

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KALP VE DAMAR
CERRAHİSİ
ANABİLİM DALI**

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Orkut GÜÇLÜ

**ALT EKSTREMİTENİN DENEYSEL
İSKEMİ/REPERFÜZYON MODELİNDE GELİŞEN
REPERFÜZYONA BAĞLI BÖBREK HASARINA
ELLAJİK ASİT, VANİLİK ASİT VE ROSMARİNİK
ASİT'İN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Alper GÜRMEN

EDİRNE – 2022

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca mesleki bilgi ve tecrübeleri ile bana destek veren başta tez danışmanım sayın Doç. Dr. Orkut Güçlü olmak üzere sayın Prof. Dr. Suat Canbaz, Doç. Dr. Serhat Hüseyin ve Prof. Dr. Volkan Yüksel hocalarıma, tezimin gerçekleştirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Patoloji Anabilim Dalı'ndan sayın Doç. Dr. Nuray Can'a ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan sayın Doç. Dr. Eray Özgün'e, değerli asistan arkadaşlarım ile sağlık personeline ve yaşamımın her anında sevgi, desteğini esirgemeyen eşim Ceyda Koç Gürmen ve aileme teşekkürlerimi borç bilirim. 2021/143 no'lu proje ile destekleyen TÜBAP'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	4
HÜCRE.....	4
HÜCRE HASARI	4
İSKEMİ VE HİPOKSİ.....	7
REPERFÜZYON VE İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARI	11
İSKEMİ/REPERFÜZYON HASAR MEKANİZMALARI	12
ANTİOKSİDANLAR/RADİKALLERE KARŞI SAVUNMA SİSTEMLERİ	16
ALT EKSTREMİTE İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI VE UZAK ORGAN HASARI.....	17
BÖBREĞİN YAPISI VE FONKSİYONLARI	18
RAT BÖBREĞİNİN YAPISI	20
ELLAJİK ASİT	21
VANİLİK ASİT	24
ROSMARİNİK ASİT	26
BİYOKİMYASAL PARAMETRELER	29
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	30
BULGULAR	36
TARTIŞMA	51
SONUÇLAR.....	57

ÖZET	59
SUMMARY	61
KAYNAKLAR	63
EKLER	



SİMGE VE KISALTMALAR

ADP	: Adenosine diphosphate(adenozin difosfat)
AMP	: Adenosine monophosphate(adenozin monofosfat)
ATP	: Adenosine triphosphate(adenozin trifosfat)
C	: Compleman (kompleman)
C3a	: Compleman 3a (kompleman 3a)
C5a	: Compleman 5a (kompleman 5a)
CA	: Kafeik asit
COX	: Siklooksijenaz
DNA	: Deoxyribonucleic acid (deoksiribonükleik asit)
EA	: Ellajik asit
ET	: Endotelin
FA	: Ferulik asit
H&E	: Hemotoksilen&eoizin
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HOCL	: Hipoklorik asit
IL	: İnterlökin
İ/R	: İskemi/reperfüzyon
LT	: Lökotrien
NAD	: Nikotiamid adenin dinükleotit
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NO	: Nitrik oksit

O₂⁻	: Süperoksit radikali
OH	: Hidroksil radikali
OSI	: Oxidative stress index (oksidatif stres indeksi)
PAF	: Platelet activating factor (trombosit aktive edici faktör)
PMNL	: Polimorf nüveli lökosit
PON	: Paraoksonaz
RA	: Rosmarinik asit
ROS	: Reaktif oksijen türevleri
ROT	: Reaktif oksijen türevleri
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
TAS	: Total antioxidant status (total antioksidan durum)
TOS	: Total oxidant status (total oksidan durum)
VA	: Vanilik asit
8-OHdG	: 8- hidroksideoksiguanozin

GİRİŞ VE AMAÇ

İskemi, bir dokuya veya organa gelen kan akımının azalması veya kesilmesi sonucu metabolizma tarafından üretilen atık ürünlerin uzaklaştırılamaması durumudur. Reperfüzyon ise, dokuya ya da organa; iskemi sonrası gerekli enerji gereksiniminin sağlanması ve yine iskemi sonrası oluşan zararlı metabolizma son ürünlerinin uzaklaştırılması için kan akımının yeniden sağlanması olayıdır. İskemiye uğrayan hücre ve dokular ortamda oksijen kısıtlılığı olması nedeniyle aerobik metabolizma sağlayamadığından anaerobik metabolizma yoluyla gerekli enerjiyi karşılamaya çalışırlar. Anaerobik yolla ortaya çıkan metabolitler reperfüzyon sağlanana kadar dokularda birikir. Kan akımının yeniden sağlanması ile dokularda biriken bu metabolitlerden oksidasyonla meydana gelen son ürünler, dolaşımın tekrar sağlanması ile sisteme yayılır (1,2).

Reperfüzyon ile nötrofil aktivasyonu, proinflamatuvar sitokinlerin salınımı, kompleman aktivasyonu, serbest oksijen radikalleri (SOR) ve proteazların oluşumu, endotelin (ET), angiotensin ve kotekolaminler gibi vazokonstruktör ajanların salınımı iskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarının lokal ve sistemik etkilerinden sorumludur (3).

Alt ekstremitte iskemi reperfüzyon hasarı, kalp damar cerrahisi uygulamaları içerisinde; en sık aort cerrahisinde abdominal aortaya geçici kros-klemp uygulamalarında olmakla birlikte unilateral veya bilateral akut femoral arter tıkanıklıklarında, travmatik veya iatrojenik arteriyel yaralanmalarda ortaya çıkmaktadır (4,5). Ayrıca serebrovasküler olaylar, miyokard infarktüsü, mezenter ve periferik arter embolilerinde uygulanan trombolitik tedaviler, sepsis, şok, yanık, pankreatit, organ transplantasyonu gibi cerrahi ve travmatik olaylarda ortaya çıkan iskemi ve hipovoleminin düzeltilmesi, ekstremitelere cerrahi girişim sırasında uygulanan turnikeler diğer reperfüzyon hasarı sebepleridir (4).

İskemi reperfüzyon hasarı; böbrek, akciğer, karaciğer ve kalp başta olmak üzere birçok organ üzerinde önemli patolojilere sebep olur. İ/R; geçici reperfüzyon aritmilerinden, çoklu organ yetmezliği sendromuna kadar ölümcül de olabilecek birçok klinik tablo ile ortaya çıkabilir (6).

Reperfüzyonda uzak organ hasarı etyolojisinde yer aldığı iddia edilen faktörlerden birisi de ‘washout’(yikanma) fenomenidir. Reperfüzyon ile ‘washout’ etkisiyle sistemik dolaşıma birçok kimyasal mediatör yayılır ve bu mediatörler olası mikroembolilerle diğer organ kapillerini tıkayarak hasara katkıda bulunur (7,8).

Özellikle alt ekstremitte iskemik reperfüzyon süreci sonrasında oluşan uzak organ hasarında; böbrek dokusu hedef konumda ve oluşan değişik derecelerdeki hasar ile klinik öneme sahip olabilmektedir. Günümüzde iskemik reperfüzyon hasarını önlemeye veya azaltmaya yönelik pek çok tedavi stratejisi geliştirilmiştir. Kardiyovasküler cerrahi teknik ve diğer protokollere rağmen iskemik/reperfüzyon hasarı mortalite ve morbiditelerin önemli bir nedeni olabilmektedir. En uygun stratejinin ne olduğuna yönelik çalışmalar halen devam etmektedir (9).

Reperfüzyon hasarı, dokular iskemik sonrası moleküler oksijeni yeniden aldığı anda meydana gelir. Organ nakli, trombolitik tedavi, uzuv travması ve kardiyovasküler cerrahi gibi geniş bir vasküler olay yelpazesini içeren oldukça önemli bir klinik durumdur. İ/R beyin, kalp, akciğer ve iskelet kası gibi birçok farklı organı değişen derecelerde etkiler. Reaktif oksijen türevleri (ROS), süperoksit anyon radikalleri (O_2^-) ve hidroksil radikalleri ($^{\cdot}OH$) gibi serbest radikallerden oluşan reaktif oksijen türevleri olarak bilinir. ROS membran lipidlerine saldırır ve bu olay lipid peroksidasyonu ile sonuçlanır. Ayrıca hücresel proteinleri, lipidleri, nükleik asitleri ve diğer potansiyel duyarlı maddeleri etkileyebilirler. Bu süreç sonunda aşırı serbest radikal üretimi ve organ disfonksiyonu ile sonuçlanır, ayrıca ROS birçok hastalığa yol açabilir. Esas olarak İ/R yaralanmasından sorumludurlar. İ/R hasarını azaltmak için uygulanan farklı tedavi stratejileri arasında çeşitli antioksidan vitaminler, bioflavonoidler ve ilaçlar yer alır (9).

İskemik sonrası oluşan hipoksi ve revaskülarizasyon sonrası oluşan reperfüzyon hasarı ülkemizde sık olarak karşılaşılan morbidite ve mortalite nedenlerinden biridir. İskemik nedeniyle oluşan hipoksi ve revaskülarizasyon ile oksijenlenme başladıktan sonra görülen reperfüzyon hasarı doku ve organlarda geri dönüşlü veya dönüşsüz hasarlara yol açabilmektedir. Bu kadar sık görülen, morbidite ve mortalitesi yüksek olan iskemik ve reperfüzyon hasarında koruyucu ve tedavi edici yaklaşımların geliştirilmesi önemli olup eksojen antioksidan maddeler ile bu hasarın azaltılması yüksek klinik önem taşımaktadır (9).

Ellajik asit (EA), ilek, ceviz, fındık ve yaban mersini gibi bitki ve meyvelerde bulunan polifenolik bir bileşiktir. EA'nın anti-inflamatuar, antioksidan ve tümör oluşumunun kemoprevensiyon inhibisyonu dahil olmak üzere farklı farmakolojik etkiler gösterdiği bildirilmiştir (9).

Çeşitli çalışmalar vanilik asit'in (VA) yılan zehiri aktivitesinin inhibisyonu, antimikrobiyal, analjezik, antiinflamatuar ve antioksidan aktiviteler dahil olmak üzere çoklu farmakolojik aktivitelerle ilişkili olduğunu göstermiştir (10).

Rosmarinik asit (RA), çok sayıda yaygın bitkide bulunan doğal olarak oluşan bir polifenolik antioksidandır. RA, *Melissa officinalis*, *Rosmarinus officinalis* ve *Prunella vulgaris* dahil olmak üzere melisa, nane bitkilerinden izole edilir. RA'nın antioksidan, antikanserojenik, antiinflamatuar, antidepresan ve antimikrobiyal etkileri olduğu gösterilmiştir (11).

Ellajik asit, vanilik asit ve rosmarinik asit'in uygulamasının, iskemiye ve reperfüzyon sırasında oluşacak olan oksidatif strese karşı koruma sağlayacağı, adaptasyonu teşvik edeceği, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hasarı önlediği ve iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olabileceği gösterilmiştir (9-11).

Bu çalışmada, abdominal aortaya kros klemp uygulaması ile alt ekstremitesi iskemisine maruz bırakılan sıçanlarda reperfüzyona bağlı böbrek hasarına ellajik asit, vanilik asit ve rosmarinik asit'in etkisini histopatolojik ve biyokimyasal olarak araştırmayı planladık.

GENEL BİLGİLER

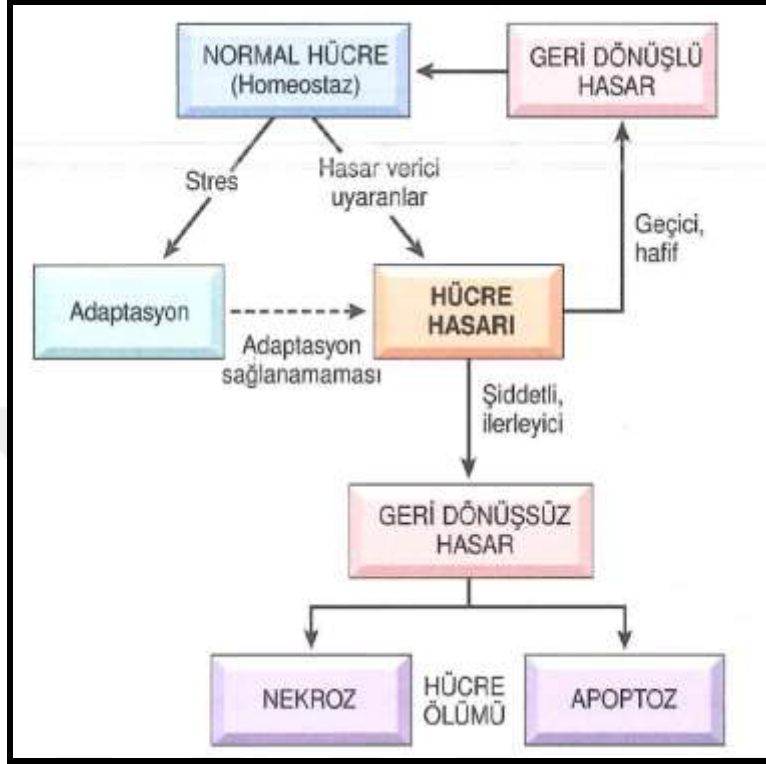
HÜCRE

Hücre vücudun başlıca canlılık birimidir. Hücre çeşitlerinin tümü kendi aralarında bazı işlevleri yapabilmek için farklılaşmış ve uzmanlaşmıştır. Hücrelerin büyük kısmı farklı yapıda olmasına rağmen temel bazı özellikleri ortaktır. Hücrelerin çoğalma yetenekleri vardır yani tamamına yakını kendileri gibi hücreleri oluşturur. Özellikle hücre hasarında çoğalma yeteneği önemlilik kazanır ve hücre çoğalması uyarılır. Homeostaz her hücrenin kendi iç ortamının devamlılığını sağlamasıdır. Hücre içi normal koşullar süregeldiği zaman hücre yaşamaya ve işlev görmeye devam eder. Eğer bir hücre grubunun homeostazisi bozulursa vücuttaki diğer hücre grupları da etkilenir ve görevlerini yapamaz duruma gelebilirler. Etkilenmenin derecesi hafif ise hastalıkla ağır ise ölümle sonuçlanır (12).

HÜCRE HASARI

Hücreler fizyolojik streslerle (kalpteki artan iş yükü gibi) veya potansiyel olarak zararlı koşullarla (besin yoksunluğu gibi) karşılaştıkça, yeni bir kararlı duruma ulaşarak ve canlılık ve işlevi koruyarak adaptasyona uğrayabilirler. Uyum yeteneği aşılsa veya dış stres doğal olarak zararlı veya aşırı ise hücre hasarı gelişir. Belirli sınırlar içinde, hasar geri dönüşümlüdür ve hücreler kararlı başlangıç değerlerine geri döner; bununla birlikte, stres şiddetli, kalıcı veya hızlı bir şekilde başlarsa, etkilenen hücrelerin geri dönüşü olmayan yaralanması ve ölümü ile sonuçlanır. Hücre ölümü, herhangi bir doku veya organdaki hastalığın evrimindeki en önemli olaylardan biridir. İskemi (kan akışı eksikliği), enfeksiyonlar, toksinler ve bağışıklık reaksiyonları dahil olmak üzere çeşitli nedenlerden kaynaklanır. Hücre ölümü ayrıca

embriyogeneizde, organların gelişiminde ve doku homeostazının korunmasında normal ve gerekli bir süreçtir (Şekil 1) (13).



Şekil 1. Hücre Hasarı (14).

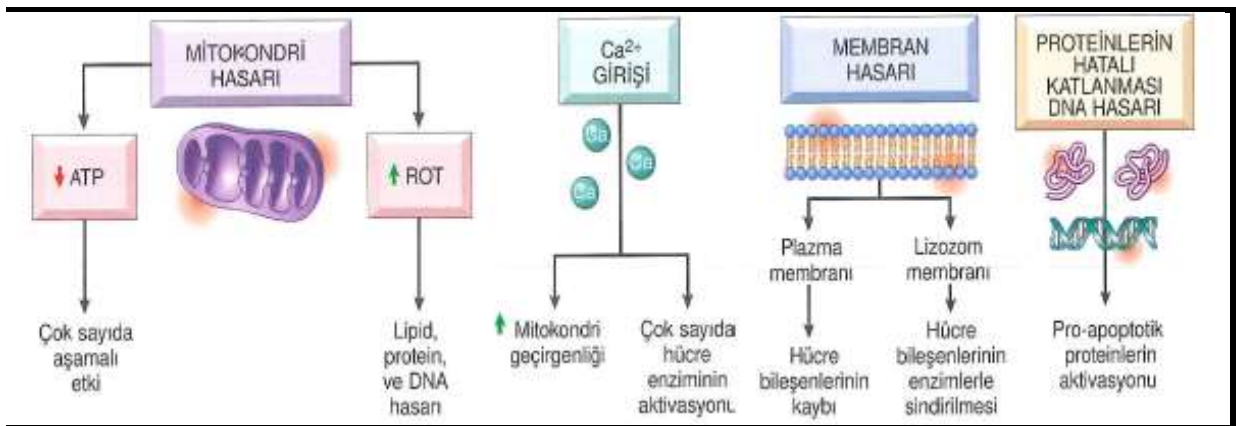
Hücreler yaralandığında, hasarın doğasına ve şiddetine bağlı olarak farklı mekanizmalarla ölürler. Oksijen ve besin kaynağı kaybı ve toksinlerin etkileri gibi ciddi rahatsızlıklar, “kazayla” hücre ölümü olarak adlandırılan hızlı ve kontrol edilemez bir ölüm şekline neden olur. Kaza sonucu hücre ölümünün morfolojik tezahürü nekrozdur (Yunanca, necros = ölüm). Nekroz, iskemi, toksinlere maruz kalma, çeşitli enfeksiyonlar ve travmadan kaynaklananlar gibi yaygın olarak karşılaşılan birçok yaralanmada hücre ölümünün ana yoludur. Nekroz, geleneksel olarak, kurtarmanın ötesinde olan ve belirli sinyaller veya biyokimyasal mekanizmalar tarafından düzenlendiği düşünülmeyen ciddi hasarın kaçınılmaz sonucu olarak kabul edilir; başka bir deyişle, nekroz kazara meydana gelir çünkü yaralanma tamir edilemeyecek kadar şiddetlidir ve birçok hücresel bileşen basitçe başarısız olur veya parçalanır. Buna karşılık, yaralanma daha az şiddetli olduğunda veya normal süreçler sırasında hücrelerin ortadan kaldırılması gerektiğinde, ölümle sonuçlanan kesin bir dizi moleküler yolu aktive ederler. Bu tür hücre ölümü, terapötik ajanlar veya genetik mutasyonlar tarafından manipüle edilebildiğinden, bunun “düzenlenmiş” hücre ölümü olduğu söylenir. Düzenlenmiş

hücre ölümlerinin çoğu tipinin morfolojik görünümü apoptozdur. Bazı durumlarda, düzenlenmiş hücre ölümü hem nekroz hem de apoptozun özelliklerini gösterir ve nekroptoz olarak adlandırılır. Tanımlanabilir genler ve sinyal yolları tarafından düzenlenen, önceden tanınmayan bu hücre ölümü biçimlerinin keşfi, hücre ölümünün kontrollü bir süreç olabileceğini gösterdi. Düzenlenmiş hücre ölümü fikri, patolojik koşullarda hücre kaybını önlemek için spesifik moleküler yolların terapötik olarak hedeflenebileceği olasılığını da yükseltir. Apoptoz, çeşitli içsel anormallikleri olan hücreleri ortadan kaldıran ve bir inflamatuvar reaksiyona neden olmadan ölü hücre parçalarının temizlenmesini destekleyen bir süreçtir. Hücre intiharının bu "temiz" formu, bir hücrenin DNA'sının veya proteinlerinin onarılamayacak şekilde hasar gördüğü veya hücrenin gerekli hayatta kalma sinyallerinden yoksun kaldığı patolojik durumlarda ortaya çıkar. Ancak her zaman patolojik bir sürecin göstergesi olan nekrozdan farklı olarak, sağlıklı dokularda da apoptoz meydana gelir. Normal gelişim sırasında istenmeyen hücrelerin ortadan kaldırılmasına ve hücre sayılarının sabit tutulmasına hizmet eder, bu nedenle mutlaka patolojik hücre hasarı ile ilişkili değildir. Bu tip fizyolojik hücre ölümü, programlanmış hücre ölümü olarak da adlandırılır (13).

Hücre hasarı durumunda birçok kimyasal ve fizyolojik reaksiyon rol alır. Farklılıklar hücrenin patolojik olaylara ve strese dayanıklılığını belirler.

Hasarlayıcı etkenlerin en önemli hedefleri;

1. ATP üretim yeri olan mitokondriler
2. Hücre membranları
3. Kalsiyum dengesindeki değişim
4. DNA hasarı ve proteinlerin hatalı katlanması (Şekil 2)



Şekil 2. Hücre zedelenmesinde hücresel ve kimyasal zedelenme yerleri (14).

Serbest oksijen radikalleri yörüngelerinde eşleşmemiş elektron içeren moleküllerdir. Aşırı kararsızdırlar. Organik ve inorganik kimyasallarla reaksiyona girerek çekirdekte nükleik asitlere, hücre zarında bulunan lipitlere zarar verirler. Hücre hasarında serbest oksijen radikallerinin önemi kesin olarak kanıtlanmıştı (13).

Ölümcül hücre hasarı gelişiminde hücre zarı hasarının kritik nokta olduğu, iskemi ve hipoksinin oksidatif fosforilasyonu ve ATP yapımını etkilediği, kalsiyumun hücre ölümüne giden önemli bir mediatör olduğu ve serbest oksijen radikallerinin hücre hasarındaki rolleri belirgindir (13).

Özetle hücre hasarının ve hücre ölümünün sayısız ve çeşitli nedenleri vardır. Benzer şekilde, hücre hasarına yol açan ve hücre ölümüyle sonuçlanan olaylar dizisini başlatabilen birçok biyokimyasal yol vardır. Bu yollardan bazılarının insan hastalıklarında önemli roller oynadığı kabul edilmektedir (13).

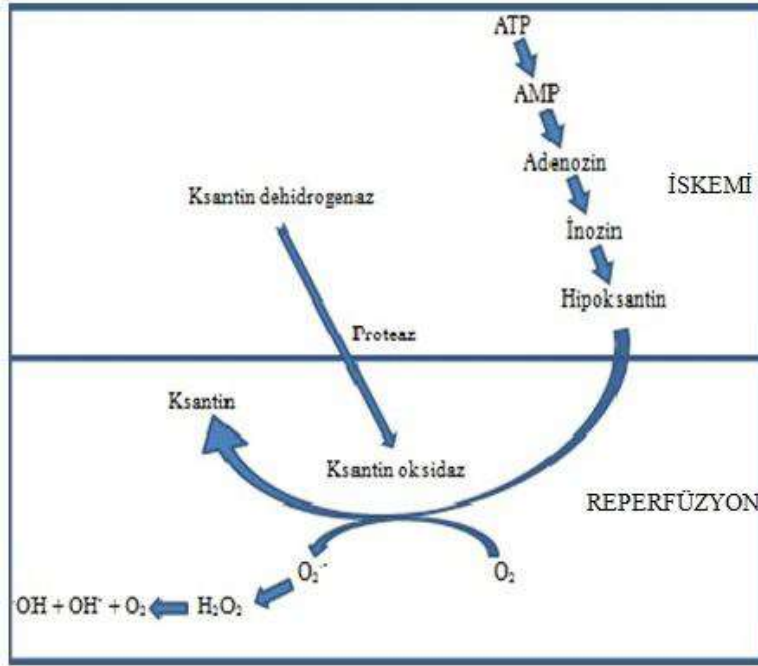
İSKEMİ VE HİPOKSİ

Bir organın arterlerinde kan akımının kısmen veya tamamen kesilmesi sonucu iskemi tablosu oluşmaktadır. Hipoksi dokuya eksik oksijen gelmesidir. Hipoksinin en sık sebebi iskemidir. İskemiye uğrayan hücre ve dokular önceden sürdürdükleri aerobik metabolizmayı sağlayamadıkları için anaerobik metabolizma ile gerekli enerjiyi sağlamaya çalışırlar.

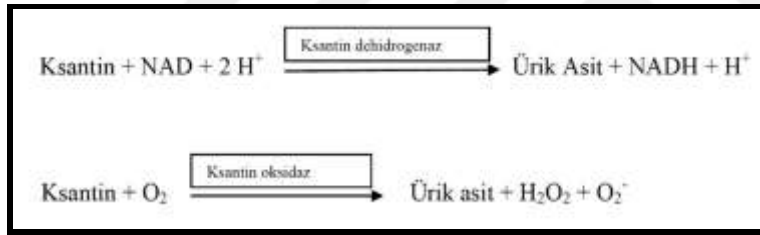
Anaerobik metabolizma sonucu oluşan ve biriken laktik asit ve toksik son ürünler asidoza neden olur, hücre içi pH düşer. Hücre enzimleri, ATP yapımı azalır. Hücre kendisi için hayati öneme sahip olan enerjiden mahrum kalır (1,2).

Adenozin trifosfat (ATP) seviyelerindeki azalmaya karşın adenozin difosfat (ADP) düzeylerinde artış olur. Artan ADP'ler önce adenozin monofosfat (AMP)'a daha sonra adenozin, inozin ve hipoksantine dönüşür. Reperfüzyon sağlanabilirse hipoksantin oksijen ve ksantin oksidaz enziminin etkisi ile ksantine dönüşür. Ksantin de ortamdaki oksijen ile reaksiyona girerek ürik asite parçalanır. Tüm bu reaksiyonlar sonucunda hasardan sorumlu olan serbest oksijen radikalleri ortaya çıkar (Şekil 3) (2).

Hipoksinin ilerleyerek devamı durumunda ortamda oksijen olmadığından ksantin mukotinamid adenin dinukleotid (NAD) ve hidrojen ile reaksiyona girerek ürik asit nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) ve H^+ oluşturur (Şekil 4) (2).



Şekil 3. İskemi reperfüzyonda oksijen radikalleri oluşumu (2).

