

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

**SIÇANLARDA OLUŞTURULAN RENAL İSKEMİ
REPERFÜZYON MODELİNDE ASKORBİK ASİT VE
MAGNEZYUMUN KARACİĞERDEKİ UZAK ORGAN
HASARINA ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

DR. MÜCAHİT ÖZDEMİR

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2020

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

**SIÇANLARDA OLUŞTURULAN RENAL İSKEMİ
REPERFÜZYON MODELİNDE ASKORBİK ASİT VE
MAGNEZYUMUN KARACİĞERDEKİ UZAK ORGAN
HASARINA ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. MÜCAHİT ÖZDEMİR

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Şule ÖZBİLGİN

TESEKKÜR

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

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

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

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

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

Uzmanlık eğitimim boyunca beraber çalıştığımız tüm asistan arkadaşlarıma,

Bugünlere gelmemde büyük emekleri bulunan, her zaman yanımda olan, desteklerini ve sevgilerini hep hissettiren aileme, Sevgi ve saygılarımla sonsuz teşekkür ederim.

MÜCAHİT ÖZDEMİR

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TABLO LİSTESİ.....	III
ŞEKİL LİSTESİ	IV
GRAFİK LİSTESİ	V
RESİM LİSTESİ	VI
KISALTMALAR	VII
ÖZET.....	1
SUMMARY.....	2
1.GİRİŞ VE AMAÇ	3
2.GENEL BİLGİLER	6
2.1.İskemi	6
2.2.Reperfüzyon	7
2.3.Böbrek İskemi Reperfüzyon ve Uzak Organ Hasarı	9
2.4.Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanlar.....	11
2.5.İskemik Önkoşullama.....	13
2.6.Farmakolojik Koşullama	14
2.7.Askorbik Asit.....	15
2.8.Magnezyum	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1.Anestezi Uygulaması.....	18
3.2.Deney Grupları ve Protokol	18
3.3.Deneysel Çalışma Modeli	20
3.4.Biyokimyasal İncelemeler.....	21
3.5.Karaciğer Dokusunun Histolojik Değerlendirilmesi.....	22
3.6.Dışlama.....	22
3.7.İstatistiksel Değerlendirme.....	22
4. BULGULAR	23
4.1.Biyokimyasal Bulgular.....	23
4.2.Histomorfolojik Bulgular	28

5. TARTIřMA.....	35
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	39
7. KAYNAKLAR.....	40
EK: Etik Kurul Onayı	



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1. Antioksidanların Sınıflaması.	13
Tablo 2: Biyokimyasal Bulgular.....	23
Tablo 3: TUNEL Sayım Sonuçları	33



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1. İskemi sonucunda hücrelerde gerçekleşen metabolik değişiklikler.....	7
Şekil 2. İskemide pürin metabolizması ve reperfüzyonda oksijen radikali oluşumu.....	8
Şekil 3. İskemi Reperfüzyonda bölgeye göç eden nötrofillerdeki solunumsal patlama	9
Şekil 4. Serbest oksijen radikallerinin hücredeki etkileri	12
Şekil 5. Askorbik Asit ve Dehidro Askorbik Asit	15
Şekil 6. Deney modelinin şematik görünümü	19



GRAFİK LİSTESİ

Sayfa No

Grafik 1. Sıçanlardan alınan kan örneklerinde ölçülen ALT düzeyleri	24
Grafik 2. Sıçanlardan alınan kan örneklerinde ölçülen AST düzeyleri.....	24
Grafik 3. Sıçanlardan alınan kan örneklerinde ölçülen Albumin düzeyleri	25
Grafik 4. Sıçanlardan alınan kan örneklerinde ölçülen Billurbin düzeyleri.....	25
Grafik 5. Sıçanlardan alınan karaciğer dokularında ölçülen MDA düzeyleri.....	25
Grafik 6. Sıçanlardan alınan karaciğer dokularında ölçülen GSH düzeyleri	26
Grafik 7. Sıçanlardan alınan böbrek dokularında ölçülen Kaspaz-3 düzeyleri.....	26
Grafik 8. Sıçanlardan alınan böbrek dokularında ölçülen SOD düzeyleri.....	26
Grafik 9. TUNEL boyamaya göre apoptotik hücre sayıları	33

RESİM LİSTESİ

Sayfa No

Resim 1. Anestezi altında laparotomi uygulanması.....	20
Resim 2. Renal pediküllerin açığa çıkarılması ve pediküllerin klemplenmesi.....	21
Resim 3. Sham grubuna ait kesit	29
Resim 4. İskemi reperfüzyon grubuna ait kesit	29
Resim 5. Askorbik Asit grubuna ait kesit	30
Resim 6. Magnezyum grubuna ait kesit.....	30
Resim 7. Askorbik Asit + Magnezyum grubuna ait kesit.....	31
Resim 8. PAS boyaması yapılan grupların kesitleri.....	32
Resim 9. TUNEL incelemesi yapılan grupların kesitleri.....	34

KISALTMALAR

İR: İskemi-Reperfüzyon

İÖK: İskemik Ön Koşullama

UİÖK: Uzak İskemik Önkoşullama

O₂: Oksijen

Na⁺: Sodyum

K⁺: Potasyum

ATP: Adenozin Trifosfat

H₂CO₃: Karbonik Asit

Ca⁺²: Kalsiyum

AMP: Adenozin Monofosfat

KDH: Ksantin Dehidrogenaz

KO: Ksantin Oksidaz

NAD: Nikotinamid Adenin Dinüklotid

NADP: Nikotinamid Adenin Dinüklotid Fosfat

SOR: Serbest Oksijen Radikalleri

ALT: Alanin aminotransferaz

AST: Aspartat Aminotransferaz

ADP: Adenozin Difosfat

C: Kompleman

TNF: Tümör Nekroz Faktör

IL: İnterlökin

cGMP: Siklik Guanozin Monofosfat

NO: Nitrik Oksit

NOS: Nikrik Oksit Sentaz

cAMP: Siklik Adenozin Monofosfat

İp: İntraperitoneal

MDA: Malonil Dialdehid

GSH: Glutasyon

SOD:Süperoksit Dismutaz

NMDA: N-Metil D-Aspartat

H&E: Hematoksilen&Eozin

PAS: Periyodik Asit Schiff

TUNEL: Terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP nick end labeling

ÖZET

Sıçanlarda Oluşturulan Renal İskemi Reperfüzyon Modelinde Askorbik Asit Ve Magnezyumun Karaciğerdeki Uzak Organ Hasarına Etkilerinin Karşılaştırılması

Dr.Mücahit ÖZDEMİR, DEÜTF Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD, İZMİR

Amaç: Renal İ/R, böbreklerde oluşturduğu hasarın yanı sıra yaşamsal önem taşıyan kalp, akciğer, beyin ve karaciğer gibi uzak organların disfonksiyonuna da neden olabilir. Bu çalışmanın amacı; sıçanlarda oluşturulan renal iskemi reperfüzyon hasarı modelinde, Renal İ/R'nun indüklediği karaciğerdeki uzak organ hasarına magnezyum ve askorbik asitin etkilerinin araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada ağırlıkları 250-300 g arasında değişen 35 adet Wistar albino cinsi erkek sıçan 5 gruba ayrıldı. Sham Grubu (n=7)'na laparotomi, diğer gruplara 45 dak iskemi ve 240 dak reperfüzyon uygulandı. İR Grubu (n=7)'na ilaç uygulanmadı. Askorbik Asit Grubu(n=7)'na iskemiden 1 saat önce 250 mg/kg askorbik asit, Magnezyum Grubu (n=7)'na iskemiden 1 saat önce 200 mg/kg magnezyum sülfat, Askorbik Asit + Magnezyum Grubu (n=7)'na iskemiden 1 saat önce askorbik asit ve magnezyum sülfat intraperitoneal olarak uygulandı. Karaciğer dokularında MDA, GSH, Kaspaz-3 ve SOD konsantrasyonları belirlendi, kan örneklerinde serum ALT, AST, albumin ve bilirubin düzeyleri ölçüldü. Histolojik incelemeler için H&E ve PAS boyamaları, apoptotik hücre incelemeleri için TUNEL immünohistokimyasal boyaması yapıldı. $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular: ALT değeri Askorbik Asit ($p:0,002$) ve Magnezyum ($p:0,017$) grubunda İR grubuna kıyasla anlamlı düşük bulundu. AST değeri Askorbik Asit ($p:0,004$), Magnezyum ($p:0,011$) grubunda İR grubuna kıyasla anlamlı düşük bulundu. MDA ,Askorbik Asit ($p:0,004$) grubunda İR grubuna kıyasla anlamlı düşük bulundu. GSH, Magnezyum ($p<0,001$) ve Askorbik asit+Magnezyum ($p<0,001$) grubunda İR grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek bulundu. Kaspaz-3,Askorbik Asit grubunda Grup İR'e kıyasla anlamlı düşük bulundu ($p:0,017$). H&E ve PAS boyamaları sonucunda ilaç uygulanan gruplarda daha az hasar tespit edildi. Askorbik Asit + Magnezyum grubunun TUNEL sayımları İR grubu sayımlarından anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0,001$).

Sonuç: Elde edilen veriler doğrultusunda sıçanlarda oluşturulan renal İ/R modelinde iskemi öncesi 250 mg/kg askorbik asit ve 200 mg/kg magnezyumun uygulanmasının karaciğerde oluşan uzak organ hasarını azalttığı saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Karaciğer, İskemi Reperfüzyon, Uzak Organ Hasarı, Askorbik Asit, Magnezyum

SUMMARY

Comparison of the Effects of Ascorbic Acid and Magnesium on Liver as a Remote Organ Damage in Renal Ischemia Reperfusion Model in Rats

Dr.Mücahit ÖZDEMİR, Dokuz Eylül University, School of Medicine, Dept. of Anaesthesiology,
IZMİR

Background: Renal ischemia-reperfusion (I/R) may cause dysfunction of distant organs such as the heart, lung, brain, and liver, as well as damage to the kidneys. The aim of this study is to investigate the effects of magnesium and ascorbic acid on liver as a remote organ damage induced by renal ischemia-reperfusion.

Materials and Methods: In this study include 35 Wistar albino male rats ranging in weight from 250-300 g were divided into 5 groups. The Sham Group (n=7) was a laparotomy, 45 min ischemia and 240 min reperfusions were applied to other groups. No drugs were applied to the IR Group (n=7). 250 mg/kg ascorbic acid 1 hour before ischemia in the Ascorbic Acid Group (n=7), Magnesium Group (n=7) was administered to 200 mg/kg magnesium sulfate 1 hour before ischemia, ascorbic acid and magnesium sulfate intraperitoneal in the same doses 1 hour before ischemia (n=7). MDA, GSH, Caspaz-3, and SOD levels were determined in the liver tissues received, serum ALT, AST, Albumin, and Billurbin levels were measured in blood samples. H&E and PAS paintings for histological examinations, TUNEL immunohistochemical staining for apoptotic cell examinations. $p<0.05$ value was considered statistically significant.

Results: ALT values were found to be significantly lower in Ascorbic Acid (p: 0.002) and Magnesium (p: 0.017) groups compared to the IR group. AST value was found to be significantly lower in Ascorbic Acid (p: 0.004), Magnesium (p: 0.011) group compared to the IR group. MDA was significantly lower in Ascorbic Acid (p: 0.004) group compared to the IR group. GSH was found to be significantly higher in the Magnesium (p<0.001) and Ascorbic acid + Magnesium (p<0.001) group compared to the IR group . Caspase-3 was significantly lower in the Ascorbic Acid group compared to Group IR (p: 0.017). As a result of H&E and PAS staining, less damage was detected in the drug-treated groups. TUNEL counts of the Ascorbic Acid + Magnesium group were found to be significantly lower than the IR group counts (p <0.001).

Conclusions: According to the data obtained, it was determined that the administration of 250 mg/kg ascorbic acid and 200 mg/kg magnesium before ischemia in the renal I/R model created in rats reduced the distant organ damage in the liver.

Keywords: Liver, Ischaemia Reperfusion Injury, Remote Organ Injury, Ascorbic Acid, Magnesium

1.GİRİŞ ve AMAC

İskemi/reperfüzyon (İ/R), bir organa kan akımının kısıtlanması ve ardından geri kazanılması olarak tanımlanır. Reperfüzyon aşamasında dokuların oksijenlenmesiyle ortaya çıkan toksik metabolik ürünler organa ve organizmaya iskemiden daha çok zarar verebilir ki bu da İ/R hasarı olarak tanımlanır. İskemi/reperfüzyon hasarının en sık ortaya çıktığı organlardan biri de böbreklerdir. Renal İ/R, böbreklerde oluşturduğu hasarın yanı sıra yaşamsal önem taşıyan kalp, akciğer, beyin ve karaciğer gibi uzak organların disfonksiyonuna da neden olabilir.¹ Uzak organ hasarının akut böbrek hasarına bağlı olarak mortalite oranlarının artmasından sorumlu olduğu bildirilmiştir.² Akut böbrek hasarında renal replasman tedavisinin bir parçası olarak kullanılan hemodiyalizin Yoğun Bakım Ünitesinde kritik hastaların mortalite oranlarını azaltamadığı saptanmış ve bu nedenle, böbrek İ/R da uzak organ hasarını azaltmak için yeni hedefler ve tedavi stratejileri gerektiği belirtilmiştir.³

Yeni tedavi stratejileri geliştirmek için renal İ/R'un ve sonrasında uzak organlarda ortaya çıkan hasarın fizyopatolojik özelliklerinin iyi bilinmesi gerekir. İskemi sırasında hasarlı doku aşırı miktarda serbest oksijen radikali (SOR) üretir; mitokondriyal oksidatif fosforilasyon, ATP tükenmesi, hücre içi kalsiyum ve membran fosfolipid proteazlarının aktivasyonunu değiştirerek oksidatif strese neden olur.^{4,5} Serbest radikallerin oluşumu, membran lipitlerinin peroksidasyonu ve proteinlerin ve DNA'nın oksidatif hasarları yoluyla böbrek dokusunda hasara neden olur, apoptoz ve hücre ölümüne katkıda bulunur.⁶ Ayrıca, katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzim sisteminin inaktifleşmesi, İ/R hasarının fizyopatolojisinden sorumlu olabilir.⁷ Mitokondri, hücre içi SOR'nin ana kaynağıdır ve ayrıca SOR için birincil hedeftir. Postiskemik hücrede mitokondri, büyük miktarda kalsiyum ve oksijen radikallerine maruz kalır. Bu faktörler reperfüzyon fazı sırasında mitokondrinin ilerleyici fonksiyonel bozulmasına katkıda bulunur.⁸

Karaciğer, renal İ/R'da en fazla etkilenen uzak organlardan biridir. Renal İ/R sırasında artan SOR ve TNF alfa, IL-6 gibi pro inflamatuvar sitokinlerin karaciğerde nötrofil infiltrasyonuna ve hepatositlerin apoptozuna neden olduğu saptanmıştır. Renal İ/R sırasında, kan aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) gibi karaciğer fonksiyonunu yansıtan enzimlerinin yükseldiği de görülmüştür.⁹

Serbest radikal hasarına karşı hücresel savunma, enzimatik (katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz) ve nonenzimatik (alfa tokoferol, askorbik asit, karoten, urate, vb.) antioksidan sistemleri ile sağlanır.¹⁰ Deneysel olarak, yeni antioksidanlar, antioksidan

enzimlerin mimetikleri, flavonoidler, nitrik oksit sentaz inhibitörleri, eritropoietin, peroksizom proliferatör ile aktiveleştirilen reseptör agonistleri, eritropoietin, statinler, adenosin ve kalsiyum kanal blokerleri gibi çeşitli ajanlar, İ/R'da böbreklerin zarar görmesini önlemek için kullanılmıştır.¹¹ Bazı deneysel çalışmalarda, askorbik asit de dahil olmak üzere antioksidan vitaminlerin, SOR'ni azaltarak sitoprotektif etkiler yarattığı gösterilmiştir.^{12,13} Askorbik asitin ayrıca böbrekte lökosit aktivasyonunu, trombosit agregasyonunu ve mikrovasküler endotele lökosit yapışmasını önlediği belirlenmiştir.¹⁴

Yüksek doz askorbik asitin nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP)-oksidaz ve indüklenabilir nitrik oksit sentaz (NOS) aktivasyonunu inhibe ederek oksidatif hasara bağlı mikrodolaşım bozukluğunu azalttığı veya onardığı; böylece İ/R hasarının etkilerini hafiflettiği preklinik çalışmalarda gösterilmiştir.^{15,16} Askorbik asitin inflamatuvar hücreler ve endotelial hücreler arasındaki oksidatif kaynaklı etkileşime müdahale edebileceği çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür. P-selektin sulu faz oksijen radikallerinden etkilenebilirken, askorbik asitin bu radikalleri nötralize ederek bu kritik adhezyon molekülünün upregülasyonunu azaltabildiği öne sürülmüştür.¹⁷ Aynı zamanda, suda çözünebilen antioksidanın, lipoprotein lipitleri etkilemeden önce sulu faz oksijen radikallerini kestiği ve böylece lipid peroksidasyonunun başlatılmasını da önleyebildiği belirtilmiştir.¹⁷

Magnezyum hem intrasellüler hem de ekstrasellüler alanlarda büyük miktarlarda bulunan bir elektrolittir. Aynı zamanda protein sentezi, kas ve sinir iletimi, nöromusküler sinyal iletimi, kan şekeri kontrolü ve kan basıncı regülasyonu da dahil olmak üzere vücutta biyokimyasal reaksiyonları düzenleyen 300'den fazla enzim sisteminde yer alan bir kofaktördür. İyon kanal düzenleyicisidir, hücrel iyon dengesinin korunmasına katkıda bulunur. Hücre zarları boyunca kalsiyum ve potasyum iyonlarının aktif taşınmasında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir.¹⁸

L tipi kalsiyum kanallarının uyarılmasıyla ortaya çıkan hücre içi kalsiyum artışının inflamatuvar yanıtı arttırdığı; mitokondriyal fonksiyonlarda bozulma, hücrede nekroz ya da apoptoza yol açtığı saptanmıştır.¹⁹ L tipi kalsiyum kanal blokeri olan magnezyum ile oluşturulan L tipi kalsiyum kanal blokajının I/R hasarından korumada etkili olabileceği belirlenmiştir.¹⁹ Magnezyum ayrıca iyi bilinen bir NMDA reseptör antagonistidir.²⁰ Lipid peroksidasyonunu direkt inhibe ederek endotelial ve nöronal reperfüzyon hasarını azalttığı gösterilmiştir.²¹

Askorbik asit (250 mg kg^{-1}) uygulamasının, sıçan karaciğerindeki I/R hasarını azaltmada etkili olduğu daha önceki çalışmada kanıtlanmıştır.²² Ancak askorbik asidin renal I/R hasarının uzak organ etkisini değerlendiren herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır. Magnezyumun böbrek I/R hasarı üzerindeki koruyucu etkisi konusunda ise sınırlı deneysel çalışma vardır. Ancak uzak organ hasarı üzerine etkisiyle ilgili herhangi bir veriye rastlanmamıştır.

