

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

RENAL İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINDA MANNİTOL VE
MİRABEGRONUN HİPOKSİ İLE TETİKLENEN
MEKANİZMALAR VE ANJİOGENEZ AÇISINDAN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
Dr. Nihat KARABACAK

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. SERHAT ÇETİN

ANKARA
NİSAN 2026

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

RENAL İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINDA MANNİTOL VE
MİRABEGRONUN HİPOKSİ İLE TETİKLENEN
MEKANİZMALAR VE ANJİOGENEZ AÇISINDAN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
Dr. Nihat KARABACAK

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. SERHAT ÇETİN

ANKARA
NİSAN 2026

TEŞEKKÜR

Meslek hayatımın en önemli 5 yılında bilgi ve becerilerini bizlere aktaran, yolumuzu aydınlatan, emek ve destekleri için her daim minnettar olacağım, başta tez danışmanım Sayın Doç. Dr. SERHAT ÇETİN olmak üzere;

Anabilim dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. AHMET BORA KÜPELİ ve Saygıdeğer hocalarımız Prof. Dr. TURGUT ALKİBAY, Prof. Dr. ÖZGÜR TAN, Prof. Dr. SİNAN SÖZEN, Prof. Dr. İLKER ŞEN, Prof. Dr. ALİ ATAN, Prof. Dr. ALİ ÜNSAL, Prof. Dr. METİN ONARAN, Prof. Dr. FAZLI POLAT, Prof. Dr. SERHAT GÜROCAK, Prof. Dr. SÜLEYMAN YEŞİL'e,

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini içtenlikle paylaşan, her zorlukta yardımına koşan, cerrahi ve akademik eğitimim için emek sarf eden birlikte çalışmaktan onur ve mutluluk duyduğum çok kıymetli Sayın Doç. Dr. ENDER CEM BULUT ve Doç. Dr. MURAT YAVUZ KOPARAL hocalarıma,

Tez çalışması ve yazım sürecinde sabır ve desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. CANAN YILMAZ ve Doç. Dr. BETÜL ÖĞÜT hocalarıma,

Tez çalışmamızı gerçekleştirmemizde katkıları büyük olan Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi ve başta sorumlu öğretim üyesi Prof. Dr. ELVAN ANADOL olmak üzere tüm ekibe,

TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Projesi kapsamında çalışmamıza finansal destek sağlayan TÜBİTAK'a (Proje numarası 324S330),

Çalışmamızın yapılabilmesinde sağladığı bütçe ile maddi destek sağlayan Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (Proje numarası TTU-2025-10022),

Beş yıl boyunca birlikte çalıştığım, aynı telaşı ve zorlukları paylaştığımız, iş yükünü birlikte omuzladığımız ama hepsinin ötesinde kardeşliği, dayanışmayı ve samimiyeti kaybetmeden birlikte yol aldığım, tüm bu zorlu süreci daha anlamlı ve katlanabilir kılan çok kıymetli asistan ağabeylerime ve kardeşlerime,

Gece gündüz demeden birlikte çalıştığımız, güler yüzleriyle ve özverileriyle kliniğimize değer katan tüm hemşire, sekreter, sağlık personeli ve ameliyathane ekibine,

Bugünlere gelmemi sağlayan, her zaman yanımda olan anneme ve babama, koşulsuz destekleriyle her adımda yanımda olan TAŞKARACA aileme,

Bu zorlu ve yorucu süreci varlıklarıyla kolaylaştıran kıymetli dostlarım Abdulsamet BURNAZ, Ahmet Fatih KÖSE, Ayin Sener BUCAK, Berkay TUTANÇ, Ertuğrul SÖZEN, Umut ÖZGÜR ve Yusuf Berat BAŞ'a,

Ve hayatımdaki en büyük şansım, yol arkadaşım, desteğini ve sevgisini her daim hissettiren biricik eşim Kübra'ya sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER

ŞEKİLLER LİSTESİ

TABLOLAR LİSTESİ

KISALTMALAR

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Böbrek Fizyolojisi ve Embriyolojisi	3
2.2 Ratlarda Böbrek Anatomisi	4
2.3 Akut Böbrek Hasarı (ABH)	4
2.3.1 Risk Faktörleri	8
2.3.2 Akut Böbrek Hasarı Etiyolojisi	8
2.3.3 İskemik Akut Böbrek Hasarı	9
2.3.4 İskemi/Reperfüzyon Hasarı	11
2.3.5 Parsiyel Nefrektomi ve İ/R Hasarı	13
2.4 Deneysel İ/R Hasarı Modelleri ve Daha Önce Denenmiş İlaçlar	13
2.5 Mannitol	16
2.6 Mirabegron	18
2.7 Biyokimyasal Parametreler	19
2.7.1 HIF 1 alfa ve VEGF	19
2.7.2 Kaveolin-1	21
2.7.3 KIM-1	22
2.7.4 TIMP	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1 Deney Grupları	24
3.2 Cerrahi Prosedür ve İ/R Modeli Oluşturulması	26
3.3 Mannitol Hazırlanması ve Uygulanması	28
3.4 Mirabegron Hazırlanması ve Uygulanması	28
3.5 İdrar, Serum ve Doku Örneklerinin Eldesi	28

3.6 24 Saatlik İdrarda Protein Düzeyinin Ölçüm Prensibi	30
3.7 Rat İdrar ve Serum Kreatinin Ölçüm Prensibi	30
3.8 Rat Serum BUN Ölçüm Prensibi	30
3.9 Kreatinin Klirensi Hesaplanması	31
3.10 Rat İdrar ve Serum KIM-1, Böbrek Dokusunda HIF-1α , VEGF-A, Kaveolin-1, TIMP-1 ve TIMP-2 Düzeylerinin Belirlenmesi	32
3.11 Doku Protein Düzeyi Ölçümü	33
3.12 Histopatolojik Değerlendirme	33
3.13 İstatistiksel Analiz	35
4. BULGULAR	36
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ	57
7. KAYNAKLAR	59
ÖZET	77
SUMMARY	80

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. İskemi Reperfüzyon Modeli Aşamaları	27
Şekil 2. Sakrifikasyon sonrası ratlardan elde edilen normal görünümde (üstteki) ve iskemik görünümde (alttaki) uzunlamasına ikiye ayrılmış böbrek dokuları	29
Şekil 3. Grup 7’de rat böbrek dokusuna ait histopatolojik (H&E) ve immünohistokimyasal (TIMP-2 ve kaveolin) bulgular.....	44
Şekil 4. Rat böbrek dokusunda TIMP-1 immünohistokimyasal ekspresyonu (×120 büyütme).....	44

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. 24 saatlik İdrar Hacmi, 24 saatlik İdrar Protein, Kreatinin ve KIM-1 düzeyleri	38
Tablo 2. Serum Kreatinin, BUN ve KIM-1 düzeyleri	39
Tablo 3. Böbrek Dokusu HIF 1 α , VEGF-A, Kaveolin 1, TIMP 1 ve TIMP 2 düzeyleri	41
Tablo 4. Histopatolojik Parametrelerin Gruplar Arasında Dağılımı	43

KISALTMALAR

AAM	: Aşırı Aktif Mesane
ABH	: Akut Böbrek Hasarı
ACLARA	: Ratlarda kreatinin klirensini tahmin eden hesaplama yöntemi
ATN	: Akut Tübüler Nekroz
ATP	: Adenozin Trifosfat
Bax	: Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	: B-cell lymphoma 2
BMP4	: Bone Morphogenetic Protein 4
BUN	: Kan Üre Azotu
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
CAT	: Katalaz
CE	: Avrupa Uygunluk Belgesi
cGMP	: Siklik Guanozin Monofosfat
CK	: Kreatin Kinaz
ClCr	: Kreatinin Klirensi
DAB	: Diaminobenzidin
eClCr	: Tahmini Kreatinin Klirensi
eNOS	: Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
EPO	: Eritropoietin
FDA	: Food and Drug Administration
GFR	: Glomerüler Filtrasyon Hızı
GLDH	: Glutamat Dehidrogenaz
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
GSK-3β	: Glikojen Sentaz Kinaz 3 Beta
H&E	: Hematoksilen ve Eozin
HADYEK	: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
HIF-1α	: Hipoksi ile İndüklenen Faktör 1 Alfa

HIF-1β	: Hipoksi ile İndüklenen Faktör 1 Beta
HRP	: Horseradish Peroxidase
IGFBP-7	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Protein 7
IL-10	: İnterlökin 10
IL-13	: İnterlökin 13
IL-17	: İnterlökin 17
IL-18	: İnterlökin 18
IL-1β	: İnterlökin 1 Beta
IL-4	: İnterlökin 4
IL-6	: İnterlökin 6
İ/R	: İskemi/Reperfüzyon
iNOS	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
KBH	: Kronik Böbrek Hastalığı
KDIGO	: Kidney Disease Improving Global Outcomes
KIM-1	: Kidney Injury Molecule-1
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
L-FABP	: Karaciğer Tipi Yağ Asidi Bağlayıcı Protein
MCP-1	: Monosit Kemoatraktan Protein-1
MDA	: Malondialdehit
mGFR	: Glomerüler Filtrasyon Hızı
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
MPO	: Miyeloperoksidaz
MYO	: Miyoglobin
NAD⁺	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid (oksitlenmiş)
NADH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid (indirgenmiş)
NF-κB	: Nükleer Faktör kappa B
NGAL	: Nötrofil Jelatinaz İlişkili Lipokalin
NLRP3	: Nod-like reseptör protein 3
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
NSAİİ	: Non-steroid Antiinflamatuvar İlaçlar

OHdG	: 8-hidroksi-deoksiguanozin
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
PDE5	: Fosfodiesteraz Tip 5
PHD	: Prolin Hidroksilaz Domain Proteini
PI3K	: Fosfoinositid 3-kinaz
PKC	: Protein Kinaz C
PN	: Parsiyel Nefrektomi
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SGLT2	: Sodyum-Glukoz Kotransporter 2
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TIMP-1	: Doku Metalloproteinaz İnhibitörü 1
TIMP-2	: Doku Metalloproteinaz İnhibitörü 2
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktörü Alfa
TUNEL	: DNA parçalanma analizi yöntemi
UCP1	: Uncoupling Protein 1
UMOD	: Uromodulin
VCAM-1	: Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGF-A	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü A

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Böbrek perfüzyonunun akut veya geçici olarak bozulduğu iskemik serebrovasküler olay, miyokard enfarktüsü, şok/resüsitasyon, böbrek nakli, kardiyopulmoner cerrahi, travma ve iatrojenik yaralanmalar gibi durumlar renal İ/R(İ/R) hasarı üzerinden akut böbrek hasarı (ABH) gelişimine yol açmaktadır, bu da yüksek morbidite ve mortalite ile ilişkilendirilmektedir(1). Benzer şekilde, parsiyel nefrektomi sırasında uygulanan renal vasküler klempleme de hasta yararına yapılan bir girişim olmasına rağmen İ/R sürecini tetikleyerek ameliyat sonrası ABH riskini artırabilmektedir. Bu nedenle, parsiyel nefrektomi ya da transplantasyon gibi renal cerrahiler sırasında gelişen İ/R hasarını azaltmaya yönelik antioksidan, antiinflamatuvar ve mikrosirkülasyonu koruyucu yeni stratejilere ihtiyaç devam etmektedir(2).

Mannitol, parsiyel nefrektomi ve transplantasyon gibi girişimlerde geleneksel olarak renoprotektif amaçla kullanılan bir osmotik diüretik olmakla birlikte, gerek klinik çalışmalarda gerek deneysel modellerde etkinliği tartışmalı ve heterojen sonuçlar içermektedir(3-6). Öte yandan, üroloji kliniğinde aşırı aktif mesanede yaygın kullanılan selektif β_3 -adrenerjik agonist mirabegronun yakın tarihli bir rat çalışmasında renal İ/R modelinde cAMP/pCREB ve GSK-3 β /NF- κ B p65 yolaklarını modüle ederek böbrek fonksiyon bozukluğu, inflamasyon ve apoptozu anlamlı ölçüde azalttığı bildirilmiştir(7).

Literatürde mirabegronun rutin renal cerrahiye benzeyen bir İ/R modelinde, daha önce gösterilmiş vazodilatasyon, hipoksi-anjiyogenez yolakları üzerindeki

etkilerini değerlendiren veya mannitol ile kombine kullanımının araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu alışmada Renal İ/R modelinde mirabegron ve mannitol uygulamalarının İ/R ile ilişkili renal oksidan hasar üzerindeki etkilerini vazodilatasyon ve anjiyogenez mekanizmaları üzerinden araştırmak için böbrek dokusunda HIF-1 α (Hipoksi ile indüklenen faktör 1-alfa), vasküler endoteliyal büyüme faktörü (VEGF), Kaveolin 1, TIMP 1 ve 2 (Matriks metalloproteinaz doku inhibitörü 1 ve 2) düzeylerinin ölçülmesi, ayrıca böbrek dokularında Kaveolin-1, TIMP 1, TIMP 2 düzeylerinin immunohistokimyasal yöntemle de belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Böbrek Fizyolojisi ve Embriyolojisi

Böbrekler, vücut ağırlığının yalnızca yaklaşık %1'ini oluşturmalarına rağmen kardiyak debinin yaklaşık %20'sini alır ve bu sayede oldukça yüksek bir kan akımına sahiptir. Bu perfüzyon, birçok iyi kanlanan organdan bile fazladır ve 100 gram doku için dakikada 400 mL'ye kadar ulaşabilir. Ancak bu büyük hacimdeki kan akımına rağmen, oluşan filtratın yalnızca yaklaşık 1 mL/dk'lık kısmı idrar olarak atılır. Bu akım hızı, idrar oluşum sürecinde belirleyici bir rol oynar ve böbrek fonksiyonlarının sürdürülmesi için kritiktir. İdrar oluşumu için harcanan enerji, vücudun bazal oksijen tüketiminin yaklaşık %10'unu oluşturur(8).

Böbrekler günde ortalama 200 litre filtrat oluşturarak hayati plazma bileşenlerinin dolaşımında kalmasını sağlar. Bu süreç, aynı zamanda sıvı ve elektrolit dengesini düzenleyerek plazma hacmi ve bileşiminin korunmasına katkıda bulunur. Böbrekler ayrıca kan basıncını düzenleyen renini üretir, asit-baz dengesini sağlar ve D vitamininin aktif formu olan kalsitriol sentezine katılır(9). Böbreğin damar yapısı; glomerüler kapiller ağ, kortikal peritübüler kapillerler ve medullayı besleyip drene eden kompleks bir mikrovasküler sistemden oluşur(8).

İnsan embriyosunda gebeliğin beşinci haftasında gelişen ve üreter tomurcuğu olarak adlandırılan yapı, metanefrozun temelini oluşturarak nefron gelişimini başlatır. Üreter tomurcuğunun proksimal uçları zamanla renal pelvisi, kaliksleri ve toplayıcı kanalları oluştururken, distale doğru uzanan bölümü üreteri meydana getirir. Kloak ise rektum, anal kanal ve ürogenital sinüse farklılaşır(10).

Ürogenital sinüsün ilerleyen dönemde mesane ve üretraya dönüşmesiyle intrauterin yaşamın üçüncü ayında metanefrik böbrek idrar üretme kapasitesine ulaşır(11, 12).

Yetişkin bir insanda, bireysel farklılıklara bağlı olarak böbreklerde 200 bin ile 2,5 milyon arasında nefron bulunur; erişkin bir rat böbreğinde ise bu sayı ortalama 30 bindir. Nefron; glomerüller ve Bowman kapsülünün oluşturduğu Malpighi cisimciği ile proksimal tübül, Henle kulbu, distal tübül ve bağlantı tüpünden oluşur. Nefronun yapısal özellikleri türler arasında farklılık gösterebilir(8).

2.2 Ratlarda Böbrek Anatomisi

Ratlarda, abdominal boşluğun kraniyalinde yer alan sağ böbrek, birinci ve üçüncü lomber vertebra hizasında iken sol böbrek daha kaudalde yerleşmektedir. Ortalama 300 gr ağırlığında bir rat böbreği 2 cm boyunda, 1,3 cm eninde ve 0,8-1 cm kalınlığındadır(13). Böbrek vasküler yapısı, abdominal aortanın bir dalı olan renal arter ve vena kava inferiora dökülen renal venden meydana gelmektedir. Üreterler ise böbrekten çıktıktan sonra mesaneye dorsolateral taraftan ulaşırlar(14).

2.3 Akut Böbrek Hasarı (ABH)

ABH, metabolik atık ürünlerin uzaklaştırılması, elektrolit ve sıvı dengesinin düzenlenmesi ve asit-baz durumunun stabilizasyonu gibi bazı böbrek fonksiyonlarının aniden azalması ile karakterizedir(15). Böbreğin boşaltım fonksiyonunun belirteci, serum kreatinin seviyeleri ile idrar üretiminin kantitatif bir belirteci olan oligüridir. KDIGO grubuna göre ABH, serum kreatinin düzeyinde 48

saat içinde $\geq 0,3$ mg/dl artış olması, son 7 gün içinde bilinen ya da tahmin edilen bazal değere göre $\geq 1,5$ kat yükselmesi veya idrar çıkışının en az 6 saat boyunca $\leq 0,5$ ml/kg/saat düzeyine düşmesi ile tanımlanır(16).

Böbrek hasarının nihai değerlendirilmesi ancak biyopsi ile mümkün olduğundan glomerüler veya tübüler hasarı gösteren birçok üriner biyobelirtecın kullanılması önerilmiştir(17). ABH tanısında kullanılan belirteçler geleneksel ve yeni nesil belirteçler olarak sınıflandırılmaktadır. Geleneksel belirteçlerden serum kreatinin ve sistatin C, glomerüler filtrasyon azalmasını geç yansıttıkları için erken tanıda duyarlılıkları sınırlıdır; idrar çıkışı takibi hemodinamik değişikliklerden etkilenmektedir, idrar mikroskopisi tübüler hasarı gösterebilse de değerlendiren kişiye bağımlı kalmaktadır(18). Buna karşılık yeni biyobelirteçler arasında Böbrek Hasar Molekülü (KIM-1) proksimal tübül hasarının spesifik göstergesi olarak öne çıkarken(19) özellikle ilaç ilişkili proksimal tübül toksisitesi için düzenleyici otoritelerce onaylanmış biyobelirteçler arasında yer almaktadır. Nötrofil Jelatinaz İlişkili Lipokalin (NGAL) iskemi ve nefrotoksik hasarı takiben saatler içinde yükselerek hem erken Akut Tübüler Nekroz (ATN) tanısında hem de prerenal hasar ayırımında değer taşımaktadır(20). Karaciğer Tipi Yağ Asidi Bağlayıcı Protein (L-FABP) oksidatif stres ve iskemiye duyarlı bir belirteç olup kontrast nefropatisi, sepsis ve kardiyak cerrahi gibi farklı klinik senaryolarda erken risk belirlemede yardımcıdır(21). Uromodulin (Tamm–Horsfall proteini) (UMOD) tübüler rezervi ve sağlam nefron kütesini yansıtırken, düşük düzeyleri artmış ABH riski ile ilişkilendirilmiştir(22). İnterlökin 18 (IL-18) ve Monosit Kemoatraktan Protein 1 (MCP-1) inflamatuvar süreçler ve tübüler hasarla ilişkili belirteçlerdir(23). Doku

Metalloproteinaz İnhibitörü 2 (TIMP-2) ve İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Protein 7 (IGFBP-7), G1 fazında hücre döngüsü arrestini ve tübüler hücre stresini yansıtan erken belirteçler olup özellikle yoğun bakım ve yüksek riskli cerrahi hastalarında, üriner [TIMP-2]·[IGFBP-7] kombinasyonu ile 12–24 saat içinde evre 2–3 ABH gelişme riskini öngörmede güçlü performans göstermektedir(24); bu kombinasyon NephroCheck adıyla FDA ve CE onaylı ilk ABH risk biyobelirteci olarak klinik kullanıma girmiştir(25). Güncel kanıtlar, tek bir biyobelirtecini tanısal olarak yeterli olmadığını; bu nedenle hasar (ör. KIM-1, NGAL, L-FABP, IL-18, MCP-1), stres/hücre döngüsü belirteçleri ([TIMP-2]·[IGFBP-7]) ve fonksiyon belirteçlerinin (kreatinin, sistatin C, idrar çıkışı) birlikte değerlendirildiği çoklu biyobelirteç yaklaşımının ABH'nin erken tanı, risk tabakalandırması ve prognoz değerlendirmesinde daha üstün performans sunduğunu göstermektedir(18, 26).