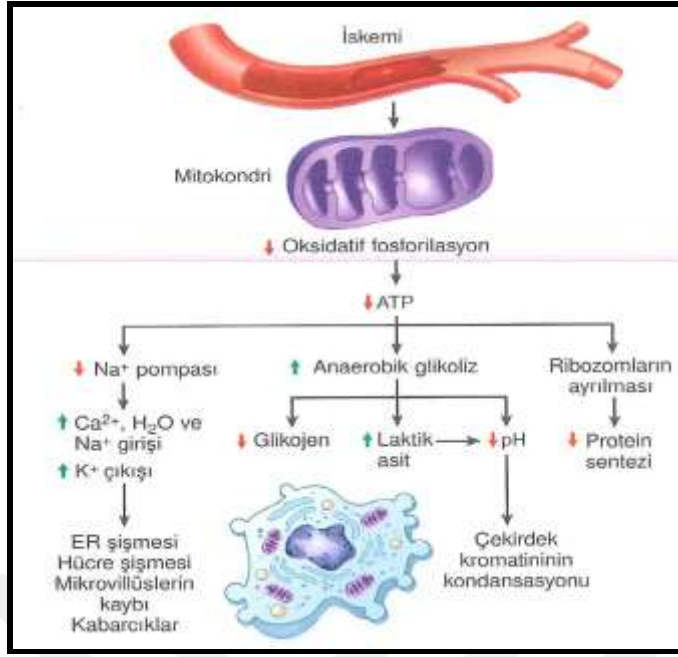


Şekil 4. Ksantinden serbest oksijen radikali oluşumu (2).

İskemi nedeniyle oluşan hasarın şiddeti doku dolaşımının bozulma süresi ve dokuya ulaşan kanın miktarıyla orantılıdır. Dokunun tipi, stres ve patolojik olaya hassasiyeti, perfüzyon ihtiyacı da hasarın şiddetine etki eden faktörlerdir (13). İskemiye bazı dokular dirençliyen (kemik, deri) bazı dokular hassastır (iskelet kası, böbrek) (15).

Kritik iskemi zamanı, doku canlılığının sürdürülebildiği maksimum iskemi süresi olarak tanımlanır (16). Yaklaşık olarak kritik iskemi süreleri karaciğer ve böbrek için 10-15 dk., beyin dokusunda yaklaşık 5 dk., iskelet kasında 2,5 saat civarındadır. Kritik iskemi süresinin aşılması sonrasında gerçekleşen reperfüzyon, parankimal hasarla sonuçlanmaktadır (17).

Uzun süreli iskemiler hücre membranında sodyum/kalsiyum (Na^+/Ca^+) iyon dengesinin bozulmasına, hücre içi pH değerinin düşmesine, ATP/fosfokreatin seviyesi azalmasına, hipoksantin seviyesinin artmasına, membran potansiyelinin değişmesine, iskelet bütünlüğü kaybına, hücrenin şişmesine, protein sentezi baskılanmasına ve çekirdeğin tahrip olmasına sebep olur (Şekil 5) (13,15,18).



Şekil 5. Hipoksi ve iskeminin fonksiyonel ve morfolojik sonuçları (14).

İskeminin süresine ve şiddetine bağlı olarak hücre zedelenmesinin iki türü vardır;

- Geri dönüşlü zedelenme
- Geri dönüşsüz zedelenme

Geri Dönüşlü Zedelenme

Hipoksinin ilk etkisi mitokondrilerdeki oksidatif fosforilasyon yani hücrenin aerobik solunumu üzerinedir. Oksijenin azalması sonucu hücre içi ATP üretimi belirgin olarak azalır (13).

Hücre membranındaki ATP bağımlı Na^+ - K^+ ATPaz pompasının aktivitesi azalır. Na^+ hücre içinde birikir. Bunu K^+ 'un hücre dışına çıkışı izler. Hücre içinde artan Na^+ 'u hücre dışına çıkarabilmek için Na^+ - Ca^{+2} antiporter sistemi hızlanır. Bu sistem ise hücre içindeki artmış Na^+ 'u dışarı çıkarırken hücre içine Ca^{+2} taşır. Sonuç olarak hücre içi Ca^{+2} miktarı artar. İntraselüler ortamda Na^+ ve Ca^{+2} birikirken K^+ azalır. Na^+ mineralinin hücre içinde net artışı suyun izoozmotik artışı ile birlikte olup akut hücresel şişme oluşturur (2,13).

Hücre ATP'deki azalma ile birlikte AMP'de artma nedeniyle anaerobik glikoliz hızlanır. Glikojenden ATP üretimi olması nedeniyle glikojen depoları hızla tüketilir. Artan glikoliz de fosfat esterlerinin hidrolizi ile laktik asit ve inorganik fosfatların birikimine neden olur. Hücre içi pH düşer. Ribozomların granüllü endoplazmik retikulumdan ayrılmasına ve protein sentezinde azalmaya neden olur (13).

Hipoksi devam ederse membran permeabilitesinin artması ve mitokondrial disfonksiyon daha fazla morfolojik bozulmaya neden olur. Hücre iskeleti dağılırken mikrovilluslar kaybolur. Hücre yüzeyinde bleb(kabarcıklar) oluşur. Mitokondriler, endoplazmik retikulum ve tüm hücreler osmotik regülasyonun kaybından dolayı şişmiş görünür (13).

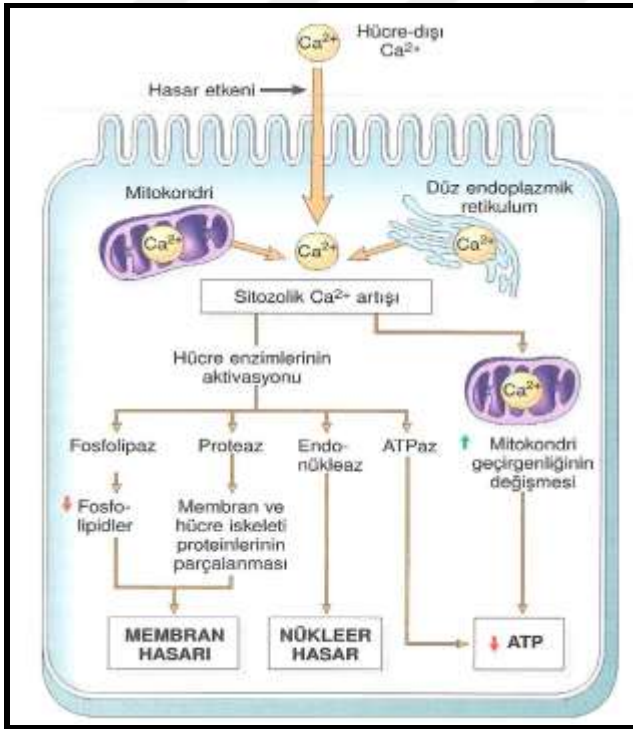
Oksijen verildiğinde bu biyokimyasal ve patolojik bulgular geri dönebilir. Eğer iskemi devam edecek olursa ATP'deki azalma şiddetlenir ve geri dönüşsüz zedelenme gerçekleşir (13).

Geri Dönüşsüz Zedelenme

Morfolojik olarak mitokondri kristallerinde aşırı vakuolizasyon, plazma zarlarının aşırı yıkımı, lizozomların şişmesi geri dönüşsüz zedelenmeye yol açan hasarlardır (19).

pH düşmesi lizozom membranlarında hasara yol açar. Enzimler sitoplazmaya geçerek asit hidrolazların aktivasyonu ile hücre bileşenlerinin enzimatik yıkımına sebep olur (13).

Membran hasarı sonucu Ca^{+2} hücre dışına çıkar. Özellikle iskemik alanın yeniden kanlandırılması ile masif Ca^{+2} akışı olur. Sonuç olarak Ca^{+2} bozukluklar ortaya çıkar (Şekil 6) (13).



Şekil 6. Hücre zedelenmesinde sitozoldeki kalsiyum artmasının kaynakları ve sonuçları (14).

Geri dönüşsüz zedelenmeyi karakterize eden iki olay mevcuttur. Bunlar mitokondriumun işlev bozukluğunun oksidatif fosforilasyon ve ATP yenilenme yokluğu nedeniyle; yeniden kanlanma ve oksijenlenmeye karşı düzelmeyişi ve membran işlevlerindeki ileri derece bozukluğun gelişmesidir (13).

REPERFÜZYON VE İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARI

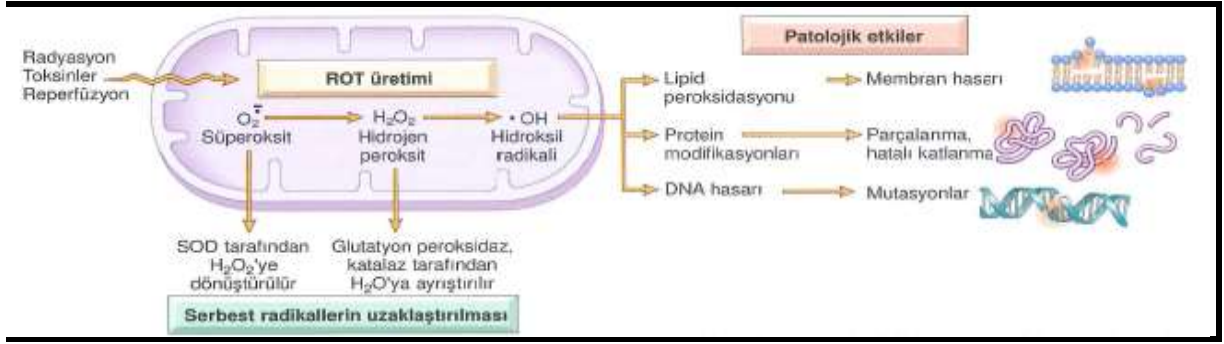
Reperfüzyon, enerji gereksiniminin karşılanması ve toksik son ürünlerin atılması için dokuya veya organa yeniden kan akımının iletilmesidir. Reperfüzyonun iskemik kalmış dokuda enerjinin tekrar üretilmesi gibi iskemik tahribatın onarılması için gerekli önemli ve olumlu etkisi mevcuttur (13,20). İskemik hasarın ortadan kaldırılması için reperfüzyon gereklidir. İskemi kısa süreli ise reperfüzyon hasar şiddeti hafif, uzun süreli ise ve geri dönüşsüz hasar başladıysa hücrelerin kurtarılması için reperfüzyon yeterli olmayabilir (21).

İskemi sonucu oluşan zararlı maddeler dolaşım olmadığı için dokuda birikir. Dolaşımın tekrar normalleşmesi ile (reperfüzyonla) buradaki metabolitlerin oksidasyonu sonucu oluşan maddeler dolaşıma karışır ve kan ile tüm vücuda yayılır. Bu durum da diğer organlarda hasar meydana gelmesine sebep olur. Yapılan çalışmalarda İ/R sonucu oluşan hasarın iskemik hasardan daha fazla zararlı metabolit meydana getirdiği gösterilmiştir (2,18,22).

Reperfüzyonun başlamasıyla inflamatuvar yanıt da başlar. Bu süreçte nötrofiller, makrofajlar, trombositler, lenfositler, endotel hücreleri, kompleman sistemi, koagülasyon kaskadı, nitrik oksid (NO), reaktif oksijen radikalleri ve sitokinler sürece dahil olur ve mikroperfüzyonu bozar (23).

İ/R boyunca meydana gelen reaktif oksijen radikallerinin endotel hücrelerini hasarlaması, vazokonstriktör endotelin sentezinde artış ve vazodilatör nitrik oksit (NO) sentezinde azalmaya yol açar. Endotel fonksiyon bozukluğu tetiklenir (24). Hasarı başlatan asıl nedenin endotel zedelenmesi olduğu düşünülmektedir (25,26).

Proteinler, zar lipidleri, deoksiribonükleik ve nükleik asitler reperfüzyon hasarında en çok etkilenen yapılardır (Şekil 7) (27).



Şekil 7. Reaktif oksijen türevlerinin (ROT) hücre zedelenmesinde üretilmesi, uzaklaştırılması ve rolü (14).

Alt ekstremitte arterlerinin ve abdominal aortanın cerrahi işlemler sırasında klempe edilmesi daha distalinde iskemiye neden olmakta, klempin açılarak tekrar distal kan akımının sağlanması lokal ve uzak organlarda reperfüzyon hasarıyla sonuçlanmaktadır (28-30).

İSKEMİ/REPERFÜZYON HASAR MEKANİZMALARI

Reperfüzyon ile dokuya sağlanan oksijen ve metabolitler iskemik dokunun hasarını geriletebileceği gibi ilerlemesine de sebep olabilir. İskemik hasarın geri dönüşlü olup olmamasına göre bu ince çizgi şekillenir (16).

Kompleman sistemi, endotel hücreleri, polimorf nüveli lökositlerin etkileşmesi çeşitli biyokimyasal reaksiyonlara neden olur ve serbest oksijen radikalleri oluşur. İ/R'de başrol serbest oksijen radikallerininindir (13,31).

Serbest Oksijen Radikalleri

Dış yörüngesinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektronu olan atom ya da moleküller serbest radikal olarak adlandırılır (32). Reperfüzyonla birlikte iskemik dokunun ortamında oksijen miktarı arttığından serbest oksijen radikalleri oluşumu da artmaktadır. Serbest radikallerin reaksiyon kapasiteleri eşlenmemiş elektron içerdikleri için yüksektir. Serbest radikaller stabil olmadıkları için ömürleri çok kısadır (33). Elektrik yükleri pozitif, negatif ve nötr olabilir (2).

Biyolojik sistemlerde indirgenme-yükseltgenme reaksiyonları gibi elektron transferi sağlayan reaksiyonlar sonucu serbest radikaller oluşmaktadır. Serbest radikaller fizyolojik şartlarda ve dış etkenlere karşı organizmanın savunmasında oluşur ve endojen mekanizmalarla etkisiz hale getirilirler. İ/R sonucu oluşan SOR düzeyi vücut savunma sistemlerini aştığından lokal ve sistemik etki oluşturur (2).

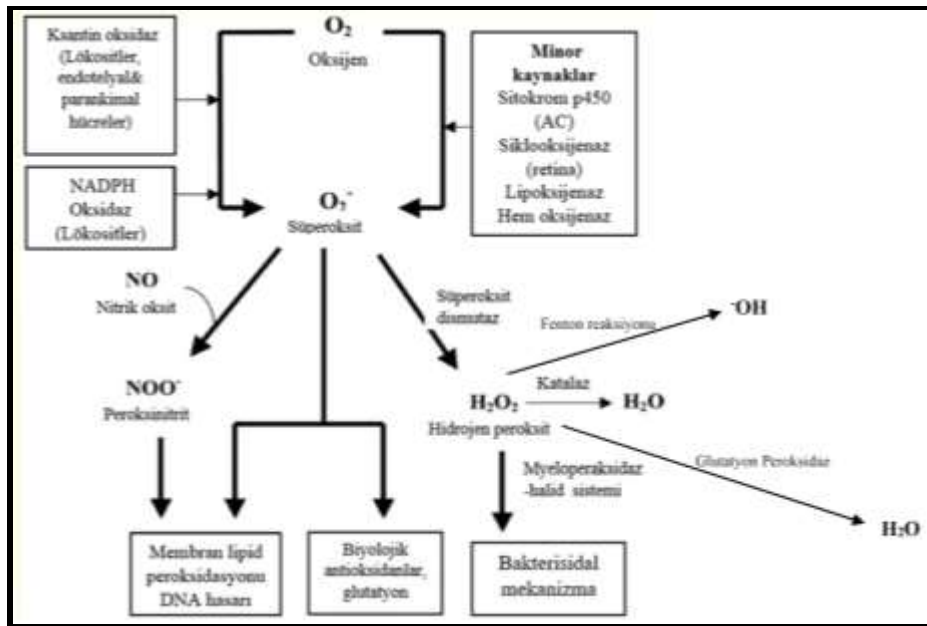
Aerobik organizmalarda yaşamın sürdürülebilmesi için oksijene gereksinim vardır. Serbest radikaller için en önemli kaynağın oksijen olduğu kabul edilmektedir. Normal metabolizma sırasında O_2 'nin %98'i H_2O 'ya indirgenmektedir. Kalan %2'lik kısım O_2^- (süperoksit) ve $\cdot OH$ (hidroksil) radikallerine dönüşür. En önemli serbest oksijen radikalleri O_2^- ve $\cdot OH$ anyonlarıdır (34).

Hücre içinde bu serbest radikaller dışında radikal olmayan ama serbest radikal oluşturma potansiyeli olan; H_2O_2 (hidrojen peroksit), $HOCl$ (hipoklorik asit) gibi zararlı oksijen türevleri oluşabilir (18,35).

Eşlenmemiş elektron içermediği için tek başına radikal olmayan H_2O_2 biyolojik sistemlerde sık olarak O_2^- ve H^+ 'ın reaksiyona girmesi ile meydana gelmektedir (2,36).

H_2O_2 'in metabolizmasında katalaz veya glutatyon peroksidaz enzimi tarafından toksik olmayan ürünler oluşturulur. H_2O_2 geçiş metallerinin varlığında toksik $\cdot OH$ radikaline dönüşür. Bu reaksiyona fenton reaksiyonu denir. Hidroksil oldukça toksik ve reaktiftir. Elektronegativitesi ve molekül yapısının büyüklüğü nedeniyle DNA (deoksiribonükleik asit), protein, karbonhidrat ve lipidler gibi makromoleküllerle reaksiyona girerek oksidatif hasara neden olur (2,37).

Organizmada oksidan ürünlere maruziyeti en aza indirebilmek için antioksidan enzim mekanizması mevcuttur. Fakat SOR'ların yüksek seviyelere ulaştığı durumlarda antioksidanlar yetersiz kalır ve oksidatif hasar gerçekleşir (Şekil 8) (38).



Şekil 8. SOR'ların oluşumu ve antioksidan savunma mekanizmaları (39).

Serbest oksijen radikal hasarı İ/R hasar mekanizmasında temeli oluşturup hemen hemen tüm basamaklarda etkin rol oynar;

- Sarkoplazmik retikulum kalsiyum ATPaz sistemi ve hücre zarı Na-K ATPaz sistemini inhibe ederek hücre Ca yükünü arttırması
- Hücre zarı fosfolipit yapısında peroksidasyonu oluşturarak hücre zarı bütünlüğünün bozulması, hücresel şişme oluşturması
- Lökositler için kemotaktik etki oluşturup lökosit aktivasyonu ve birikimine neden olması
- No-reflow fenomeninde aracı olarak görev alması
- Nitrik oksit ile reaksiyon sonucu oluşan peroksinitrit aracılığıyla doku hasarı oluşması
- Protein ve enzimlerde yapısal bozulmaya ve parçalanmaya neden olması
- Genetik yapıda hasarlanma oluşturması (40,41).

Serbest oksijen radikal hasarında rol oynayan bazı radikal ajanlar Tablo 1’de özetlenmiştir.

Tablo 1. Bazı radikal ajanlar (42)

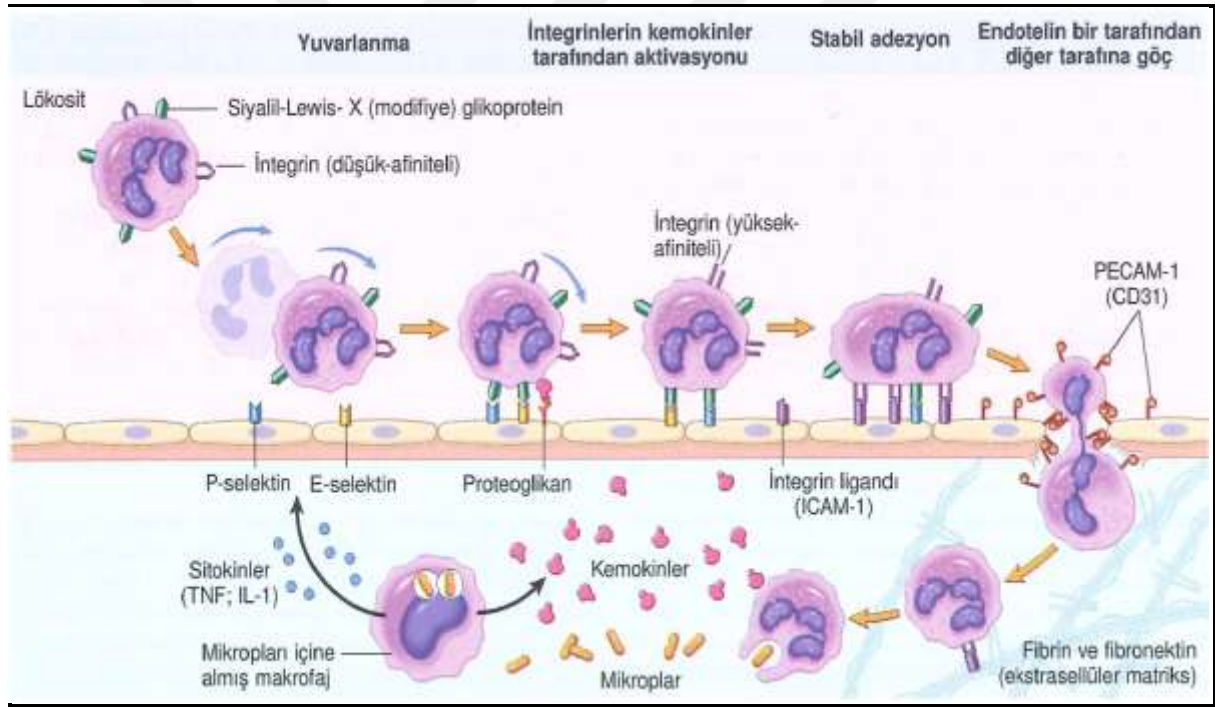
RADİKAL	SİMGE	TANIMLAMA
Hidrojen	H ⁺	Bilinen en basit radikal
Süperoksit	O ₂ ⁻	Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü
Hidroksil	OH ⁻	En toksik(reaktif) oksijen metaboliti
Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂	Moleküler hasar yeteneği zayıf, reaktivitesi çok düşük
Singlet oksijen	O ₂ ⁻	Güçlü oksidatif oksijen formu, yarılanma ömrü hızlı
Perhidroksi radikal	HO ₂ ⁻	Lipitlerle hızlı çözünerek lipid peroksidasyonunu arttırır
Peroksil radikal	ROO ⁻	Perhidroksile oranla daha zayıf etkili, lipitlere lokalize olur
Triklorometil	CCl ₃	CCl ₄ metabolizması ürünü, karaciğerde üretilen bir radikal
Thyl radikali	RS ⁻	Sülfürlü ve çiftlenmemiş elektron içeren türlerin genel adı
Alkoksil	RO ⁻	Organik peroksitlerin yıkımı ile üretilen oksijen metaboliti
Nitrojen oksit	NO	L-arjinin aminoasidinden in vivo üretilir
Nitrojen dioksit	NO ₂	No’nun oksijen ile reaksiyonu sonucu oluşur

Polimorf Nüveli Lökositler (PMNL) ve Endotel Etkileşimi

İskemi/reperfüzyon hasarından sonra ilk aktiflenen hücreler PMNL olup mikrovasküler geçirgenlik artışından da başlıca sorumlu olan hücrelerdir (13,43). İ/R lökosit ve endotel hücre

yüzeylerindeki adhezyon-agregasyon oluşumunu artırarak lökosit diapedeziyle sonuçlanan kaskadın aktivasyonuna neden olur (44). SOR; platelet aktive edici faktör (PAF), lökatrien B4 (LTB4) gibi kemotaktik uyarıları, komplemanın aktivasyonunu, antiadheziv bir molekül olan NO'nun yıkımını artırarak lökosit infiltrasyonuna neden olur (45). Aktive olmuş lökositler ürettikleri serbest oksijen radikalleri, sitotoksik enzimler ve mikrosirkülasyonda oluşturdukları obstrüksiyonla hasara katkıda bulunur (46).

PMNL'nin dokuya transformasyonu için önce rolling (yuvarlanma) gerekir. PMNL'nin sitokinler, LTB4 ve kompleman 5a (C5A) ile etkileşmesi sonucu yüzey adhezyon molekülü aktive olur.(44,47) Selektinler yuvarlanmada, kemokinler integrinlere ilgilerini arttırmak üzere nötrofillerin aktivasyonunda, integrinler lökositlerin endotele sıkıca yapışmasında ve CD31 (PECAM-1) transmigrasyonda rol alır (Şekil 9) (13).



Şekil 9. İ/R hasarında lökosit endotel etkileşimi (14).

Endotel hücreleri arasından geçen lökositler hedef dokuya göç ederler. Hasarlı dokuya olan lökosit kemotaksisi kemoatraktanlar [C5A, LTB4, IL-8(interlökin-8)] tarafından gerçekleştirilir (14). İ/R hasarında TNF α (tümör nekrozis faktör alfa), IL-1 β (interlökin 1beta), PAF ve kompleman sistemi gibi inflamatuvar araçların hepsi lökosit göçünü artırır (43).

Lökositler tüm bu basamaklar sonucunda doku hasarının artmasına neden olurlar. Klinik yansıması mikrovasküler tromboz ve disfonksiyonla karakterize “no-reflow” fenomenidir (16).

Endotel hücreleri SOR için hedef konumundadır. Aynı zamanda SOR üretim kaynağıdır. Mikrovasküler homeostazdan sorumlu moleküller olan endotelin (ET) ve NO'yu üretirler (48). NO; endotelial derived relaxing factor (EDRF) diye de bilinir. Damarda dilatasyon yapar (49). ET ise güçlü bir vazokonstriktördür. Endotelde meydana gelen hasarlar bu mediatörlerin oluşmasında bozukluğa ve dengesizliğe yol açar (50). Endotel hücrelerinin oksidatif stresi sonucu kompleman sistemi de aktive olur. SOR etkisi ile endotel hücreleri tarafından IL-1, PAF, prostaglandinler, granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), büyüme faktörü (GF) ve tromboxan A2 (TxA2) üretilir. Endotel hücreleri ayrıca kendi bazal membranlarını sindiren kollajenaz da salgılar (51).

Kompleman Sistemi ve Sitokinler

Kompleman (C) sistemi inflamasyonda ve konakçı savunmasında önemli görevleri olan plazma proteinleridir. Kompleman proteinlerinin sentez yeri hepatositler, monositler, makrofajlar ve böbreğin tübüler ve glomerüler hücreleridir. Sistemin aktivasyonu sonucunda proinflamatuvar komponentler (C3a, C5a, C3b, C5b-9) oluşur. C3a (kompleman faktör 3a) ve C5a (kompleman faktör 5a) anaflatoksinlerdir. Lökositleri aktive ederler. C5a ayrıca kemotaksisi uyarır. Bunlara ek olarak; TNF- α , IL-1 ve IL-6 makrofaj inflamatuvar proteinlerini uyararak inflamasyona yanıtı arttırır (52,53). Sistem endotel bağımlı vazodilatasyonu inhibe ederek ve endotelde siklik guanozin monofosfatı (c-GMP) azaltarak vasküler tonusu bozar (53,54).

İ/R hasarında komplemanın aktive olması damar homeostazisini bozar. PMNL adhezyonunu uyarır. Sonuç olarak doku hasarında artmaya neden olur (15).

ANTIOKSİDANLAR/RADİKALLERE KARŞI SAVUNMA SİSTEMLERİ

Antioksidan savunma sistemleri serbest radikallerin organizmadaki olumsuz etkilerine karşı koruyucu sistemlerdir. Hücrelerde sürekli SOR oluşur ve antioksidan mekanizmalarla zararlı etkiler oluşturmaktan uzaklaştırılır. Oksidan maddeler belirli düzeyin üstüne çıktığında antioksidan savunma sistemleri yetersiz kalır. Serbest radikaller nükleik asit, karbonhidrat, protein, lipid gibi hücrenin bazal yapıtaşlarını hasara uğratarak zararlı olmaktadır (2,55,56).