Renal I/R hasarının karaciğer üzerine olan olumsuz etkilerini önlemek için FTY720 isimli sfingolipid immün modölatörü, PPAR gama agonisti pioglitazon ve N.vagus uyarısı ile çeşitli çalışmalar yapılmıştır.^{9,23,24} Çeşitli ajanlarla karaciğerdeki uzak organ hasarını azaltmayı hedefleyen tedavi yöntemleri geliştirilmiştir. Ancak yaptığımız literatür araştırmasında askorbik asit ve magnezyumun renal I/R'da karaciğerdeki uzak organ hasarı üzerine etkisiyle ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

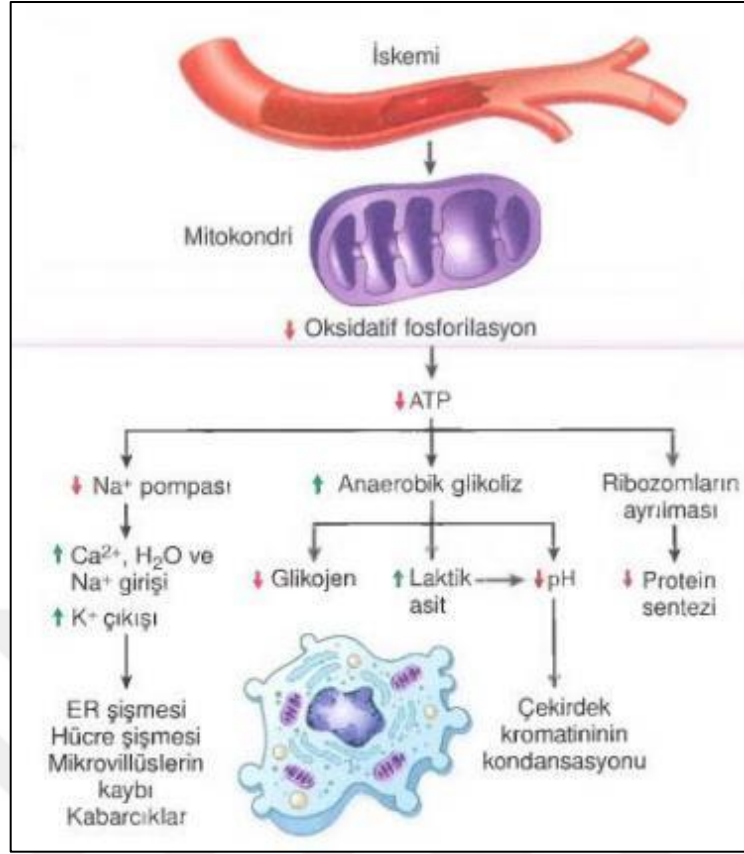
Bu çalışmanın amacı; sıçanlarda oluşturulan renal I/R hasarı modelinde iskemi öncesi uygulanan askorbik asit ve magnezyum sülfatın ayrı ayrı ve birlikte uygulanmasının karaciğerdeki uzak organ hasarı üzerine etkilerinin araştırılmasıdır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 İskemi

İskemi, organ kan akımında azalma sonucunda oksijen ve besin maddelerinin dokulara yeterli düzeyde ulaşamaması ve oluşan atık ürünlerin dolaşımdan uzaklaştırılamaması olarak tanımlanır. Bu olay geri dönüşümlü veya dönüşümsüz hücre hasarına yol açar. İskeminin neden olduğu patolojik süreçler sık karşılaşılan ve yaşamı tehdit eden durumlardır.²⁵ İskemi sonrası kan akımının tekrar başlaması (reperfüzyon) iskeminin dokuda oluşturduğu hasardan daha fazla hasar oluşturur.²⁶

İskemik periyod süresince dokuda toksik etkisi olan SOR üretilir. Reperfüzyon sırasında SOR endotel hasarı, mikrovasküler permeabilitede artış ve dokuda ödeme neden olmaktadır.^{26,27} Adezyon molekülleri ve sitokinlerin aktive olması da sistemik inflamatuvar yanıt sendromunu(SIYS) başlatabilir. Bu yanıtlar İ/R hasarı olarak tanımlanır.²⁷ İskemi sırasında hücre membranında bulunan sodyum-potasyum pompasının çalışması için gerekli olan enerji sağlanamaz. Bunun sonucunda potasyum (K^+) iyonları hücre dışına çıkarken sodyum (Na^+) ve klorür (Cl^-) iyonları da hücre içine girerler. Adenozin trifosfat (ATP) ihtiyacı anaerobik glikolizle karşılanmaya çalışılır, bu da laktik asit üretimi ile sonuçlanır. Biriken karbondioksit H_2CO_3 oluşumuna neden olur, böylece asidoz artar. Adenozin trifosfat bağımlı çalışan diğer bir pompa ise ekstrasellüler ve intrasellüler kalsiyum (Ca^{+2}) pompasıdır. İntrasellüler Ca^{+2} artışı ile proteolitik enzimler ve fosfolipazlar aktive olur. Fosfolipaz A_2 aktivasyonu ile membran fosfolipidleri bozulmaya başlar, plazma ve mitokondriyal membran geçirgenlikleri değişir.¹⁰ Fosfolipaz aktivasyonu araşidonik asit yapımı ile sonuçlanır. Araşidonik asit direkt etkiyle mitokondriyal enzimleri inhibe eder ve serbest radikal oluşumunu artırır.²⁸ (Şekil 1)



Şekil 1: İskemi sonucunda hücrelerde gerçekleşen metabolik değişiklikler

2.2 Reperfüzyon

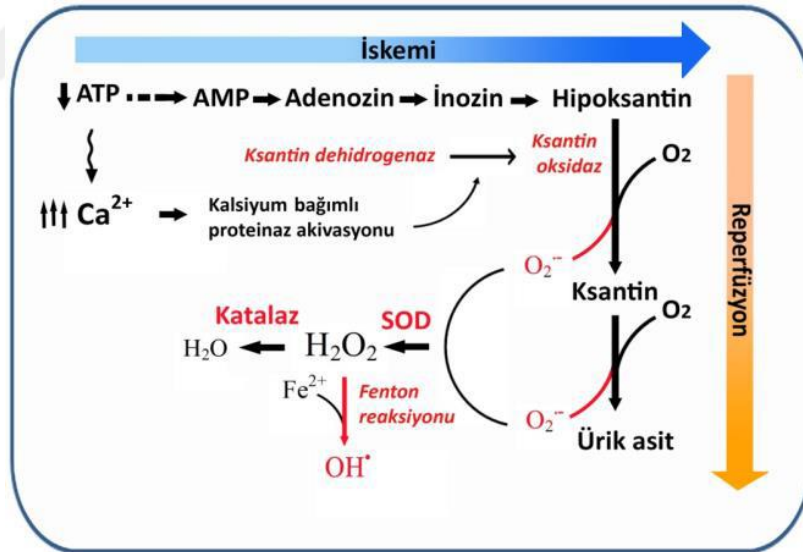
İskemik dokudaki kan dolaşımının yeniden sağlanmasına reperfüzyon denir ve ilaçlarla veya mekanik müdahalelerle olabilir. İskemi sonrası kan akımının tekrar başlaması iskeminin oluşturduğu hasarı artırır ve iskemik dokularda iskeminin oluşturduğu hasardan daha fazlasına yol açabilir.^{26,29} İskemi ve reperfüzyon periyotlarından oluşan bu zararlı etkilerin tümü İ/R hasarı olarak adlandırılır.³⁰

İskemi reperfüzyon hasarı klinik olarak sıklıkla transplantasyon, iskemik serebrovasküler olay (stroke), miyokard enfarktüsü, şok, resüsitasyon ve turnike uygulamaları sonrasında görülmektedir.³¹ İskemi reperfüzyon hasarının başlıca nedenleri arasında serbest oksijen radikalleri, polimorf nüveli lökositler, kompleman sistemi, endotel hücreleri yer almaktadır.³²

Reperfüzyon ile dokuya tekrar ulaşan oksijen nedeniyle toksik SOR oluşur, hücre membranında lipid peroksidasyonu meydana gelir, direkt hücre hasarına yol açar ve arasıdonik asit üretimiyle prostoglandin oluşumunu artırarak lökositleri aktive eder.³³ Süperoksit

radikalleri ile aktive olan lökositler vasküler endotel ile etkileşime girer. Lökosit yüzeyindeki P-selektin glikoprotein I ile endotelial P-selektin etkileşimi lökosit göçündeki ilk adımı oluşturur. Dokuya gelen aktive lökositler toksik oksijen radikalleri, proteaz, elastaz, kollajenaz, laktoferrin ve katyonik proteinleri açığa çıkarırlar. Bu da mikrovasküler geçirgenlik artışı, ödem, tromboz ve parankimal hücre ölümü ile sonuçlanır.^{34,35}

İskemi sonucunda hücre içindeki yüksek enerjili adenin bileşikleri olan ATP ve ADP, AMP'ye indirgenir ve hücre içi AMP düzeyleri yükselir. Artmış AMP'den adenzin ayrılarak sırayla inozin ve hipoksantine dönüştürülür. ATP azalması membranların iyon gradiyentini koruyamamasına ve hücre içine Ca^{2+} girişine yol açar.³⁶ Hücre içine giren Ca^{2+} , proteazları aktifleyerek ksantin dehidrogenazdan ksantin oksidaz oluşumuna yol açar ve ksantin oksidaz aracılığı ile de sırasıyla hipoksantinden ksantin ve ürik asit oluşur (Şekil-2). Reperfüzyon sırasında dokuya gelen bol miktarda O_2 molekülünden, bu reaksiyonlar sırasında serbest oksijen radikalleri, süperoksit ve hidrojen peroksit ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2) meydana gelir. Hücredeki iskemi eğer hipoksantin yıkılmaya başlamadan önce düzeltilip yeterli oksijen sağlanırsa, hipoksantin ve diğer bileşiklerden tekrar ATP oluşur.^{37,38}



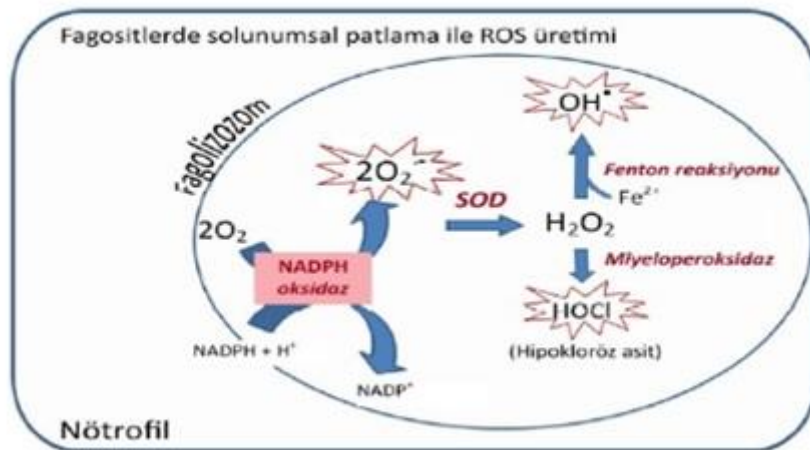
Şekil 2. İskemide purin metabolizması ve reperfüzyonda oksijen radikali oluşumu

İske mi sonrası dokudaki diğer önemli bir SOR kaynağı da nötrofillerdir. Nötrofillerin membranlarında bulunan NADPH bağımlı oksidaz sistemleri SOR oluşumunun en önemli kaynaklarından biridir. Bu enzim sistemi normalde inaktif olup, bakteriler, mitojenler yada sitokinlerce aktive edildiklerinde O_2 'nin H_2O_2 'e ve O_2 'e dönüşmesini sağlarlar. $O_2^{\cdot-}$ oluşumunda nötrofil kemotaksisinin de önemi büyüktür. Ca^{2+} da fosfolipaz A2 aktivitesini sağlayarak,

lökotrienlerin aktive ettiği polimorfonükleer (PMN) hücreler üzerinden O_2^- oluşumunu gerçekleştirir. Polimorfonükleer hücreler kaynaklı reperfüzyon hasarı mikrovasküler alana kemotaktik birikimi ve mikrovasküler endotele adezyonla karakterizedir.³⁹ İskemi reperfüzyon etkisinin dokuda nötrofil birikimi ile doğrudan ilişkili olduğu ve bu birikimin normal homeostazla kıyaslandığında iskemik dönemde 5 kat ve reperfüzyon döneminde ise 18 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir.⁴⁰

2.3 Böbrek İskemi Reperfüzyon ve Uzak Organ Hasarı

Birçok çalışmada karaciğer, kalp, böbrek, akciğer ve beyin gibi organların İ/R'na bağlı zedelenmesinde nötrofillerin doku düzeyinde ve sistemik olarak arttığı gösterilmiştir.⁴¹⁻⁴⁵ Normal fizyolojik şartlarda fagositik lökositler (makrofaj, nötrofil v.b) ROS'un tetiklediği inflamatuvar mediyatörlere yanıt olarak aktive olurlar ve solunumsal patlama adı verilen mekanizmayla oksidan mediyatörler üretirler. Fagositik hücrelerde solunumsal patlamada ROS üretiminden sorumlu başlıca enzim NADPH oksidaz (NOX) olup aktivasyon sırasında oksidan üretimi yaklaşık 50-100 kata kadar artabilir.⁴⁶ NOX aracılığıyla üretilen süperoksitler, SOD aracılığı ile önce hidrojen peroksit ve sonrasında miyeloperoksidaz etkisi ile de hipokloröz asite veya Fenton reaksiyonu ile hidroksil radikaline (OH) dönüşür ve ortama salınır.²⁹ (Şekil 3). Polimorf çekirdekli lökositler kaynaklı bu artmış ROS üretimi, reperfüzyon hasarında başlıca rolü oynar. PMNL'den bunun dışında IL-1, IL-6, IL-12, IFN γ ve TNF α gibi sitokin ve kemokinler ile elastaz ve kollejenaz gibi proteazlar salınarak bölgeye daha fazla inflamatuvar hücre toplanmasına ve daha fazla ROS üretimine yol açar.⁴⁷



Şekil 3 İskemi Reperfüzyonda bölgeye göç eden nötrofillerde oluşan solunumsal patlama

Akut böbrek hasarı (AKI), yüksek mortalite, morbidite nedeniyle kritik hastalarda ciddi komplikasyonlardan biridir.⁴⁸⁻⁵⁰ Hastanede yatan hastalarda AKI insidansı yüksektir.⁵¹ Dünya çapında yapılan ve 3 milyondan fazla hastayı, 154 çalışmayı içeren yeni bir meta analiz 5 yetişkinden 1'inin ve her 3 çocuktan 1'inin hastaneye yatış sırasında AKI aldığını bildirmiştir.⁵² Diyaliz gerektiren AKI, yüksek mortalite oranı %40 ila %50 iken kardiyak ve solunum yetmezliği gibi ilişkili uzak organ işlev bozukluğu durumları ile beraber olunca mortalite oranı %80'lere kadar çıkmıştır.⁵³⁻⁵⁵ Akut böbrek hasarı, sepsis, kalp cerrahisi sonrası kontrast madde maruziyeti, kanama, karaciğer yetmezliği ve ciddi kalp yetmezliği gibi farklı klinik ortamlara bağlı olarak geniş bir nedensel faktör yelpazesine sahiptir. Sepsis, yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) AKI'nın önde gelen nedenidir, tüm AKI'nın %10 ila %45'i sepsis ile ilişkilidir.⁵⁶⁻⁵⁸ Sepsis ve AKI beraber görülen hastaların daha yüksek mortalite oranına sahip olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir.⁵⁶

Akut böbrek hasarındaki uzak organ işlev bozukluğunun, kanda dolaşan humoral ve/veya hücrel araçlardan kaynaklandığı düşünülmektedir.⁵⁹ Serbest dolaşan sitokinler İ/R doku hasarının patogeneğinde önemli bir rol oynarlar. Tübüler epitel hücreleri tarafından ve ayrıca aktif lökositler tarafından üretilen tümör nekroz faktörü (TNF-a), endotel hücrelerinde adezyon moleküllerinin ekspresyonunu indükler ve İ/R'da lökosit infiltrasyonunu artırır. TNF-a, interlökin 6 (IL-6), IL-8 ve IL-10 gibi diğer proenflamatuar veya antienflamatuar sitokinleri indükler, bu da diğer organ sistemlerini etkiler.⁶⁰ Yapılan bir çalışmada, IL-6'yı inaktive edici antikor uygulanması, böbrek İ/R bağlı oluşan akciğer hasarını azaltmıştır.⁶¹ Reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ve oksidatif hasar gibi çeşitli mekanizmaların, çeşitli hastalıklarda enflamatuar yolların aktivasyonuna ve organ fonksiyonunun kötüleşmesine doğrudan katkıda bulunduğu düşünülmektedir.^{62,63} Böbrek İ/R bağlı kalp, dalak, beyin, karaciğer ve bağırsakta oluşan uzak organ hasarı hakkında birçok çalışma yapılmıştır.⁶⁴⁻⁶⁹