Wistar ratlarda İ/R modelinde idrar protein, üre, kreatinin, protein/kreatinin oranı; serum üre ve kreatinin; fraksiyonel Na/K atılımı, idrar akımı ve kreatinin klirensi gibi parametrelerdeki değişikliklerin RIFLE sınıflamasına göre ABH riskini ve seyrini göstermekte etkili olduğu bildirilmiştir(27). Sisplatin ile indüklenen ABH modellerinde klasik BUN ve serum kreatinin artışına ek olarak idrar KIM-1, NGAL, IL-18, nefrin ve serum sistatin C düzeylerinin, kreatinin yükselmesinden önce anlamlı biçimde arttığı ve bu nedenle erken tanı için duyarlı biyobelirteçler olarak kullanıldığı gösterilmiştir(28, 29). Mannitol, sükroz ve kontrast madde ile oluşturulan osmotik/tübüler hasar modellerinde, idrarda KIM-1, NGAL, clusterin, sistatin C, albümin ve total protein gibi biyobelirteçlerin, hem

duyarlılık hem de hasar şiddeti ile korelasyon açısından geleneksel serum kreatinin ve kan üre azotu (BUN)'dan daha üstün olduğu rapor edilmiştir(30, 31).

Son yıllarda rat modellerinde kreatinin klirensinin belirlenmesinde klasik idrar toplama yöntemlerine alternatif olarak plazma kreatinin ve vücut ağırlığına dayalı tahmin modelleri geliştirilmiş ve bu yaklaşımların deneysel ölçümlerle yüksek korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. Pellicer-Valero ve ark., erkek Wistar ratlardan elde edilen 1554 adet (ölçülmüş kreatinin klirensi (mClCr), plazma kreatinin, vücut ağırlığı üçlüsünü kullanarak) ölçüm sonucunda yalnızca plazma kreatinin ve vücut ağırlığına dayalı bir yapay network ile ClCr tahmin eden bir model geliştirmiştir(32). Bu yaklaşımın çevrimiçi ara yüzü olan ACLARA hesaplayıcısı, pratikte yalnızca plazma kreatinin ve vücut ağırlığını kullanarak ClCr tahmini(eClCr) yapmaktadır. ACLARA, başlangıçta Wistar rat verileriyle geliştirilmiş, daha sonra spontan hipertansif ratlarda akut böbrek hasarı modellerini içeren 1458 ölçümde yeniden test edilmiş; bu analizde ölçülmüş ve tahmin edilen ClCr arasında korelasyon yaklaşık 0.90, ortalama mutlak hata ise 0.18 mL/dk olarak raporlanmıştır(33). Kronik böbrek hasarı modeliyle yürütülen 90 günlük takip çalışmasında, mClCr ile ACLARA tahminleri (eClCr) arasında Pearson korelasyon katsayısı $r=0.83$ ($p<0.0001$) bulunmuş, deneyin genel seyri açısından mClCr ve eClCr'nin neredeyse özdeş bilgi sağladığı ve idrar toplama kaynaklı deneysel hataların eClCr ile kısmen aşıldığı belirtilmiştir(34).

2.3.1 Risk Faktörleri

ABH için risk faktörleri genel olarak üç grupta toplanabilir. Çevresel faktörler arasında bulaşıcı hastalıkların yeterince kontrol edilememesi ve sağlık bakım sistemlerinin yetersizliği yer alır. Hastaya bağlı faktörler; hipovolemi, hipotansiyon, anemi, hipoksi ve nefrotoksik ilaç kullanımı gibi kontrol edilebilir durumların yanı sıra kronik böbrek, kalp, karaciğer veya gastrointestinal sistem hastalıkları, diyabetes mellitus, ciddi enfeksiyonlar ve sepsis gibi değiştirilemeyen ek hastalıkları içerir. Ayrıca genetik yatkınlıklar kapsamında miyoglobininüri, hemoglobininüri ve ürolitiazis de ABH gelişimi için önemli risk faktörleri arasında sayılmaktadır(35).

2.3.2 Akut Böbrek Hasarı Etiyolojisi

Klinik olarak ABH postrenal, renal ve prerenal olarak üç ana etiyolojiye ayrılabilir.

Postrenal ABH adından da anlaşılacağı gibi böbrekten sonra gelen yapılarda gerçekleşen patolojiler nedeniyle böbrek fonksiyonlarının bozulduğu durumlardır(36). Postrenal ABH'nin nedenleri arasında üreter taşları, nörojenik mesane, papiller nekroz, retroperitoneal fibrozis, asiklovir veya indinavir gibi çeşitli maddelerin çökmesine bağlı intratübüler tıkanma, erkeklerde prostat hiperplazisi/kanseri ve kadınlarda jinekolojik kanserler yer almaktadır(37). İdrar akışını engelleyen idrar yolu tıkanıklıkları sonucu tübüllerde sıvı basıncı artar ve buna bağlı olarak GFR azalır. Akut idrar yolu tıkanıklığı böbrek kan akışının

bozulmasına ve yine GFR'nin azalmasına katkıda bulunan inflamatuvar süreçlere de yol açabilir(38).

Renal ABH, intrarenal ABH olarak da adlandırılır ve böbrekte kan damarları, tübüller ve glomerülleri de içerebilen, kısacası böbreğin kendisinde gerçekleşen patolojilerden kaynaklanır(36).

Böbreklere giden kan akımının azalmasından kaynaklanan prerenal ABH en sık karşılaşılan ABH nedenidir ve iskemik ABH olarak da adlandırılır. Normalde böbreklere dakikada 1100 ml (kalp debisinin %20-25'i) kan ulaşır. Vücut sıvılarının ve bunun içinde çözünmüş madde konsantrasyonlarının hassas şekilde ayarlanabilmesi için GFR'nin korunması şarttır(39). Glomerüllere gelen kan akımındaki azalma, GFR'de düşüşe neden olarak böbrek hasarını başlatabilir(40). ABH bazı durumlarda birden çok nedenle başlayabilir örneğin prerenal hasar ve renal hasar aynı anda bulunabilir.

2.3.3 İskemik Akut Böbrek Hasarı

Yüksek mortalite oranlarıyla ilişkilendirilen ABH'nin yaygın bir nedeni olarak renal iskemi böbrek transplantasyonu, enfeksiyonlar, vasküler oklüzyonlar veya hidronefroz gibi durumlarda gelişebilir ve bu durum akut böbrek hasarına neden olabilmektedir(36, 40). Böbrekler normal şartlar altında kan akımındaki azalmalara cevaben GFR'yi düzenleme yeteneğindedir ancak vasküler oklüzyon gibi kompanse edilemeyen durumlarda oksijen ve metabolik substratlar yeterince böbreğe ulaştırılamaz(41). Bu nedenle tübül hücreleri hücresel metabolizma için gerekli ATP üretimine devam edemez(42).

İskemik ABH patofizyolojisinde böbrekte hasarın başladığı ilk yer tübül epitel hücreleridir. Özellikle proksimal tübül hücreleri böbrekte iskemik hasardan en çok etkilenen hücrelerdir. Bunun bir nedeni yüksek metabolizmaya sahip olmaları ve anaerobik glikoliz kapasitelerinin görece düşük olmasıdır(43). Bir diğer neden ise dış medullada bulunan proksimal tübül segmentlerinin mikrovasküler yapılanmasının çok zayıf olmasıdır. İskemi sonlandığında bile bu bölgeler yeterli perfüzyonu almakta gecikir. Lokal mikrovasküler akımın azalması hipoksinin devam etmesine yol açarak hasara katkıda bulunur(44).

İskemi süresince hücresel metabolizmanın bozulması sonucu tübül hücreleri şişer, hücre iskeleti değişiklikleri meydana gelir ve fonksiyonları bozulur(45) Tüm nefron segmentlerinde iskeminin neden olduğu hücre şişmesi, başlıca luminal membrandan alınan Na^+ miktarı değişmeksizin ATP yoksunluğuna bağlı bazolateral membrandaki Na^+/K^+ ATPaz pompasının aktivitesinin ve hızının azalmasından kaynaklanır(46). Bu durum renal tübüler hücre kaybına ve böbreğin fonksiyonlarını sürdürememesine neden olur. Metabolik atıklar uzaklaştırılmaz; su ve elektrolit dengesi sürdürülemez hale gelir. Vücutta oluşan elektrolit birikimi hızla renal fonksiyonları bozar. ABH'nin devam etmesi durumunda metabolik asidoz gelişebilir(42).

Proksimal tübül hücrelerinden vazokonstriksiyona ve hücre adezyon moleküllerinin aşırı ekspresyonuna neden olan proinflamatuvar sitokinler salınır ve dokuya lökosit hücre infiltrasyonu gerçekleşir(47). Endotel fonksiyonlarında bozulmanın başlaması ve inflamasyonun gelişmesi ABH'yi şiddetlendirir. Dahası böbrek yeniden kanlansa yani reperfüzyon sağlansa bile böbrek hasarlanması

devam eder. İ/R hasarı olarak bilinen bu paradoksal durum, temelinde birçok mekanizmayı barındırır(48).

2.3.4 İskemi/Reperfüzyon Hasarı

İskemi, organ ya da dokuya yetersiz kan akışı sonucunda gelişen ve başlangıçta reversible olmakla birlikte ilerlediğinde irreversible hücre ve doku hasarı ile sonuçlanabilen bir süreçtir(49). İrreversible hasarın önlenmesi için dokuya kan akımının mümkün olan en kısa sürede yeniden sağlanması (reperfüzyon) gerekir(50). Ancak reperfüzyonla birlikte kan akımının yeniden sağlanması, paradoksal olarak iskeminin yol açtığı hasarı daha da artırabilir. İskemi ve reperfüzyon evrelerinin bir arada oluşturduğu bu zararlı etkiler bütününe iskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarı adı verilir(51).

İskemik dönemde kan akımının azalmasına bağlı oksijenlenme düşer, buna paralel olarak aerobik metabolizma sekteye uğrar, anaerobik metabolizma baskın hale gelir. Enerji üretimi giderek azalır ve mitokondriyal disfonksiyon başlar(52). Anaerobik süreçlerin neden olduğu laktat birikimi ve metabolik artıkların uzaklaştırılamaması hücre içi asidoza yol açar; hücresel enerji üretimi zamanla tamamen durur(53). Bu dönemde reaktif oksijen radikalleri (ROS), sitokinler ve kemokinler gibi hasarın başlamasına aracılık eden moleküllerin de biriktiği gösterilmiştir(54).

İskemide hasarlanan mitokondriler, reperfüzyon sırasında oksijen yeniden sağlansa dahi yeterli ATP üretemezler(55) ve bu durum mitokondriyal

disfonksiyonu derinleştirir(56). Bunun sonucunda ATP hızla tükenir ve ROS üretimi belirgin şekilde artar(57).

İ/R hasarı restriksiyon, restorasyon ve reoksijenizasyon dönemleriyle karakterizedir(58), böbrekte mikrovasküler hasar ve akut inflamatuvar değişiklikler yoluyla belirgin fonksiyon bozukluğuna neden olur(58). Süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi ROS molekülleri böbrek dokusunda oluşan bu hasarın temel araçlarından(59). Artmış lökosit adezyonu ve buna bağlı endotel aktivasyonu/hasarı İ/R ile tetiklenen inflamatuvar yanıtın önemli bileşenleridir(60). Doku, İ/R hasarına karşı antioksidan savunma sistemlerini aktive ederek yanıt verse de hasarın ağır olduğu durumlarda bu koruyucu mekanizmalar yetersiz kalmakta ve sonuçta akut böbrek hasarı gelişmektedir.

Böbrek perfüzyonunun bozulduğu; iskemik serebrovasküler olay, miyokard enfarktüsü, şok/resüsitasyon, böbrek transplantasyonu, kardiyopulmoner cerrahi işlemler, kazalar veya iatrojenik travma gibi birçok nedenle indüklenen renal İ/R hasarı, ABH'ye yol açan yaygın bir komplikasyondur(58). Gerek böbrek cerrahisi gerekse iskemik olaylar neticesinde ABH ilişkili yüksek morbidite ve mortalite söz konusudur.

İ/R hasarında reperfüzyon sonrası vücudun verdiği hasar yanıtının büyüklüğü iskeminin süresine bağlıdır(61). Uzun iskemi periyotları, reperfüzyona bağlı doku hasarını, hücresel işlev bozukluğunu ve/veya hücre ölümünü indükleyerek cevabı şiddetli hale getirebilir.

Renal parankim boyunca oksijenasyon kortekste en yüksek, dış medullada orta ve papillada en düşüktür(62). Düşük oksijen gerilimine fizyolojik olarak adapte

olmuş iç medulla ve papilla hücreleri, daha belirgin anaerobik glikoliz kapasiteleri sayesinde iskemiye karşı görece daha dayanıklı kabul edilirken; yüksek enerji gereksinimi ve sınırlı anaerobik kapasitesi olan proksimal tübül hücreleri ise özellikle savunmasızdır(63).

2.3.5 Parsiyel Nefrektomi ve İ/R Hasarı

Cerrahi endikasyonu olan küçük böbrek tümörlerinde standart yaklaşım nefron koruyucu cerrahi, yani parsiyel nefrektomidir(PN)(59). İdeal bir PN’de amaç, tümöral alanın rezeke edilerek kalan böbrek parankiminin fonksiyonel rezervinin korunmasıdır. Vakaların çoğunda, tümörün rezeke edilmesi sırasında intraoperatif kanamayı azaltmak amacıyla renal arter ve ven birlikte klemlenerek iskemi oluşturulur. Tümör rezeksiyonunu takiben tümör yatağı onarılır ve klemp açılarak böbrek reperfüze edilir. Bu aşamada reperfüzyon fazında reaktif oksijen radikallerinin artışıyla İ/R hasarı gelişebilir; bunun sonucunda glomerül ve tübüler epitelyum bütünlüğü bozulur ve akut tübüler nekroz ortaya çıkabilir(64). Bu nedenle tümör cerrahisi gibi iskemik süreçler renal İ/R hasarı için önemli bir risk faktörüdür.

2.4 Deneysel İ/R Hasarı Modelleri ve Daha Önce Denenmiş İlaçlar

İ/R hasarının etkilerini ve altta yatan patofizyolojik mekanizmaları ortaya koyabilmek için deney hayvanları ile oluşturulan modeller vazgeçilmez bir araçtır; özellikle kemirgenler düşük maliyet, kolay barındırma ve iyi tanımlanmış cerrahi protokoller nedeniyle böbrek ve diğer organ İ/R çalışmalarında en sık kullanılan

türlerdir(2, 65). Farklı organ sistemleri için köpek, domuz gibi daha büyük memeliler translasyonel modeller sunsa da ürolojik organlara (başta böbrek ve testis) yönelik İ/R deneylerinde cerrahi işlemin teknik olarak daha kolay olması, ilaç uygulamasının pratikliği ve geniş metodolojik birikim nedeniyle çoğunlukla sıçan ve fare modelleri tercih edilmektedir(2, 66).

İn vivo ve in vitro renal İ/R modelleri, böbrek hipoperfüzyonu, parsiyel nefrektomi ve transplantasyon gibi klinik durumların patofizyolojisini kontrollü biçimde taklit ederek ABH'den Kronik Böbrek Hastalığı (KBH)'na giden süreci öngörmeye olanak sağlar(2).

Deneyisel böbrek İ/R hasarı modellerine yönelik literatürde, çoğunlukla rat veya farelerde 30–50 dakikalık tek taraflı ya da bilateral sıcak iskemi sonrası 24–48 saat reperfüzyon uygulanan modellerde serum kreatinin, BUN, NGAL, KIM-1, LDH, CK, MYO gibi fonksiyonel belirteçler ile doku düzeyinde MDA, SOD, GSH, GSH-Px, katalaz, 8-OHdG, 4-HNE, MPO, TNF- α , IL-1 β , IL-6, NLRP3, Bax/Bcl-2, kaspaz-3, TUNEL, VCAM-1, α -SMA gibi oksidatif stres, inflamasyon, apoptoz ve fibrozis parametreleri ayrıntılı biçimde değerlendirilmiştir(2, 67-69). Çeşitli çalışmalarda antioksidan (N-asetilsistein, vitamin C/E, resveratrol), antiinflamatuvar (kortikosteroidler, nonsteroid antiinflamatar ilaçlar (NSAİİ), statinler), vazodilatör/nitrik oksit sentez (NOS) modülatörü (L-arjinin, NO vericileri) ve sitoprotektif/antiapoptotik ajanların (eritropoietin, melatonin, bazı immünmodülatörler) etkileri, ilacın iskemi öncesi ya da reperfüzyon başlangıcında verilmesiyle test edilmiş; bu ilaçların MDA ve MPO gibi oksidatif/inflamatuvar belirteçleri azaltması, SOD, CAT ve GSH düzeyleri gibi antioksidan savunmayı

artırması, proinflamatuvar sitokin ve adezyon molekölü ekspresyonunu baskılaması ile birlikte histolojik böbrek hasarını ve fonksiyon kaybını anlamlı düzeyde hafiflettiğı gösterilmiştir(70-76).

Renal İ/R hasarını azaltmak için rutin Üroloji pratiğinde kullanılan birtakım moleküller de denenmiştir. Bu kapsamda mannitol gibi ozmotik diüretikler, fosfodiesteraz inhibitörleri (tadalafil,sildenafil,udenafil), β 3-agonist (mirabegron) ve çeşitli diğ er ürolojik ilaçlar kullanılarak böbrek fonksiyonları, oksidatif stres ve histolojik hasar üzerine etkileri araştırılmış; bazı çalışmalarda bu ajanların belirgin koruyucu etki sağladığı, bazılarında ise anlamlı bir iyileşme göstermediğı bildirilmiştir(7, 77-80).

Fosfodiesteraz 5 inhibitörü tadalafil, Li ve arkadaşlarının 45 dakikalık unilateral renal iskemi sonrası 11 gün boyunca 1–3 mg/kg/gün oral verildiğı murin İ/R modelinde aşırı mezangial proliferasyon ve ekstrasellüler matriks birikimini azaltarak yapısal hasarı ve glomerüler filtrasyon fonksiyonunu iyileştirmiş; bu renoprotektif etkinin Akt/NF- κ B sinyal yolunun inhibisyonu ile ilişkili olduğı gösterilmiştir(81). Önceki rat İ/R çalışmalarında tek doz intraperitoneal veya oral tadalafil, MDA'yı azaltıp total antioksidan kapasiteyi artırmış, tübüler nekroz, nötrofil infiltrasyonu, Apaf-1, iNOS, eNOS, kaspaz-3 ekspresyonunu azaltarak histolojik skoru iyileştirmiştir(82). Bir başka PDE5 inhibitörü sildenafil için de benzer protokollerde MDA, MPO, iNOS mRNA, p53 ve eNOS düzeylerini baskılayarak nefroprotektif etki bildirmiştir(82).

Klinik pratikte yaygın kullanılan ilaçlardan SGLT2 inhibitörü dapagliflozin, Zhu ve arkadaşlarının bilateral 30 dakikalık İ/R içeren rat çalışmasında 1 mg/kg

oral dozda NGAL, KIM-1, kreatinin, BUN, IL-6, TNF- α ve MDA'yı anlamlı azaltırken SOD ve GSH-Px'i artırmış; PI3K/Akt aktivasyonu ve BMP4 üzerinden apoptozu baskılayıp otofajiyi uyararak fonksiyonel ve histolojik iyileşme sağlamıştır(83). ACE inhibitörü trandolapril, Jallawee ve arkadaşlarının bilateral 30 dakikalık iskemi-24 saat reperfüzyon modelinde 0,3 mg/kg oral ön tedaviyle serum kreatinin/üreyi, renal IL-6, KIM-1 ve kaspaz-3 düzeylerini düşürmüş; GSH, LC3 ve Akt'ı yükselterek oksidatif stres, inflamasyon ve apoptozu azaltırken otofaji yolunu aktive etmiştir(84). Modafinil, Asli ve arkadaşlarının bilateral 45 dakikalık iskemi-24 saat reperfüzyonu içeren Wistar ratlarında 50–100 mg/kg dozlarda glomerüler, vasküler ve interstisyel hasarı hafifletmiş; TNF- α , IL-18, LDH, kreatinin, üre, NGAL düzeylerini düşürüp SOD ve katalazı artırarak belirgin renoprotektif etki sağlamıştır(85). Sonuç olarak çok sayıda farmakolojik girişim, iyi tanımlanmış renal İ/R modellerinde benzer panele sahip biyokimyasal, moleküler ve histolojik parametreler üzerinden güçlü antioksidan, anti-inflamatuar, anti-apoptotik ve antifibrotik etkiler göstermektedir.

