanlı oksidasyonu ile birlikte hemen indirgenmiş forma dönüştürülür. 340 nm'deki absorbanstaki azalma ölçülür (84).

3.4.6. Doku Oksitlenmiş Total Glutasyon (GSH) Ölçümü

GSH düzeylerinin doku örneklerinde belirlenmesi, Ellman yöntemi kullanılarak ditiyonitrobenzoik asit (DTNB) geri çevirim metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde, GSH'nin tiyol kalıntıları DTNB moleküllerini spektrofotometrik olarak 412 nm'de absorbanlı olan 2-nitro-5-benzoik aside indirger. GSH, indirgeme işleminden önce ve sonra ölçüldü. Bu yöntemin temel prensibi, sülfhidril gruplarının DTNB ile reaksiyona girerek, sarı renkli bir disülfid bileşiği oluşturmasıdır. Oluşan bu sarı renkli kompleksin optik yoğunluğu, 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülerek GSH aktivitesi belirlenir (85).

3.4.7. Doku Nitrik Oksit Sentaz (iNOS)Aktivite Ölçümü

Bu ELISA kiti, rekabetçi ELISA (Competitive-ELISA) prensibini kullanmaktadır. Kit içerisinde ELISA plakası, NOS2/iNOS antijeni ile önceden kaplanmıştır. Reaksiyon sırasında, numunedeki saptama antikoru üzerindeki NOS2/iNOS'a özgü bağlanma bölgeleri için katı faz destekleyici üzerindeki sabit miktarda NOS2/iNOS ile rekabet eder. Fazla konjugat ile bağlanmamış numune yıkandıktan sonra, her bir mikro kuyuya horseradish peroksidaz (HRP) ile konjuge edilmiş avidin eklenir ve inkübe edilir. Daha sonra her kuyuya substrat çözeltisi ilave edilir. Enzim-substrat reaksiyonu, durdurma çözeltisi eklenerek sonlandırılır ve meydana gelen renk değişimi, 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. Numunelerdeki NOS2/iNOS konsantrasyonu, numunelerin optik yoğunluk değerlerinin standart eğri ile karşılaştırılması yoluyla belirlenir.

3.4.8. Serum Üre (BUN), Kreatinin Seviye Ölçümü

Üre, amonyak ve CO₂ üretmek için üreaz varlığında hidrolize edilir. Üretilen amonyak, Glutamat dehidrojenaz (GLDH) varlığında 2-oksoglutarat ve NADH ile birleşerek glutamat ve NAD açığa çıkarır. NADH tüketiminden kaynaklanan absorbanstaki azalma kinetik olarak ölçülür. Kreatinin ölçümünde anti-CRP antikorları, numunedeki antijenle reaksiyona girerek bir antijen/antikor kompleksi oluşturur. Aglütinasyonun ardından türbidimetrik olarak ölçüm yapılır.

3.5. Histopatolojik Değerlendirme

Deneklerden elde edilen her iki böbrek dokusu işlem öncesinde %10'luk nötral formalin solüsyonuna alınarak fiksede edildi. Uygun fiksasyon süresinin ardından tüm materyaller uzun aks boyunca örneklendi, numaralandırıldı ve kodlanarak standart histolojik prosedürlerle doku takip cihazında işlem gördü. Takiben, tüm örnekler parafin bloklara gömüldü. Her bloktan 5 µm kalınlığında seri kesitler alınarak lamlara aktarıldı, ardından deparafinizasyon işlemleri tamamlandı. Kesitler, rutin Hematoksilen-Eozin (H&E) ve Periyodik Asit-Schiff (PAS) boyama protokolleri ile boyandı. Özellikle PAS boyası, glomerüler yapıların, bazal membran bütünlüğünün ve fırçamsı kenarların (brush border) değerlendirilmesinde kullanıldı.



Şekil 10. Doku ve Kan Örnekleri

Boyama işlemleri tamamlanan lamlar, yüksek çözünürlüklü dijital slayt tarayıcı ile taranarak dijital platforma aktarıldı. Tüm histopatolojik değerlendirme, grup bilgisine kör bir patolog tarafından dijital slaytlar üzerinden gerçekleştirildi.

Her örnek, aşağıdaki morfolojik kriterler açısından detaylı olarak incelendi:

- Tübüler yapılarda: fırçamsı kenar kaybı, tübüler atrofi, vakuolizasyon, dilatasyon, kast oluşumu, nekroz
- Tübülointerstisyel alanda: hemoraji, mononükleer hücre infiltrasyonu, fibrozis
- Glomerüler yapılarda: tuft retraksiyonu, Bowman kapsül kalınlaşması ve segmental yapısal deformasyonlar

Ayrıca, histolojik değişikliklerin kantitatif olarak değerlendirilmesinde EGTI (Endotelyal, Glomerüler, Tübüler, İnterstisyel) skorlama sistemi kullanıldı (Tablo 1)(86). Bu sistemde her anatomik bölge, hasarın derecesine göre 0 ile 3 veya 4 puan arasında değerlendirilerek skorlanmaktadır. Skorlama sonunda toplam 0 ile 14 arasında bir skor elde edilmektedir. Buna göre her denek için bir skor hesaplanmış, bulgular gruplara göre değerlendirilmiştir.

Tablo 1. EGTI Histolojik Skorlama Sistemi

Doku Alanı	Hasar Tanımı	Skor
Tübüler	Histolojik bozulma yok	0
	<%25 fırçamsı kenar kaybı, bazal membran bütünlüğü korunmuş	1
	>%25 fırçamsı kenar kaybı, kalınlaşmış bazal membran	2
	(+) İnflamasyon, kast formasyonu, <%60 tübüler nekroz	3
	(+) >%60 tübüler nekroz	4
Endotelyal	Normal görünüm	0
	Endotelyal hücrelerde şişme	1
	Endotelyal hücre yapısında bozulma	2
	Endotelyal bütünlük kaybı	3
Glomerüler	Normal görünüm	0
	Bowman kapsülünde kalınlaşma	1
	Glomerüler tuft retraksiyonu	2
	Glomerüler fibrozis	3
Tübülointerstisyel	Normal görünüm	0
	<%25 alanda hemoraji ve/veya inflamasyon	1
	(+) <%25 alanda nekroz	2
	%60'a kadar nekroz	3
	>%60 yaygın nekroz	4

3.6. İstatistiksel Analiz

Çalışmadan elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesinde IBM SPSS statistics 22.0 (Chicago, IL, USA) programı kullanıldı. Sürekli nicel değişkenlerin normallik varsayımı Shapiro-Wilk ve Kolmogorov-Smirnov testi ile yapıldı . $p>0,05$ değeri normal dağılım olarak kabul edildi. Grupların karşılaştırılmasında One-Way ANOVA (post hoc Tukey testi ile post hoc Games-Howell testi) ve Kruskal –Wallis (post hoc Dunn testi) testleri uygulandı. Grup varyanslarının homojenliği varsayımı ise Levene testi ile incelendi. Histopatolojik değerlendirmelerde gruplar arasındaki karşılaştırmalarda One-Way ANOVA (post hoc Tukey testi) testi kullanıldı. Tüm değerlendirmelerde $p<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi ve sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak ve medyan (minimum-maksimum) şeklinde ifade edildi.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Analiz

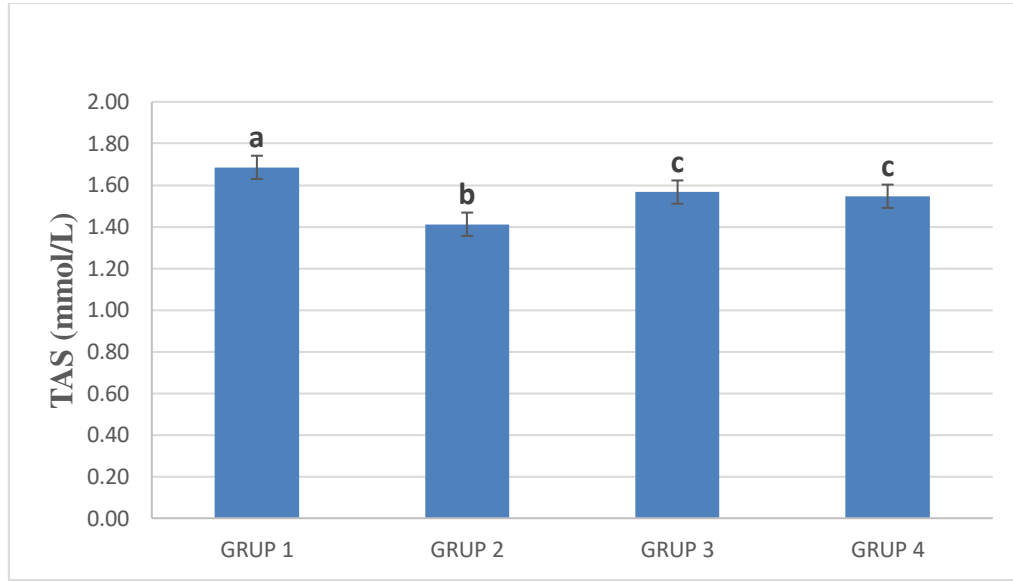
4.1.1. Doku TAS değerleri

Doku TAS değerleri Kontrol grubunda ortalama $1,68 \pm 0,1$ mmol/L olarak ölçölürken, Grup 2 'de $1,41 \pm 0,2$ mmol/L, Grup 3'te $1,56 \pm 0,1$ mmol/L, Grup 4'te ise $1,54 \pm 0,1$ olarak bulundu. Tüm gruplar karşılaştırıldığında böbrek dokusu ortalama TAS seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı ($p<0,01$). Gruplar arası yapılan karşılaştırmada, I/R grubundaki ortalama TAS değerlerinin kontrol grubundan düşük olduğu anlamlı bulundu ($p<0,01$). Tedavi ve profilaksi grubu TAS seviyelerinin I/R grubundan istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek olduğu ancak profilaksi grubu ile tedavi grubu arasında anlamlı fark olmadığı bulundu (sırasıyla $p<0,01$, $p<0,01$, $p>0,05$).

Tablo 2. Grupların böbrek dokusu ortalama TAS değerleri

Gruplar	Doku ortalama TAS (mmol/L) seviyeleri $\pm$ standart sapma	Medyan (Min- Max) değerler (mmol/L)	P değeri
1.Grup (Sham grubu)	$1,68 \pm 0,1$	1,67 (1,51-1,85)	<i>p <0,01</i>
2.Grup (Renal I/R grubu)	$1,41 \pm 0,2$	1,42 (1,31-1,53)	
3.Grup (Tedavi grubu)	$1,56 \pm 0,1$	1,56 (1,42-1,68)	
4.Grup (Profilaksi grubu)	$1,54 \pm 0,1$	1,55 (1,43-1,66)	

Grafik 1. Böbrek dokusu ortalama TAS değerleri



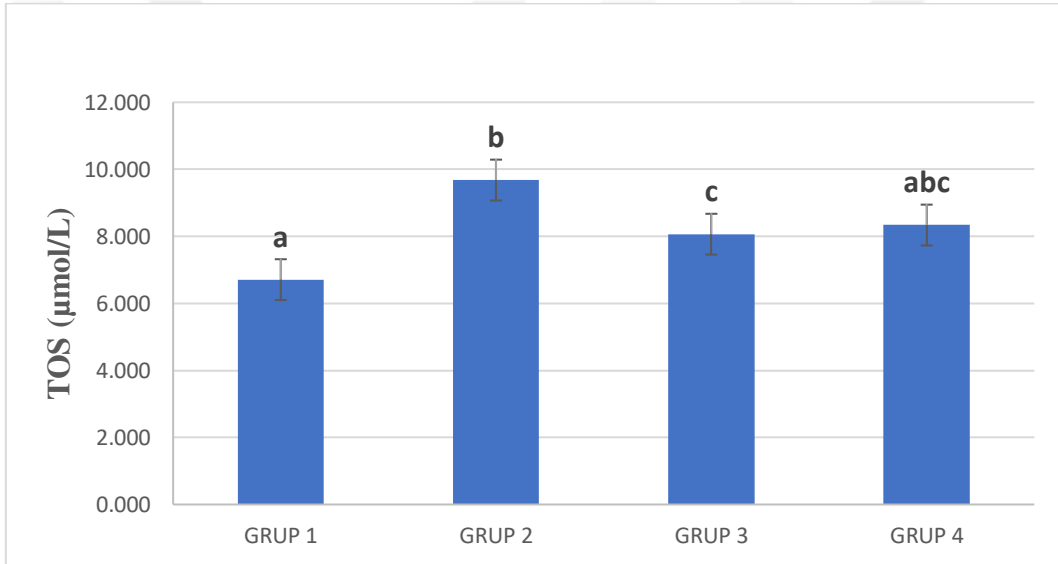
(Farklı harf ile gösterilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. Aynı harfi taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır.)