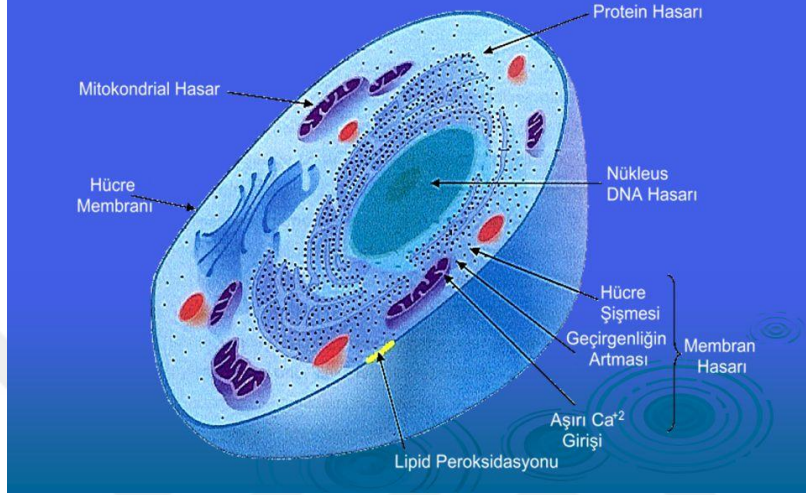
Önceki çalışmalar AKI'nın karaciğer gibi uzak organlarda lökosit infiltrasyonunda bir artışa neden olduğunu göstermiştir. Renal İ/R'nun karaciğerde oksidatif stresi indüklediği, hepatik disfonksiyona neden olduğu da gösterilmiştir. Renal İ/R hepatik tümör nekroz faktörü düzeylerinde, miyeloperoksidaz aktivitelerinde ve tiyobarbitürik asit reaktif madde (TBARS) konsantrasyonlarında artışa neden olmuştur.^{70,71} Renal İ/R sırasında, kan AST ve ALT gibi karaciğer fonksiyonel indeksleri yükselmiştir.⁷² Süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz, vücuttaki en önemli enzimatik antioksidan sistemler arasındadır. Reaktif oksijen metabolitlerine karşı ilk ve en önemli savunma hattı olan SOD, süperoksit iyonunu daha az reaktif bir molekül olan H₂O₂'ye dönüştürür.⁷³ Reaktif oksijen türleri çoklu doymamış yağ

asitlerini bozar ve bir organizmada oksidatif stres seviyesini ölçmek için bir biyobelirteç olarak kullanılabilen bir sitotoksik reaktif aldehit olan MDA'yı oluşturur.⁷⁴ Böbrek İ/R, proinflatuar sitokin ve hasara neden olan moleküllerin ekspresyonunu arttırdığını, apoptozu teşvik ettiğini ve karaciğerde hücre hasarına neden olduğu gösterilmiştir.⁷²

2.4 Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanlar

Yapısında en az bir tane eşlenmemiş elektron bulunduran reaktif halde bulunan atom veya moleküle serbest radikal denir.^{75,76} İmmün sistemin fagositoz yapabilen hücrelerinden (nötrofiller, eozinofiller, monosit ve makrofajlar), O₂ kullanarak serbest radikallerin ana kaynağını oluşturan solunum patlamasına yol açarlar.^{33,77} Serbest radikaller, hücre metabolizması sırasındaki enzimatik reaksiyonlarda ara ürünler olarak oluşmaktadır. Ara ürünler olarak bilinen reaktif oksijen türleri bazen enzimlerin aktif yerinden sızarak moleküler oksijenle etkileşebilir ve serbest oksijen radikallerini meydana getirirler.⁷⁸ Kararsız yapıdaki bu reaktif oksijen türleri, kararlı hale gelmek için hücrelere saldırmakta ve hücre bileşenlerine zarar vererek çeşitli hastalıklara yol açmaktadır.^{79,80} Kendisi zararlı etkiye sahip olmayan süperoksit radikali, hidrojen peroksitin kaynağı ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisidir. Bu radikaller serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatarak hücrede karbon merkezli süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikali, organik hidroperoksit, hipoklorit, radikalleri gibi çeşitli oksidanların oluşumuna neden olurlar.⁸¹ Doymamış yağ asitleri reaktif oksijenle tepkimeye girerek lipid peroksi radikalini, daha sonrada lipidlerle zincir reaksiyon yaparak lipid hidroperoksitleri oluşturur.⁸² Ortamda bulunan bakır ve demir iyonları lipid peroksit oluşumunu artırır ve bu radikali sitotoksik ürünlere dönüştürür.⁸³ Reaktif oksijenler son yörüngelerindeki elektronu tamamlayıp kararlı yapıya ulaşmak için lipidler, proteinler, karbonhidratlar ve DNA ile reaksiyona girmektedirler. Bu reaktif oksijen içeren maddelerin miktarı arttığında membrandaki lipidlerin peroksidasyonuna yol açarak permeabilitenin bozulmasına, dolayısıyla hücre içi iyon dengesizliğine neden olmaktadır.⁸⁴ Aynı zamanda proteinlerin, DNA ve RNA gibi moleküllerin yapısını bozarak birçok hastalığın oluşumunda önemli rol oynamaktadırlar.⁸⁵ (Şekil 4). Reaktif oksijen türleri, hücre zarında bulunan doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunu arttırarak toksik etkilerini gösterirler.^{86,87} Oluşan lipid peroksit radikalleri, hücre membranındaki diğer doymamış yağ asitleri ile tepkimeye girerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açar. Aynı zamanda oluşan hidrojen atomlarını alarak lipid peroksitlere dönüşürler ve böylece olay kendi kendini aktive ederek devam eder.^{82,83,88,89}

Serbest Oksijen Radikallerinin Etkileri



Şekil 4 Serbest oksijen radikallerinin hücredeki etkileri

Malondialdehid (MDA) lipid peroksitlerin en çok bilinen aldehyd formu olup, araşidonik asidin oksijenasyonu ya da poliansature yağ asitlerinin enzimatik olmayan oksidatif yıkımı sonucu ortaya çıkmaktadır.^{82-84,86,90} MDA hücre zarındaki proteinlerin amino grupları ile çift bağ oluşturur ve tiyol grupları ile etkileşir böylece iyon transportu, enzimatik aktivite, hücre yüzey determinantlarının agregasyon durumlarını ve intrinsik membran özelliklerini değiştirmektedir.⁸⁵ MDA, profibrogenetik sitokinleri (transforming growth faktör- β 1 = TGF- β 1) üreten Kupffer hücrelerini aktive etmekte, ayrıca kollagen gen ekspresyonunu ve üretimini artırmaktadır. Bu nedenle, lipid peroksidasyonun son ürünlerinden olan MDA ölçümü hücresel hasarın derecesini ölçmede kullanılmaktadır. ROS'un direk ölçümü zor olduğu için moleküler ve enzimatik antioksidanların doku ve kandaki düzeyleri oksidatif durumu yansıtmaktadır.^{85-87,91} Reperfüzyonsuz iskemide ve spesifik antioksidanlar tarafından oksijen radikalleri inaktifleştirildiğinde lipid peroksidasyonu gözlenmez.⁹²

Serbest oksijen radikallerinin oluşumunu, oluşturdukları hasarı önlemek ve detoksifikasyonunu sağlamak için birçok savunma mekanizması tanımlanmıştır. Bu mekanizmalar “antioksidan savunma sistemleri” olarak bilinirler. Organizmadaki prooksidan-

antioksidan dengesinin prooksidan lehine artması oksidatif stres olarak tanımlanır ve reperfüzyon hasarında sıklıkla görülür. Antioksidanlar toplayıcı, bastırıcı, zincir kırıcı ve onarıcı olmak üzere dört ayrı şekilde etki ederler. Antioksidanlar, endojen kaynaklı veya egzojen kaynaklı olabilirler.⁹³ (Tablo-1)

Tablo 1:Antioksidanlar

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

Oksidatif hasara karşı hücre içindeki en önemli koruyucu oksidan bileşik glutatyondur. Glutasyon, glutamat, sistein ve glisinden oluşur ve vücutta başlıca karaciğer ve böbrekte oluşur. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır. Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril gruplarını redükte eder oksidasyona karşı korur. Böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. GSH yabancı bileşiklerin detoksifikasyonunu ve aminoasitlerin membrandan transportunu da sağlar. GSH hücreleri oksidatif strese karşı korumada hayati öneme sahiptir.^{94,95}

2.5 İskemik Önkoşullama

Uzamış iskeminin zararlı etkilerinden korunmak amacıyla dokuların kısa süreli olarak iskemiye maruz bırakılması ile İ/R sonrası oluşan hasara karşı adaptasyon sağlanmış olur. Bu

İÖK olarak adlandırılır.⁹⁶ İlk kez 1986 yılında Murry ve ark. tarafından kalpte tarif edilmiştir.⁹⁷ Kalpte 40 dak'lık tek bir iskemiye takiben ciddi bir ATP düşüşü ve hücre ölümü olduğu halde, dört kez tekrarlanan 10 dak'lık İ/R periyodunun İ/R hasarını azalttığı gösterilmiştir. Bu koruyucu etkinin mekanizması tam olarak açıklanamamakla birlikte takip eden iskemi periyotlarında ilk iskemi dönemine göre ATP düşüşünde azalma olduğu, ayrıca laktat, hidrojen ve amonyak gibi zararlı maddelerin her perfüzyonla birlikte ortamdan uzaklaştırıldığı gösterilmiştir.^{98,99}

İskemik ön koşullama mekanik veya farmakolojik olarak uygulanabilir. Mekanik olarak yapılan İÖK direkt veya UİÖK şeklinde ikiye ayrılır. Direkt İÖK'de hedef organın kendisi iskemi süresi öncesinde kısa aralıklarla İ/R periyotlarına maruz bırakılarak İ/R hasarından korunmuş olur. Ancak bu yöntemin büyük damarlara travma ve organa stres oluşturması gibi dezavantajları vardır. Uzak İÖK ise hedef organdan farklı bir dokunun kısa aralıklarla İ/R periyotlarına maruz bırakılarak hedef organın hasardan korunması yöntemidir. Böylece hedef organ direkt olarak strese maruz kalmaz.¹⁰⁰

İskemik önkoşullamanın koruyucu etkisinde fosfolipaz C veya D'nin aktifleşmesini sağlayan adenosin veya alfa-1 adrenerjik reseptör aktivasyonu kritik başlangıç basamağını oluşturmaktadır. Önkoşullamanın akut yararlı etkileri ATP duyarlı K⁺ kanallarının Protein kinaz C'ye bağımlı fosforilasyonuna bağlıdır. Protein kinaz C bağımlı, 5'nükleotidazın hücre yüzeyine translokasyonu artarak, hücresel adenosin üretimi artar ve hücresel enerji depoları korunur, lökosit tutunması azalır.¹⁰¹ İskemik önkoşullamanın hem cGMP, hem de cAMP düzeylerinde artışa neden olduğu gösterilmiş olup, İÖK'de bunların tetikleyici rolleri olabileceği düşünülmüştür.¹⁰² Dokuda İÖK sonrası ATP'nin stabil kaldığı, adenosin, ksantin ve inozinin ise arttığı bulunmuştur.¹⁰³

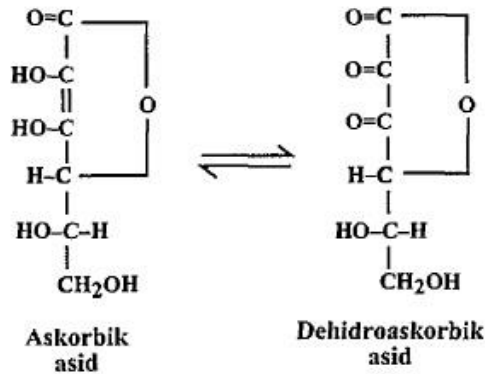
2.6 Farmakolojik Koşullama

İskemi reperfüzyon hasarını azaltmak veya önlemek için kullanılan diğer yöntem farmakolojik koşullamadır. Farmakolojik koşullama koruyucu (önkoşullama) ve/veya tedavi edici (ardkoşullama) olarak uygulanabilir.³⁴ Bu amaçla böbrek İ/R hasarında farklı ilaçların kullanıldığı birçok çalışma yapılmıştır. Aktive protein C, alfa melanosit stimüle edici hormon, statin ve deksmedetomidin gibi ajanların İ/R hasarını azalttığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir.^{70,104,105}

Farklı birçok farmakolojik ajanın sinyal yollarını farklı noktalarda aktive ettiği ve böylece İÖK'yi taklit ettiği gözlemlenmiştir.¹⁰⁶ Bu gözlemler İÖK'nin sağladığı etkileyici korumanın terapötik ajanlarla da sağlanabileceği düşüncesini doğurmuştur.^{107,108}

2.7 Askorbik Asit

Askorbik asit yapıcı, glukoza ve diğer altı karbonlu monosakkaridlere benzeyen bir ketolaktondur. İnsan ve diğer primatlarda ve kobaylarda vücutta sentez edilmediği halde, incelenen diğer memeli türlerinde glukozdan başlayarak L-gulonik asit üzerinden sentez edilir. Dokularda bir enzimin katalitik aracılığı olmadan bile kolayca dehidroaskorbik aside oksidlenir. Oksitlenme askorbik asit molekulundeki enodiol grubunun diketo grubuna dönüşmesi ve doymamış bağın doymuş hale gelmesi suretiyle olur. Bu özelliği nedeniyle askorbik asit indirgeyici nitelik gösterir; dehidro şekline dönüşmesi molekül başına iki hidrojen atomunun serbest kalmasına neden olur. Dehidroaskorbik asit ortamda iki hidrojen atomu almak suretiyle kolaylıkla askorbik aside indirgenir. Bu kimyasal özelliklerinden dolayı, askorbik asit ve dehidroaskorbik asit vücut sıvılarında denge halinde bulunurlar ve birbirine kolayca dönüşürler; böylece redoks niteliği gösterirler. İki şekil de aynı derecede fizyolojik etkinlik gösterir. Vitaminler içinde kimyaca en labil olan vitamin türüdür. Ortamın asid olması askorbik asidin dayanıklılığını artırır. Askorbik asit içeren bitkisel ürünlerin bayatlaması, ısıya ve havaya maruz kalması ve doğranması vitamin içeriğinin azalmasına neden olur.



Şekil 5 Askorbik Asit ve Dehidroaskorbik asit

Yukarıda belirtilen kimyasal özelliği nedeniyle askorbik asidin kendi başına redoks sistem oluşturduktan başka, diğer redoks sistemleri ile birlikte (glutatyon, sitokrom c, piridin nukleotidleri ve flavin nukleotidleri ile kenetlenmiş olan redoks sistemleri gibi) hücrelerde oksidlenme-indirgenme olaylarında rol oynadığı gösterilmiştir. Ancak vücutta redoks sistemlerinin çeşitliliği ve sadece askorbik asidin rol oynadığı sisteme kısıtlı kalmaması, bu vitaminin sözü edilen temel etkisinin önemini azaltır. Askorbik asit hematopoietik dokuda,

tetrahidrofolik asidin oksitlenmeden kalmasını sağlar. İnce barsakta demir absorpsiyonunu artırır. Askorbik asid, ekstraseluler sıvıda bulunan en önemli antioksidan maddedir. Hücrelerin içinde de antioksidan etkinlik gösterir. Superoksid anyonunu, hidrojen peroksid, hipoklorit, hidroksil radikali, peroksil radikalleri ve singlet oksijeni güçlü bir şekilde bağlayarak inaktive eder. Plazma lipidleri ile yapılan incelemeler, peroksil radikali oluşmasını indukleyen maddelerin yaptığı lipid peroksidasyonunu inhibe eden en önemli plazma komponentinin askorbik asid olduğunu göstermiştir. Böylece biyomembranları ve DNA'yı peroksidatif zedelenmeden koruyabilir. Ayrıca tokoferol'un antioksidan etkinliğini güçlendirir. Folik asidin, tetrahidrofolik aside ve midede non-hem ferrik demir'in ferro demire indirgemesine katkıda bulunur. C vitamininin diğer bir önemli fonksiyonu, belirli hidroksilasyon ve amidasyon reaksiyonlarının koenzimi olmasıdır. Bu özelliği nedeniyle aşağıda belirtilen kollajen sentezinde, ksenobiyotiklerin mikrozomal metabolizmasında, hemoglobin sentezinde, norohipofiz hormonlarının biyosentezinde ve olasılıkla adrenal korteksteki steroid hormon biyosentezinde rol oynar.¹⁰⁹

Tata ve ark.²² ratlara iskemiden 20 dk önce 125, 250 ve 500 mg/kg askorbik asit vererek karaciğer İ/R hasarını koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmada, askorbik asit verilen grup ile İ/R grubu arasında karaciğer GSH düzeylerinde önemli bir düşüş görüldüğünü bu sonucun askorbik asidin karaciğer hepatositlerinin maruz kaldığı oksidatif stresi azalttığı şekilde yorumlamışlardır

Seo ve ark.¹¹⁰ ratlarda hepatic iskemi reperfüzyon hasarını değerlendirdikleri çalışmalarında, iskemiden 5 dak önce 30 mg/kg, 100 mg/kg, 300 mg/kg ve 1000 mg/kg dozlarını dört farklı gruba uygulamışlardır. Düşük dozlarda antioksidan etkinlik gösterilmişken, yüksek doz uygulamada ise preoksidan etkilerinin olduğu göstermişlerdir. Lee ve ark.¹¹¹ iskemik önkoşullama ve askorbik asidin karaciğer İ/R hasarı üzerine yaptıkları çalışmada, İ/R sırasında artan mitokondriyal hasar seviyesini sinerjistik olarak azalttığını göstermişlerdir. Korkmaz ve ark.¹¹² ratlarda renal İ/R hasarını değerlendirdikleri çalışmalarında, iskemiden 1 saat önce uyguladıkları 250 mg/kg askorbik asitin renal İ/R hasarından koruyucu etkisi olduğunu göstermişlerdir.

2.8 Magnezyum

Magnezyum, ATP(Adenozintrifosfat) ve nükleik asitlerin sentezinde yapımında rol alır.¹¹³ Birçok enzimin kofaktörü olarak rol alır. Bu etkisini reaktif substratlara bağlanıp reaksiyonu hızlandırarak yapar. Bu nedenle ATP'nin gerekli olduğu glukoz tüketimi, protein, yağ asidi, nükleik asit ve koenzimlerin sentezi ve kas kontraksiyonunda görev alır. Magnezyum, kalp ritminin düzenlenmesinde, trombosit fonksiyonlarında ve hücre membranındaki Na-K

kanalını etkileyerek hücre içinde potasyum girmesini düzenler.¹¹⁴ Normal erişkinde %60'ı kemikte, %30'u iskelet kasında, %19'u yumuşak dokuda ve %1'den azı da ekstrasellüler sıvıda yer almaktadır.¹¹⁵ Plazmada toplam magnezyum(Mg) miktarı 1,7-2,4 (0,7- 1,0 mmol/L) mg/dL'dir. Magnezyum vücuttaki düzenlenmesi böbrek, kemik ve ince barsak tarafından yapılır. Magnezyum başlıca ileum ve kolondan emilir.¹¹⁶ Magnezyum L tipi kalsiyum kanal blokeridir. Normalde L-tipi kalsiyum kanalı uyarılınca hücre için kalsiyum miktarı artar ve artan hücre içi kalsiyum apoptoz ve nekroza yol açan enzimlerin aktivasyonunu sağlar. Dolayısıyla magnezyumun bu kanalı bloke etmesi apoptoz ve nekrozu önleyebilir.¹⁹ Magnezyum prostasiklin üretimini arttırır vazodilatasyona ve platelet agregasyonunu azaltarak trombozu önler. Lipid peroksidasyonunu önleyerek oksidatif maddelerin hücrelere verdiği hasarı azaltır.²¹ Magnezyum sülfat hücre içi kalsiyum miktarını azaltarak ayrıca Na-K kanalı üzerindeki etkisiyle hücrelerin maruz kaldığı iskemi-reperfüzyon hasarını azaltabilir.²¹ Magnezyum iyi bilinen bir NMDA reseptör antagonistidir. Bu sayede analjezik etki gösterebilir.²⁰

Sit ve ark.¹¹⁷ magnezyum sülfatın karaciğer İ/R hasarı üzerine araştırdıkları araştırmada, ratlara iskemiden 1 saat önce 200 mg/kg intraperitoneal (İ.P) magnezyum sülfat verilmiş ve magnezyum verilen bu grupta AST ve INR düzeylerinin İ/R grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldığı, ayrıca immunohistolojik incelemede yine İ/R grubunda görülen apoptoz ve nekrozun magnezyum sülfat uygulanan grupta anlamlı olarak azaldığını göstermişlerdir.