En önemli antioksidan mekanizmalar;

- Metal iyonlarının bağlanması ile radikal oluşumunun önlenmesi
- Oluşan radikallerin elimine edilmesi
- Radikal zincir reaksiyonlarının kırılması
- Hasarlı yapının tamir edilmesi veya tamir edilemeyecek durumdaki moleküllerin

uzaklaştırılması

- Antioksidan kapasitenin artırılması

Enzim Yapısındaki Antioksidanlar

Enzim yapısındaki antioksidanlar Tablo 2’de özetlenmiştir.

Tablo 2. Enzim yapısında antioksidanlar (2,55,57,58)

Enzim	Görevi
Süperoksid dismutaz (SOD)	O_2^- radikalinin H_2O_2 ’ye dismutasyonu
Glutasyon peroksidaz	H_2O_2 ’yi ortadan kaldıran başlıca enzim Yapısında selenyum içerir Glutasyon redüktaz ile H_2O ve glutasyon oluşur
Katalaz	H_2O_2 ’yi ortadan kaldıran enzim Peroksizomlarda üretilir

Enzim Yapısında Olmayan Antioksidanlar

Ferritin, melatonin, hemopeksin, haptoglobulin, seruloplazmin, transferrin, miyogloblin, albümin, metal iyonlarını bağlayarak; bilirubin, flavonoidler, vitamin E, askorbik asit, β -karoten, tioller, ubikinol, tokoferol radikal zincir kırıcı (serbest radikalleri süpürerek) etki gösteren önleyici antioksidanlardır.

Hidroksil radikali süpürücüleri olan mannitol, dimetil sülfoksit, reperfüzyon sırasında süperoksit radikali oluşturan ksantin oksidaz enzimini inhibe eden allopurinol, oksipurinol, kalsiyum kanal blokerleri, ibuprofen, demir iyonlarına bağlı lipid peroksidasyonunu önleyen salisilatlar, siklosporin, demir şelatörü olan deferoksamin, beta blokerlerden metoprolol, karvedilol ise farmakolojik antioksidanlara örnek gösterilebilir (2,59,60).

ALT EKSTREMİTE İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI VE UZAK ORGAN HASARI

Alt ekstremitte iskemi reperfüzyon hasarında lokal ve sistemik etkiler gözlenir. Lokal etkiler damar endoteli, iskelet kasında gözlenirken, sistemik etkiler başlıca akciğer, böbrek, kalp, karaciğer, beyin olmak üzere tüm dokularda gözlenir (61).

İskelet kası kütle olarak büyük olması ve iskemik hasara en hassas dokulardan biri olması nedeniyle alt ekstremitte iskemi reperfüzyon hasarında önemli bir rol oynar.

Reperfüzyon hasarında prognoz kas hasar miktarına bağlıdır; geri dönüşümsüz zedelenme miktarı ile doğru, nekrotik kas miktarı ile ters orantılıdır (61).

İskemik kalmış dokuda reperfüzyonla başlayan inflamatuvar yanıt lokal hasarı arttırmaktadır. Inflamatuvar cevabın tetikleyicileri; laktik asit, inorganik fosfat, asit fosfataz, potasyum, proteolitik enzimler ve pürin bazları gibi kas yıkım ürünleridir. Yıkım ürünlerinin salınması sonucu; intrensek pıhtılaşma mekanizmalarının aktifleşmesi, mikrovasküler hasar ve mikro vasküler trombozis oluşturarak hasarın daha da yaygınlaşmasına neden olur (2,61).

İskemi reperfüzyon hasarında en önemli sonuçlardan biri uzak organ hasarıdır, yüksek morbidite ve mortalite ile seyredir. Sistemik enflamasyon hemen her organda hastalık oluşturabilir (62).

Böbrek vücutta en iyi perfüze olan organlardan biri olmasından dolayı perfüzyon azlığına en hassas organlardan biridir. Abdominal aort cerrahisinde postoperatif dönemde morbidite ve mortaliteyi etkileyen en önemli komplikasyonlardan biri böbrek yetmezliğidir. En önemli fizyopatolojik mekanizma ise İ/R hasarıdır (63). Böbrek İ/R hasarında serbest oksijen radikallerinin yeri büyüktür (64). İskemik dokudan salınan miyogloblin ve diğer toksik maddelerin de rol aldığı kabul edilmektedir (61,62). Aortik kros klemp uygulaması ve İ/R hasarı böbrek yetmezliğinde önemli yere sahiptir (65). Alt ekstremité İ/R hasarı ayrıca akciğer, karaciğer, bağırsak, miyokard, gastrointestinal sistem gibi uzak organları içerecek biçimde hasar meydana getirir hatta çoklu organ yetmezliğine neden olabileceği bilinmektedir (66-68). Tutulan doku kitlesi ve iskemi süresi ile doğru orantılı olarak oluşan komplikasyonların şiddeti artmaktadır, morbidite ve mortaliteyi azaltmak amacıyla kan akımının; kas hasarı oluşmadan önceki kritik safhada düzeltilmesi gerekmektedir (61).

Deneyssel bazı çalışmalarda perfüzyonun sistemik etkilerinden korunmak amacıyla; antioksidanların, antilökotrienlerin, antitromboksanların ve anti trombosit aktive edici faktörlerin kullanılabileceği gösterilmektedir (61).

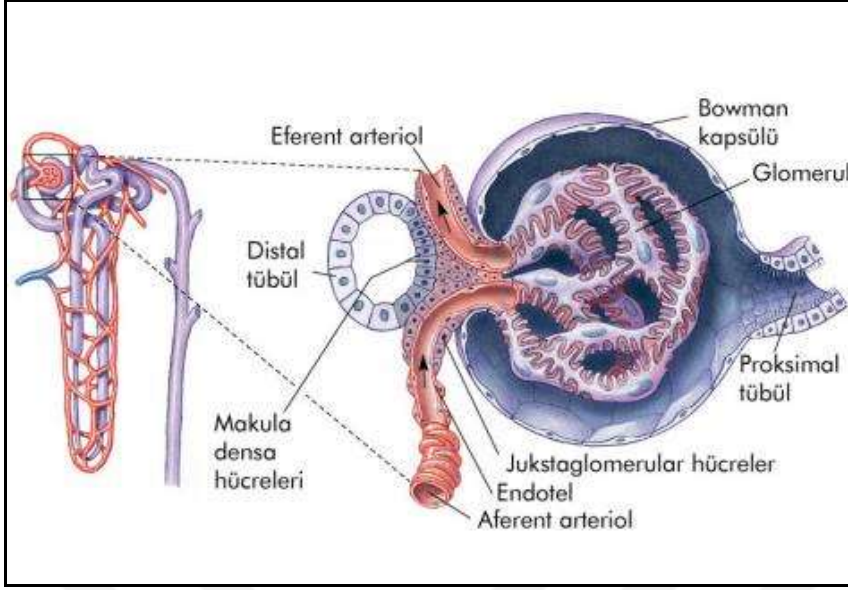
BÖBREĞİN YAPISI VE FONKSİYONLARI

Böbrekler retroperitoneal yerleşimli koyu renkli görünümdeki fasulyeye benzer organlardır (69). 12. Torasik ve 3. Lomber vertebra arasında uzanırlar. Sağ böbrek sol böbreğe göre karaciğer yereleşiminden dolayı daha aşağıda bulunmaktadır. Böbreklerin ağırlıkları cinsiyete göre farklılıklar göstermekte olup; erkeklerde yaklaşık 125-175 g kadınlarda ise yaklaşık 115-155 g ağırlığındadır. Vertikal uzunlukları 11-14 cm, ve horizontal uzunluğu 6 cm olup, yaklaşık 4 cm kalınlığındadır. Ayrıca her iki böbrek şekillerini ve kendilerini korumaya yardımcı olan yoğun ve düzensiz bağ dokusundan oluşan lifli bir kapsül ile çevrelenmiştir (70).

Böbrekler sagittal olarak kesildiğinde dıştan içe kapsül, korteks ve medulla göze çarpmaktadır. Korteksten medullaya inen düz tübüllerin farklı uzunlukta olması ve düzenlenmesiyle oluşan 8-18 adet konik şekilli medüller yapılara piramit adı verilir. Piramitlerin tabanları kortikomedüller bölgede bulunurken, tepe bölümleri kaliks içine uzanır. Kaliks içine uzanan bu bölüme papilla adı verilir. Majör kaliks adlı kanallar pelvisin dış sınırını oluşturur ve her papillada tübüllerden idrar toplayan daha küçük kanallar olan minör kalikslere ayrılır. Pelvis, üreter duvarları ve kalikslerin duvarları kasılabilir dokular olup idrarın mesaneye doğru ilerletilmesine katkıda bulunur (12,71).

Aortadan köken alan renal arterler her bir böbreği kanlandırır. Her iki böbreğe giden kan miktarı dakikada yaklaşık 1100ml yani kardiyak outputun %20'si kadardır. 100 gram doku başına yaklaşık dakikada 300-400ml kan akışı gerçekleşmektedir ve bu oran gram doku başına beynin 5, kalbin ise 4 katı kadar bir akımdır. Renal arter böbreğe hilustan girdikten sonra önce interlobar sonra arkuat arterlere ayrılır. Arkuat arterler interlobuler arterlerle devam eder. Interlobuler arterlerden glomerüle giren afferent arteriyoller köken alır. Efferent arteriyoller glomerülü oluşturan kapillerlerin birleşmesi ile oluşur. Efferent arteriyoller böbrekteki ikinci kapiller ağ sistemi olan peritübüler kapiller ağı oluşturur ve tübülüsleri sarar. Peritübüler kapillerlerden gelen kan venöz sisteme dökülür. Oradan sırasıyla interlobüler ven, arkuat ven, interlobar ven ve renal veni takip eder. Renal venler ise inferior vena kavaya drene olur (12,72,73).

Her bir böbrek nefron adı verilen böbreğin fonksiyonel en küçük işlevsel birimi olan yapılar içermektedir (69). Her bir nefron sıvının filtre edildiği glomerüler kapiller ağ ve filtratın idrara dönüştürüldüğü bir tübül içerir. Glomerül; sıvının kandan filtre edildiği, tübülüsler; filtre edilen sıvının idrara dönüştürüldüğü proksimal, distal tübülüsler, henle kulbu ve toplayıcı kanallardan oluşan kısımdır (74). Her bir böbrekte yaklaşık 1 milyon nefron bulunur. Böbrek yeni nefron rejenere edemez. Renal hasar, yaşlanma veya hastalık gibi durumlarda nefron sayısında kademeli bir azalma olur (12,71). Nefronların temel işlevi toksik maddeleri plazmadan temizlemektir. Glomerüler filtrasyon, tübüler reabsorpsiyon ve tübüler sekresyon mekanizmaları ile işlevini yerine getirir (12,73). Nefronlardan gelen idrar pelviste toplanır, üreteropelvik birleşme yerinde üreter içine akar. Üreterler oluşan idrarı mesaneye taşır (75,76). Henle kulbunun çıkan kalın kolunun son kısmında Makula Densa olarak adlandırılan özelleşmiş epitel hücreleri bulunur. Makula Densa jukstaglomerüler hücrelerden renin salgılanmasını uyaran sodyum ve klora duyarlı hücrelerden oluşmaktadır ve glomerüler filtrasyonu düzenleyen önemli bir mekanizmadır (Şekil 10) (70).



Şekil 10. Makula Densa  zelle mi  hücrelerinin yerleşimi (12).

Glomerüler filtrasyonun böbrek kan akımının kontrolünde birçok faktör rol alır. Böbrek damarları özellikle sempatik sinir liflerinde zengindir. Sempatik sinir sisteminin aktive olması böbrek kan akımı ve glomerüler filtrasyon hızını azaltabilir. Endotelin hasar görmüş böbreğin damar endotelinden salınır. Glomerüler filtrasyon hızını azaltır. Endotelden kaynaklanan NO, böbrek damar direncini azaltır ve glomerüler filtrasyonu arttırır. Prostaglandin E2, prostoglandin I2 ve bradikinin de damarları genişleten ve glomerüler filtrasyonu arttıran diğer otokoidlerdir (77,78).

B bre in temel fonksiyonları şunlardır:

- İdrar oluşturarak; vücut sıvı ve elektrolit dengesinin korunması ve sürdürülmesi, üre, ürik asit, ilaçlar, toksinler gibi atık maddelerin eliminasyonu,
- Hormon ve benzeri maddelerin sentezi
- Ekstrasellüler sıvı hacmi ve kan basıncının hormonal düzenlenmesi
- Peptit hormonların yıkımı
- Düşük molekül ağırlıklı proteinlerin katabolizması
- Glukoneogenez
- Lipit metabolizması (73).

RAT B BRE İNİN YAPISI

Rat b bre i unipapiller yapıya sahiptir ve insan b bre ine oranla çok daha küçük olup renal tübül içeriği daha azdır. Medüller kütlesinin korteksine oranı insaninkine yakındır. Rat b bre inin pelvisi daha küçük bir üriner bo lu a sahip ve daha basit yapıdadır.

Rat böbreğinin mikroskopik farklılıkları özellikle nefron sayısında göze çarpmaktadır. Rat böbreğinde yaklaşık 30 bin nefron bulunurken bu sayı insanda yaklaşık 1 milyondur. Boyutsal olarak karşılaştırmasında rat böbreği insan böbreğinden çok daha küçük yapıda olup ortalama 1.6 x 1 x 0.9 cm'dir (79).

ELLAJİK ASİT

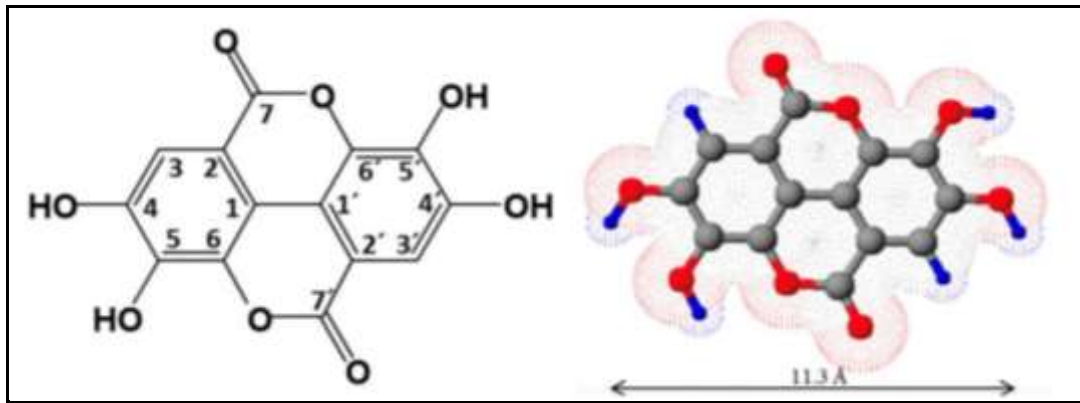
Ellajik Asit Nedir?

Bir gallik asit dimeri olan EA, ellagitanninlerin hidrolizi ile üretilir (80). EA, ahududu, çilek, baheda, üzüm, nar, ceviz, frenk üzümü, camu-camu, longan tohumları, mango, guava, badem ve yeşil çay dahil olmak üzere çeşitli meyveler, kabuklu yemişler ve tohumlarda bulunan polifenolik bir bileşiktir (81).

Ellajik Asit'in Kimyasal Yapısı

Ellajik asit, ilk olarak Chevreul tarafından safra kesesinde (fransızca: noix de galle) fark edildi, 1818'de Braconnot tarafından asit olarak adlandırılan ve "galle" kelimesini tersine çevirerek tanımlandı (82).

Ellajik asit, moleküler ağırlığı 302.194 g/mol olan gallik asidin dimerik bir türevinden oluşur. EA, dört serbest OH grubu ve kaynaşmış aromatik halkalardan oluşan bir çekirdeğe bağlı iki asiloksi grubu içerir (82). Son derece termostabil bir moleküldür (erime noktası 350°C). Aynı zamanda eter, alkol ve suda orta derecede çözünür. Yapısal olarak 4 halkanın varlığı lipofilik alanı belirtir. Hidrofilik alanı temsil eden, sırasıyla elektron alıcıları olarak hareket eden ve hidrojen bağı tarafları oluşturan 2 lakton ve 4 fenolik gruptur (Şekil 11) (81).



Şekil 11. Ellajik Asit'in kimyasal yapısı (82).

Ellajik Asit'in Biyolojik İşlevselliği

Ellagitanninler tohumlarda, meyvelerde ve kabuklu yemişlerde bol miktarda bulunan polifenolik bileşiklerdir. Ellagitanninler hidrolize edilebilir tanenler olarak sınıflandırılır ve EA'nın kompleks türevleridir. EA, nar, ceviz, siyah ahududu, ahududu, badem ve çilek dahil olmak üzere çok çeşitli fındık, sebze ve meyvelerde bulunan polifenolik bir bileşiktir. Çeşitli in vitro ve in vivo çalışmalarda doğrulandığı gibi antioksidan, anti-inflamatuar, antibakteriyel, antikanserojenik, antiplazmodiyal, antiviral, hepatoprotektif, antifibrotik, immünomodülatör ve nöroprotektif aktiviteler gibi geniş spektrumlu fizyolojik etkilere sahiptir (81).

Midede ilk absorpsiyondan sonra, Ellagitanninler katekol O-metiltransferaz tarafından hızla metil konjugasyonuna girer. Ellagitanninlerin yıkımı midede başlar ve yıkım ürünleri periferik kanda saptanabilir. (83). Gastrointestinal sistemde ve diğer bölgelerde, özellikle karaciğerde, EA ve ellagitanninler mikrobiyal metabolitleri tekrar faz I (hidroksilasyon) ve faz II (sülfasyon, metilasyon ve glukuronidasyon) enzimleri tarafından metabolize edilerek dokularda depolanabilen ya da idrarla atılabilen suda çözünür metabolitler elde edilir (84).

Ellajik asit ya bağımsız olarak ya da absorpsiyonun ardından EA ve ürolitinler dahil olmak üzere diğer birkaç metaboliti serbest bırakan ellagitanninler gibi karmaşık yapıların bir parçası olarak bulunur. Son on yılda, EA, çok sayıda moleküler hedefinin yanı sıra çok çeşitli biyolojik aktiviteleri nedeniyle büyük ilgi görmüştür. Birkaç çalışma, EA'nın oksidatif stresi düşürme potansiyelinin, geniş spektrumlu farmakolojik özelliklerinden sorumlu olduğunu bildirmiştir. Biyokimyasal düzeyde, lipid metabolizmasını ve lipidemik profili normalleştirmedeki etkinliği, IL-6, IL-1 β ve TNF-a gibi proinflamatuar mediatörleri düzenleme, nükleer faktör eritroidini yukarı düzenleme gibi çeşitli mekanizmalar da terapötik etkisi ile ilişkilendirilmiştir. EA, serbest radikal süpürücü etkisi, demir şelasyonu, birkaç hücre sinyal yolunun başlatılması ve mitokondriyal disfonksiyonun hafifletilmesi ile kayda değer bir nöroprotektif aktivite uygular (81).

Ellajik asit, çeşitli metabolik aktivitelerine dayanan yüksek terapötik gücü nedeniyle halk hekimliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Metal bağlayıcı bir bileşik olarak EA, böbrek ve karaciğerde nikel kaynaklı biyokimyasal değişiklikleri baskılar. N-asetil transaminazın aktivitesini azaltır ve çeşitli dokularda kanserojenlerin N-asetilasyonunu azaltır. EA'nın glutatyon peroksidaz, katalaz, kinon redüktaz ve glutatyon-S-transferaz aktivitelerinin artırılması dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla tümör oluşumunu engellediği bildirilmiştir. EA'nın kimyasal analoglarının incelenmesi, ellajik asit molekülünün farklı bölümlerinin, farklı varsayılan anti-kanserojen aktivitelerinden sorumlu olduğunu göstermiştir. Bu antioksidan ayrıca antiinflamatuar aktivite gösterir ve retinoik asit, retinol, beta-karoten,

kantaksantin ve askorbik asit gibi diğer antioksidanlarla birlikte kromozomların kararsızlığını azaltır. Ayrıca, t-bütil hidroperoksitin neden olduğu lipid peroksit oluşumunu ve süperoksit anyonlarının oluşumunu engelleyerek izole edilmiş sıçan hepatositlerini korur. EA'nın düzenleyici mekanizmalar üzerindeki bu etkileri, hücresel ve hücre altı seviyelerde gösterilen çeşitli etkilerine yansımış gibi görünmektedir (80).

Oksidatif stres, çeşitli faktörler tarafından üretilen ve çeşitli kronik hastalıklara neden olan biyolojik bir durumdur. Bu nedenle oksidatif stres, EA gibi doğal antioksidanlarla tedavi edilmiştir. EA, oksidatif stres ile ilişkili farklı hastalıklara karşı korunmada önemli bir role sahiptir. İn vitro ve in vivo çalışmalar, oksidatif stresin baskılanmasında EA'nın koruyucu rolünü doğrulamıştır. Sonuç olarak, EA biyolojik sistemlerde oksidatif stresi baskılayıcı güce sahip güçlü bir doğal antioksidandır (85).

Bitki bazlı doğal ürünler, insan vücudunda birden fazla hedef bölgeye sahip karmaşık kimyasal moleküllerin kaynağıdır. Bu moleküller, çeşitli tıbbi özellikleri için kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (86). Son on yılda, doğal ürünlerin ve bunların fito-bileşenlerinin biyolojik etkileri, beslenme özellikleri ve kayda değer sağlık ve terapötik faydaları kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiştir (87). Oksidatif stres ve inflamasyonun neden olduğu bozulmayı önleme etkinliklerinin yanı sıra, doğal ürünlerin kinazlar, reseptörler ve düzenleyici proteinler gibi enzimler üzerindeki doğrudan etkileri yoluyla çoklu sinyal iletim yollarını değiştirdiği de gösterilmiştir (81).

Ellajik asitin şu anda yerleşik farmakolojik özelliklerinin çoğu, öncelikle hem süperoksit hem de hidroksil anyon radikallerini temizlemekten sorumlu olan 4 hidroksil grubu içeren temel yapısı tarafından yönetilen antioksidan aktivitesine bağlıdır (88). EA, bir fare modelinde siklooksijenaz (COX) enzimi ve TNF- α , IL-1 β ve IL-6 üretimi üzerindeki modülatör etkisi ile anti-inflamatuar etkiler göstermiştir (81).

Son çalışmalar, EA'nın çok sayıda hücresel anormallikle mücadelede farmakolojik rolünü ortaya çıkarmıştır (81).

Ellajik aktif tabletler (Source Naturals, Santa Cruz, ABD), Ellajik Asit Kapsülleri (Biotech Nutritions, Novi, MI, ABD) ve PomActiv (H&B Wellness, Chandigarh, Hindistan) dahil olmak üzere EA ve EA ile zenginleştirilmiş ürünler sağlığı geliştirici faaliyetleri nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (89).

Günümüzde bu bileşiklere artan ilgi, esas olarak fenolik antioksidan özelliklerle bağlantılı yararlı sağlık etkileri sunan yeni ürünlerin tüketimi ve geliştirilmesi ile ilişkilidir (90).

VANİLİK ASİT

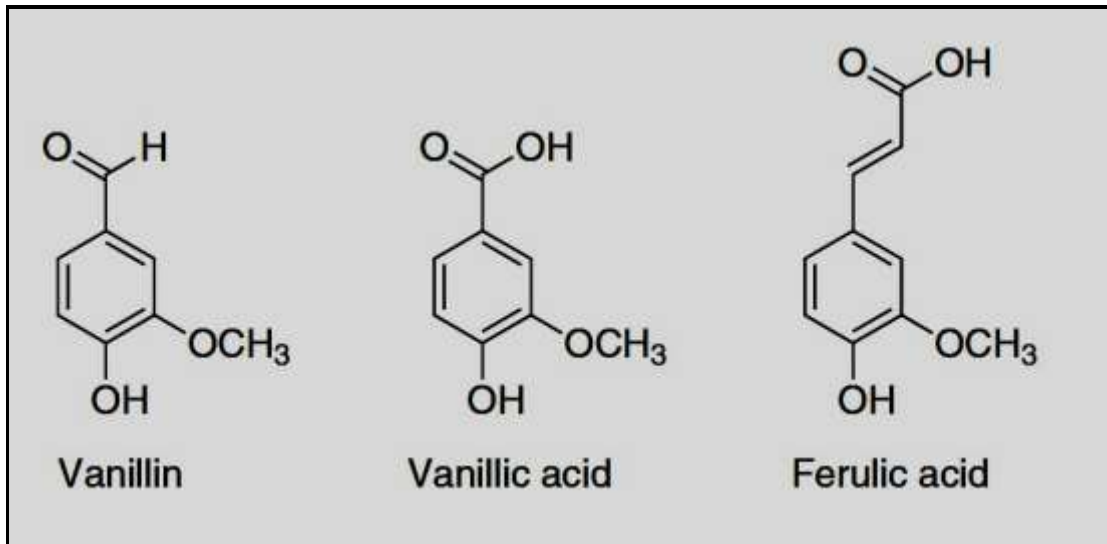
Vanilik Asit Nedir?

Vanilinin oksitlenmiş bir formu olan VA, aroma maddesi olarak kullanılan bir benzoik asit türevidir (91). Bitkilerde en yüksek miktarda VA, geleneksel Çin tıbbında kullanılan *Angelica sinensis*'in köklerinde bulunmuştur (91).

Vanilin (4-hidroksi-3-metoksibenzaldehit) ve asidi, VA (4-hidroksi-3-metoksibenzoik asit), tıbbi özellikleri için iyi çalışılmış yaygın fenolikler arasındadır. Bu fenolikler, vanilya fasulyesi ve bakla özütlerinin ana bileşenleridir ve yaygın olarak gıdalarda, kozmetiklerde ve ilaçlarda tatlandırıcı olarak kullanılır (92).

Vanilik Asit'in Kimyasal Yapısı

Vanilik asit, doğal olarak oluşan bir fenolik asittir (vanilatın konjuge asidi). Katı bir görünüme, 211.5 santigrat derece erime noktasına, 14 santigrat derecede 1.5 mg/ml çözünürlüğe sahiptir. Vanilin, gıda endüstrisinde, kozmetikte ve farmasötiklerde aroma maddesi olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Araştırma sonuçlarına göre, VA, ferulik asidin (FA) vaniline biyolojik olarak dönüştürülmesinden sonraki ara bileşiktir. Vanilin oksitlendiğinde klorojenik asit üretir. VA, kafeik asit metabolize edildiğinde de üretilir. VA, 3. Pozisyonda metoksi grubu ile süstitüe edilmiş bir monohidroksibenzoik asittir (Şekil 12) (93).