4.1.2. Doku TOS Değerleri

Doku TOS değerleri kontrol grubunda $6,7 \pm 0,9 \mu\text{mol/L}$, Grup 2 'de $9,6 \pm 1,3 \mu\text{mol/L}$, Grup 3'te $8 \pm 1 \mu\text{mol/L}$, Grup 4'te ise $8,3 \pm 1,7$ olarak bulundu. Tüm gruplar karşılaştırıldığında doku TOS seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0,01$). Gruplar arası yapılan istatistiksel karşılaştırmada I/R ve tedavi gruplarının kontrol grubundan daha yüksek doku TOS değerine sahip olduğu anlamlı olarak sonuçlandı (sırasıyla $p < 0,05$, $p < 0,01$). I/R grubu ile tedavi grubu karşılaştırıldığında ise I/R grubunun daha yüksek TOS seviyesine sahip olduğu istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,01$). Profilaksi grubu ile diğer tüm gruplar karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p > 0,05$).

Tablo 3. Grupların böbrek dokusu ortalama TOS değerleri

Gruplar	Doku ortalama TOS ($\mu\text{mol/L}$) seviyeleri $\pm$ standart sapma	Medyan (Min- Max) değerler ($\mu\text{mol/L}$)	P değeri
1.Grup (Sham grubu)	6,7 $\pm$ 0,9	6,8 (5,1-7,9)	<i>p < 0,01</i>
2.Grup (Renal I/R grubu)	9,6 $\pm$ 1,3	9,9 (7,7-11,4)	
3.Grup (Tedavi grubu)	8 $\pm$ 1	7,8 (6,8-10,1)	
4.Grup (Profilaksi grubu)	8,3 $\pm$ 1,7	7,5 (6,6-11,2)	

Grafik 2. Böbrek dokusu ortalama TOS değerleri

(Farklı harf ile gösterilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. Aynı harfi taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır.)

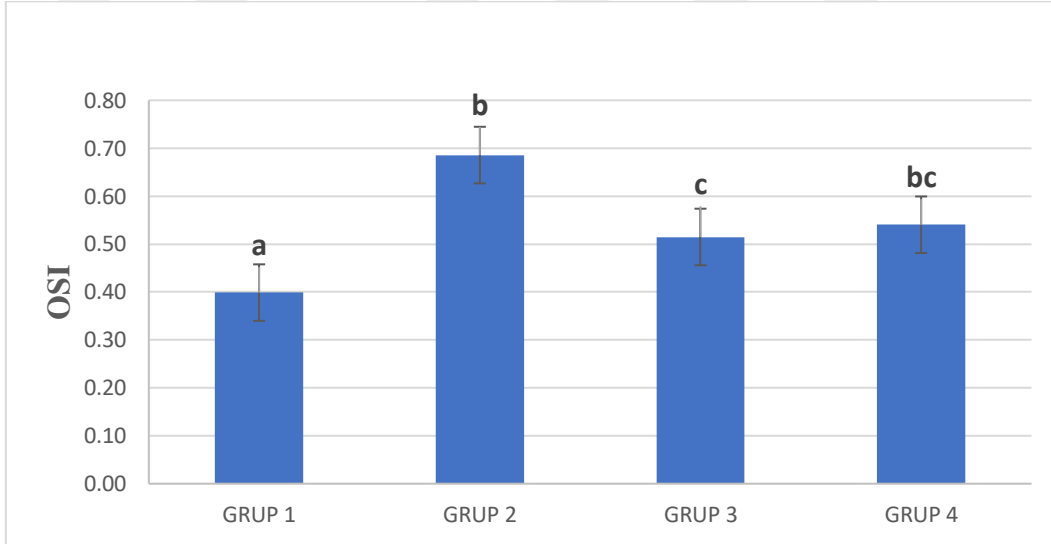
4.1.3. Doku OSI Değerleri

Doku OSI değerleri kontrol grubunda ortalama $0,39 \pm 0,05$, Grup 2’de $0,68 \pm 0,09$, Grup 3’te $0,51 \pm 0,04$, Grup 4’te ise $0,54 \pm 0,11$ olarak bulundu. Tüm gruplar karşılaştırıldığında böbrek dokusu ortalama OSI değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p < 0,05$). Böbrek dokusu ortalama OSI değerleri gruplar arasında değerlendirildiğinde kontrol grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı farklılık bulundu ($p < 0,01$). Tedavi grubunun OSI seviyelerinin I/R grubundan daha düşük olduğu sonucu da istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Ancak tedavi ve I/R grubu ile profilaksi grubu arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p > 0,05$).

Tablo 4. Grupların böbrek dokusu ortalama OSI değerleri

Gruplar	Doku ortalama OSI değerleri±standart sapma	Medyan (Min-Max) değerler	P değeri
1.Grup (Sham grubu)	0,39±0,05	0,41 (0,3-0,49)	<i>p <0,05</i>
2.Grup (Renal I/R grubu)	0,68±0,09	0,66 (0,55-0,84)	
3.Grup (Tedavi grubu)	0,51±0,04	0,50 (0,44-0,59)	
4.Grup (Profilaksi grubu)	0,54±0,11	0,52 (0,40-0,76)	

Grafik 3. Böbrek dokusu ortalama OSI değerleri



(Farklı harf ile gösterilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. Aynı harf taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır.)

4.1.4. Doku GSH Değerleri

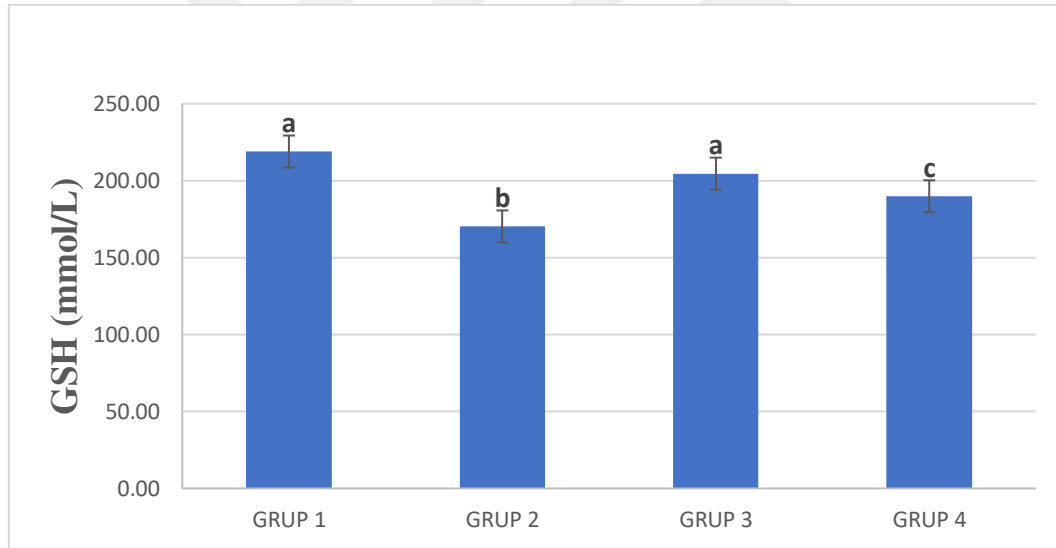
Sıçanlarda oluşturulan I/R modelindeki böbrek GSH değerleri tablo 5’te gösterilmiştir. Gruplararası ortalama GSH seviyeleri arasında anlamlı fark saptandı ($p<0,01$). Doku GSH seviyeleri I/R grubunda ve etken maddenin I/R’den önce uygulandığı profilaksi gruplarında, sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük saptandı (sırasıyla $p<0,01$, $p<0,05$). Tedavi ve profilaksi grubu ile I/R grubu arasında anlamlı fark tespit edildi ($p<0,05$). Tedavi grubundaki GSH seviyelerinin de profilaksi grubundan yüksek

olduğu anlamlı sonuçlandı. Ancak böbrek GSH seviyeleri tedavi grubunda, sham grubuna göre anlamlı farklılık göstermedi ($p>0,05$).

Tablo 5. Grupların böbrek dokusu ortalama GSH değerleri

Gruplar	Doku ortalama GSH (mmol/L)düzeyleri±standart sapma	Medyan (Min-Max) değerler(mmol/L)	P değeri
1.Grup (Sham grubu)	218,9±21,9	207,6 (199,2-265,9)	$P<0,01$
2.Grup (Renal I/R grubu)	170,2±7,52	170,1 (158-181,6)	
3.Grup (Tedavi grubu)	204,5±11,2	208,9 (189,2-219,6)	
4.Grup (Profilaksi grubu)	189,8±5,24	188,6 (184,9-200,9)	

Grafik 4. Böbrek dokusu ortalama GSH değerleri



(Farklı harf ile gösterilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. Aynı harfi taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır.)

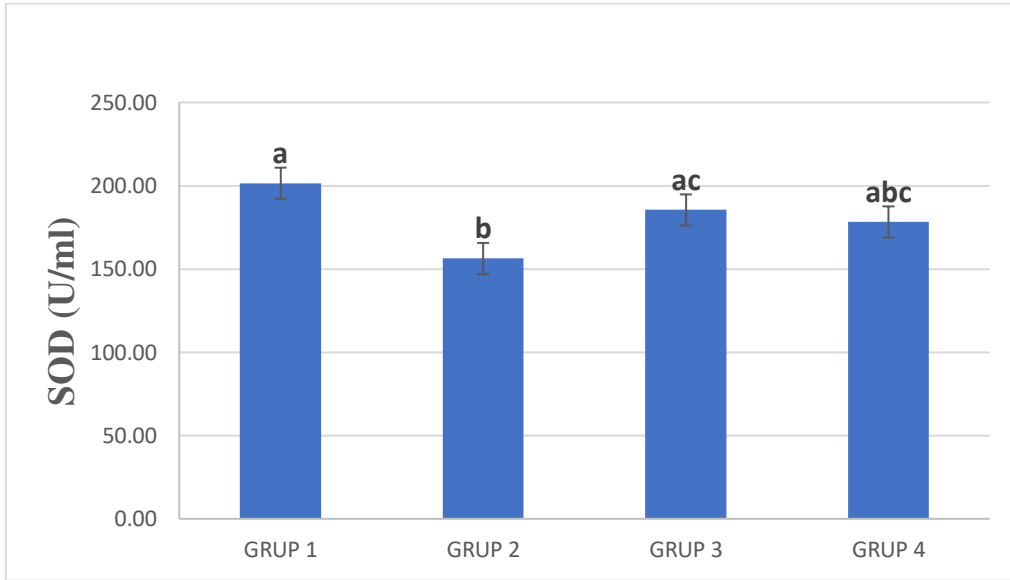
4.1.5. Doku SOD Değerleri

Doku SOD değerleri tablo 6'da gösterilmiştir. Böbrek dokusu ortalama SOD değerleri tüm gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,01$). I/R grubunda doku SOD seviyelerinin tedavi ve kontrol grubuna göre belirgin azaldığı anlamlı olarak tespit edildi ($p<0,05$). Ancak diğer gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 6. Grupların böbrek dokusu ortalama SOD değerleri

Gruplar	Doku ortalama SOD (U/ml) düzeyleri±standart sapma	Medyan (Min-Max) değerler(U/ml)	P değeri
1.Grup (Sham grubu)	201,4±23,83	209,4 (162,9-233,4)	<i>p < 0,01</i>
2.Grup (Renal I/R grubu)	156,2±21,78	157,4 (115,9-194,4)	
3.Grup (Tedavi grubu)	185,4±9,39	188,5 (165,6-195,4)	
4.Grup (Profilaksi grubu)	178,2±7,36	178,3 (165,8-188,2)	

Grafik 5. Böbrek dokusu ortalama SOD değerleri



(Farklı harf ile gösterilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. Aynı harfi taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır.)

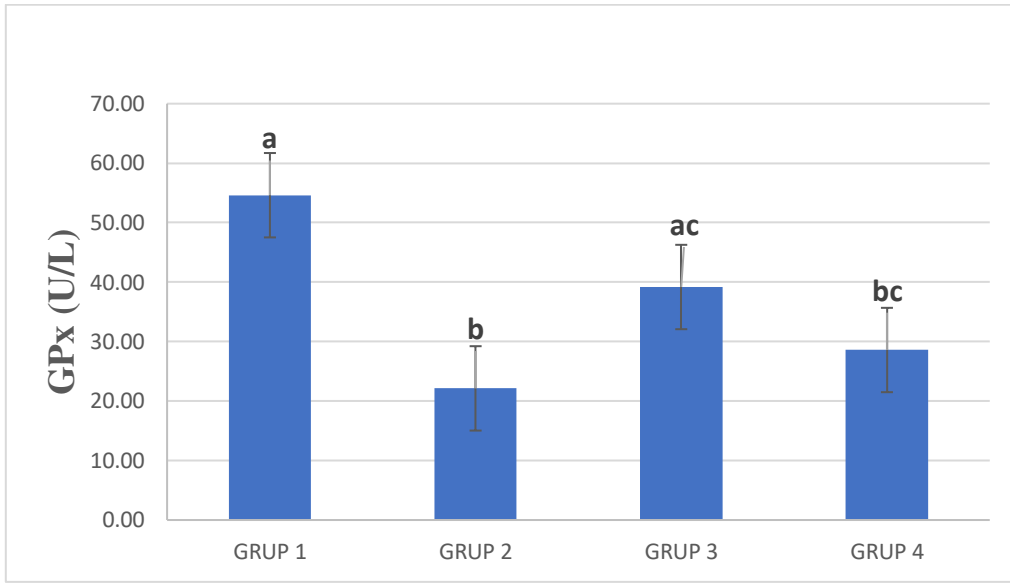
4.1.6. Doku GPx Değerleri

Böbrek dokusu GPx değerleri tablo 7’de gösterilmiştir. Yapılan istatistiksel analizde tüm gruplar değerlendirildiğinde GPx düzeyleri arasında anlamlı farklılık tespit edildi ($p<0,01$). Gruplar arası değerlendirme yapıldığında ise I/R grubundaki GPx düzeyleri Sham ve tedavi gruplarından düşüktür ve bu farklılık istatistiksel olarak da anlamlı bulundu ($p<0,01$). Diğer gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında ortalama GPx değerlerinin tedavi grubunda I/R grubuna göre daha yüksek olduğu anlamlı olarak sonuçlanmış, ancak tedavi grubu ile kontrol ve profilaksi grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı (sırasıyla $p<0,05$, $p>0,05$).