2.5 Mannitol

Mannitol, glomerüllerden serbestçe filtre edilen ve tübüllerden minimal reabsorbe edilen bir osmotik diüretiktir. Hücre içinden su çekerek ekstrasellüler volümü artırır, kan viskozitesini azaltır; renal kan akımını artırır, renin salınımını inhibe eder ve serbest radikal süpürücü etkisiyle tübüler lümeni yıkayarak obstrüktif silendirleri ve nefrotoksinleri dilüe eder, teorik olarak renal İ/R hasarını sınırladığı bildirilmiştir(86). Bazı deneysel İ/R modellerinde mannitol, artmış renal

kan akım, oksidatif stresin azalması ve tübüler nekrozun hafiflemesi yoluyla akut tübüler hasara karşı koruyucu etki göstermiştir(77, 86, 87). Ancak klinik çalışmalarda elde edilen sonuçlar çelişkilidir. Yüksek ABH riski taşıyan erişkinlerde intravasküler mannitol + hidrasyon ile yalnızca hidrasyonun karşılaştırıldığı randomize kontrollü çalışmaların sistematik derleme-metaanalizinde (9 çalışma, 626 hasta) mannitolün serum kreatininini azaltmadığı, genel ABH insidansında hidrasyona ek bir yarar sağlamadığı, kontrast alan hastalarda kontrast nefropatisi riskini olumsuz etkilediği; yalnızca 1980'lerden kalma sınırlı verilerde kadaverik böbrek nakli alıcılarında akut böbrek yetmezliği ve diyaliz ihtiyacını azaltabileceği bildirilmektedir(77, 88). 22 çalışmayı içeren daha güncel bir sistematik derlemede mannitolün aort cerrahisi, kardiyopulmoner bypass veya parsiyel nefrektomi gibi girişimlerde kanıta dayalı bir renoprotektif ajan olarak önerilemeyeceği vurgulanmıştır(4). Akut böbrek hasarında mannitol uygulamasını inceleyen meta-analizler ve klinik veriler, özellikle inme gibi durumlarda yoğun ve tekrarlayan mannitol tedavisinin ABH riskini anlamlı derecede artırabildiğini göstermektedir(89-91). Buna karşın suprarrenal aort klemplenmesi sırasında önceden KBH bulunan hastalarda mannitol kullanımının postoperatif diyaliz ihtiyacını azaltabildiği, yani seçilmiş İ/R durumlarında ve belirli alt gruplarda olası renoprotektif etkiler gösterebileceği bildirilmiştir(92, 93). Tüm bu veriler ışığında, mannitolün renal İ/R hasarını önlemedeki olası etkileri; hemodilüsyon ve kan vizkozitesinin azalmasına bağlı renal kan akımı artışı, tübül hücre şişmesini azaltarak filtrasyon yüzeyinin korunması, serbest radikal süpürücü etkisiyle oksidatif stres ve endotelial disfonksiyonun azaltılması ve lümen

yıkaması ile silendir/nefrotoksin temizliğine dayanmakla birlikte, klinik ABH ve İ/R modellerinde bu mekanizmaların tutarlı ve güçlü bir şekilde klinik sonuçlanımlara yansımadağı, hatta kontrast nefropatisi veya nörolojik hastalarda ABH riskini artırabildiğı için güncel kanıtların mannitolü rutin renoprotektif ajan olarak desteklemediğı görölmektedir(4, 77, 88, 89, 94)

2.6 Mirabegron

Mirabegron, selektif bir β_3 -adrenerjik reseptör agonistidir, üroloji kliniğinde aşırı aktif mesane(AAM) tedavisinde detrüsor düz kasındaki β_3 reseptörleri aktive ederek mesane kompliyans ve kapasitesini artırır, noktüri, pollaküri ve urgency ataklarını azaltır(95). Renal İ/R bağlamında kullanılma gerekçesi, böbrek ve vasküler dokuda eksprese edilen β_3 reseptörleri üzerinden cAMP artışı, anti-inflamatuar ve anti-apoptotik yolların aktive edilerek akut böbrek hasarının sınırlandırılabilceğı hipotezidir(96, 97). Bilateral renal İ/R rat modelinde cerrahi indüksiyondan önce iki gün boyunca 30 mg/kg oral mirabegron verilen çalışmada, mirabegronun serum kreatinin ve BUN düzeylerini, KIM-1, MCP-1, TNF- α gibi hasar ve inflamasyon belirteçlerini, GSK-3 β ve NF- κ B p65 aktivitesini azalttığı; IL-10, cAMP ve pCREB düzeylerini artırarak böbrek disfonksiyonunu, histolojik tübüler hasarı, inflamasyonu ve apoptozu anlamlı ölçüde hafiflettiğı gösterilmiştir. Bu renoprotektif etkilerinin cAMP/pCREB ve GSK-3 β /NF- κ B p65 sinyal yollarının modülasyonu ile ilişkili olduğı belirtilmiştir(7). Başka bir modelde HgCl-indüklenmiş ABH'de mirabegronun β_3 -reseptör aracılı olarak NF- κ B p65, iNOS ve proinflamatuvar sitokinleri

baskıladığı, M1/M2 makrofaj polarizasyonunu inhibe ettiği, oksidatif stresi azalttığı, erken (NGAL, KIM-1, sistatin-C) ve geç (kreatinin, BUN) böbrek hasarı belirteçlerini iyileştirdiği bildirilmiştir(98). AAM'de yaygın kullanımının yanı sıra β 3-reseptör uyarımının NO-bağımlı ve bağımsız cGMP artışı, RhoA/Rho-kinaz yolunun inhibisyonu ve vazodilatasyon/anjiyogenez üzerinden erektil ve kadın cinsel fonksiyonlarında potansiyel yararlı etkiler sağlayabildiği, ayrıca direnç damarlarında ve aortada cGMP aracılı vazorelaksasyon oluşturduğu gösterilmiştir(99-103). Bu veriler mirabegronun vazodilatasyon, anjiyogenez ve anti-apoptotik mekanizmalar yoluyla hipoksi ilişkili doku hasarını modüle edebileceğini düşündürmektedir.

2.7 Biyokimyasal Parametreler

2.7.1 HIF 1 alfa ve VEGF

Hipoksinin dokuda oksidatif stresi artırarak HIF-1 α ilişkili anjiyogenez yollarını aktive ettiği bilinmektedir(104). Bu yolda birçok mediatör ve ara eleman rol oynamaktadır. İ/R hasarını azaltmak için üzerinde çalışılan farmakolojik ajanlar bu yoldaki ara basamakları hedeflemektedir. Doku hipoksisinde, ayrıntılı hücre içi oksijen sensör proteinleri, protein hidroksilaz alanı içeren proteinler (PHD) 1-3 ve HIF-1 ve 2 hücrel oksijen içeriğini analiz eder ve eksik oksijen kaynağına karşı koymak için bir yanıt indükler(105). HIF'in artışı sadece PHD'ler tarafından değil, normoksik koşullarda bile NO tarafından da kontrol edilir. NO, gen transkripsiyonu ve translasyonundan bağımsız olarak degradasyonunu

önleyerek HIF-1 α proteininin birikimini etkiler. VEGF, endotelial hüce hipoksisi sırasında HIF-1 α bağımlı bir şekilde indüklenir, HIF-1 α ve 2 α anjiyogeneze farklı roller üstlendikleri için birbirlerinin yerine kullanılamazlar(106). HIF-1 α hipoksiye adaptasyonda rol oynayan çeşitli genlerin ekspresyonuna yol açtığı için hipoksiye karşı hücre yanıtının ana düzenleyicisidir(107). HIF, oksijenle düzenlenen bir alfa alt birimi ve yapısal olarak eksprese edilmiş bir beta alt birimi içeren bir heterodimerik proteindir. Alfa alt birimleri, normoksi sırasında, iki prolin kalıntısının PHD'ler tarafından hidroksilasyonundan sonra esas olarak proteazoma bağımlı bir yol aracılığıyla parçalanır. Hipoksi sırasında, PHD'ler inhibe edilir ve HIF-1 α alt birimi birikir, HIF-1 β ile dimerize olur ve VEGF veya eritropoietin (EPO) gibi anjiyogeneze ve doku onarımında rol oynayan genleri içeren HIF hedef genlerinin ekspresyonunu artırır(106, 108). İ/R hasarının önlenmesindeki anahtar mekanizma, hücre içi bir transkripsiyon proteini olan HIF'in upregülasyonu gibi görünmektedir. HIF metabolik adaptasyona, anjiyogeneze, eritropoeze, hücre büyümesine, hayatta kalmaya ve apoptoza aracılık eder. İskemik önkoşullama (IPC) veya hipoksiyi simüle eden ilaçlar (hipoksi-mimetikler) yoluyla HIF-1 α 'nın upregüle edilmesi, İ/R hasarını azaltmaya yönelik bir yöntem olarak araştırılmıştır. HIF'nin İ/R modellerinde iskemik hasara ve toksik nefropatlere karşı nefron koruyucu rolü daha önce açıklanmıştır(105, 109). Ayrıca, böbrek nakli modellerinde demir şelatörleri gibi PHD inhibitörlerinin kullanılması, HIF indüksiyonunun tübüler hücreleri iskemik hasardan koruduğunu göstermektedir(109). Bu araştırmalar HIF-1'in iskemi öncesinde veya sırasında stabilizasyonda rolünü kanıtlamaktadır.

VEGF, her türlü kan damarının fizyolojik ve patolojik olarak büyümesini anjiogenik ve vaskulojenik süreçler aracılığı ile düzenler. Proteolitik enzimlerin (matriks metalloproteinaz, plazminojen aktivatörü) sekresyonu ve aktivasyonu, ekstrasellüler matriksin yıkımının indüklenmesi, endotel hücrelerin göçü ve proliferasyonu, damar yapısının organizasyonu gibi anjiogenezin her aşamasında rol oynadığı bilinmektedir(110). Hipoksida düşük oksijen basıncına maruz kalmakla üretilen HIF-1, VEGF geninin promoter bölgesinde HIF-1'i bağlayan yere bağlanarak VEGF mRNA'nın transkripsiyon hızını ve VEGF üretimini uyarır. VEGF-A,VEGF-Ailesinde anjiogenez sürecinde birinci derecede önemli olan moleküldür(111).

2.7.2 Kaveolin-1

Kaveoller endotelyal, düz kas, epitel hücreleri ve fibroblast gibi çeşitli hücrelerin plazma membranlarında lipid yığınlarının bir alt kümesi olarak bulunmuştur. Kaveoller transitoz, endositoz, hücre çoğalmasının düzenlenmesi, diferansiyasyon ve apoptoziste rol almaktadır(112). Kaveol proteinin yapı taşı olan kaveolinler 3 izoformda bulunmaktadır. Kaveolin-1'in birçok kas dışı hücre tipinde en çok da endotelyal hücrelerde bulunduğu rapor edilmektedir(113). Kaveola ve kaveolinler, makromoleküllerin hareketi, sinyal iletim moleküllerinin organizasyonu ve doku onarımında yer alan büyüme faktörleri ve bunların reseptörleri gibi moleküllerle etkileşimi içeren çeşitli temel hücresel fonksiyonlara sahiptir(114). İskemik böbrek hasarında Kaveolin-1'in değişen ekspresyon paternleri gösterilmiştir. Özellikle, hasarlı proksimal tübüler epitelde artmış

ekspresyon ve yoğun noktasal membran ve sitoplazmik ekspresyon gösterilmiştir(115). Apoptoz veya nekroz nedeniyle adezyon özelliğini kaybeden veya ölen yaralı hücrelerde yoğun Kaveolin-1 ekspresyonu bulunmuştur. Renal tübüler epitelyal ve vasküler endotelial kültürleri kullanan in vitro model çalışma, iskemi-reperfüzyona göre modellenen başlatıcıların neden olduğu hasarın, membrana bağlı Kaveolin-1 proteininin sitoplazmaya translokasyonu ile bağlantılı olduğunu göstermiştir(115). Bu çalışmaların sonucunda Kaveola ve Kaveolin-1'in, renal hücre hasarını azaltmak için hedeflenecek reseptörler olabileceği düşünülmüştür. İ/R hasarında Kaveolin-1 miktarının dokuları korumak için arttığı belirtilmektedir(116). Kaveolin-1 amin grubu (NH₂) içeren iskele bölgesi, fosfokinaz C (PKC) ve endotelial NO sentaz (eNOS) gibi proteinlerle etkileşime girer. PKC, eNOS'u inhibe eder böylece endotel hücrelerinden salınan NO miktarı azalır. Bundan dolayı Kaveolin-1 gibi PKC'yi inhibe eden maddeler süperoksit üretimini inhibe etmek ve endotel hücrelerinden NO salınımını artırmak eğilimindedir(113).

2.7.3 KIM-1

KIM-1, proksimal renal tübüler epitelin apikal yüzeyinde lokalize olan ve hasarlı epitelde yüksek düzeyde eksprese edilen bir transmembran glikoproteindir. Proksimal renal tübüler epitel, böbreğin iskemiye en duyarlı kısmıdır. Artmış KIM-1 seviyesi, tübüler hasarın şiddeti ile ilişkilidir. Daha önce yapılmış hayvan deneyleri ve insan çalışmalarında KIM-1 seviyesinin İ/R hasarını gösteren bir belirteç olduğu gösterilmiştir(117-119). KIM-1'in en erken ve en belirgin artışı

idrarda görülmüş, üriner KIM-1 serum kreatinin ve diğer klasik belirteçlerden çok önce ve çok daha yüksek kat artışlarıyla tübüler hasarı göstermiştir(120, 121). Klinik ve meta-analiz verileri de KIM-1'in özellikle idrarda ölçümünün akut tübüler hasarın erken ve duyarlı bir göstergesi olduğunu, serum KIM-1'in yararlı olmakla birlikte tanısal performansının üriner düzeylere benzer veya daha düşük olduğunu desteklemektedir(122, 123).

2.7.4 TIMP

TIMP-1, MMP'leri inhibe ederek ekstraselüler matriks döngüsünü ve doku yeniden şekillenmesini düzenler; ayrıca MMP'den bağımsız, büyüme faktörü–benzeri ve hücre adezyonuna bağlı sinyal yolları üzerinden hücre büyümesi ve apoptozu modüle eden sitokin-benzeri etkiler gösterir (124).

TIMP-2, ABH'ye yol açan bir öncül durumu gösteren, ABH'nin anahtar mekanizması olarak kabul edilen G1 hücre döngüsü durmasının biyobelirteçlerdendir(125, 126). ABH, hücresel ve moleküler yollardaki inflamasyon, oksidatif stres ve apoptoz mekanizmalarıyla ilişkilidir(127). TIMP-2 bu mekanizmalara katılabilir ve böbreğin erken hasarını yansıtabilir(128). TIMP-2'nin hasarlı tübüler epiteli işaretleyebildiğini ve septik ve iskemik hasar durumunda böbrek stresi için uyarı veren sinyaller gönderebildiğini gösteren kanıtlar vardır(129).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nden (GÜDAM) 200-250 gram arasında değişen yaklaşık 12 haftalık Wistar-Albino ırka sahip 42 adet erkek rat ile gerçekleştirilmiştir. Bu deneysel çalışma için Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (HADYEK) onay alınmıştır (Karar no: GÜ.ET-24.110). Tüm prosedürler "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" ve Gazi Üniversitesi deney hayvanları kullanım kılavuzuna uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

3.1 Deney Grupları

Çalışmada örneklem büyüklüğü G*Power 3.1.9.7 programı kullanılarak yapılan güç analizi ile hesaplanmıştır. Tek yönlü ANOVA için sabit etkiler modeli kullanılarak, etki büyüklüğü $f = 0.8$, %95 güç ve %5 hata payı $\alpha = 0.05$ ile yapılan hesaplamada, 7 grup için gerekli minimum örneklem büyüklüğü 42 olarak bulunmuştur. Her grup için $n=6$ olmak üzere ratlar rastgele GÜDAM veteriner hekimi tarafından bilgisayar tabanlı rastgeleleştirme ile 7 gruba ayrılmıştır. Biyokimyasal ve histopatolojik analizler, gruplardan habersiz araştırmacılar tarafından değerlendirildi.

Grup 1 (Sham Grubu, $n=6$); İ/R prosedürleri olmadan cerrahi insizyon ve kapama işlemleri uygulandı.

Grup 2 (İ/R Grubu, $n=6$); sağ renal pedikül 30 dakika boyunca bulldog damar klempleri ile oklüde edildi ve ardından 24 saat boyunca reperfüzyon

sağlandı(130). Rata uygulanan ventral linea alba kesisi ile karına girildi. Makas ve pens kullanılarak künt diseksiyonla kesiden cilt ve deri altı katmanları ayrıldı. Sağ böbrek steril çubuklarla kesiden dışarı itilerek sağ böbrek pedikülü açığa çıkartıldı. Böbrek üst ve alt kutuplarını çevreleyen dokulardan dikkatlice ayrıldı. Sağ böbreğin pedikülü, arteri ve veni bulldog klemp ile klemlendi. Tam iskemi, böbreğin birkaç saniye içinde kırmızıdan mora renk değişikliği ile teyit edildi. İskemiden sonra 30.dakikada vasküler klemp çıkartılarak reperfüzyon başlatıldı. Böbrek renginin kırmızıya dönmesi reperfüzyon göstergesi olarak kabul edildi. Nefrektomi uygulanarak alınan sağ böbrek uzunlamasına ikiye ayrıldı, yarısı biyokimyasal parametrelerin tayini için, diğer yarısı histopatolojik inceleme amacıyla kullanıldı.

Grup 3 (Mannitol Grubu, n=6); Mannitol (bir kez / tek uygulama) lateral kuyruk veninden intravenöz yolla bolus şekilde 1 mL %20 lik dozda(77) verildi. Uygulamadan önce ratların kuyrukları 40-45 ° C'lik sıcak suyla ısıtılarak venöz dilatasyon sağlandı, kuyruk veni tespit edildikten sonra 26 G numaralı kanül kullanılarak 45 derecelik açı ile kuyruk venine girilip tek seferde verildi.

Grup 4 (Mirabegron Grubu, n=6); Mirabegron (bir kez / tek uygulama) ratlara oral gavaj yoluyla 10 mg/kg dozda çeşme suyuyla taze olarak hazırlanarak verildi(131). Ratlar 24. Saat sonunda sakrifiye edildi, kan, idrar ve doku örnekleri toplandı.

Grup 5 (İ/R + Mannitol Grubu, n=6); Rutin klinik uygulamayı taklit edecek şekilde iskemiden 15 dakika önce %20 lik Mannitol, kuyruk veninden 1 mL dozda lateral kuyruk venlerinden intravenöz yolla bolus olarak verildi(130).

Sonrasında İ/R modeli oluşturma basamakları grup 2 ye uygulandığı şekilde uygulandı.

Grup 6 (İ/R + Mirabegron Grubu, n=6); İ/R prosedüründen 4 saat öncesinde(132, 133) 10 mg/kg mirabegron oral gavaj yoluyla verildi ve sonrasında İ/R modeli oluşturma basamakları grup 2 ye uygulandığı şekilde uygulandı.

Grup 7 (İ/R + Mannitol +Mirabegron Grubu, n=6); İ/R prosedüründen 4 saat öncesinde 10 mg/kg mirabegron oral gavaj yoluyla, %20 lik Mannitol 1 mL dozda iskemiden 15 dakika önce lateral kuyruk veninden intravenöz yolla bolus şekilde verildi ve sonrasında İ/R modeli oluşturma basamakları grup 2 ye uygulandığı şekilde uygulandı.

3.2 Cerrahi Prosedür ve İ/R Modeli Oluşturulması

Deney öncesinde, ratlara 50 mg/kg dozunda Ketamin (Ketalar® % 10, Pfizer) ve 5 mg/kg dozunda Xylasin (Rompun®, Bayer) intraperitoneal yolla verilerek anestezi sağlandı. Hayvanlar sırt üstü yatırıldıktan sonra karın bölgesi tıraş edildi ve %10'luk povidone-iodine (Batidex®, Toseal) solüsyonu ile dezenfekte edildi.

Sol böbrek pedikülü gonadal ve adrenal vasküler yapılarla ilişkili olduğundan komplikasyon ve etkilenimi azaltmak için iskemi reperfüzyon modelinde sağ böbrek tercih edildi. Cerrahi işlem tek bir operatör tarafından uygulandı. Orta hat laparotomi ile abdominal alana erişilip sağ böbreğe ulaşıldı ve hilus/pedikül izole edildi. İskemi uygulanan gruplarda 30 dakika süreyle bulldog damar klempleri yardımı ile iskemi gerçekleştirildi. İskemi esnasında, karın içi

organlar ısıtılmış % 0,9'luk steril salin solüsyonu ile nemlendirildi ve batın geçici olarak kapatıldı. İskemi süresinin (30 dk) tamamlanmasının ardından klempler dikkatlice çıkarıldı ve reperfüzyon aşamasına geçildi. Sağ böbreğin renginin normale döndüğü, kan akışının tekrar sağlandığı 1-2 dakika gözlemlenerek doğrulandı. Anestezi seviyesi bu süreç boyunca sürekli olarak izlendi. Ardından karın cildi primer olarak kapatıldı. Sütürlerin cilt yüzeyinde kalacak ucu ratların kemiremeyeceği kadar kısa bırakılarak kesildi. 24 saat sonra reperfüzyon fazı tamamlanınca sakrifikasyona geçildi.