Akan ve ark.¹⁹ in magnezyum sülfatın diyabetik sıçanlarda oluşturulan İ/R hasarında koruyucu etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında, iskemiden 5 dakika önce 200 mg/kg İ.P. magnezyum sülfat uygulanmış ve histomorfolojik olarak akut böbrek hasarını azalttığı yönünde veriler elde etmişlerdir.

Kaptanoğlu ve ark.¹¹⁸ ratlarda intrauterin oluşturulan İ/R hasarında, magnezyum sülfatın fetal deride koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmada İ/R hasarından 20 dak önce 600 mg/kg magnezyum sülfat İ.P. olarak vermişler ve magnezyum sülfatın koruyucu etkisi olduğunu göstermişlerdir.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Sıçanlarda Renal İ/R modelinde askorbik asit ve Mg'un etkinliğinin araştırıldığı bu çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı (Etik Protokol No:32/2019 Tarih: 07/08/2019) (EK 1) alınmasının ardından Dokuz Eylül Üniversitesi Multidisipliner Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Çalışmaya Wistar cinsi, ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen, 35 adet erkek sıçan alındı. DEÜTF Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan sağlanan denekler standart sıçan yemi ve su ile beslendiler. Sıçanlar standart laboratuvar koşullarında (12 saat gündüz- 12 saat gece olacak şekilde ışıklandırma, 20-22 °C oda ısısı, % 50-60 nem) izlendi. Deneysel uygulama sırasında laboratuvar hayvanlarının bakılmasına yönelik uluslararası kılavuzlara bağlı kalındı.

3.1 Anestezi Uygulaması

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

3.2 Deney Grupları ve Protokol

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

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

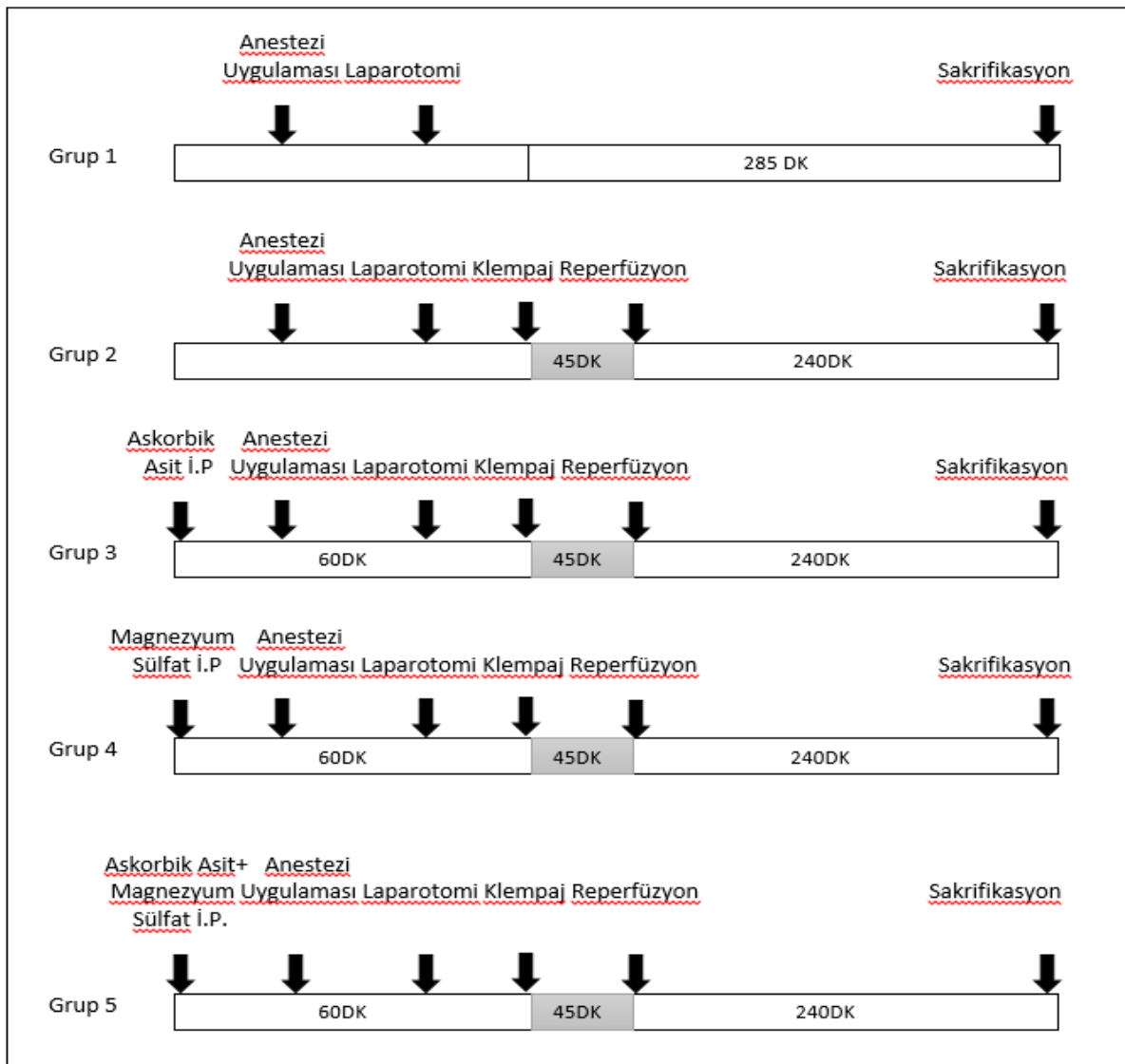
Grup Askorbik Asit (Grup 3, n= 7): Laparotomi öncesi 250 mg/kg askorbik asit toplam volüm 1ml olacak şekilde %0,9'luk NaCl ile sulandırılarak intraperitoneal (İP) yolla uygulandı. Laparotomi sonrası sağ ve sol renal pediküller açığa çıkartılarak (ilaç uygulamasından 1 saat sonra) her iki pediküle atravmatik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

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

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

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

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



Şekil-6. Deney modelinin şematik görünümü

3.3 Deneyisel Çalışma Modeli

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



Resim-1: Anestezi altında laparotomi uygulanması

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

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



Resim-2: Renal pediküllerin açığa çıkarılması ve pediküllerin klemplenmesi

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

3.4 Biyokimyasal Değerlendirme

Oksidatif stres parametresi olarak Malondialdehid (MDA) ile antioksidan parametrelerden Süperoksit dismutaz (SOD) ile Glutasyon (GSH) değerlendirme amacıyla kullanıldı. Alınan karaciğer örnekleri -80 °C de saklandıktan sonra homojenize edildi. Homojenizasyondan sonra numuneler santrifüj edilecek ve süpernatantta MDA, SOD, GSH ve Kaspaz 3 konsantrasyonları belirlendi. Kan örneklerinde AST, ALT, Albumin, Bilirubin değerlerinin çalışılması için DEÜTF Hastanesi Merkez Laboratuvarı'ndan hizmet alındı.

3.5 Karaciğer dokusunun histolojik değerlendirilmesi

Doku örnekleri %10 formalinde sabitlendi, daha sonra parafin içine gömülüp ve 5 mm'lik bölümlere kesildi, parçalar hematoksilin eozin ile boyandı. Kesitler kör bir şekilde gruplanarak, karaciğer hasarının derecesinin değerlendirilmesi için 100 büyütme kullanılarak ışık mikroskopunda incelendi. Histolojik incelemeler için Hematoksilin&Eozin (H&E) ve Periyodik Asit Schiff (PAS) boyamaları, apoptotik hücre incelemeleri için TUNEL immünohistokimyasal boyaması yapıldı.

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

3.6 Dışlama

Resüsitasyon gereksinimi olan sıçanların çalışma dışında bırakılması planlandı.

3.7 İstatistiksel Değerlendirme

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

4. BULGULAR

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

4.1. Biyokimyasal Bulgular

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

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

	Grup Sham (n=7)	Grup İR (n=7)	Grup Askorbik Asit (n=7)	Grup Magnezyum (n=7)	Grup Askorbik Asit+Magnezyum (n=7)	p
ALT(mg/dl)	61 $\pm$ 13,29*	232,57 $\pm$ 35,25ß	90 $\pm$ 12,68	103,71 $\pm$ 27,20	91,57 $\pm$ 17,71	<0,001
AST(mg/dl)	226,28 $\pm$ 52,71æ	830,71 $\pm$ 188,24#	398 $\pm$ 41,69	368,285 $\pm$ 60,784	390,285 $\pm$ 84,42	<0,001
Albumin	2,77 $\pm$ 0,21	2,59 $\pm$ 0,23\$	2,73 $\pm$ 0,15	2,77 $\pm$ 0,14	2,76 $\pm$ 0,19	0,004
T.Billurbin	0,22 $\pm$ 0,03	0,29 $\pm$ 0,05	0,23 $\pm$ 0,08	0,25 $\pm$ 0,03	0,21 $\pm$ 0,02	>0,05
MDA (ng/mg prot)	0,79 $\pm$ 0,19£	1,34 $\pm$ 0,23**	1,09 $\pm$ 0,11	1,47 $\pm$ 0,34	1,41 $\pm$ 0,34	0,009
GSH (ng/mg prot)	100,5 $\pm$ 11,27	84,1 $\pm$ 1,5&	86,6 $\pm$ 6,8	94,0 $\pm$ 5,27	87,5 $\pm$ 4,76	<0,001
Kaspaz 3 (ng/mg prot)	93,36 $\pm$ 2,23	116,91 $\pm$ 16,86	35,67 $\pm$ 0,63##	112,21 $\pm$ 14,23	101,85 $\pm$ 10,88	0,007
SOD (ng/mg prot)	47,05 $\pm$ 12,19	71,46 $\pm$ 9,28ßß	50,76 $\pm$ 4,90	58,19 $\pm$ 11,4	52,7 $\pm$ 5,17	<0,001

*Grup İR (p:0,001), Grup Askorbik Asit (p:0,002), Grup Magnezyum (p:0,002) ve Grup Magnezyum +Askorbik Asit (p:0,004) grubuna kıyasla anlamlı fark

ß Grup Askorbik Asit (p:0,002), Grup Magnezyum (p:0,017), Grup Askorbik Asit +Magnezyum(p:0,004) grubuna kıyasla anlamlı fark

æ Grup İR(p:0,001), Grup Askorbik Asit(p:0,001), Grup Magnezyum (p:0,026) ve Grup Askorbik Asit+Magnezyum(p:0,004) grubuna göre anlamlı fark.

Grup Askorbik Asit (p:0,004), Grup Magnezyum(p:0,011) ve Grup Askorbik Asit+Magnezyum (p:0,011) grubuna göre anlamlı fark

\$ Grup Askorbik Asit+Magnezyum (p:0,007) grubuna göre anlamlı fark

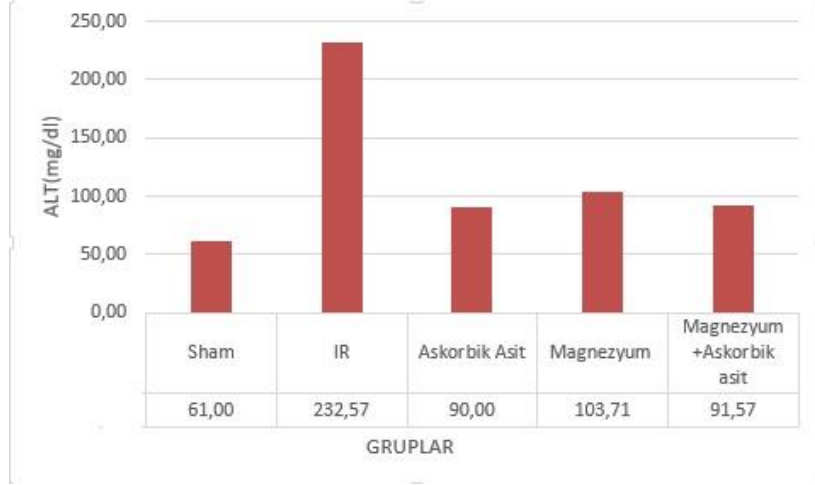
£ Grup Askorbik Asit (p:0,011),Grup Magnezyum(p:0,011) ve Grup Askorbik Asit+Magnezyum (p:0,007) grubuna göre anlamlı fark

** Grup Askorbik Asit (p:0,004) grubuna kıyasla anlamlı fark

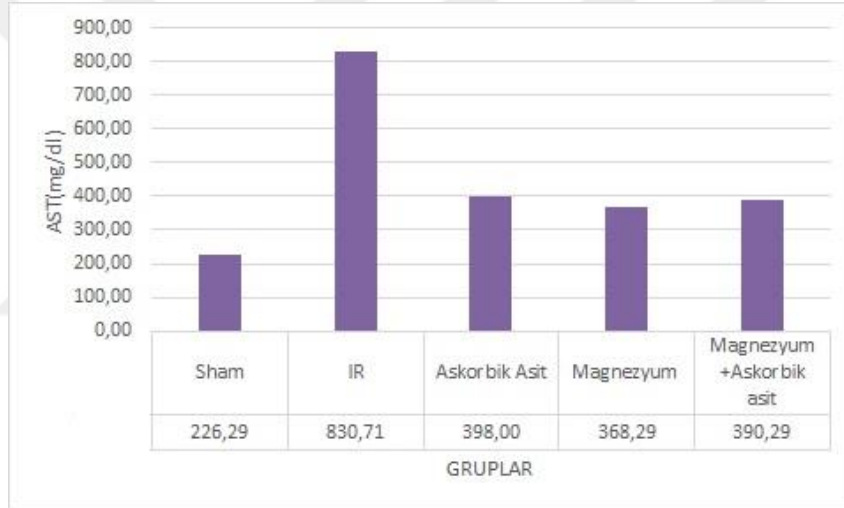
& Grup Magnezyum (p<0,001), Grup Askorbik Asit +Magnezyum(p<0,001) grubuna kıyasla anlamlı fark

Grup İR (p:0,017), Grup Magnezyum (p:0,004) ve Grup Magnezyum +Askorbik Asit (p:0,011) grubuna kıyasla anlamlı fark

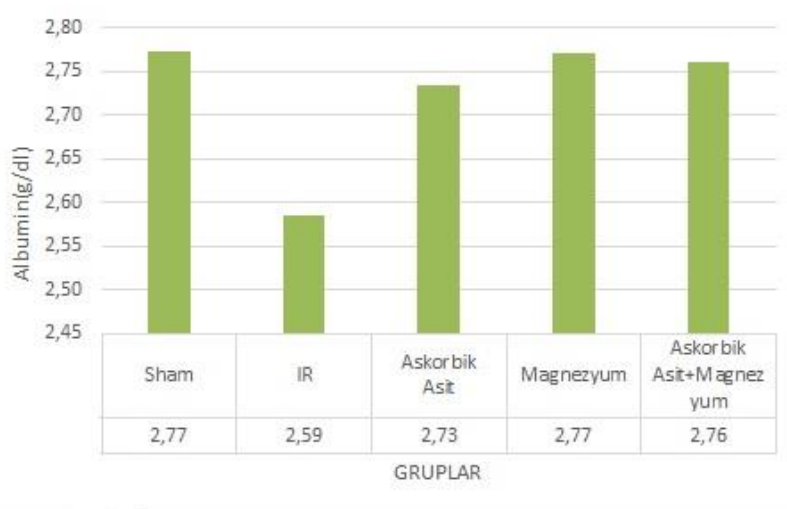
BB Grup Sham(p:0,001), Grup Askorbik Asit (p:0,001),Grup Magnezyum(p:0,001) ve Grup Askorbik Asit+Magnezyum (p:0,001) grubuna göre anlamlı fark



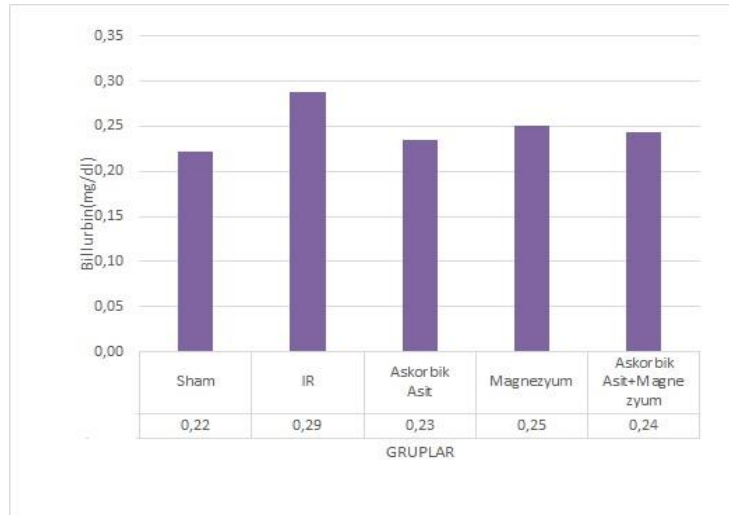
Grafik-1: Sıçanlardan alınan kan örneklerinde ölçülen ALT düzeyleri



Grafik-2: Sıçanlardan alınan kan örneklerinde ölçülen AST düzeyleri



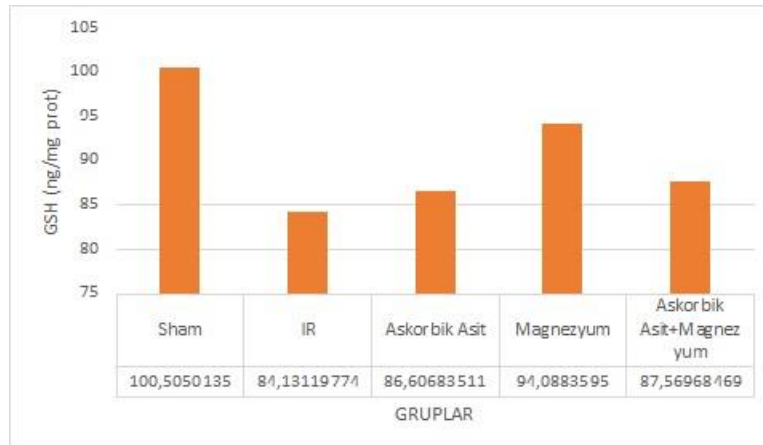
Grafik-3: Sıçanlardan alınan kan örneklerinde ölçülen Albumin düzeyleri



