

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

DENEYSEL BÖBREK İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINDA
EVEROLİMUS'UN OKSİDAN-ANTİOKSİDAN SİSTEM VE
RENAL HİSTOLOJİ ÜZERİNE ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ
DR. ELİF SUYANI

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. ÜLVER BOZTEPE DERİCİ

ANKARA-2006

TEŞEKKÜR

İç Hastalıkları Uzmanlık eğitimim boyunca yakın destek ve ilgisini gördüğüm İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Candan TUNCER başta olmak üzere tüm hocalarıma ve asistan arkadaşlarıma;

Çalışmamın her aşamasında destek olan ve yol gösteren tez danışmanım Doç. Dr. Ülver BOZTEPE DERİCİ başta olmak üzere biyokimyasal incelemeleri yapan Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hatice PAŞAOĞLU'na, histopatolojik incelemeleri yapan Yrd. Doç. Dr. Özlem ERDEM'e, mevcut çalışmanın deney aşamasında emeği geçen, Genel Cerrahi Anabilim Dalı'ndan Dr. Tolga ŞAHİN'e, Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Dr. Ebru OFLUOĞLU'na ve Patoloji Anabilim Dalı'ndan Gonca BARIT'a; teşekkür ederim.

Dr. Elif Suyanı

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR.....	1
GİRİŞ.....	2
GENEL BİLGİLER.....	4
1. BÖBREĞİN YAPISI VE FONKSİYONLARI.....	4
2. AKUT BÖBREK YETMEZLİĞİ.....	7
3. İSKEMİK AKUT BÖBREK YETMEZLİĞİ.....	11
3.1. İSKEMİK AKUT BÖBREK YETMEZLİĞİNİN PATOFİZYOLOJİSİ.....	12
3.2. İSKEMİK AKUT BÖBREK YETMEZLİĞİNİN PATOLOJİSİ.....	31
4. İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARININ RENAL TRANSPLANTASYONDAKİ ROLÜ.....	32
5. EVEROLİMUS.....	34
GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
1. BİYOKİMYASAL İNCELEME YÖNTEMLERİ.....	36
1.1. Doku MDA Analizi.....	37
1.2. Böbrek Dokusunda SOD aktivitesinin Ölçülmesi.....	37
1.3. Böbrek Dokusunda MPO düzeyinin ölçülmesi.....	40
1.4. Serum BUN, Kreatinin, IL-6 ve TNF- α Analizi.....	41
2.HİSTOPATOLOJİK İNCELEME YÖNTEMLERİ.....	41
3.İSTATİKSEL ANALİZ.....	41
SONUÇLAR.....	42
1. BİYOKİMYASAL İNCELEME SONUÇLARI.....	42
2.HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME SONUÇLARI.....	49
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	51
ÖZET.....	60
KAYNAKLAR.....	61
ETİK KURUL KARARI.....	7

KISALTMALAR

ABY: Akut böbrek yetmezliği

SOD: Süperoksit dismutaz

ACE: Anjiotensin konverting enzim

TNF: Tümör nekroz faktörü

AMP: Adenin monofosfat

ATN: Akut tübüler nekroz

ATP: Adenin trifosfat

BUN: Kan üre nitrojeni

DNA: Deoksiribo nükleik asit

Fe⁺²: Demir

GFR: Glomerüler filtrasyon hızı

ICAM-1: İntersellüler adezyon molekülü-1

Ig: İmmünglobulin

IL: İnterlökin

I/R: İskemi-reperfüzyon

K⁺: Potasyum iyonu

MCP-1: Monosit kemoatraktan protein-1

MDA: Malondialdehit

MPO: Miyeloperoksidaz

Na⁺: Sodyum iyonu

NaCl: Sodyum klorür

NAD: Nikotinamid adenin dinükleotid

NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat hidrojen

NO: Nitrik oksit

NSAID: Nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar

GİRİŞ

Günümüzde görülme sıklığı giderek artan ABY, önemli bir morbidite ve mortalite sebebi olarak da karşımıza çıkmaktadır. ABY, hastaneye başvuran hastaların %5'ini, yoğun bakım ünitelerindeki hastaların %30'unu (14), kardiyopulmoner operasyon geçiren hastaların %4-15'ini (95) ve non kardiyojenik operasyonların ise %25-27'sini oluşturmaktadır (67). 1950'de hemodiyaliz kullanımının başlaması ile birlikte daha önce ABY'e bağlı mortalite %90 iken %50'ye düşmüştür. Ancak son yarım yüzyılda, ABY'in patogenezi daha iyi anlaşılmış olmakla birlikte, mortalitenin azaltılmasında pek bir gelişme sağlanamamıştır. Halen ABY'li hastalarda %50'ye varan bir mortalite söz konusudur. Mortalite, multiorgan yetmezliği olan hastalarda daha da artarak %80'lere kadar ulaşmaktadır (84,95,100).

Akut Böbrek Yetmezliği, saatler veya günler içerisinde ani olarak böbrek fonksiyonlarının bozulması ve buna bağlı olarak nitrojenöz maddelerin vücutta birikmesi ile karakterize bir durumdur. Böbrek yetmezliğinin ağırlığına ve süresine bağlı olarak, metabolik asidoz, su ve elektrolit dengesinin bozulması gibi metabolik bozukluklar da tabloya eklenebilir. Bu hastaların %20-60'ında diyaliz ihtiyacı olmaktadır (14,54,95).

Bu kadar sık görülen, morbidite ve mortalitesi yüksek olan ABY'de patogenezin aydınlatılması, koruyucu ve tedavi edici yaklaşımlar geliştirilmesi önemli olup, bu konuda da birçok çalışma yapılmaktadır.

İskemik ABY, prerenal nedenlere ya da intrarenal mikrovasküler patolojilere bağlı olarak renal kan akımındaki bozulma nedeniyle ortaya çıkar ve tedavi edilmediğinde kronik böbrek yetmezliğine kadar ilerler (12,13,54,86). İskemik ABY çoğunlukla major kardiyovasküler cerrahilerde, transplantasyonda, travma, sepsis ve volüm kaybı ile giden durumlarda görülür (13,95). Renal transplantasyon işleminde de transplante edilecek greftin I/R hasarına değişen düzeylerde maruz kalması, postoperatif dönemde buna bağlı greft fonksiyon gecikmeleri ve

hatta kayıpları sözkonusu olabilmektedir. Dolayısıyla bu prosedürde I/R hasarının önlenmesine yönelik girişimlerin greft fonksiyonlarına ve greft yaşam süresine olumlu etkilerde bulunması tartışmasız bir gerçektir (36,87,97). Bu nedenle büyük ameliyatlara ve renal transplantasyon öncesinde akut renal I/R yaralanmasından korunmak amacıyla uygun bir profilaktik tedavinin bulunması akılcı bir yaklaşımdır.

Akut renal I/R yaralanmasında oksidatif stres ve iltihabi hücre birikimi hastalığın fizyopatolojisinde önemli mekanizmaları oluşturmaktadır. Renal I/R'da nötrofil infiltrasyonu patofizyolojide önemli bir yer tutmakla birlikte son yıllarda T hücrelerinin ve sitokinlerin de bu hasarda önemli bir medyatör olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla T hücre proliferasyonunun inhibe edilmesi ve inflamatuvar yanıtta önemli bir role sahip TNF- α sentezinin inhibe edilmesinin renal I/R yaralanmasında olumlu değişimlere neden olabileceği düşünülmektedir (4,16, 21,28,30,34,40,47,61,76,91,102,103,105,106).

Everolimus renal transplantasyon hastalarında immünsüpresyon amacıyla yeni kullanıma giren makrolid grubu bir antibiyotiktir. Solid organ transplantasyonu yapılan hastalarda kullanılmakta olan sirolimusun oral biyoyararlanımını arttırmak için geliştirilmiş, bir sirolimus (rapamisin) derivativesidir. T ve B hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir (5,49). Aynı mekanizma ile fonksiyon gören sirolimusun TNF- α sentezini de inhibe ettiği gösterilmiştir(1). Dolayısı ile everolimus da TNF- α düzeylerini inhibe ediyor olabilir.

Bu çalışmada renal transplantasyonda immünsüpresyon amacıyla kullanılan everolimusun aynı zamanda I/R yaralanması üzerine koruyucu etkilerinin olup olmadığını araştırmak hedeflanmıştır. Bu ilacın I/R hasarından koruyucu etkilerinin bilinmesi ile transplante edilecek böbreğin soğuk iskemi ve takiben reperfüzyon sürecinde maruz kalacağı hasarların en aza indirilmesi mümkün olacak ve transplantasyon sonrası greftin erken fonksiyon görmesinde sağlanacak ek faydalar aşikar hale gelecektir.

GENEL BİLGİLER

1. BÖBREĞİN YAPISI VE FONKSİYONLARI

Böbrekler insan vücudunda retroperitoneal kavitede, paravertebral yerleşimli olup, 12. torasik ve 3. lomber vertebralar arasında uzanırlar. Sağ böbrek, karaciğerin sağ lobunun büyük olması ve basısı nedeni ile sola göre 1-2 cm daha aşağıda bulunur. Her bir böbrek yaklaşık olarak 150-200 gr ağırlığında olup, 12-13 cm uzunluğunda, 6-7 cm eninde ve 2.5-3 cm derinliğindedir. Sağ böbrek üstte sürrenal bez, üst ve önde karaciğer, hilus seviyesinde duodenum, altta ve lateral kenarda kolon ile komşudur. Sol böbrek ise üstte sürrenal bez, önde mide, dalak, pankreas, jejunum, ve desendan kolon ile komşudur. Her iki böbrek arkada diafragma, kuadratus lumborum ve psoas kaslarına yaslanır. Her bir böbreğin anterior ve posterior yüzeyleri, medial ve lateral kenarları, superior ve inferior kutupları vardır. Lateral kenar konkav, medial kenar ise konveks şeklindedir. Medial kesimde renal hilus denilen ve içinden renal arter, renal ven, renal pelvis, üreter, lenfatik ve sinirlerin geçtiği bir yarık bulunur. Renal hilus böbrek içinde, 2.5 cm derinliğinde olan ve içinde renal pelvis, renal kaliks, renal damar ve sinirler ile değişik miktarlarda yağ dokusunun bulunduğu renal sinüs olarak devam eder (66,98).

Her bir böbrek aortadan köken alan renal arterler ile kanlanır. Renal arter hilustan böbreğe girdikten sonra önce interlobar daha sonra arkuat arterlere ayrılır. Arkuat arterlerden dik olarak interlobüler arterler çıkar. Bu arterlerden glomerüle giden afferent arterioller köken alır. Glomerülü oluşturan kapillerler birleşerek efferent arteriollerini oluşturur. Efferent arterioller daha sonra dallanarak tübülüsleri saran, böbrekteki 2. kapiller ağ sistemi olan peritübüler kapiller ağı oluşturur. Peritübüler kapillerlerden gelen kan venöz sisteme dökülür.

Oradan sırası ile arteryel sistemle paralel olarak interlobüler ven, arkuat ven, interlobar ven ve renal veni takip eder. Renal venler ise inferior vena kavaya drene olurlar (38,98).

Üreterin üst kısmının genişlemesi ile oluşan renal pelvis ilk önce 3 majör kalikse, majör kaliksler de 8 veya daha fazla minör kalikse bölünür (66).

Böbrek sagittal olarak kesildiğinde dışta korteks, içte medulla olmak üzere 2 kısımdan oluşur. Medulla, medüller piramit ismi verilen 10-18 adet piramidal yapıdan oluşur. Piramitlerin tabanları kortikomedüller bölgede bulunurken, tepe kısımları kaliks içine kadar uzanır. Kaliks içine açılan bu kısımlara papilla ismi verilir. Korteks böbreğin dış kısmının yanı sıra medüller piramitler arasında da yer alır ve bu kısma Bertini'nin böbrek kolonları denir (45).