Tablo 7. Grupların böbrek dokusu ortalama GPx değerleri

Gruplar	Doku ortalama GPx (U/L) düzeyleri±standart sapma	Medyan (Min- Max) değerler(U/L)	P değeri
1.Grup (Sham grubu)	54,6±17,85	52 (32,2-85,8)	<i>p < 0,01</i>
2.Grup (Renal I/R grubu)	22,1±7,21	21,7 (12,8-32,7)	
3.Grup (Tedavi grubu)	39,1±10,2	37,8 (24,8-57,2)	
4.Grup (Profilaksi grubu)	28,5±5,98	28,9 (20,4-35,7)	

Grafik 6. Böbrek dokusu ortalama GPx değerleri



(Farklı harf ile gösterilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. Aynı harfi taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır.)

4.1.7. Doku CAT Değerleri

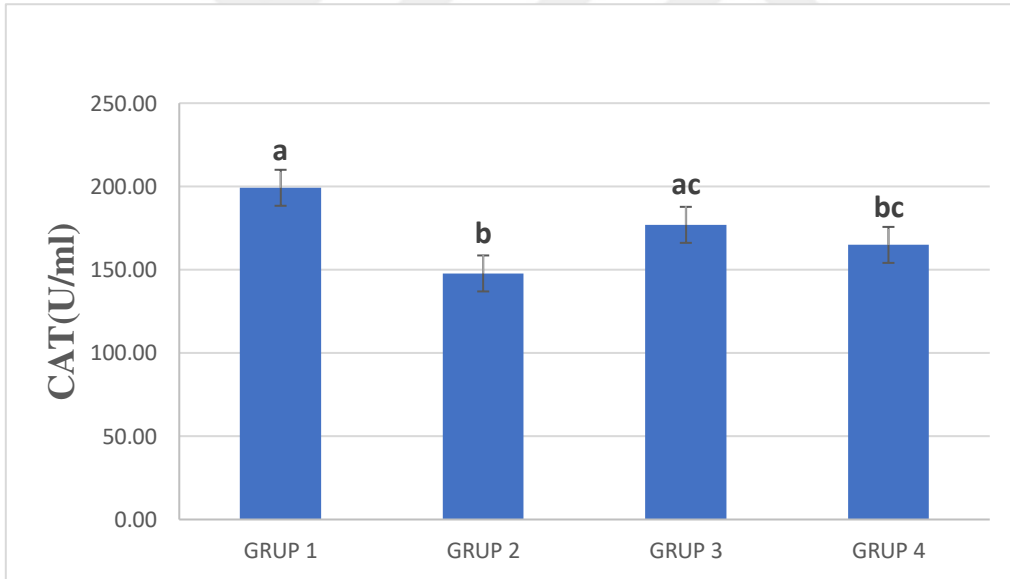
Böbrek dokusu ortalama CAT değerleri kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi ($p < 0,01$). Gruplar arası ortalama CAT seviyeleri karşılaştırıldığında I/R grubundaki ortalama CAT değerleri tedavi ve kontrol grubundan belirgin derecede düşüktür. Bu farklılık istatistiksel olarak da anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Tedavi ve I/R grubu karşılaştırıldığında ise doku CAT seviyelerinin tedavi grubunda daha yüksek olduğu istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Kontrol grubunun profilaksi grubuyla arasında anlamlı fark tespit edildi ancak tedavi grubuyla arasında anlamlı bir

fark bulunmadı (sırasıyla $p < 0,05$, $p > 0,05$). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p > 0,05$).

Tablo 8. Grupların böbrek dokusu ortalama CAT değerleri

Gruplar	Doku ortalama CAT (U/ml) düzeyleri $\pm$ standart sapma	Medyan (Min-Max) değerler (U/ml)	P değeri
1.Grup (Sham grubu)	199,1 $\pm$ 10,95	202,8 (178,4-210,4)	$p < 0,01$
2.Grup (Renal I/R grubu)	147,7 $\pm$ 33,63	148,9 (119-166,5)	
3.Grup (Tedavi grubu)	176,9 $\pm$ 24,1	168,6 (149-215,3)	
4.Grup (Profilaksi grubu)	164,8 $\pm$ 29,28	162,8 (106,8-204,1)	

Grafik 7. Böbrek dokusu ortalama CAT değerleri



(Farklı harf ile gösterilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. Aynı harf taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır.)

4.1.8. Doku MDA Değerleri

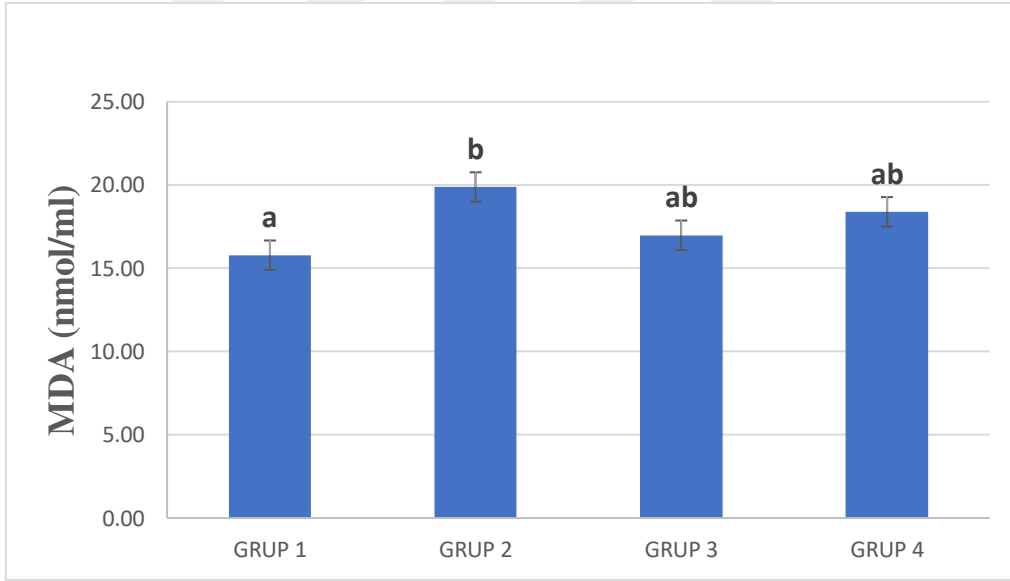
Böbrek dokusu ortalama MDA değerleri Sham grubunda ortalama $15,7 \pm 2,2$ nmol/ml, grup 2’de $19,8 \pm 2,9$ nmol/ml, grup 3’te $16,9 \pm 2,2$ nmol/ml, grup 4’te $18,3 \pm 3,6$ nmol/ml olarak sonuçlanmıştır ve tüm gruplar karşılaştırıldığında ortalama MDA seviyeleri

arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Gruplar arası yapılan karşılaştırmada yalnızca I/R grubu MDA değerlerinin kontrol grubundan daha düşük olduğu anlamlı bulundu ($p<0,05$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p>0,05$).

Tablo 9. Grupların böbrek dokusu ortalama MDA değerleri

Gruplar	Doku ortalama MDA (nmol/ml) düzeyleri $\pm$ standart sapma	Medyan (Min-Max) değerler (nmol/ml)	P değeri
1.Grup (Sham grubu)	15,7 $\pm$ 2,2	15,9 (12,4-19,3)	$p < 0,05$
2.Grup (Renal I/R grubu)	19,8 $\pm$ 2,9	19,4 (15,7-24,2)	
3.Grup (Tedavi grubu)	16,9 $\pm$ 2,2	16,7 (14,3-21,4)	
4.Grup (Profilaksi grubu)	18,3 $\pm$ 3,6	17,7 (12,7-23,5)	

Grafik 8. Böbrek dokusu ortalama MDA değerleri



(Farklı harf ile gösterilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. Aynı harfi taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır.)

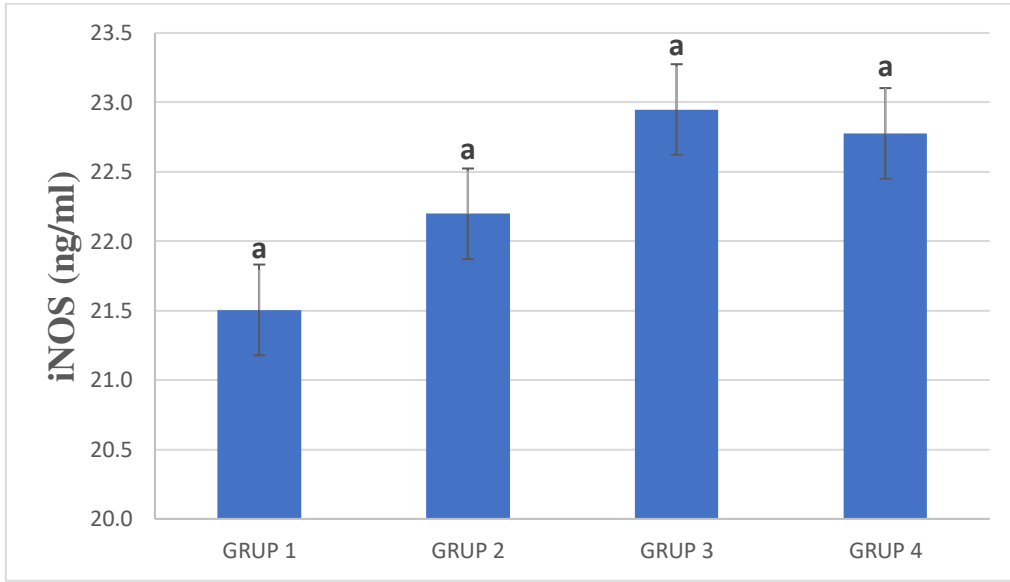
4.1.9. Doku iNOS Değerleri

Doku iNOS ortalama değerleri karşılaştırıldığında grup 1’de 21,5 $\pm$ 10,3 ng/ml, grup 2’de 22,1 $\pm$ 9,2 ng/ml, grup 3’te 22,9 $\pm$ 9,9 ng/ml, grup 4’te ise 22,7 $\pm$ 12,6 ng/ml olarak sonuçlanmıştır. Grupların ortalama iNOS değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($p>0,05$).

Tablo 10. Grupların böbrek dokusu ortalama iNOS değerleri

Gruplar	Doku ortalama iNOS düzeyleri (ng/ml)±standart sapma	Medyan (Min-Max) değerler (ng/ml)	P değeri
1.Grup (Sham grubu)	21,5±10,3	23,7 (9,8-34,7)	<i>p >0,05</i>
2.Grup (Renal I/R grubu)	22,1±9,2	20,1 (4,2-34,6)	
3.Grup (Tedavi grubu)	22,9±9,9	16,8 (11,6-38,2)	
4.Grup (Profilaksi grubu)	22,7±12,6	19,9 (4,1-38,1)	

Grafik 9. Böbrek dokusu ortalama iNOS değerleri



(Farklı harf ile gösterilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. Aynı harfi taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır.)