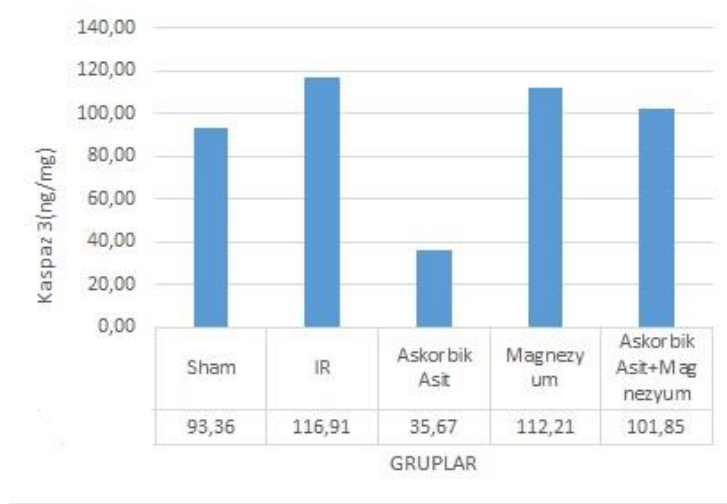
Grafik-4: Sıçanlardan alınan kan örneklerinde ölçülen Billurbin düzeyleri



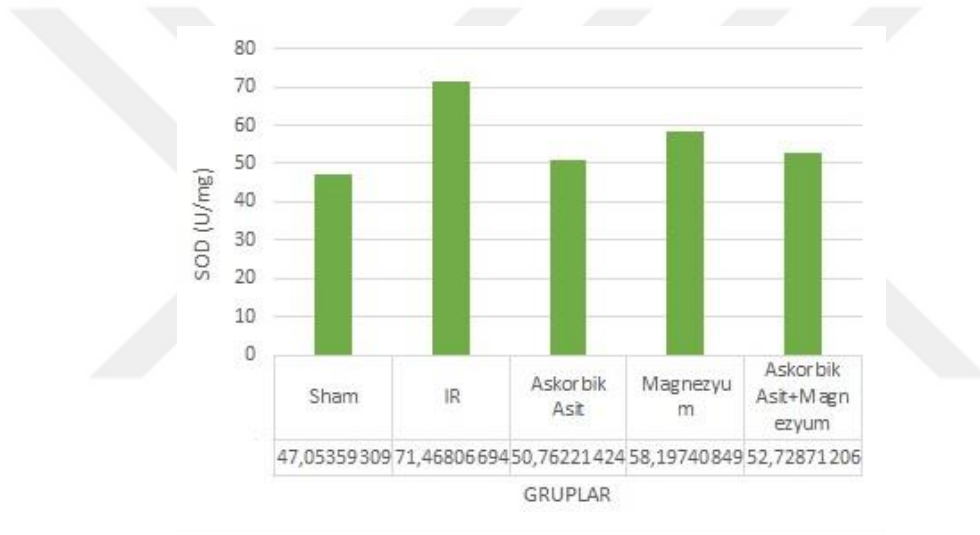
Grafik-5: Sıçanlardan alınan karaciğer dokularında ölçülen MDA düzeyleri



Grafik-6: Sıçanlardan alınan karaciğer dokularında ölçülen GSH düzeyleri



Grafik-7: Sıçanlardan alınan karaciğer dokularında ölçülen Kaspaz 3 düzeyleri



Grafik-8: Sıçanlardan alınan karaciğer dokularında ölçülen SOD düzeyleri

Alanin aminotransferaz değerleri karşılaştırılan Sham, İ/R, Askorbik Asit, Magnezyum ve Askorbik Asit + Magnezyum grupları arasında ortaya çıkan fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p:0,001$). Sham grubundaki ALT değerinin İ/R ($p:0,001$), Askorbik Asit ($p:0,002$) ve Magnezyum ($p: 0,004$) gruplarından anlamlı olarak daha düşük olduğu belirlendi. Bu sonuç İ/R hasarının olduğu, böylece deney şartlarının sağlandığı şeklinde yorumlandı. Askorbik Asit ($p:0,002$), Magnezyum ($p:0,017$) ve Magnezyum+Askorbik Asit ($p:0,004$) gruplarından elde edilen ALT değerlerinin İ/R grubuna göre daha düşük bulunması Magnezyum ve Askorbik Asitin ayrı ayrı ve birlikte verilince ALT değerini düşürmede başarılı olduğunu düşündürdü.

Aspartat aminotransferaz değerleri açısından değerlendirilen Sham, İ/R, Askorbik Asit, Magnezyum ve Askorbik Asit + Magnezyum grupları arasında ortaya çıkan fark

istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$). Sham grubundaki AST değeri diğer gruplara göre daha düşük bulundu ve İ/R ($p:0,001$), Askorbik Asit ($p:0,001$), Magnezyum ($p:0,026$) ve Askorbik Asit+Magnezyum ($p:0,004$) grubuna göre anlamlı fark görüldü. Bu sonuç da ALT için elde edilen sonuca benzer şekilde İ/R hasarının olduğu ve deney şartlarının sağlandığı şeklinde yorumlandı. Askorbik Asit ($p:0,004$), Magnezyum ($p:0,011$) ve Magnezyum+Askorbik Asit ($p:0,011$) gruplarından elde edilen AST değerlerinin İ/R grubuna göre daha düşük bulunması Magnezyum ve Askorbik Asitin ayrı ayrı ve birlikte verilince AST değerini düşürmede başarılı olduğu bulundu.

Albumin değerleri açısından değerlendirilen Sham, İ/R, Askorbik Asit, Magnezyum ve Askorbik Asit + Magnezyum grupları arasında ortaya çıkan fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p:0,004$). Askorbik Asit+Magnezyum grubu I/R grubuna kıyasla anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p:0,007$). Bu da negatif akut faz reaktanı olan albuminin inflamasyonun azalmasıyla Magnezyum+Askorbik Asit grubunda daha yüksek bulunduğu tespit edildi.

Bilirubin değerleri açısından değerlendirilen Sham, İ/R, Askorbik Asit, Magnezyum ve Askorbik Asit + Magnezyum grupları arasında ortaya çıkan fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$).

Malondialdehit(MDA) değerleri açısından değerlendirilen Sham, İ/R, Askorbik Asit, Magnezyum ve Askorbik Asit + Magnezyum grupları arasında ortaya çıkan fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p:0,009$). Grup Askorbik Asit ($p:0,011$), Grup Magnezyum ($p:0,011$) ve Grup Askorbik Asit+Magnezyum ($p:0,007$) sham grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Grup Askorbik Asit ($p:0,004$) İ/R grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu.

Yapılan çalışma sonucunda uygulanan iskemi reperfüzyon modelinin sham grubuna göre MDA düzeylerinde nmol/mg başına artışa neden olduğu ve lipid peroksidasyonunu arttırdığı öngörülmektedir. Modelde uygulanan askorbik asidin MDA oluşumunu azalttığı/önlediği ancak Mg uygulamasının MDA düzeyleri üzerinde önleyici bir etkiye sahip olmadığı saptanmıştır.

Glutasyon(GSH) değerleri açısından Sham, İ/R, Askorbik Asit, Magnezyum ve Askorbik Asit + Magnezyum grupları karşılaştırıldığında gruplar arası ortaya çıkan fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$). Magnezyum grubu ve Askorbik Asit+Magnezyum grubu İ/R grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek saptanmıştır ($p<0,001$). Yapılan çalışma sonucunda uygulanan iskemi reperfüzyon modelinde, iskemi reperfüzyon grubunda GSH düzeylerinde azalışa neden olduğu saptanmıştır. Reperfüzyon sonrası süreçte

GSH düzeylerinin sham grubuna göre değişim göstermesi uygulanan modelde oluşan oksidatif stresin artmış olduğunu göstermektedir.

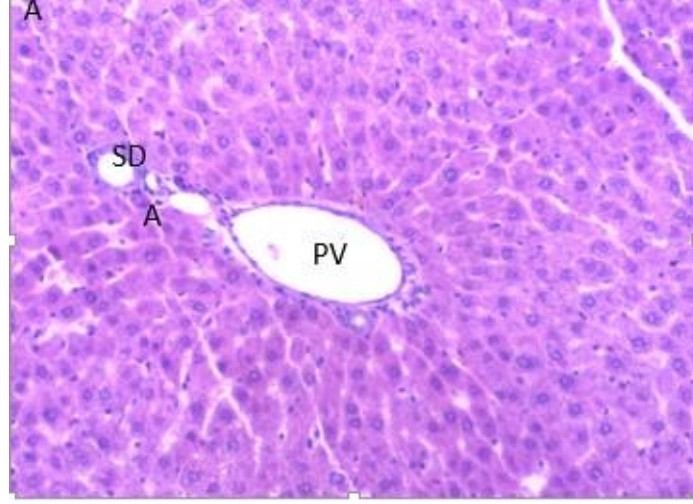
Kaspaz-3 deęerleri açısından deęerlendirilen Sham, İ/R, Askorbik Asit, Magnezyum ve Askorbik Asit + Magnezyum grupları arasında ortaya çıkan fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p:0,007$). Askorbik Asit grubu, Grup İ/R ($p:0,017$), Grup Magnezyum ($p:0,004$) ve Grup Magnezyum +Askorbik Asit ($p:0,011$) grubuna kıyasla anlamlı olarak daha dūřuk bulundu. Kaspaz-3, apoptotik hūcre lūmūnū belirten bir serin proteaz enzimidir. Kaspaz-3 dūzeylerinin azalmıř olması, apoptotik hūcre lūmūnūn azaldıęını ifade etmektedir. Magnezyum ve askorbik asit verilince Kaspaz-3 dūzeyinin İ/R grubuna gore dūřuk olması hem magnezyumun hem de askorbik asidin apoptoza karřı önleyici etkisi olduęunu dūřūndūrmūřtır.

Sūperoksit dismutaz (SOD) deęerleri açısından deęerlendirilen Sham, İ/R, Askorbik Asit, Magnezyum ve Askorbik Asit + Magnezyum grupları arasında ortaya çıkan fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$). İ/R grubu, Grup Askorbik Asit ($p<0,001$), Grup Magnezyum ($p<0,001$) ve Grup Askorbik Asit+Magnezyum ($p<0,001$) gruplarına gore anlamlı olarak yūksək bulundu. İřkemi reperfūzyon grubunda SOD dūzeyinin arttıęı, ancak askorbik asit ve Mg uygulamalarının oksidatif stres iliřkili antioksidan savunma sistemi üzerindeki etkilerine baęlı olarak SOD aktivasyonunu azaltmıř olduęu dūřūnūlmektedir.

4.2. Histomorfolojik Bulgular

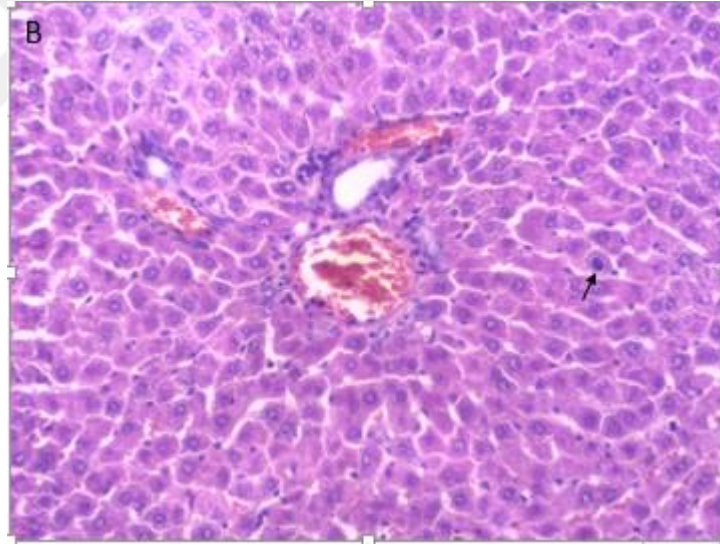
Histolojik incelemeler için Hematoksilen&Eozin (H&E) ve Periyodik Asit Schiff (PAS) boyamaları ile doku morfolojisi, ve karacięerdeki lezyonlar incelendi. Bu deęerlendirmeler farklı iki uzman tarafından kr bir řekilde yorumlanarak yapıldı. Her iki uzman grūřū de deęerlendirilen gruplardaki sıçanlar için uyumluydu. Askorbik Asit ve Magnezyum ayrı ayrı ve birlikte uygulamasının İ/R indūkleđi karacięerdeki uzak organ hasarını önleyici etkisi tūm örneklerde grūlerek tespit edildi.

Sham grubuna ait karacięer kesitleri incelendięinde dūzgūn hepatosit dizilimi, periferde doęru artan sitoplazmik lipid damlacıkları içeren hūcreler gözlendi. Histopatolojik olarak Sham grubun sıçanların dokularında belirgin bir patolojik bulgu gözlenmedi (Resim-3).



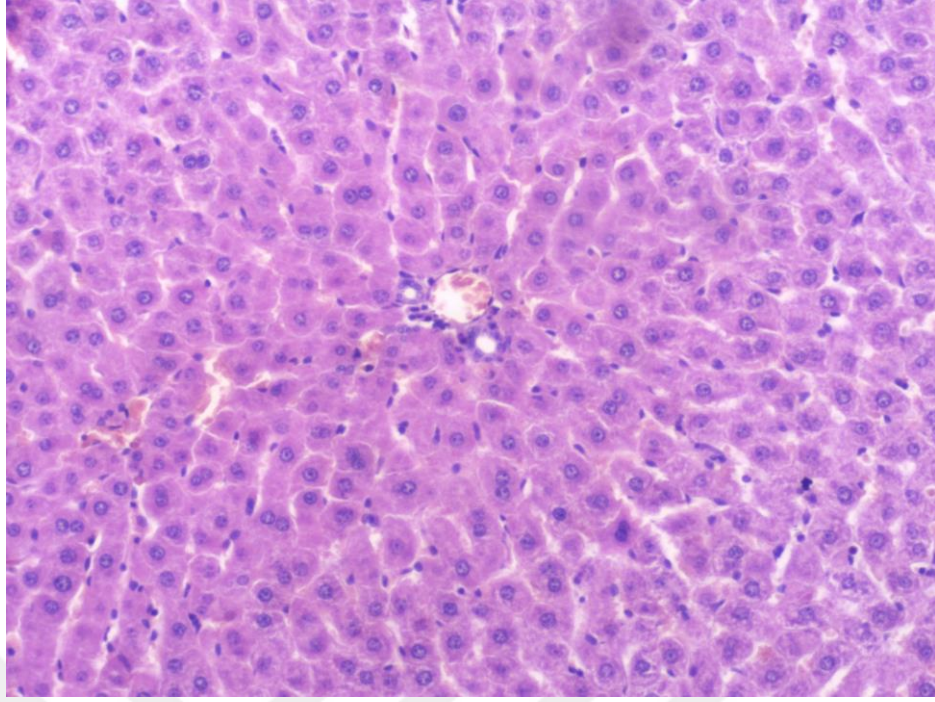
Resim-3. Sham grubuna ait kesit (PV: Portal Ven, SD: Safra Duktusu, A: Arter)

İskemi Reperfüzyon grubuna ait karaciğeri kesitleri incelendiğinde hepatosit sitoplazmasının yoğunlaştığı ve daha eozinofilik boyandığı gözleniyor. Dokuda yer yer piknotik hücreler gözlendi (Resim-4).



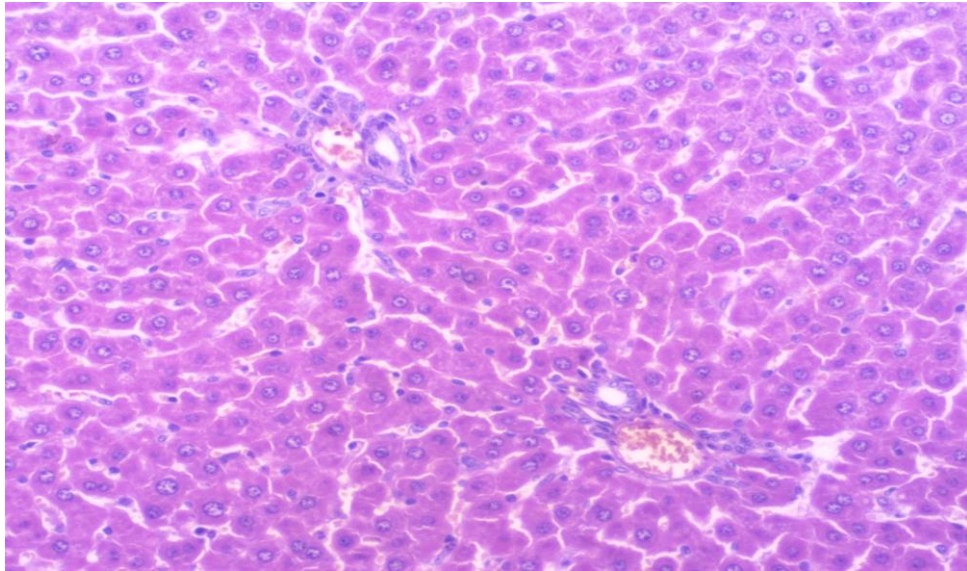
Resim-4. İskemi Reperfüzyon grubuna ait kesit (Siyah ok: Piknotik hücre)

Askorbik asit grubuna ait kesitler incelendiğinde İ/R grubunda görülen hepatosit sitoplazmasındaki yoğunlaşmanın ve eozinofilik boyanmanın belirgin azaldığı gözlendi. Ayrıca İ/R grubunda gözlenen piknotik hücrelerin askorbik asit grubunda daha az oranda gözlendiği görüldü. Doku histolojisi Sham grubuna yakın bulundu (Resim-5).