Böbrekte idrar oluşumunu sağlayan en küçük yapısal ve anatomik birim nefrondur. Her bir böbrekte, her birinin idrar yapabilme fonksiyonu olan yaklaşık 1 milyon nefron bulunur. Böbrek yeni nefron rejenere edemez. Dolayısıyla renal bir hasar, hastalık veya normal yaşlanma ile nefron sayısında kademeli bir azalma olur. Her bir nefronun iki kısmı vardır:

1) Glomerül; sıvının kandan filtre edildiği kısım, 2) Tübülüsler; filtre edilen sıvının idrara dönüştüğü proksimal ve distal tübülüsler, Henle Kulpu ile toplayıcı kanallardan oluşan kısımdır. Glomerüller, proksimal ve distal tübülüsler ve dış kortekste bulunan nefronların Henle kulpları kortekste; toplayıcı kanallar, Henle kulpları ve vasa rectalar medüllada bulunur. Nefronlar böbrek dokusunda ilerledikleri derinliğe göre, kortikal ve jukstaglomerüler olmak üzere 2 tiptir. Glomerül, dallanan ve anastomozlar yapan ve epitelyal hücreler ile kaplı kapiller bir yumaktır. Bowman kapsülü denen bir yapı içinde bulunur. Glomerülden filtre edilen sıvı sırasıyla proksimal tübül, henle kulpu, distal tübül ve toplayıcı kanallardan geçer, renal papillaların içinden renal kalikse açılır. Oradan da renal pelvise ve üretere geçer (38,45).

Distal t b l s n başlangıcı her nefronda afferent ve efferent arteriyoller ile temas halindedir ve bu üç yapı jukstaglomerüler apparatus denen yapıyı oluşturur. Bu apparatusun görevi renin salgılayarak kan basıncı üzerinde etkili olmak, glomerüler filtrasyon ve renal kan akımının regülasyonunu idare etmektir. Jukstaglomerüler apparatusun distal t b l steki değişlik gösteren hücrelerine maküla densa ismi verilir ve distal t b l steki sıvının birleşimine göre jukstaglomerüler apparatusun aktivitesini ayarlar (45,98).

Nefronların temel işlevi istenmeyen maddeleri plazmadan temizlemektir. Bunun için kullanılan mekanizmalar şunlardır:

- 1) Glomerüler Filtrasyon: Glomer ldeki kanın plazmasının bir bölümü (yaklaşık 1/5'i) glomerüler membrandan filtre edilir.
- 2) Tübüler Reabsorpsiyon: Filtre edilen sıvı, tübüllerde ilerlerken su ve diğer gerekli maddeler reabsorbe edilir. İstenmeyen maddeler geri emilmez ve idrar oluşumuna katkıda bulunur.
- 3) Tübüler Sekresyon: Plazmadaki bazı maddeler tübülleri döşeyen epitel hücrelerince doğrudan tübüler sıvı içine sekrete edilir (38,98).

Böbreğin temel fonksiyonları:

- 1) Ekskretuar (İtrah) fonksiyonları; idrar oluşumu
 - *Artık maddelerin eliminasyonu: Metabolik artık maddeler ( re, kreatinin, ürik asit gibi) Ekzojen maddeler (ilaçlar, toksinler ve metabolitleri).
 - *Su dengesinin korunması: Total vücut suyunun korunması, plasma osmolalitesinin korunması.
 - *Elektrolit ve asit baz dengesinin korunması: Sodyum, klorür, kalsiyum, fosfat, potasyum, magnezyum ve asit-baz dengesinin korunması.
- 2) Metabolik Fonksiyonlar

*Hormonlar ve benzeri maddelerin sentezi: Renin, D vitamini, eritropoietin, prostoglandinler, kallikrein-kinin, büyüme faktörleri.

*Peptid yapılı hormonların yıkımı ve katabolizması: İnsülin, glukagon, parathormon, kalsitonin, prolaktin, büyüme hormonu, vazopressin, gastrointestinal hormonlar.

*Düşük molekül ağırlıklı proteinlerin katabolizması: Hafif zincirler, β -2 mikroglobulin...

*Diğer metabolik fonksiyonlar: Glukoneogenez, lipid metabolizması (98).

2. AKUT BÖBREK YETMEZLİĞİ

Akut böbrek yetmezliği, saatler veya günler içerisinde ani olarak böbrek fonksiyonlarının bozulması ve buna bağlı olarak nitrojenöz maddelerin vücutta birikmesi ile karakterize bir durumdur. Böbrek yetmezliğinin ağırlığına ve süresine bağlı olarak, metabolik asidoz, su ve elektrolit dengesinin bozulması gibi metabolik bozukluklar da tabloya eklenebilir. Bu hastaların %20-60'ında diyaliz ihtiyacı olmaktadır (14,54,95). Akut böbrek yetmezliğinin tanımı ile ilgili farklı görüşler olmakla birlikte yakın zamanda The Acute Dialysis Quality Initiative Group, ABY'yi ağırlığına göre 3, klinik sonuçlarına göre 2 kategoriye ayırdığı bir sınıflama geliştirmiştir (Tablo I) (9).

Tablo I: RIFLE SINIFLAMASI

	GFR Kriteri	İdrar çıkış kriteri
Risk	Serum kreatinini 1.5 kat artmış	6 saat, <0.5 mL/kg saat
Hasar	Serum kreatinini 2 kat artmış	12 saat, <0.5 mL/kg saat
Yetmezlik	Serum kreatinini 3 kat artmış veya 44 μ mol/L üzerinde artış olduğunda kreatinin=355 μ mol/L	24 saat <0.3 mL/kg saat veya 12 saat anüri
Kayıp	Böbrek fonksiyonlarının 4 Haftadan daha fazla kaybı	

Akut böbrek yetmezliği, hastaneye başvuran hastaların %5'ini, yoğun bakım ünitelerindeki hastaların %30'unu (14), kardiyopulmoner operasyon geçiren hastaların %4-15'ini (95) ve non kardiyojenik operasyonların ise %25-27'sini oluşturmaktadır (67).

1950'de hemodiyaliz kullanımının başlaması ile birlikte daha önce ABY'e bağlı mortalite %90 iken %50'ye düşmüştür. Ancak son yarım yüzyılda, ABY'in patogenezi daha iyi anlaşılmış olmakla birlikte, mortalitenin azaltılmasında pek bir gelişme sağlanamamıştır. Halen ABY'li hastalarda %50'ye varan bir mortalite söz konusudur. Demografik değişiklikler, ABY gelişen hastaların yaşlarının artmış olması, komorbid hastalıkların giderek artması bu durumdan sorumlu olabilecek bazı nedenlerdir (84,95,100). Mortalite, multiorgan yetmezliği olan hastalarda daha da artarak %80'lere kadar ulaşmaktadır (95).

Yoğun bakım ünitelerinde ABY nadiren izole olarak bulunur (%11-23) ve genellikle başka organ yetmezlikleri duruma eşlik eder (%69-90) (67,100). Burada izlenen hastaların yaklaşık %4.9'unun renal replasman tedavisine ihtiyacı olmaktadır (54)

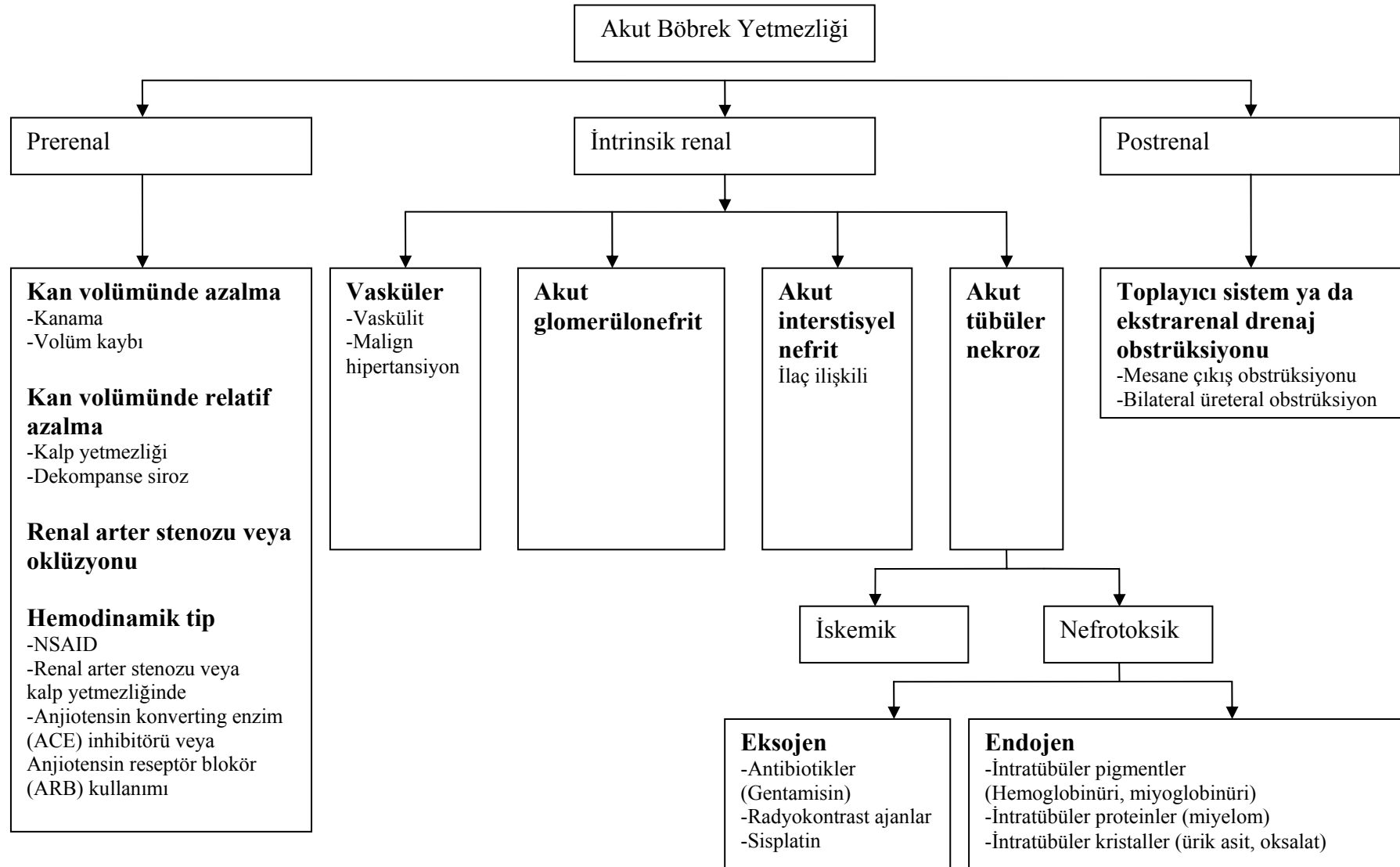
Akut böbrek yetmezliği gelişiminde; ileri yaş, kronik hastalık öyküsü (kardiyovasküler ve pulmoner yetmezlik, neoplastik hastalıklar, siroz), postoperatif dönem, solid organ transplantasyonu, sepsis ve nefrotoksik ajanlara maruziyet gibi risk faktörleri söz konusudur (14,67,95,100). Özellikle hastane kaynaklı gelişen ABY'de sepsis, en önemli risk faktörü olup yaklaşık %48 oranında etyolojide rol oynamaktadır (67). Yine nefrotoksik ajanlar (aminoglikozitler, radyokontrast ajanlar, ACE inhibitörleri, NSAID), yapılan bütün analizlerde ABY gelişiminde önemli bir risk faktörü olarak bulunmuştur (14,67,95,100). Özellikle diyabeti olan hastalar radyokontrast maddelere karşı toksik reaksiyon geliştirmede daha riskli bir grubu oluşturmaktadır (95).

Akut böbrek yetmezliği, oligürik (idrar miktarının günlük 400 ml'nin altında olması) veya nonoligürik olabilir. Yaklaşık %50 hastada görülen oligüri genellikle ağır böbrek yetmezliği

göstergesi olup artmış mortalite ile ilişkilidir (100). Non oligürik ABY prognozunun daha iyi olmasında, birçoğunun ilaç ilişkili ve nefrotoksik orijinli olması ve etyolojik maruziyetin kısa süreli olması suçlanmaktadır (95).

ABYnin etyolojisi patogeneze göre 3 kategoride incelenebilir (Şekil 1) (54).