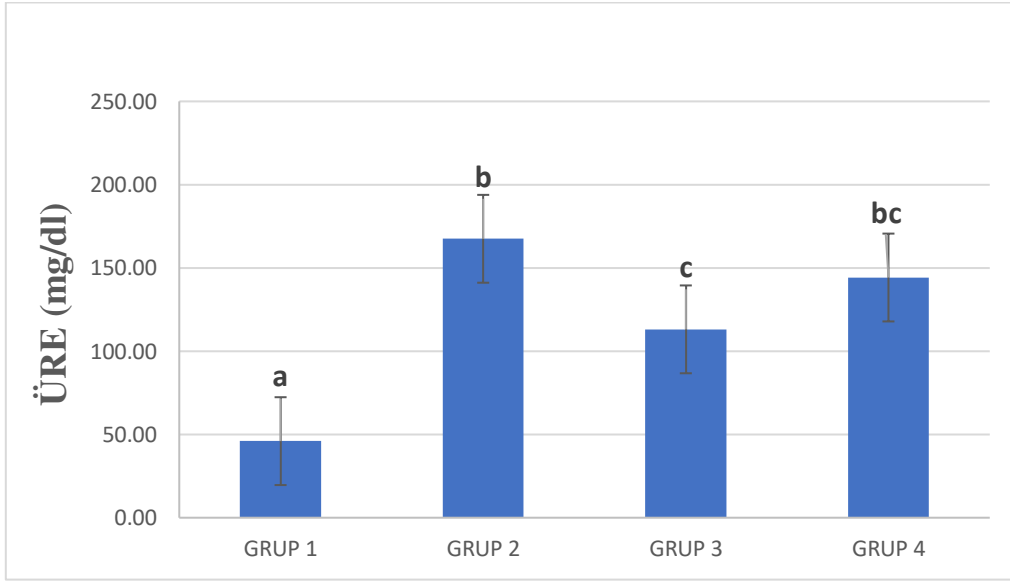
4.1.10. Serum Üre Değerleri

Sıçanlarda oluşturulan I/R modelinde gruplar arası ortalama serum üre değerleri karşılaştırılmıştır. Tüm gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi ($p < 0,01$). Gruplar arası ortalama serum üre seviyeleri kıyaslandığında ise I/R, profilaksi ve tedavi grubunun sham grubuyla arasında anlamlı bir fark bulundu (sırasıyla $p < 0,01$, $p < 0,05$, $p < 0,01$). Tedavi grubu ortalama üre seviyeleri, I/R grubundan anlamlı derecede düşük olarak bulundu ($p < 0,05$). Ancak profilaksi grubu ile tedavi ve I/R grubu arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p > 0,05$).

Tablo 11. Grupların ortalama serum Üre değerleri

Gruplar	Serum ortalama Üre (mg/dl) düzeyleri $\pm$ standart sapma	Medyan (Min-Max) değerler (mg/dl)	P değeri
1.Grup (Sham grubu)	45,9 $\pm$ 16	41 (21,5-70,6)	<i>p <0,01</i>
2.Grup (Renal I/R grubu)	167,4 $\pm$ 41,7	182 (108-221,7)	
3.Grup (Tedavi grubu)	113,1 $\pm$ 36,1	110,1 (58,6-168,6)	
4.Grup (Profilaksi grubu)	144,2 $\pm$ 65,4	169,3 (54,4-221,3)	

Grafik 10. Ortalama serum Üre değerleri



(Farklı harf ile gösterilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. Aynı harfi taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır.)

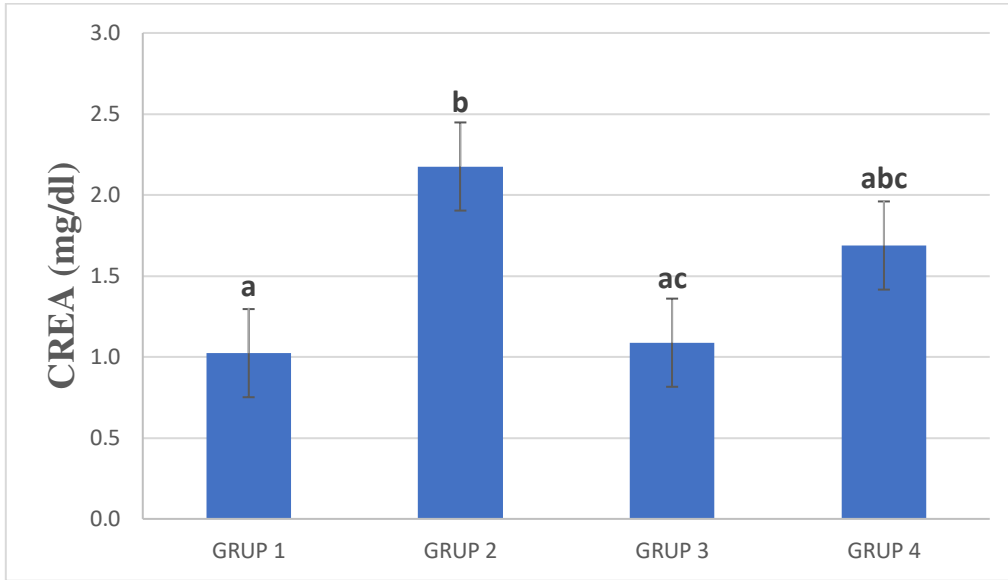
4.1.11. Serum Kreatinin Değerleri

Tüm grupların ortalama serum kreatinin değerleri karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık bulundu ($p < 0,01$). Gruplar arası yapılan değerlendirmede kontrol grubu ile I/R grubu arasında, tedavi grubuyla I/R grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edildi (sırasıyla $p < 0,01$, $p < 0,05$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p > 0,05$).

Tablo 12. Grupların ortalama serum Kreatinin değerleri

Gruplar	Serum ortalama Kreatinin düzeyleri (mg/dl) $\pm$ standart sapma	Medyan (Min-Max) değerler (mg/dl)	P değeri
1.Grup (Sham grubu)	1,02 $\pm$ 0,04	1,01 (0,96-1,07)	<i>p <0,01</i>
2.Grup (Renal I/R grubu)	2,1 $\pm$ 0,84	1,98 (1,2-3,3)	
3.Grup (Tedavi grubu)	1,08 $\pm$ 0,13	1,1 (0,9-1,2)	
4.Grup (Profilaksi grubu)	1,68 $\pm$ 0,7	1,39 (0,9-2,8)	

Grafik 11. Ortalama serum Kreatinin değerleri



(Farklı harf ile gösterilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. Aynı harfi taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır.)

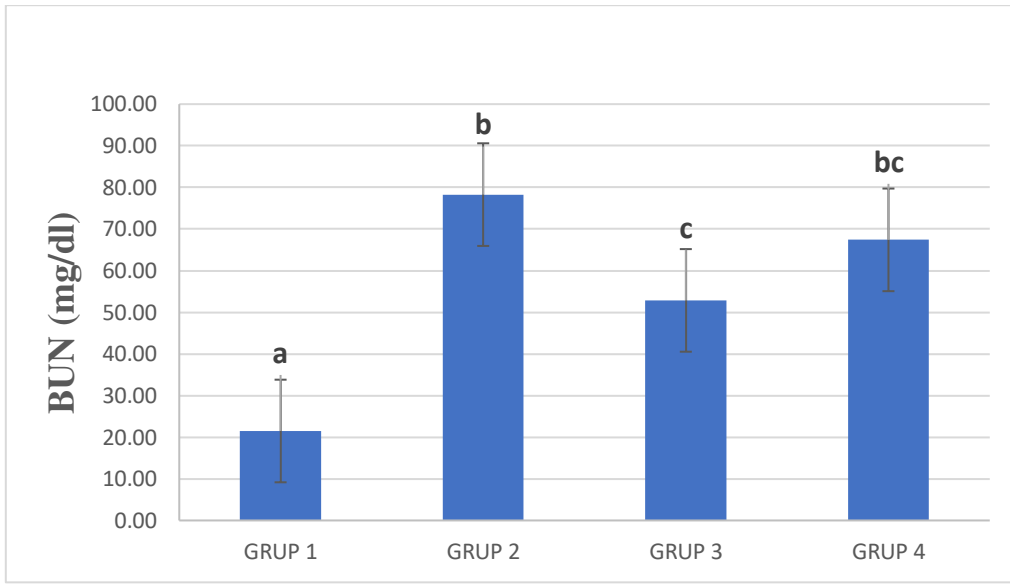
4.1.12. Serum BUN Değerleri

Sıçanlarda yapılan I/R hasarı çalışmasında tüm gruplar karşılaştırdı ve istatistiksel olarak ortalama serum BUN değerleri arasında anlamlı farklılık bulundu ($p < 0,01$). Gruplar arası yapılan karşılaştırmada I/R, profilaksi ve tedavi grubunun ortalama serum BUN değerlerinin kontrol grubundan daha yüksek olduğu istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,01$). Tedavi grubundaki değerler I/R grubundan daha düşük olarak sonuçlandı ve anlamlı bulundu ($p < 0,01$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p > 0,05$).

Tablo 13. Grupların ortalama serum BUN değerleri

Gruplar	Serum ortalama BUN (mg/dl) düzeyleri $\pm$ standart sapma	Medyan (Min-Max) değerler (mg/dl)	P değeri
1.Grup (Sham grubu)	21,4 $\pm$ 7,4	19,1 (10-33)	<i>p <0,01</i>
2.Grup (Renal I/R grubu)	78,1 $\pm$ 19,6	85 (49,5-103,6)	
3.Grup (Tedavi grubu)	52,8 $\pm$ 16,8	51,4 (27,3-78,8)	
4.Grup (Profilaksi grubu)	67,4 $\pm$ 30,5	79,1 (25,4-103,4)	

Grafik 12. Ortalama serum BUN değerleri



(Farklı harf ile gösterilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. Aynı harfi taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır.)

4.2. Histopatolojik Analiz

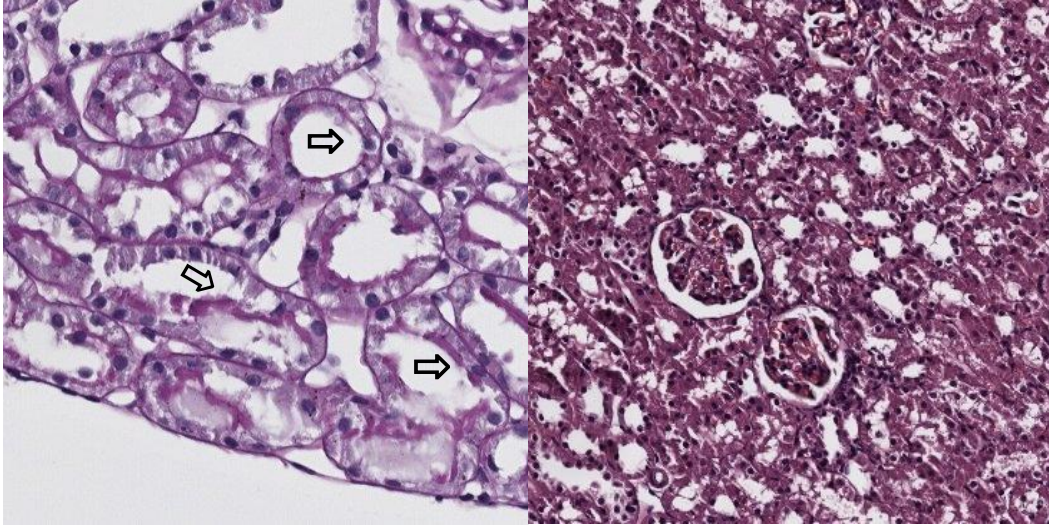
Histopatolojik değerlendirme daha önce bahsedilen EGTI skorum sistemine göre yapıldı. Her grupta denekler arasında farklar izlenmekle birlikte ortalama değerlendirmede hastalık grubunda bazı alanlarda belirgin túbüler nekroz, interstisyel inflamasyon ve masif hemoraji saptanırken, bazı örneklerde PAS boyamasında glomerüler tuftta retraksiyon ve Bowman kapsül kalınlaşması gibi değişiklikler dikkat çekmiştir.

Profilaksi grubunda, histolojik hasarın kısmen azaldığı, fırçamsı kenar kaybı ve hafif düzeyde inflamasyonun ve vasküler dilatasyonun fokal alanlarla sınırlı olduğu izlendi.

Tedavi grubunda ise profilaksiye benzer bulgular gözlenmiş olup benzer şekilde fokal alanlarda fırçamsı kenar kaybı ve hafif glomerüler segmental bozulmalar mevcuttu. Yine benzer şekilde hemoraji ve inflamasyon minimal olarak izlendi.

Kontrol grubunda tüm dokular normal morfolojide olup glomerül yapılarında, tübüllerde, interstisyel alanda ve vasküler yapılarda herhangi bir patolojik bulguya rastlanmadı. Nekroz, hemoraji, inflamasyon, fırçamsı kenar kaybı gibi hasara bağlı bulgular görülmedi. Her gruptan elde edilen temsili örneklerden alınan resimler aşağıda gösterilmiştir. (Dört deney grubuna ait temsili böbrek dokusu kesitlerinin Hematoksilen-Eozin (H&E) ve Periyodik Asit-Schiff (PAS) boyamalarıyla elde edilen, farklı alanlardan seçilmiş görüntüleri, dijital olarak taranan lamalar üzerinden elde edilmiştir.)