Şekil 12. Vanilin, Vanilik Asit ve Ferulik Asit'in Kimyasal Yapısı (94).

Vanilik Asit'in Biyolojik İşlevselliği

Fenolik asitler gibi ikincil bitki ürünlerinin birçok insan hastalığının önlenmesindeki rolü kapsamlı bir şekilde açıklanmıştır. Özellikle, çeşitli bitki ve meyvelerde bulunan bir fenolik türev olan VA'nın (4-hidroksi-3 metoksibenzoik asit) ilginç bir farmakolojik profile sahip olduğunu göstermiştir. Deneysel çalışmalar kardiyovasküler, gastrointestinal ve karaciğer hastalıkları üzerinde etkililik kanıtı sağlamıştır. Akut inflamatuvar süreçler üzerindeki faydalı aktivite de tarif edilmiştir. Ayrıca VA'nın, inflamatuvar mediatörler olan tümör nekroz faktörü (TNF- α), interlökin (IL-6), siklooksijenaz-2 (COX-2) ve NO sentezini veya salınımını engellediği gösterilmiştir (95).

Fenolik bileşikler, bitkisel gıdaların önemli bir bölümünü oluşturur. Bu fenolik bileşiklerin çoğu in vitro antioksidanlardır ve antioksidanlar kardiyovasküler hastalıklara karşı koruma sağlayabilir. Fenolik asitler, benzoik ve sinamik asitlerin hidroksillenmiş türevleridir. Fenolik asitler, antioksidan özelliklerinden dolayı ateroskleroz ve kanser başta olmak üzere birçok insan hastalığının önlenmesindeki rolleri nedeniyle çok dikkat çekmiştir. VA (4-hidroksi-3-metoksibenzoik asit), yenilebilir bitki ve meyvelerin fenolik bir türevidir. Antibakteriyel ve antimikrobiyal özelliklere sahiptir. VA ayrıca deneysel olarak indüklenen karsinogenezde kimyasal önleyici etki gösterir (96).

Angelica sinensis'in birkaç fitokimyasalı vardır ve önemli bir doğal antioksidan kaynağıdır. VA biyolojik membranı koruyan ve hücrelerde lipid peroksidasyonunu engelleyen bir diyet fenolik bileşiktir. Derin araştırmalar, VA'nın, hidroksil radikalleri ve lipid peroksit radikalleri dahil olmak üzere ROS'u temizleme veya ortadan kaldırma potansiyeline sahip olduğunu bildirmiştir. Vanilik asit ayrıca antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antitümörijenik ve hepatoprotektif etkiler göstermiştir (97).

Vanilik asit; antioksidan, hepatoprotektif, kardiyoprotektif ve antiapoptotik aktivitelere sahiptir. Hispidulin ve nepetin gibi bazı fenolik bileşiklerin immünosupresif özelliğe sahip olduğu bulunurken, aynı çalışmada vanilik asidin immün sistemi uyarıcı potansiyele sahip olduğu bulunmuştur. Hoş ve kremsi bir kokusu vardır, bu nedenle aroma maddesi olarak kullanılır. Vanilin ve VA'nın antiinflamatuvar etkileri ve oksidatif stres üzerindeki etkisi iyi bilinmektedir. VA'nın nörolojik bozukluklarda da rolü vardır. Oksidatif stres kaynaklı modelde alzheimer hastalığının patogenezinde yer alan β -amiloidi zayıflatmıştır (93).

Vanilik asit, genellikle gıda endüstrisinde katkı maddesi olarak kullanılan fenolik bileşiklere ait, doğal olarak oluşan bir aromatik asittir. Fenolik yapısından dolayı biyolojik membranı yalıtır ve hücrelerde lipid peroksidasyonunu kısıtlar. Mevcut literatür, vanilik asidin hidroksil ve lipid peroksil gibi ROS radikallerini temizleyip çıkarabildiğini göstermektedir.

Ayrıca antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antitümörijenik ve hepatoprotektif etkilere sahiptir. Vanillik asit açısından zengin diyetler, serbest radikal kanser oluşumunu azaltabilir ve farklı modellerde kimyasal ve fiziksel mutajenlerin neden olduğu mutajenezi yavaşlatabilir (98). Vanilik asitle muamele edilmiş hücrelerin hem ROS üretimi hem de DNA parçalanması açısından daha az etkilendiği gösterilmiştir. Buna göre, VA'nın gıda ve ilaç endüstrilerinde yeni bir antioksidan ajan olarak faydalı olabileceğini düşünülmektedir (98).

ROSMARİNİK ASİT

Rosmarinik Asit Nedir?

Rosmarinik asit, doğal olarak oluşan biyoaktif bir bileşiktir. Bu bileşiğin adı, RA'nın ilk kez izole edildiği bitkiden gelmektedir (99). RA ilk olarak 1958 yılında Scarpati ve Oriente tarafından *Rosmarinus officinalis* L.'den (Lamiaceae) izole edilmiştir (100).

Melissa officinalis (limon balsamı), *ocimum* gibi lamiaceae familyasına ait otlar (fesleğen), *origanum vulgare* (kekik), *perilla frutescens* (biftek bitkisi, çin fesleğeni), *rosmarinus officinalis* (biberiye), *salvia officinalis* (adaçayı) yemeklerde tatlandırıcı olarak ve tıbbi amaçlar için kullanılır. Bu bitkilerdeki yüksek rosmarinik asit içeriğinin terapötik aktivitelerine önemli bir katkı sağladığı gösterilmiştir (101).

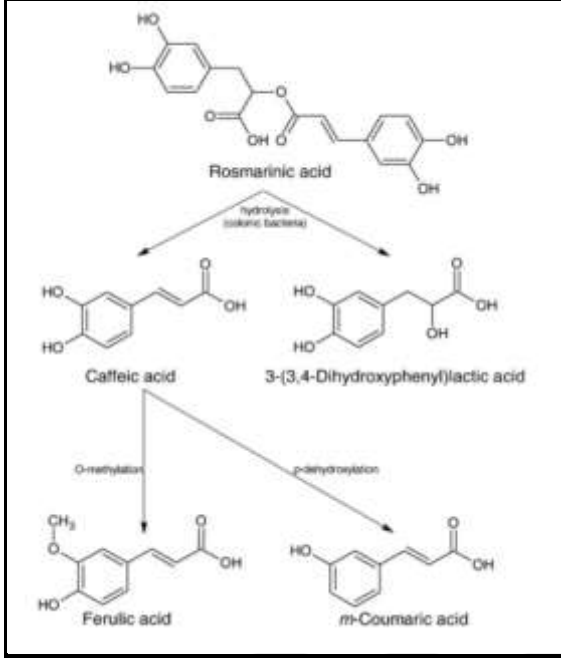
Rosmarinik Asit'in Kimyasal Yapısı

Yapısı kafeik asit ve 3,4-dihidroksifenillaktik asidin bir esterinden oluşur. RA molekülü, karboksilik grup, iki aromatik halka, doymamış C=C bağı ve ester kısmı içerir. Bu moleküler yapı, bu bileşiğin spesifik özelliklerini oluşturur (99).

Rosmarinik asit, kafeik asit ve 3,4-dihidroksifenillaktik asidin bir esteri ve doğal olarak oluşan bir polifenol flavonoiddir. RA'nın moleküler formülü C₁₈H₁₆O₈'dir. Her aromatik halkada iki komşu OH grubu ile iki aromatik halkaya sahiptir. Fenol OH ve diğer gruplar (katekol, fenolik asitler), H-verici aktivitelerinden dolayı RA'nın antioksidan aktivitesinden sorumludur. Benzer şekilde, RA bir fenolik asittir ve serbest radikalleri yakalayarak etkili bir antioksidan görevi görür. Suda az çözünür, ancak etanol, dimetil sülfoksit (DMSO) veya dimetil formamid (DMF) gibi çoğu organik çözücünde yaklaşık 25 mg/ml'de iyi çözünür. Moleküler ağırlığı 360.318g/mol'dür (102).

Rosmarinik asit, kolonik bakteriler tarafından iki kurucu organik asit olan kafeik asit (CA) ve 3,4-dihidroksifenillaktik asit'e (DHPLA) hidrolize edilir. Kafeik asit, ferulik asit (FA)

üretmek için O-metilasyon ile veya m-kumarik asit (m-CoA) üretmek için p-dehidroksilasyon ile daha da metabolize edilir (Şekil 13) (101).



Şekil 13. Rosmarinik Asit ve Metabolitlerinin Kimyasal Yapısı (101).

Rosmarinik Asit'in Biyolojik İşlevselliği

Fitokimyasallar, çok çeşitli akut ve kronik tıbbi durumları tedavi etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır ve kapsamlı araştırmalar, bu tür fitokimyasalların antioksidan aktivitesinin terapötik etkilerine önemli bir katkı sağladığına işaret etmektedir (101).

Rosmarinik asit birçok ilginç biyolojik aktiviteye sahiptir. Antioksidan aktivitesi E vitamininden daha güçlüdür ve hidroksisinamik asit türevleri serisinde en yüksektir: Rosmarinik asit > klorojenik asit > kafeik asit > ferulik asit > kumarik asit.

Antimikrobiyal aktivitesi de mevcuttur. RA; staphylococcus epidermidis, staphylococcus lugdunensis, stenotrophomonas maltophilia, enterococcus faecalis, pseudomonas aeruginosa, corynebacterium, mycobacterium smegmatis ve staphylococcus gibi bazı patojenik bakterilere karşı inhibitör ve bakterisidal etkiler göstermiştir. RA'nın antiviral, antialerjik, nöroprotektif, antiinflamatuvar, anti-HIV ve antitümör etkileri literatürde tanımlanmıştır. RA, sıçan kolon kanserinde güçlü bir kemopreventif ajan olarak kullanılabilir. Kolorektal karsinom metastazını engelleyebileceği bildirilmiştir (99).

Rosmarinik asidin önemli bir özelliği, membranları stabilize etme ve serbest radikal hareketini önleme, dolayısıyla membranları oksidasyona karşı koruma yeteneğine dayanan

antioksidan aktivitesidir. Bu aktivite, RA'nın lipozomlar olarak bilinen küresel veziküllerin genel stabilitesini arttırdığı gösterildiğinde doğrulanmıştır. Aynı zamanda, RA'nın ROS oluşumunu önemli ölçüde azalttığı ve T hücreleri ve makrofajlardan IL-6 salgılanmasını azalttığı, böylece UVB'nin neden olduğu insan keratinosit oluşumunu önlediği gösterilmiştir (100).

Rosmarinik asidin potansiyel olarak faydalı biyolojik etkileri olduğu bilinmektedir. RA, COX-2 enzimlerinin ekspresyonunu ve prostaglandin seviyelerini azaltarak anti-inflamatuar etkiler sergiler, bununla birlikte RA'nın topikal bozukluklarda potansiyel terapötik ve koruyucu faydaları olmuştur bunun hem antiinflamatuar hem de antioksidan özelliklerden kaynaklandığı öne sürülmüştür. Ayrıca, RA'nın insülin duyarlılığını iyileştirdiği ve plazma lipid seviyelerini düşürdüğü bilinmektedir bu da antidiyabetik etkiler için potansiyel bir mekanizma önermektedir (101).

Rosmarinik asidin ayrıca fibroz sürecini baskıladığı ve karaciğer fibrozlu bir sıçan modelinde patolojik dokuların biyokimyasal göstergelerini ve morfolojisini iyileştirdiği rapor edilmiştir. Bu durum karaciğer sitokinleri üzerindeki olumsuz etkiye ve ayrıca ilgili bir genin ekspresyon seviyelerine bağlanmıştır. RA'nın apoptotik etkisi ve diyetle uzun süreli büyük miktarlarda tüketildikten sonra antikanser aktivitesi, özellikle metastaz inhibe etme kapasitesi için güçlü kanıtlar sunulmuştur. Son zamanlarda, *S. khuzistanica* hücre süspansiyonlarından elde edilen RA ile zenginleştirilmiş metanolik ekstraktların, kaspaz 8 aktivitesini artırarak apoptozisin ekstresek yolunun aktivasyonu yoluyla apoptotik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (100).

Çoğu bitki, kimyasal yapıları ve biyoaktiviteleri nedeniyle tıbbi bitkiler olarak tanımlanır. Bu kimyasalları çeşitli teknikler kullanarak izole etmek için önemli araştırma çalışmaları yürütülmektedir. Modern yaşamın hızı nedeniyle, insanlar sağlığı korumada ve hastalıkları önlemede önemli zorluklarla karşı karşıyadır. Bu nedenle bu sorunların üstesinden gelmek için bitkisel ilaçlar kullanılmaktadır. RA içeren bitkiler genellikle bahçelerde mutfak otları olarak yetiştirilir ve yemek pişirmede kullanımlarına ek olarak, antioksidan, anti-inflamatuar ve antikanser özellikleri dahil olmak üzere birçok güçlü fizyolojik etkiye sahip oldukları bildirilmektedir. Bu bitkilerin ekstraktlarının, antikanser, antioksidan özellikleri nedeniyle önemli tıbbi etkilere sahip olduğu bildirilmektedir. Ayrıca anti-inflamatuar, anti-alerjik, anti-depresyon, antihiperglisemik ve antimikrobiyal özellikleri mevcuttur. RA; siklooksijenazı inhibe ederek prostaglandin sentezini bloke etmesi nedeniyle önemli anti-inflamatuar aktiviteye sahiptir (102).

BİYOKİMYASAL PARAMETRELER

Serum Total Antioksidan Durum (TAS), Serum Total Oksidan Durum (TOS), Oksidatif Stres İndeksi (OSI)

Toplam oksidan durumu (TOS) genellikle vücudun genel oksidasyon durumunu tahmin etmek için kullanılır. Benzer şekilde, toplam antioksidan durumu (TAS), vücudun genel antioksidan durumunu ölçmek için kullanılır. TOS'un TAS'a oranı olan oksidatif stres indeksi (OSI), TAS ve TOS'un kapsamlı bir ölçümü olduğu için vücuttaki oksidatif stresin daha kesin bir indeksi olabilir. TOS, TAS ve OSI vücuttaki genel oksidatif stres durumunu değerlendirmek için kullanılan oksidatif stres parametreleridir (103).

Serum Aril Esteraz (AREase), Laktonaz

Paraoksonaz (PON), insanın yedinci kromozomu q21-22 bölgesinde lokalizedir ve PON-1, PON-2 ve PON-3'ten oluşur (104). Paraoksonaz 1 (PON1), arilesteraz (AREase), paraoksonaz (POase) ve laktonaz aktiviteleri ile kalsiyum bağımlı çok işlevli bir enzimdir. PON1 esas olarak karaciğer tarafından sentezlenir ve kan dolaşımında yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ile birleşir. Enzim, ksenobiyotik toksisiteye karşı koruma sağlamak için çeşitli sinir ajanlarını ve organofosforlu insektisitleri hidrolize eder ve ayrıca düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonunu azaltır, makrofaj köpük hücre oluşumunu azaltır. Bu nedenle, PON1 antioksidan, antiinflamatuvar ve antiaterojenik yanıtlarda önemli bir rol oynar. PON1'in fizyolojik fonksiyonlarının laktonaz aktivitesi ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (105).

8-OH Dehidrogenaz

8-Hidroksideoksiguanozin (8-OHdG), çeşitli hastalıkların tetiklenmesinde rol oynayan oksidatif stresin en önemli ve en iyi belgelenmiş biyolojik belirteçidir. 8-OHdG seviyeleri, yaşa bağlı çeşitli kronik hastalıkların temel nedeni olduğu bilinen oksidatif DNA hasarı ile ilişkilidir (106).

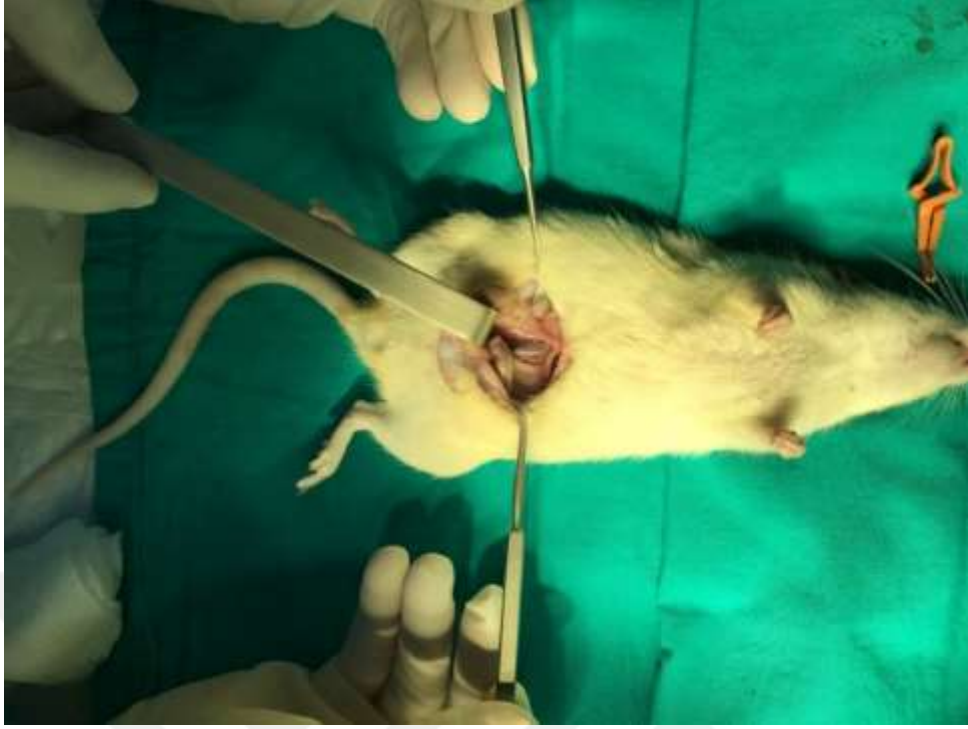
Birçok çalışma, 8-hidroksi-2'-deoksiguanozinin (8-OHdG) klinikte, çevrede SOR tarafından indüklenen oksidatif hasarı ve DNA mutasyonlarını değerlendirmek için bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini kanıtlamıştır (107).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun TÜHDYEK-2021/01 protokol, 2021.01.01 karar nolu onayı alındıktan sonra Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Birimi Laboratuvarı'nda yapıldı (Ek-1). Çalışmamız TÜBAP 2021/143 no'lu proje ile desteklendi (Ek-2). Sıçanlar Deney Hayvanları Birimi'nden temin edildi. Çalışmada yaklaşık 3.5-4 aylık, dişi, 190-250 gr ağırlığında, 48 adet Sprague-Dawley sıçan kullanıldı. Sıçanlar randomize olarak eşit sayıda (n=8) 6 gruba ayrıldı. Sıçanlar deney süresince 12'şer saatlik aydınlık-karanlık ışıklandırması olan, ısısı 20-22 C⁰ ve nem oranı %45-50 olan, otomatik olarak ayarlanan odalarda yaşatıldı. Bu süreçte tüm sıçanlar şeffaf kafeslerde tutuldu. Sıçanların beslenmesinde standart ticari pellet yemi ve çeşme suyu kullanıldı. Deneye başlamadan önce hayvanların bir hafta ortam koşullarına adaptasyonları sağlandı.

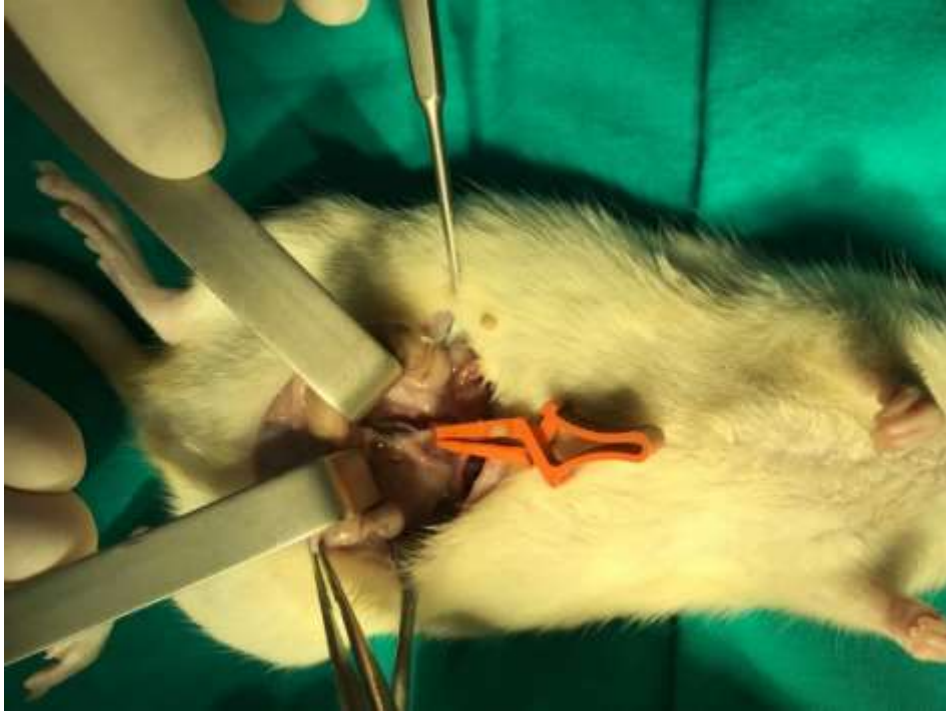
DENEKLERİN HAZIRLANMASI VE CERRAHİ TEKNİK

Tüm sıçanlara 8 saatlik açlık sonrasında ketamine HCl 40 mg/kg + ksilazin hidroklorür 5 mg/kg sol ön ayak adalesine intramusküler yolla uygulanarak anestezi uygulandı. Gerekli olduğunda deney süresince bir kez olmak üzere ketamine HCl ek doz yapılması planlandı. İşlem boyunca sıçanların solunumları spontan olarak devam edecek şekilde uygulandı. Sıçanlar ısıtıcı lamba altında supin pozisyonda masaya yatırıldı. Tüm sıçanların ciltleri aseptik olarak hazırlandıktan sonra ksifoidin hemen altından pubisin 0,5 cm üstüne kadar orta hat median laparotomi yapıldı. Laporotomi sonrası barsaklar nemli bez yardımı ile sağa deviye edildi. İnfrarenal abdominal aorta ve bilateral böbrekler künt diseksiyonla explore edildi (Resim 1).



Resim 1. İnfrarenal abdominal aortanın eksplere edilmesi.

Tüm sıçanlara antikoagölan amaçlı düşük doz (100 ü/kg) heparin yapıldı. İnfrarenal abdominal aortaya atravmatik mikrovasküler klemp kondu (Resim 2).



Resim 2. İnfrarenal abdominal aortaya atravmatik mikrovasküler klemp koyulması.

Klemp sonrasında peritoneal boşluğa yaklaşık 5 ml ılık serum fizyolojik sıkıldı. Sıvı kaybını önlemek için karın 3 adet ipek dikiş ile yaklaştırıldı. 1 saatlik iskemiye takiben infrarenal abdominal aortadaki atravmatik mikrovasküler klemp kaldırıldı ve 2 saatlik reperfüzyon periyodu uygulandı. İlaç uygulanacak olan gruplarda klemp kaldırılmadan, reperfüzyon başlamadan 15 dakika önce belirlenen ilaçlar benzer çalışmalardan hareketle belirlenen dozlarda intraperitoneal olarak uygulandı. Aortik iskemi klempleme işlemi sonrasında aortada pulsasyon kaybı, reperfüzyon ise klempin kaldırılmasından sonra aortada pulsasyon varlığı ile takip edildi. Deneyin sonunda tüm gruplarda sıçanların bilateral böbrekleri alındı. İşlem sonrası sıçanlar sakrifiye edildi. Böbrek dokuları %10'luk formaldehit solüsyonu içinde saklandı.

DENEY GRUPLARI

Kontrol Grubu (K) (n=8)

Cerrahi hazırlık ve anestezi indüksiyonu sonrasında median laparotomi yapılarak infrarenal aort eksplere edildi. Aort künt diseksiyonla döndü. Aorta klemp konulmadı. Karın içine ılık serum fizyolojik enjekte edilerek, karın 3 adet ipek ile yaklaştırıldı. Diğer gruplara uygulanan 1 saat iskemi, 2 saat reperfüzyon süresi tamamlandı. İşlem sonunda sıçanların kan örnekleri ve bilateral böbrekleri alınarak sakrifiye edildi.

İskemi/Reperfüzyon Grubu (İ/R) (n=8)

Cerrahi hazırlık ve anestezi indüksiyonu sonrasında median laparotomi yapılarak infrarenal aort eksplere edildi. Aort künt diseksiyonla döndü ve atravmatik mikrovasküler klemp yerleştirildi. Aorta distalinde pulsasyon kaybı olduğu görüldü. Karın içine ılık serum fizyolojik enjekte edilerek, karın 3 adet ipek ile yaklaştırıldı. 1 saatlik iskemi ardından ipekler alındı. Mikrovasküler klemp kaldırıldı. Aorta distalinde pulsasyonun tekrar başladığı görüldü. Karın katları tekrar yaklaştırıldı. 2 saatlik reperfüzyon periyodunun ardından kan örnekleri ve bilateral böbrekler alınarak sıçanlar sakrifiye edildi.

İskemi/Reperfüzyon + Ellajik Asit Grubu (İ/R+EA) (n=8)

Cerrahi hazırlık ve anestezi indüksiyonu sonrasında median laparotomi yapılarak infrarenal aort eksplere edildi. Aort künt diseksiyonla döndü ve atravmatik mikrovasküler klemp yerleştirildi. Aorta distalinde pulsasyon kaybı olduğu görüldü. Karın içine ılık serum fizyolojik enjekte edilerek, karın 3 adet ipek ile yaklaştırıldı. 1 saatlik iskemi ardından ipekler

alındı. Mikrovasküler klemp kaldırıldı. Aorta distalinde pulsasyonun tekrar başladığı görüldü. Karın katları sıvı kaybını engellemek amacıyla tekrar yaklaştırıldı. Klemp kaldırılmadan, reperfüzyon başlamadan 15 dakika önce ellajik asit 100 mg/kg intraperitoneal olarak uygulandı. Reperfüzyon süresinin sonunda ipek sütürler alınarak batın tekrar açıldı. Sıçanların kan örnekleri ve bilateral böbrekleri alınarak sakrifiye edildi.