- 1) Prerenal Azotemi (Prerenal ABY): Akut böbrek yetmezliğinin en sık nedenidir ve böbreğin hipoperfüzyonuna bağlı oluşur. Eğer altta yatan sebep düzeltilirse böbrek fonksiyonları hemen geri döner. Başlangıçta böbrek hasarı yok iken, eğer perfüzyon hemen sağlanmaz ise böbrek hasarı gelişir ve ATN'e ilerler (14,54,95). Toplum kaynaklı ABY'in %70'i, hastane kaynaklı ABY'in ise %40'ını oluşturur (95).
- 2) Akut İntrinsik Böbrek Yetmezliği: Akut böbrek yetmezliğinin %25'ini oluşturur. Böbreğin büyük ve mikrovasküler damarları ile glomerüllerini tutan hastalıklara, tübülointerstisyel hastalıklara, iskemik ve nefrotoksik ATN'e bağlı oluşabilir (14,54,95). Akut tübüler nekroz çoğu zaman ABY ile eş anlamlı olarak kullanılmaktadır. Ancak iskemik ve nefrotoksik ABY'li olguların %20-30'unda ATN'de olduğu gibi tübüler nekroza rastlanmaz (13,14,95). İskemik ve toksik ATN, olguların yaklaşık %90'ını oluşturur (14).
- 3) Postrenal ABY: Tüm ABY olgularının %5'ini oluşturur. Tek bir böbreğin, kreatinin dengesini sağlayacak kapasiteye sahip olması nedeni ile obstrüksiyona bağlı böbrek yetmezliği gelişmesi için bilateral üreterlerde, üretrada veya mesane boynunda tıkanma olması gereklidir (14,54,95).



3. İSKEMİK AKUT BÖBREK YETMEZLİĞİ

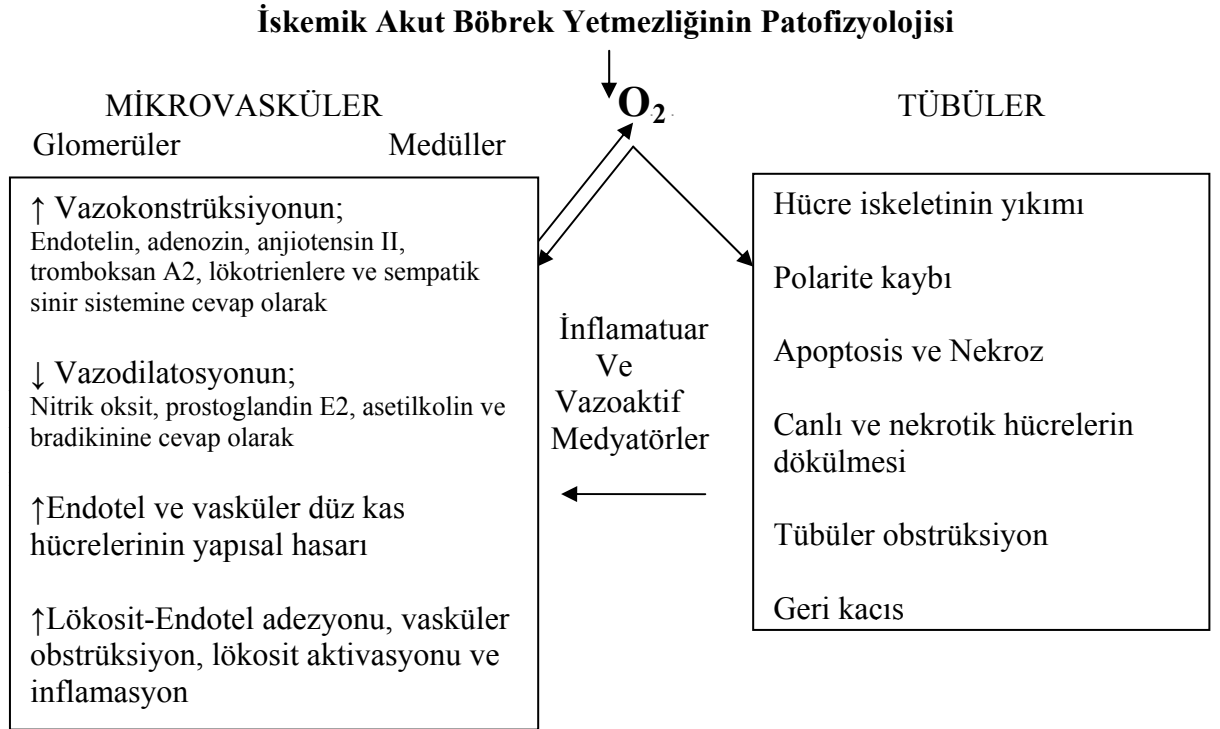
İskemik ABY, prerenal nedenlere ya da intrarenal mikrovasküler vazokonstrüksiyon veya obstrüksiyondan dolayı ani olarak renal kan akımının azalmasına bağlı ortaya çıkar (12,13,54,86). İskemi-reperfüzyon hasarı öncelikle böbreğin hipoksiye duyarlı olan kısmından başlar. Böbreğe gelen kan akımının büyük kısmı renal korteksten geçer ve renal medullanın kanlanmasını sağlayan vasa rectaya çok az kan gider; bu da renal medüllayı hipoksiye daha duyarlı hale getirir (15,34). İskemik hasar tübüler disfonksiyona ve Na^+ kaybına neden olarak, distal kısımlara giden Na^+ miktarını artırır, glomerüler vazokonstrüksiyon ve glomerüler filtrasyonda azalmaya sebep olan tübüloglomerüler feedback denen refleksin aktifleşmesini sağlar. Medüller hipoksi ayrıca hücresel enerji depolarının azalmasına, endotel ve düz kas hücrelerindeki aktin hücre iskeletinin bozulmasına neden olur. Bunun sonucu ise hücresel deformite ve çevre dokularda hipoksinin artmasıdır (34). Prerenal azotemi ve iskemik ABY, renal hipoperfüzyonun aynı spektrumunda yer alan 2 klinik durum olmakla birlikte iskemik ABY’de prerenal azotemiden farklı olarak, hipoperfüzyona bağlı, böbrek hasarı mevcuttur (13,14,54). İskemik ABY çoğunlukla major kardiyovasküler cerrahilerde, transplantasyonda, travma, sepsis ve volüm kaybı ile giden durumlarda görülür (13,95). Renal hasar öncelikle tübülüslerde oluşur ve renal perfüzyon sağlandıktan 1-2 hafta sonra iyileşir, fakat tam restorasyonu 4 haftayı bulabilir (13,86). En ağır haliyle iskemi sonucu bilateral renal kortikal nekroz ve geri dönüşümlü olmayan böbrek yetmezliği gelişir (13). İskemik ABY klinik olarak 3 fazda seyreder (13,14):

- 1) Başlangıç Fazı: Saatler ve günler içinde gelişir. Hipoperfüzyon ile birlikte GFR; intrarenal vazokonstrüksiyon, azalmış glomerüler permeabilite, hücresel artıkların tübüler obstrüksiyonu ve glomerüler filtratın hasarlı tübül epitelinin geri sızması sonucu azalmaya başlar.

- 2) Gelişim fazı: Epitel hücre hasarının oturduğu fazdır. 1-2 hafta sürer. GFR 5-10 ml/dk'da sabitlenir, idrar çıkışı azdır ve üremik komplikasyonlar ortaya çıkar.
- 3) İyileşme fazı: Tübülüs hücrelerinin rejenere olduğu ve GFR'in gittikçe düzeldiği fazdır. Bu dönemde izlenen poliüri, durumu komplike hale getirebilir.

3.1. İSKEMİK AKUT BÖBREK YETMEZLİĞİNİN PATOFİZYOLOJİSİ

İskemik ABY patofizyolojisi oldukça karışık bir durum olup bu konuda halen birçok çalışma yapılmakta ve değişik mekanizmalar öne sürülmektedir (Şekil 2) (11). Bu konunun daha iyi anlaşılabilmesi için konuyu başlıklar halinde incelemek uygun olacaktır.



Şekil 2: İskemik Akut Böbrek Yetmezliğinde mikrovasküler ve tübüler olayların etkileşimi

Hemodinamik Faktörler

Renal kan akımındaki azalma iskemik böbrek hasarının başlaması ve devamında kritik bir öneme sahiptir. Normal fizyolojik koşullarda oksijen basıncı dış korteksten içe, medüllaya doğru gidildikçe azalır (15). Böbrek içi kanlanmasındaki bu bölgesel değişiklik ABY'nin başlangıç fazında olduğu kadar, gelişim fazında da önemli bir role sahiptir. Hem hayvan hem de insan I/R modellerinde, renal reperfüzyon sağlandıktan sonra total renal kan akımında %40-50'lik bir azalma gözlenmiştir (65). Renal kan akımındaki bu kalıcı düşüş insan renal allogreftlarındaki iskemi sonrası GFR düşüşünü de açıklamaktadır (65,99). Bu düşüşün sebeplerinden biri, hasara uğramış olan böbrekte Na^+ absorpsiyonunun azalarak makula densaya giden solüt yükünü arttırması ve bu artmış solüt yüküne bağlı olarak aktifleşen tübüloglomerüler feedback'in neden olduğu kalıcı vazokonstrüksiyondur (11,86,99).

Kan akımında kalıcı düşüş yapan diğer bir mekanizma endotel hasarıdır. Endotel hücrelerinde, aktin hücre iskeleti ve hücreler arası bağlantılarda (junctional complex) bozulmalar, bombeleşme (blebbing) ve adezyon moleküllerinin ekspresyonunda artış olur. Lökosit-endotel etkileşimi endotel hasarını ve hücre şişmesini iyice arttırır, eritrosit ve lökosit akümülyasyonuna neden olur. Kan akımı bozulur ve medüllada şantlar gelişir. Dolayısıyla bu bölgede hipoksi ve hücresel hasar devam eder (11,65,86,99). Endotel hasarının bir diğer sonucu endotel hücrelerince sentezlenen NO azalmasıdır. Nitrik oksitin ABY'deki yeri tartışmalıdır. Nitrik oksit, fizyolojik koşullarda endotelden salgılanır, vazodilatasyon yapar ve endotelin ekspresyonu ile aktivasyonu azalır. Bu yönü ile koruyucu olan NO, I/R sırasında epitel hücrelerinden iskemi bağımlı nitrik oksit sentaz (ischemia induced nitrik oksit synthase) tarafından da sentezlenir. Bu NO, süperoksit anyonu ile birleşerek oluşturduğu peroksinitrit aracılığı ile DNA ve solunum zincirindeki enzimlerin sentezini inhibe eder; tübüler hücrelerin

adezyonunu azaltarak hücrelerin lümen içine dökülmesini dolayısıyla intralüminal obstrüksiyonu artırır (86).

Aktin hücre iskeletinin bozulması ile renal kan akımının otoregülasyonu bozulur. Yine anjiotensin II, tromboksan A2, prostoglandin H2, lökotrienler (C4, D4), endothelin-1, adenozin ve sempatik sinir aktivasyonu gelişim fazındaki vazokonstrüksiyondan ve kan akımının bozulmasından sorumludur (11,86,99).

Tübülüsler

İskemik böbrek hastalığının başlangıç fazında böbrek perfüzyonunun bozulması ile birlikte ABY'e ilerlemesindeki temel olay GFR'deki ani düşüştür (12,13,86,99). Glomerüler filtrasyon hızının azalmasının 3 sebebi vardır; 1) Renal kan akımındaki azalmaya bağlı olarak glomerüler ultrafiltrasyon basıncının azalması, 2) İskemik tübül epitel hücrelerinin bazal membrandan ayrılarak tübül lümeninde oluşturduğu silendir ve birikime bağlı olarak tübüllerin tıkanarak glomerüler filtratın akımını engellemesi, 3) Glomerüler filtratın geriye kaçmasıdır (13,86,99).

İskemik hasar proksimal tübülüsün terminal medüller kısmında ve Henle kulpunun çıkan kalın kolunda en belirgindir. Bunun nedeni bu kısımların aktif solüt transportunun fazla olduğu kısımlar olması ve normal durumlarda da böbreğin rölatif olarak daha az kanlanan bölgesinde olmalarıdır. (12,13,15,86,99). İskemi sırasında proksimal tübüler hücreler ekstrasellüler matriksten ve hücreler arası bağlantıların (junctional complex) bozulması ile birbirinden ayrılarak lümen içine dökülürler. Lümen içinde ise silendir ve birikimler oluşturarak tübüler tıkanmaya neden olurlar (64,99).