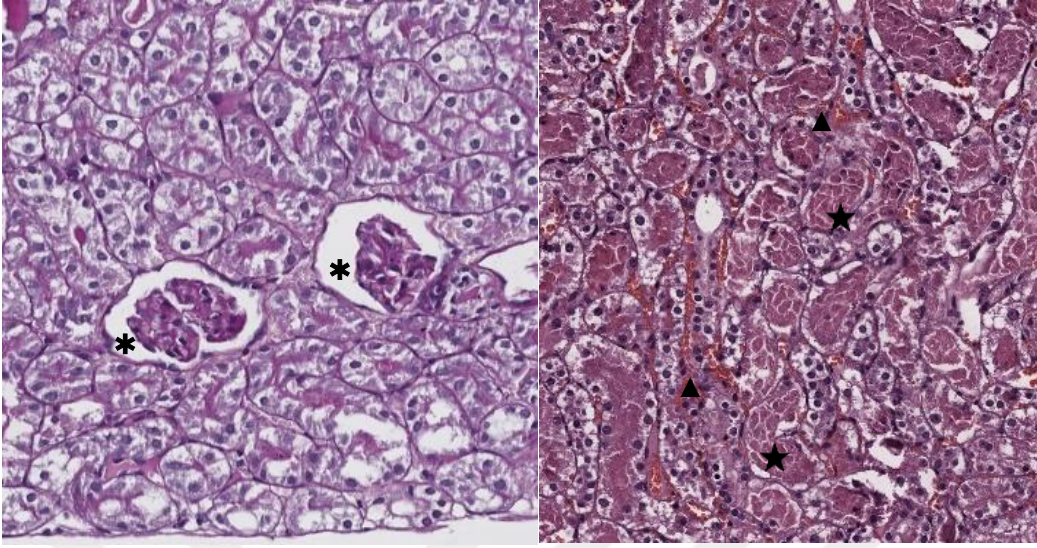
4.2.1. Grup 1 histopatolojik değişiklikler



Şekil 11. Kontrol grubundaki histopatolojik değişiklikler

Kontrol grubunda glomerüler ve tübüler yapıların bütünlüğü korunmuştur. Nekroz, inflamasyon ve hemorajiye rastlanmamıştır. PAS boyamasında glomerül ve bazal membran yapılar normal sınırlarda izlenmiş, fırçamsı kenarların korunmuş olarak görülmüştür ($\Rightarrow$).

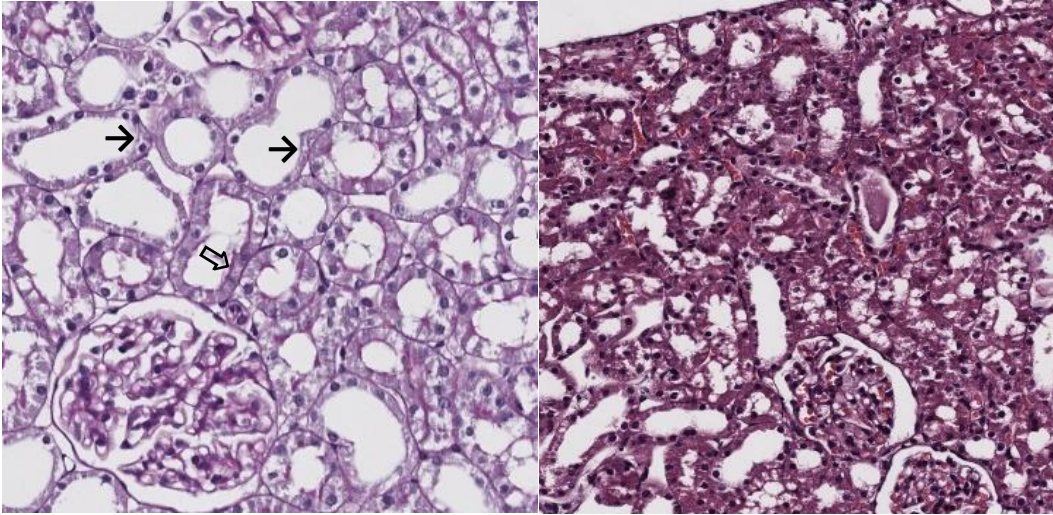
4.2.2. Grup 2 histopatolojik değişiklikler



Şekil 12. Hastalık grubundaki histopatolojik değişiklikler

Fokal alanlarda belirgin tübüler nekroz (★), belirgin interstisyel inflamasyon ve masif hemoraji (▲) izlenmiştir. PAS boyalı kesitte, glomerüler tuftta retraksiyon ve hafif Bowman kapsül kalınlaşması gibi glomerüler değişiklikler de (*) dikkat çekmektedir.

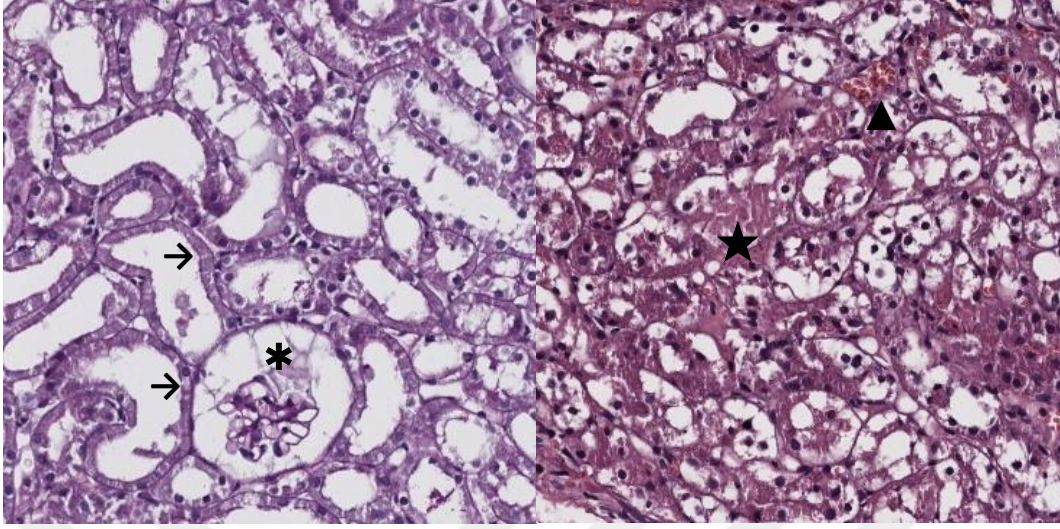
4.2.3. Grup 3 histopatolojik değişiklikler



Şekil 13. Tedavi grubundaki histopatolojik değişiklikler

Hafif hemoraji, düşük dereceli inflamasyon ve bazı tübüllerde fırçamsı kenar kaybı (→) izlenmiştir. PAS boyalı kesitte, glomerüler yapıların büyük ölçüde korunduğu, ancak bazı glomerüllerde segmental bozulmaların yer aldığđ gözlenmiştir.

4.2.4. Grup 4 histopatolojik değişiklikler



Şekil 14. Profilaksi grubundaki histopatolojik değişiklikler

Tedavi grubuna benzer morfolojik bulgular gözlenmiş; Hastalık grubuna kıyasla histolojik yapının daha iyi korunduğu, ancak bazı alanlarda fokal fırçamsı kenar (brush border) kaybı (→), hafif damar dilatasyonu, hemoraji ve sınırlı interstisyel inflamasyon saptanmıştır. PAS boyalı kesitte glomerüler yapılar büyük ölçüde korunmuş olup, nadiren fokal alanlarda tuft yapısında retraksiyon izlenmiştir.

4.2.5. Histopatolojik Değişikliklerin İstatistik Analizi

Tüm gruptaki sıçanlardan alınan sağ böbrek ve sol böbrek doku örnekleri tablo 14'te gösterildiği şekilde EGTİ skora göre skorlanmış ve tübüler, endotelial, glomerüler, tübülointerstiyel toplam skorlar hesaplanmıştır. Tablo 14'te listelenmiş sıçanların kontrol grubundakilere 'K' ile başlayan sayılar, I/R grubundakilere 'H' ile başlayan sayılar, tedavi grubundakilere 'T' ile başlayan sayılar ve profilaksi grubundakilere ise 'P' ile başlayan sayılar verilmiştir.

Tablo 14. EGTİ Sistemine göre gruplar arası toplam skorlar

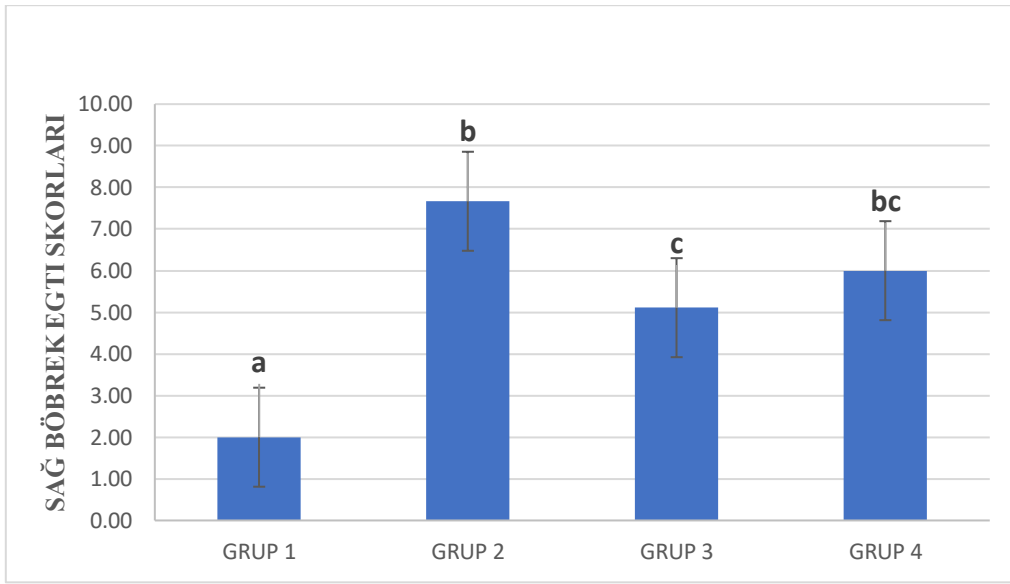
		<i>Toplam EGTİ Skorları</i>	
		Sol böbrek	Sağ böbrek
KONTROL GRUBU	K1	1	1
	K2	1	4
	K3	1	1
	K4	4	1
	K5	2	3
	K6	1	1
	K7	3	2
	K8	2	3
	K9	3	2
HASTALIK GRUBU	H1	9	7
	H2	3	5
	H3	6	9
	H4	7	10
	H5	7	6
	H6	7	7
	H7	8	9
	H8	8	7
	H9	9	9
TEDAVİ GRUBU	T1	6	6
	T2	5	4
	T3	6	7
	T4	5	4
	T5	5	2
	T6	6	4
	T7	6	6
	T8	2	5
	T9	8	8
PROFİLAKSİ GRUBU	P1	8	2
	P2	5	3
	P3	8	6
	P4	9	8
	P5	5	7
	P6	5	9
	P7	6	5
	P8	8	5
	P9	3	9

Sağ böbrek dokusu ortalama EGTİ skorları istatistiksel olarak hesaplanmış ve sonuçlar tablo 15’te verilmiştir. Yapılan istatistiksel analizde tüm gruplar karşılaştırıldı ve sağ böbrek EGTİ skorları arasında anlamlı farklılık bulundu ($p<0,01$). Gruplar arası yapılan karşılaştırmada ise kontrol grubuyla diğer gruplar arasında, tedavi grubu ve hastalık grubu arasında anlamlı farklılık bulundu (sırasıyla $p<0,05$, $p<0,01$). Ancak profilaksi ile hastalık grubu arasında ve profilaksi ile tedavi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi ($p>0,05$).

Tablo 15. Grupların sağ böbrek dokusu ortalama EGTI skorları

Gruplar	Sağ böbrek dokusu ortalama EGTI skoru± standart sapma	Medyan (Min-Max) değerler (mg/dl)	P değeri
1.Grup (Sham grubu)	2±1,11	2 (1-4)	<i>p <0,01</i>
2.Grup (Renal I/R grubu)	7,6±1,6	7 (5-10)	
3.Grup (Tedavi grubu)	5,1±1,8	5 (2-8)	
4.Grup (Profilaksi grubu)	6±2,5	6 (2-9)	

Grafik 13. Sağ böbrek dokusu ortalama EGTI skorları



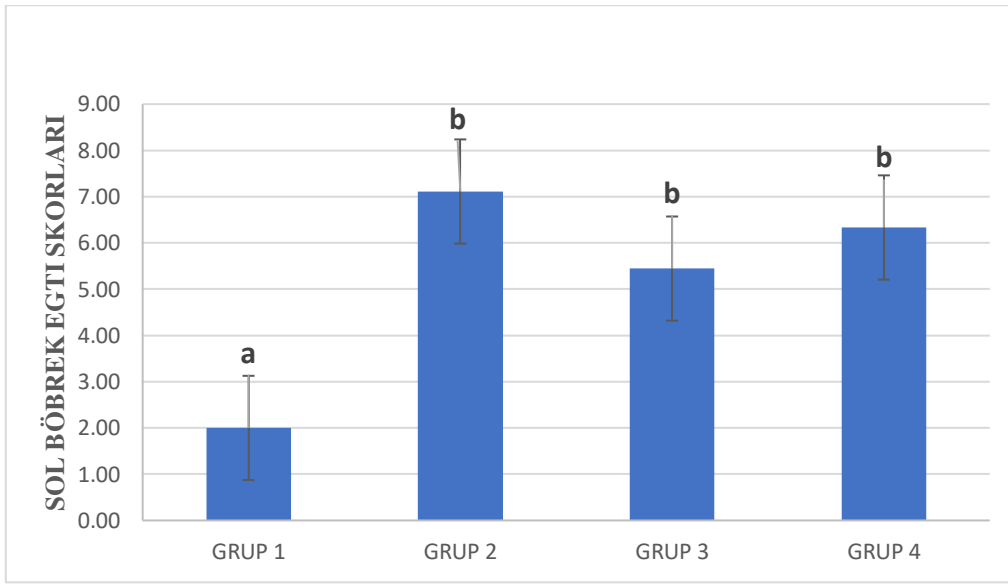
(Farklı harf ile gösterilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. Aynı harfi taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır.)