Şekil 1. İskemi Reperfüzyon Modeli Aşamaları

- Normal görümlü böbrek dokusu, vasküler klem yerleştirilme aşaması (İskemi başlangıcı)
- İskeminin 30.dakikasında böbrek dokusu rengi koyulaşmış (İskemi fazı)
- Vasküler klempin çıkartılması ile reperfüzyon başlamış, kanlanmaya başlayan alanlar ile koyu renkli alan arasında demarkasyon hattı görünmektedir. (Reperfüzyon fazı)

3.3 Mannitol Hazırlanması ve Uygulanması

Mannitol uygulamaları için ticari serum şeklinde hazırlanmış %20'lik mannitolün 100 cc suda intravenöz infüzyon çözeltisi temin edildi. Mannitol 1 mL dozda iskemiden 15 dakika önce lateral kuyruk veninden intravenöz yolla bolus şekilde verildi(130).

3.4 Mirabegron Hazırlanması ve Uygulanması

Mirabegron Sigma marka (CAS Numarası: 223673-61-8, SML2480) saf etken madde halinde temin edilmiştir. İ/R prosedüründen 4 saat öncesinde ratların tek seferde içebileceği sıvı miktarı olan 0.5 cc çeşme suyu içinde 10 mg/kg mirabegronun çözünmesi sağlandı ve oral gavaj ile verildi(131).

3.5 İdrar, Serum ve Doku Örneklerinin Eldesi

Ratlar gruplarına göre cerrahi prosedür uygulanması, ilaç verilmesi ve/veya İ/R prosedürlerinden sonra tek tek metabolik kafeslere alınarak barındırıldı ve 24 saat boyunca genel durumları izlendi.

Bu süreçte metabolik kafeste 24 saatlik idrarları toplanarak idrar hacimleri kayıt altına alındı. 24 saatlik idrar total protein ve kreatinin düzeyleri aynı gün Roche Cobas c703 biyokimya otoanalizöründe standart laboratuvar yöntemlerle ölçüldü. Kalan idrarlar porsiyonlanarak -80°C de çalışma gününe kadar saklandı.

24 saatin sonunda, ksilazin (5 mg/kg) kas içi yolla ve ketamin (45 mg/kg) kas içi yolla olacak şekilde derin anestezide intrakardiyak yoldan sağ atriuma 21G enjektör ile girilerek 6-7 ml kan örnekleme gerçekleştirilerek hayvanlar feda

edildi, kanlar sarı kapaklı jelli kan alma tüplerine konuldu, 3000 rpm de 10 dk santrifüj edildi.

Ayrılan serumlardan aynı gün Roche Cobas c703 biyokimya otoanalizöründe standart laboratuvar yöntemlerle serum BUN ve kreatinin düzeyi ölçüldü. Kalan serumlar porsiyonlanarak -80°C de çalışma gününe kadar saklandı.

Histopatolojik ve biyokimyasal doku analizleri için sağ böbrek çıkartıldı. Alınan böbrek doku örnekleri uzunlamasına ikiye bölündü; bir yarısı immünhistokimya boyamaları için %10'luk paraformaldehit içinde 24 saat boyunca sabitlendi, diğer yarısı ise hızlıca sıvı azota atılarak donduruldu, diğer biyokimyasal parametrelerin çalışılma zamanına kadar derin dondurucuda -80°C'de saklandı.



Şekil 2. Sakrifikasyon sonrası ratlardan elde edilen normal görünümde (üstteki) ve iskemik görünümde (alttaki) uzunlamasına ikiye ayrılmış böbrek dokuları

3.6 24 Saatlik İdrarda Protein Düzeyinin Ölçüm Prensibi

İdrar protein düzeyi kolorimetrik yöntem ile belirlendi. Bu yöntemde proteinler, asidik ortamda kompleks oluşturuca boya (pirogallol kırmızısı) ile reaksiyona girerek renkli bir kompleks oluşturur. Oluşan renk yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçülür ve örnekteki toplam protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Sonuçlar 24 saatlik idrar hacmine (dl) oranlanarak mg/gün olarak verildi.

3.7 Rat İdrar ve Serum Kreatinin Ölçüm Prensibi

Serum ve 24 saatlik idrar kreatinin düzeyi, tam otomatik biyokimya analizöründe kinetik Jaffe yöntemi kullanılarak belirlendi. Bu yöntemde kreatinin, alkali ortamda pikrik asit ile reaksiyona girerek turuncu-kırmızı renkli bir kreatinin-pikrat kompleksi oluşturur. Oluşan renkli kompleksin absorbansı belirli bir dalga boyunda (genellikle 500–520 nm aralığında) spektrofotometrik olarak ölçülür. Reaksiyonun kinetik olarak izlenmesi, özgüllüğü artırmak amacıyla interferans oluşturan maddelerin etkisini azaltmaya yöneliktir. Ölçülen absorbans değişimi, örnekteki kreatinin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Serum kreatinin değerleri mg/dl, idrar kreatinin düzeyi 24 saatlik idrar hacmine (dl) oranlanarak mg/gün olarak verildi.

3.8 Rat Serum BUN Ölçüm Prensibi

Serum üre düzeyleri, enzimatik ultraviyole yöntemi ile belirlendi. Bu yöntemde üre, üreaz enzimi tarafından amonyak ve karbondioksit hidrolize edilir.

Açığa çıkan amonyak, glutamat dehidrogenaz (GLDH) enzimi varlığında α -ketoglutarat ile reaksiyona girerek glutamat oluşturur. Bu reaksiyon sırasında NADH, NAD⁺'a oksitlenir. NADH'nin azalması, 340 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. Absorbans değişimi, örnekteki üre konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Serum üre değerleri 2.14 e bölünerek BUN seviyeleri hesaplanmıştır, sonuçlar mg/dl olarak verilmiştir (Üre (mg/dL)=BUN×2.14).

3.9 Kreatinin Klirensi Hesaplanması

Böbrek fonksiyonunun değerlendirilmesinde glomerüler filtrasyon ve tübüler klirens göstergeleri olarak glomerüler filtrasyon hızı (mGFR) ve kreatinin klirensi (ACLARA) parametreleri kullanılmıştır. ACLARA hesaplanırken 24 saatlik idrar kreatinin konsantrasyonu, idrar hacmi, serum kreatinin düzeyi ve hayvan vücut ağırlığı dikkate alınmıştır (32). ACLARA, kreatininin böbreklerden atılım hızını gösteren bir indeks olarak değerlendirilmiş ve aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{ACLARA (eCrCL)} = \frac{\text{İdrar Kreatinini} \times 24 \text{ saatlik idrar hacmi}}{\text{Plazma Kreatinini} \times \text{Vücut ağırlığı}}$$

mGFR ise serum kreatinin düzeyine dayalı uygun hesaplama formülü kullanılarak elde edilmiş ve böbreğin filtrasyon kapasitesini dolaylı olarak yansıtan bir parametre olarak değerlendirilmiştir.

$$\text{mGFR} = \frac{\text{İdrar Kreatinini} \times 24 \text{ saatlik idrar hacmi}}{\text{Plazma Kreatinini} \times 1440}$$

3.10 Rat İdrar ve Serum KIM-1, Böbrek Dokusunda HIF-1 α , VEGF-A, Kaveolin-1, TIMP-1 ve TIMP-2 Düzeylerinin Belirlenmesi

Serumda ve 24 saatlik idrarda KIM-1 düzeyini belirlemek için sandviç ELİSA metodu ile ölçüm yapan BT Lab marka (Shanghai, China, E0549Ra) ticari kit kullanıldı.

Böbrek dokuları çalışılacağı zaman dondurucudan çıkarılıp 1/10 oranında (100 mg doku, 900 mikrolitre PBS) fosfat buffer salin (PBS) ile homojenize edildi, kullanılan ticari kitin önerileri doğrultusunda santrifüj edilerek doku homojenatının süpernatantından sandviç ELİSA metodu ile ticari kit kullanılarak ölçüldü. HIF-1 α (BT Lab, Shanghai, China, E0210Ra), VEGF-A (Elabscience, Texas, USA, E-EL-R2603), Kaveolin-1 (BT Lab, Shanghai, China, E0354Ra), TIMP-1 (BT Lab, Shanghai, China, E0322Ra) ve TIMP-2 (BT Lab, Shanghai, China, E0323Ra) eliza kitleri için çalışma içi ve günler arası CV <%10 idi. Sonuçlar doku protein düzeyine oranlanarak mg protein başına verildi.

Sandviç elisa yönteminde ölçülecek antijeni (KIM-1, HIF-1 α , VEGF-A, Kaveolin-1, TIMP-1 ve TIMP-2) sandviçlemek için iki spesifik antikor kullanılır; bunlar genellikle eşleşmiş antikor çiftleri olarak adlandırılır. Ticari kitte yakalama antikoru ile çoklu kuyucuklu mikrolakada kaplanmıştır. Mikrolakada ilgili kuyucuklara ölçüm yapılacak örnekler, kalibratör ve iç kalite kontrol numuneleri eklenir ve ölçülecek proteinin/antijenin bağlanması için inkübe edilir. Daha sonra biyotin ile konjuge bir tespit antikoru eklenir ve bu ikinci antikor hedef protein üzerindeki ek bir epitopa bağlanır. Streptavidin-HRP ile biyotin birleşerek immün kompleks oluşumu sağlanmış olur. İnkübasyon ve yıkama sonrasında bağlanmamış

enzimler uzaklaştırılır. Üzerine enzimin substratı pipetlenir ve örnekte bulunan analit miktarıyla orantılı bir renk üretilir. Reaksiyonu durdurmak için asitli bir solüsyon eklenir. Standart ve numunelere ait absorbanslar reaksiyon sonunda oluşan renge göre uygun dalga boyunda ölçülür. Standart konsantrasyonları ve absorbans değerleri ile çizilen standart eğrisinden elde edilen formül kullanılarak çalışma örneklerinin hormon/antijen konsantrasyonları hesaplanır.

3.11 Doku Protein Düzeyi Ölçümü

Biyokimyasal parametreleri ölçtüğümüz doku süpernatantından Bradford yöntemi ile total protein düzeyi ölçüldü (Otto Scientific, Ankara, Türkiye, Otto3057)(134). Bradford protein konsantrasyonunun hızlı, hassas ve pratik bir şekilde belirlenmesini sağlayan spektrofotometrik bir analiz tekniğidir. Bu yöntem Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlere bağlanması sonucu meydana gelen renk değişimine dayanır. Asidik ortamda kırmızı-kahverengi formda bulunan boya, proteinlerle etkileşime girdiğinde mavi renge dönüşür ve bu dönüşüm 595 nm dalga boyunda ölçülür. Elde edilen absorbans değeri, standart protein çözeltileri kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırılarak örnekteki protein miktarı hesaplanır. Dokulardaki protein düzeyi mg protein/ml olarak hesaplanmış, dokuda çalışılan parametreler bu sonuca oranlanarak verilmiştir.

3.12 Histopatolojik Değerlendirme

Rat nefrektomi materyalleri öncelikle %10'luk formaldehit solüsyonunda fikse edilmiş, tamamı örneklenmiş, klasik doku takip prosedürlerinden geçirilmiş,

parafine gömülmüş ve 4 mikrometre kalınlığındaki kesitler alınarak hematoxilen & eozin boyalı preparatlar hazırlanmıştır. Bu preparatlar tek bir patolog tarafından incelenerek yeterlilikleri değerlendirilmiş ve tüm dokular yeterli bulunmuştur. Tübüler zedelenme için tübül fırçamsı kenarında kayıp, apoptotik hücre varlığı, tübüler silendir formasyonu varlığı, tübül epitel hücrelerinde nekroz varlığı değerlendirilmiştir. 0= Yok, 1= <%10 tübül, 2= %10-50 tübül, 3= >%50 tübül olarak skorlanmıştır. Sonrasında formalin ile fikse, parafine gömülü bu dokulara ait 4 mikrometre kalınlığındaki kesitler pozitif şarjlı lamlara alınmıştır. TIMP-1 (Genetex, Rabbit Poliklonal, 1:200 dilüsyon), TIMP-2 (Proteintech, Rabbit Poliklonal, 1:200 dilüsyon), Kaveolin-1 (Proteintech, Rabbit Poliklonal, 1:200 dilüsyon) ekspresyonunu belirlemek için, Ultraview Universal DAB Detection Kit kullanılarak streptacidin-biyotin üçlü indirekt immünoperoksidaz ile otomatik immünohistokimyasal boyama yöntemiyle Ventana Benchmark XT cihazında boyama yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak TIMP-1 ve TIMP-2 için kolon adenokarsinom, Kaveolin-1 için düz kas dokusu kullanılmıştır. Değerlendirme yapılırken hücrelerin sitoplazmik olarak pozitif olması dikkate alınmıştır. Tüm immünohistokimyasal belirteçlerin yaygınlığı ve şiddeti değerlendirilmiştir.

Ekspresyon yaygınlığı için skollama:

0= Yok, 1= <%10 tübül, 2= %10-50 tübül, 3= >%50 tübül.

Ekspresyon şiddeti için skollama:

0= negatif, 1= Zayıf, 2= Orta, 3= Şiddetli(135)

3.13 İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler IBM SPSS Statistics (sürüm 28.0, IBM Corp., Armonk, NY, ABD) programı kullanılarak gerçekleştirildi. Tek yönlü ANOVA için sabit etkiler modeli kullanılarak, etki büyüklüğü $f = 0.8$, %95 güç ve %5 hata payı $\alpha = 0.05$ ile yapılan hesaplamada, 7 grup için gerekli minimum örneklem büyüklüğü 42 olarak bulunmuştur. Değişkenlerin dağılım özellikleri, grup başına düşük örneklem sayısı ($n=6$) nedeniyle Shapiro–Wilk testi ile değerlendirildi. Çoğu parametre normal dağılım göstermediğinden, parametrik olmayan yöntemler tercih edildi. Gruplar arası karşılaştırmalar için Kruskal–Wallis testi uygulandı; anlamlı fark saptanan değişkenlerde ikili karşılaştırmalar Dunn-Bonferroni düzeltmeli post hoc analizle yapıldı. Sonuçlar ortanca, çeyrekler aralığı (IQR) ve minimum–maksimum değerler şeklinde sunuldu.

Histopatolojik veriler ordinal özellikte olduğundan, bu veriler de parametrik olmayan testlerle analiz edildi. Kruskal–Wallis testleri için etki büyüklüğü eta-kare (η^2), Mann–Whitney U testleri için sıralı biserial korelasyon katsayısı (r) ile hesaplandı.

4. BULGULAR

Çalışmada idrar, serum ve doku örneklerinden elde edilen biyokimyasal ve histopatolojik veriler Kruskal–Wallis testi ile analiz edilmiş, anlamlı fark saptanan değişkenler için Dunn-Bonferroni düzeltmeli post-hoc analiz uygulanmıştır, $0.05/21=0.002$ ve altındaki p değerleri anlamlı kabul edilmiştir. Tüm gruplarda $n=6$ 'dır. Tüm sonuçlar tablo 1,2 ve 3 de Ortanca (1. ve 3. çeyrek; Min: Minimum ve Max: Maksimum) olarak ifade edilmiştir.

Çalışmada gruplara ait 24 saatlik idrar hacimleri, total protein, total kreatinin ve idrar KIM-1 düzeylerine ilişkin tanımlayıcı istatistikler Tablo 1'de sunulmuştur. Gruplar arasında bu parametreler açısından yapılan Kruskal-Wallis testi analizinde, 24 saatlik idrar hacmi ($p=0,000$) ve idrar KIM-1 düzeyleri ($p=0,000$) bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. İdrar hacmi ortalanca değerleri incelendiğinde, Sham grubuna kıyasla İ/R ve tedavi gruplarında artış eğilimi gözlenmiş olup en yüksek ortalanca değer İ/R+Mannitol+Mirabegron grubunda olduğu görülmüştür. Benzer şekilde, idrar KIM-1 düzeylerinin İ/R grubunda arttığı, tedavi uygulanan gruplarda ise azalma eğilimi gösterdiği dikkati çekmiştir (Tablo 1).

Buna karşın, total protein ($p=0,113$) ve total kreatinin ($p=0,052$) düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Total kreatinin değerlerinde sınırda anlamlılık gözlenmesine rağmen, bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (Tablo 1).

24 saatlik idrar hacmi düzeylerinde saptanan genel farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığını belirlemek amacıyla yapılan Bonferroni düzeltmesi ile düzeltilmiş çoklu karşılaştırmalar sonucunda ise gruplar arası ikili karşılaştırmalarda Sham ve Mirabegron grubu arasında, İ/R ve Mirabegron grubu arasında, Mannitol ve Mirabegron grubu arasında, Mirabegron grubu ile İ/R+Mannitol, İ/R+Mirabegron ve İ/R+Mannitol +Mirabegron grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir (tüm karşılaştırmalarda $p<0,002$).

İdrar KIM-1 düzeylerinde saptanan genel farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığını belirlemek amacıyla yapılan Bonferroni düzeltmesi ile düzeltilmiş çoklu karşılaştırmalar sonucunda ise gruplar arası ikili karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmemiştir ($p>0,002$).

Tablo 1. 24 saatlik İdrar Hacmi, 24 saatlik İdrar Protein, Kreatinin ve KIM-1 düzeyleri

Grup		İdrar Hacmi ml/24saat	Total Protein mg/24saat	Total Kreatinin mg/24saat	İdrar KIM1 ng/24 saat
Sham	Ortanca	3,75	12,47	7,38	0,34
	Minimum	3,00	11,32	4,23	0,20
	Maksimum	5,25	15,55	10,88	0,67
	Çeyreklik	25	3,00	11,96	5,22
		75	5,06	13,36	10,28
İ/R	Ortanca	6,00	13,70	4,63	0,40
	Minimum	5,50	11,87	3,92	0,30
	Maksimum	6,50	15,07	6,14	0,60
	Çeyreklik	25	5,50	12,32	4,08
		75	6,12	14,93	5,49
Mannitol	Ortanca	7,50	12,93	6,37	0,26
	Minimum	7,00	10,64	4,38	0,20
	Maksimum	8,00	14,16	10,96	0,48
	Çeyreklik	25	7,00	11,88	5,33
		75	8,00	14,04	9,88
Mirabegron	Ortanca	11,00^{a,b,c}	17,51	7,33	0,20
	Minimum	11,00	14,52	6,47	0,14
	Maksimum	11,00	22,14	12,65	0,36
	Çeyreklik	25	11,00	14,68	6,57
		75	11,00	21,32	11,05
İ/R+Mannitol	Ortanca	10,00^d	14,73	8,14	0,26
	Minimum	9,00	12,50	6,10	0,12
	Maksimum	10,50	27,60	10,79	0,35
	Çeyreklik	25	9,37	12,79	6,75
		75	10,50	24,80	9,35
İ/R+Mirabegron	Ortanca	13,00^d	12,12	6,81	0,23
	Minimum	12,00	8,76	4,40	0,14
	Maksimum	15,00	20,93	11,56	0,30
	Çeyreklik	25	12,37	8,88	5,65
		75	15,00	20,30	8,57
İ/R+Mannitol+Mirabegron	Ortanca	18,50^d	14,40	7,59	0,12
	Minimum	17,00	10,20	5,76	0,08
	Maksimum	28,00	26,10	9,05	0,15
	Çeyreklik	25	17,37	10,66	6,92
		75	22,00	20,80	8,96

a: Sham grubu ile karşılaştırmada $p<0.002$

b:İ/R grubu ile karşılaştırmada $p<0.002$

c:Mannitol grubu ile karşılaştırmada <0.002

d: Mirabegron grubu ile karşılaştırmada <0.002

Çalışmada serum kreatinin, BUN, serum KIM-1, mGFR ve ACLARA parametrelerine ait tanımlayıcı istatistikler Tablo 2’de sunulmuştur. Gruplar arasında bu parametreler açısından yapılan Kruskal-Wallis testi analizinde; serum

kreatinin (p=0,585), BUN (p=0,688), serum KIM-1 (p=0,658), mGFR (p=0,737) ve ACLARA (p=0,735) değerleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p>0,05). Elde edilen bulgular, incelenen serum parametrelerinin çalışma grupları arasında benzer dağılım gösterdiğini ortaya koymaktadır (Tablo 2).