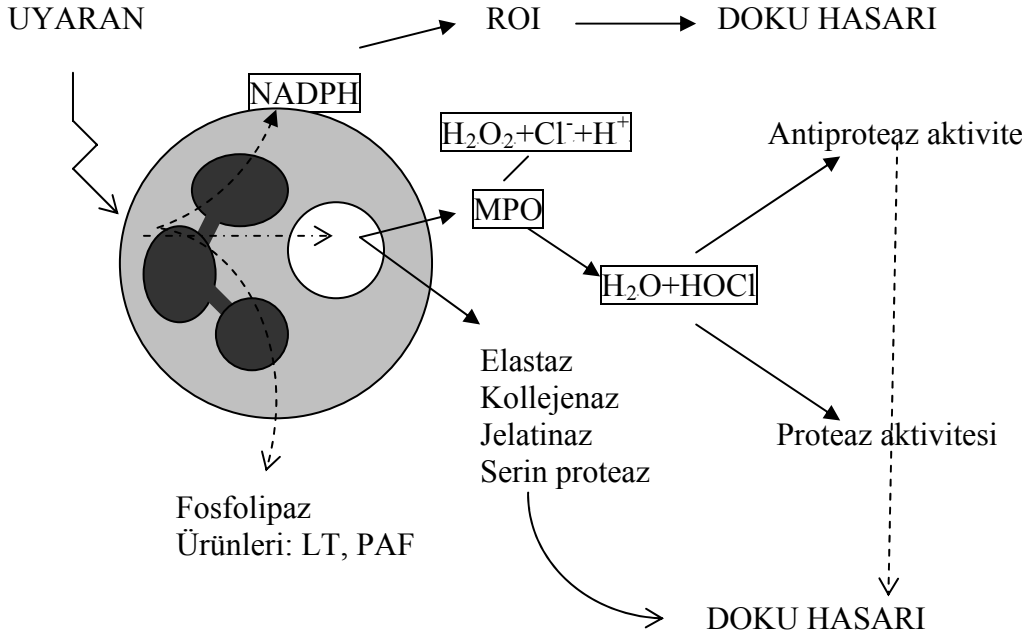
Proksimal tübülüs hücreleri, normalde apikal ve bazolateral kısımlardan oluşan ve bu kısımların kompozisyonları farklı olan polarize hücrelerdir. Apikal bölge çok sayıda mikrovillüs ile amplifiye olmuştur. Mikrovillüslerin ortasında polarize aktin filament bağları

vardır ve bu yapılar villin, ezrin ve miyozin I gibi moleküllerle membrana bağlanırlar (64,99). Bazolateral kısımda daha farklı proteinler ve fosfolipitler ile Na^+/K^+ ATPaz bulunur. Epitel hücre polaritesi, tübül fonksiyonu için (iyon, solüt ve su transportu) gereklidir. Hücreler birbirlerine hücreler arası bağlantılar (junctional complex) (tight junction, adherens junction, desmozom ve gap junction) ile, ekstrasellüler matrikse ise fokal adezyon kompleksi adı verilen integrin adezyon kompleksleri ile bağlıdır (64,86,99). Tight junctionlar hücrelerin apikal ve bazolateral membran kısımlarını ayırarak hücre polarizasyonunu sağlar, su ve solütlerin parasellüler transportunda bariyer görevi yapar. Adherent junction, tight junction'ın bazalinde yer alır. Hücre polaritesinin oluşumuna katkıda bulunur. Adherens junctionlar kalsiyum bağımlıdır ve hücre şekli için gerekli olan aktin hücre iskeletine E-kadherin aracılığı ile bağlanır ve adezyonda rol alır (64,86,99). İskemi-reperfüzyon hasarında ATP azalması ile birlikte hücreler arası bağlantılarda bir kayıp olur. Buna bağlı olarak hücre polaritesi kaybolur ve parasellüler permeabilite artar. Permeabilite artışı glomerüler filtratta geri kaçıışı sağlar (backleak) (53,64,86,99). Ayrıca hücre polaritesinin kaybı ile birlikte membran proteinleri yer değiştirir. Bu proteinlerden özellikle bazolateral bölgede bulunan Na^+/K^+ ATPaz apikal bölgeye geçer ve Na^+ transportu bozulur (52,63). İntraluminal Na^+ artarak distal tübüle giden Na^+ miktarını arttırır. Distal bölgeye giden Na^+ 'nın artması tübüloglomerüler feedback denilen ve afferent arteriolde vazokonstrüksiyona yol açan bir refleks oluşturur. Bu reflekse bağlı olarak GFR'deki düşüş devam eder. Ayrıca Na^+/K^+ ATPaz aktivitesindeki bu bozulma, hücrelerde NaCl ve suyun hücre içinde kalarak hücre şişmesine neden olur (11,86,99). Özet olarak normal epitel hücre fenotipi ve fizyolojisini sağlayan hücreler arası bağlantılar iskemik koşullarda ATP azalması sonucu bozulur ve yukarıda bahsedilen mekanizmalarla GFR'de azalmaya neden olur.

Lökosit İnfiltrasyonu ve Adezyon Molekülleri

Nötrofil, iskemik böbrek hastalığında en çok çalışılan inflamatuvar hücredir. Renal iskemide endotel aktivasyonu, endotel hasarı, endotel-lökosit adezyonu ve kapillerlerde lökosit ve eritrosit tutulumu artar ve renal mikrosirkülasyon bozulur (12,41). Lökosit infiltrasyonu daha çok peritübüler bölgede görülür (62). Ancak insanlarda ABY nedeniyle yapılan renal biyopsilerde hayvan deneylerinden farklı olarak daha az miktarda nötrofil infiltrasyonu görülebilmektedir (34).

Lökositler, adezyon moleküllerinde artış yapan sitokin, reaktif oksijen radikalleri, eikozonoidler gibi moleküller tarafından aktive edilirler. IL-1, -2, -8, -10, -18, TNF- α gibi sitokinler nötrofil deformitesini ve bölgede tutulma eğilimlerini artırırlar (99). Bu tutulan lökositler serbest oksijen radikalleri, eikozonoid ve proteaz sentezleyerek renal hasarı artırırlar. Bu şekilde pozitif bir döngü oluşur (Şekil 3) (40).



NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat hidrojen, ROI: Reaktif oksijen radikalleri, H₂O₂: Hidrojen peroksit, Cl⁻: Klor iyonu, H⁺: Hidrojen iyonu, MPO: Miyeloperoksidaz, H₂O: Su, HOCl: Hipoklorus asit, LT: Lökotrienler, PAF: Platelet aktive edici faktör.

Şekil 3: İskemik Doku Hasarında Lökositlerin Rolü

İskemik renal hasarda nötrofil mi yoksa mononükleer hücre infiltrasyonunun mu daha önemli olduğu konusunda tartışmalar bulunmaktadır. Nötrofil aktivasyonunun inhibe edildiği veya nötrofilden yoksun bırakılan hayvan modellerinin bazılarında doku hasarı engellenmiş olmakla birlikte tüm çalışmalarda aynı sonuç elde edilememiştir (21,34,47,96,102). Bu çelişkinin sebebi olarak; nötrofil tespitinde kullanılan MPO, kloroasetat esteraz ve nötrofil spesifik mAB HIS-48'in makrofajlar ile kros reaksiyona girmesi gösterilmiştir (106). Yine ABY'in geç iyileşme fazında makrofaj ve T lenfosit hücre infiltrasyonunun nötrofil infiltrasyonunun önüne geçtiği izlenmiştir (34,92,93,106) (Tablo II) (34).

Tablo II: İskemi-Reperfüzyon Hasarında Böbreği İnfiltrate Eden Hücreler ve Hasardaki Roller

Hücre Tipi	Böbreğe infiltrasyon fazları			Patogenezdeki rolü
	Başlangıç	Gelişim	İyileşme	
Nötrofiller	++	+	-	Daha çok etkileyici hücre olarak
Makrofajlar	+	++	+/-	Hasar tamirinde etkili
T hücreleri	?	+	++	Erken dönemde modülatuar etkili
B hücreleri	?	+	?	Modülatuar etkili
Plateletler	++	+	?	Erken medyatör

İskemi-reperfüzyon sırasında salınan inflamatuvar medyatörler ile birlikte endotel-lökosit etkileşimini sağlayan ve hem nötrofil hem de endotel hücrelerde eksprese edilen adezyon moleküllerinde artış olur. Adezyon molekülleri integrinler, selektinler Ig ailesi (süperfamily) dir (12,64). Ig ailesi daha çok endotel hücrelerinde eksprese olur ve nötrofil

kemoatraksiyonunda rol alır. Bu ailede yer alan ICAM-1'in renal iskemide hasara katkıda bulunduğu, ICAM-1 knockout farelerde (47) ve ICAM-1'e karşı antikor uygulanan farelerde (31,39) renal iskemik hasarın daha az olması ile gösterilmiştir. L, E, P selektinler sırası ile nötrofil, endotel hücreleri ve trombositlerde eksprese olurlar ve nötrofillerin yuvarlanarak endotele yapışmasında rol oynarlar (64). P-selektinlerin trombositlerde eksprese olması ve yoğun nötrofil infiltrasyonu yapması, trombositlerin de iskemik böbrek hasarında rolü olduğunu göstermektedir (64). L selektinde aynı sonuç elde edilememiş olmakla birlikte, selektinlerin bloke edilmesinin renal I/R'de erken ve geç dönemde renal fonksiyonları koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmiştir (78,88,92,93). E-selektinin de monoklonal antikorlar ile bloke edilmesi ile, postiskemik nötrofil infiltrasyonunu inhibe ederek, iskemik hasardan koruyucu olduğunu gösteren çalışmalar vardır (88). CD11 ve CD18 gibi moleküllerin dahil olduğu integrinler lökositlerde ortaya çıkıp, yapışma ve infiltrasyonda görev alırlar. İntegrinlerin bloke edilmesinin renal iskemi sonrası nötrofil infiltrasyonunu azalttığı gösterilmiş, ancak bunun renal fonksiyonları korumadaki etkisi ile ilgili farklı sonuçlar bulunmuştur (64,77,90).

T Hücreleri

Klasik doku hasarı modellerinde, T hücrelerinin iskemik ABY'de rol almadığı düşünülürken, son zamanlarda yapılan çalışmalarda vasa rectada nötrofil yerine T hücre infiltrasyonu saptanmış (75,105), iskemi sonrası erken ve geç dönemde T hücre infiltrasyonu olduğu gösterilmiştir (4,106). T hücrelerinin önemi $CD4^+/CD8^+$ knockout farelerle yapılan deneylerde, iskemik renal hasarın azaldığının gözlenmesi ile fark edilmiştir. Bu farelerde renal fonksiyonların daha iyi olduğu, tübüler nekrozun ve postiskemik nötrofil infiltrasyonunun azaldığı izlenmiştir (76). T hücre aktivasyonu için gerekli olan CD28-B7

yolunun CTLA4Ig kullanılarak bloke edilmesinin de, renal I/R hasarını azalttığı (91), iskemik hasar sonrası geç organ disfonksiyonunda koruyucu rol oynadığı gösterilmiştir (19). T hücrelerinin öneminin ortaya çıkması ile $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerinin I/R'de rollerinin belirlenmesi için yapılan deneylerde, özellikle $CD4^+$ T hücrelerinin iskemik hasar oluşumunda önemli olduğu saptanmıştır (16,103). Bu sonuçlara rağmen, T hücresi ile birlikte B hücresi knockout fare deneylerinde ise, bu durumun renal I/R'den koruyucu bir etkisi olmadığı görülmüştür (18,70). T hücrelerinin I/R'de etki mekanizması tam olarak bilinmemekte, bu hücrelerin erken dönemde vasküler endotele yapışarak kan akımını bozduğu, daha sonra da tekrar kan dolaşımına girdiği (vur kaç fenomeni) düşünülmektedir (34,105). T hücrelerinin erken dönemde etkili olduğu renal I/R'de olmamakla birlikte diğer organ modellerinde gösterilmiştir (26).