Sıçanlarda oluşturulan I/R modelinde gruplar arası sol böbrek ortalama EGTI skorları karşılaştırıldı ve tablo 16’da gösterildi. Tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi ($p < 0,01$). Gruplar arası ortalama EGTI skorları kıyaslandığında ise I/R, profilaksi ve tedavi grubunun sham grubuyla arasında anlamlı bir fark bulundu ($p < 0,01$). Tedavi grubundaki yüksek skor I/R grubu ile karşılaştırıldığında da anlamlı bir fark elde edildi ($p < 0,05$). Ancak diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p > 0,05$).

Tablo 16. Grupların sol böbrek dokusu ortalama EGTI skorları

Gruplar	Sol böbrek dokusu ortalama EGTI skoru± standart sapma	Medyan (Min-Max) değerler	P değeri
1.Grup (Sham grubu)	2±1,11	2 (1-4)	<i>p <0,01</i>
2.Grup (Renal I/R grubu)	7,1±1,8	7 (3-9)	
3.Grup (Tedavi grubu)	5,4±1,5	6 (2-8)	
4.Grup (Profilaksi grubu)	6,3±2	6 (3-9)	

Grafik 14. Sol böbrek dokusu ortalama EGTI skorları



(Farklı harf ile gösterilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. Aynı harfi taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır.)

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada sıçanlarda oluşturulan deneysel renal iskemi-reperfüzyon modeli oluşturulmuş ve bu model üzerinde amniyon hücre kültürü özelliği taşıyan Gibco™ AmnioMAX™ - II Complete Medium tedavisinin sonuçları değerlendirilmiştir. Böbrekler, I/R hasarına karşı oldukça savunmasız organlardır. İskeminin 30 dakikayı geçmediği durumlarda böbrekte gelişen hasarlar geri döndürülebilmektedir. 60 dakikanın üzerinde gelişen iskemilerde ABY tablosu gelişmektedir. Literatürde sıçanlarda I/R hasarı modeliyle ilgili birçok çalışma bulunmaktadır ve cerrahi prosedür ile iskemi süresi hakkında net bir konsensüs bulunmamaktadır (87). Birkaç farklı yöntem olmasına rağmen, bilateral renal arter klemplenmesi ve yaklaşık 45 dakikalık iskemi süresi I/R hasarı oluşturmak için en optimum yöntem olarak kabul edilebilir (87-89). Bizim çalışmamızda da bu süre baz alınarak böbreklerde iskemik hasar oluşturulmaya çalışılmıştır.

I/R hasarını önlemek için birçok farmakolojik ajanla yoğun çalışmalar yürütülmektedir. I/R hasarı oksidatif strese yol açtığından bu çalışmalar genelde antioksidan bileşiklerle yapılmaktadır (90). Birden fazla antioksidan maddenin I/R hasarının önüne geçebileceği ispatlansa da rutin kullanıma giren herhangi bir etken madde bulunmamaktadır (91).

Antioksidan bileşiklerin yanında kök hücre tedavilerinin de I/R hasarı üzerine etkileri araştırılmış ve faydası ispatlanmıştır (92). Amniyotik epitel hücrelerinin kullanıldığı bir hayvan deney çalışmasında I/R hasarı üzerine olan etkiler araştırılmış ve yüz güldürücü sonuçlar ortaya çıkmıştır (93). Başka bir çalışmada, İnsan amniyotik epitel hücrelerini karaciğerlerin iskemi-reperfüzyon hasarının önüne geçebileceği ispatlanmıştır (94). Karaçal ve arkadaşları yüksek konsantrasyonlarda hyaluronik asit, uyarıcı aktivatör ve diğer faktörler içeren insan amniyotik sıvısının tavşan kalvaryal defektlerine subperiosteal olarak uygulandığında kemik iyileşmesini hızlandırabileceği göstermiştir (95). Bizim çalışmamızda ise ulaşımı daha kolay ve daha az maliyetli olan, insan amniyon hücre kültür özelliği taşıyan Gibco™ AmnioMAX™ - II Complete Medium tedavisi kullanılmıştır.

Aydoğdu ve arkadaşları tarafından yapılan hayvan deney çalışmasında, testis I/R hasarına AmnioMAX tedavisinin etkisi araştırılmıştır. İskemik bırakılan testis dokusu detorsiyone edildikten sonra intraparankimal 0.5 cc AmnioMAX uygulanmıştır. Sonuç olarak AmnioMAX enjeksiyonunun oksidatif stresi baskıladığı ve antioksidan sistemi uyararak

morfolojik hasarı önlediği ispatlanmıştır (80). Mirapoğlu ve arkadaşlarının trakea yaralanması modelinde yara iyileşmesi üzerine trombositten zengin plazma ve amniyotik hücre kültürü ortamının etkilerini karşılaştırdığı hayvan deney çalışmasında, AmnioMAX'ın trakeal iyileşme üzerindeki etkisinin sıçan trakeal stenoz modelinde daha belirgin olduğu bulunmuştur (7).

I/R hasarı, özellikle böbrek gibi end organlarda meydana geldiği için hem klinik hem de deneysel çalışmalarda çeşitli bilimsel yöntemlerle değerlendirilebilmektedir. Bu değerlendirme, hasarın derecesini, mekanizmalarını ve potansiyel tedavi yaklaşımlarının etkinliğini anlamak için kritik bir öneme sahiptir. Bu hasar çoğu zaman biyokimyasal belirteçler, histopatolojik inceleme ve bazen de moleküler düzeydeki hasar parametreleri kullanılarak değerlendirilir (96). I/R hasarının değerlendirmesinde serum kreatinin ve BUN en sık kullanılan ve basit göstergelerdir. Literatürde selenyum, askorbik asit, magnezyum gibi birçok ajanın I/R hasarını takiben artan kreatinin ve BUN seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (97-99). Böbrek hasarı sonrasında serum kreatinin ve BUN seviyelerinde artış gözlenir. Bizim çalışmamızda serum üre ve BUN değerleri I/R grubunda kontrol grubuna göre artmış olarak sonuçlandı ve istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi ($p<0,01$). Tedavi ve profilaksi grubundaki ortalama serum üre değerlerinin ise I/R grubuna göre daha az olduğu görüldü ancak yalnızca tedavi grubu değerlerinin I/R grubu ile karşılaştırılması sonucunda anlamlı bir farklılık elde edildi ($p<0,05$). Bir başka böbrek fonksiyon değeri olan serum kreatinin seviyelerinin karşılaştırılmasında ise benzer sonuçlar elde edildi. Yine I/R grubundaki değerler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir yükselme ve tedavi grubu ile karşılaştırıldığında ise tedavi grubunda anlamlı bir düşüş tespit edildi (sırasıyla $p<0,01$, $p<0,05$). Böbrek fonksiyon değerleri açısından yapılan bu kıyaslamalar I/R hasarı modelimizin uygun şekilde tasarlandığını gösteriyor denilebilir. Bu sonuçlar, deneysel I/R modelinde böbrek fonksiyonlarında bozulma meydana geldiğini ve kullanılan ajanın bu bozulmayı kısmen geri çevirdiğini desteklemektedir.

Oksidatif stres, I/R hasarının temel mekanizmalarından biridir ve MDA gibi lipid peroksidasyon ürünleri ile SOD, CAT ve GSH gibi antioksidan enzimlerin/moleküllerin düzeyleri bu hasarın değerlendirilmesinde kritik rol oynar (100, 101). Çalışmamızda, I/R grubunun kontrol grubuna kıyasla doku MDA seviyelerinde belirgin bir artış görüldü ($p<0,01$). MDA, lipid peroksidasyonunun önemli bir göstergesi olup, bu artış I/R hasarı sonucunda dokuda serbest oksijen radikallerine bağlı anlamlı bir lipid peroksidasyon

hasarı olduğunu desteklemektedir. I/R grubundaki MDA seviyeleri de, I/R hasarı modelinin doğru tasarlandığını destekler niteliktedir. Tedavi ve profilaksi gruplarında ise MDA düzeyleri, I/R grubuna göre belirgin azalmıştır ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (sırasıyla $p>0,05$, $p>0,05$). Yine de uygulanan tedavinin lipid peroksidasyonunu azaltmada etkili olduğu klinik tespit olarak söylenebilir. Çalışmamızda, I/R grubundaki ortalama CAT değerlerinin tedavi ve kontrol grubundan belirgin derecede düşük olduğu, hatta tedavi grubundaki CAT seviyelerinin kontrol grubu ile arasında fark bulunmadığı istatistiksel olarak anlamlı bulundu (sırasıyla $p<0,05$, $p<0,05$, $p>0,05$). Bu bulgu, I/R hasarının oksidatif stresi artırarak antioksidan savunma sistemini zayıflattığını ve kullanılan ajanın bu dengeyi düzelttiğini kanıtlar niteliktedir. Tedavi grubundaki seviyelerin kontrol grubuyla benzer olması AmnioMAX'ın oksidatif stres üzerine etkinliğini göstermektedir. Literatürdeki birçok çalışmada da katalaz ile yapılan değerlendirmelerde kullanılan antioksidan moleküller benzer etkiye yol açmıştır (102). Endojen bir antioksidan olan GSH düzeyleri, I/R grubunda Sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0,01$). Bu durum, I/R hasarı sırasında organizmanın antioksidan savunma sisteminin tükendiğini göstermektedir. Ancak, tedavi ve profilaksi gruplarında GSH düzeyleri, I/R grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek tespit edildi ($p<0,05$). Dahası, tedavi grubunun GSH düzeyleri Sham grubuyla arasında anlamlı bir fark göstermedi ($p>0,05$), bu da uygulanan tedavinin GSH seviyelerini kontrol grubuna yakın seviyelere geri döndürmede başarılı olduğunu işaret etmektedir. Tedavi grubundaki GSH seviyelerinin profilaksi grubuyla karşılaştırıldığında daha yüksek olması anlamlı bulundu ($p<0,05$). Bu durum, I/R öncesi uygulanan AmnioMAX etken maddesinin, I/R sonrası uygulanmasından daha etkili olduğu sonucunu ortaya koymaktadır. SOD ve GPx gibi enzimatik antioksidanlar, reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonunda kritik rol oynarlar. Çalışmamızda, I/R grubundaki doku SOD ve GPx seviyeleri benzer şekilde, hem tedavi hem de kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu (sırasıyla $p<0,05$, $p<0,01$). Bu durum, I/R hasarı ile böbrekte belirgin bir oksidatif stres maruziyeti ve antioksidan savunma mekanizmalarında azalma olduğunu doğrulamaktadır. Tedavi ve profilaksi gruplarının böbrek dokusu SOD ve GPx düzeylerinin kontrol grubuyla arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p>0,05$). Bu sonuçlar, AmnioMAX etken maddesinin I/R hasarının neden olduğu antioksidan enzim aktivitesi düşüşünü engellemede etkili olduğunu göstermektedir. Genel olarak, I/R hasarı böbrek dokusunda oksidan/antioksidan dengeyi oksidanlar lehine bozarak oksidatif strese yol açmaktadır. Bu durum, TAS seviyelerinde

düşüşe ve TOS/OSİ seviyelerinde artışa yol açar. Resveratrol, amlodipin ve naringenin, gibi çeşitli ajanların kullanıldığı birçok çalışma göstermiştir ki bu maddeler, oksidatif hasarı azaltma ve antioksidan kapasiteyi artırma potansiyeline sahiptir (103-105). Sıçanlarda oluşturulan I/R hasarında uygulanan amnioMAX etken maddesi profilaksi ve tedavi grubu doku TAS seviyelerinde I/R grubuna göre anlamlı ve ciddi bir yükseklik bulundu ($p<0,01$). Bu durum çalışmada yapılan analizlerde, etken maddenin total antioksidan mekanizmaya oldukça fazla katkı sağladığı sonucunu ortaya koymaktadır. Gruplar arası yapılan istatistiksel analizlerde TOS ve OSI değerleri benzer saptanmıştır. TOS seviyeleri I/R grubunda anlamlı olarak daha yüksek bulundu ve tedavi grubuyla karşılaştırıldığında tedavi grubundaki değerlerin daha düşük olduğu istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,01$). Düşük konsantrasyonlardaki NO, vazodilatasyon yaparak, trombosit agregasyonunu baskılar ve lökositlerin hasarlı dokuya göçünü azaltır. Antioksidan etkiler göstererek iskemik hasarı hafifletebilir. Bizim çalışmamızda tüm gruplar göz önünde bulundurularak yapılan ortalama indüklenabilir nitrik oksit sentaz seviyeleri kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p>0,05$).