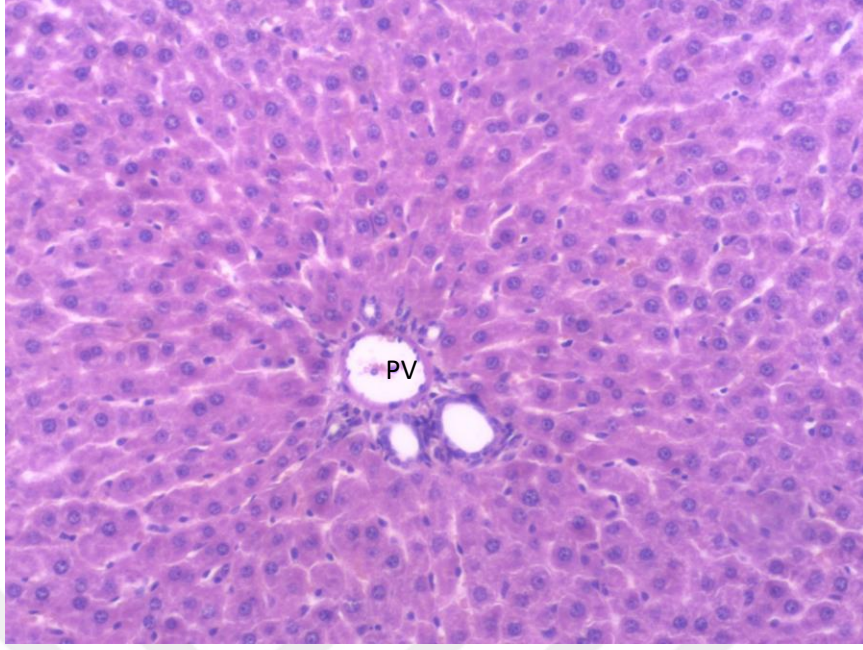
Resim-5. Askorbik asit grubuna ait kesit

Magnezyum grubu'na ait kesitler incelendiğinde İ/R grubunda görülen hepatosit sitoplazmasındaki yoğunlaşmanın ve eozinofilik boyanmanın belirgin azaldığı gözlemlendi. Ayrıca İ/R grubunda gözlenen piknotik hücrelerin magnezyum grubunda daha az oranda gözlemlendiği görüldü. Doku histolojisi Sham grubuna yakın bulundu (Resim-6).



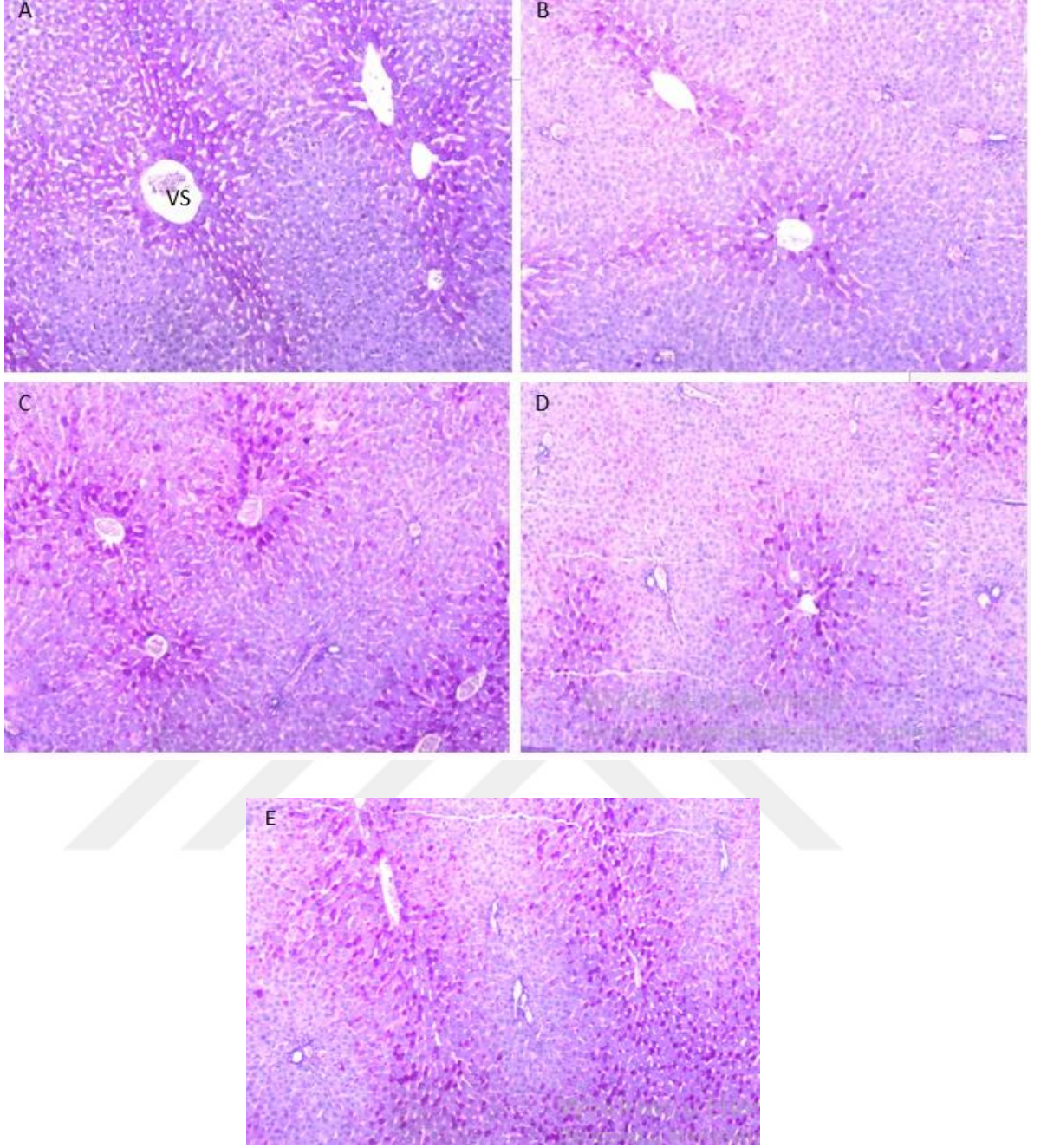
Resim-6: Magnezyum grubuna ait kesit

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



Resim-7: Askorbik asit + magnezyum grubuna ait kesit (PV: Portal ven)

PAS boyamasında. Sham grubunda vena sentralis çevresinde yoğun glikojen içeren hepatositler gözlenirken, İ/R grubunda bu hücrelerin azaldığı gözlemlendi. Askorbik asit, magnezyum sülfat ve askorbik asit+magnezyum sülfat gruplarında gruplarında ise Sham grubuna yakın dağılım gözlemlendi (Resim-8).



Resim-8: PAS boyaması yapılan grupların kesitleri (A:Sham; B:İR; C:Askorbik Asit;D: Magnezyum; E: Askorbik Asit + Magnezyum)

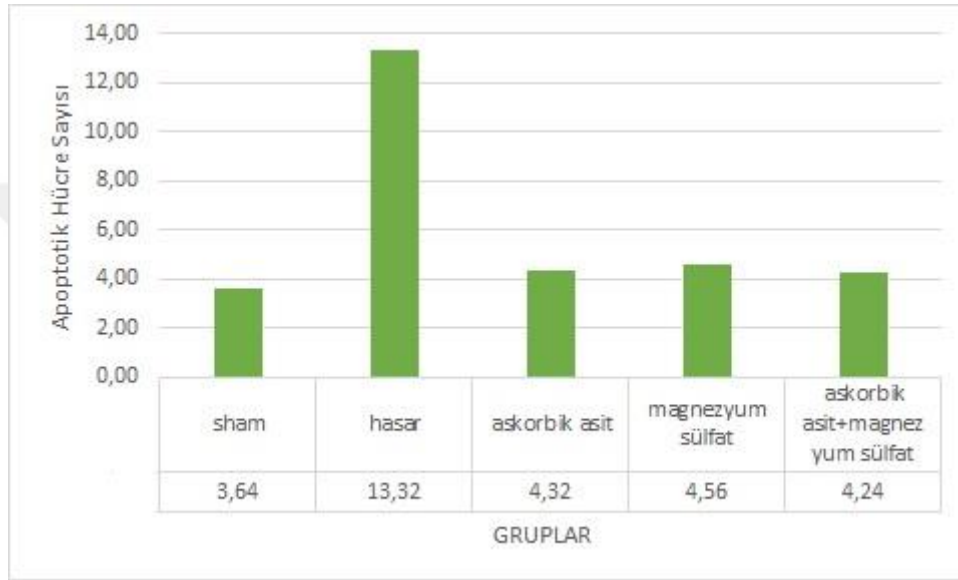
Karaciğer doku incelemesi sonucunda elde edilen TUNEL immünohistokimyasal boyama sonuçlarına göre apoptotik hücre sayıları ortalamaları aşağıdaki Tablo-3'te ve Grafik-5'te sunulmuştur.

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

	Grup Sham (n=7)	Grup İR (n=7)	Grup Askorbik Asit (n=7)	Grup Magnezyum (n=7)	Grup Askorbik Asit + Magnezyum (n=7)	p
Apoptotik Hücre Sayısı	3,64 $\pm$ 0,355*	13,32 $\pm$ 0,449#	4,32 $\pm$ 0,438	4,56 $\pm$ 0,454	4,24 $\pm$ 0,448	0,017

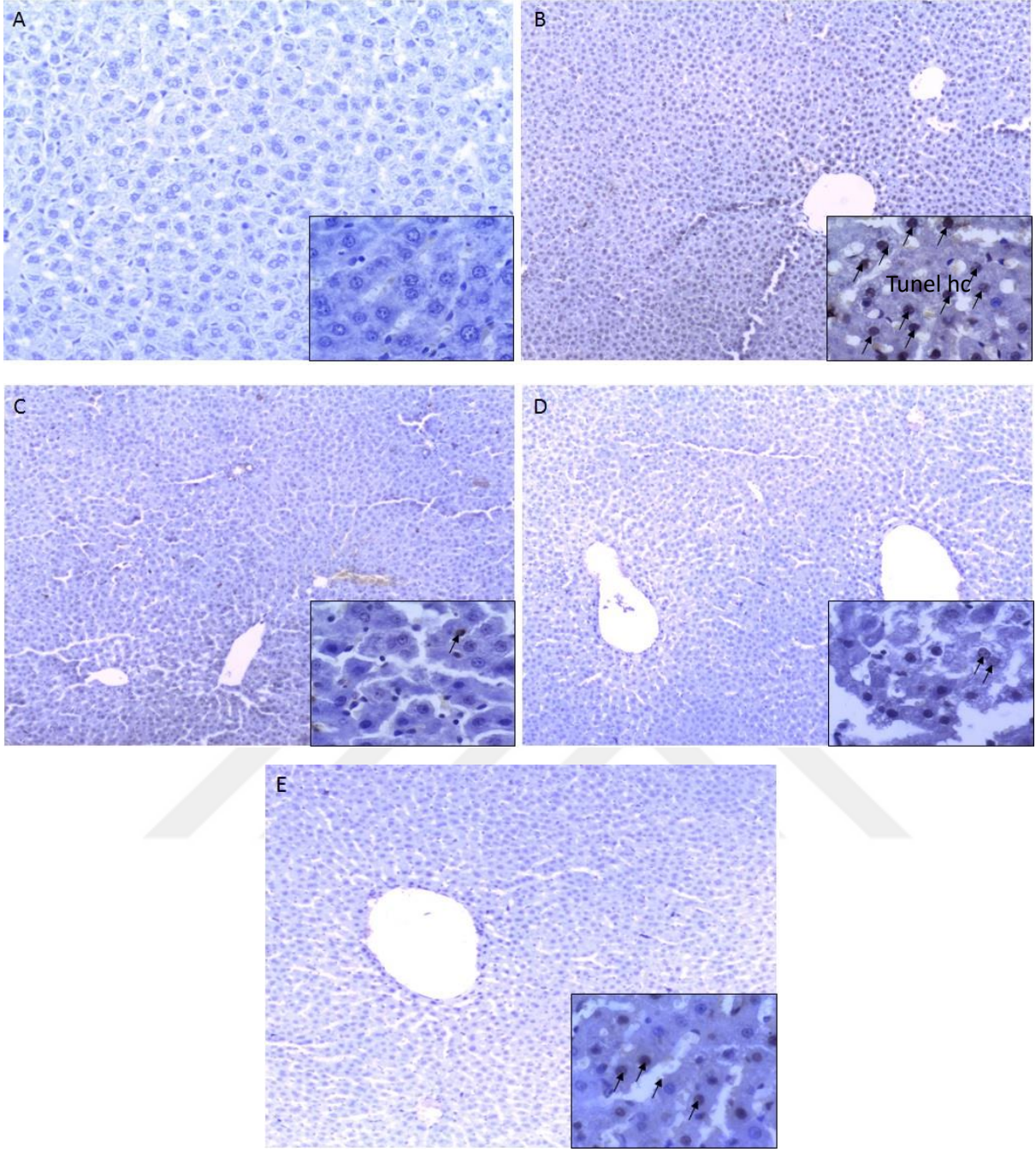
* İR (p<0,001), Sham grubuna kıyasla anlamlı fark.

Askorbik Asit (p<0,001), Magnezyum (p<0,001) ve Askorbik Asit+Magnezyum Grubuna (p< 0,001) kıyasla anlamlı fark.



Grafik-9: TUNEL boyamaya göre apoptotik hücre sayıları

TUNEL boyamaya göre apoptotik hücre sayı ortalamaları karşılaştırıldığında Sham, İ/R, Askorbik Asit, Magnezyum ve Askorbik Asit + Magnezyum grupları arasında ortaya çıkan fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p:0,017). Sham grubundaki ortalama hücre sayılarının İ/R (p<0,001) grubundan anlamlı olarak daha düşük olduğu belirlendi. Bu sonuç İ/R hasarının oluştuğu, böylece deney şartlarının sağlandığı şeklinde yorumlandı. Askorbik Asit (p<0,001), Magnezyum (p<0,001) ve Askorbik Asit + Magnezyum (p<0,001) gruplarının apoptotik hücre sayıları ortalamaları İ/R grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük saptandı. Bu da uygulanan Askorbik Asit ve Magnezyumun apoptotik hücre sayısını benzer derecede azalttığını düşündürdü.



Resim-9. TUNEL incelemesi yapılan grupların kesitleri(A: Grup Sham; B: Grup İR; C: Grup Askorbik Asit; D: Magnezyum; E: Askorbik Asit + Magnezyum)

5. TARTISMA

Sıçanlarda renal iskemi reperfüzyonunun karaciğerde oluşturduğu uzak organ hasarına yönelik, iskemi öncesi uygulanan askorbik asit ve magnezyumun ayrı ayrı ve birlikte uygulanmasının etkinliğinin araştırıldığı bu deneysel çalışmada, her iki ajanın da biyokimyasal parametreler, histomorfolojik ve immünohistolojik sonuçları renal I/R bağlı gelişen uzak organ hasarını koruyucu olarak olumlu yönde değiştirdiği saptanmıştır.

Renal İ/R hasarı deneysel olarak iki farklı yöntemle oluşturulabilir. Bunlardan biri tek taraflı nefrektomi ve karşı taraf renal arter ya da renal pedikül klemplenmesi, diğeri ise bilateral renal pedikül ya da renal arterlerin klemplenmesidir. En çok tanımlanan yöntemlerin sadece renal arterin ya da renal arter ve venin beraber geçici olarak kapatılması olduğu saptanmıştır. Çalışmalardan elde edilen sonuçlar renal arter ve venlerin birlikte klemplenmesinin iskemi hasarını oluşturmada ideal yöntem olduğunu göstermektedir.^{119,120} Bu çalışmada bilateral renal iskemi atravmatik mikrovasküler klemplerle oluşturulmuştur. Akımın durduğu böbrek renginde solukluk ve arteriyel nabzın ortadan kalktığının izlenmesiyle doğrulanmış; iskemi süresinin sonunda klemplerin açılmasıyla kan akımının yeniden başladığı da benzer şekilde fizik muayenede renal pediküllerde arter nabzının alınması ve solukluğun geçmesi ile belirlenmiştir. İskemi reperfüzyon yöntemi kadar renal iskemi süresinin de önemli olduğu belirtilmiştir. Yapılan literatür taramasında İ/R hasarı oluşturmak için farklı süreler kullanıldığı, kullanılan sürenin organa göre de değişiklik gösterdiği saptanmıştır. Kritik iskemi süresi organ bağımlı olup beyinde 5 dak'dan daha fazla iskemi dikkate değer ölçüde nöron ölümü ve infarktüse neden olurken, karaciğer ve böbrek için bu sürenin 15-20 dak olduğu bildirilmiştir.¹⁶ Renal iskemi süresi 30 dakikadan kısa olduğunda oluşan iskeminin karaciğerde yeterince hasar oluşturamadığı gösterilmiştir.¹²¹

Deneysel böbrek İ/R modelinin karaciğerde uzak organ hasarı oluşturmak için farklı iskemi ve reperfüzyon süreleri kullanılmıştır. Kadkhodae ve ark¹²¹ İ/R hasarının karaciğerdeki uzak organ hasarını incelemek için 30 dk, 45 dk ve 60 dk iskemi ve 60 dakikalık reperfüzyon süreleriyle yaptıkları deneyde; 30 dakikalık iskeminin karaciğerde oluşturduğu histolojik ve biyokimyasal hasarın yetersiz olduğunu, böbrek İ/R uzak organ olarak karaciğerdeki etkilerini görmek için en az 45 dakikalık iskemi gerektiğini gösteren veriler elde etmişlerdir. Seifi ve ark.¹²² 45 dakikalık iskemi ile yaptıkları deneyde plazma AST ve ALT seviyelerinin arttığını karaciğerdeki MDA düzeyinin artıp, SOD aktivitesinin azaldığını göstermişlerdir. Bu çalışmada da, literatürden elde edilen bilgiler ışığında 45 dakikalık iskemi süresi uygulanmıştır. Kontrol grubu sonuçları ile karşılaştırıldığında da modelin başarılı olduğu anlaşılmıştır.

Shang ve ark.¹²³ 45 dakikalık iskemi ve 1 ve 6 saatlik reperfüzyon uyguladıkları deneyde hem plazma transaminazlarının yükseldiğini hem de karaciğerde doku hasarı oluştuğunu göstermişlerdir. Wang ve ark.¹²⁴ karaciğerdeki uzak organ hasarını incelemek için 1 saatlik iskemi, 4 saatlik ve 8 saatlik reperfüzyon süreleri ile yaptıkları deneyde 4 saatlik reperfüzyonda ALT ve AST değerlerinin pik değerlerinin görüldüğü ve karaciğerin histolojik incelemesinde fokal hepatoselüler nekroz ve yağlı dejenerasyonun oluştuğunu belirtmişlerdir. Bu veriler ile uyumlu olarak çalışmamızdaki deneysel modelde 4 saatlik reperfüzyon süresi tercih edilmiştir.