B lenfositleri

Renal I/R'de B lenfositleri ile ilgili yeterli veri olmamakla birlikte, reperfüzyon sonrası erken dönemde B hücre infiltrasyonu olduğu gösterilmiştir (4). Renal I/R'de B hücrelerinin fonksiyonunu değerlendirmek için yapılan hayvan deneyinde, B hücrelerinden yoksun bırakılan farelerde renal fonksiyonların normal farelere göre daha iyi korunduğu ve tübüler hasarın daha az olduğu görülmüştür (17). Ancak, wild tip farelerin serumları B hücrelerinden yoksun farelerin serumları ile yer değiştirildiğinde iskemik hasarın engellenemediği görülmüş ve başka çözünür moleküllerin iskemik hasardan sorumlu olabileceği düşünülmüştür (34) .

Monosit/Makrofajlar

İskemik hasar sırasında makrofajlar böbrek medüllasının dış kısmında toplanırlar (Ysebaert) ve makrofaj kökenli kemoatraktan moleküller (monocyte chemoattractant protein-1) eksperimental hasarda artarlar (34). Makrofajların iskemik hasarda ne derece rol oynadığı ise netleşmemiş olup, I/R öncesi sistemik monosit/makrofaj deplesyonu yapılan hayvan deneyinde IL-6, TNF- α , IL-1 β düzeylerinin, tübüler nekroz ve inflamasyonun azaldığı gösterilmiştir. IL-6'nın inflamasyondaki rolü tartışmalı olmakla birlikte makrofajlardan salınan IL-6'nın, yine makrofajlardan salınan TNF- α , IL-1 β ve MCP-1'in iskemik renal hasarda rolü olduğu düşünülmektedir. (44).

Serbest Radikaller ve Lipid Peroksidasyonu:

İskemik böbrek hasarında, renal perfüzyonun bozulması sonucu oluşan, ve böbrek fonksiyonlarının bozulmasında temel patoloji olan tübüler hasarın yanı sıra, yeniden perfüzyon sağlandıktan sonra üretilen serbest radikaller de önemli bir yere sahiptir (8,35) .

En dış orbitada bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan atom veya moleküle serbest radikal denir. Son orbitadaki bu eşleşmemiş elektrona bağlı olarak, bu atom veya molekül reaktif olup diğer moleküller ile reaksiyona girme eğilimindedir (20,35,79). Oksijen, dış orbitada 2 tane eşleşmemiş elektronu ile biyolojik sistemlerdeki önemli bir serbest radikaldir. Oksijen ile reaksiyona giren moleküllerin oluşturduğu serbest radikaller de biyolojik sistemde önemli bir yere sahiptir (Tablo III)(79).

Tablo III : Serbest Radikaller ve Toksik Metabolitler

Toksik Oksijen Metabolitleri	
Oksijen Merkezli Serbest Radikaller	
Moleküler oksijen	O_2
Süperoksit radikali	$O_2^{\cdot -}$
Hidroksil radikali	$OH^{\cdot}$
Alkoksil radikali	$RO^{\cdot}$
Peroksil radikali	$ROO^{\cdot}$
Oksijen Merkezli Olmayan Serbest Radikaller	
Karbon merkezli	
Lipid radikali	$L^{\cdot}$
Alkoksil radikali	$R^{\cdot}$
Sülfür merkezli	
Thiyl	$R-S^{\cdot}$
Hidrojen merkezli	
Hidrojen atomu	$H^{\cdot}$
Demir merkezli	
Perferil radikali	$Fe^{+3}-O_2-Fe^{+2}$
Radikal Olmayan Toksik Metabolitler	
Ozon	O_3
Hidroperoksitler	
Hidrojen peroksit	H_2O_2
Lipid peroksit	$LOOH$
Hipoklorik asit	$HOCL$
Kloraminler	$R'RNCL$

Eğer moleküler O_2 'ye bir elektron eklenirse süperoksit ($O_2^{\cdot -}$), 2 elektron eklenirse de hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşur. Biyolojik sistemlerde H_2O_2 çoğunlukla iki $O_2^{\cdot -}$ molekülünün reaksiyona girmesi ile oluşur. Hidrojen peroksit serbest bir radikal olmamakla birlikte kimyasal olarak reaktif olması nedeni ile reaktif oksijen türü olarak kabul edilmektedir (20,35). Süperoksit ve hidrojen peroksit demirin katalitik etkisi ile reaksiyona girerek oldukça toksik ve reaktif olan hidroksil ($OH^{\cdot}$) radikalini oluştururlar. Bu reaksiyona Haber-Weiss Reaksiyonu denir (20,35) .



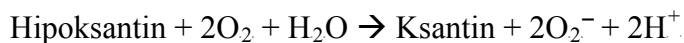
Oksijen kaynaklı serbest radikaller dışında diğer önemli bir grup, karbon kaynaklı serbest radikallerdir ($R\bullet$). Bu radikaller lipid, nükleik asit, karbonhidrat veya protein gibi moleküllerin yapısında bulunan karboksil (RH) gruplarını, oksijen kaynaklı radikallerin harekete geçirmesi ile oluşturlar. Oksijen ile oluşan bu reaksiyonda peroksil radikali ($ROO\bullet$) oluşur. Peroksil radikalleri daha sonra alkoksil radikali oluşturan reaksiyona katılırlar (20,35,79).

Serbest radikallerin endojen ve eksojen kaynakları olup, hücrel metabolizma sırasında sürekli olarak üretilmektedir. Mitokondrial elektron transport zinciri, oksidan enzimler (Ksantin oksidaz, siklooksijenaz), fagositler, nötrofiller, Fe^{+2} ve epinefrin'nin hücrel otooksidasyonu endojen kaynaklar olup, okside ilaçlar (CCl_4 , asitaminofen), sigara, radyasyon, glutasyonu oksidize eden maddeler ise eksojen kaynaklardır (35).

Renal I/R hasarının oluşumunda rol oynayan serbest radikalleri oluşturan sistemler;

1) Mitokondrial elektron transport zinciri; normal şartlarda hücrel metabolizmada serbest radikaller üretilmektedir. Oksidatif fosforilasyon sırasında ATP üretimi için moleküler O_2 suya dönüşür. Fakat O_2 'nin %1-5'i bu yoldan kaçarak serbest oksijen radikallerinin olduğu başka biyokimyasal yollara katılır (79). Ayrıca mitokondrial elektron transport zinciri ve otooksidasyon da serbest radikal üretimine katkıda bulunur. İç mitokondrial membranda yer alan elektron transport enzim kompleksi H_2O_2 üretirken, ubiquinone-cytochrom b bölgesi O_2^- üretiminden sorumludur. Mitokondrial solunum arttığında serbest radikal üretimi de artmaktadır. Ayrıca hipokside olduğu gibi terminal sitokrom azaldığında da mitokondrial elektron transport zincirinde O_2^- üretimi artmaktadır (35).

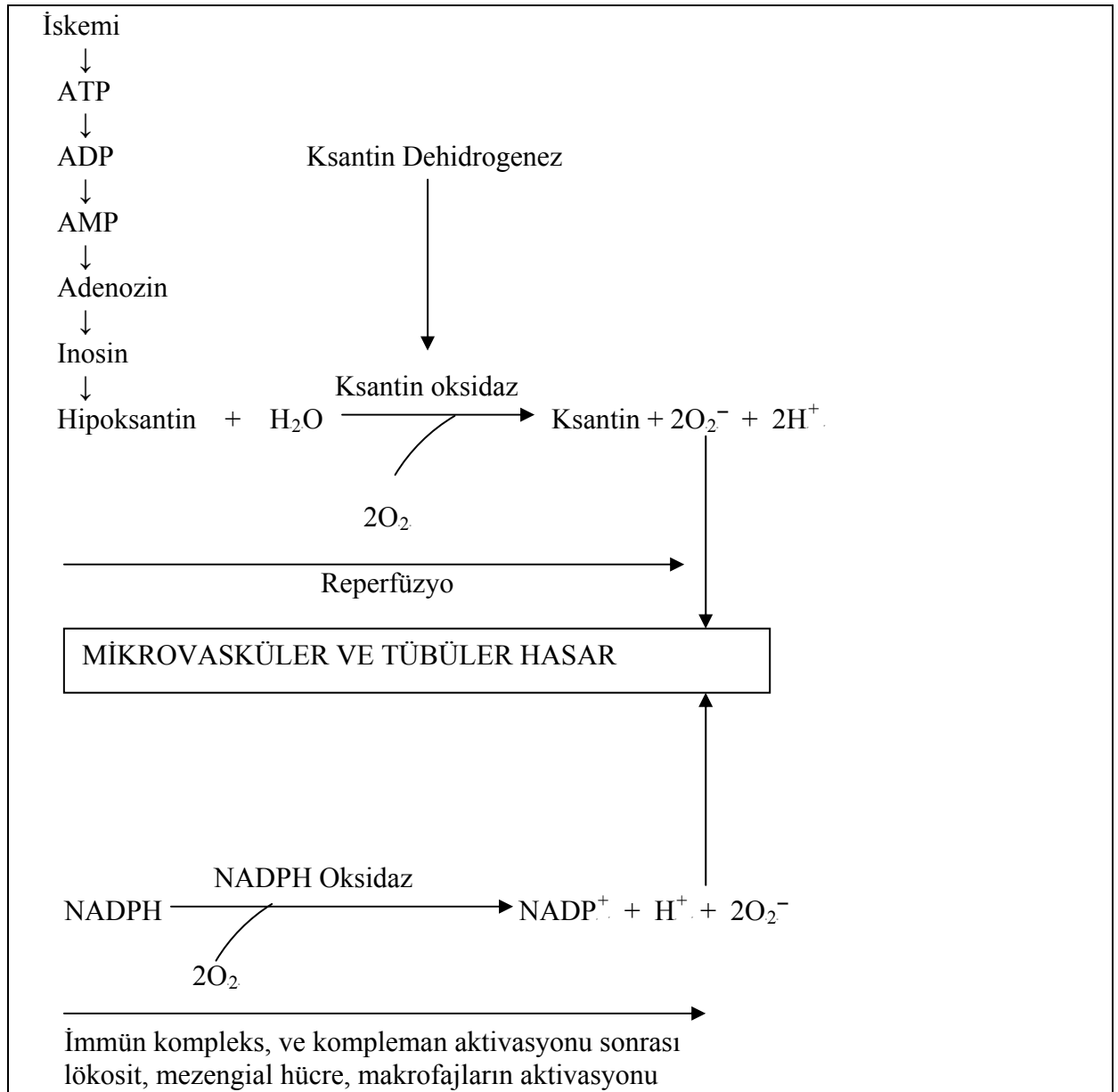
2) Enzimler ve proteinler; sitoplazmik bir enzim olan ksantin oksidaz purin metabolizması sırasında O_2 'nin indirgenmesi ile O_2^- üretir.



Ksantin oksidaz normal dokularda ksantin dehidrogenaz (tip D) olarak sentezlenir. Ksantin dehidrogenaz hipoksantinin ksantin ve ürik aside dönüştürülmesi sırasında NAD^{+} 'yi elektron alıcısı olarak kullanır ve dolayısıyla radikal üretmez. Ksantin dehidrogenazın homojenizasyonu sırasında ksantin oksidaz (tip O) oluşur ve ksantin oksidaz elektron alıcısı olarak NAD^{+} yerine moleküler oksijen kullanır. Bu da serbest oksijen radikali üretimi ile sonuçlanır. Renal iskemi sırasında, tip D irreverzibl olarak tip O'ya dönüştürülür ve bunun için 30 dakikalık bir iskemi yeterli olmaktadır. Ayrıca iskemi sırasında, membran iyon gradientindeki bozulmaya bağlı olarak da kalsiyum hücre içine girer. Sitoplazmada artmış olan kalsiyum konsantrasyonu ksantin dehidrogenazı ksantin oksidaza çeviren proteazları aktive eder. İskemi ile eş zamanlı olarak yeterli O_2 sağlanamaması nedeni ile ATP üretimi azalır ve AMP konsantrasyonu artar. AMP bir sonraki aşamada adenozin, inozin ve hipoksantine dönüştürülür. Reperfüzyon sırasında moleküler oksijen artışı ile birlikte hipoksantin oksidize edilir ve O_2^- oluşur (8,35) (Şekil 4) (8).