Renal I/R hasarının morfolojik olarak doğrulanması, böbrek dokularının histopatolojik incelemesi ile mümkündür. Bu hasar türü genellikle hemoraji, tübüler nekroz, vakuolizasyon, fırçamsı kenar kaybı, interstisyel ödem, interstisyel fibrozis ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu gibi spesifik histolojik bulgularla karakterizedir (106). Çalışmamızda, renal hasarın değerlendirilmesi için EGTI skorum sistemi kullanılmıştır. Bu yöntem ile her sıçandaki böbrek dokusu hasarı endotelyal, glomerüler, tübüler ve interstisyel açıdan incelenmiş, böbrek dokusundaki histopatolojik değişiklikler nicel skorlar halinde değerlendirilmiştir. Böylece objektif ve istatistiksel analizlere olanak sağlanmıştır. EGTI skorlamasına göre sağ ve sol böbreklerin doku skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Bu sonuç, oluşturulan iskemi/reperfüzyon modelinde her iki böbreğin de benzer düzeyde hasarlandığını göstermektedir.

Sağ ve sol böbreklerde kendi içindeki gruplar arasında değerlendirme yapıldığında I/R grubundaki sıçanlarda gözlenen histopatolojik hasarın kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,01$). Bu durum ayrıca deneysel I/R modelinin başarıyla uygulandığını doğrulamaktadır. Özellikle sitoplazmik vakuolizasyon, mononükleer hücre infiltrasyonu, hemoraji ve tübüler nekrozun belirgin olması, I/R

hasarının önemli morfolojik bulguları olarak öne çıkmıştır. Tedavi ve profilaksi gruplarında izlenen histopatolojik hasarların I/R grubuna kıyasla belirgin şekilde azaldığı gözlenmiştir. Ancak sol böbrekte bu fark istatistiksel olarak gösterilememiştir ($p>0,05$). Sağ böbrek dokusunda ise tedavi grubuyla I/R grubu arasındaki farkın istatistiksel olarak da anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0,01$). Bu bulgular, Gibco™ AmnioMAX™ - II Complete Medium tedavisinin renal dokuda hücre ve doku düzeyinde de koruyucu etkisini ortaya koymuştur. Özellikle inflamasyon parametreleri açısından tedavi grubunun kontrol grubuna yakın değerler göstermesi, Gibco™ AmnioMAX™ - II Complete Medium'un anti-inflamatuvar etkinliğine işaret etmektedir. Deneysel renal iskemi reperfüzyon (I/R) hasarı modelinde, I/R grubunda belirgin düzeyde artan nekrozun, tedavi ve profilaksi gruplarında anlamlı olarak azaldığı histopatolojik değerlendirmeler ile gösterilmiştir. Bu durum, kullanılan etken maddenin hücre ölümünü azaltıcı ya da engelleyici bir potansiyele sahip olduğunu düşündürmektedir. Profilaksi ve tedavi grupları arasında histopatolojik ve biyokimyasal bulgular yönünden belirgin fark olmamakla birlikte, tüm parametrelerin genel değerlendirmesinde tedavi grubunun, I/R grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha iyi sonuçlar sergilediği dikkat çekmektedir. Bu bulgulardan hareketle, Gibco™ AmnioMAX™ - II Complete Medium'un iskemi/reperfüzyon hasarı sonrasında uygulanmasının daha etkili bir strateji olduğu sonucuna varılabilir.

5.1. Çalışmanın Kısıtlılıkları

Bu çalışmada, kullanılan tek doz veya tek zamanlamalı tedavi yaklaşımları, farklı dozların ve uygulama zamanlarının daha kapsamlı araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Daha geniş hayvan gruplarıyla yapılacak deneysel çalışmalarda denek sayısı arttırıldığında bu nicel değerlerin bariz şekilde etken maddenin inflamatuvar sürece olan etkisini kanıtlayacağı, istatistiksel anlamlılığı ve tedavi farklarını daha net ortaya koyabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ

Bu çalışmada sıçanlarda oluşturulan deneysel renal iskemi-reperfüzyon modelinde Gibco™ AmnioMAX™ - II Complete Medium tedavisinin böbrek dokusu üzerine olan hasara etkileri araştırıldı ve önemli sonuçlar elde edildi. Deneysel modelde uygulanan I/R, böbreklerde hem biyokimyasal hem de histopatolojik olarak belirgin ve istatistiksel olarak anlamlı hasar oluşturdu. Bu veriler, çalışmada kurulan I/R modelinin başarılı bir şekilde uygulandığını kanıtlamıştır. Bu çalışmadan elde edilen bulgular, deneysel renal I/R modelinde Gibco™ AmnioMAX™ - II Complete Medium tedavisinin, böbrek dokusundaki oksidatif hasarı önemli ölçüde azalttığını ve antioksidan savunma mekanizmalarını güçlendirdiğini açıkça göstermiştir. Tedavi ve profilaksi gruplarında MDA düzeylerindeki düşüş ve GSH, SOD, GPx düzeylerindeki iyileşme, bu ajanın antioksidan kapasitesini artırma potansiyeline işaret etmektedir. TOS/OSI düzeylerinde ise I/R'nin neden olduğu artışın tedavi ile anlamlı ölçüde azaldığı görüldü. Katalaz seviyeleri, tedavi grubunda anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,01$). Bu sonuçlar, Gibco™ AmnioMAX™ - II Complete Medium'un I/R hasarı sonrası oluşan sitotoksik hasarın yönetiminde umut vadeden, antioksidan savunma sistemini destekleyici rol oynayan bir ajan olabileceğini düşündürmektedir. Etken maddenin uygulandığı gruplarda, I/R grubuna göre BUN,üre ve kreatinin değerlerinin düşük saptanması, böbrek fonksiyonların belirgin derecede korunduğunu göstermiştir. Gibco™ AmnioMAX™ - II Complete Medium tedavisi verilen gruplarda I/R hasarına bağlı gelişen inflamasyonun ve nekrozun belirgin derecede azaldığı gözlemlendi. Bu veriler ışığında etken maddenin renal I/R hasarına karşı hücresel düzeyde koruyucu ,anti-inflamatuvar ve nekrozu önleyici etkiler gösterdiği söylenebilir.

Bu çalışma, Gibco™ AmnioMAX™ - II Complete Medium'un renal I/R hasarındaki potansiyel koruyucu ve tedavi edici etkilerini araştırarak literatürdeki ilk çalışmadır. Elde edilen öncü bulgular, bu preparatın, parsiyel nefrektomi ve böbrek transplantasyonu gibi cerrahilerde veya sepsis gibi hayatı tehdit edici klinik durumlarda ortaya çıkan iskemik hasarın önlenmesi ve tedavisinde umut vaat edebileceğini göstermektedir.

Gelecekte yapılacak daha geniş kapsamlı çalışmalarda, Gibco™ AmnioMAX™ - II Complete Medium'un daha farklı dozlarda ve uygulama zamanlamalarında etkilerinin incelenmesi klinik uygulamaya yönelik potansiyelini netleştirebilir. Bunun yanı sıra uzun süreli reperfüzyon modellerinde etkileri ve renal fonksiyon testleri üzerindeki daha

kapsamlı değerlendirmeler, bu tedavinin etkinliğini daha net ortaya koyacaktır. Ayrıca, daha detaylı biyokimyasal analizlerin ve sonuçlarının sunulması, çalışmanın kapsamını ve yorumlama gücünü artıracaktır.



7. KAYNAKÇA

1. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. Surg Clin North Am. 1992;72(1):65-83.
2. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. J Pathol. 2000;190(3):255-66.
3. Sheridan AM, Bonventre JV. Pathophysiology of ischemic acute renal failure. Contrib Nephrol. 2001(132):7-21.
4. Doi K, Rabb H. Impact of acute kidney injury on distant organ function: recent findings and potential therapeutic targets. Kidney Int. 2016;89(3):555-64.
5. Sirotković-Skerlev M, Plestina S, Bilić I, Kovac Z. [Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury]. Lijec Vjesn. 2006;128(3-4):87-95.
6. Tajiri N, Acosta S, Portillo-Gonzales GS, Aguirre D, Reyes S, Lozano D, et al. Therapeutic outcomes of transplantation of amniotic fluid-derived stem cells in experimental ischemic stroke. Front Cell Neurosci. 2014;8:227.
7. Mirapoglu SL, Guler EM, Tok OE, Aydogdu I, Cay A, Camli MF, et al. Effects of Platelet Rich Plasma and Amniotic Cell Culture Medium on Wound Healing Following Experimental Animal Tracheal Injury Model: A Comparative Study. J Craniofac Surg. 2021;32(5):1937-41.
8. Ozgenel GY, Filiz G. Effects of human amniotic fluid on peripheral nerve scarring and regeneration in rats. J Neurosurg. 2003;98(2):371-7.
9. ÜLGER BV. Ürogenital sistem embriyolojisi. SAĞLIK & BİLİM 2023: GENEL EMBRİYOLOJİ-II. 2023:77.
10. Anderson JK, Kabalin J, Cadeddu J. Surgical anatomy of retroperitoneum. Campbell-Walsh urology 9th ed Philadelphia: Saunders. 2007:3-19.
11. Brooks JD. Anatomy of the lower urinary tract and male genitalia. Campbell-walsh urology. 2007.
12. AvAnoğlu A. İşeme organlarının embriyolojisi ve anatomisi. Çocuk Cerrahisi Dergisi. 2016;30:541-4.
13. Reidy KJ, Rosenblum ND. Cell and molecular biology of kidney development. Semin Nephrol. 2009;29(4):321-37.
14. YILDIZHAN E, ÜLGER BV. ÜROGENİTAL SİSTEM EMBRİYOLOJİSİ. SAĞLIK & BİLİM 2023 GENEL EMBRİYOLOJİ-II.77.
15. Arıncı K, Elhan A. Anatomi. 3. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi. 2001:334-6.
16. Klahr S, Pukerson ML. The pathophysiology of obstructive nephropathy: the role of vasoactive compounds in the hemodynamic and structural abnormalities of the obstructed kidney. Am J Kidney Dis. 1994;23(2):219-23.
17. Venkatakrishna SSB, Onyango LC, Serai SD, Viteri B. Kidney Anatomy and Physiology. In: Serai SD, Darge K, editors. Advanced Clinical MRI of the Kidney: Methods and Protocols. Cham: Springer International Publishing; 2023. p. 3-12.
18. Guyton A. Urine formation by the kidneys: I. Glomerular filtration, renal blood flow, and their control. Textbook of medical physiology. 1996.
19. Arıncı K, Elhan A. Anatomi. 2. cilt, 4. baskı. Ankara, Türkiye, Güneş Kitabevi. 2006:54-7.
20. McMahon RS, Penfold D, Bashir K. Anatomy, Abdomen and Pelvis: Kidney Collecting Ducts. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2025, StatPearls Publishing LLC.; 2025.

21. Yaman S, Göğüş O, Anafarta K. Ürogenital organların anatomik ve histolojik yapısı. Ankara: Güneş Kitapevi; 1990.
22. ScienceFacts.net) SFv. Nephron Diagram: ScienceFacts.net; 2025 [Available from: <https://www.sciencefacts.net/nephron-diagram.html>].
23. Karaaslan F, editor Analysis of Effect of Reduced Glomerular Capillary Filtration Coefficient on Glomerular Capillary Hydrostatic Pressure. 2022 Medical Technologies Congress (TIPTEKNO); 2022: IEEE.
24. Rohovyi I, Boiko OV, Filipova LO. [Functional and structural characteristics of the nephron segments]. Fiziol Zh (1994). 2003;49(6):94-100.
25. Klemens CA, Staruschenko A. American Journal of Physiology-Renal Physiology Collections: Hypertension. Am J Physiol Renal Physiol. 2020;319(6):F1001-f2.
26. Moinuddin Z, Dhanda R. Anatomy of the kidney and ureter. Anaesthesia & Intensive Care Medicine. 2015;16(6):247-52.
27. O'Sullivan ED, Hughes J, Ferenbach DA. Renal Aging: Causes and Consequences. J Am Soc Nephrol. 2017;28(2):407-20.
28. Wesson Jr LG. Physiology of the kidney. Physiologie und Pathologische Physiologie/Physiology and Pathological Physiology/Physiologie Normale et Pathologique: Springer; 1965. p. 1-386.
29. Chmielewski C. Renal physiology series: Part 1 of 8. Renal anatomy and overview of nephron function. Anna j. 1992;19(1):34-8.
30. Notohamiprodjo M, Reiser MF, Sourbron SP. Diffusion and perfusion of the kidney. European journal of radiology. 2010;76(3):337-47.
31. Feher J. Functional Anatomy of the Kidneys and Overview of Kidney Function. 2012. p. 626-32.
32. On the Diseases of the Kidney, Their Pathology, Diagnosis, and Treatment; with an Introductory Chapter on the Anatomy and Physiology of the Kidney. Br Foreign Med Chir Rev. 1852;10(20):380-401.
33. DİNÇEL N. Mesane Anatomisi ve Fizyolojisi. Türkiye Klinikleri Pediatric Nephrology-Special Topics. 2023;4(1):1-6.
34. Abelson B, Sun D, Que L, Nebel RA, Baker D, Popiel P, et al. Sex differences in lower urinary tract biology and physiology. Biol Sex Differ. 2018;9(1):45.
35. Ganong WF. Review of medical physiology. Review of medical physiology1975. p. 599-.
36. Anderson J, Kabalin JN, Cadeddu J. Surgical Anatomy of the Retroperitoneum, Adrenals, Kidneys, and Ureters. Campbell-Walsh Urology. 2007;3-37.
37. Tekin A, Bölge Ç, Hastanesi E, Kliniği Ç. İşeme fizyolojisi ve işemenin nöral kontrolü. Çocuk Cerrahisi Derg. 2016;30:545-9.
38. De Mello G, Maack T. Nephron function of the isolated perfused rat kidney. American Journal of Physiology-Legacy Content. 1976;231(6):1699-707.
39. Knepper M, Burg M. Organization of nephron function. American Journal of Physiology-Renal Physiology. 1983;244(6):F579-F89.
40. Tarım Ö. Endokrinoloji ve Nefroloji-Derleme. The Journal of Current Pediatrics.
41. Madsen KM, Tisher CC. Structural-functional relationships along the distal nephron. Am J Physiol. 1986;250(1 Pt 2):F1-15.
42. Yıldırım EB. ÜRİNER SİSTEM HİSTOLOJİSİ. SAĞLIK & BİLİM 2024: Histoloji ve Embriyoloji-I. 2024:101.
43. Scott RP, Quaggin SE. Review series: The cell biology of renal filtration. J Cell Biol. 2015;209(2):199-210.
44. Toth T, Bartfai J. The antihypertensive endocrine function of the kidney. Clin Sci. 1961;20:307-13.