İskemi/Reperfüzyon + Vanilik Asit Grubu (İ/R+VA) (n=8)

Cerrahi hazırlık ve anestezi indüksiyonu sonrasında median laparotomi yapılarak infrarenal aort eksplere edildi. Aort künt diseksiyonla dönüldü ve atravmatik mikrovasküler klemp yerleştirildi. Aorta distalinde pulsasyon kaybı olduğu görüldü. Karın içine ılık serum fizyolojik enjekte edilerek, karın 3 adet ipek ile yaklaştırıldı. 1 saatlik iskemi ardından ipekler alındı. Mikrovasküler klemp kaldırıldı. Aorta distalinde pulsasyonun tekrar başladığı görüldü. Karın katları sıvı kaybını engellemek amacıyla tekrar yaklaştırıldı. Klemp kaldırılmadan, reperfüzyon başlamadan 15 dakika önce vanilik asit 12 mg/kg intraperitoneal olarak uygulandı. Reperfüzyon süresinin sonunda ipek sütürler alınarak batın tekrar açıldı. Sıçanların kan örnekleri ve bilateral böbrekleri alınarak sakrifiye edildi.

İskemi/Reperfüzyon + Rosmarinik Asit Grubu (İ/R+RA) (n=8)

Cerrahi hazırlık ve anestezi indüksiyonu sonrasında median laparotomi yapılarak infrarenal aort eksplere edildi. Aort künt diseksiyonla dönüldü ve atravmatik mikrovasküler klemp yerleştirildi. Aorta distalinde pulsasyon kaybı olduğu görüldü. Karın içine ılık serum fizyolojik enjekte edilerek, karın 3 adet ipek ile yaklaştırıldı. 1 saatlik iskemi ardından ipekler alındı. Mikrovasküler klemp kaldırıldı. Aorta distalinde pulsasyonun tekrar başladığı görüldü. Karın katları sıvı kaybını engellemek amacıyla tekrar yaklaştırıldı. Klemp kaldırılmadan, reperfüzyon başlamadan 15 dakika önce rosmarinik asit 50 mg/kg intraperitoneal olarak uygulandı. Reperfüzyon süresinin sonunda ipek sütürler alınarak batın tekrar açıldı. Sıçanların kan örnekleri ve bilateral böbrekleri alınarak sakrifiye edildi.

İskemi/Reperfüzyon + Ellajik Asit + Vanilik Asit + Rosmarinik Asit Grubu (İ/R+EA+VA+RA) (n=8)

Cerrahi hazırlık ve anestezi indüksiyonu sonrasında median laparotomi yapılarak infrarenal aort eksplere edildi. Aort künt diseksiyonla dönüldü ve atravmatik mikrovasküler klemp yerleştirildi. Aorta distalinde pulsasyon kaybı olduğu görüldü. Karın içine ılık serum fizyolojik enjekte edilerek, karın 3 adet ipek ile yaklaştırıldı. 1 saatlik iskemi ardından ipekler

alındı. Mikrovasküler klemp kaldırıldı. Aorta distalinde pulsasyonun tekrar başladığı görüldü. Karın katları sıvı kaybını engellemek amacıyla tekrar yaklaştırıldı. Klemp kaldırılmadan, reperfüzyon başlamadan 15 dakika önce ellajik asit 100 mg/kg, vanilik asit 12 mg/kg ve rosmarinik asit 50 mg/kg intraperitoneal olarak uygulandı. Reperfüzyon süresinin sonunda ipek sütürler alınarak batın tekrar açıldı. Sıçanların kan örnekleri ve bilateral böbrekleri alınarak sakrifiye edildi.

Böbrek Dokularının Histopatolojik İncelenmesi

Histopatolojik inceleme için böbrek dokuları ayrı ayrı %10'luk tamponlu nötral formaldehit çözeltisinde fikse edildi. Örneklerden parafin bloklar hazırlandı. Bu parafin bloklardan mikrotom yardımı ile 3-4 mikronluk kesitler alınarak hematoksilin eozin (H+E) ile boyandı. Histopatolojik inceleme ışık mikroskobu ile yapıldı.

Histopatolojik Skorlama

Skorlama yapılırken preparatlarda; glomerüler skleroz, fokal glomerüler nekroz, Bowman kapsülü dilatasyonu, tübül epitel dejenerasyonu, tübül epitelinde nekroz, tübüler dilatasyon, interstisyel inflamatuvar infiltrasyon, damar konjesyonu, damar duvar kalınlaşması, interstisyel fibrozis değerlendirildi.

Skorlama;

+0: Değişiklik yok

+1: Fokal, hafif

+2: Multifokal, orta

+3: Belirgin, yaygın

Biyokimyasal İnceleme

Sıçanlardan alınan kan örnekleri, antikoagülan içermeyen, sarı kapaklı biyokimya tüplerine konarak biyokimya laboratuvarına transfer edildi. Numunelerin pıhtılaşma sürecinin tamamlanması beklendi. Ardından 3000g'de, 10dk santrifüj edilerek serumlarına ayrıldı. Elde edilen numuneler porsiyonlanarak çalışma gününe kadar -80°C'de muhafaza edildi. Çalışma gününde oda ısısına getirilen numunelerde serum total antioksidan durum (TAS) ve total oksidan durum (TOS) spektrofotometrik olarak ölçüldü ve oksidatif stres indeksi (OSI) hesaplandı. Serum arilesteraz ve laktonaz aktiviteleri sırasıyla fenilasetat ve dihidrokumarin

kullanılarak spektrofotometrede kinetik olarak ölçüldü. Serum 8-OhDG düzeyi ölçümü ticari kitin prospektüsüne göre enzyme-linked immunoassay (ELISA) yöntemiyle yapıldı.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Deneyde Kullanılacak Hayvan Sayısının Belirlenmesi

Bakar ve ark. (108) tarafından gerçekleştirilen çalışma referans alınarak etki büyüklüğü 0,85 olarak belirlenmiştir. Bu etki büyüklüğü göz önünde bulundurularak %80 güç ve %5 anlamlılık düzeyinde çalışmaya toplam 36 “gözlemin” dahil edilmesinin yeterli olacağı öngörüldü. Bununla birlikte çalışmada %30’luk bir kayıp öngörüldüğü için çalışmaya 48 “gözlemin” dahil edilmesine karar verildi.

Verilerin İstatistiksel Analizinin Yapılması

Çalışmada histopatolojik ve biyokimyasal ölçümlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Normallik testi sonucuna göre çalışmada değişkenler öncelikli olarak medyan(minimum:maksimum) değerleriyle ifade edilmiş olup ortalama(mean) ve standart sapma değerleriyle desteklendi.

Gruplar arasında yapılan karşılaştırmalarda Kruskal Wallis testi kullanıldı. Kruskal Wallis testi sonrasında genel anlamlılık elde edilmesi durumunda alt grup analizler Dunn-Bonferroni testi kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmanın analizleri SPSS (IBM Corp. Released 2015. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.) programında yapılmış olup, istatistiksel karşılaştırmalarda tip I hata oranı %5 olarak kabul edildi. Tüm istatistiksel analizlerde anlamlılık düzeyi 0,05 olarak belirlendi.

BULGULAR

Çalışmada 6 grup ve her grupta 8 adet olmak üzere 48 adet sıçan kullanıldı. Kontrol grubu “Grup 1”,
iskemi/reperfüzyon grubu “Grup 2”,
iskemi/reperfüzyon+ellajik asit grubu “Grup 3”,
iskemi/reperfüzyon+vanilik asit grubu “Grup 4”,
iskemi/reperfüzyon+rosmarinik asit grubu “Grup 5” ve
iskemi/reperfüzyon+ellajik asit+vanilik asit+rosmarinik asit grubu “Grup 6” olarak adlandırıldı.

HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Histopatolojik skora göre kontrol grubu histopatolojik bulguları Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3. Kontrol Grubu histopatolojik inceleme

	Grup 1 Kontrol							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Glomerüler Skleroz	0	0	0	0	0	0	0	0
Fokal Glomerüler Nekroz	0	0	0	0	0	0	0	0
Bowman Kapsül Dilatasyonu	0	2	1	2	0	0	0	2
Tübül Epitel Dejenerasyonu	1	0	1	2	1	1	1	0
Tübül Epitelinde Nekroz	0	0	1	0	0	0	0	0
Tübüler Dilatasyon	1	0	0	1	0	0	0	1
İnterstiyel İnflamatuar İnfiltrasyon	2	2	1	1	2	1	1	1
Damar Konjesyonu	1	3	1	0	1	0	1	1
Damar Duvar Kalınlaşması	0	1	1	0	0	1	0	0
İnterstiyel Fibrozis	0	0	0	0	0	0	0	0

+0: Değişiklik yok +1: Fokal, hafif +2: Multifokal, orta +3: Belirgin, yaygın

Histopatolojik skora göre İ/R grubu histopatolojik bulguları Tablo 4'te gösterilmiştir.

Tablo 4. İ/R Grubu histopatolojik inceleme

	Grup 2 İ/R							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Glomerüler Skleroz	0	0	0	0	0	0	0	0
Fokal Glomerüler Nekroz	0	0	0	0	0	0	0	0
Bowman Kapsül Dilatasyonu	1	3	1	1	1	2	0	1
Tübül Epitel Dejenerasyonu	2	2	2	3	2	2	2	3
Tübül Epitelinde Nekroz	2	2	1	2	3	1	2	2
Tübüler Dilatasyon	2	2	3	1	3	1	2	1
İnterstiyel İnflamatuar İnfiltrasyon	2	3	3	2	1	1	3	1
Damar Konjesyonu	2	2	3	2	3	3	1	3
Damar Duvar Kalınlaşması	1	2	1	1	2	2	2	3
İnterstiyel Fibrozis	0	0	0	0	0	0	0	0

+0: Değişiklik yok +1: Fokal, hafif +2: Multifokal, orta +3: Belirgin, yaygın

Histopatolojik skrolama sistemine göre İ/R+EA grubu histopatolojik bulguları Tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 5. İ/R+EA histopatolojik inceleme

	Grup 3 İ/R+EA							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Glomerüler Skleroz	0	ex	0	0	0	0	0	0
Fokal Glomerüler Nekroz	0	ex	0	0	0	0	0	0
Bowman Kapsül Dilatasyonu	0	ex	1	1	1	2	2	3
Tübül Epitel Dejenerasyonu	3	ex	3	2	2	3	2	2
Tübül Epitelinde Nekroz	3	ex	2	2	1	1	1	1
Tübüler Dilatasyon	3	ex	3	3	3	3	3	3
İnterstisyel İnflamatuar İnfiltasyon	2	ex	2	3	3	2	2	2
Damar Konjesyonu	3	ex	1	3	1	3	3	1
Damar Duvar Kalınlaşması	1	ex	0	0	1	1	1	2
İnterstisyel Fibrozis	0	ex	0	0	0	0	0	0

+0: Değişiklik yok +1: Fokal, hafif +2: Multifokal, orta +3: Belirgin, yaygın

İ/R+EA grubunda bir sıçan çalışma sırasında ex olmuştur.

Histopatolojik skrolama sistemine göre İ/R+VA grubu histopatolojik bulguları Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. İ/R+VA histopatolojik inceleme

	Grup 4 İ/R+VA							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Glomerüler Skleroz	0	0	0	0	0	0	0	0
Fokal Glomerüler Nekroz	0	0	1	0	0	0	0	0
Bowman Kapsül Dilatasyonu	1	1	0	0	1	0	0	0
Tübül Epitel Dejenerasyonu	2	2	3	3	3	2	3	3
Tübül Epitelinde Nekroz	2	1	3	3	2	3	2	2
Tübüler Dilatasyon	3	0	1	1	1	1	1	0
İnterstisyel İnflamatuar İnfiltasyon	0	2	3	2	1	3	2	3
Damar Konjesyonu	3	2	3	1	2	2	1	3
Damar Duvar Kalınlaşması	2	3	2	1	1	3	2	1
İnterstisyel Fibrozis	0	0	0	0	0	0	0	0

+0: Değişiklik yok +1: Fokal, hafif +2: Multifokal, orta +3: Belirgin, yaygın

Histopatolojik skarlama sistemine göre İ/R+RA grubu histopatolojik bulguları Tablo 7’de gösterilmiştir.

Tablo 7. İ/R+RA histopatolojik inceleme

	Grup 5 İ/R+RA							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Glomerüler Skleroz	0	0	0	0	0	0	0	0
Fokal Glomerüler Nekroz	0	0	0	1	0	0	0	0
Bowman Kapsül Dilatasyonu	0	1	0	0	0	0	0	0
Tübül Epitel Dejenerasyonu	2	3	2	3	2	3	2	2
Tübül Epitelinde Nekroz	2	3	2	1	1	1	2	3
Tübüler Dilatasyon	1	2	1	3	1	3	2	1
İnterstisyel İnflamatuar İnfiltrasyon	2	3	3	2	1	2	2	1
Damar Konjesyonu	1	2	1	0	0	2	1	1
Damar Duvar Kalınlaşması	3	2	3	1	2	2	3	2
İnterstisyel Fibrozis	0	0	0	0	0	0	0	0

+0: Değişiklik yok +1: Fokal, hafif +2: Multifokal, orta +3: Belirgin, yaygın

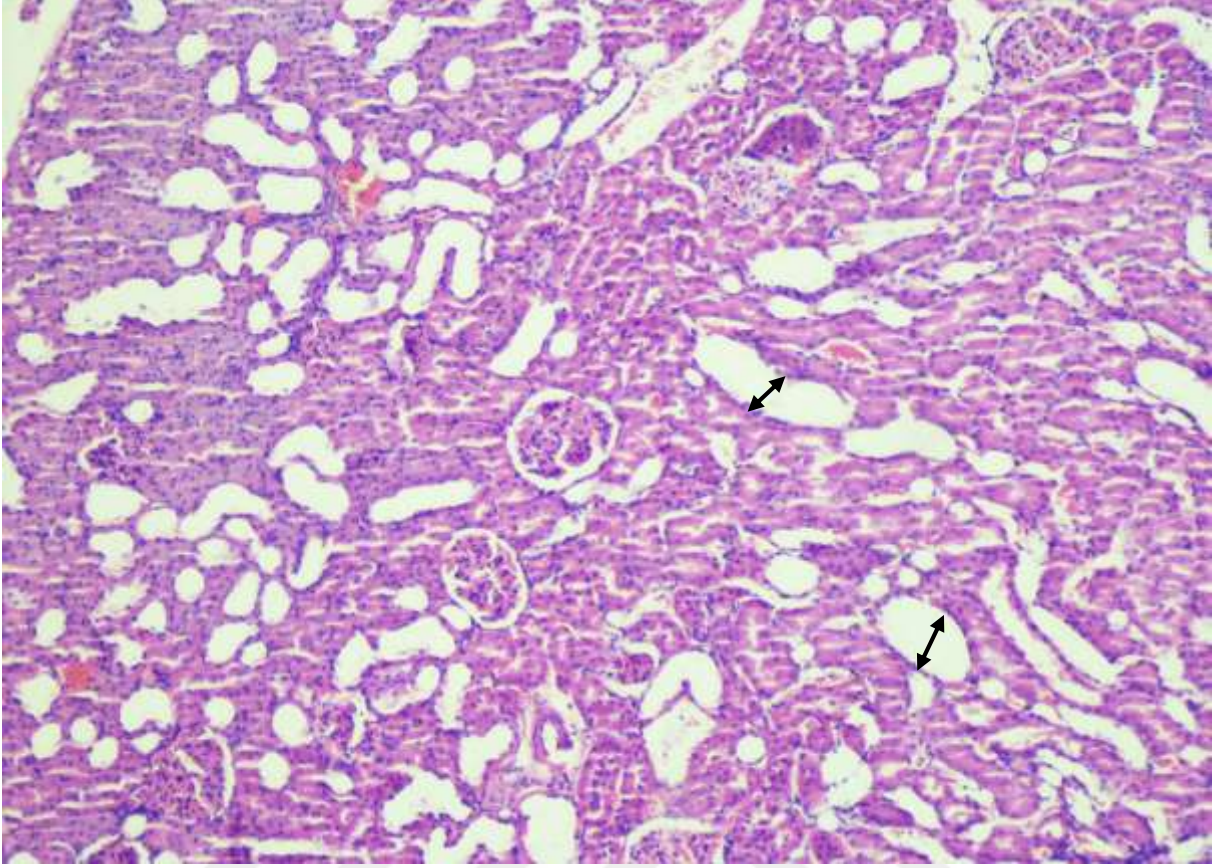
Histopatolojik skarlama sistemine göre İ/R+EA+VA+RA grubu histopatolojik bulguları Tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo 8. İ/R+EA+VA+RA histopatolojik inceleme

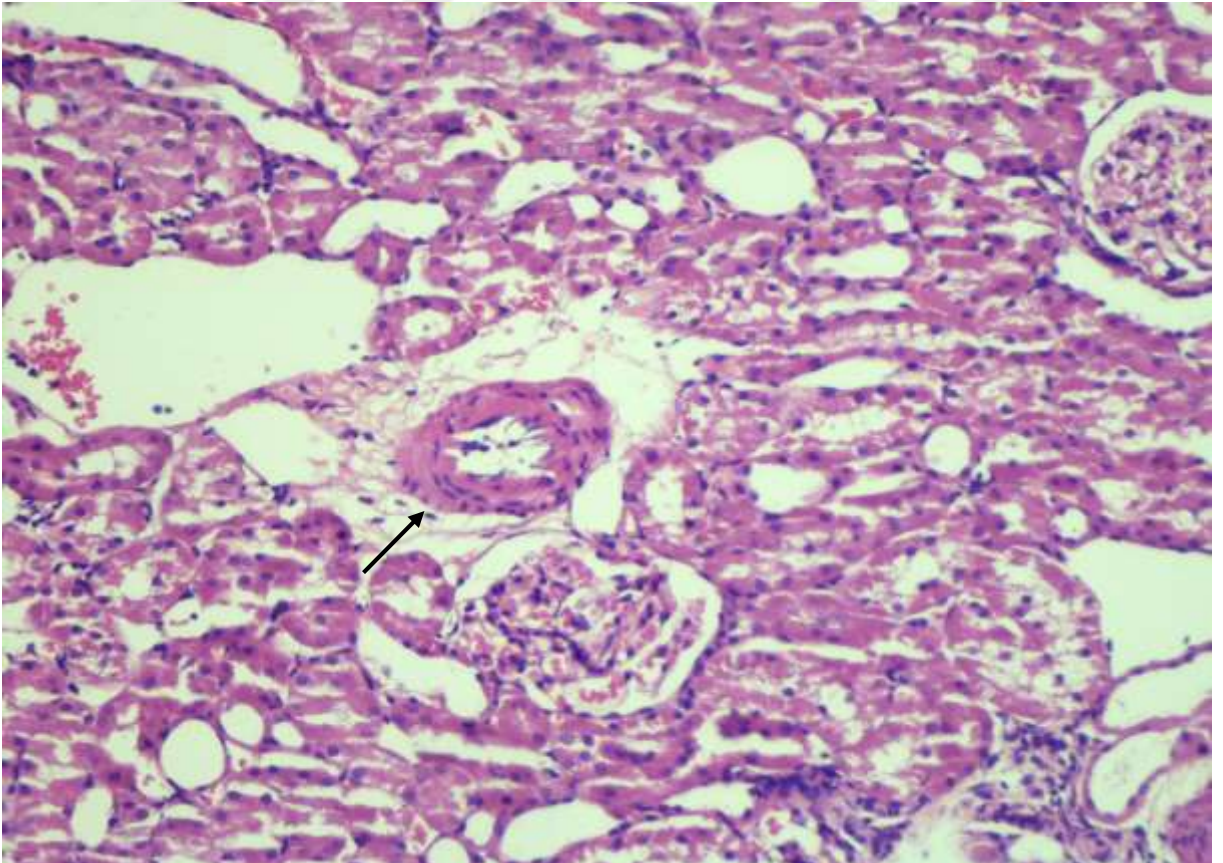
	Grup 6 İ/R+EA+VA+RA							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Glomerüler Skleroz	0	0	0	0	0	0	0	0
Fokal Glomerüler Nekroz	0	0	0	0	0	0	0	0
Bowman Kapsül Dilatasyonu	1	2	2	3	2	1	2	1
Tübül Epitel Dejenerasyonu	3	2	2	1	2	2	1	3
Tübül Epitelinde Nekroz	2	1	2	2	1	1	1	3
Tübüler Dilatasyon	2	3	3	3	3	3	3	3
İnterstisyel İnflamatuar İnfiltrasyon	3	3	2	1	1	3	2	2
Damar Konjesyonu	3	3	3	1	3	3	3	3
Damar Duvar Kalınlaşması	1	1	1	1	1	1	2	1
İnterstisyel Fibrozis	0	0	0	0	0	0	0	0

+0: Değişiklik yok +1: Fokal, hafif +2: Multifokal, orta +3: Belirgin, yaygın

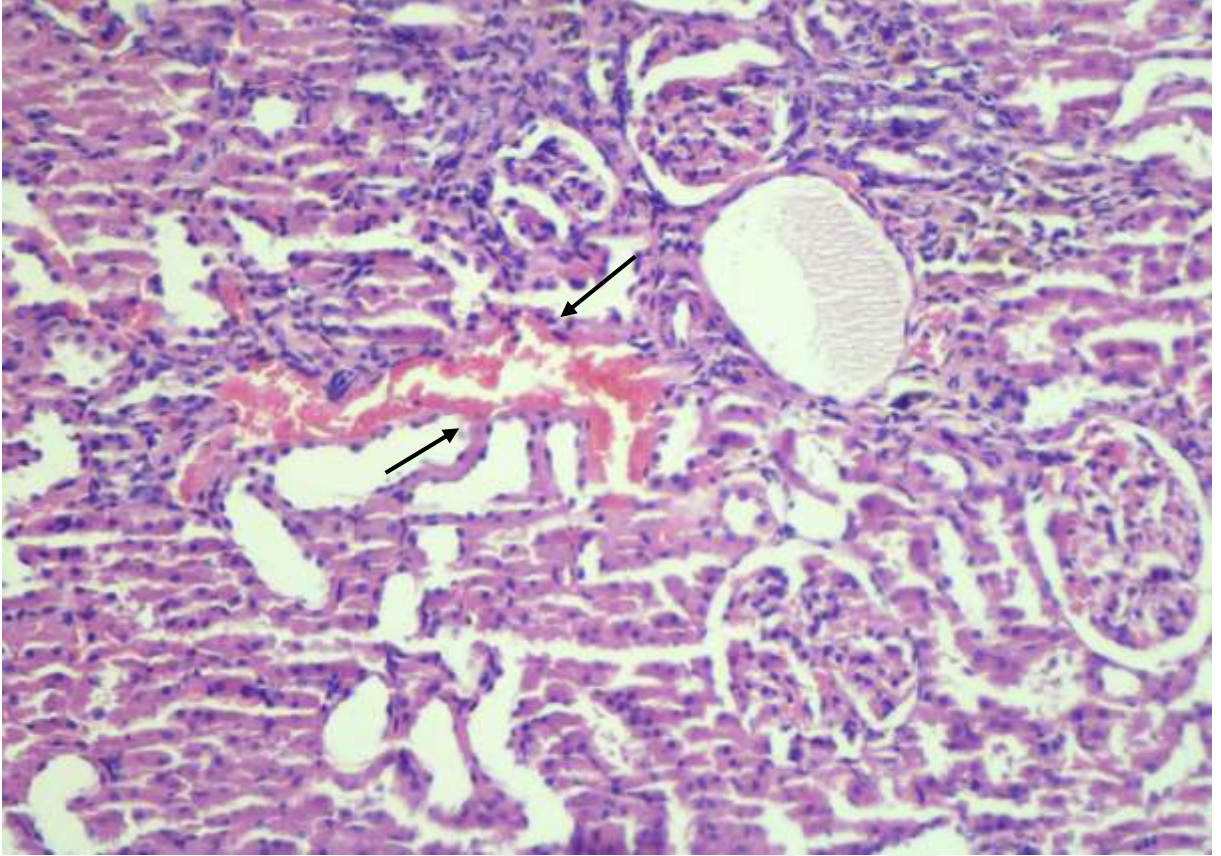
Böbrek dokusuna ait histopatolojik kesitler Şekil 14-17’de verilmiştir.