Tablo 2. Serum Kreatinin, BUN ve KIM-1 düzeyleri

Grup		Serum Kreatinin mg/dl	BUN mg/dl	Serum KIM1 ng/ml	mGFR ml/dk	ACLARA (eCrCL) ml/dk
Sham	Ortanca	0,49	21,50	2,20	0,95	0,61
	Minimum	0,45	17,8	1,65	0,62	0,51
	Maksimum	0,58	35,4	4,38	1,69	0,73
	Çeyreklik 25	0,45	18,85	1,84	0,65	0,58
	75	0,55	27,37	3,44	1,57	0,66
İ/R	Ortanca	0,42	25,45	2,95	0,72	0,71
	Minimum	0,33	19,8	1,85	0,54	0,57
	Maksimum	0,53	28,4	3,57	1,27	0,95
	Çeyreklik 25	0,33	21,75	2,39	0,62	0,57
	75	0,52	27,65	3,31	1,03	0,89
Mannitol	Ortanca	0,48	20,30	2,47	1,07	0,67
	Minimum	0,34	13,9	2,38	0,32	0,39
	Maksimum	0,95	28,0	3,69	1,64	0,98
	Çeyreklik 25	0,38	16,37	2,39	0,38	0,55
	75	0,64	25,22	3,09	1,60	0,78
Mirabegron	Ortanca	0,57	25,00	2,79	0,82	0,54
	Minimum	0,38	19,5	1,42	0,65	0,46
	Maksimum	0,70	27,3	3,31	2,64	0,94
	Çeyreklik 25	0,44	21,45	1,67	0,68	0,47
	75	0,67	25,72	3,12	2,40	0,81
İ/R+Mannitol	Ortanca	0,54	24,15	2,98	1,22	0,60
	Minimum	0,35	14,0	2,54	0,75	0,41
	Maksimum	0,72	27,1	3,53	2,08	0,92
	Çeyreklik 25	0,35	18,12	2,54	0,82	0,47
	75	0,66	26,87	3,18	1,72	0,88
İ/R+Mirabegron	Ortanca	0,47	20,60	3,06	1,00	0,65
	Minimum	0,38	13,3	2,27	0,56	0,43
	Maksimum	0,70	32,4	3,76	2,12	0,93
	Çeyreklik 25	0,37	16,37	2,63	0,70	0,51
	75	0,58	30,60	3,44	1,39	0,90
İ/R+Mannitol+Mirabegron	Ortanca	0,56	22,35	2,48	0,95	0,55
	Minimum	0,43	14,9	1,90	0,88	0,34
	Maksimum	0,95	25,9	3,26	1,23	0,73
	Çeyreklik 25	0,43	17,97	2,02	0,91	0,40
	75	0,74	25,30	3,15	1,08	0,70

Böbrek dokusunda HIF-1 α , VEGF-A, Kaveolin, TIMP-1 ve TIMP-2 düzeylerine ait tanımlayıcı istatistikler Tablo 3’de sunulmuştur. Gruplar arasında bu parametreler açısından yapılan Kruskal-Wallis testi analizinde HIF-1 α (p=0,153), VEGF-A (p=0,491), Kaveolin-1 (p=0,610), TIMP-1 (p=0,284) ve TIMP-2 (p=0,097) düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p>0,05).

Bununla birlikte, ortanca değerler incelendiğinde bazı parametrelerde grup bazlı belirgin eğilimler dikkati çekmektedir. HIF-1 α düzeylerinin özellikle Mannitol ve İ/R+Mannitol gruplarında Sham grubuna kıyasla daha yüksek ortanca değerler gösterdiği, VEGF-A ekspresyonunun İ/R+Mannitol grubunda artış eğilimi sergilediği, Kaveolin-1 düzeylerinde ise gruplar arasında daha heterojen bir dağılım bulunduğu gözlenmiştir. TIMP-2 düzeylerinin özellikle İ/R+Mirabegron grubunda düşüş eğilimi göstermesi dikkat çekmekle birlikte, bu değişimler istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmamıştır.

Genel olarak elde edilen bulgular, böbrek dokusunda incelenen anjiyogenez, hipoksi yanıtı ve ekstrasellüler matriks düzenlenmesine ait belirteçlerde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadığını, ancak bazı tedavi gruplarında yönsel biyolojik değişim eğilimlerinin mevcut olduğunu göstermektedir.

Tablo 3. Böbrek Dokusu HIF 1 α , VEGF-A, Kaveolin 1, TIMP 1 ve TIMP 2 düzeyleri

Grup			Böbrek HIF1a	Böbrek VEGFa	Böbrek Kaveolin-1	Böbrek TIMP1	Böbrek TIMP2
			ng/mg protein	pg/mg protein	ng/mg protein	ng/mg protein	ng/mg protein
Sham	Ortanca		0,89	707	14,845	1,46	18,90
	Minimum		0,77	510	11,0	,98	13,6
	Maksimum		1,40	903	16,7	1,70	27,6
	Çeyreklik	25	0,79	646	11,50	1,27	16,15
		75	1,10	841	16,17	1,66	25,27
İ/R	Ortanca		0,85	682	11,28	1,62	15,85
	Minimum		0,59	503	7,5	1,40	5,8
	Maksimum		1,07	998	23,1	1,99	24,7
	Çeyreklik	25	0,71	588	7,73	1,42	10,15
		75	1,03	819	16,73	1,96	22,30
Mannitol	Ortanca		1,39	735	11,94	1,55	15,35
	Minimum		0,51	536	5,4	1,00	5,5
	Maksimum		1,74	1844	27,0	2,06	18,5
	Çeyreklik	25	0,72	555	9,47	1,33	6,77
		75	1,53	1130	19,28	1,81	18,50
Mirabegron	Ortanca		1,06	784	13,29	1,83	23,55
	Minimum		0,86	652	11,8	1,63	16,1
	Maksimum		1,89	1035	20,4	2,97	35,9
	Çeyreklik	25	0,86	668	12,16	1,73	18,12
		75	1,44	923	15,60	2,51	27,27
İ/R+Mannitol	Ortanca		1,44	708	15,12	1,80	21,40
	Minimum		0,88	630	12,0	,73	13,9
	Maksimum		1,68	1805	27,0	2,80	26,2
	Çeyreklik	25	0,89	667	12,40	1,27	17,72
		75	1,63	1029	19,63	2,43	26,05
İ/R+Mirabegron	Ortanca		0,93	754	12,31	1,50	9,65
	Minimum		0,53	699	8,4	,72	3,0
	Maksimum		1,20	848	23,8	3,05	29,9
	Çeyreklik	25	0,67	723	10,76	1,11	7,27
		75	1,17	809	17,94	2,01	20,82
İ/R+Mannitol+Mirabegron	Ortanca		1,01	573	12,19	1,69	18,55
	Minimum		0,76	467	8,7	1,16	4,8
	Maksimum		1,29	869	20,0	2,39	38,4
	Çeyreklik	25	0,80	469	9,40	1,23	8,70
		75	1,25	774	15,48	1,96	25,80

İ/R grubunda tübül hasarı (fırçamsı kenar kaybı, nekroz, silindir formasyonu) anlamlı şekilde arttığı ($p=0.001-0.003$), apoptoz skorunun yükseldiği ($p=0.001$) tespit edilmiştir. İ/R modelinin başarılı şekilde hasar oluşturduğu ortaya konmuştur.

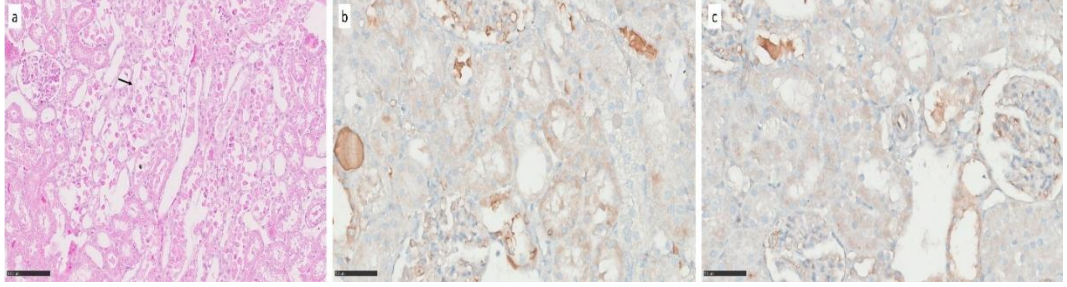
Tübül fırçamsı kenarında kayıp ($p<0.001$), tübüler silindir formasyonu ($p<0.001$), apoptotik hücre varlığı ($p<0.001$) ve tübül epitel nekrozu ($p<0.001$) skorları açısından gruplar arasında anlamlı fark saptandı. Grup 5, 6 ve 7 bu parametrelerde en yüksek ortanca değerlere sahipti. Grup 2'ye kıyasla Grup 5, 6 ve 7'deki artışlar istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$). Grup 1'e göre tüm İ/R içeren gruplarda patolojik skorlar artmış olarak izlendi.

TIMP-1 ve TIMP-2 immunohistokimyasal yaygınlık ve çarpım skorları açısından da gruplar arası anlamlı fark gözlemlendi ($p<0.001$). Her iki belirteç için Grup 6 ve Grup 7 bu parametrelerde en yüksek değerlere ulaştı.

Tablo 4. Histopatolojik Parametrelerin Gruplar Arasında Dağılımı

Parametre	Sham	İ/R	Mannitol	Mirabegron	İ/R + Mannitol	İ/R + Mirabegron	İ/R + Mannitol + Mirabegron	p
Tübül Fırçası Kenarı Kaybı	0 (0-0, 0-1)	1 (0-1, 0-2)	1 (0-2, 0-2)	2 (1-2, 0-3)	3 (2-3, 1-3)	3 (2-3, 1-3)	3 (2-3, 1-3)	0.001
Apoptotik Hücre Skoru	0 (0-0, 0-1)	1 (0-1, 0-2)	2 (1-2, 0-2)	2 (1-3, 1-3)	3 (2-3, 1-3)	3 (2-3, 1-3)	3 (2-3, 1-3)	0.001
Tübüler Silindir Formasyonu	0 (0-0, 0-1)	1 (0-1, 0-2)	1 (0-2, 0-2)	2 (1-2, 0-3)	3 (2-3, 1-3)	3 (2-3, 1-3)	3 (2-3, 1-3)	0.002
Tübül Epitel Hücre Nekrozu	0 (0-0, 0-1)	1 (0-1, 0-2)	2 (1-2, 0-3)	2 (1-3, 1-3)	3 (2-3, 1-3)	3 (2-3, 1-3)	3 (2-3, 1-3)	0.003
TIMP-1 Şiddet Skoru	1 (0-1, 0-2)	1 (0-2, 0-2)	2 (1-2, 0-3)	2 (1-2, 0-3)	2 (1-2, 0-3)	2 (1-3, 1-3)	2 (1-3, 1-3)	0.326
TIMP-1 Yaygınlık Skoru	1 (0-1, 0-2)	1 (0-2, 0-2)	2 (1-2, 0-3)	2 (1-3, 0-3)	3 (2-3, 1-3)	3 (2-3, 1-3)	3 (2-3, 1-3)	0.004
TIMP-1 Çarpım Skoru	1 (0-1, 0-2)	1 (0-2, 0-2)	2 (1-2, 0-3)	2 (1-3, 0-3)	3 (2-3, 1-3)	3 (2-3, 1-3)	3 (2-3, 1-3)	0.005
TIMP-2 Şiddet Skoru	1 (0-1, 0-2)	1 (0-2, 0-2)	2 (1-2, 0-3)	2 (1-2, 0-3)	2 (1-2, 0-3)	2 (1-3, 1-3)	2 (1-3, 1-3)	0.482
TIMP-2 Yaygınlık Skoru	1 (0-1, 0-2)	1 (0-2, 0-2)	2 (1-2, 0-3)	2 (1-3, 0-3)	3 (2-3, 1-3)	3 (2-3, 1-3)	3 (2-3, 1-3)	0.002
TIMP-2 Çarpım Skoru	1 (0-1, 0-2)	1 (0-2, 0-2)	2 (1-2, 0-3)	2 (1-3, 0-3)	3 (2-3, 1-3)	3 (2-3, 1-3)	3 (2-3, 1-3)	0.003
Kaveolin-1 Yaygınlık Skoru	1 (0-1, 0-2)	1 (0-2, 0-2)	1 (0-2, 0-3)	1 (0-2, 0-3)	1 (0-2, 0-3)	1 (0-2, 0-3)	1 (0-2, 0-3)	0.612
Kaveolin-1 Şiddet Skoru	1 (0-1, 0-2)	1 (0-2, 0-2)	1 (0-2, 0-3)	1 (0-2, 0-3)	1 (0-2, 0-3)	1 (0-2, 0-3)	1 (0-2, 0-3)	0.576
Kaveolin-1 Çarpım Skoru	1 (0-1, 0-2)	1 (0-2, 0-2)	1 (0-2, 0-3)	1 (0-2, 0-3)	1 (0-2, 0-3)	1 (0-2, 0-3)	1 (0-2, 0-3)	0.583

Veriler ortanca (IQR, min-maks), n = 6 olarak verilmiştir.



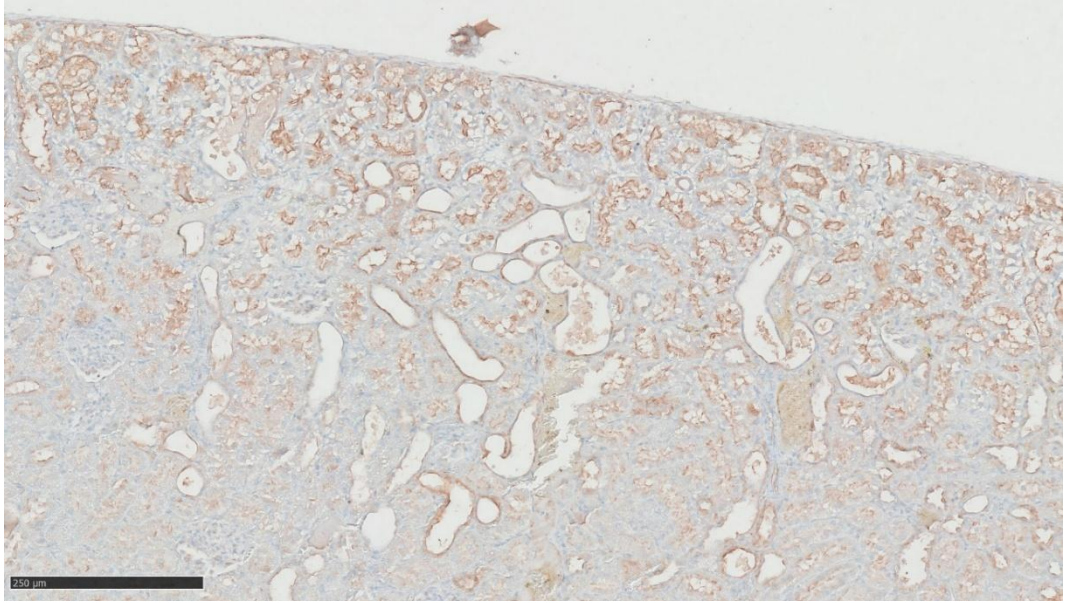
Şekil 3. Grup 7’de rat böbrek dokusuna ait histopatolojik (H&E) ve immünohistokimyasal (TIMP-2 ve kaveolin) bulgular

Görüntü, Grup 7’de yer alan 6 numaralı ratın böbrek dokusuna aittir.

(a) Epitel hücre dökülmesi, apoptoz ve çıplak bazal membran alanları (ok) ile karakterize tübüler hasar (H&E, $\times 200$ büyütme).

(b) Proksimal tübüllerde TIMP-2 ekspresyonu (immünoperoksidaz, $\times 400$ büyütme).

(c) Proksimal tübüllerde kaveolin ekspresyonu (immünoperoksidaz, $\times 400$ büyütme).



Şekil 4. Rat böbrek dokusunda TIMP-1 immünohistokimyasal ekspresyonu ($\times 120$ büyütme)

Görüntü, Grup 7’de yer alan 6 numaralı ratın böbrek dokusuna aittir.

5. TARTIŞMA

Küçük böbrek kitlelerinin standart cerrahi tedavisi olan parsiyel nefrektomide tümör rezeksiyonu esnasında kanama kontrolü için vasküler klempleme sıkça başvurulmuş bir yöntemdir. Bu aşamada gelişen İ/R hasarını azaltmaya yönelik literatürde uzlaşılmış bir öneri bulunmamakla birlikte çeşitli antioksidan, antiinflamatuvar ve mikrosirkülasyonu koruyucu stratejiler denenmektedir. Bu deneysel çalışmada böbrek İ/R hasarında mannitol ve mirabegronun potansiyel renoprotektif etkileri araştırılmış, klasik histopatolojik skorlama ve biyokimyasal oksidatif stres parametrelerinin yanı sıra yeni biyobelirteçler kullanılarak renal hasarın daha duyarlı biçimde ortaya konması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda İ/R grubunda sham grubuna göre belirgin fonksiyonel bozulma, oksidatif stres artışı ve tubulointerstisyel hasar gözlenirken, mannitol ve mirabegron verilen gruplarda biyokimyasal ve histopatolojik düzeyde koruyucu etkiler görülmemiştir. Bu bulgular, İ/R hasarını azaltmada kullanılabilecek ajanların ve tedavi dozlarının dikkatle seçilmesi gerektiğini, herhangi bir molekülün literatürde henüz net bir öneri düzeyine ulaşmadığını destekler niteliktedir.

Mannitol, ozmotik diüretik ve serbest radikal temizleyici özellikleri nedeniyle hem deneysel İ/R modellerinde hem de klinik ABH senaryolarında uzun süredir renoprotektif bir ajan adayı olarak değerlendirilmektedir. Ancak literatürdeki bulgular oldukça çelişkilidir. Renal İ/R sırasında artan intratubuler basınç, viskozite ve filtrat stazının yanı sıra silendirlerin ve kristallerin lümende

birikimi tübüler obstrüksiyon ve ikincil iskemiye katkıda bulunur; mannitolün ozmotik diürezisi, lümeni yıkaması ve intratübüler viskoziteyi azaltıcı etkisi bu mekanizmalara karşı teorik bir avantaj sağladığı belirtilmektedir (osmotik deswelling–mikrosirkülasyon hipotezi)(136). Çalışmamızda mannitol, mirabegron ve kombinasyon tedavisinin İ/R kaynaklı biyokimyasal böbrek hasarı belirteçleri üzerinde anlamlı bir iyileştirici veya kötüleştirici etkisi gösterilmemişken bazı histopatolojik belirteçler üzerinde olumsuz etkilere sahip olabileceği gösterilmiştir.

Rat renal İ/R modellerinde mannitol; kreatinin, BUN, kreatinin klerensi, NGAL ve histopatolojik tübüler hasar skorları üzerinden değerlendirilmiş, bazı çalışmalarda kısmi iyileşme sağlasa da çoğu zaman yetersiz veya zayıf renoprotektif etki göstermiştir(69, 74). Ozlulardan ve ark.'nın ratlarda oluşturdukları renal İ/R modeli çalışmasında Mannitol verilen gruplarda, kreatinin ve kreatinin klirensi kısmen iyileşmiş, BUN artmış, doku ve serum MDA ile doku/serum/idrarda NGAL düzeyleri azalmış fakat histopatolojik hasar skoru artmıştır. Bu grup histolojik hasar skorunda en kötü grup olarak raporlanmıştır(77). Etil pirüvat çalışmalarında ise mannitol, oksidatif stres ve özgül böbrek hasar belirteçleri (NGAL, KIM-1) üzerinde anlamlı koruyucu etki göstermemiş, BUN/Cr düzeyleri ve histolojik bulgulara belirgin bozulma gözlenmiştir(87). Yang ve ark.'nın meta-analizinde, intravasküler mannitolün yüksek ABH riski taşıyan erişkinlerde yalnızca uygun hidrasyona kıyasla serum kreatinin artışını azaltmadığını ve genel olarak ek renal koruma sağlamadığını, hatta radyokontrast nefropatisi durumunda kreatinin artışını belirgin biçimde artırarak potansiyel zararı olabileceğini göstermiştir(88). Aynı meta-analizde, yalnızca kadaverik böbrek

nakli alıcılarında, klemler açılmadan hemen önce verilen mannitolün akut böbrek yetmezliği/diyaliz gereksinimini azaltabildiği, ancak bu bulgunun 1980'lere ait iki küçük çalışma ile sınırlı olduğu ve cerrahi ile immünsüpresyon protokollerindeki değişiklikler nedeniyle dikkatle yorumlanması gerektiği vurgulanmıştır(88). Bazı hayvan İ/R modellerinde mannitol, osmotik diürez, serbest radikal süpürme ve hücresel şişmenin azalması yoluyla böbrek perfüzyonunu ve histolojik hasarı iyileştiren renoprotektif bir ajan olarak rapor edilmiştir; alt ekstremitte İ/R modelinde mannitol uygulaması akut böbrek hasarını azalttığı gibi(137), pankreas İ/R modelinde de mannitol ksantin oksidaz aracılı böbrek hasarını anlamlı biçimde hafiflettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur(138). Çelikmen ve ark. yaptığı çalışmada mannitol, deneysel mekanik ezilme modelinde ne böbrek fonksiyonlarını anlamlı ölçüde iyileştirmiş ne de sistemik etkilerin önlenmesinde tek başına belirgin bir yarar göstermiştir(139). Bazı rat renal İ/R modellerinde mannitol biyokimyasal ve histolojik böbrek hasarını azaltabilse de koruyucu etkisi yeni ajanlar kadar güçlü bulunmamış ve kombinasyonlarda (ör. krisin + mannitol) etkiyi zayıflatabilen farmakokinetik etkileşimler bildirilmiştir(86) Klinik tarafta, perioperatif ABH'yi önlemek amacıyla mannitol kullanımını inceleyen bir sistematik derleme; kardiyak cerrahi, aort cerrahisi ve parsiyel nefrektomi gibi alanlarda ABH'yi önlediğine dair ikna edici kanıt bulamamış ve mannitolün kanıta dayalı bir standart yaklaşım olarak önerilemeyeceğini vurgulamıştır(4).