45. Çiçek Z, Akıllıoğlu K, Dogan A. Lokal ve Sistemik Renin Anjiyotensin Sistemi. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi. 2019;28(4):259-69.
46. İşlek İ, Albayrak D. Eritropoietin. Journal of Experimental and Clinical Medicine. 2009;10(1-2).
47. Erbay E, Mersin S, İbrahimoglu Ö. D Vitamini ve vücut sistemleri üzerine etkisi. Sağlık Akademisyenleri Dergisi. 2019;6(3):201-6.
48. Roberts BN, Christini DJ. NHE inhibition does not improve Na(+) or Ca(2+) overload during reperfusion: using modeling to illuminate the mechanisms underlying a therapeutic failure. PLoS Comput Biol. 2011;7(10):e1002241.
49. Becker LB. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. Cardiovasc Res. 2004;61(3):461-70.
50. ÖZTÜRK EG. İskemi-Reperfüzyon Hasarı. Türkiye Klinikleri Cardiovascular Surgery-Special Topics. 2025;17(1):17-23.
51. Teke Z, Kabay B, Akın Ö. İskemi-reperfüzyon hasarının patofizyolojisi. Pamukkale Tıp Dergisi. 2008.
52. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. Pharmacol Rev. 2001;53(1):135-59.
53. Lieberthal W, Levine JS. Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. Am J Physiol. 1996;271(3 Pt 2):F477-88.
54. Gueler F, Park JK, Rong S, Kirsch T, Lindschau C, Zheng W, et al. Statins attenuate ischemia-reperfusion injury by inducing heme oxygenase-1 in infiltrating macrophages. Am J Pathol. 2007;170(4):1192-9.
55. Kapitsinou PP, Haase VH. Molecular mechanisms of ischemic preconditioning in the kidney. Am J Physiol Renal Physiol. 2015;309(10):F821-34.
56. Baud L, Ardaillou R. Reactive oxygen species: production and role in the kidney. Am J Physiol. 1986;251(5 Pt 2):F765-76.
57. 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(1):46-55.
58. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. Apmis. 2007;115(2):81-103.
59. Kehrer JP. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. Toxicology. 2000;149(1):43-50.
60. Karabulut H, Gülay MŞ. Serbest radikaller. Mehmet Akif Ersoy University Journal of Health Sciences Institute. 2016;4(1).
61. Slegtenhorst BR, Dor FJ, Rodriguez H, Voskuil FJ, Tullius SG. Ischemia/reperfusion Injury and its Consequences on Immunity and Inflammation. Curr Transplant Rep. 2014;1(3):147-54.
62. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. Br Med Bull. 2004;70:71-86.
63. Newman PJ, Newman DK. Signal transduction pathways mediated by PECAM-1: new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003;23(6):953-64.
64. Gorsuch WB, Chrysanthou E, Schwaeble WJ, Stahl GL. The complement system in ischemia-reperfusion injuries. Immunobiology. 2012;217(11):1026-33.
65. Banz Y, Rieben R. Role of complement and perspectives for intervention in ischemia-reperfusion damage. Ann Med. 2012;44(3):205-17.
66. Skattum L, van Deuren M, van der Poll T, Truedsson L. Complement deficiency states and associated infections. Mol Immunol. 2011;48(14):1643-55.

67. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med*. 1985;312(3):159-63.
68. Wang Y, Branicky R, Noë A, Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol*. 2018;217(6):1915-28.
69. Handy DE, Loscalzo J. The role of glutathione peroxidase-1 in health and disease. *Free Radic Biol Med*. 2022;188:146-61.
70. ÇEKMEN MB, TURGUT M, TÜRKÖZ Y, AYGÜN AD, GÖZÜKARA EM. Nitrik Oksit (NO) ve Nitrik Oksit Sentaz (NOS)'ın Fizyolojik ve Patolojik Özellikleri. *Türkiye Klinikleri Journal of Pediatrics*. 2001;10(4):226-35.
71. Liu Y, Hyde AS, Simpson MA, Barycki JJ. Emerging regulatory paradigms in glutathione metabolism. *Adv Cancer Res*. 2014;122:69-101.
72. McCord JM. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem*. 1993;26(5):351-7.
73. Jomova K, Raptova R, Alomar SY, Alwasel SH, Nepovimova E, Kuca K, Valko M. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. *Arch Toxicol*. 2023;97(10):2499-574.
74. Suakıtcı S, Güven BB, Tanoglu A, Özkan S. A combination of levosimendan and N-Acetylcysteine shows significant favorable efficacy on experimental liver ischemia/reperfusion injury. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*. 2021;27(4):381-8.
75. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem*. 2004;37(4):277-85.
76. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*. 2005;38(12):1103-11.
77. Martin MM, Chan M, Antoine C, Bar-El L, Bornstein E, Young BK. Clinical potential of human amniotic fluid stem cells. *J Perinat Med*. 2023;51(1):117-24.
78. Streubel B, Martucci-Ivessa G, Fleck T, Bittner RE. [In vitro transformation of amniotic cells to muscle cells--background and outlook]. *Wien Med Wochenschr*. 1996;146(9-10):216-7.
79. Miceli V, Bertani A, Chinnici CM, Bulati M, Pampalone M, Amico G, et al. Conditioned Medium from Human Amnion-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells Attenuating the Effects of Cold Ischemia-Reperfusion Injury in an In Vitro Model Using Human Alveolar Epithelial Cells. *Int J Mol Sci*. 2021;22(2).
80. Aydogdu I, Karaca E, Coban G, Cay A, Guler EM, Kocyigit A, et al. An investigation of the effects of amniotic fluid on experimental ischemia/reperfusion damage in rat testes. *J Pediatr Urol*. 2021;17(6):761.e1-.e6.
81. Yumru M, Savas HA, Kalenderoglu A, Bulut M, Celik H, Erel O. Oxidative imbalance in bipolar disorder subtypes: a comparative study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009;33(6):1070-4.
82. Kosecik M, Erel O, Sevinc E, Selek S. Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking. *Int J Cardiol*. 2005;100(1):61-4.
83. Harma M, Harma M, Erel O. Increased oxidative stress in patients with hydatidiform mole. *Swiss Med Wkly*. 2003;133(41-42):563-6.
84. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*. 1967;70(1):158-69.
85. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. 1959;82(1):70-7.
86. Khalid U, Pino-Chavez G, Nesargikar P, Jenkins R, Bowen T, Fraser D, Chávez R. Kidney ischaemia reperfusion injury in the rat: The EGTI scoring system as a valid

and reliable tool for histological assessment. *Journal of Histology and Histopathology*. 2016;3:1.

87. Fu Y, Tang C, Cai J, Chen G, Zhang D, Dong Z. Rodent models of AKI-CKD transition. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2018;315(4):F1098-f106.
88. Meyer F, Silva DS, Bombonato GM, Lizana JN, Dziedricki LF, Krieger ML. Histological analysis and the blood flux in kidneys submitted to different periods of ischemia/reperfusion. *Acta Cir Bras*. 2011;26(6):451-5.
89. Dobashi K, Ghosh B, Orak JK, Singh I, Singh AK. Kidney ischemia-reperfusion: modulation of antioxidant defenses. *Mol Cell Biochem*. 2000;205(1-2):1-11.
90. Park SK, Hyun SH, In G, Park CK, Kwak YS, Jang YJ, et al. The antioxidant activities of Korean Red Ginseng (*Panax ginseng*) and ginsenosides: A systemic review through in vivo and clinical trials. *J Ginseng Res*. 2021;45(1):41-7.
91. Lee BM, Lee SK, Kim HS. Inhibition of oxidative DNA damage, 8-OHdG, and carbonyl contents in smokers treated with antioxidants (vitamin E, vitamin C, beta-carotene and red ginseng). *Cancer Lett*. 1998;132(1-2):219-27.
92. Lim SW, Kim KW, Kim BM, Shin YJ, Luo K, Quan Y, et al. Alleviation of renal ischemia/reperfusion injury by exosomes from induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells. *Korean J Intern Med*. 2022;37(2):411-24.
93. Ren Y, Chen Y, Zheng X, Wang H, Kang X, Tang J, et al. Human amniotic epithelial cells ameliorate kidney damage in ischemia-reperfusion mouse model of acute kidney injury. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):410.
94. Qiu X, Xu H, Tan Y, Li J, Wang Z, Lian Z, et al. Human amniotic epithelial cells alleviate ischemia-reperfusion injury of steatotic livers through mediating PAK1/AMPK-dependent autophagy. *Genes Dis*. 2025;12(2):101343.
95. Karaçal N, Koşucu P, Cobanglu U, Kutlu N. Effect of human amniotic fluid on bone healing. *J Surg Res*. 2005;129(2):283-7.
96. Pryor WA, Stanley JP. Letter: A suggested mechanism for the production of malonaldehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. *J Org Chem*. 1975;40(24):3615-7.
97. Wang S, Chen Y, Han S, Liu Y, Gao J, Huang Y, et al. Selenium nanoparticles alleviate ischemia reperfusion injury-induced acute kidney injury by modulating GPx-1/NLRP3/Caspase-1 pathway. *Theranostics*. 2022;12(8):3882-95.
98. Zografos CG, Chrysikos D, Pittaras T, Karampelias V, Chairakakis A, Galanos A, et al. The Effects of Ascorbic Acid and U-74389G on Renal Ischemia-Reperfusion Injury in a Rat Model. *In Vivo*. 2020;34(5):2475-84.
99. Akan M, Ozbilgin S, Boztas N, Celik A, Ozkardesler S, Ergur BU, et al. Effect of magnesium sulfate on renal ischemia-reperfusion injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(8):1642-55.
100. Mohamed Abd E, Lasheen NN. Comparative study on the protective role of vitamin C and L-arginine in experimental renal ischemia reperfusion in adult rats. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2014;6(3):153-65.
101. Aboutaleb N, Jamali H, Abolhasani M, Pazoki Toroudi H. Lavender oil (*Lavandula angustifolia*) attenuates renal ischemia/reperfusion injury in rats through suppression of inflammation, oxidative stress and apoptosis. *Biomed Pharmacother*. 2019;110:9-19.
102. Peng P, Zou J, Zhong B, Zhang G, Zou X, Xie T. Protective Effects and Mechanisms of Flavonoids in Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *Pharmacology*. 2023;108(1):27-36.

103. Zhang B, Wan S, Liu H, Qiu Q, Chen H, Chen Z, et al. Naringenin Alleviates Renal Ischemia Reperfusion Injury by Suppressing ER Stress-Induced Pyroptosis and Apoptosis through Activating Nrf2/HO-1 Signaling Pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:5992436.
104. Shirzad H, Mousavinezhad SA, Panji M, Ala M. Amlodipine alleviates renal ischemia/reperfusion injury in rats through Nrf2/Sestrin2/PGC-1 α /TFAM Pathway. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2023;24(1):82.
105. Alaasam ER, Janabi AM, Al-Buthabhak KM, Almudhafar RH, Hadi NR, Alexiou A, et al. Nephroprotective role of resveratrol in renal ischemia-reperfusion injury: a preclinical study in Sprague-Dawley rats. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2024;25(1):82.
106. Li X, Ma N, Xu J, Zhang Y, Yang P, Su X, et al. Targeting Ferroptosis: Pathological Mechanism and Treatment of Ischemia-Reperfusion Injury. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021:1587922.