3) Fagosit ve nötrofiller önemli serbest radikal kaynaklarıdır. Aktive fagositler bakterisidal rolleri gereği O_2^- , H_2O_2 ve diğer serbest oksijen radikallerini üretirler ve bakteri ile karşılaştıklarında bu radikalleri hücre dışına bırakırlar (20). Nötrofil membranında bulunan NADPH bağımlı oksidaz sistemi etkili bir O_2^- kaynağıdır (Şekil 4). Normalde aktif olmayan bu enzim bakteri, mitojen veya sitokin ile karşılaştığında aktif hale dönüşerek O_2^- üretimine başlar. Süperoksit kendisi toksik olmamakla birlikte bu sistemde etkisini hipoklorik asit üretimi ile gösterir. Hipoklorik asit MPO enziminin katalize ettiği bir reaksiyonda, H_2O_2 ve klorid iyonlarından meydana gelir. (79).

4) Plazma membranında araşidonik asitin prostoglandin, tromboksan ve lökotriene dönüşümünden sorumlu olan lipooksijenaz ve siklooksijenaz gibi enzimler yer alır. Bu reaksiyonlar sırasında serbest yağ asiti radikalleri oluşur (35).



Şekil 4: İskemi-Reperfüzyonda Serbest Radikal Üretimi

5) Hücre içindeki spontan bazı reaksiyonlar; hücre içinde pek çok çözünür sitozolik moleküller oksidasyon-redüksiyon reaksiyonuna uğrar. Tioller, hydroquinonlar ve katekoller redoks reaksiyonuna girerek O₂⁻ üretimini sağlarlar. Tiol ve askorbat Fe⁺³'ü Fe⁺²'ye indirger. Fe⁺²'nin otooksidasyonu sırasında O₂⁻ oluşur. O₂⁻'nin spontan dismutasyonu ile de H₂O₂ oluşur (35).

6) Endoplazmik ve nükleer membranlar serbest radikal üretiminde rol alan diğer hücresel yapılardır. Bu membranlarda, yağ asitlerini oksidize ederek serbest radikal üreten sitokrom p-450 sistemi bulunmaktadır (35).

7) Yine flavaproteinler ve peroksizomlar serbest radikal üretiminde önemli kaynaklardır (35).

Serbest Radikallere Bağlı Hücresel Hasar:

Serbest radikaller hücredeki herhangi bir biyokimyasal komponent ile reaksiyona girebilir. Lipidler, proteinler ve nükleik asitler bu komponentlerden en önemlileridir. Radikaller oldukça reaktif oldukları için ilk karşılaştıkları poliansatüre yağ asitlerinden zengin hücre membranları ile reaksiyona girerler. Bu reaksiyon lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve yağ asitlerinin oksitlenmesine neden olan bir dizi zincirleme reaksiyondan oluşur. Lipid peroksidasyonu sadece poliansatüre yağ asitinin yapısını değiştirmekle kalmaz, önce yağ asit radikali sonra sırası ile yağ asiti peroksil radikalinin ($\text{LOO}\bullet$) ve lipid hidroperoksitin (LOOH) oluşumuna neden olur. Bütün bu reaksiyonların sonucunda ise MDA gibi aldehytler ve kısa zincirli alkanlar oluşur. Lipid peroksidasyonu hücre membran bütünlüğünü bozarak membran permeabilitesinde artışa ve iyon transportunda bozulmaya; mitokondri membran bütünlüğünü bozarak oksidatif fosforilasyonu sağlayan elektron transportunda bozulmaya; lizozomal membran permeabilitesini arttırarak enzimlerin sitoplazmaya çıkıp hücre hasarı yapmasına neden olur. Ayrıca lipid peroksidasyonu ile açığa çıkan aldehytler de hücre hasarına katkıda bulunur (20,35,79).

Protein ve nükleik asitler serbest radikallere poliansatüre yağ asitlerinden daha az duyarlıdır. Yapısal ve enzimatik proteinler serbest radikallere bağlı denatüre olurken, nükleik asitlerde direkt hasar oluşur. Nükleik asit hasarı sonucunda DNA'da baz hidroksilasyonu, çapraz bağlanmalar veya kopmalar oluşur. Sonuçta çeşitli mutasyonlar ya da hücre ölümü meydana gelir (20,79).

Serbest Radikallere Karşı Korunma Mekanizmaları:

Normal şartlarda da üretimi olan serbest radikallerinin zararlı etkilerinden organizmayı korumak üzere antioksidan olarak adlandırılan korunma sistemleri mevcuttur. Bu sistemleri endojen ve eksojen antioksidan korunma mekanizmaları olarak ikiye ayırabiliriz.

1) Endojen antioksidan korunma mekanizmaları: Aerobik organizmalarda birçok mekanizma mevcuttur (Tablo IV) (79).

Tablo IV: Serbest Radikallere Karşı Hücre İçi Korunma Mekanizmaları

Endojen Antioksidan Korunma Mekanizmaları
Enzimatik Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi Süperoksit dismutaz Katalaz Glutasyon peroksidaz Non-enzimatik Membranöz α - tokoferol β -karoten Non-membranöz Askorbik asit Ürat Sistin Seruloplazmin Transferrin Albumin

Hücreler yapısal olarak serbest radikal reaksiyonlarının reaktanlarını ayırmak üzere organize edilmiştir. Örneğin serbest radikal üretiminde katalizör olarak yer alan demir, ferritin ve transferrin gibi proteinler tarafından inaktif olarak tutulur (79).

Serbest oksijen radikallerine karşı majör korunma sistemi antioksidan enzim sistemidir. Bu enzimler $O_2^{\cdot-}$ 'ni moleküler oksijen ve H_2O_2 'ye dönüştüren reaksiyonu katalizleyen SOD ve

H_2O_2 'yi suya dönüştüren reaksiyonları katalizleyen katalaz ve glutatyon peroksidazdır (20,35,79).

SOD enzimi değişik şekillerde, mitokondrial matrikste, sitoplazmada, nükleusta, lizozomda, peroksizomda ve ekstrasellüler sıvıda bulunur. Mitokondriadaki enzimin aktif bölgesinde mangan bulunurken sitoplazmada ve diğer kısımlarda yer alan SOD'un aktif bölgesinde bakır ve/veya çinko bulunur (27,79).

Katalaz H_2O_2 'i direkt olarak suya çevirir ve bu reaksiyonda sekonder bir toksik ara ürün oluşmaz. Katalaz H_2O_2 konsantrasyonu arttığında devreye girerken, düşük konsantrasyonlarda glutatyon peroksidaz H_2O_2 'i parçalar (20,35,79).

Serbest radikallere karşı korunma mekanizmalarından bir diğer serbest radikalleri elimine eden sistem; radikal tutucu (scavenger) olarak bilinen ve enzim olmayan moleküllerin oluşturduğu sistemdir. Alfa tokoferol (vitamin E) lipid peroksil radikallerine hidrojen aktararak lipid peroksidasyonunda zincirleme giden reaksiyonu inhibe eder. Beta karoten serbest oksijeni tutar. Nonmembranöz (Aqueous) serbest radikal tutucusu olan askorbik asit (vitami C) serbest radikalleri tutması yanı sıra vitamin E rejenerasyonunda rol oynar. Yine plazmadaki ürik asit ve hücre içinde yer alan glutatyon, sistin, seruloplazmin ve transferrin radikal tutucu etkiye sahip diğer moleküllerdir (20,79).

Üçüncü antioksidan korunma mekanizması, onarıcı etkidir. Serbest radikallere bağlı oluşan hasarlanmış nükleik asitler bazı enzimler tarafından onarılırken, oksidasyona uğrayan proteinler proteolitik sistemlerce, membran lipidleri ise lipaz, peroksidaz ve açıl transferaz tarafından metabolize edilerek temizlenir (20) .

2) Eksojen antioksidan korunma mekanizmaları: Eksojen antioksidan ajanlar serbest radikal hasarını daha önce açıklanan endojen mekanizmalar (oksijen kaynaklı serbest radikal

üretiminin engellenmesi, oluşan radikallerin tutulması, endojen antioksidan koruma mekanizmalarının arttırılması (augmentation)) aracılığı ile önlerler (Tablo V) (79)

Tablo V : Eksojen Antioksidanlar

Eksojen antioksidanlar	
Enzim İnhibitörleri	Etkilenen moleküller
Ksantin oksidaz inhibitörleri Allopurinol, oksipurinol, folik asit Pterin aldehit, tungsten	Ksantin oksidaz
Diğer inhibitörler Soyafasülyesi tripsin inhibitörü	Ksantin Dehidrogenaz
NADPH oksidaz inhibitörleri Adenozin, lokal anestezikler Nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar Kalsiyum kanal blokörleri Cetiedil CHIP (crude hyphal inhibitory product) NADPH oksidaza karşı monoklonal antikorlar	NADPH oksidaz
Süperoksit dismutaz Native SOD, IgA hinge-linked SOD Polietilen glikol polimer (PEG)-SOD Liposome encapsulated SOD	O_2^-
SOD'u taklit edenler Cu-Diisopropilsalisilik asit türevleri (CuTIM, CuDIM, Cu α , MeTIM) Desferal Mn, Siklik nitroksitler	O_2^-
Katalaz Native katalaz, PEG-katalaz, Liposome encapsulated katalaz	H_2O_2
Diğer nonenzimatik serbest radikal tutucular Mannitol Albumin Dimetil sülfoksit Dimetiltioüre Lazaroids	OH• LOOH, HOCL OH• OH, H_2O_2 , HOCL LOOH, O_2^-
Demir redoks siklusunun inhibitörleri Deferoksamin, seruloplazmin	Fe ⁺³
Glutasyon peroksidazın aktivitesini düzenleyiciler Oltipraz, Ebselen, Glutasyon, N-asetilsistein	GSH
Nötrofil adezyon inhibitörleri CD11/CD18 kompleksine karşı monoklonal antikorlar Çözünür GMP	Nötrofil

Renal Hastalıklarda Serbest Radikallerin Yeri:

Eksperimental modellerde reaktif oksijen radikallerinin iskemik toksik ve immün aracılı hasarda önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (8). Renal vazokonstriksiyon, GFR’de ani düşüş, tübüler hasar ve obstrüksiyon, glomerüler filtratın geri kaçıışı gibi mekanizmaları içeren iskemik böbrek yetmezliği kompleks bir sendromdur. Renal arter oklüzyonu veya intrarenal norepinefrin infüzyonu yapılan hayvan modellerinde reaktif oksijen radikallerinde artış olduğu gösterilmiştir (8). İn vitro olarak hipoksiye maruz bırakılan daha sonra da reoksijenize edilen proksimal tübül epitel hücre kültürlerinde reaktif oksijen radikallerinin (O_2^- , H_2O_2 , $OH\bullet$) üretiminde artış olduğu ve bu radikallerin lipid peroksidasyonu aracılığı ile hücre hasarında rol oynadığı gösterilmiştir (8). Normal koşullarda da üretilen O_2^- , H_2O_2 ve $OH\bullet$ radikallerinin üretimi anoksi ve reoksijenizasyonda sırası ile %352, %326 ve %145 artmaktadır. Bu artış reoksijenizasyonun özellikle ilk 5 dakikasında olmaktadır (35). Serbest oksijen radikallerindeki bu artışa rağmen bu moleküllerin detoksifikasyonunda rol oynayan SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinde bir azalma söz konusudur. Renal I/R hasarında 30 dakikalık iskemi sonrasında 2 ve 24 saatlik reperfüzyon uygulandığında SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinin etkilenmediği; 60 ve 90 dakikalık iskemi uygulandığında ise enzimlerde belirgin bir azalma olduğu gözlenmiştir (27).