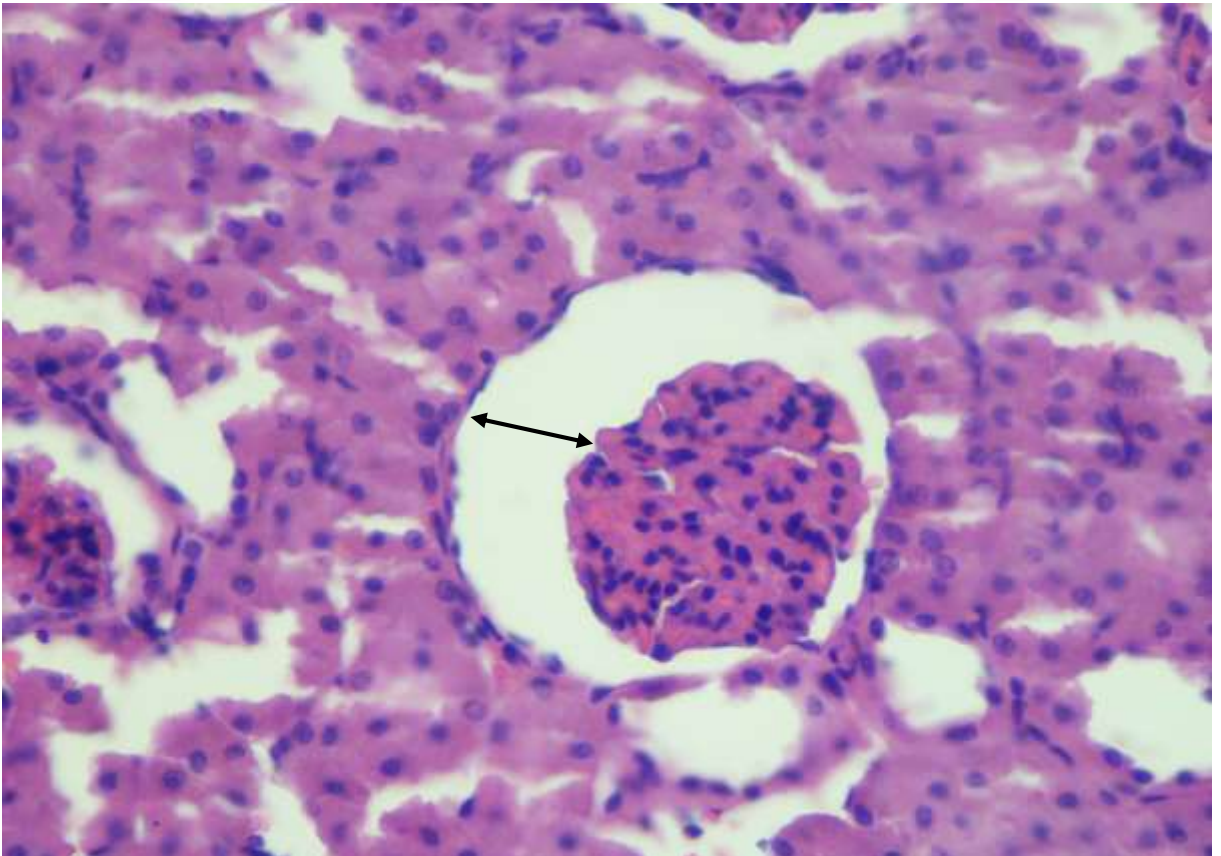
Şekil 14. İskemi/Reperfüzyon grubunda belirgin tübüler dilatasyon (H&E X100)



Şekil 15. İskemi/Reperfüzyon grubunda belirgin damar duvar kalınlaşması (H&E X200)



Şekil 16. İskemi/Reperfüzyon grubunda belirgin damar konjesyonu (H&E X200)



Şekil 17. İskemi/Reperfüzyon grubunda belirgin bowman kapsül dilatasyonu (H&E X400)

HİSTOPATOLOJİK İSTATİSTİKSEL BULGULAR

Tablo 9. Histopatolojik parametrelerin median(min:max) değerleri ve ortalama değerleri(mean) ± standart sapmalar

Gruplar	Glomerüler Skleroz	Fokal Glomerüler Nekroz	Bowman Kapsül Dilatasyonu	Tübül Epitel Dejenerasyonu	Tübül Epitelinde Nekroz	Tübüler Dilatasyon	İnterstisyel İnflamatuvar İnfiltrasyon	Damar Konjesyonu	Damar Duvar Kalınlaşması	İnterstisyel Fibrozis
Kontrol	0,00(0,00:0,00) 0,00±0,00	0,00(0,00:0,00) 0,00±0,00	0,50(0,00:2,00) 0,87±0,99	1,00(0,00:2,00) 0,87±0,64	0,00(0,00:1,00) 0,12±0,35	0,00(0,00:1,00) 0,37±0,51	1,00(1,00:2,00) 1,37±0,51	1,00(0,00:3,00) 1,00±0,92	0,00(0,00:1,00) 0,37±0,51	0,00(0,00:0,00) 0,00±0,00
İ/R	0,00(0,00:0,00) 0,00±0,00	0,00(0,00:0,00) 0,00±0,00	1,00(0,00:3,00) 1,25±0,88	2,00(2,00:3,00) 2,25±0,46	2,00(1,00:3,00) 1,87±0,64	2,00(1,00:3,00) 1,87±0,83	2,00(1,00:3,00) 2,00±0,92	2,50(1,00:3,00) 2,37±0,74	2,00(1,00:3,00) 1,75±0,70	0,00(0,00:0,00) 0,00±0,00
İ/R+EA	0,00(0,00:0,00) 0,00±0,00	0,00(0,00:0,00) 0,00±0,00	1,00(0,00:3,00) 1,42±0,97	2,00(2,00:3,00) 2,42±0,53	1,00(1,00:3,00) 1,57±0,78	3,00(3,00:3,00) 3,00±0,00	2,00(2,00:3,00) 2,28±0,48	3,00(1,00:3,00) 2,14±1,06	1,00(0,00:2,00) 0,85±0,69	0,00(0,00:0,00) 0,00±0,00
İ/R+VA	0,00(0,00:0,00) 0,00±0,00	0,00(0,00:1,00) 0,12±0,35	0,00(0,00:1,00) 0,37±0,51	3,00(2,00:3,00) 2,62±0,51	2,00(1,00:3,00) 2,25±0,70	1,00(0,00:3,00) 1,00±0,92	2,00(0,00:3,00) 2,00±1,06	2,00(1,00:3,00) 2,12±0,83	2,00(1,00:3,00) 1,87±0,83	0,00(0,00:0,00) 0,00±0,00
İ/R+RA	0,00(0,00:0,00) 0,00±0,00	0,00(0,00:1,00) 0,12±0,35	0,00(0,00:1,00) 0,12±0,35	2,00(2,00:3,00) 2,37±0,51	2,00(1,00:3,00) 1,87±0,83	1,50(1,00:3,00) 1,75±0,88	2,00(1,00:3,00) 2,00±0,75	1,00(0,00:2,00) 1,00±0,75	2,00(1,00:3,00) 2,25±0,70	0,00(0,00:0,00) 0,00±0,00
İ/R+EA+VA+RA	0,00(0,00:0,00) 0,00±0,00	0,00(0,00:0,00) 0,00±0,00	2,00(1,00:3,00) 1,75±0,70	2,00(1,00:3,00) 2,00±0,75	1,50(1,00:3,00) 1,62±0,74	3,00(2,00:3,00) 2,87±0,35	2,00(1,00:3,00) 2,12±0,83	3,00(1,00:3,00) 2,75±0,70	1,00(1,00(2,00) 1,12±0,35	0,00(0,00:0,00) 0,00±0,00
p değeri		0,55	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	0,28	<0,01*	<0,01*	

*: İstatistiksel olarak anlamlı(p<0,05)

Kruskal Wallis testi ile 6 grup histopatolojik olarak birbiri ile karşılaştırıldı. Glomerüler skleroz ve interstisyel fibrozis tüm gruplarda 0(değişiklik yok) saptandığı için değerlendirmeye katılmadı. Gruplar arasında fokal glomerüler nekroz ve interstisyel inflamatuvar infiltrasyon açısından anlamlı farklılık saptanmadı ancak bowman kapsül dilatasyonu, tübül epitel dejenerasyonu, tübül epitelinde nekroz, tübüler dilatasyon, damar konjesyonu ve damar duvar kalınlaşması açısından anlamlı farklılık saptandı(p<0,05).

İkili gruplar arası istatistiksel değerlendirme Dunn-Bonferroni testi kullanıldı ve p<0,05 anlamlı istatistiksel sınır olarak kabul edildi. Sonuçlar tablo 10'da gösterilmiştir. Fokal glomerüler nekroz ve interstisyel inflamatuvar infiltrasyon Kruskal Wallis testinde istatistiksel olarak anlamlı tespit edilmediği için ikili değerlendirmeye alınmadı.

İ/R+EA grubunda bir sıçan çalışma sırasında ex olduğu için istatistiksel değerlendirmeye alınmadı.

Histopatolojik parametrelerin median ve ortalama değerleri Tablo 9’da gösterilmiştir.

Tablo 10. Histopatolojik verilerin ikili gruplar arası istatistiksel analiz p değerleri

	Bowman Kapsül Dilatasyonu	Tübül Epitel Dejenerasyonu	Tübül Epitelinde Nekroz	Tübüler Dilatasyon	Damar Konjesyonu	Damar Duvar Kalınlaşması
Kontrol – İ/R	>0,99	0,03*	<0,01*	0,16	0,15	0,02*
Kontrol – İ/R+EA	>0,99	<0,01*	0,1	<0,01*	0,57	>0,99
Kontrol – İ/R+VA	>0,99	<0,01*	<0,01*	>0,99	0,57	0,01*
Kontrol – İ/R+RA	>0,99	0,01*	<0,01*	0,28	>0,99	<0,01*
Kontrol– İ/R+EA+VA+RA	0,79	0,23	0,05	<0,01*	0,01*	>0,99
İ/R – İ/R+EA	>0,99	>0,99	>0,99	0,71	>0,99	0,67
İ/R – İ/R+VA	0,79	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99
İ/R – İ/R+RA	0,14	>0,99	>0,99	>0,99	0,14	>0,99
İ/R– İ/R+EA+VA+RA	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99
İ/R+EA – İ/R+VA	0,42	>0,99	>0,99	0,01*	>0,99	0,43
İ/R+EA – İ/R+RA	0,07	>0,99	>0,99	0,44	0,53	0,04*
İ/R+EA– İ/R+EA+VA+RA	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99
İ/R+VA – İ/R+RA	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	0,53	>0,99
İ/R+VA– İ/R+EA+VA+RA	0,03*	>0,99	>0,99	0,01*	>0,99	>0,99
İ/R+RA– İ/R+EA+VA+RA	<0,01*	>0,99	>0,99	0,66	0,01*	0,17

*: İstatistiksel olarak anlamlı(p<0,05)

- Kontrol grubu ile İ/R grubu karşılaştırıldığında tübül epitel dejenerasyonu düzeyleri İ/R grubunda kontrol grubuna göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu(p<0,05).
- Kontrol grubu ile İ/R grubu karşılaştırıldığında tübül epitelinde nekroz düzeyleri İ/R grubunda kontrol grubuna göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu(p<0,05).
- Kontrol grubu ile İ/R grubu karşılaştırıldığında damar duvar kalınlaşması düzeyleri İ/R grubunda kontrol grubuna göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu(p<0,05).
- Kontrol grubu ile İ/R+EA grubu karşılaştırıldığında tübül epitel dejenerasyonu düzeyleri

İ/R+EA grubunda kontrol grubuna göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu($p<0,05$).

- Kontrol grubu ile İ/R+EA grubu karşılaştırıldığında tübüler dilatasyon düzeyleri İ/R+EA grubunda kontrol grubuna göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu($p<0,05$).
- Kontrol grubu ile İ/R+VA grubu karşılaştırıldığında tübül epitel dejenerasyonu düzeyleri İ/R+VA grubunda kontrol grubuna göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu($p<0,05$).
- Kontrol grubu ile İ/R+VA grubu karşılaştırıldığında tübül epitelinde nekroz düzeyleri İ/R+VA grubunda kontrol grubuna göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu($p<0,05$).
- Kontrol grubu ile İ/R+VA grubu karşılaştırıldığında damar duvar kalınlaşması düzeyleri İ/R+VA grubunda kontrol grubuna göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu($p<0,05$).
- Kontrol grubu ile İ/R+RA grubu karşılaştırıldığında tübül epitel dejenerasyonu düzeyleri İ/R+RA grubunda kontrol grubuna göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu($p<0,05$).
- Kontrol grubu ile İ/R+RA grubu karşılaştırıldığında tübül epitelinde nekroz düzeyleri İ/R+RA grubunda kontrol grubuna göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu($p<0,05$).
- Kontrol grubu ile İ/R+RA grubu karşılaştırıldığında damar duvar kalınlaşması düzeyleri İ/R+RA grubunda kontrol grubuna göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu($p<0,05$).
- Kontrol grubu ile İ/R+EA+VA+RA grubu karşılaştırıldığında tübüler dilatasyon düzeyleri İ/R+EA+VA+RA grubunda kontrol grubuna göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu($p<0,05$).
- Kontrol grubu ile İ/R+EA+VA+RA grubu karşılaştırıldığında damar konjesyonu düzeyleri İ/R+EA+VA+RA grubunda kontrol grubuna göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu($p<0,05$).
- İ/R+EA grubu ile İ/R+VA grubu karşılaştırıldığında tübüler dilatasyon düzeyleri İ/R+EA grubunda İ/R+VA grubuna göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu($p<0,05$).
- İ/R+EA grubu ile İ/R+RA grubu karşılaştırıldığında damar duvar kalınlaşması düzeyleri İ/R+RA grubunda İ/R+EA grubuna göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu($p<0,05$).

- İ/R+VA grubu ile İ/R+EA+VA+RA grubu karşılaştırıldığında bowman kapsül dilatasyonu düzeyleri İ/R+EA+VA+RA grubunda İ/R+VA grubuna göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu($p<0,05$).
- İ/R+VA grubu ile İ/R+EA+VA+RA grubu karşılaştırıldığında tübüler dilatasyon düzeyleri İ/R+EA+VA+RA grubunda İ/R+VA grubuna göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu($p<0,05$).
- İ/R+RA grubu ile İ/R+EA+VA+RA grubu karşılaştırıldığında bowman kapsül dilatasyonu düzeyleri İ/R+EA+VA+RA grubunda İ/R+RA grubuna göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu($p<0,05$).
- İ/R+RA grubu ile İ/R+EA+VA+RA grubu karşılaştırıldığında damar konjesyonu düzeyleri İ/R+EA+VA+RA grubunda İ/R+RA grubuna göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu($p<0,05$) (Tablo 10).

BİYOKİMYASAL BULGULAR

Kontrol grubu biyokimyasal bulguları Tablo 11’de gösterilmiştir.

Tablo 11. Kontrol Grubu serum TOS, TAS, OSİ, Arilseteraz aktivitesi, Laktonaz aktivitesi ve 8-Hidroksi Deoksiguanozin değerleri

	Grup 1 Kontrol							
	1	2	3	4	5	6	7	8
TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eq/L)	8,18	10,54	8,47	9,56	17,73	10,94	7,29	7,78
TAS (mmol Trolox Eq/L)	1,62	1,60	1,57	1,49	1,15	1,48	1,78	1,65
OSİ	0,51	0,66	0,54	0,64	1,55	0,74	0,41	0,47
Arilesteraz aktivitesi (U/L)	53,21	54,37	58,59	51,71	44,73	45,13	48,73	47,73
Laktonaz aktivitesi (U/L)	7,15	7,67	8,46	5,69	6,50	7,45	7,17	6,08
8-Hidroksi Deoksiguanozin (ng/mL)	4,83	5,23	7,58	6,11	5,50	6,87	5,78	7,48

İ/R grubu biyokimyasal bulguları Tablo 12’de gösterilmiştir.

Tablo 12. İ/R grubu serum TOS, TAS, OSİ, Arilseteraz aktivitesi, Laktonaz aktivitesi ve 8-Hidroksi Deoksiguanozin değerleri

	Grup 2 İ/R							
	1	2	3	4	5	6	7	8
TOS (μmol H ₂ O ₂ Eq/L)	16,45	20,20	16,45	16,26	15,27	21,77	14,58	25,12
TAS (mmol Trolox Eq/L)	1,29	0,97	0,93	1,30	0,72	1,09	0,94	0,88
OSİ	1,28	2,09	1,77	1,25	2,12	1,99	1,55	2,87
Arilesteraz aktivitesi (U/L)	52,62	38,93	52,60	49,88	45,13	40,94	47,74	45,33
Laktonaz aktivitesi (U/L)	6,57	4,80	6,52	5,69	4,17	7,78	8,42	5,84
8-Hidroksi Deoksiguanozin (ng/mL)	6,80	5,90	8,06	7,11	7,65	7,33	8,66	4,91

İ/R+EA grubu biyokimyasal bulguları Tablo 13’te gösterilmiştir.

Tablo 13. İ/R+EA Grubu serum TOS, TAS, OSİ, Arilseteraz aktivitesi, Laktonaz aktivitesi ve 8-Hidroksi Deoksiguanozin değerleri

	Grup 3 İ/R+EA							
	1	2	3	4	5	6	7	8
TOS (μmol H ₂ O ₂ Eq/L)	14,58	ex	12,32	19,51	17,24	13,60	14,19	12,02
TAS (mmol Trolox Eq/L)	1,17	ex	1,36	1,35	1,27	1,32	1,29	1,50
OSİ	1,25	ex	0,90	1,44	1,36	1,03	1,10	0,80
Arilesteraz aktivitesi (U/L)	50,58	ex	47,36	51,45	41,37	45,23	39,38	44,08
Laktonaz aktivitesi (U/L)	8,38	ex	7,22	7,73	5,25	7,78	6,36	7,30
8-Hidroksi Deoksiguanozin (ng/mL)	6,18	ex	6,92	5,08	5,90	6,45	7,72	6,70

İ/R+VA grubu biyokimyasal bulguları Tablo 14’te gösterilmiştir.

Tablo 14. İ/R+VA Grubu serum TOS, TAS, OSİ, Arilseteraz aktivitesi, Laktonaz aktivitesi ve 8-Hidroksi Deoksiguanozin değerleri

	Grup 4 İ/R+VA							
	1	2	3	4	5	6	7	8
TOS (μmol H ₂ O ₂ Eq/L)	21,18	12,41	13,30	10,84	20,79	8,57	18,03	10,05
TAS (mmol Trolox Eq/L)	1,56	1,39	1,34	0,98	>0,99	1,44	1,06	1,46
OSİ	1,36	0,89	>0,99	1,10	2,08	0,59	1,69	0,69
Arilesteraz aktivitesi (U/L)	47,95	39,34	51,78	53,50	33,04	35,81	42,94	42,78
Laktonaz aktivitesi (U/L)	6,55	9,76	7,70	8,00	8,45	9,03	8,04	7,70
8-Hidroksi Deoksiguanozin (ng/mL)	5,59	5,34	6,26	5,01	4,76	7,21	9,00	7,43

İ/R+RA grubu biyokimyasal bulguları Tablo 15’te gösterilmiştir.

Tablo 15. İ/R+RA Grubu serum TOS, TAS, OSİ, Arilseteraz aktivitesi, Laktonaz aktivitesi ve 8-Hidroksi Deoksiguanozin değerleri

	Grup 5 İ/R+RA							
	1	2	3	4	5	6	7	8
TOS (μmol H ₂ O ₂ Eq/L)	20,49	27,49	18,03	18,42	23,45	24,24	19,61	27,49
TAS (mmol Trolox Eq/L)	0,98	1,46	1,25	1,37	1,14	1,19	1,43	1,35
OSİ	2,08	1,88	1,44	1,35	2,06	2,04	1,37	2,04
Arilesteraz aktivitesi (U/L)	46,48	48,09	49,41	55,25	41,08	44,08	41,36	44,87
Laktonaz aktivitesi (U/L)	9,76	5,82	6,36	7,43	6,80	4,91	5,35	6,92
8-Hidroksi Deoksiguanozin (ng/mL)	6,67	8,46	8,81	7,70	5,78	6,88	6,24	5,62

İ/R+EA+VA+RA grubu biyokimyasal bulguları Tablo 16’da gösterilmiştir.

Tablo 16. İ/R+EA+VA+RA Grubu serum TOS, TAS, OSİ, Arilseteraz aktivitesi, Laktonaz aktivitesi ve 8-Hidroksi Deoksiguanozin değerleri

	Grup 6 İ/R+EA+VA+RA							
	1	2	3	4	5	6	7	8
TOS (μmol H ₂ O ₂ Eq/L)	12,02	17,93	22,36	26,70	13,20	24,93	16,85	21,97
TAS (mmol Trolox Eq/L)	1,61	1,73	1,37	1,37	1,10	1,72	1,32	2,06
OSİ	0,75	1,04	1,64	1,95	1,20	1,45	1,27	1,06
Arilesteraz aktivitesi (U/L)	41,81	42,23	41,08	45,42	47,11	49,52	49,01	38,14
Laktonaz aktivitesi (U/L)	6,85	8,19	8,73	5,60	9,21	7,49	7,68	5,81
8-Hidroksi Deoksiguanozin (ng/mL)	5,75	9,40	4,83	5,43	8,97	5,20	5,45	6,74

BİYOKİMYASAL İSTATİSTİKSEL BULGULAR

Tablo 17. Biyokimyasal parametrelerin median(min:max) değerleri ve ortalama değerleri(mean) ± standart sapmalar

Gruplar	TOS (μmol H ₂ O ₂ Eq/L)	TAS (mmol Trolox Eq/L)	OSİ	Arilesteraz aktivitesi (U/L)	Laktonaz aktivitesi (U/L)	8-Hidroksi Deoksiguanozin (ng/mL)
Kontrol	9,01(7,29:17,73) (10,06±3,35)	1,58(1,15:1,78) 1,54±0,18	0,59(0,41:1,55) 0,69±0,36	50,22(44,73:58,59) 50,52±4,81	7,16(5,69:8,46) 7,02±0,89	5,94(4,83:7,58) 6,17±1,03
İ/R	16,45(14,58:25,12) 18,26±3,70	0,95(0,72:1,30) 1,01±0,20	1,88(1,25:2,87) 1,86±0,53	46,53(38,93:52,62) 46,64±5,05	6,18(4,17:8,42) 6,22±1,42	7,22(4,91:8,66) 7,05±1,19
İ/R+EA	14,19(12,02:19,51) 14,78±2,70	1,32(1,17:1,50) 1,32±0,10	1,10(0,80:1,44) 1,12±0,23	45,23(39,38:51,45) 45,63±4,49	7,30(5,25:8,38) 7,14±1,04	6,45(5,08:7,72) 6,42±0,83
İ/R+VA	12,85(8,57:21,18) 14,39±4,93	1,36(0,98:1,56) 1,27±0,22	1,05(0,59:2,08) 1,17±0,50	42,86(33,04:53,50) 43,39±7,31	8,02(6,55:9,76) 8,15±0,96	5,92(4,76:9,00) 6,32±1,45
İ/R+RA	21,97(18,03:27,49) 22,40±3,82	1,30(0,98:1,46) 1,27±0,16	1,96(1,35:2,08) 1,78±0,33	45,67(41,08:55,25) 46,32±4,65	6,58(4,91:9,76) 6,66±1,50	6,77(5,62:8,81) 7,02±1,19
İ/R+EA+VA+RA	19,95(12,02:26,70) 19,49±5,35	1,49(1,10:2,06) 1,53±0,30	1,23(0,75:1,95) 1,29±0,37	43,82(38,14:49,52) 44,29±4,09	7,58(5,60:9,21) 7,44±1,29	5,60(4,83:9,40) 6,47±1,76
p değeri	<0,01*	0,001*	<0,01*	0,259	0,064	0,527

*: İstatistiksel olarak anlamlı(p<0,05)

Kruskal Wallis testi ile 6 grup biyokimyasal olarak birbiri ile karşılaştırıldı. Gruplar arasında arilesteraz aktivitesi(U/L), laktonaz aktivitesi(U/L) ve 8-hidroksi deoksiguanozin(ng/mL) açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ancak gruplar arasında TOS (μmol H₂O₂ Eq/L),

TAS (mmol Trolox Eq/L) ve OSİ (TOS/TAS) açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı(p<0,05).

İ/R+EA grubunda bir sıçan çalışma sırasında ex olduğu için istatistiksel değerlendirmeye alınmadı

İkili gruplar arası istatistiksel değerlendirmede Dunn-Bonferroni testi kullanıldı ve $p<0,05$ anlamlı istatistiksel sınır olarak kabul edildi. Sonuçlar tablo 18’de gösterilmiştir. Arilesteraz aktivitesi(U/L), laktonaz aktivitesi(U/L) ve 8-hidroksi deoksiguanozin(ng/mL), Kruskal Wallis testinde istatistiksel olarak anlamlı tespit edilmediği için ikili değerlendirmeye alınmadı (Tablo 17).

Tablo 18. Biyokimyasal verilerin ikili gruplar arası istatistiksel analiz p değerleri

	TOS (μmol H2O2 Eq/L)	TAS (mmol Trolox Eq/L)	OSİ
Kontrol – İ/R	0,04*	<0,01*	<0,01*
Kontrol – İ/R+EA	>0,99	0,7	>0,99
Kontrol – İ/R+VA	>0,99	0,56	>0,99
Kontrol – İ/R+RA	<0,01*	0,3	<0,01*
Kontrol– İ/R+EA+VA+RA	0,01*	>0,99	0,34
İ/R – İ/R+EA	>0,99	0,57	0,24
İ/R – İ/R+VA	>0,99	0,5	0,28
İ/R – İ/R+RA	>0,99	0,9	>0,99
İ/R– İ/R+EA+VA+RA	>0,99	<0,01*	0,94
İ/R+EA – İ/R+VA	>0,99	>0,99	>0,99
İ/R+EA – İ/R+RA	0,13	>0,99	0,3
İ/R+EA– İ/R+EA+VA+RA	>0,99	>0,99	>0,99
İ/R+VA – İ/R+RA	0,08	>0,99	0,36
İ/R+VA– İ/R+EA+VA+RA	>0,99	>0,99	>0,99
İ/R+RA–İ/R+EA+VA+RA	>0,99	>0,99	>0,99

*: İstatistiksel olarak anlamlı($p<0,05$)

- Kontrol grubu ile İ/R grubu karşılaştırıldığında serum TOS (μmol H2O2 Eq/L) değerleri İ/R grubunda kontrol grubuna göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu($p<0,05$).
- Kontrol grubu ile İ/R grubu karşılaştırıldığında serum TAS (mmol Trolox Eq/L) değerleri İ/R grubunda kontrol grubuna göre düşük bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu($p<0,05$).
- Kontrol grubu ile İ/R grubu karşılaştırıldığında serum OSİ değerleri İ/R grubunda

kontrol grubuna göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu($p<0,05$).

- Kontrol grubu ile İ/R+RA grubu karşılaştırıldığında serum TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L}$) değerleri İ/R+RA grubunda yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu($p<0,05$).
- Kontrol grubu ile İ/R+RA grubu karşılaştırıldığında serum OSI değerleri İ/R+RA grubunda yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu($p<0,05$).
- Kontrol grubu ile İ/R+EA+VA+RA grubu karşılaştırıldığında serum TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L}$) değerleri İ/R+EA+VA+RA grubunda yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu($p<0,05$).
- İ/R grubu ile İ/R+EA+VA+RA grubu karşılaştırıldığında serum TAS (mmol Trolox Eq/L) değerleri İ/R+EA+VA+RA grubunda yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu($p<0,05$) (Tablo 18).

TARTIŞMA

Ekstremitte iskemisi periferik vasküler cerrahi, aort cerrahisi, ekstremitelerin reimplantasyonu, ezici yaralanmalar, periferik vasküler yaralanmalar veya akut arteriyel tıkanıklıklar sonrasında karşılaşılan bir durumdur (109). Akut ekstremitte iskemisi ciddi morbidite ve mortaliteye neden olabilen klinik bir problemdir. Ekstremitenin reperfüzyonu tekrar sağlansa bile ekstremitte kaybı, akut akciğer, böbrek, kalp, bağırsak, beyin ve diğer organ yetmezliklerine yol açabilir, fonksiyon kaybı yaratabilir. Çoklu organ hasarları hastanede kalış süresini ve maliyeti arttırmaktadır (110). Cerrahi müdahalenin gecikmesi bu riskleri daha da arttırabilir (109).

Alt ekstremitte İ/R hasarında iskelet kası büyük kütlesi ve iskemik hasara hassas dokulardan biri olması sebebiyle önemli rol oynar. Reperfüzyon hasarında prognoz kas hasarı miktarına bağlıdır (61). Akut ekstremitte iskemisi sonrası reperfüzyonu şiddetli yerel doku hasarı ve sistemik komplikasyonları oluşturmaktadır (111). Sebep iskemiden çok reperfüzyon sahasında oluşan toksik metabolitlerdir. İ/R hasarındaki temel mekanizma İ/R olduğunda oksijenin dokulara yeniden dağılımı ile SOR oluşmasıdır. Oluşan SOR ile çeşitli mekanizmalarla majör organlarda mikrovasküler endotelial hasara bağlı geçirgenlik artışı, trombosit agregasyonu ve nekroze alanlar oluşmaktadır (111).

Hasarlanmış dokuda biriken hücre tipi inflamasyonun süresi ve uyarının tipine göre değişir. İ/R hasarında dokuda biriken inflamatuvar hücre tipi ilk 6-24 saat nötrofiller, 24-48 saat sonra ise monositler şeklindedir. Hasarlanmış dokuda akut dönemde nötrofil, kronik dönemde monosit hakimiyeti vardır (13).