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

Literatürde sıçan renal İR bağlı karaciğer uzak hasarından koruyucu olarak farmakolojik ajanların kullanıldığı çalışmalar söz konusudur. Ancak, hem bu çalışmalarda araştırılan ajanlar çok çeşitlidir hem de çalışmalarda belli bir standart bulunmamaktadır. Foster ve ark.²⁴ FTY720 isimli sfingolipid immun modulatorü kullanarak renal iskemi reperfüzyon modelinde karaciğere etkisini araştırdıkları araştırmada FTY720 tedavisinin hepatoselüler dejenerasyonunu ve karaciğer hasarı serum belirteçlerini (ALT/AST) azalttığını göstermiştir. Zhang ve ark.¹²⁵ nervus vagus uyarısının akut hepatik İR modeline uygulandığında; karaciğerdeki inflamasyonu, oksidatif stres ve apoptozu inhibe ederek hepatik İR hasarını önemli ölçüde hafiflettiğini göstermişler. Vagus uyarısının karaciğerdeki Nrf2 / HO-1 yolunu belirgin şekilde aktive ettiğini göstermişler ve Nrf2 / HO-1 sinyalini geliştirerek hepatik İR hasarına karşı koruyabileceğini belirtmişler. Lai ve ark.⁹ yaptığı çalışmada nervus vagus uyarısının oksidatif stres ve apoptozun inhibe edilmesini, enflamatuar sitokinlerin indirgenmesini ve karaciğerdeki antioksidan kapasitenin artırılması yoluyla renal İR'den karaciğer hasarına karşı koruyucu etkileri olduğunu göstermişler ve akut böbrek hasarı ile indüklenen karaciğer hasarını tedavi etmek için umut verici bir adjuvan tedavi stratejisi haline gelebileceğini belirtmişlerdir. Elshazly ve ark.²³ yaptıkları çalışmada PPAR γ agonisti, pioglitazonun, karaciğer iltihabını ve oksidatif stresi azalttığını ve böbrek İR hasarında karaciğer fonksiyonunu iyileştirdiğini göstermişlerdir. Bu nedenle, PPAR γ agonist uygulaması, böbrek İR' nu geçiren hastalarda hem karaciğeri hem de böbreği korumak için potansiyel bir yaklaşım sağlayabildiğini göstermişlerdir. Akbulut ve ark.¹²⁶ koenzim Q10'un renal İR sonrası ortaya çıkan karaciğer hasarını önlemesini inceledikleri araştırmada, koenzim Q10 verilen grubun İR grubuna göre ALT, AST, GGT, ALP düzeylerinin anlamlı derecede düşük olduğunu,

dokudaki oksidatif stresi gösteren MDA, MPO ve nitrit düzeylerini de yine İ/R grubuna göre daha düşük olduğunu gösteren veriler elde ettiler. Ayrıca İ/R grubunda karaciğer doku incelemesinde görülen belirgin hiperemi, sitoplazmik vakuolleşme, dejenerasyon ve nekrozun koenzim Q10 verilen grupta gerilediğini göstermişlerdir. Khastar ve ark.¹²⁷ E vitaminin renal İ/R bağlı karaciğer uzak organ hasarına etkisini inceledikleri araştırmada E vitaminin İ/R neden olduğu plazma ALT, AST yüksekliğini azalttığı, artmış MDA düzeylerini de düşürdüğü görüldü. Bu bulgularla E vitaminin İ/R 'a bağlı karaciğer hasarını azalttığı gösterilmiştir.

İskemi reperfüzyon sonucunda oluşan mitokondriyal hasarlanmanın patogenezinde SOR'nin aşırı üretiminin ve antioksidan enzimlerin rolünün belirlenmesi antioksidan ve serbest radikal önleyici tedavileri gündeme getirmiştir. Renal İ/R bağlı karaciğerde oluşan uzak organ hasarını önlemek veya tedavi etmek amacıyla bu deneyde uyguladığımız yöntemlerden biri olan askorbik asitin böbrek ve karaciğer İ/R hasarındaki olumlu etkileri daha önce yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir. Seo ve ark.¹¹⁰ ratlarda hepatik iskemi reperfüzyon hasarını değerlendirdikleri çalışmalarında, iskemiden 5 dk önce 30 mg/kg, 100 mg/kg, 300 mg/kg ve 1000 mg/kg dozlarını dört farklı gruba uygulamışlardır. Düşük dozlarda antioksidan etkinlik gösterilmişken, yüksek doz uygulamada ise preoksidan etkilerinin olduğu göstermişlerdir. Tata ve ark.²² ratlara iskemiden 20 dk önce 125, 250 ve 500 mg/kg askorbik asit vererek karaciğer İ/R hasarını koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmalarında, askorbik asit verilen grup ile İ/R grubu arasında karaciğer GSH düzeylerinde önemli bir düşüş görüldüğünü bu sonucun askorbik asidin karaciğer hepatositlerinin maruz kaldığı oksidatif stresi azalttığı şekilde yorumlamışlardır. Bu literatürler göz önünde bulunularak bu çalışmada da askorbik asit dozu 250 mg/kg olarak seçilmiştir. Lee ve ark.¹¹¹ iskemik önkoşullama ve askorbik asidin karaciğer İ/R hasarı üzerine yaptıkları çalışmada, İ/R sırasında artan mitokondriyal hasar seviyesini sinerjistik olarak azalttığını göstermişlerdir. Histolojik değerlendirmede de askorbik asit ve iskemik önkoşullama yapılan grubun karaciğer dokusunda İ/R grubuna kıyasla daha az apoptoz ve nekroz olduğu görüldü. . Çalışmamızda da Hematoksilen&Eozin (H&E) ve Periyodik Asit Schiff (PAS) boyamaları kesitlerini iki uzman histolog yorumları sonucunda değerlendirilmiştir. Histomorfolojik inceleme sonrası askorbik asit ve magnezyumun renal İ/R bağlı karaciğerdeki uzak organ hasarını azalttığı ya da koruduğu gösterilmiştir. Yaptığımız çalışmada Askorbik Asit verilen grupta yapılan biyokimyasal değerlendirmede IR grubuna kıyasla ALT,AST,MDA,Kaspaz-3 ve SOD düzeylerinde anlamlı düşüş görülmüş bu veriler askorbik asidin karaciğerdeki uzak organ hasarını azalttığını göstermiştir.

Renal İ/R bağı karaciğerde oluşan uzak organ hasarını önlemek veya tedavi etmek amacıyla araştırdığımız diğer ajan olan magnezyumun İ/R hasarındaki olumlu etkileri de daha önce yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir. Magnezyum sülfatın farklı organ İR hasarı tedavilerinde farklı dozlarda kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Kao ve ark.²¹ bilateral alt ekstremité İ/R hasarına bağı akciğer hasarında 100 mg/kg i.v. magnezyum sülfat uygulanmış ve İ/R hasarına bağı akut akciğer hasarının azaldığını göstermişlerdir. Kaptanoğlu ve ark.¹¹⁸ intrauterin İ/R hasarında magnezyum sülfatın fetal deride koruyuculuk sağladığını göstermişlerdir.

Bu çalışmada kullandığımız 200 mg/kg'lık magnezyum dozu, literatürde önerilen dozlardan seçilmiştir.^{19,117} Magnezyum daha önce renal İ/R renal hasara etkileri ve karaciğer İ/R karaciğer hasarı etkileri üzerine araştırılmış iken renal İ/R bağı karaciğerdeki uzak organ hasarına etkisini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Sit ve ark.¹¹⁷ magnezyum sülfatın karaciğer İ/R hasarı üzerine araştırdıkları araştırmada, iskemiden 1 saat önce 200 mg/kg İ.P magnezyum sülfat verilmiş; magnezyum sülfat uygulanan grupta AST ve INR düzeylerinin İ/R grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldığı, ayrıca immunohistolojik incelemede yine İ/R grubunda görülen apoptoz ve nekrozun magnezyum sülfat uygulanan grupta anlamlı olarak azaldığını gösteren veriler elde ettikleri görülmüştür.

Akan ve ark.¹⁹ in magnezyum sülfatın diyabetik sıçanlarda oluşturulan İ/R hasarında koruyucu etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında, iskemiden 5 dakika önce 200 mg/kg İ.P. magnezyum sülfat uygulanmış ve histomorfolojik olarak akut böbrek hasarını azalttığı yönünde veriler elde etmişlerdir.Çalışmamızda da Magnezyum ve Askorbik Asit +Magnezyum verilen grupta yapılan biyokimyasal değerlendirmede İ/R Grubuna kıyasla , ALT,AST ve SOD düzeylerinde anlamlı bir düşme görülürken, glutatyon düzeyinde anlamlı artış görülmüştür,bu veriler magnezyumun İ/R indüklediği karaciğerdeki uzak organ hasarını azalttığını göstermiştir. Hematoksilen&Eozin (H&E) ve Periyodik Asit Schiff (PAS) boyamaları ile TUNEL immün boyama sonuçları da İ/R hasarında anlamlı bir azalmaya yol açtığı bulunmuştur. TUNEL yöntemi DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlar. İn situ DNA fragmantasyonu TdT-(terminal deoksinükleotidil transferaz) aracılı floresan dUTP işaretleme(TUNEL) yöntemiyle belirlenir, apoptozisin varlığı bu metodla saptanabilir.¹²⁸ Bu çalışmada İ/R grubunda TUNEL pozitif hücreler açısından sham grubuna göre belirgin bir artış olduğu gözlenmiş; magnezyum ve askorbik asidin ayrı ayrı ve birlikte uygulamasının apoptotik hücre sayısında İ/R grubuna kıyasla anlamlı bir azalmaya yol açtığı saptanmıştır. Apoptozda saptanan bu anlamlı azalma İ/R hasarında önemli bir yolak olan apoptozun askorbik asit ve magnezyumun ayrı ayrı veya birlikte uygulayarak önlenebileceğini gösteren veriler elde edilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sıçanlarda oluşturulan İ/R modelinde 250 mg/kg askorbik asit ve 200 mg/kg magnezyum sülfat uygulamalarının karaciğerde oluşan uzak hasarına etkisinin araştırıldığı bu çalışmada, doku MDA, GSH, kaspaz 3 ve SOD, kanda ise ALT, AST, Albumin, total bilirubin ölçümleri ile histomorfolojik ve immünohistolojik inceleme sonuçları değerlendirilmiştir.

Sıçanlarda oluşturulan renal İ/R modelinde iskemi öncesi 250 mg/kg askorbik asit ve 200 mg/kg magnezyumun ayrı ayrı ve birlikte uygulanmasının karaciğerde oluşan uzak organ hasarını azalttığı saptanmıştır.

Böbrek İ/R bağlı karaciğerde oluşan uzak organ hasarını önlemek için iskemi öncesi askorbik asit ve magnezyum sülfat uygulamasının basit, noninvaziv ve güvenli bir yöntem olabileceği düşünülmektedir. Ancak bu uygulamanın etki mekanizmaları ve etkinlikleri açısından farklarının ortaya konacağı, insandaki doz ve sürelerinin belirleneceği daha ayrıntılı çalışmalara gereksinim vardır.

7.KAYNAKLAR

1. Hoke TS, Douglas IS, Klein CL, et al. Acute Renal Failure after Bilateral Nephrectomy Is Associated with Cytokine-Mediated Pulmonary Injury. :155-164.
doi:10.1681/ASN.2006050494
2. Hoste EAJ, Clermont G, Kersten A, et al. RIFLE criteria for acute kidney injury are associated with hospital mortality in critically ill patients : a cohort analysis. 2006;10(3):1-10. doi:10.1186/cc4915
3. Fliser D, Kielstein JT. Technology Insight : treatment of renal failure in the intensive care unit with extended dialysis. 2006;2(1):32-39. doi:10.1038/ncpneph0060
4. Johnson KJ, Weinberg JM. Postischemic renal injury due to oxygen radicals. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1993;2(4):625-635. doi:10.1097/00041552-199307000-00014
5. Bonventre J V. Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int*. 1993;43(5):1160-1178. doi:10.1038/ki.1993.163
6. Kehrer JP. Free Radicals as Mediators of Tissue Injury and Disease. *Crit Rev Toxicol*. 1993;23(1):21-48. doi:10.3109/10408449309104073
7. Singh I, Gulati S, Orak JK, Singh AK. Expression of antioxidant enzymes in rat kidney during ischemia-reperfusion injury. *Mol Cell Biochem*. 1993;125(2):97-104.
doi:10.1007/bf00936438
8. Malis CD, Weber PC, Leaf A, et al. Incorporation of marine lipids into mitochondrial membranes increases susceptibility to damage by calcium and reactive oxygen species: evidence for enhanced activation of phospholipase A2 in mitochondria enriched with n-3 fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(22):8845-8849.
doi:10.1073/pnas.87.22.8845
9. Lai Y, Deng J, Wang M, et al. Vagus nerve stimulation protects against acute liver injury induced by renal ischemia reperfusion via antioxidant stress and anti-inflammation. *Biomed Pharmacother*. 2019;117(May):109062.
doi:10.1016/j.biopha.2019.109062
10. McMichael M, Moore RM. Ischemia-reperfusion injury pathophysiology, part I. *J Vet Emerg Crit Care*. 2004.

11. Chatterjee PK. Novel pharmacological approaches to the treatment of renal ischemia-reperfusion injury: a comprehensive review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2007;376(1-2):1-43. doi:10.1007/s00210-007-0183-5
12. Domanski L, Sulikowski T, Safranow K, et al. Effect of trimetazidine on the nucleotide profile in rat kidney with ischemia–reperfusion injury. *Eur J Pharm Sci.* 2006;27(4):320-327. doi:10.1016/j.ejps.2005.10.012
13. Taha MO, Souza HS, Carvalho CA, et al. Cytoprotective effects of ascorbic acid on the ischemia-reperfusion injury of rat liver. *Transplant Proc.* 2004;36(2):296-300. doi:10.1016/j.transproceed.2004.01.096
14. Lehr H-A, Frei B, Olofsson AM, et al. Protection From Oxidized LDL–Induced Leukocyte Adhesion to Microvascular and Macrovascular Endothelium In Vivo by Vitamin C but Not by Vitamin E. *Circulation.* 1995;91(5):1525-1532. doi:10.1161/01.cir.91.5.1525
15. Azari O, Kheirandish R, Azizi S, et al. M. Protective Effects of Hydrocortisone, Vitamin C and E Alone or in Combination against Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Rat. *Iran J Pathol.* 2015;10(4):272-280.
16. Oudemans-van Straaten HM, Spoelstra-de Man AME, de Waard MC. Vitamin C revisited. *Crit Care.* 2014;18(4):1-13. doi:10.1186/s13054-014-0460-x
17. Mohamed AEHA, Lasheen NN. Comparative study on the protective role of vitamin C and L-arginine in experimental renal ischemia reperfusion in adult rats. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2014;6(3):153-165.
18. Gröber U, Schmidt J, Kisters K. Magnesium in Prevention and Therapy. *Nutrients.* 2015;7(9):8199-8226. doi:10.3390/nu7095388
19. Akan M, Ozbilgin S, Boztas N, et al. Effect of magnesium sulfate on renal ischemia-reperfusion injury in streptozotocin-induced diabetic rats. 2016:1642-1655.
20. Pundir M, Arora S, Kaur T, et al. Effect of modulating the allosteric sites of N-methyl-D-aspartate receptors in ischemia-reperfusion induced acute kidney injury. *J Surg Res.* 2013;183(2):668-677. doi:10.1016/j.jss.2013.01.040
21. Kao M, Jan W, Ph D, et al. Magnesium Sulfate Mitigates Lung Injury Induced by Bilateral Lower Limb Ischemia-Reperfusion in Rats. *J Surg Res.* 2011;171(1):e97-

e106. doi:10.1016/j.jss.2011.03.028

22. Tata V De, Brizzi S, Saviozzi M, et al. Protective Role of Dehydroascorbate in Rat Liver Ischemia-Reperfusion Injury. 2005;221:215-221. doi:10.1016/j.jss.2004.08.008
23. Elshazly S, Soliman E. PPAR gamma agonist , pioglitazone , rescues liver damage induced by renal ischemia / reperfusion injury. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2019;362(October 2018):86-94. doi:10.1016/j.taap.2018.10.022
24. Foster AD, Vicente D, Clark N, et al. FTY720 Effects on Inflammation and Liver Damage in a Rat Model of Renal Ischemia-Reperfusion Injury. 2019;2019.
25. Atila K, Çoker A, Sagol O, et al. Protective effects of carnitine in an experimental ischemia-reperfusion injury. *Clin Nutr*. 2002;21(4):309-313. doi:10.1054/clnu.2002.0544
26. Huang SS, Wei FC, Hung LM. Ischemic preconditioning attenuates postischemic leukocyte-endothelial cell interactions - Role of nitric oxide and protein kinase C. *Circ J*. 2006;70(8):1070-1075. doi:10.1253/circj.70.1070
27. Olguner Ç, Koca U, Kar A, et al. Ischemic preconditioning attenuates the lipid peroxidation and remote lung injury in the rat model of unilateral lower limb ischemia reperfusion. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2006;50(2):150-155. doi:10.1111/j.1399-6576.2006.00938.x
28. Cocco T, Di M, Papa P, Lorusso M. Arachidonic acid interaction with the mitochondrial electron transport chain promotes reactive oxygen species generation. *Free Radic Biol Med*. 1999;27(1-2):51-59. doi:10.1016/S0891-5849(99)00034-9
29. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 1986;250(6 (13/6)):G749-G753. doi:10.1152/ajpgi.1986.250.6.g749
30. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology*. 2001;94(6):1133-1138. doi:10.1097/00000542-200106000-00030
31. Şener G, Yeğen BÇ. İskemi Reperfüzyon Hasarı.
32. Howell JG, Zibari GB, Brown MF, et al. Both ischemic and pharmacological

- preconditioning decrease hepatic leukocyte/endothelial cell interactions.
Transplantation. 2000;69(2):300-303. doi:10.1097/00007890-200001270-00017
33. Toyokuni S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int*. 1999;49(2):91-102. doi:10.1046/j.1440-1827.1999.00829.x
 34. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia–reperfusion injury. *J Pathol*. 2000;190(3):255-266. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(200002)190:3<255::AID-PATH526>3.0.CO;2-6
 35. Panés J, Perry M, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell adhesion: Avenues for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol*. 1999;126(3):537-550. doi:10.1038/sj.bjp.0702328
 36. Ichimiya M, Chang SH, Liu H, et al. Effect of Bcl-2 on oxidant-induced cell death and intracellular Ca²⁺ mobilization. *Am J Physiol Physiol*. 1998;275(3):C832-C839. doi:10.1152/ajpcell.1998.275.3.c832
 37. Ankarcrona M, Dypbukt JM, Orrenius S, Nicotera P. Calcineurin and mitochondrial function in glutamate-induced neuronal cell death. *FEBS Lett*. 1996;394(3):321-324. doi:10.1016/0014-5793(96)00959-3
 38. Salvemini D, Muscoli C, Riley DP, Cuzzocrea S. Superoxide Dismutase Mimetics. *Pulm Pharmacol Ther*. 2002;15(5):439-447. doi:10.1006/pupt.2002.0374
 39. Kaminski KA, Bonda TA, Korecki J, et al. Oxidative stress and neutrophil activation—the two keystones of ischemia/reperfusion injury. *Int J Cardiol*. 2002;86(1):41-59. doi:10.1016/s0167-5273(02)00189-4
 40. Grisham MB, Hernandez LA, Granger DN. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am J Physiol Liver Physiol*. 1986;251(4):G567-G574. doi:10.1152/ajpgi.1986.251.4.g567
 41. Schmid-Schönbein GW, Engler RL. Microcirculation in acute ischemia and the no-reflow phenomenon. *Ann Biomed Eng*. 1987;15(1):107-110. doi:10.1007/bf02364173
 42. de Perrot M, Liu M, Waddell TK, et al. Ischemia–Reperfusion–induced Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(4):490-511. doi:10.1164/rccm.200207-670so
 43. Pan J, Konstas A-A, Bateman B, Ortolano GA, et al. Reperfusion injury following