Reaktif oksijen radikallerinin çok reaktif olmalarına bağlı olarak yarı ömürlerinin kısa olması renal I/R sonrası serbest oksijen radikallerinin direkt olarak ölçümünü zorlaştırmaktadır. Bu nedenle bu moleküllerin renal iskemideki rolleri indirekt olarak lipid peroksidasyonunda açığa çıkan etan, MDA gibi ürünlerin ölçümü ile olmaktadır (8,35). İskemi sonrası böbrek hasarında reaktif oksijen radikallerinin rol oynadığını gösteren diğer bir olay da iskemi öncesi antioksidan infüzyonunun I/R’de fonksiyonel ve histolojik hasar oluşumunda koruma sağladığının gösterilmiş olmasıdır (8). Örneğin iskemi öncesi ve

reperfüzyon sırasında SOD infüzyonunun böbrek hasarını azalttığı görülmüştür (35,43). Süperoksit dismutazın $O_2^{\cdot-}$ detoksifikasyonunu sağladığını düşünecek olursak bu buluş I/R sırasında $O_2^{\cdot-}$ radikalinin arttığının bir göstergesidir (35). Hidrojen peroksit detoksifikasyonunda önemli bir yere sahip olan katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri ile yapılan çalışmalarda bu enzimlerin inhibe edilmesinin iskemik renal hasarı arttırdığı görülmüştür. Bu da $O_2^{\cdot-}$ gibi H_2O_2 'nin de I/R'de önemli olduğunun göstergesidir (8).

Böbreklerde yaklaşık 30 dakikalık bir iskemi sonrası ksantin dehidrogenaz, ksantin oksidaza çevrilmektedir. Renal iskemide, ksantin oksidaz inhibitörü olan allopurinol infüzyonu ve tungsten suplementasyonunun koruyucu etkilerinin bulunmuş olması, ksantin oksidazın $O_2^{\cdot-}$ kaynağı olduğunu göstermektedir (35).

İskemik renal hasarında H_2O_2 ve $O_2^{\cdot-}$ 'in etkileri yanı sıra bu iki molekülün reaksiyona girmesi ile oluşan $OH\cdot$ 'nin de bu hasarda yer aldığı $OH\cdot$ tutucusu olarak bilinen dimetilsülfoksit, dimetiltioüre, indirgenmiş glutatyon moleküllerinin iskemik hasarı azalttığının gösterilmesi ile tespit edilmiştir (35).

Renal İskemi-Reperfüzyonda Sitokinler

İskemik renal hasarda makrofajlar, lökositler ve endotel hücreleri yanı sıra renal tübüler hücrelerde de inflamasyonu arttıran proinflamatuvar sitokinler üretilir (12). Renal iskemide oksijen radikalleri, stres ile aktive kinaz olan p38MAP (Mitogen activated kinase)'ı, p38MAP kinaz ise nükleer faktör-kB (NFkB)'yi aktive eder. Bir transkripsiyon faktör olan NFkB, TNF- α ve IL-1 üretiminde rol oynar (28,61). TNF- α glomerüler kan akımını, glomerüler filtrasyon hızını azaltır; glomerüler albumin permeabilitesini artırır; glomerüler fibrin depozisyonunu indükler; serbest oksijen radikali, IL-1 gibi endojen pirojen ve diğer proinflamatuvar sitokinlerin üretimini stimüle eder; nötrofil ve monosit infiltrasyonunu

(recruitment) artırır; ICAM-1 ve L-selektin ekspresyonunu artırır; hücrel apoptosisi indükler (30). İnsan dimerik reseptörlerinin (TNF bağlayan proteinler) TNF aktivitesini inhibe ederek renal allogreft survisini uzatması anti-TNF tedavilerini renal I/R'de önemli bir opsiyon haline getirmektedir (30). Renal I/R'de, immün ve inflamatuvar cevapların regülasyonunda rol alan IL-6 sekresyonunda da artış olur. IL-6 knockout ve IL-6 antikoru verilen farelerde ICAM-1, P selektin gibi adezyon moleküllerinde, TNF- α ve IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinlerde, dolayısıyla iskemik renal hasarda azalma görülmüştür (71). İskemi-reperfüzyonda bu sitokinlerin yanı sıra IL-1, IL-2, TNF- α , TGF- α , IFN- γ üretiminde de artış olmaktadır (56,93).

3.2. İSKEMİK AKUT BÖBREK YETMEZLİĞİNİN PATOLOJİSİ

İskemik ABY'nin klasik patolojik özelliği tübül epitelinin yama tarzında, fokal nekrozu ve bazal membrandan ayrılmasıdır. Bu değişiklikler daha çok kortikomedüller bileşkedeki tübüler segmentlerde belirgindir. Bununla birlikte, tübül epitel rejenerasyonu, nekroz veya hücre bütünlüğünün bozulması, intratübüler silendir, interstisyel ödem ve hücre infiltrasyonu hatta tübüler kollaps ve dilatasyon gibi bulgulara rastlanabilir. Tübül lümeninde eozinofilik hiyalin ve pigmente granüler silendir ile bir tıkaç oluşur. Bunlar Tamm-Horsfall mukoproteini ile birlikte hemoglobin ve diğer plazma proteinlerinden oluşurlar. Lökosit infiltrasyonu çoğunlukla vasa rectada izlenir. Karakteristik olarak intrarenal kan damarları ve glomerüller, yaygın damar içi pıhtılaşma ve uzun süreli iskemi mevcut değilse normaldir (13,50).

Nefrotoksik ABY'de ise morfolojik değişiklikler daha çok prokimal tübüllerin düz ve kıvrımlı kollarında belirgindir. Tübüler hücre nekrozu daha az belirgindir (13,50).

Nefrotoksik ve iskemik ABY'nin patolojilerindeki farklılıklara rağmen klinik olarak benzer durumlardır. Akut böbrek yetmezliği düzeldikten sonra yapılan böbrek biyopsisi normal olarak bulunur (13,50).

4. İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARININ RENAL TRANSPLANTASYONDAKİ ETKİLERİ

Renal transplantasyon tedavisinde, çalışmalar daha çok akut rejeksiyonun önlenmesine odaklanmış ve sonuç olarak akut rejeksiyon oranları %20'in altına indirilerek 1 yıllık renal allograft survisi %80'lerin üzerine çıkarılmıştır. Bu gelişmeler greftin uzun dönem survisini arttırmaya yetmemiş, kronik allograft nefropatisinin önüne geçilememiştir(87). Uyumsuz HLA (Unrelated) canlı vericilerden yapılan renal transplantasyon sonuçlarının HLA uyumlu kadavralardan yapılan transplantasyon sonuçlarına göre daha iyi olması, renal transplantasyonda immunolojik faktörler dışında mekanizmaların olduğunu da düşündürmektedir (87,97). İskemik-reperfüzyon hasarı da, erken ve geç dönemde greft fonksiyonlarını etkileyen önemli bir nonimmünolojik faktördür. Renal greftin iskemisi, donörden greftin alınması öncesi ve sırasında gelişen sıcak iske mi ile greftin alındıktan sonra korunması ve alıcıya takılarak revaskülarizasyona kadar geçen süreyi kapsayan soğuk iske mi dönemlerinden oluşmaktadır (97). Soğuk iske mi sonrası renal allotransplantasyon yapılan hayvan deneyinde tek başına siklosporin veya antiiske mik tedavi ile önlenemeyen yüksek bir mortalite gözlenirken, her iki tedavi birlikte verildiğinde mortalite görülmemiş, makrofaj ve T hücre infiltrasyonunun ve uzun dönemde proteinürünün azaldığı izlenmiştir. Bu da soğuk iske minin greft fonksiyonu açısından önemini göstermektedir (36,51). Nefroktomi yapılan ratlarda sıcak iske mi sonrası; 24. saatte tübüler hücrelerin bazal membrandan ayrılması, silendir oluşumu ve böbrekte ödem; 72. saatte ekstrasellüler matrikste artış, interstisyel hücre infiltrasyonunda artış, silendir oluşumunun daha da artması, kortekste eritrosit infiltrasyonu,

tübüler bazal membran ve Bowman kapsülünde kalınlaşma izlenmiş ve 8. günde tübüler silendirlerde azalma olmakla birlikte bu değişikliklerin en üst düzeyde olduğu gözlenmiştir (33). Uzun dönemde ise glomerüloskleroz, interstisyel fibroz, tübüler atrofi ve interstisyel infiltrasyon gözlenmiştir (7,33).

Deneysel ve klinik çalışmalarda, I/R hasarının önlenmesi renal transplantasyon sonuçlarını iyileştirmekte ve bunun için değişik yöntemler denenmektedir (Tablo VI) (72)

Tablo VI: Renal Transplantasyonda İskemi-Reperfüzyon Hasarını Önlemeye Yönelik Statejiler

İskemi-Reperfüzyon Hasarını ve Gecikmiş Greft Fonksiyonunu Önlemeye Yönelik Stratejiler

Koruma Solüsyonları

- Wisconsin Üniversitesi Solüsyonu
- Histidin-Triptofan-Ketoglutarat solüsyonu
- Celsior Solüsyonu

Alıcının Sıvı Tedavisi

- Kolloid ve kistalloidlerle volüm genişletilmesi
- Mannitol veya furosemid

Vazodilatör Ajanlar

- Kalsiyum kanal blokörleri
- Prostatiklin
- Atrial natriüretik peptit
- Selektif veya non-selektif endotelin reseptör antagonistleri

Antioksidanlar

- Hem-oksijenaz-1 indüksiyonu veya greftte aşırı ekspresyonu
- N-Asetilsistein
- Propionil-L-Karnitin
- Indüklenebilir NO sentaz inhibitörleri

Antiinflamatuvar Ajanlar

- Platelet aktive edici faktör reseptör antagonistleri
- TNF-alfa monoklonal antikorları
- Sitokin antagonistleri veya inhibitörleri (IL-1, 10, 13, CXCL-8, MCP-1)
- ICAM-1 ve lökosit fonksiyon-ilişkili antijen-1'e karşı antikorlar
- Çözünür P-selektin glikoprotein ligandı
- İmmünsüpresanlar (CTLA4-Ig füzyon proteini, mikofenolat mofetil)
- Kompleman inhibitörleri
- Statinler

Büyüme Faktörleri

- İnsülin benzeri büyüme faktörü

5. EVEROLİMUS

Everolimus renal transplantasyon hastalarında immünsüpresif tedavide yeni yeni kullanıma giren makrolid grubu bir antibiyotiktir. Solid organ transplantasyonu yapılan hastalarda kullanılmakta olan sirolimusun oral biyoyararlanımını arttırmak için geliştirilmiş, bir sirolimus (rapamisin) derivativesidir (5,49,94). Everolimus hücre içine girdikten sonra bir immunofilin olan FK506-binding proteine (FKBP12) bağlanır. Everolimus-FKBP12 kompleksi mammalian TOR (target of rapamycin) adı verilen kinaza bağlanarak p70 S6 kinazın aktivasyonunu inhibe eder. Sonuçta hücre siklusu G1'den S fazına geçiş arasında durur ve hücre proliferasyonu inhibe olur. Ayrıca IL-2 reseptörü ve CD28 bağımlı yolları inhibe ederek de T ve B hücre proliferasyonunu inhibe eder (5,94). Everolimus sadece hematopoietik hücre proliferasyonunu değil ayrıca vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu da inhibe eder. Bu şekilde kronik renal allograft nefropatisi ile ilişkili olan uzun dönem vasküler reaksiyonu inhibe eder (5,85). Everolimus ile aynı etki mekanizmasına sahip olan sirolimusun I/R'den koruyucu etkisi ince barsakta çalışılmış ve sirolimusun T-hücre sinyal yolundan bağımsız olarak ince barsak iskemisinde hücre koruyucu ve antiinflamatuvar mekanizmalarla koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (74).

Everolimusun oral yararlanımı (%16) düşük olmakla birlikte sirolimusun oral yararlanımından (%10) daha fazladır. Everolimus oral alındığında hızlı emilmekte olup 7 günde kararlı düzeye ulaşır. Karaciğerde sitokrom P450 sistemi tarafından metabolize edilip %98'i safra, %2'si idrar ile atılır. Eliminasyon yarı ömrü 18-35 saattir. Hipertrigliseridemi, hiperkolestrolemi, oportunistik enfeksiyonlar, trombositopeni ve lökopeni sık görülen yan etkilerdir (49)

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu onayı alındıktan sonra Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında yapılmıştır. Biyokimyasal analizler Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı, patolojik incelemeler ise Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada toplam 46 adet erişkin 200-250 gram ağırlığında Wistar albino erkek sıçan kullanıldı. Deney öncesi tüm hayvanlar standart yem ve su ile beslendi. Denekler toplam 3 gruba ayrıldı.