Renal transplantasyonda çoklu biyobelirteç paneli (KIM-1, NGAL, IL 18, IGFBP7 vb.) ile yapılan randomize çalışmalarda mannitolün İ/R hasarını azaltmada belirgin fayda sağlamadığı, yalnızca bazı biyobelirteçlerde sınırlı değişiklikler

oluşturduğu gösterilmiştir(144, 159). İki ayrı karaciğer nakli kohortunda da intraoperatif mannitol infüzyonu ne postreperfüzyon sendromunu ne de postoperatif ABH insidansını azaltmış, bir çalışmada kardiyak komplikasyonları artırmakla ilişkili bulunmuştur(140, 141). Nörocerrahi ve serebrovasküler olay hastalarında geniş serilerde mannitol infüzyonu sonrasında ABH oranları %13–17 civarında bildirilmiş; yüksek kümülatif doz, önceden böbrek hastalığı ve eşlik eden kardiyovasküler hastalıklar ABH riskini anlamlı şekilde artıran faktörler olarak tanımlanmıştır(142, 143). Literatürde meta-analiz ve sistematik derlemeler mannitolün ABH'yi önleyici ek bir yarar sunmadığını, hatta bazı durumlarda böbrek fonksiyonunu olumsuz etkileyebileceğini vurgulamaktadır(3, 75). Bizim modelimizde de mannitol verilen gruplarda iyileşme gözlenmemesi, bu deneysel ve klinik verilerle uyum göstermektedir. Mannitolün renal İ/R'de renoprotektif ajan olarak kabul edilmesinin sorgulanması gerektiğini güçlü biçimde desteklemektedir.

Son yıllarda AAM tedavisinde sıkça kullanılan β 3-adrenerjik reseptör agonist ajan Mirabegron'un(144), mesane detrusor kasındaki Beta-3 reseptörlere bağlanarak mesane kompliyansında ve kapasitesinde artış ile nokturi, pollaküri yakınmalarını azalttığı, urgency ataklarını kontrol altına aldığı bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada NO-cGMP yolundan bağımsız olarak β 3-adrenoseptörlerini aktive ederek vazodilatasyon etkisi oluşturduğu(100), başka bir çalışmada RhoA/Rho-kinaz yolunun inhibisyonunu içeren ve erektil fonksiyonu kolaylaştıran cGMP'ye bağımlı ancak NO'dan bağımsız bir vazorelaksasyonu ortaya çıkardığı gösterilmiştir(99). Başka bir çalışmada β 3-reseptör uyarımının, NO sentazın aktivasyonu ve buna bağlı olarak cGMP'nin doku seviyelerinde artış yoluyla rat

aortunda vazorelaksasyonuna neden olduğu gösterilmiştir(101). Bu sonuçlar Mirabegronun AAM dışında özellikle erektil disfonksiyon ve kadın cinsel fonksiyonları üzerine olumlu etkileri (145, 146) olabileceğini ve bu etkisini vazodilatasyon/anjiyogenez yolağı üzerinden yapabileceğini desteklemektedir. Üroloji pratiğinde son 10 yılda yaygınlaşarak kılavuzlara giren Mirabegron'un hem beta adrenerjik reseptör aktivitesi hem de hipoksi ile indüklenen ve anjiyogenez ilişkili mekanizmalar üzerinden olası ikincil etkileri ile renal İ/R hasarında iyileşme sağlayabileceği hipotezini doğurmuştur. Yakın zamanda sonuçlanmış az sayıda çalışmanın olumlu sonuçları mevcut olsa da literatürde mirabegronun böbrek koruyucu etkisine dair boşluk devam etmektedir.

2024 yılında yapılan bir rat modelinde mirabegron'un renal İ/R hasarına potansiyel koruyucu etkileri araştırılmış, erkek ratlara İ/R cerrahi indüksiyonundan önce iki gün boyunca 30 mg/kg'lık oral dozda verilen mirabegronun, rat böbrek dokularında böbrek disfonksiyonunu, histolojik anormallikleri, inflamasyonu ve apoptozu önemli ölçüde azalttığı rapor edilmiştir(7). Bu çalışmada mirabegronun İ/R hasarından koruyucu etkilerini serum kreatinin, BUN, KIM-1, inflamatuvar sitokinler ve apoptozu anlamlı olarak azaltarak histolojik hasarı hafifletip cAMP/pCREB ve GSK-3 β /NF- κ B p65 sinyal yollarının modülasyonu yoluyla yaptığı belirtilmiştir. Başka bir çalışmada HgCl ile indüklenmiş ABH modelinde mirabegron, β 3-AR ve miR-127 ekspresyonunu artırıp NF- κ B p65, iNOS, IL-4/-13/-17 ve MDA gibi inflamatuvar/oksidatif belirteçleri baskılamış; M1/M2 makrofaj aktivasyonunu inhibe ederek klodin-2, erken (KIM-1, NGAL, sistatin-C) ve geç (kreatinin, BUN) böbrek hasar göstergelerini ve tübüler yapıyı korumuş, bu

etkiler β 3-AR blokajı ile kaybolmuştur(98). Renal İ/R sonrası karaciğer hasarı modelinde, 0,3 mg/kg mirabegron ön tedavisi, hepatik lobül mimarisini büyük ölçüde düzelterek sinüzoid dilatasyonu ve hepatosit dejenerasyonunu azaltmış, artmış iNOS immünboyanmasını tersine çevirerek uzak organ (karaciğer) üzerinde de koruyucu etki göstermiştir(147). Diyabetik nefropati modelinde kronik mirabegron tedavisi, yağ dokusu “browning”ini ve UCP1 aracılı termogenezi artırarak glukolipid metabolizmasını, insülin duyarlılığını ve böbrek fonksiyonunu iyileştirmiş, inflamasyonu ve renal fibrozisi azaltmıştır(102). Literatürdeki az sayıda çalışmada mirabegron koruyucu görünürken, bizim çalışmamızda mirabegron verilen İ/R grubunda biyokimyasal ve histopatolojik açıdan düzelme olmaması hatta histopatolojik olarak belirgin kötüleşme saptanması, literatürdeki verilerle çelişen ve dikkat çekici bir bulgudur. Bu fark; doz (30 mg/kg ile 10 mg/kg), uygulama süresi (2 günlük öncül tedavi ile tek doz), İ/R süresi ya da kullandığımız histopatolojik skorlama yöntemi gibi metodolojik farklılıklar ile ilişkili olabilir(7, 147). Çalışmamız mirabegronun her koşulda renoprotektif olmadığı, bazı protokollerde hasarı artırabileceği olasılığına dikkat çekerek literatüre önemli bir karşı tez sağlamaktadır.

Bizim kliniğimiz dahil olmak üzere birçok üroloji merkezinde parsiyel nefrektomi esnasında İ/R hasarını azaltmak için peroperatif intravenöz mannitol uygulaması devam etmektedir. Literatürde son dönemde İ/R hasarını azaltmak için birçok ilaç denenmiş ancak hiçbiri net olarak öneri düzeyine ulaşmamıştır. Biz de son yıllarda üroloji pratiğinde yer edinmiş, günde tek doz oral yolla alınan, kolay ulaşılabilir ve nispeten ucuz bir ilaç olarak Mirabegron’un literatürde gösterilen İ/R

hasarındaki olası olumlu etkilerini test edip rutin kullanımdaki intravenöz Mannitol uygulaması ile karşılaştırmayı ve iki molekülün kombine kullanımın etkilerini araştırmayı amaçladık.

Çalışmanın örneklem büyüklüğü güç analizi doğrultusunda hesaplandı ve diğer hayvan deney modellerindeki ile benzerdi(2). Bu sayının test ettiğimiz yöntem için yeterli olduğunu düşünmekteyiz. İ/R grubunun Sham grubuna göre tüm parametrelerde anlamlı fark göstermesi İ/R modelimizin doğruluğunu teyit etmekte idi.

İ/R grubunda beklenen biyokimyasal ve histopatolojik değişiklikler gözlenmesine rağmen ilaç verilen gruplarda beklenen koruyucu etki gözlenmedi. Bu da ilaç dozlarının uygunluğu ve uygulama yöntemi üzerine düşündürücü bir bulgu idi. Mannitol dozu literatürdeki çalışmalara(77) ve insandaki peroperatif klinik kullanımına uygun dozda idi. Mirabegron ise deneysel İ/R modellerinde daha yüksek dozlarda verildiği çalışmalar olmasına rağmen(7) literatürde daha çok kabul gören güvenli dozda verilmişti(131, 148). İnsanlarda OAB tedavisinde verildiği gibi oral yolla günde tek doz şeklinde verilerek uygulanabilirlik ve klinik kullanım taklit edilmeye çalışılmıştır. Uygulama yöntemleri de daha önceki çalışmalar ile benzer idi.

Çalışmamızda özellikle İdrar KIM-1 düzeylerinde İ/R grubunda artış ve tedavi gruplarında azalma eğilimi gözlenmesine rağmen, gruplar arası varyasyonun yüksek olması ve Bonferroni düzeltmesinin korumacı yapısı nedeniyle ikili karşılaştırmalarda anlamlı fark saptanmamıştır.

Bu çalışmada elde edilen bulgular birlikte değerlendirildiğinde, idrar parametreleri ile serum parametreleri arasında belirgin bir duyarlılık farkı olduğu görülmektedir. İdrar volümü ve idrar KIM-1 düzeylerinde yapılan Kruskal-Wallis testi analizinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmasına rağmen, serum kreatinin, BUN, serum KIM-1, mGFR ve ACLARA (eCrCl) parametrelerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu durum, renal hasarın özellikle erken dönemde serum biyobelirteçlerinden ziyade idrar biyobelirteçleri ile daha duyarlı bir şekilde ortaya konulabildiğini düşündürmektedir.

Özellikle idrar KIM-1 düzeylerinde İ/R grubunda gözlenen artış ve tedavi uygulanan gruplarda izlenen istatistiksel anlamlı olmayan azalma eğilimi, tübüler hasarın idrar biyobelirteçleri aracılığıyla daha erken ve belirgin şekilde izlenebildiğini desteklemektedir. Buna karşın serum kreatinin ve BUN gibi geleneksel böbrek fonksiyon göstergelerinin gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemesi, bu parametrelerin akut ve erken dönem renal hasarı saptamada sınırlı duyarlılığa sahip olabileceğini göstermektedir.

İdrar parametrelerinde genel anlamlılık saptanmasına rağmen, Bonferroni düzeltilmesi ile yapılan ikili karşılaştırmalarda anlamlı fark bulunmaması, grup içi varyasyonun yüksekliği ve örneklem büyüklüğünün sınırlı olması ile açıklanabilir. Bununla birlikte, ortanca değerlerde gözlenen yönsel değişimler, tedavi gruplarının özellikle idrar biyobelirteçleri üzerinde potansiyel düzenleyici etkileri olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmada mGFR ve ACLARA değerlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır. Bu durum, İ/R modelinde uygulanan

tedavilerin böbreğin global filtrasyon kapasitesi üzerinde belirgin bir değişiklik oluşturmadığını düşündürmektedir. Özellikle serum kreatinin temelli türetilen mGFR'nin erken dönem böbrek hasarını yansıtmakta yetersiz kalabileceği bilinmektedir.

Benzer şekilde ACLARA formülü ile hesaplanan eCrCl değerlerinde de anlamlı değişiklik olmaması, kreatinin klirensinin bu modelde erken fonksiyonel değişiklikleri yakalamada sınırlı duyarlılığa sahip olabileceğini göstermektedir. Buna karşın idrar biyobelirteçlerinde gözlenen değişiklikler, böbrek hasarının daha erken ve duyarlı göstergelerinin tübüler düzeyde ortaya çıktığını desteklemektedir.

mGFR ve ACLARA glomerüler filtrasyonu yansıtan daha geç değişen fonksiyonel parametrelerdir. Bizim modelimizde erken dönemde özellikle tübüler hasar ön planda olduğu için idrar KIM-1 gibi duyarlı biyobelirteçlerde değişim görülmüş, ancak glomerüler filtrasyon rezervi korunduğu için mGFR ve ACLARA'da anlamlı değişiklik saptanmamıştır.

Sonuç olarak, bu bulgular İ/R hasarının değerlendirilmesinde idrar biyobelirteçlerinin serum parametrelerine kıyasla daha duyarlı olabileceğini ve deneysel modellerde erken dönem böbrek hasarının ortaya konulmasında öncelikli olarak değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir.

TIMP-1, TIMP-2 ve Kaveolin-1 düzeyleri özellikle Mirabegron+Mannitol kolunda (Grup 7) en yüksek değere ulaşmış; hem TIMP-1 ve 2 hem immünohistokimyasal yaygınlık skorları Mirabegron verilen İ/R gruplarında (Grup 6-7) belirgin olarak yükselmiştir. Histopatolojik olarak fırçası kenar kaybı,

tübüler silindir, apoptoz ve tübüler nekroz skorları Grup 6 ve 7’de İ/R grubuna kıyasla anlamlı artmıştır.

Tek başına veya kombinasyon gruplarında tübül hasarını geriye çevirilememiş olduğu, skorların İ/R seviyesinde kaldığı, mannitol, mirabegron ve kombinasyonun koruyucu etkisinin olmadığı görülmüştür. TIMP-1 ve TIMP-2’de bazı parametreler anlamlı (yaygınlık/çarpım) ancak Kaveolin-1 tedavi gruplarında istatistiksel açıdan anlamsız bulunmuştur. Fibrozis ve ekstraselüler matriks remodeling üzerinde net bir ilaç etkisi olmadığı görülmüştür. Ancak bazı matriks sinyallerinde küçük değişimler mevcuttur. Mannitol ve mirabegron uygulamaları, İ/R ile indüklenen böbrek doku hasarında histopatolojik iyileşme sağlamamıştır.

Bu çalışmada hem biyokimyasal hem histopatolojik değerlendirme için seçilen parametreler, renal İ/R hasarının erken, moleküler ve morfolojik boyutlarını aynı anda yakalaması açısından literatüre göre daha bütüncül bir panel sunmaktadır. Biyokimyasal olarak KIM-1, TIMP-1, TIMP-2, Kaveolin-1, HIF-1 α ve VEGF kullanılması, literatürdeki birçok deneysel modelle benzerdir. KIM-1’in mRNA, protein ve idrar/serum düzeylerindeki artışın tübüler hasar skoru ile paralel seyrettiği, klasik hasar belirteçlerine üstün olduğu gösterilmiştir(117). Çalışmamızda da KIM-1’in hem biyokimyasal hem histopatolojik düzeyde kullanılması, Dase ve Hu’nun çalışmalarındaki tübüler hasar skoru ile KIM-1 korelasyonuna benzer bir yaklaşım sunmaktadır(117, 149). HIF-1 α ve VEGF, diğer çalışmalarda çoğunlukla doku ekspresyonu ve hücre sağkalımı/anjyogenez üzerinden ele alınmış; HIF-1 α ’nın mitofaji ve apoptoz, VEGF’nin ise onarım ve fibrozis ile ilişkili olduğu gösterilmiştir(2, 150). Bizim modelimizde bu iki

belirtecin birlikte kullanılması, hipoksi yanıtı ile vaskülogenez yanıtının aynı modelde ilişkilendirilebilmesini sağlamaktadır.

Histopatolojik açıdan literatürde sıklıkla kullanılan parametreler; tübüler nekroz, fırçamsı kenar kaybı, silindir formasyonu, vakuolizasyon, interstisyel inflamasyon ve fibrozis için semikantitatif skorlamalardır(2, 117, 151). Bizim çalışmamız bu klasik skorlamalara ek olarak TIMP-1, TIMP-2 ve Kaveolin-1 için yaygınlık ve çarpım skorları kullanarak immünohistokimyasal ekspresyonu kantitatif morfolojiyle entegre etmektedir. Çakır ve ark. serum Kaveolin-1 düzeylerini renal İ/R sonrası zamana bağlı olarak değerlendirmiş ancak ayrıntılı doku skorlaması yapmamıştır(152). TIMP-2 üzerine yakın tarihli çalışmalar daha çok fibrozis, mitokondriyal disfonksiyon ve metabolik reprogramlama odaklıdır; tübül epitel dokusunda detaylı immunhistokimya skoru ile klasik akut hasar bulgularını aynı anda inceleyen çalışmalar sınırlıdır(153, 154).

Literatüre benzer şekilde KIM-1, HIF-1 α , VEGF gibi iyi bilinen İ/R belirteçlerinin ve klasik histopatolojik skorlamaları kullanılmasının yanında TIMP-1/TIMP-2 ve Kaveolin-1'i hem biyokimyasal hem de yaygınlık $\times$ şiddet skorlarıyla değerlendirip bunları fırçamsı kenar kaybı, apoptoz, silindir oluşumu ve nekroz gibi ayrıntılı morfolojik parametrelerle aynı model içinde ilişkilendirmemiz çalışmamızın özgünlüğüne katkı sağlamaktadır. Bunun akut hasarın moleküler matriks düzenleyicileri ve endotel/tübül etkileşimiyle bağlantısını ortaya koyan daha geniş bir biyobelirteç-histopatoloji birlikteliği sağladığını düşünmekteyiz.

Sonuçları itibari ile bu çalışma mannitolun İ/R hasarında kullanımının tartışmalı durumuna katkı sağlamıştır. Mirabegronun ise literatürdeki az sayıda

Çalışmada gösterilen renoprotektif etkilerinin kesinlik içermemesini ve dikkatle uygulanmasını destekler niteliktedir.

Bu çalışmada böbreğin iskemi sırasında maruz kaldığı hipoksiye yanıtı daha önce çalışılmamış mekanizmalar üzerinden değerlendirilmiştir. İ/R hasarında mirabegronun hipoksi ile indüklenen anjiyogenez yolakları üzerinden etkilerine bildiğimiz kadarıyla literatürde rastlanmadığı gibi, mannitol ile birlikte etkinliğini gösteren çalışma da bulunmamaktadır. Rutin renal cerrahi uygulamasına girdiği şekliyle tek başına mannitol kullanımının, tek başına mirabegron uygulaması ile karşılaştırılmasının yapılması, ayrıca bu iki etken maddenin birlikte kullanıldığı grubun karşılaştırmaya dahil edilmesi, deney modelinde biyokimyasal ve histopatolojik sonuçların birbiri ile örtüşmesi bu çalışmanın özgün ve güçlü yönlerini oluşturmaktadır.

İ/R modelimizde reperfüzyon sonrası 24.saatte sakrifikasyon uygulandığı için ilaçların uzun dönem etkilerini gözlemleyemedik, bunun çalışmanın zayıf yönlerinden biri olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca her ne kadar yol gösterici olsa da hayvan deneyi çalışmalarında sonuçların birebir insan sonuçlarını yansıtamayabileceği unutulmamalıdır. İ/R modeli ve ilaç dozları literatür ile uyumlu olmasına rağmen sonuçlarımızın model kaynaklı yanılma payı içerebileceği göz ardı edilmemelidir.

6. SONUÇ

Bu çalışmanın bulguları, renal İ/R hasarının erken dönem değerlendirilmesinde idrar biyobelirteçlerinin serum parametrelerine kıyasla daha duyarlı olabileceğini göstermektedir. İdrar volümü ve özellikle idrar KIM-1 düzeylerinde saptanan anlamlı değişikliklere karşın, serum kreatinin ve BUN gibi geleneksel parametrelerde anlamlı farklılık izlenmemesi, klinik pratikte yalnızca serum belirteçlerine dayalı değerlendirmenin erken böbrek hasarını gözden kaçırabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle, riskli hasta gruplarında idrar biyobelirteçlerinin değerlendirilmesi, böbrek hasarının daha erken dönemde saptanmasına ve olası tedavi yaklaşımlarının zamanında uygulanmasına katkı sağlayabilir.

Bununla birlikte, idrar parametrelerinde gözlenen genel anlamlılığa rağmen Bonferroni düzeltmesi ile yapılan ikili karşılaştırmalarda anlamlı fark saptanmamış olması, bu bulguların klinik uygulamaya doğrudan genellenebilmesi için daha geniş örneklemli ve ileri çalışmalarla desteklenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Sonuç olarak, idrar biyobelirteçlerinin klinik kullanım potansiyeli yüksek olmakla birlikte, bu parametrelerin rutin pratiğe entegrasyonu için ek kanıtlara ihtiyaç bulunmaktadır.

Bu rat renal İ/R modelinde, mannitol ve mirabegron uygulamaları beklenenin aksine anlamlı bir nefroprotektif etki sağlamamıştır. Mannitol ve mirabegron verilen gruplarda serum kreatinin, BUN ve akut tübüler hasar belirteçlerindeki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da, histopatolojik

olarak tübüler nekroz ve interstisyel inflamasyon skorlarını kötüleştirdiği gösterilmiştir.