Reperfüzyona bağlı hasarın karakteristik özellikleri;

- Mikrovasküler geçirgenlik kaybı,

- Hücresel şişme,
- Hücre iskeletindeki değişikliklerdir.

Sonuç olarak doku ödemi ve kapiller kan akımında azalma meydana gelir (112). Gündüz ve ark. (113) izole endotel hücre kültüründe yaptığı İR çalışmasında 30 dakika iskemik periyotta endotel sitozolik kalsiyum konsantrasyonunun iki aşamalı arttığını ve takiben 40 dakika reperfüzyon sürecinde iskemik periyoda göre artışın daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Kalsiyum artışı endotel hücre kontraksiyonuna neden olarak endotel hücreleri arasındaki mesafeyi arttırır ve ödeme sebep olur.

İnfrarenal aorta klemplendirilmesi ile oluşan alt ekstremité İR hasarı sonrası oluşan uzak organ hasarında böbrekler hedef konumdadır. İR hasarı, abdominal aort cerrahisi postoperatif dönemde morbidite ve mortaliteyi etkileyen en önemli komplikasyon olan akut böbrek yetmezliğinin oluşumundaki belirgin patofizyolojik mekanizmadır (63). İR sonrası böbrek hasarında çok sayıda mediatör rol almaktadır. İR oluşumu ile birlikte oksidatif fosforilasyonun değişmesi, ATP'nin azalması, hücre içi proteaz ve fosfatazların aktive olması sonucu aşırı miktarda SOR üretimi oksidatif strese neden olur (114). Hasar oluşmasında en önemli neden cerrahide abdominal aortaya konan kros klempe bağlı iskemi ve reperfüzyon oluşmasıdır. Kaçmaz ve ark. (115) infrarenal aort klemplenmesi sonucu oluşturdukları İR hasarında, İR grubunda kontrol grubuna göre böbrek, akciğer ve bağırsakta malonil dealdehit, myeloperoksidaz (nötrofil infiltrasyonunun indirekt göstergesi) seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulurken, glutatyon seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulmuşlardır. Akciğerin İR sonrası doku ağırlığındaki artışı ve İR sonrası alanin aminotransferaz/aspartat aminotransferaz seviyelerindeki artışı istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu çalışma aort klemplenmesi sonucu oluşturulan İR hasarının uzak organ etkilerini göstermektedir. Biz de çalışmamızda İR grubunda kontrol grubuna göre hem histopatolojik hem biyokimyasal olarak anlamlı kötüleşme saptadık. İnfrarenal aortik klemplendirilmeden sonra renal kan akımında %30'luk bir azalma ile bağlantılıdır. Renal hemodinamik bozukluk klemplendirildikten sonra devam eder (116). Aort cerrahisi geçirmiş olan hastalarda postoperatif 6. ayda glomerüler filtrasyon oranı ve renal plazma akımı anlamlı derecede düşük saptanmıştır (117). İR hasarı böbreğin hipoksiye duyarlı kısmı olan renal medulladan başlar. Renal hasar öncelikle tubuluslarda oluşur. Bunun sebebi iskemiye bağlı gelişen tübüler nekrozdur. Reperfüzyonla birlikte 1-2 hafta içinde tübül fonksiyonları normale döner (118).

İskemik kalmış böbrekte tedavi kan akımını yeniden sağlamak yani reperfüzyondur fakat bu durumda da reperfüzyon hasarı kaçınılmazdır. Reperfüzyon hasarının önlemesi veya azaltılmasında çözüm aramak gerekliliği vardır. En etkin ve en uygun tedavi halen tartışma

konusudur. Bahsedilen birçok tedavi modeli deneysel aşamada olup insanlardaki klinik kullanımına ait bilgiler henüz yetersizdir.

Deneysel alt ekstremite İ/R hasarının böbreğe verdiği zarar sıçanlarda iyi belirlenmiş ve çalışmaların çoğunda tercih edilmiştir (119,120). Bu bilgiler doğrultusunda biz de çalışmamızda Sprague-Dawley cinsi dişi sıçanlar kullandık.

Böbreklerde deneysel İ/R hasarının ortaya çıkması için belirli bir iskemi süresi gereklidir. Sıçan böbreğinde 60 dakikalık iskemi süresinden sonra reperfüzyon hasarının ortaya çıktığı gösterilmiştir (64). Bizim çalışmamızda da 60 dakikalık iskemi ardından 120 dakikalık reperfüzyon uygulanmıştır.

Serbest radikallerin reperfüzyon sonrası 15-20 saniye içinde hızla oluştukları gösterildiğinden, reperfüzyon hasarını azaltmak amacıyla ajan kullanılacak ise bunun reperfüzyondan 15 dakika önce verildiğinde efektif olduğu, reperfüzyondan sonra verildiği takdirde önleyici özelliğinin etkili olmadığı bilinmektedir (2,121). Biz de aortadaki klemp kaldırılmadan 15 dakika önce EA, VA, RA uygulaması yaparak çalışmamızın efektif olmasını sağlamaya çalıştık.

Bazı deneysel çalışmalarda antioksidanların, antitromboksanların, antilökotrienlerin, antiplatelet aktive edici faktörlerin reperfüzyonun sistemik etkilerinden korunmak amacıyla kullanılabileceği gösterilmiştir (61). Günümüzde İ/R sonrasında ortaya çıkan SOR'ların olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak için süperoksit dismutaz, allopürinol, katalaz, vit C, alfa tokoferol, L-carnitine, mannitol gibi çeşitli maddeler tedavide denenmiş, etkili oldukları gösterilmiştir. Bu maddelerin ya nötrofil aktivasyonunu önleyerek ya mikrovasküler geçirgenlik artışını önleyerek ya da antioksidan sistemi aktive ederek İ/R sonrası ortaya çıkan uzak doku hasarına karşı koruyucu etkiye sahip oldukları gösterilmiştir (109). Çok sayıda deneysel çalışmada E vitamini, n-asetil sistein, demir şelatörleri, kalsiyum kanal blokerleri, anjiyotensin konverting enzim inhibitörleri gibi antioksidanların da tedavide etkinlikleri gösterilmiştir (122). Berkan ve ark. (123) abdominal aortaya klemp koyarak yaptıkları deneysel çalışmada, ilaçlı gruba iskemiden 5 gün önce intramusküler askorbik asit vermeye başlamışlar ve akciğerler üzerine koruyucu etkinliğini araştırmışlardır. Elde edilen sonuçları histopatolojik olarak değerlendirmişler ve askorbik asitin İ/R hasarının akciğerler üzerine etkisini önlemede yardımcı olduğunu saptamışlardır.

Bu çalışmanın amacı, sıçan infrarenal abdominal aortasına klemp konması sonrası alt ekstremite iskemisi yaratıp reperfüzyon sonrasında (klemp kaldırılması) böbreklerde oluşan iskemi/reperfüzyon hasarına ellajik asit, vanilik asit ve rosmarinik asidin etkilerini araştırmaktır. Alt ekstremitenin iskemi/reperfüzyonun uzak organ hasarı üzerine olumsuz

etkilerinin melatonin, aprotinin, askorbik asit, n asetilsistein gibi bazı maddeler ile azaltıldığı deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (4,109,120,123). Ayrıca çalışmamızda kullandığımız EA, VA ve RA gibi terapötik ajanların antioksidan etkileri ile ilgili deneysel hayvan çalışmaları literatürde mevcuttur (85,92,97,101). Fakat ellajik asit, vanilik asit ve rosmarinik asitin alt ekstremitede İ/R'nin neden olduğu böbrek hasarına etkileri ile ilgili yapılan literatür taramasında görüldüğü kadarıyla ilk çalışmadır.

Yüce ve ark. (124) tarafından sıçanlarda yapılan bir çalışmada siklosporin A uygulamasının belirgin oksidatif stres ve böbrek, karaciğer ve kalp hasarı ile sonuçlandığı sonucuna varmışlar ve ellajik asit uygulaması ile lipid peroksidasyonu korunması ve hücrenin antioksidan durumunun artırılması ile doku fonksiyon bozukluğunu iyileştirdiğini göstermişlerdir. Hwang ve ark. (125) yaptığı çalışmada EA'nın antioksidan ve sitoprotektif özelliklerinin, çeşitli oksidatif stres türlerinin neden olduğu karaciğer hasarını önlediğini göstermişlerdir. Kapan ve ark. (126) da yaptıkları çalışmada iskemi reperfüzyon hasarına karşı EA'nın karaciğer ve uzak organlara olan olası koruyucu etkisini araştırmışlar; EA uygulaması ile iyileşmiş histopatolojik değişiklikler görmelerine rağmen istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edememişlerdir. Biz de çalışmamızda EA uygulanan grupta İ/R grubuna göre damar konjesyonu ve damar duvar kalınlaşmasında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da iyileşmiş histopatolojik değişiklikler elde ettik.

Yao ve ark.(127) yaptıkları çalışmada VA'nın oksidatif stresi engelleyerek akut miyokardiyal hipoksi/reoksijenizasyon hasarını hafifletebileceğini göstermişlerdir. Stanely Mainzen Prince ve ark. (96) yaptıkları çalışmada izoproterenol ile indüklenen kardiyotoksik sıçanlarda VA tedavisi ile lipid peroksidasyonu antioksidanlarda düşüş olduğunu ayrıca 10mg/kg dozunda vanilik asit uygulamasının 5mg/kg'a göre daha etkili olduğunu gözlemlemişlerdir.

Luo ve ark. (128) 2022 yılında yayınladıkları çalışmalarında pulmoner İ/R hasarından 7 gün önce gavaj yoluyla günlük RA (50, 75 veya 100 mg/kg) vermişlerdir. Pulmoner İ/R hasarı oluşturdıklarında hipoksemi, pulmoner ödem ve serum inflamatuvar sitokinlerinde artış tespit etmişler. RA ön tedavisi (75 ve 100mg/kg) hasar parametrelerini etkili şekilde geri döndürürken 50mg/kg RA ön tedavisinde bu etkinin daha az olduğunu göstermişlerdir.

Çalışmamızda histopatolojik böbrek bulguları incelendiğinde; glomerüler skleroz ve interstisyel fibrozis hiçbir grupta saptanmadı. İ/R grubunda %75 multifokal-orta (+2), %25 belirgin-yaygın (+3) tübül epitel dejenerasyonu; %25 fokal-hafif (+1), %62,5 multifokal-orta (+2), %12,5 belirgin-yaygın (+3) tübül epitelinde nekroz; %37,5 fokal-hafif (+1), %50 multifokal-orta (+2), %12,5 belirgin-yaygın (+3) damar duvar kalınlaşması tespit edildi.

Histopatolojik olarak kontrol grubu ve İ/R grubu arasında anlamlı farklılık mevcuttu. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler Gülmen ve ark. (129) ile Kiriş ve ark.'ın (130) çalışmalarıyla benzerlik göstermiş olup İ/R grubu verileri ile kontrol grubu verileri karşılaştırıldığında histopatolojik olarak istatistiksel anlamlı farklılıkların olduğunu tespit ettik.

Çalışmamızın histopatolojik sonuçlarına bakıldığında kontrol grubu ile İ/R grubu arasında istatistiksel ve klinik olarak anlamlı farklılık tespit ettik. İ/R+EA, İ/R+VA, İ/R+EA gruplarında ise İ/R grubuna göre istatistiksel olarak olmasa da histopatolojik skorumaya sistemine göre iyileşme ve kontrol grubuna göre ise klinik olarak anlamlı görülen yakın skorlar elde ettik. İ/R+EA grubunda kontrol grubuna göre bowman kapsül dilatasyonu (K:0,87 İ/R+EA:1,42 p:>0,99) ve damar duvar kalınlaşması (K:0,37 İ/R+EA: 0,85 p:>0,99); İ/R+VA grubunda kontrol grubuna göre bowman kapsül dilatasyonu (K:0,87 İ/R+VA: 0,37 p:>0,99); İ/R+RA grubunda kontrol grubuna göre damar konjesyonu (K:1,00 İ/R+RA: 1,00 p:>0,99) benzerlik göstermiştir. İ/R+ilaç gruplarında İ/R grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilememesinin nedeni ilaçların verilmiş yolunun intraperitoneal olması ve dozunun düşük gelmesi olabilir. Ayrıca ilaçların uygulama süresi de ilaç etkinliğini etkilemiş olabilir.

Tokgoz ve ark. (131) yaptığı çalışmada biyokimyasal oksidatif parametre olarak TAS, TOS, OSİ, malondialdehit (MDA), SOD, NO ölçümü yapmış fakat gruplar arasında TAS, TOS ve OSİ için anlamlı istatistiksel sonuç elde edememiştir. Yurtcu ve ark.(132) ise çalışmasında TAS, TOS gibi oksidatif hasar gösteren parametreler kullanılmış olup istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmese de tedavi öncesi İ/R grubunda oksidan düzeyleri yüksek, antioksidan düzeyleri düşük olarak bulmuştur. Bizim çalışmamızda biyokimyasal bulgular incelendiğinde;

Gruplar arasında TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L}$), TAS (mmol Trolox Eq/L) ve OSİ (TOS/TAS) açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,05$).

İ/R grubunda kontrol grubuna göre TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L}$) (İ/R:18,26 K:10,06 p:0,04) değeri yüksek, TAS (mmol Trolox Eq/L) değeri İ/R grubunda kontrol grubuna göre (İ/R:1,01 K:1,54 p:<0,01) düşük ve OSİ (TOS/TAS) değeri İ/R grubunda kontrol grubuna göre (İ/R:1,86 K:0,69 p:<0,01) yüksek bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı idi. İ/R grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L}$), TAS (mmol Trolox Eq/L) ve OSİ (TOS/TAS) değerlerinde anlamlı istatistiksel farklılıklar tespit ettik.

Uzar ve ark. (133) diyabetik sıçanlarda sinir uçlarında oksidatif stresi ölçerek yaptıkları çalışmada ellajik asit ile tedavi edilen sıçanlarda katalaz, PON-1 ve TAS değerlerinin normal düzeylere döndüğünü, MDA, TOS, NO ve OSİ değerlerinde tedavi edilmeyen sıçanlara göre

düşme olduğunu saptamışlardır. Biz de çalışmamızda EA uyguladığımız grupta İ/R grubuna göre TOS ve OSİ değerlerini düşük, TAS değerini yüksek saptadık.

Radmanesh ve ark. (134) sıçan kardiyak dokusunda iskemi/reperfüzyon oluşturarak yaptıkları çalışmada VA uygulanan grupta enfarkt boyutunda, MDA'da ve miyokard disfonksiyonunda azalma göstermişlerdir. Biz de yaptığımız çalışmada VA uyguladığımız grupta benzer şekilde oksidatif durumu gösteren TOS ve OSİ değerlerinde azalma, antioksidan durumu gösteren TAS değerinde yükselme saptadık.

Murillo-González ve ark (135) yaptıkları çalışmada kardiyovasküler hastalığı olan hastalarda PON1 laktonaz aktivitesini kontrol grubuna göre daha düşük bulmuşlardır. Çalışmamızda da İ/R grubunda kontrol grubuna göre laktonaz aktivitesi (U/L) (kontrol: 7,02; İ/R: 6,22 mean değerler) azalmış olup antioksidan aktivitede düşme görülmüştür. İ/R+EA grubunda (İR+EA: 7,14 mean değer) ve İ/R+VA grubunda (İ/R+VA: 8,15 mean değer) laktonaz aktivitesi (U/L) İ/R ve kontrol grubundan yüksek saptanmış olup antioksidan aktivitede artma görülmüştür. Laktonaz aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı değere yakın p değeri saptanmıştır (p: 0,064).

Çalışmamızın biyokimyasal sonuçlarına bakıldığında kontrol grubu ile İ/R grubu arasında istatistiksel ve klinik olarak anlamlı farklılık tespit ettik. İ/R+EA, İ/R+VA, İ/R+EA gruplarında ise İ/R grubuna göre istatistiksel olarak olmasa da klinik olarak anlamlı şekilde oksidatif değerlerde azalma / antioksidan değerlerde artma elde ettik. İ/R+ilaç gruplarında İ/R grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilememesinin nedeni ilaçların verilmiş yolunun intraperitoneal olması ve dozunun düşük gelmesi olabilir. Ayrıca ilaçların uygulama süresi de ilaç etkinliğini etkilemiş olabilir.

İskemi reperfüzyon hasarının mekanizması karmaşık ve multifaktöriyeldir. Günümüzde iskemi reperfüzyon hasarını tedavi edici veya profilaktik olarak kullanılacak ilaç ve metodlar üzerinde hâlâ çalışmalar sürmektedir. Çalışmamızda alt ekstremité İ/R hasarının böbrek dokusunda histopatolojik ve biyokimyasal hasara sebep olduğu görülmüştür. EA, VA ve RA'nın böbrekteki bu hasarlanmayı klinik olarak azalttığını düşünmekteyiz.

SONUÇLAR

Çalışmamızda sıçan infrarenal abdominal aortasına klemp konması sonrası alt ekstremitte iskemisi yaratıp reperfüzyon sonrasında (klemp kaldırılması) böbreklerde oluşan iskemi/reperfüzyon hasarına ellajik asit, vanilik asit ve rosmarinik asidin etkilerini histopatolojik ve biyokimyasal olarak araştırdık.

Histopatolojik değerlendirmeye bakıldığında;

1-Kontrol grubu ile İ/R grubu arasında istatistiksel ve klinik olarak anlamlı ve diğer çalışmalarla benzer sonuçlar elde ettik. İ/R grubunda kontrol grubuna göre parametrelerde skarlama sistemine göre artma/kötüleşme tespit ettik.

2-İ/R grubu ile İ/R+EA, İ/R+VA, İ/R+RA gruplarına bakıldığında ise istatistiksel olarak olmasa da bazı parametrelerde diğer çalışmalarla benzer şekilde skarlama sistemine göre azalma/iyileşme tespit ettik.

Biyokimyasal değerlendirmeye bakıldığında;

1-Kontrol grubu ile İ/R grubu arasında TOS, TAS, OSİ değerlerinde istatistiksel ve klinik olarak anlamlı diğer çalışmalarla benzer sonuçlar elde ettik. Kontrol grubuna göre İ/R grubunda TOS değerleri artmış, TAS değerleri azalmış ve OSİ ise artmış olarak bulundu.

2-İ/R grubu ile İ/R+EA, İ/R+VA, İ/R+RA gruplarına bakıldığında ise istatistiksel olarak olmasa da diğer çalışmalarla benzer şekilde oksidan parametrelerde İ/R+ilaç gruplarında olumlu değişiklikler tespit ettik.

Özellikle alt ekstremitte iskemi reperfüzyon hasarının oluşumunun azalması, lokal ve uzak etkilerinin minime indirilmesi için en önemli olan erken tanı ve mümkün olduğunca erken revaskülarizasyon sağlanmasıdır.

Çalışmamızda alt ekstremitelerde oluşturulan iskemi ve sonrasında oluşturulan reperfüzyonun böbrekte hasarlanma yaptığını ışık mikroskopi ve biyokimyasal verilerle tespit ettik. EA, VA, RA'nın istatistiksel olarak görülmesi de İ/R hasarında böbrek üzerinde histopatolojik ve biyokimyasal olarak faydalı sonuçları olabileceğini düşünüyoruz.

Bu bulguların tam olarak ortaya konması ve pratikte kullanılabilmesi için daha geniş deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.



ÖZET

Bu deneysel çalışmada, sıçan infrarenal abdominal aortunda oklüzyon-reperfüzyon sonrası böbreklerde oluşan iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine ellajik asit, vanilik asit ve rosmarinik asitin etkileri araştırıldı. 48 adet Sprague-Dawley cinsi dişi sıçan randomize olarak, eşit sayıda (n=8) altı gruba ayrıldı. Kontrol grubuna median laparotomi ve diseksiyon uygulandı. Diğer gruplara uygulanan toplam deney süresi sonunda kan örnekleri alındı ve bilateral nefrektomi yapıldı. İskemi/reperfüzyon grubuna median laparotomi ardından infrarenal aortaya mikrovasküler klempt konularak 60 dakika iskemi oluşturuldu ardından klempt kaldırılarak 120 dakika reperfüzyon sağlandı. İskemi/reperfüzyon grubuna ek olarak; iskemi/reperfüzyon+ ellajik asit grubuna 100mg/kg ellajik asit, iskemi/reperfüzyon+vanilik asit grubuna 12 mg/kg vanilik asit, iskemi/reperfüzyon+ rosmarinik asit grubuna 50 mg/kg rosmarinik asit ve iskemi/reperfüzyon+ ellajik asit + vanilik asit+ rosmarinik asit grubuna 100mg/kg ellajik asit + 12 mg/kg vanilik asit + 50mg/kg rosmarinik asit klempt kaldırılmadan 15 dakika önce uygulandı. Tüm gruplara reperfüzyon süresinin sonunda bilateral nefrektomi yapıldı ve kan örnekleri alındı. Böbrek dokuları formaldehitte fikse edildi, kesitler hazırlanarak hemotoksilen-eozin ile boyandı. Preparatlar ışık mikroskopunda değerlendirildi. Alınan kan örnekleri santrifüj edilip serumlarına ayrıldı ve biyokimya laboratuvarında çalışıldı. Histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler sonucunda iskemi/reperfüzyon grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı kötüleşme tespit edildi. Histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler sonucunda iskemi/reperfüzyon+ilaç uygulanan gruplarda iskemi/reperfüzyon grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan klinik olarak anlamlı iyileşmeler tespit edildi. Sonuç olarak ellajik asit, vanilik asit ve rosmarinik asit uygulanmasının

antioksidan etkileri ile akut alt ekstremitte iskemilerinde reperfüzyon sonrası böbrekte gelişecek hasara olumlu etkileri olabileceği görüldü. Bu bulguların tam olarak ortaya konması ve pratikte kullanılabilmesi için daha geniş deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: iskemi, reperfüzyon, böbrek hasarı, ellajik asit, vanilik asit, rosmarinik asit



INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF ELLAGIC ACID, VANILLIC ACID AND ROSMARINIC ACID ON REPERFUSION-RELATED KIDNEY DAMAGE DEVELOPED IN THE EXPERIMENTAL LOWER EXTREMITY ISCHEMIA/REPERFUSION MODEL

SUMMARY

In this experimental study, the effects of ellagic acid, vanillic acid and rosmarinic acid on the ischemia-reperfusion injury in the kidneys after occlusion-reperfusion in the rat infrarenal abdominal aorta were investigated. 48 female Sprague-Dawley rats were randomly divided into six equal groups (n=8). Median laparotomy and dissection were performed in the control group. At the end of the total experimental period applied to the other groups, blood samples were taken and bilateral nephrectomy was performed. In the ischemia/reperfusion group, after median laparotomy, a microvascular clamp was placed on the infrarenal aorta and ischemia was created for 60 minutes, then the clamp was removed and reperfusion was achieved for 120 minutes. In addition to the ischemia/reperfusion group; 100mg/kg ellagic acid to the ischemia/reperfusion+ ellagic acid group, 12 mg/kg vanillic acid to the ischemia/reperfusion+vanillic acid group, 50 mg/kg rosmarinic acid to the ischemia/reperfusion+ rosmarinic acid group and ischemia/reperfusion+ ellagic acid + vanillic acid+ rosmarinic acid group 100mg/kg ellagic acid + 12 mg/kg vanillic acid + 50mg/kg rosmarinic acid was applied 15 minutes before the clamp was removed. At the end of the reperfusion period, bilateral nephrectomy was performed in all groups and blood samples were taken. Kidney tissues were fixed with formaldehyde, sections were prepared and stained with

hematoxylin-eosin. The preparations were evaluated under the light microscope. The blood samples taken were centrifuged and separated into their serums and studied in the biochemistry laboratory. As a result of histopathological and biochemical evaluations, statistically significant worsening was detected in the ischemia/reperfusion group compared to the control group. As a result of histopathological and biochemical evaluations, clinically significant improvements were detected in the ischemia/reperfusion+medication administered groups, which was not statistically significant compared to the ischemia/reperfusion group. As a result, it was observed that the antioxidant effects of ellagic acid, vanillic acid and rosmarinic acid application may have positive effects on the damage to develop in the kidney after reperfusion in acute lower extremity ischemia. Larger experimental and clinical studies are needed to fully reveal these findings and to use them in practice.

Keywords: ischemia, reperfusion, kidney injury, ellagic acid, vanillic acid, rosmarinic acid

KAYNAKLAR

1. Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado JA, Piña E, Geller DA. Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 2008;147(1):153-9.
2. Ege T. Kalp ve damar hastalıklarında iskemi-reperfüzyon hasarı. Duran E, editor: İstanbul: Çapa Tıp Kitabevi; 2004. p. 197-215
3. Eliason JL, Wakefield TW. Metabolic consequences of acute limb ischemia and their clinical implications. *Semin Vasc Surg* 2009;22(1):29-33.
4. Koksall C, Bozkurt AK, Sirin G, Konukoglu D, Ustundag N. Aprotinin ameliorates ischemia/reperfusion injury in a rat hind limb model. *Vascul Pharmacol* 2004;41(4-5):125-9.
5. Norwood MG, Bown MJ, Sayers RD. Ischaemia-reperfusion injury and regional inflammatory responses in abdominal aortic aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004;28(3):234-45.
6. Kozlov AV, Bahrami S, Calzia E, Dungel P, Gille L, Kuznetsov AV, et al. Mitochondrial dysfunction and biogenesis: do ICU patients die from mitochondrial failure? *Ann Intensive Care* 2011;1(1):41.
7. Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA, et al. Chemokine expression during hepatic ischemia/reperfusion-induced lung injury in the rat. The role of epithelial neutrophil activating protein. *J Clin Invest* 1995;95(1):134-41.
8. Şirin H SİİO, Cerrahoğlu M, Aksoy Ö, Baltalarlı A, Saçar M ve ark. Altekstremite iskemi reperfüzyonunun yol açtığı pulmoner hasarda aprotinin'in koruyucu etkinliği. *Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg* 2001;9(4):233-7.
9. Ekinci Akdemir FN, Gülçin İ, Karagöz B, Soslu R, Alwasel SH. A comparative study on the antioxidant effects of hesperidin and ellagic acid against skeletal muscle ischemia/reperfusion injury. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2016;31(4):114-8.