- cerebral ischemia: pathophysiology, MR imaging, and potential therapies. *Neuroradiology*. 2007;49(2):93-102. doi:10.1007/s00234-006-0183-z
44. Dworakowski R, Walker S, Momin A, et al. Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase-Derived Superoxide and Vascular Endothelial Dysfunction in Human Heart Failure. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(14):1349-1356. doi:10.1016/j.jacc.2007.12.033
 45. Rodrigues SF, Granger DN. Role of blood cells in ischaemia-reperfusion induced endothelial barrier failure. *Cardiovasc Res*. 2010;87(2):291-299. doi:10.1093/cvr/cvq090
 46. Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg*. 2001;181(2):160-166. doi:10.1016/s0002-9610(00)00573-0
 47. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, et al. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2012;298:229-317. doi:10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7
 48. Metnitz PGH, Krenn CG, Steltzer H, et al. Effect of acute renal failure requiring renal replacement therapy on outcome in critically ill patients*. *Crit Care Med*. 2002;30(9):2051-2058. doi:10.1097/00003246-200209000-00016
 49. Chertow GM, Burdick E, Honour M, et al. Acute Kidney Injury, Mortality, Length of Stay, and Costs in Hospitalized Patients. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(11):3365-3370. doi:10.1681/asn.2004090740
 50. Mandelbaum T, Scott DJ, Lee J, et al. Outcome of critically ill patients with acute kidney injury using the Acute Kidney Injury Network criteria. *Crit Care Med*. 2011;39(12):2659-2664. doi:10.1097/CCM.0b013e3182281f1b
 51. Zeng X, McMahon GM, Brunelli SM, Bates DW, et al. Incidence, outcomes, and comparisons across definitions of AKI in hospitalized individuals. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014;9(1):12-20. doi:10.2215/CJN.02730313
 52. Susantitaphong P, Cruz DN, Cerda J, et al. World incidence of AKI: a meta-analysis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013;8(9):1482-1493. doi:10.2215/CJN.00710113
 53. Wald R, McArthur E, Adhikari NKJ, et al. Changing Incidence and Outcomes Following Dialysis-Requiring Acute Kidney Injury Among Critically Ill Adults: A Population-Based Cohort Study. *Am J Kidney Dis*. 2015;65(6):870-877.

doi:10.1053/j.ajkd.2014.10.017

54. Chao C-T, Hou C-C, Wu V-C, et al. The impact of dialysis-requiring acute kidney injury on long-term prognosis of patients requiring prolonged mechanical ventilation: nationwide population-based study. *PLoS One*. 2012;7(12):e50675-e50675. doi:10.1371/journal.pone.0050675
55. Chertow GM. Prognostic stratification in critically ill patients with acute renal failure requiring dialysis. *Arch Intern Med*. 1995;155(14):1505-1511. doi:10.1001/archinte.155.14.1505
56. Neveu H, Kleinknecht D, Brivet F, et al. Prognostic factors in acute renal failure due to sepsis. Results of a prospective multicentre study. *Nephrol Dial Transplant*. 1996;11(2):293-299. doi:10.1093/oxfordjournals.ndt.a027256
57. Silvester W, Bellomo R, Cole L. Epidemiology, management, and outcome of severe acute renal failure of critical illness in Australia. *Crit Care Med*. 2001;29(10):1910-1915. doi:10.1097/00003246-200110000-00010
58. Bagshaw SM, Mortis G, Godinez-Luna T, et al. Renal Recovery after Severe Acute Renal Failure. *Int J Artif Organs*. 2006;29(11):1023-1030. doi:10.1177/039139880602901102
59. Zarbock A, Schmolke M, Spieker T, et al. Acute Uremia but Not Renal Inflammation Attenuates Aseptic Acute Lung Injury: A Critical Role for Uremic Neutrophils. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(11):3124-3131. doi:10.1681/asn.2006040358
60. Godet C, Goujon J-M, Petit I, et al. endotoxin tolerance enhances interleukin-10 renal expression and decreases ischemia-reperfusion renal injury in rats. *Shock*. 2006;25(4):384-388. doi:10.1097/01.shk.0000209528.35743.54
61. Hoke TS, Douglas IS, Klein CL, et al. Acute Renal Failure after Bilateral Nephrectomy Is Associated with Cytokine-Mediated Pulmonary Injury. *J Am Soc Nephrol*. 2006;18(1):155-164. doi:10.1681/asn.2006050494
62. Guarnieri G, Biolo G, Zanetti M, Barazzoni R. Chronic systemic inflammation in uremia: Potential therapeutic approaches. *Semin Nephrol*. 2004;24(5):441-445. doi:10.1016/j.semnephrol.2004.06.007
63. Kaushal GP, Liu L, Kaushal V, et al. Regulation of caspase-3 and -9 activation in

- oxidant stress to RTE by forkhead transcription factors, Bcl-2 proteins, and MAP kinases. *Am J Physiol Physiol*. 2004;287(6):F1258-F1268.
doi:10.1152/ajprenal.00391.2003
64. Grams ME, Rabb H. The distant organ effects of acute kidney injury. *Kidney Int*. 2012;81(10):942-948. doi:10.1038/ki.2011.241
 65. Ologunde R, Zhao H, Lu K ,et al. Organ cross talk and remote organ damage following acute kidney injury. *Int Urol Nephrol*. 2014;46(12):2337-2345. doi:10.1007/s11255-014-0766-2
 66. Nongnuch A, Panorchan K, Davenport A. Brain-kidney crosstalk. *Crit Care*. 2014;18(3):225. doi:10.1186/cc13907
 67. Virzì G, Day S, de Cal M, et al. Heart-kidney crosstalk and role of humoral signaling in critical illness. *Crit Care*. 2014;18(1):201. doi:10.1186/cc13177
 68. Basu RK, Wheeler DS. Kidney-lung cross-talk and acute kidney injury. *Pediatr Nephrol*. 2013;28(12):2239-2248. doi:10.1007/s00467-012-2386-3
 69. Yap SC, Lee HT. Acute Kidney Injury and Extrarenal Organ Dysfunction. *Anesthesiology*. 2012;116(5):1139-1148. doi:10.1097/aln.0b013e31824f951b
 70. Mizutani A, Okajima K, Uchiba M, et al. Activated protein C reduces ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats by inhibiting leukocyte activation (Blood (2000) 95:12 (3781-3787)). *Blood*. 2013;122(2):302. doi:10.1182/blood-2013-03-493585
 71. Serteser M, Koken T, Kahraman A, et al. Changes in Hepatic TNF- α Levels, Antioxidant Status, and Oxidation Products after Renal Ischemia/Reperfusion Injury in Mice. *J Surg Res*. 2002;107(2):234-240. doi:10.1006/jsre.2002.6513
 72. Golab F, Kadkhodae M, Zahmatkesh M, et al. Ischemic and non-ischemic acute kidney injury cause hepatic damage. *Kidney Int*. 2009;75(8):783-792. doi:10.1038/ki.2008.683
 73. Kadkhodae M, Khastar H, Arab HA, et al. M. Antioxidant Vitamins Preserve Superoxide Dismutase Activities in Gentamicin-Induced Nephrotoxicity. *Transplant Proc*. 2007;39(4):864-865. doi:10.1016/j.transproceed.2007.02.038

74. Nafar M, Samavat S. Biomarkers in Kidney Transplantation. *Biomarkers Kidney Dis.* 2015;1-24. doi:10.1007/978-94-007-7743-9_29-1
75. Onat T, Emerk K, Sözmen EY. İnsan biyokimyası. *Palme yayıncılık.* 2002;666.
76. Özdem SS, Şadan G. Serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve klinik açıdan önemi. *Akdeniz Üniv Tıp Fak Derg.* 1994;11:63-71.
77. Colleen S. Marks' Temel Tıbbi Biyokimyası-Klinik Yaklaşım. *Baskı, Ankara Güneş Tıp Yayınları.* 2007.
78. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci IJBS.* 2008;4(2):89.
79. Janssen YM, Van Houten B, Borm PJ, et al.. Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab Invest.* 1993;69(3):261.
80. Sardesai VM. Role of Antioxidants in Health Maintenance. *Nutr Clin Pract.* 1995;10(1):19-25. doi:10.1177/011542659501000119
81. Genestra M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal.* 2007;19(9):1807-1819. doi:10.1016/j.cellsig.2007.04.009
82. Katz D, Mazor D, Dvilansky A, et al. Effect of Radiation on Red Cell Membrane and Intracellular Oxidative Defense Systems. *Free Radic Res.* 1996;24(3):199-204. doi:10.3109/10715769609088017
83. Sözmen EY. Yaşlanma biyokimyası. *İnsan Biyokim Palme Yayıncılık, Ankara pp.* 2002:665-674.
84. Kellogg EW, Fridovich I. Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymically generated superoxide and hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* 1977;252(19):6721-6728.
85. CROSS CE. Oxygen Radicals and Human Disease. *Ann Intern Med.* 1987;107(4):526. doi:10.7326/0003-4819-107-4-526
86. Bianchi G, Bugianesi E, Ronchi M, et al. Glutathione kinetics in normal man and in patients with liver cirrhosis. *J Hepatol.* 1997;26(3):606-613. doi:10.1016/s0168-8278(97)80426-6
87. Konstantynowicz J, Lebensztejn DM, Skiba E, et al. Prevalence of fractures in children with chronic viral hepatitis and liver fibrosis. *Bone.* 2009;45:S74.

doi:10.1016/j.bone.2009.04.087

88. Bao YP, Williamson G, Tew D, et al. Antioxidant effects of propofol in human hepatic microsomes: concentration effects and clinical relevance. *Br J Anaesth.* 1998;81(4):584-589. doi:10.1093/bja/81.4.584
89. Maeda H, Akaike T. Oxygen Free Radicals as Pathogenic Molecules in Viral Diseases. *Exp Biol Med.* 1991;198(2):721-727. doi:10.3181/00379727-198-43309c
90. Akaike T, Suga M, Maeda H. Free Radicals in Viral Pathogenesis: Molecular Mechanisms Involving Superoxide and NO. *Exp Biol Med.* 1998;217(1):64-73. doi:10.3181/00379727-217-44206
91. Williams P, Lopez H, Britt D, et al. *Characterization of Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats.*
92. Becker LB. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res.* 2004;61(3):461-470. doi:10.1016/j.cardiores.2003.10.025
93. Sen S, Chakraborty R. The role of antioxidants in human health. *ACS Symp Ser.* 2011;1083:1-37. doi:10.1021/bk-2011-1083.ch001
94. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, et al. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res.* 1995;18(1):1-11. doi:10.1111/j.1600-079X.1995.tb00133.x
95. Ross D. Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents. Mechanisms of free-radical induced toxicity and glutathione-dependent protection. *Pharmacol Ther.* 1988;37(2):231-249. doi:10.1016/0163-7258(88)90027-7
96. Laurikka J, Wu ZK, Iisalo P, et al. Regional ischemic preconditioning enhances myocardial performance in off-pump coronary artery bypass grafting. *Chest.* 2002;121(4):1183-1189. doi:10.1378/chest.121.4.1183
97. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986;74(5):1124-1136. doi:10.1161/01.CIR.74.5.1124
98. Avi R, Hadhani T, Anuel M, et al. *MEDICAL PROGRESS ACUTE RENAL FAILURE A.*; 1996.

99. Bouchard JF, Lamontagne D. Mechanisms of protection afforded by preconditioning to endothelial function against ischemic injury. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 1996;271(5 40-5).
100. Tapuria N, Kumar Y, Habib MM, et al. Remote Ischemic Preconditioning: A Novel Protective Method From Ischemia Reperfusion Injury-A Review. *J Surg Res*. 2008. doi:10.1016/j.jss.2007.12.747
101. Jerome SN, Akimitsu T, Gute DC, et al. Ischemic preconditioning attenuates capillary no-reflow induced by prolonged ischemia and reperfusion. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 1995;268(5 37-5).
102. Lochner A, Marais E, Genade S, et al. *Nitric Oxide: A Trigger for Classic Preconditioning?* Vol 279.; 2000.
103. Peralta C, Closa D, Xaus C, et al. Hepatic preconditioning in rats is defined by a balance of adenosine and xanthine. *Hepatology*. 1998;28(3):768-773. doi:10.1002/hep.510280325
104. Chiao H, Kohda Y, McIeroy P, et al. *Melanocyte-Stimulating Hormone in Renal Ischemia 1165*. Vol 99.; 1997.
105. Curtis FG, Vianna PT VR. Dexmedetomidine and S(+)-ketamine in ischemia and reperfusion injury in the rat kidney. *Acta Cir Bras* . 2011;26(3):202-206.
106. Kloner RA, Bolli R, Marban E ,et al. Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: An NHLBI workshop. In: *Circulation*. Vol 97. Lippincott Williams and Wilkins; 1998:1848-1867. doi:10.1161/01.CIR.97.18.1848
107. Kloner RA, Rezkalla SH. Preconditioning, postconditioning and their application to clinical cardiology. *Cardiovasc Res*. 2006;70(2):297-307. doi:10.1016/j.cardiores.2006.01.012
108. Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the myocardium: From cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev*. 2003;83(4):1113-1151. doi:10.1152/physrev.00009.2003
109. Kayaalp SO. *Akılcı Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. Pelikan Yayıncılık; 2012.
110. Seo M, Lee S. 2002_JHepatol_MinYoungSeo.pdf. 2002;36:72-77.

111. Lee W, Ph D, Lee J, et al. Protective Effects of Combined Ischemic Preconditioning and Ascorbic Acid on Mitochondrial Injury in Hepatic Ischemia / Reperfusion. 2007;52:45-52. doi:10.1016/j.jss.2006.08.043
112. Korkmaz A, Kolankaya D. The Protective Effects of Ascorbic Acid against Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Male Rats The Protective Effects of Ascorbic Acid against Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Male Rats. 2009;6049. doi:10.1080/08860220802546271
113. Toyoshima C, Mizutani T. Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Nature*. 2004;430(6999):529-535. doi:10.1038/nature02680
114. Aikawa JR. Magnesium & Its Biologic significance CRC press. *Boca Raton, FL*. 1981:21-38.
115. Elin RJ. Magnesium: The Fifth but Forgotten Electrolyte. *Am J Clin Pathol*. 1994;102(5):616-622. doi:10.1093/ajcp/102.5.616
116. de Baaij JHF, Hoenderop JGJ, Bindels RJM. Regulation of magnesium balance: lessons learned from human genetic disease. *Clin Kidney J*. 2012;5(Suppl 1):i15-i24. doi:10.1093/ndtplus/sfr164
117. Sit M, Yoldas H, Karagoz I, et al. Effects of magnesium sulphate on liver ischemia/reperfusion injury in a rat model. *Exp Biomed Res*. 2019;2(3):93-102. doi:10.30714/j-ebr.2019353194
118. Kaptanoglu AF, Arca T, Kilinc K. Magnesium sulfate protects fetal skin from intrauterine ischemia reperfusion injury. 2012:529-532. doi:10.1007/s00403-012-1217-5
119. Orvieto MA, Zorn KC, Mendiola F, et al. Recovery of Renal Function After Complete Renal Hilar Versus Artery Alone Clamping During Open and Laparoscopic Surgery. *J Urol*. 2007;177(6):2371-2374. doi:10.1016/j.juro.2007.01.115
120. Simmons MN, Schreiber MJ, Gill IS. Surgical Renal Ischemia: A Contemporary Overview. *J Urol*. 2008;180(1):19-30. doi:10.1016/j.juro.2008.03.022
121. Kadkhodae M, Golab F, Zahmatkesh M, et al. Effects of different periods of renal ischemia on liver as a remote organ. *World J Gastroenterol*. 2009;15(9):1113-1118. doi:10.3748/wjg.15.1113

122. Seifi B, Kadkhodae M, Najafi A, Mahmoudi A. Protection of Liver as a Remote Organ after Renal Ischemia-Reperfusion Injury by Renal Ischemic Postconditioning. *Int J Nephrol*. 2014;2014:10-13. doi:10.1155/2014/120391
123. Shang Y, Madduma Hewage S, Wijerathne CUB, et al. Kidney Ischemia-Reperfusion Elicits Acute Liver Injury and Inflammatory Response. *Front Med*. 2020;7(June):1-9. doi:10.3389/fmed.2020.00201
124. Wang B, Bai M, Bai Y et al. Liver injury following renal ischemia reperfusion in rats. *Transplant Proc*. 2010;42(9):3422-3426. doi:10.1016/j.transproceed.2010.09.008
125. Zhang Q, Lai Y, Deng J, Wang M, et al. Vagus Nerve Stimulation Attenuates Hepatic Ischemia / Reperfusion Injury via the Nrf2 / HO-1 Pathway. 2019;2019.
126. Akbulut A, Karakaya J, Korkmaz M. Temel Tıp Bilimleri / Basic Medical Sciences Renal İskemi Reperfüzyonun İndüklediği Uzak Karaciğer Hasarında Koenzim Q10 ' un Koruyucu Etkisi The Protective Effect of Coenzyme Q10 on the Renal Ischemia Reperfusion Induced Liver. 2019;72(2):184-191. doi:10.4274/atfm.galenos.2019.46338
127. Khastar H, Khastar H. Protective effects of vitamin E against liver damage caused by renal ischemia reperfusion Protective effects of vitamin E against liver damage caused by renal ischemia reperfusion. 2015;6049. doi:10.3109/0886022X.2015.1006084
128. Watanabe I, Toyoda M, Okuda J, et al. Detection of Apoptotic Cells in Human Colorectal Cancer by Two Different in situ Methods : Antibody against Single-stranded DNA and Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP-biotin Nick End-labeling (TUNEL) Methods. 1999;(February):188-193.