Ayrıca oksidatif stres, inflamasyon ve hücre ölümüyle ilişkili histopatolojik bulguların da tedavi gruplarında daha ağır seyretmesi, bu ajanların söz konusu protokol ve dozlarda İ/R hasarının yol açtığı ABH'yi hafifletmek bir yana, kötüleştirebileceğine işaret etmekte ise de; modelimizin 24 saatlik bir gözlemi içeren kısa bir sürenin sonuçları ve tek doz uygulamalar olduğu akılda tutulmalıdır.

Genel olarak bu bulgular, mannitol ve mirabegronun renal İ/R hasarında daha çok erken fonksiyonel yanıtlar üzerinde etkili olabileceğini, buna karşın yapısal doku değişikliklerinin daha geç veya daha sınırlı düzeyde ortaya çıkabileceğini düşündürmüştür.

Sonuç olarak, bu deneysel İ/R modelinde mannitol ve mirabegron, İ/R kaynaklı böbrek hasarını önleyememiş ve iyileştirememiştir. Bu bulgular, renal İ/R hasarına yönelik farmakolojik stratejilerin, ajan seçimi, doz ve zamanlama açısından yeniden gözden geçirilmesi ve gelecekte yapılacak deneysel ve klinik çalışmalarla doğrulanması gerektiğini ortaya koymaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Duplechin MOD, Folds GT, Duplechin DP, Ahmadzadeh S, Myers SH, Shekoohi S, et al. Prevention and Management of Perioperative Acute Kidney Injury: A Narrative Review. *Diseases*. 2025;13(9):295.
2. Shiva N, Sharma N, Kulkarni YA, Mulay SR, Gaikwad AB. Renal ischemia/reperfusion injury: An insight on in vitro and in vivo models. *Life sciences*. 2020;256:117860.
3. Lugo-Baruqui JA, Ayyathurai R, Sriram A, Pragatheeshwar KD. Use of mannitol for ischemia reperfusion injury in kidney transplant and partial nephrectomies—review of literature. *Current Urology Reports*. 2019;20(1):6.
4. Waskowski J, Pfortmueller CA, Erdoes G, Buehlmann R, Messmer AS, Luedi MM, et al. Mannitol for the prevention of peri-operative acute kidney injury: a systematic review. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 2019;58(1):130-40.
5. Spaliviero M, Power NE, Murray KS, Sjoberg DD, Benfante NE, Bernstein ML, et al. Intravenous mannitol versus placebo during partial nephrectomy in patients with normal kidney function: a double-blind, clinically-integrated, randomized trial. *European urology*. 2018;73(1):53-9.
6. Nair SM, Power NE, Coleman JA. Examining mannitol use in kidney cancer surgery: a cautionary tale of extrapolated surgical data. *European urology focus*. 2019;5(6):930-4.
7. Ahmed MA, Kamel EO, Abd-Eldayem AM. Role of cAMP/pCREB and GSK-3 β /NF- κ B p65 signaling pathways in the renoprotective effect of mirabegron against renal ischemia-reperfusion injury in rats. *European Journal of Pharmacology*. 2024;974:176617.

8. Navar L, Maddox D, Munger K. The renal circulations and glomerular filtration. Brenner and rector's the kidney Amsterdam: Elsevier. 2020:80-114.
9. Ogobuiro I, Tuma F. Physiology, renal. StatPearls [Internet]: StatPearls Publishing; 2023.
10. Uetani N, Bouchard M. Plumbing in the embryo: developmental defects of the urinary tracts. Clinical genetics. 2009;75(4):307-17.
11. Costantini F, Kopan R. Patterning a complex organ: branching morphogenesis and nephron segmentation in kidney development. Developmental cell. 2010;18(5):698-712.
12. May CJ, Saleem M, Welsh GI. Podocyte dedifferentiation: a specialized process for a specialized cell. Frontiers in endocrinology. 2014;5:148.
13. Peti-Peterdi J, Kidokoro K, Riquier-Brison A. Novel in vivo techniques to visualize kidney anatomy and function. Kidney international. 2015;88(1):44-51.
14. Gallardo PA, Vio CP. Functional anatomy of the kidney. Renal Physiology and Hydrosaline Metabolism: Springer; 2022. p. 7-28.
15. Almazmomi MA, Esmat A, Naeem A, Abid M. Acute kidney injury: definition, management, and promising therapeutic target. Cureus. 2023;15(12).
16. Ostermann M, Lumlertgul N, Jeong R, See E, Joannidis M, James M. Acute kidney injury. The Lancet. 2025;405(10474):241-56.
17. Kane-Gill SL, Meersch M, Bell M. Biomarker-guided management of acute kidney injury. Current opinion in critical care. 2020;26(6):556-62.
18. Ostermann M, Legrand M, Meersch M, Srisawat N, Zarbock A, Kellum JA. Biomarkers in acute kidney injury. Annals of Intensive Care. 2024;14(1):145.
19. Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a urinary biomarker and much more. Oxford University Press; 2009. p. 3265-8.

20. Shang W, Wang Z. The update of NGAL in acute kidney injury. *Current Protein and Peptide Science*. 2017;18(12):1211-7.
21. Xu Y, Xie Y, Shao X, Ni Z, Mou S. L-FABP: A novel biomarker of kidney disease. *Clinica chimica acta*. 2015;445:85-90.
22. Vonbrunn E, Ebert N, Cordasic N, Amann K, Büttner A, Büttner-Herold M, et al. Serum Uromodulin as early marker for ischemic acute kidney injury and nephron loss: association with kidney tissue distribution pattern. *Journal of Translational Medicine*. 2025;23(1):323.
23. Johnson MJ, Tommerdahl KL, Vinovskis C, Waikar S, Reinicke T, Parikh CR, et al. Relationship between biomarkers of tubular injury and intrarenal hemodynamic dysfunction in youth with type 1 diabetes. *Pediatric Nephrology*. 2022;37(12):3085-92.
24. Fan W, Ankawi G, Zhang J, Digvijay K, Giavarina D, Yin Y, et al. Current understanding and future directions in the application of TIMP-2 and IGFBP7 in AKI clinical practice. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2019;57(5):567-76.
25. Yang HS, Hur M, Lee KR, Kim H, Kim HY, Kim JW, et al. Biomarker rule-in or rule-out in patients with acute diseases for validation of acute kidney injury in the emergency department (BRAVA): a multicenter study evaluating urinary TIMP-2/IGFBP7. *Annals of Laboratory Medicine*. 2022;42(2):178-87.
26. Yang H, Chen Y, He J, Li Y, Feng Y. Advances in the diagnosis of early biomarkers for acute kidney injury: a literature review. *BMC nephrology*. 2025;26(1):115.
27. Kohl K, Herzog E, Dickneite G, Pestel S. Evaluation of urinary biomarkers for early detection of acute kidney injury in a rat nephropathy model. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 2020;105:106901.

28. Jana S, Mitra P, Dutta A, Khatun A, Das TK, Pradhan S, et al. Early diagnostic biomarkers for acute kidney injury using cisplatin-induced nephrotoxicity in rat model. *Current research in toxicology*. 2023;5:100135.
29. Holditch SJ, Brown CN, Lombardi AM, Nguyen KN, Edelstein CL. Recent advances in models, mechanisms, biomarkers, and interventions in cisplatin-induced acute kidney injury. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(12):3011.
30. Kashani K, Cheungpasitporn W, Ronco C. Biomarkers of acute kidney injury: the pathway from discovery to clinical adoption. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2017;55(8):1074-89.
31. Fuentes-Calvo I, Cuesta C, Sancho-Martinez SM, Hidalgo-Thomas OA, Paniagua-Sancho M, Lopez-Hernandez FJ, et al. Biomarkers of persistent renal vulnerability after acute kidney injury recovery. *Scientific reports*. 2021;11(1):21183.
32. Pellicer-Valero ÓJ, Massaro GA, Casanova AG, Paniagua-Sancho M, Fuentes-Calvo I, Harvat M, et al. Neural network-based calculator for rat glomerular filtration rate. *Biomedicines*. 2022;10(3):610.
33. Fuentes-Calvo I, Alonso EMB, Diaz-Morales N, Pellicer-Valero Ó, Massaro GA, Casanova AG, et al. # 4145 ACLARA: AN ON-LINE CALCULATOR TO ESTIMATE CREATININE CLEARANCE IN RATS. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2023;38(Supplement_1):gfa063c_4145.
34. Fuentes-Calvo I, del Valle Mercado Hernández J, Pellicer-Valero O, Massaro GA, Casanova AG, Sancho MP, et al. # 1413 High performance of ACLARA calculator of rat creatinine clearance for the chronic follow up of renal function. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2024;39(Supplement_1):gfae069-1360-413.
35. Mehta RL, Cerdá J, Burdmann EA, Tonelli M, García-García G, Jha V, et al. International Society of Nephrology's 0by25 initiative for acute kidney injury

(zero preventable deaths by 2025): a human rights case for nephrology. *The Lancet*. 2015;385(9987):2616-43.

36. Turgut F, Awad AS, Abdel-Rahman EM. Acute kidney injury: medical causes and pathogenesis. *J Clin Med*. 2023;12(1):375.
37. Goyal A, Daneshpajouhnejad P, Hashmi MF, Bashir K. Acute kidney injury. *StatPearls [internet]: StatPearls Publishing*; 2023.
38. Boyer N, Eldridge J, Prowle JR, Forni LG. Postoperative acute kidney injury. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2022;17(10):1535-45.
39. Cristiano F, Posari C, d'Angelo B, Schiazza A, Gigante A, Caravelli L, et al. How to assess the glomerular filtration rate, and which method is deemed most reliable? *GIORNALE ITALIANO DI NEFROLOGIA*. 2024;41(4).
40. Bonavia A, Vece G, Karamchandani K. Prerenal acute kidney injury—still a relevant term in modern clinical practice? *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2021;36(9):1570-7.
41. Ronco C, Bellomo R, Kellum JA. Acute kidney injury. *The Lancet*. 2019;394(10212):1949-64.
42. Kellum JA, Romagnani P, Ashuntantang G, Ronco C, Zarbock A, Anders H-J. Acute kidney injury. *Nature reviews Disease primers*. 2021;7(1):52.
43. Baker ML, Cantley LG. Adding insult to injury: the spectrum of tubulointerstitial responses in acute kidney injury. *The Journal of Clinical Investigation*. 2025;135(6).
44. Kwiatkowska E, Kwiatkowski S, Dziedziejko V, Tomasiewicz I, Domański L. Renal microcirculation injury as the main cause of ischemic acute kidney injury development. *Biology*. 2023;12(2):327.
45. Chen Z, Li Y, Yuan Y, Lai K, Ye K, Lin Y, et al. Single-cell sequencing reveals homogeneity and heterogeneity of the cytopathological mechanisms in different etiology-induced AKI. *Cell death & disease*. 2023;14(5):318.

46. Huang R, Zhang C, Xiang Z, Lin T, Ling J, Hu H. Role of mitochondria in renal ischemia–reperfusion injury. *The FEBS Journal*. 2024;291(24):5365-78.
47. Tammaro A, Kers J, Scantlebery AM, Florquin S. Metabolic flexibility and innate immunity in renal ischemia reperfusion injury: the fine balance between adaptive repair and tissue degeneration. *Frontiers in immunology*. 2020;11:1346.
48. Zhang M, Liu Q, Meng H, Duan H, Liu X, Wu J, et al. Ischemia-reperfusion injury: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Signal transduction and targeted therapy*. 2024;9(1):12.
49. Hobson MJ, Zingarelli B. Ischemia-reperfusion injury. *Pediatric Critical Care Medicine: Volume 1: Care of the Critically Ill or Injured Child*. 2014:251-68.
50. Grebenchikov O, Likhvantsev V, Elu P, Silachev D, Pevzner I, Zorova L, et al. Molecular mechanisms of ischemic-reperfusion syndrome and its personalized therapy. *Anesteziologiya i reanimatologiya*. 2014(3):59-67.
51. Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(11):4210-21.
52. Pabla N, Bajwa A. Role of mitochondrial therapy for ischemic-reperfusion injury and acute kidney injury. *Nephron*. 2022;146(3):253-8.
53. Kosieradzki M, Rowiński W, editors. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. *Transplantation proceedings*; 2008: Elsevier.
54. Kinsey GR, Li L, Okusa MD. Inflammation in acute kidney injury. *Nephron Experimental Nephrology*. 2008;109(4):e102-e7.
55. Kim M-J, Oh CJ, Hong C-W, Jeon J-H. Comprehensive overview of the role of mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of acute kidney ischemia-reperfusion injury: a narrative review. *Journal of Yeungnam Medical Science*. 2024;41(2):61-73.

56. Wang J, Zhu P, Toan S, Li R, Ren J, Zhou H. Pum2-Mff axis fine-tunes mitochondrial quality control in acute ischemic kidney injury. *Cell Biology and Toxicology*. 2020;36(4):365-78.
57. Duann P, Lin P-H. Mitochondria damage and kidney disease. *Mitochondrial dynamics in cardiovascular medicine*. 2017:529-51.
58. Baek J, Kim S, editors. Effects of Transfusion of Stored Red Blood Cells on Renal Ischemia-Reperfusion–Induced Hepatic Injury in Rats. *Transplantation Proceedings*; 2023: Elsevier.
59. Yang Y. Partial versus radical nephrectomy in patients with renal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Urology Journal*. 2020;17(2):109-17.
60. Feige K, Rubbert J, Raupach A, Stroethoff M, Heinen A, Hollmann MW, et al. Cardioprotective Properties of Mannitol—Involvement of Mitochondrial Potassium Channels. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(5):2395.
61. Soares RO, Losada DM, Jordani MC, Évora P, Castro-e-Silva O. Ischemia/reperfusion injury revisited: an overview of the latest pharmacological strategies. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(20):5034.
62. Wen D, Liang A, Yue X, Peng P, Xu C, Pu Q, et al. Noninvasive evaluation of renal oxygenation by blood oxygenation level-dependent magnetic resonance imaging in patients with primary aldosteronism. *Scientific Reports*. 2025;15(1):33261.
63. Schaub JA, Venkatachalam MA, Weinberg JM. Proximal tubular oxidative metabolism in acute kidney injury and the transition to CKD. *Kidney360*. 2021;2(2):355-64.
64. Chen Y, Li Z, Zhang H, Chen H, Hao J, Liu H, et al. Mitochondrial metabolism and targeted treatment strategies in ischemic-induced acute kidney injury. *Cell death discovery*. 2024;10(1):69.

65. Fu Y, Tang C, Cai J, Chen G, Zhang D, Dong Z. Rodent models of AKI-CKD transition. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2018;315(4):F1098-F106.
66. Smith T, Zaidi A, Brown CVM, Pino-Chavez G, Bowen T, Meran S, et al. Robust rat and mouse models of bilateral renal ischemia reperfusion injury. *in vivo*. 2024;38(3):1049-57.
67. Taniguchi A, Miyashita K, Fukae S, Tanaka R, Nishida M, Kitayama T, et al. Single-cell transcriptome analysis of a rat model of bilateral renal ischemia-reperfusion injury. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2023;33:101433.
68. Harwood R, Bridge J, Ressel L, Scarfe L, Sharkey J, Czanner G, et al. Murine models of renal ischemia reperfusion injury: An opportunity for refinement using noninvasive monitoring methods. *Physiological Reports*. 2022;10(5):e15211.
69. Li C, Yu Y, Zhu S, Hu Y, Ling X, Xu L, et al. The emerging role of regulated cell death in ischemia and reperfusion-induced acute kidney injury: current evidence and future perspectives. *Cell Death Discovery*. 2024;10(1):216.
70. Kizilgun M, Poyrazoglu Y, Oztas Y, Yaman H, Cakir E, Cayci T, et al. Beneficial effects of N-acetylcysteine and ebselen on renal ischemia/reperfusion injury. *Renal failure*. 2011;33(5):512-7.
71. Ko SH, Jun JH, Oh JE, Shin E, Kwak Y-L, Shim J-K. Effect of high-dose vitamin C on renal ischemia-reperfusion injury. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2024;173:116407.
72. Cusumano G, Cola E, Spagnoletti G, Severino A, Giubilato S, Stigliano E, et al. High-dose atorvastatin reduces oxidative stress of ischemia/reperfusion injury after isogeneic kidney transplantation in rats: in vivo, preclinical, case–control, open-label study. *Renal Replacement Therapy*. 2023;9(1):57.
73. Börklüce A, Emmez G, İnan G, Gülbahar Ö, Kilicoglu S, Gültekin M, et al. The Effect of Epibaditine on Renal Ischemia Reperfusion Injury in Rats

Ratlarda Oluşturulan Renal İskemi Reperfüzyon Hasarında Epibatidin Etkileri. *Anestezi Dergisi*. 2024;32(2).

74. Yahiya YI, Hadi NR, Raghif AA, Habooby NGSA. Protective effect of IAXO-102 on renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Journal of Medicine and Life*. 2023;16(4):623.
75. Alkhafaji GA, Janabi AM. Protective effects of bexagliflozin on renal function in a rat model of ischemia-reperfusion injury; an experimental animal study. *Journal of Nephroarmacology*. 2025;14(2):e12760-e.
76. Alaasam ER, Janabi AM, Al-Buthabhak KM, Almudhafar RH, Hadi NR, Alexiou A, et al. Nephroprotective role of resveratrol in renal ischemia-reperfusion injury: a preclinical study in Sprague-Dawley rats. *BMC Pharmacology and Toxicology*. 2024;25(1):82.
77. Stamatiou K, Pierris N, Özlülerden Y, Toktaş C, Aybek H, Küçükataş V, et al. The renoprotective effects of mannitol and udenafil in renal ischemia-reperfusion injury model. *Investig Clin Urol*. 2017;58(4):289-95.
78. Lee EH, Yoo ES, Yoon BH, Jeon M, Kwon TG, Kim BS, et al. The renoprotective effects of tadalafil on ischemia–reperfusion injury during partial nephrectomy in an animal model. *BMC nephrology*. 2025;26(1):335.
79. Küçük A, Yucel M, Erkasap N, Tosun M, Koken T, Ozkurt M, et al. The effects of PDE5 inhibitory drugs on renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Molecular biology reports*. 2012;39(10):9775-82.
80. Zahran MH, Hussein AM, Barakat N, Awadalla A, Khater S, Harraz A, et al. Sildenafil activates antioxidant and antiapoptotic genes and inhibits proinflammatory cytokine genes in a rat model of renal ischemia/reperfusion injury. *International urology and nephrology*. 2015;47(11):1907-15.
81. Li Z, Liu A, Qian A, Feng W, Yang J, Tian X, et al. Tadalafil protects against renal fibrosis after ischemia-reperfusion injury by inhibiting Akt/NF-κB signaling pathway. *European Journal of Pharmacology*. 2025:178388.

82. Chatterjee PK. Novel pharmacological approaches to the treatment of renal ischemia-reperfusion injury: a comprehensive review. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2007;376(1):1-43.
83. Li N. Protective effects and mechanisms of dapagliflozin on renal ischemia/reperfusion injury. *Transplant immunology*. 2024;84:102010.
84. Q Jallawee H, Janabi AM. Trandolapril improves renal ischemia-reperfusion injury in adult male rats via activation of the autophagy pathway and inhibition of inflammation, oxidative stress, and apoptosis. *Journal of Bioscience and Applied Research*. 2024;10(6):114-27.
85. Asli F, Poshtdar S, Dehpour AR, Mohammad Jafari R. Exploring the therapeutic potential of Modafinil in mitigating renal ischemia–reperfusion injury in rats. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 2024;38(6):1168-77.
86. Abdallah HM, El Awdan SA, El-Marasy SA, Ahmed-Farid OA, Hassan A. Chrysin or mannitol for treatment of acute kidney injury: Evidence for pharmacokinetic interaction. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2021;11(12):139-50.
87. Bloom J, Patel N, Wagmaister J, Choudhury M, Eshghi M, Konno S. Prophylactic effect of ethyl pyruvate on renal ischemia/reperfusion injury mediated through oxidative stress. *International Urology and Nephrology*. 2019;51(1):85-92.
88. Yang B, Xu J, Xu F, Zou Z, Ye C, Mei C, et al. Intravascular administration of mannitol for acute kidney injury prevention: a systematic review and meta-analysis. *PloS one*. 2014;9(1):e85029.
89. Grace M, Paul GA, Aravindan V, Afzal CM, Joy BA, Ajmal NM. Incidence and determinants of acute kidney injury following Mannitol therapy. *MGM Journal of Medical Sciences*. 2021;8(4):355-60.
90. Purnomo AF, Permana KR, Daryanto B. Acute kidney injury following mannitol administration in traumatic brain injury: a meta-analysis. *Acta Informatica Medica*. 2021;29(4):270.