10. Khoshnam SE, Sarkaki A, Khorsandi L, Winlow W, Badavi M, Moghaddam HF, et al. Vanillic acid attenuates effects of transient bilateral common carotid occlusion and reperfusion in rats. *Biomed Pharmacother* 2017;96:667-74.
11. Oğuz A, Büyük A, Ekinçi A, Alabalık U, Türkoğlu A, Tuncer MC, et al. Investigation of antioxidant effects of rosmarinic acid on liver, lung and kidney in rats: a biochemical and histopathological study. *Folia Morphol (Warsz)* 2020;79(2):288-95.
12. Hall JE Guyton and Hall Text Book of Medical Physiology: Nobel Tıp Kitabevleri; 2013.
13. Kumar V. AAAJ. Robbins Basic Pathology 2020.
14. Kumar V CR, Robbins SL. Robbins Temel Patoloji 2014.
15. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull* 2004;70:71-86.
16. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery* 2004;24(6):468-75.
17. Tapuria N, Kumar Y, Habib MM, Abu Amara M, Seifalian AM, Davidson BR. Remote ischemic preconditioning: a novel protective method from ischemia reperfusion injury--a review. *J Surg Res* 2008;150(2):304-30.
18. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1994;81(5):637-47.
19. Karakaya A. Akut alt ekstremite iskemi-reperfüzyon sonrasında gelişen böbrek hasarına ilioprost ve levosimendanin etkilerinin araştırılması (tez). Eskişehir: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi; 2009.
20. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surg Clin North Am* 1992;72(1):65-83.
21. Ladipo JK, Seidel SA, Bradshaw LA, Halter S, Wikswo JP, Jr., Richards WO. Histopathologic changes during mesenteric ischaemia and reperfusion. *West Afr J Med* 2003;22(1):59-62.
22. Mangino MJ, Anderson CB, Murphy MK, Brunt E, Turk J. Mucosal arachidonate metabolism and intestinal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1989;257(2 Pt 1):G299-307.
23. Buja LM. Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol* 2005;14(4):170-5.
24. Granger DN. Ischemia-reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. *Microcirculation* 1999;6(3):167-78.
25. Girotti A. Chapter 11 Lipid photooxidative damage in biological membranes: reaction mechanisms, cytotoxic consequences, and defense strategies. *Comprehensive Series in Photosci* 2001;3:231-50.
26. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res* 1998;39(8):1529-42.

27. Wilhelm J. Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. *Acta Univ Carol Med Monogr* 1990;137:1-53.
28. Göksin İ AM, Baltarlı A, Saçar M, Kaya Ş, Özcan V ve ark. The effect of normovolemic hemodilution on lung injury after ischemia-reperfusion of lower extremities. *Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg* 2006;14(1):54-8.
29. Tekeli A AnS, Civelek A, İşbir S, Ak K, Çobanoğlu A ve ark. Alt ekstremitte iskemi reperfüzyonu sonucunda gelişen akciğer hasarının önlenmesinde farklı bir ajan: FK 506 (Takrolimus). *Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg* 2001;9(4):242-6.
30. İşbir S AnS, Ak K, Zeybek Ü, Aydın M, Civelek A ve ark. Akut alt ekstremitte iskemi/reperfüzyon hasarının akciğer serbest oksijen radikalleri üzerine olan etkisi. *Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg* 2000;8(2):629-31.
31. Semenza GL. Cellular and molecular dissection of reperfusion injury: ROS within and without. *Circ Res* 2000;86(2):117-8.
32. Altan N. SDA, Koca C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. *Türk Biyokimya Dergisi*. 2006;31:51-6.
33. Kılıç K. KA. Oksijen Toksisitesinin Aracı Molekülleri Olarak Oksijen Radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*. 2002;33(2):110-8.
34. Dormandy TL. An approach to free radicals. *Lancet*. 1983;2(8357):1010-4.
35. Ertan T. SA, Kılıç M., Aşlar AK., Koç M., Cengiz Ö. Kan Malondialdehid ve Total Antioksidan Seviyesinin(TAS) Önemi. *Cerrahi Tıp Bülteni*. 2001;2;4:154-67.
36. Davies SJ, Reichardt-Pascal SY, Vaughan D, Russell GI. Differential effect of ischaemia-reperfusion injury on anti-oxidant enzyme activity in the rat kidney. *Exp Nephrol* 1995;3(6):348-54.
37. Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D, Tan DX, Burkhardt S. Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 2001;939:200-15.
38. Cantürk NZ. Sİ. Cerrahi Araştırma Kitabı: Nobel Tıp Kitabevleri; 2005.
39. Khalil AA, Aziz FA, Hall JC. Reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg* 2006;117(3):1024-33.
40. Piper HM, Meuter K, Schäfer C. Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 2003;75(2):S644-8.
41. Allen DG, Xiao XH. Role of the cardiac Na⁺/H⁺ exchanger during ischemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* 2003;57(4):934-41.
42. Dündar Y, Aslan R. Hekimlikte Oksidatif Stres ve Antioksidanlar, Oxidative Stress and Antioxidants in Medicine 2000.

43. Serizawa A, Nakamura S, Suzuki, Baba S, Nakano M. Involvement of platelet-activating factor in cytokine production and neutrophil activation after hepatic ischemia-reperfusion. *Hepatology* 1996;23(6):1656-63.
44. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994;76(2):301-14.
45. Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, Korthuis RJ. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem* 1998;179(1-2):169-87.
46. Rubin BB, Smith A, Liauw S, Isenman D, Romaschin AD, Walker PM. Complement activation and white cell sequestration in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol* 1990;259(2):525-31.
47. McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Leukotrienes C4 and D4 stimulate human endothelial cells to synthesize platelet-activating factor and bind neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83(7):2204-8.
48. García-Villalón AL, Amezcua YM, Monge L, Fernández N, Salcedo A, Diéguez G. Endothelin-1 potentiation of coronary artery contraction after ischemia-reperfusion. *Vascul Pharmacol* 2008;48(2-3):109-14.
49. Ignarro LJ, Byrns RE, Wood KS. Endothelium-dependent modulation of cGMP levels and intrinsic smooth muscle tone in isolated bovine intrapulmonary artery and vein. *Circ Res* 1987;60(1):82-92.
50. Esmon CT, Owen WG. Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78(4):2249-52.
51. Weight SC, Bell PR, Nicholson ML. Renal ischaemia--reperfusion injury. *Br J Surg* 1996;83(2):162-70.
52. Thrane AS, Skehan JD, Thrane PS. A novel interpretation of immune redundancy and duality in reperfusion injury with important implications for intervention in ischaemic disease. *Med Hypotheses* 2007;68(6):1363-70.
53. Şener G YB. İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim Derg* 2009;22(3):5-14.
54. Zhang W, Smith C, Shapiro A, Monette R, Hutchison J, Stanimirovic D. Increased expression of bioactive chemokines in human cerebrovascular endothelial cells and astrocytes subjected to simulated ischemia in vitro. *J Neuroimmunol* 1999;101(2):148-60.
55. Günaydın B. ÇH. Genel anesteziyelerin serbest radikaller ve antioksidanlarla ilişkisi. *Anestezi Derg* 2003(11(2)):87-98.
56. Basım S. Alt Ekstremitelerde İskemi-Reperfüzyon Oluşturulan Ratlarda Gingko Biloba Egb761'in Barsak Anastomozu İyileşmesi Üzerine Etkisi (tez). TC Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi; 2005.
57. Zweier JL, Talukder MA. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2006;70(2):181-90.

58. Demiryürek AT, Kennedy S, Wainwright CL, Wadsworth RM, Kane KA. Influence of nitric oxide on luminol-enhanced chemiluminescence measured from porcine-stimulated leukocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997;30(3):332-7.
59. Biesalski HK, Böhles H, Esterbauer H, Fürst P, Gey F, Hundsdörfer G, et al. Antioxidant vitamins in prevention. *Clin Nutr* 1997;16(3):151-5.
60. Andersson C-M, Hallberg A, Högberg T. Advances in the development of pharmaceutical antioxidants. In: Testa B, Meyer UA, editors. *Advances in Drug Research*. 28: Academic Press; 1996. p. 65-180.
61. Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg* 2002;10(6):620-30.
62. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000;190(3):255-66.
63. Bonventre JV. Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int*. 1993;43(5):1160-78.
64. Paller MS, Hoidal JR, Ferris TF. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *J Clin Invest* 1984;74(4):1156-64.
65. Gelman S. The pathophysiology of aortic cross-clamping and unclamping. *Anesthesiology* 1995;82(4):1026-60.
66. Chang YK, Huang SC, Kao MC, Huang CJ. Cepharanthine alleviates liver injury in a rodent model of limb ischemia-reperfusion. *Acta Anaesthesiol Taiwan* 2016;54(1):11-5.
67. Gokalp O, Eygi B, Gokalp G, Kiray M, Besir Y, Iscan S, et al. Which Distant Organ is Most Affected by Lower Extremity Ischemia-Reperfusion? *Ann Vasc Surg* 2020;65:271-81.
68. Tuncay A, Sivgin V, Ozdemirkan A, Sezen SC, Boyunaga H, Kucuk A, et al. The Effect of Cerium Oxide on Lung Tissue in Lower Extremity Ischemia Reperfusion Injury in Sevoflurane Administered Rats. *Int J Nanomedicine* 2020;15:7481-9.
69. Altunören O. AG, Güngör Ö. Böbrek Fizyopatolojisi. Arınsoy T. GÖ, Koçyiğit İ., editor: Reaktif Yayınevi; 2017.
70. Biga LM. DS, Harwell A., Hopkins R., Kaufmann J., LeMaster M., Matern P., Marrison-Graham K., Quick D., Runyeon J. *Anatomy & Physiology*. Oregon State University 2019.
71. Junqueira LC. CJ, Kelley RO. *Temel Histoloji*. Aytekin Y. SS, editor. İstanbul: Barış Kitabevi; 1993.
72. Sequeira Lopez MLS, Gomez RA. Development of the renal arterioles. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(12):2156-65.
73. Goldman L. Bennet JC. *Cecil Textbook of Medicine*. 21st ed. editor 2000.
74. Odar V. *Anatomi Ders Kitabı*: Hacettepe Taş Kitapçılık; 1986.

75. İşlekel H. İnsan Biyokimyası. Onat T. EK, Sözman EY., editor. Ankara: Palme Yayıncılık; 2002.
76. Akpolat T. UC, Süleymanlar G. Nefroloji El Kitabı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 1996.
77. Lance DD. BB. The Renal Circulation in: The Kidney. Philadelphia: WB Saunders Company; 1996.
78. Navar LG. CP, Mitchell KD. Renal Cieculation in: Text Book of Nephrology. Baltimore: Williams & Wilkins; 1995.
79. Çakır ÖÖ. Yürük E., Binbay M. Üriner Sistem Taş Hastalığında Deneysel Modeller. Endoüroloji Bülteni. 2014;7:13-7.
80. Buniatian GH. Stages of activation of hepatic stellate cells: effects of ellagic acid, an inhibitor of liver fibrosis, on their differentiation in culture. Cell Prolif. 2003;36(6):307-19.
81. Gupta A, Singh AK, Kumar R, Jamieson S, Pandey AK, Bishayee A. Neuroprotective Potential of Ellagic Acid: A Critical Review. Adv Nutr. 2021;12(4):1211-38.
82. Evtugin DD, Magina S, Evtuguin DV. Recent Advances in the Production and Applications of Ellagic Acid and Its Derivatives. A Review. Molecules. 2020;25(12):2745.
83. Bialonska D, Ramnani P, Kasimsetty SG, Muntha KR, Gibson GR, Ferreira D. The influence of pomegranate by-product and punicalagins on selected groups of human intestinal microbiota. Int J Food Microbiol 2010;140(2-3):175-82.
84. Kumar Singh A, Cabral C, Kumar R, Ganguly R, Kumar Rana H, Gupta A, et al. Beneficial Effects of Dietary Polyphenols on Gut Microbiota and Strategies to Improve Delivery Efficiency. Nutrients 2019;11(9).
85. Zeb A. Ellagic acid in suppressing in vivo and in vitro oxidative stresses. Mol Cell Biochem. 2018;448(1-2):27-41.
86. Gupta A, Singh AK, Kumar R, Ganguly R, Rana HK, Pandey PK, et al. Corilagin in Cancer: A Critical Evaluation of Anticancer Activities and Molecular Mechanisms. Molecules. 2019;24(18).
87. Silva RFM, Pogačnik L. Polyphenols from Food and Natural Products: Neuroprotection and Safety. Antioxidants (Basel). 2020;9(1).
88. Pari L, Sivasankari R. Effect of ellagic acid on cyclosporine A-induced oxidative damage in the liver of rats. Fundam Clin Pharmacol 2008;22(4):395-401.
89. Lipińska L, Klewicka E, Sójka M. The structure, occurrence and biological activity of ellagitannins: a general review. Acta Sci Pol Technol Aliment 2014;13(3):289-99.
90. Wu X, Gu L, Holden J, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Beecher G, et al. Development of a database for total antioxidant capacity in foods: a preliminary study. Journal of Food Composition and Analysis. 2004;17(3):407-22.

91. Kim S-J, Kim M-C, Um J-Y, Hong S-H. The Beneficial Effect of Vanillic Acid on Ulcerative Colitis. *Molecules* 2010;15(10).
92. Salau VF, Erukainure OL, Ibeji CU, Olasehinde TA, Koobanally NA, Islam MS. Vanillin and vanillic acid modulate antioxidant defense system via amelioration of metabolic complications linked to Fe(2+)-induced brain tissues damage. *Metab Brain Dis* 2020;35(5):727-38.
93. Sharma N, Tiwari N, Vyas M, Khurana N, Muthuraman A, Utreja P. An overview of therapeutic effects of vanillic acid. *Plant Archives* 2020;20(2):3053-9.
94. Tai A, Sawano T, Yazama F, Ito H. Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2011;1810(2):170-7.
95. Yrbas MdA, Morucci F, Alonso R, Gorzalczany S. Pharmacological mechanism underlying the antinociceptive activity of vanillic acid. *Pharmacol Biochem Behav* 2015;132:88-95.
96. Stanely Mainzen Prince P, Rajakumar S, Dhanasekar K. Protective effects of vanillic acid on electrocardiogram, lipid peroxidation, antioxidants, proinflammatory markers and histopathology in isoproterenol induced cardiotoxic rats. *Euro J Pharmacol* 2011;668(1):233-40.
97. Anbalagan V, Raju K, Shanmugam M. Assessment of Lipid Peroxidation and Antioxidant Status in Vanillic Acid Treated 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene Induced Hamster Buccal Pouch Carcinogenesis. *J Clin Diagn Res* 2017;11(3):1-4.
98. Taqvi S, Ahmed Bhat E, Sajjad N, Sabir JSM, Qureshi A, Rather IA, et al. Protective effect of vanillic acid in hydrogen peroxide-induced oxidative stress in D.Mel-2 cell line. *Saudi J Biol Sci* 2021;28(3):1795-800.
99. Świsłocka R, Regulska E, Karpińska J, Świdorski G, Lewandowski W. Molecular structure and antioxidant properties of alkali metal salts of rosmarinic acid. Experimental and DFT studies. *Molecules* 2019;24(14):2645.
100. Khojasteh A, Mirjalili MH, Alcalde MA, Cusido RM, Eibl R, Palazon J. Powerful Plant Antioxidants: A New Biosustainable Approach to the Production of Rosmarinic Acid. *Antioxidants* 2020;9(12):1273.
101. Adomako-Bonsu AG, Chan SLF, Pratten M, Fry JR. Antioxidant activity of rosmarinic acid and its principal metabolites in chemical and cellular systems: Importance of physico-chemical characteristics. *Toxicology in Vitro* 2017;40:248-55.
102. Swamy MK, Sinniah UR, Ghasemzadeh A. Anticancer potential of rosmarinic acid and its improved production through biotechnological interventions and functional genomics. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018;102(18):7775-93.
103. Wu R, Feng J, Yang Y, Dai C, Lu A, Li J, et al. Significance of Serum Total Oxidant/Antioxidant Status in Patients with Colorectal Cancer. *PLoS One*. 2017;12(1):e0170003-e.

104. Abuhandan M, Cakmak A, Taskin A, Karakaya E, Kocyigit A, Kılıc H. The effect of age on the paraoxonase and arylesterase activity of pregnant mothers and their infants. *J Clin Lab Anal* 2012;26(4):302-6.
105. Zhou M, Liu X-H, Liu Q-Q, Chen M, Bai H, Guan L-B, et al. Lactonase Activity, Status, and Genetic Variations of Paraoxonase 1 in Women with Gestational Diabetes Mellitus. *J Diabetes Res* 2020;2020:3483427-.
106. Prabhulkar S, Li C-Z. Assessment of oxidative DNA damage and repair at single cellular level via real-time monitoring of 8-OHdG biomarker. *Biosensors and Bioelectronics* 2010;26(4):1743-9.
107. Li P, Gu Y, Yu S, Li Y, Yang J, Jia G. Assessing the suitability of 8-OHdG and micronuclei as genotoxic biomarkers in chromate-exposed workers: a cross-sectional study. *BMJ Open* 2014;4(10):e005979-e.
108. Bakar E, Ulucam E, Cerkezayabekir A, Sanal F, Inan M. Investigation of the effects of naringin on intestinal ischemia reperfusion model at the ultrastructural and biochemical level. *Biomed Pharmacother* 2019;109:345-50.
109. Uysal A, Burma O, Akar İ, Özsin KK, Rahman A, Üstündağ B, et al. Alt ekstremité iskemî reperfüzyonunun yol açtığı akciğer hasarında melatoninin koruyucu etkinliği. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi* 2006;14(4):308-14.
110. Yamamoto H, Yamamoto F, Tanaka F, Motokawa M, Shiroto K, Yamaura G, et al. Acute occlusion of the abdominal aorta with concomitant internal iliac artery occlusion. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2011;17(4):422-7.
111. Saba D YH, Şenkaya I, Ağrış M, Özer Z, Özkan H, Et Al. The Effects Of Calcium Dobesilate On Skeletal Muscle Ischemia. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi* 2000;8(4):797-801.
112. Homer-Vanniasinkam S, Crinnion J, Gough M. Post-ischaemic organ dysfunction: a review. *Euro J Vasc Endovasc Surg* 1997;14(3):195-203.
113. Gündüz D, Kasseckert SA, Härtel FV, Aslam M, Abdallah Y, Schäfer M, et al. Accumulation of extracellular ATP protects against acute reperfusion injury in rat heart endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2006;71(4):764-73.
114. Erbas H, Aydogdu N, Kaymak K. Effects of N-acetylcysteine on arginase, ornithine and nitric oxide in renal ischemia-reperfusion injury. *Pharmacological Res* 2004;50(5):523-7.
115. Kaçmaz A, User EY, Sehirli AO, Tilki M, Ozkan S, Sener G. Protective effect of melatonin against ischemia/reperfusion-induced oxidative remote organ injury in the rat. *Surg Today* 2005;35(9):744-50.
116. Gamulin Z, Forster A, Morel D, Simonet F, Aymon E, Favre H. Effects of infrarenal aortic cross-clamping on renal hemodynamics in humans. *Anesthesiology* 1984;61(4):394-9.
117. Awad R, Barham W, Taylor D, Woodward D, Bullen B. The effect of infrarenal aortic reconstruction on glomerular filtration rate and effective renal plasma flow. *Euro J Vasc Surg* 1992;6(4):362-7.

- 118.Friedewald JJ, Rabb H. Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 2004;66(2):486-91.
- 119.Teruya R, Fagundes DJ, Oshima CTF, Brasileiro JL, Marks G, Ynouye CM, et al. The effects of pentoxifylline into the kidneys of rats in a model of unilateral hindlimb ischemia/reperfusion injury. *Acta Cirúrgica Brasileira* 2008;23:29-35.
- 120.Aydoğdu N, Kaymak K, YALÇIN Ö. Sıçanlarda böbrek iskemi/reperfüzyon hasarında nasetilsisteinin etkileri. *Fırat Tıp Dergisi* 2005;10(4):151-5.
- 121.Park JL, Lucchesi BR. Mechanisms of myocardial reperfusion injury. *Ann Thoracic Surg* 1999;68(5):1905-12.
- 122.Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Anesthesiologists* 2001;94(6):1133-8.
- 123.Berkan Ö, Yildiz E, Katrancıoğlu N, Günay İ. Alt ekstremité iskemi reperfüzyona bağlı gelişen akciğer hasarında askorbik asidin etkisi. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi* 2001;9(4):238-41.
- 124.Yüce A, Ateşşahin A, Ceribaşı AO. Amelioration of cyclosporine A-induced renal, hepatic and cardiac damages by ellagic acid in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008;103(2):186-91.
- 125.Hwang JM, Cho JS, Kim TH, Lee YI. Ellagic acid protects hepatocytes from damage by inhibiting mitochondrial production of reactive oxygen species. *Biomed Pharmacother* 2010;64(4):264-70.
- 126.Kapan M, Gumus M, Onder A, Firat U, Basarali MK, Boyuk A, et al. The effects of ellagic acid on the liver and remote organs' oxidative stress and structure after hepatic ischemia reperfusion injury caused by pringle maneuver in rats. *Bratisl Lek Listy* 2012;113(5):274-81.
- 127.Yao X, Jiao S, Qin M, Hu W, Yi B, Liu D. Vanillic Acid Alleviates Acute Myocardial Hypoxia/Reoxygenation Injury by Inhibiting Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev* 2020;2020: doi: 10.1155/2020/8348035.
- 128.Luo W, Tao Y, Chen S, Luo H, Li X, Qu S, et al. Rosmarinic Acid Ameliorates Pulmonary Ischemia/Reperfusion Injury by Activating the PI3K/Akt Signaling Pathway. *Front Pharmacol* 2022;13:860944.
- 129.Gülmen Ş, Doğuç DK, Ceylan BG, Çetin NK, Meteoğlu İ, Okutan H, et al. Deneyisel aortik iskemi-reperfüzyonda beta-glukanın böbrek hasarı üzerine etkisi. *Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg* 2011;19(2):234-41.
- 130.Kiris I, Kapan S, Kılbas A, Yılmaz N, Altuntaş I, Karahan N, et al. The protective effect of erythropoietin on renal injury induced by abdominal aortic-ischemia-reperfusion in rats. *J Surg Res* 2008;149(2):206-13.
- 131.Tokgoz VY, Sipahi M, Keskin O, Guvendi GF, Takir S. Protective effects of vitamin D on ischemia-reperfusion injury of the ovary in a rat model. *Iran J Basic Med Sci* 2018;21(6):593-9.

- 132.Yurtcu E, Togrul C, Ozyer S, Uzunlar O, Karatas YH, Seckin KD, et al. Dose dependent protective effects of vardenafil on ischemia-reperfusion injury with biochemical and histopathologic evaluation in rat ovary. *J Pediatr Surg* 2015;50(7):1205-9.
- 133.Uzar E, Alp H, Cevik MU, Fırat U, Evliyaoglu O, Tufek A, et al. Ellagic acid attenuates oxidative stress on brain and sciatic nerve and improves histopathology of brain in streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurol Sci* 2012;33(3):567-74.
- 134.Radmanesh E, Dianat M, Badavi M, Goudarzi G, Mard SA. The cardioprotective effect of vanillic acid on hemodynamic parameters, malondialdehyde, and infarct size in ischemia-reperfusion isolated rat heart exposed to PM(10). *Iran J Basic Med Sci* 2017;20(7):760-8.
- 135.Murillo-González FE, Ponce-Ruiz N, Rojas-García AE, Rothenberg SJ, Bernal-Hernández YY, Cerda-Flores RM, et al. PON1 lactonase activity and its association with cardiovascular disease. *Clin Chim Acta* 2020;500:47-53.



EKLER



Ek 1



T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(Trakya University, Local Ethics Committee of Animal Experiments)

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Oturum Sayısı: 2021/01

Karar Tarihi: 29.01.2021

Karar No: 2021.01.01

Hayvan Sayısı ve Cinsi: Sıçan 48 adet

Yürüttüğü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Orkut GÜÇLÜ'nün yaptığı, Arş. Gör. Dr. Alper GÜRMEN'in Tıpta Uzmanlık Tezi olarak planlanan TÜHADYEK-2021/01 protokol nolu "Alt ekstremitenin deneysel iskemi/reperfüzyon modelinde gelişen reperfüzyona bağlı böbrek hasarına ellajik asit, vanilik asit ve rosmarinik asit'in etkilerinin araştırılması" başlıklı çalışma isteği görüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri etik kurullarının çalışma usul ve esaslarına dair yönetmelik ve Trakya Üniversitesi hayvan deneyleri yerel etik kurulu yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Prof. Dr. Enis ULUÇAM
Başkan
Araştırma ile İlişki: ☒ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☒ evet ☐ hayır

Prof. Dr. Hakan ERBAŞ
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☒ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☒ evet ☐ hayır

Prof. Dr. Suat ERDOĞAN
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Prof. Dr. Atakan SEZER
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Prof. Dr. Tevfik AKTOZ
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☒ evet ☐ hayır

Prof. Dr. Necdet KÖT
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Doç. Dr. Elvan BAKAR
Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒ yok
Toplantı Katılım: ☒ evet ☐ hayır

Doç. Dr. Filiz SANAL
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Dr. Öğr. Üyesi F. Gülfeşan ÇANAKÇI
Dış Hekimliği Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Vet. Hek. Kenan BEİVİ
Vet. Hek. Üye
Araştırma ile İlişki: ☒ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Prof. Dr. Uğur GÖLER
Sivil Toplum Kuruluşu/Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Ayhan YILMAZ
Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

KATILMADI

Ek 2

Evrak Tarih ve Sayısı: 16.12.2021-E.172401



T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
İdari ve Mali İşler Daire Başkanlığı

Sayı : E-59803669-604.99-172401
Konu : Sözleşme

16.12.2021

Sayın Doç. Dr. Orkut GÜÇLÜ
Trakya Üniversitesi
Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı

Yöneticiliğini yapmış olduğunuz ve Arş. Gör. Dr. Alper GÜRMEN'in "Alt Ekstremitenin DeneySEL İskemi/Reperfüzyon Modelinde Gelişen Reperfüzyona Bağlı Böbrek Hasarına Ellajik Asit, Vanilik Asit ve Rosmarinik Asit'in Etkilerinin Araştırılması" başlıklı tıpta uzmanlık projesinin, 18 (on sekiz) ay süre ve 39.817,00 TL ile desteklenmesine, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'nun 06.12.2021 tarih ve 2021/14 sayılı toplantısında mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilimsel Araştırma Projeleri Yönergesi'nin 8. maddesinin 4. bendi uyarınca düzenlenen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Sözleşmesi'nin tarafınızca imzalanarak 1 (bir) hafta içinde Rektörlüğe iletilmesi hususunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Osman Nuri HATİPOĞLU
Rektör Yardımcısı

Ek:Protokol sözleşmesi (2 sayfa)

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu :BSU6443PHT Pin Kodu :84172

Belge Takip Adresi : <https://www.turkiye.gov.tr/trakya-universitesi-ebys>

Adres : Trakya Üniversitesi Rektörlüğü İdari ve Mali İşler Daire Başkanlığı Balkan Yerleşkesi Edirne
22030

Telefon : 2842234210 Faks : 2842235507
e-Posta : idamali@trakya.edu.tr Web: <http://imdb.trakya.edu.tr/>
Kep Adresi : trakyaumi@hs01.kep.tr

Belgi için : Cennet ŞAHİN
Unvanı : Bilgisayar İşletmeni