91. Moustafa H, Schoene D, Altarsha E, Rahmig J, Schneider H, Pallesen L-P, et al. Acute kidney injury in patients with malignant middle cerebral artery infarction undergoing hyperosmolar therapy with mannitol. *Journal of Critical Care*. 2021;64:22-8.
92. Teter K, Rockman C, Patel V, Chang H, Jacobowitz G, Gelb B, et al. Mannitol use is renal protective in patients with chronic kidney disease requiring supraceliac aortic clamping. *Annals of Vascular Surgery*. 2022;85:77-86.
93. Nicholson M, Baker D, Hopkinson B, Wenham P. Randomized controlled trial of the effect of mannitol on renal reperfusion injury during aortic aneurysm surgery. *Journal of British Surgery*. 1996;83(9):1230-3.
94. Skrifvars MB, Bailey M, Moore E, Mårtensson J, French C, Presneill J, et al. A post hoc analysis of osmotherapy use in the erythropoietin in traumatic brain injury study—associations with acute kidney injury and mortality. *Critical care medicine*. 2021;49(4):e394-e403.
95. Elkhatab MM, Alqahtani AM, Kim MH, Kim J, Kim JH, Jung JH. Safety and efficacy of beta-3 adrenergic agonists in treating neurogenic lower urinary tract dysfunction: A systematic review and meta-analysis. *Investig Clin Urol*. 2024;65(3):217.
96. Schena G, Caplan MJ. Everything you always wanted to know about β 3-AR(* but were afraid to ask). *Cells*. 2019;8(4):357.
97. Samanta S, Bagchi D, Bagchi M. Physiological and metabolic functions of the β 3-adrenergic receptor and an approach to therapeutic achievements. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 2024;80(4):757-74.
98. Kamal MM, El-Abhar HS, Abdallah DM, Ahmed KA, Aly NES, Rabie MA. Mirabegron, dependent on β 3-adrenergic receptor, alleviates mercuric chloride-induced kidney injury by reversing the impact on the inflammatory network, M1/M2 macrophages, and claudin-2. *International Immunopharmacology*. 2024;126:111289.

99. Cirino G, Sorrentino R, di Villa Bianca RdE, Popolo A, Palmieri A, Imbimbo C, et al. Involvement of β 3-adrenergic receptor activation via cyclic GMP- but not NO-dependent mechanisms in human corpus cavernosum function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(9):5531-6.
100. Gur S, Peak T, Yafi FA, Kadowitz PJ, Sikka SC, Hellstrom WJ. Mirabegron causes relaxation of human and rat corpus cavernosum: could it be a potential therapy for erectile dysfunction? *BJU Int*. 2016;118(3):464-74.
101. Trochu JN, Leblais V, Rautureau Y, Bévérilli F, Le Marec H, Berdeaux A, et al. Beta 3-adrenoceptor stimulation induces vasorelaxation mediated essentially by endothelium-derived nitric oxide in rat thoracic aorta. *British journal of pharmacology*. 1999;128(1):69-76.
102. Zhao K, Meng L, Wang X, Sui W, Zhang Y. Uncoupling protein 1-mediated protective effects of β 3-adrenergic receptor agonist on kidney fibrosis via promoting adipose tissue browning in diabetic mice. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2025;309:142977.
103. Balligand J-L, Brito D, Brosteanu O, Casadei B, Depoix C, Edelmann F, et al. Repurposing the β 3-adrenergic receptor agonist mirabegron in patients with structural cardiac disease: the beta3-LVH Phase 2b randomized clinical trial. *JAMA cardiology*. 2023;8(11):1031-40.
104. Conde E, Alegre L, Blanco-Sanchez I, Saenz-Morales D, Aguado-Fraile E, Ponte B, et al. Hypoxia inducible factor 1-alpha (HIF-1 alpha) is induced during reperfusion after renal ischemia and is critical for proximal tubule cell survival. *PloS one*. 2012;7(3):e33258.
105. Hill P, Shukla D, Tran MG, Aragones J, Cook HT, Carmeliet P, et al. Inhibition of hypoxia inducible factor hydroxylases protects against renal ischemia-reperfusion injury. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2008;19(1):39-46.
106. Semenza GL. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology*. 2009;24(2):97-106.

107. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends in molecular medicine*. 2001;7(8):345-50.
108. Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, Bauer C, Wenger RH, Gassmann M. Induction of HIF-1 α in response to hypoxia is instantaneous. *The FASEB Journal*. 2001;15(7):1312-4.
109. Weidemann A, Bernhardt WM, Klanke B, Daniel C, Buchholz B, Ca V, et al. HIF activation protects from acute kidney injury. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2008;19(3):486-94.
110. Dzietko M, Derugin N, Wendland M, Vexler Z, Ferriero D. Delayed VEGF treatment enhances angiogenesis and recovery after neonatal focal rodent stroke. *Translational stroke research*. 2013;4:189-200.
111. Nakayama M, Nakayama A, Van Lessen M, Yamamoto H, Hoffmann S, Drexler HC, et al. Spatial regulation of VEGF receptor endocytosis in angiogenesis. *Nature cell biology*. 2013;15(3):249-60.
112. Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, et al. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in Caveolin-1-1 gene-disrupted mice. *science*. 2001;293(5539):2449-52.
113. Young LH, Ikeda Y, Lefer AM. Caveolin-1-1 peptide exerts cardioprotective effects in myocardial ischemia-reperfusion via nitric oxide mechanism. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2001;280(6):H2489-H95.
114. Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP. Caveolin-1s, a family of scaffolding proteins for organizing “preassembled signaling complexes” at the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(10):5419-22.
115. Mahmoudi M, Willgoss D, Cuttle L, Yang T, Pat B, Winterford C, et al. In vivo and in vitro models demonstrate a role for Caveolin-1-1 in the pathogenesis of ischaemic acute renal failure. *The Journal of Pathology: A*

Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland. 2003;200(3):396-405.

116. Chaudhary KR, Cho WJ, Yang F, Samokhvalov V, El-Sikhry HE, Daniel EE, et al. Effect of ischemia reperfusion injury and epoxyeicosatrienoic acids on Kaveolin-1 expression in mouse myocardium. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2013;61(3):258-63.
117. Dase J, Rasyid H, Masadah R, Cangara MH, Bukhari A, Dwiyanti R, et al. Analysis of mRNA and protein kidney injury Molecule-1 (KIM-1) expression in a kidney model during the initiation phase of ischemia reperfusion injury. *Annals of Medicine and Surgery*. 2022;75.
118. van Timmeren MM, van den Heuvel MC, Bailly V, Bakker SJ, van Goor H, Stegeman CA. Tubular kidney injury molecule-1 (KIM-1) in human renal disease. *The Journal of pathology*. 2007;212(2):209-17.
119. Cai J, Jiao X, Luo W, Chen J, Xu X, Fang Y, et al. Kidney injury molecule-1 expression predicts structural damage and outcome in histological acute tubular injury. *Renal Failure*. 2019;41(1):80-7.
120. Sabbisetti VS, Ito K, Wang C, Yang L, Mefferd SC, Bonventre JV. Novel assays for detection of urinary KIM-1 in mouse models of kidney injury. *Toxicological Sciences*. 2013;131(1):13-25.
121. Vaidya VS, Ramirez V, Ichimura T, Bobadilla NA, Bonventre JV. Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2006;290(2):F517-F29.
122. Su Y, Yang X, Cheng W-W, Shang X-M, Wang H-L, Shen H-C. Kidney injury molecule 1 in the early detection of acute kidney injury—A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Medicine*. 2025;12:1574945.
123. Shao X, Tian L, Xu W, Zhang Z, Wang C, Qi C, et al. Diagnostic value of urinary kidney injury molecule 1 for acute kidney injury: a meta-analysis. *PloS one*. 2014;9(1):e84131.

124. Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, Castruita-De la Rosa C, Ramirez-Acuña JM, Perez-Romero BA, Guerrero-Rodriguez JF, et al. The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(24):9739.
125. Ronco C. Acute kidney injury: from clinical to molecular diagnosis. *Critical Care*. 2016;20:1-4.
126. Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2006;17(6):1503-20.
127. Husi H, Human C. Molecular determinants of acute kidney injury. *Journal of Injury and Violence Research*. 2015;7(2):75.
128. Yang Q-h, Liu D-w, Long Y, Liu H-z, Chai W-z, Wang X-T. Acute renal failure during sepsis: potential role of cell cycle regulation. *Journal of Infection*. 2009;58(6):459-64.
129. Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Science signaling*. 2008;1(27):re6-re.
130. Küçük A, Arslan M. Deneysel İskemi Reperfüzyon Modelleri. 2021.
131. Majima T, Matsukawa Y, Funahashi Y, Kato M, Yamamoto T, Gotoh M. The effect of mirabegron on bladder blood flow in a rat model of bladder outlet obstruction. *World J Urol*. 2020;38:2021-7.
132. Yamada S, Chimoto J, Shiho M, Okura T, Morikawa K, Wakuda H, et al. Possible involvement of muscarinic receptor blockade in mirabegron therapy for patients with overactive bladder. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2021;377(2):201-6.
133. Krauwinkel W, van Dijk J, Schaddelee M, Eltink C, Meijer J, Strabach G, et al. Pharmacokinetic properties of mirabegron, a β_3 -adrenoceptor agonist: results from two phase I, randomized, multiple-dose studies in healthy young and elderly men and women. *Clinical therapeutics*. 2012;34(10):2144-60.

134. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976;72(1-2):248-54.
135. Nesovic Ostojic J, Zivotic M, Kovacevic S, Ivanov M, Brkic P, Mihailovic-Stanojevic N, et al. Immunohistochemical Pattern of Histone H2A Variant Expression in an Experimental Model of Ischemia–Reperfusion-Induced Acute Kidney Injury. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(9):8085.
136. Zálešák M, BLAŽÍČEK P, Pancza D, Gablovský I, Štrbák V, Ravingerová T. Hyperosmotic environment blunts effectivity of ischemic preconditioning against ischemia-reperfusion injury and improves ischemic tolerance in non-preconditioned isolated rat hearts. *Physiological research*. 2016;65(6).
137. Goksin I, Adali F, Enli Y, Akbulut M, Teke Z, Sackan G, et al. The effect of phlebotomy and mannitol on acute renal injury induced by ischemia/reperfusion of lower limbs in rats. *Annals of vascular surgery*. 2011;25(8):1118-28.
138. Khoury W, Namnesnikov M, Fedorov D, Abu-Ghazala S, Weinbroum AA. Mannitol attenuates kidney damage induced by xanthine oxidase-associated pancreas ischemia-reperfusion. *Journal of Surgical Research*. 2010;160(1):163-8.
139. Çelikmen M, Sarıkaya S, ÖZÜÇELİK D, Sever M, Açıkşarı K, Çelikmen D, et al. Effects of acetaminophen and mannitol on crush injuries in rats: An experimental study Ezilme yaralanması oluşturulan sıçanlarda asetaminofen ve mannitolün etkileri: Deneysel çalışma. *Ulusal Travma ve Acil Cerrahi Dergisi*. 2016;22(4).
140. Emara MM, Diab DG, Yassen AM, Abo-Zeid MA. Mannitol for prevention of acute kidney injury after liver transplantation: a randomized controlled trial. *BMC anesthesiology*. 2022;22(1):393.

141. DeMaria J, Samuel, Bachner EM, Mroz V, Gamboa S, Ouyang Y, Egorova NN, et al. The Efficacy of Mannitol in Attenuating Postreperfusion Syndrome in Orthotopic Liver Transplantation: A Retrospective Cohort Study. *J Clin Med*. 2025;14(6):1897.
142. Choi HW, Yoon CH, Ryu J-A. Acute kidney injury following mannitol infusion in neurosurgical patients. *Journal of Neurointensive Care*. 2022;5(1):9-14.
143. Ramos RJT, Cabigas KS, Rabara EC, Lim ME. Incidence, risk factors, and clinical outcomes of mannitol-induced acute kidney injury among acute stroke patients admitted to East Avenue Medical Center. *medRxiv*. 2023:2023.07. 02.23292143.
144. Athanasiou S, Pitsouni E, Grigoriadis T, Zacharakis D, Salvatore S, Serati M. Mirabegron in female patients with overactive bladder syndrome: what's new? A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2020;251:73-82.
145. Zachariou A, Mamoulakis C, Filiponi M, Dimitriadis F, Giannakis J, Skouros S, et al. The effect of mirabegron, used for overactive bladder treatment, on female sexual function: a prospective controlled study. *BMC Urol*. 2018;18:1-8.
146. Gubbiotti M, Giannantoni A, Cantaluppi S, Coluccia AC, Ghezzi F, Serati M. The impact of Mirabegron on sexual function in women with idiopathic overactive bladder. *BMC Urol*. 2019;19:1-5.
147. Montaser MM, Ragab I, Kamel EO. Possible effects of mirabegron on rat liver in renal ischemia reperfusion injury: histological and immunohistochemical studies. *Minia journal of medical research*. 2020;31(3):308-16.
148. Sawada N, Nomiya M, Hood B, Koslov D, Zarifpour M, Andersson K-E. Protective effect of a β 3-adrenoceptor agonist on bladder function in a rat model of chronic bladder ischemia. *European urology*. 2013;64(4):664-71.

149. Smith SF, Hosgood SA, Nicholson ML. Ischemia-reperfusion injury in renal transplantation: 3 key signaling pathways in tubular epithelial cells. *Kidney international*. 2019;95(1):50-6.
150. Li X, Chen W, Feng J, Zhao B. The effects of HIF-1 α overexpression on renal injury, immune disorders and mitochondrial apoptotic pathways in renal ischemia/reperfusion rats. *Transl Androl Urol*. 2020;9(5):2157.
151. . !!! INVALID CITATION !!! {}.
152. Cakir RC, Dinc B, Ellidağ HY, Yildirim S, Kaplan TT, Celik O, et al. Determination of SCUBE-1, SCUBE-2, Kaveolin-1-1, and ischemia biomarker levels in rats following renal ischemia-reperfusion. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*. 2025;51(1):235.
153. Schanz M, Kimmel M, Alscher MD, Amann K, Daniel C. TIMP-2 and IGFBP7 in human kidney biopsies in renal disease. *Clinical Kidney Journal*. 2023;16(9):1434-46.
154. Xu D, Jiang J, Liu Y, Pang J, Suo J, Li Y, et al. TIMP2 protects against sepsis-associated acute kidney injury by cAMP/NLRP3 axis-mediated pyroptosis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2024;326(5):C1353-C66.

ÖZET

Böbrek perfüzyonunun bozulduğu durumlarda, örneğin miyokard enfarktüsü, şok, böbrek transplantasyonu veya cerrahi işlemler sonrası İ/R (iskemi/reperfüzyon) hasarı, böbrek dokusunda mikrovasküler hasar ve inflamatuvar değişimlere sebep olarak böbrek fonksiyon bozukluğuna yol açar. İskemik süreçte serbest radikallerin, böbrek hasarına yol açtığı bilinmektedir. Bu çalışmada rat renal İ/R modelinde mirabegron ve mannitol uygulamalarının İ/R ile ilişkili renal oksidan hasar üzerindeki etkilerini vazodilatasyon ve anjiyogenez mekanizmaları üzerinden araştırmak amaçlanmıştır.

12 haftalık 42 adet Wistar albino türü erkek rat Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nden (GÜDAM) temin edilerek, rastgele 7 (n=6) gruba ayrılmıştır (Sham, İ/R, Mannitol, Mirabegron, İ/R+Mannitol, İ/R+Mirabegron, İ/R+Mannitol+Mirabegron). İ/R prosedüründen 4 saat öncesinde 10 mg/kg mirabegron oral gavaj yoluyla, %20'lik mannitol 1 mL dozda iskemiden 15 dakika önce lateral kuyruk venlerinden intravenöz yolla bolus şeklinde verilmiştir. Sağ böbrek renal pedikülünün 30 dakika boyunca oklüde edilmiş, 24 saatlik reperfüzyon sağlanmıştır. 24 saatlik idrarda kreatinin, protein, KIM-1, serumda BUN, kreatinin, KIM-1 ve böbrek dokusunda HIF-1 α (Hipoksi ile indüklenen faktör 1-alfa), Kaveolin-1, TIMP-1 ve TIMP-2 (Matriks metalloproteinaz doku inhibitörü 1 ve 2), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) düzeyleri

ölçülmüş, ayrıca böbrek dokularında kaveolin-1, TIMP-1, TIMP-2 düzeyleri immünohistokimyasal boyamalarla değerlendirilmiştir. SPSS paket programı ile gruplar arasındaki farklılıkları ortaya koymak için varyans analizi prosedürü uygulanmıştır.

Gruplar arasında 24 saatlik idrar hacmi ($p=0,000$) ve idrar KIM-1 düzeyleri ($p=0,000$) bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. İdrar total protein ($p=0,113$) ve idrar total kreatinin ($p=0,052$), serum kreatinin ($p=0,585$), BUN ($p=0,688$), serum KIM-1 ($p=0,658$), mGFR ($p=0,737$) ve ACLARA ($p=0,735$), böbrek dokusunda HIF-1 α ($p=0,153$), VEGF-A ($p=0,491$), Kaveolin-1 ($p=0,610$), TIMP-1 ($p=0,284$) ve TIMP-2 ($p=0,097$) düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Histopatolojik olarak İ/R hasarı doğrulanmış, tübüler hasar skorlarında, TIMP-1 ve TIMP-2 yaygınlık ve çarpım skorlarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

Bu rat renal İ/R modelinde, mannitol, mirabegron ve bunların kombinasyonunun uygulamaları beklenenin aksine anlamlı bir nefroprotektif etki sağlamamıştır. Mannitol ve mirabegron verilen gruplarda serum kreatinin, BUN ve akut tübüler hasar belirteçlerindeki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da, histopatolojik olarak tübüler nekroz ve interstisyel inflamasyon skorlarını iyileştirmediği, hatta daha kötüleştirdiği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Renal iskemi/reperfüzyon hasarı, mirabegron, mannitol, akut böbrek hasarı, oksidatif stres, anjiyogenez



SUMMARY

In conditions where renal perfusion is impaired—such as myocardial infarction, shock, renal transplantation, or post-surgical ischemia/reperfusion (I/R) injury—microvascular damage and inflammatory alterations in renal tissue lead to renal dysfunction. During ischemic processes, free radicals are known to contribute to renal injury. In this study, we aimed to investigate the effects of mirabegron and mannitol administration on I/R-related renal oxidative damage in a rat renal I/R model, focusing on mechanisms involving vasodilation and angiogenesis.

A total of 42 male 12-week-old Wistar albino rats were obtained from the Gazi University Experimental Animals Research Center (GUDAM) and randomly assigned to seven groups (n=6 per group): Sham, I/R, Mannitol, Mirabegron, I/R + Mannitol, I/R + Mirabegron, and I/R + Mannitol + Mirabegron. Mirabegron (10 mg/kg) was administered via oral gavage 4 hours before the I/R procedure, while 20% mannitol (1 mL) was administered as an intravenous bolus via the lateral tail vein 15 minutes before ischemia. The right renal pedicle was occluded for 30 minutes, followed by 24 hours of reperfusion. Over a 24-hour urine collection period, creatinine, total protein, and KIM-1 levels were measured. Serum levels of BUN, creatinine, and KIM-1 were also assessed. In renal tissue, levels of HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α), Caveolin-1, TIMP-1 and TIMP-2 (tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2), and vascular endothelial growth factor (VEGF) were analyzed. In addition, immunohistochemical staining was used to evaluate renal tissue expression of Caveolin-1, TIMP-1, and TIMP-2. Statistical

analysis of group differences was performed using analysis of variance (ANOVA) in SPSS software.

A statistically significant difference was observed in 24-hour urine output ($p=0.000$) and urinary KIM-1 levels ($p=0.000$). No statistically significant differences were detected in urinary total protein ($p=0.113$), urinary total creatinine ($p=0.052$), serum creatinine ($p=0.585$), BUN ($p=0.688$), serum KIM-1 ($p=0.658$), mGFR ($p=0.737$), ACLARA ($p=0.735$), or renal tissue levels of HIF-1 α ($p=0.153$), VEGF-A ($p=0.491$), Caveolin-1 ($p=0.610$), TIMP-1 ($p=0.284$), and TIMP-2 ($p=0.097$) (all $p>0.05$). Histopathologically confirmed I/R injury showed statistically significant differences in tubular injury scores and in the extent and composite (product) scores of TIMP-1 and TIMP-2.

In this rat renal I/R model, administration of mannitol, mirabegron, and their combination did not provide a statistically significant nephroprotective effect, contrary to expectations. Although the changes in serum creatinine, BUN, and acute tubular injury markers were not statistically significant in the mannitol- and mirabegron-treated groups, histopathological analysis demonstrated that they did not improve—and in fact worsened—tubular necrosis and interstitial inflammation scores.

Keywords: Renal ischemia/reperfusion injury, mirabegron, mannitol, acute kidney injury, oxidative stress, angiogenesis