Grup I: Kontrol grubu: Bu gruptaki deneklere herhangi bir tedavi verilmedi. Kontrol grubu olarak değerlendirildi. Bu deneklere laparotomi uygulanarak kan ve böbrek dokusu örnekleri alındı.

Grup II: İskemi-Reperfüzyon Grubu: Bu gruptaki deneklere herhangi bir tedavi verilmedi. Laporotomi sonrası bilateral renal arterlere klemp konarak 45 dakika boyunca iskemi uygulandı. Deneklerin 11 tanesinde 2 saatlik, 7 tanesinde ise 24 saatlik reperfüzyon sonrasında laparotomi yapılarak kan ve böbrek dokusu örnekleri alındı.

Grup III: Tedavi Grubu: Bu gruptaki deneklere 7 gün boyunca 1.5 mg/kg/gün peroral everolimus tedavisi uygulandı. Everolimus'un (Novartis A.Ş.'nin hediyesi) suda eriyen oral formları tedavi grubuna gastrik gavaj ile oral yoldan her gün aynı saatte, 7 gün verildi. Tedavi bitiminde laparotomi yapılarak bilateral renal arterlere klemp konuldu ve 45 dakika boyunca renal iskemi uygulandı. Deneklerin 9 tanesinden 2 saatlik, 9 tanesinden ise 24 saatlik reperfüzyon sonunda kan ve böbrek dokusu örnekleri alındı.

Bütün denekler 40 mg/kg (i.m.) ketamin HCl (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) anestezisi ile uyutuldu. Deneklerin abdominal bölgeleri tıraş edilip %10 polivinilpirolidon iyot kompleksiyle (Batticon, Adeka) sterilize edildi. Abdominal bölgeye orta hat üzerinde yaklaşık 3 cm'lik cilt kesisi yapıldı. Karın içi görünür hale getirildikten sonra karın içi organlar kenarlara doğru çekildi. Böylece renovasküler yatak görünür hale getirildi. Kontrol grubundan herhangi bir işlem uygulanmaksızın kan ve böbrek dokusu alındı. İskemi-reperfüzyon grubu ve tedavi gruplarında ise her iki böbrek pedinkülü ortaya konulduktan sonra, pedinküllere birer adet non travmatik klemp 45 dakika boyunca uygulandıktan sonra klempler kaldırıldı. Klemp uygulaması sonrası böbreklerde renk değişikliği gözlemlendi. Her iki grubun 2 saatlik reperfüzyon uygulanacak deneklerinin 2 saat boyunca açıkta kalan karın bölgesi üzerine ılık serum fizyolojik ile ıslatılmış spanç konuldu. İki saatin sonunda kan ve doku örnekleri alındı. Yirmidört saatlik reperfüzyon uygulanacak deneklerin ise iskemi işlemi tamamlandıktan sonra laparotomi insizyonu primer 3/0 ipek iplikle kapatıldı. Bu deneklere 24 saat sonra tekrar anestezi işlemi uygulanarak laparotomi insizyonları tekrar açıldı, kan ve böbrek dokusu örnekleri alındı. Bu gruba kan ve sıvı kaybını önlemek için 24 saatlik reperfüzyon süresince cilt altına 3 ml serum fizyolojik uygulandı. Deneklerden portal ven yolu ile kan ve sonrasında böbrek dokusu alınarak hayvanlar sakrifiye edildi.

1. BİYOKİMYASAL İNCELEME YÖNTEMLERİ

Deneklerden MDA, SOD, MPO analizi için alınan böbrek dokusu alüminyum folyolara sarılarak azot tankı içine ivedilikle sarkıtıldı. Azot tankının içinde laboratuara ulaştırılan doku örnekleri analiz gününe kadar -70°C'de donduruldu. BUN, kreatinin, IL-6 ve TNF- α çalışılmak üzere portal venden alınan 4 cc'lik kan örnekleri biyokimya tüpü içerisinde

laboratuara ulaştırıldı. 3000 devir/dakika hızda 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Ayrılan serumlar analiz gününe kadar -70°C’de dondurularak saklandı.

1.1. Doku MDA Analizi

Doku MDA düzeyleri Okhawa ve arkadaşlarının (68) tariflediğı yönteme göre tayin edildi. Bu yöntemin ilkesi; homojenattaki proteinlerin sodyum dodesil sülfat (SDS) ile bağlanmasından sonra örnekte bulunan MDA’nın ortam pH’sı 3,5 olduğı koşullarda tiobütirik asit (TBA) ile oluşturduğu kompleksten ileri gelen kırmızı rengin spektrofotometrik ölçümüne dayanır.

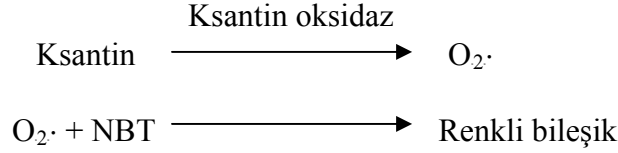
MDA tayini için analiz zamanına kadar derin dondurucuda tutulan doku örnekleri %1,15 potasyum klorür (KCl) ile 1/10 (w/v) oranında homojenize edildi. Homojenattan 50 mikrolitre alınarak üzerine 50 mikrolitre %8,1 SDS eklendi. Ardından 375 mikrolitre %8 TBA, 375 mikrolitre %20 asetik asit (pH=3,5) ve 150 mikrolitre su eklendi. Elde edilen karışım 60 dakika, 95°C’de su banyosunda kaynatıldı. Bundan hemen sonra örnekler soğutulularak üzerine 250 mikrolitre distile su ve 1,250 mikrolitre n-butanol/piridin (15/1 v/v) eklenerek vortekslendi. Daha sonra 4000 devir/dakika 10 dakika santrifüj edilip 532 nm.’de köre karşı okundu.

Standart olarak 1,1,3,3 tetraetoksi propan kullanılarak standart grafik elde edildi ve örneklerin absorbans değerlerinin nmol cinsinden MDA miktarı saptandı. Sonuçlar “nmol/gr yaş doku” cinsinden belirlendi.

1.2. Böbrek Dokusunda SOD Aktivitesinin Ölçülmesi

Doku SOD aktivitesi, Yi-Sun’un 1988’de tanımladığı (102), ksantin ksantin oksidaz ile $O_2 \cdot^-$ oluşturması ve bunun da nitrotetrazolium blue (NBT) ile renkli bir bileşik oluşturarak bu

renk şiddetinin spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. Ortamdaki SOD aktivitesi ne kadar fazla ise $O_2 \cdot^-$ 'yi ortadan kaldıracak için oluşan rengin şiddeti o kadar az olacaktır.



Reaktifler: Stok ksantin: 3mmol/ L , Na_2CO_3 : 400 mmol/L, NBT: 150 μ mol/L, BSA (Sığır serum albumini): 1 g/L, $CuCl_2$: 0.8 mmol/L

Ksantin oksidaz (XO) enzim çözeltisi: 1/100 (v/v) 2 M'lık amonyum sülfat çözeltisi ile dilüe edilir.

Kloroform / etanol: 3/5 (v/v)

Reaktif karışımı: 40 ml 10 kat dilüe edilmiş stok ksantin çözeltisi + 20 ml NBT +12 ml Na_2CO_3 + 6 ml BSA karıştırılır. 250 ml'ye tamamlanır.

Deneyin yapılışı :

Dokular distile su ile 1/10 oranında teflon metal uçlu homojenizatörle homojenize edildi. Süpernatant, kloroform / etanol karışımı ile 1/1 (v/v) oranında karıştırıldı. 5000xg'de +4 °C'de 2 saat santrifuj edildi. Enzim aktivitesi tayini ve protein tayini bu süpernatandan yapıldı. Protein miktarları Lowry metodu ile ölçüldü.

	Kör	Numune
Reaktif karışımı	2.9 ml	2.9 ml
Numune	--	50 μ l
Distile su	50 μ l	--
Ksantin oksidaz çözeltisi	50 μ l	50 μ l

25 °C’de 20 dakika inkübasyondan sonra tüplere 0.8 mM CuCl₂’den 1 ml eklendi ve 560 nm’de distile suya karşı okundu.

Hesaplama:

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{(\text{Kör abs} - \text{Numune abs})}{\text{Kör abs}} \times 100$$

% 50 inhibisyonu 1Ü aktivitenin sağladığı düşünülerek hesap yapıldı.

Lowry Protein Tayini:

Reaktifler: %2’lik Na₂CO₃ içine 0,1 N’lik NaOH (A1), %2’lik Na-K tartarat (B1), %1’lik CuSO₄ (B2), Folin ciocalteu’s fenol

Standart olarak 1 mg/ml sığır serum albumin (BSA) kullanıldı.

C solüsyonu; 0,5 ml B₁+ 0,5 ml B₂+ 16,5 ml A

Folin çekolte (F.c); 1 hacim F.c. + 1 hacim distile su

Deneyin yapılışı :

	BSA	Distile su	C solüsyonu
Kör	-	100 µl	2 ml
Standart-1	40 µl	60 µl	2 ml
Standart-2	80 µl	20 µl	2 ml
Numune	40 µl	60 µl	2 ml

Deney tüpleri vortekslendikten sonra, 15 dakika bekletildi. Daha sonra deney tüplerine 200 µl folin çekolte eklenerek iyice vortekslendi ve 1 saat karanlıkta bekletildi. Tüpler 750 nm’de köre karşı okundu.

Hesaplama:

$$\text{Protein miktarı} : \frac{\text{Numune Abs}}{\text{Standart Abs}} \times \text{standart konsantrasyonu.}$$

Sonuçlar mg/ml olarak verilir.

SOD enzim tayini sonucu, elde edilen sonuçlar protein miktarlarına bölünerek Ü/mg protein olarak verildi.

1.3. Böbrek Dokusunda MPO Düzeyinin Ölçülmesi

100 mg böbrek dokusu 1 ml soğuk 20 mM potasyum fosfat tamponu ile yaklaşık 45 saniye homojenize edildi. Homojenattan 1'er ml alınıp ependorf tüplerine kondu ve 13.500 rpm'de 30 dakika + 4°C'de soğutmalı santrifüjde santrifügasyon yapıldı. Süpernatant alınıp pellet %0.5 HETAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) ve %0.146 EDTA içeren 1 ml 50 mM potasyum fosfat tamponu ile çözülüp 10 saniye sonike edildi. Numuneler 60°C'de 2 saat inkübe edilip 13.500 rpm'de 30 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Süpernatant yeni ependorf tüplerine aktarıldı.

Bu metodun prensibi H₂O₂'in homojenattaki MPO tarafından oksitlenirken reaksiyon karışımında bulunan o-dianisidinin 410 nm dalga boyundaki ışığı absorplaması esasına dayanır. Daha sonra numuneler 37°C'de 30 dakika su banyosunda bekletildi. Sonra her bir numuneye 200µl 3 M'lık HCl asit eklenerek 410 nm boyunda köre karşı okundu.

$$\text{Ünite/g} = \frac{\frac{\text{Absorbans} \times 1000}{30 \text{ dakika}}}{20 \text{ mg}} \quad \text{formülü ile ünite/g cinsinden sonuç bulundu (59).}$$

	KÖR	NUMUNE
500 mM tampon	200 µl	200 µl
H ₂ O ₂	90 µl	90 µl
o-dianisidin	100 µl	100 µl
Numune	-	200 µl
Distile su	1600 µl	1400 µl

1.4. Serum BUN ,Kreatinin, IL-6 ve TNF- α Analizi

BUN ve kreatinin Beckman Coulter Lx20 cihaz orijinli kitlerle çalışıldı. IL-6 analizi Bisource rat IL-6, TNF- α analizi ise Bisource rat TNF-alfa kitleri ile çalışıldı.

2. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME YÖNTEMLERİ

Çalışma sonucu çıkarılan böbrekler %10'luk formaldehit içerisinde fikse edilip parafin bloklara alındı. Alınan kesitler hemotoksilen eozin ile boyandı. Her kesitte 12 mikroskopik alan 10x büyütme ile incelendi. Sahna ve arkadaşlarının kullandıkları histopatolojik sınıflama ile değerlendirildi (81).

3. İSTATİKSEL ANALİZ

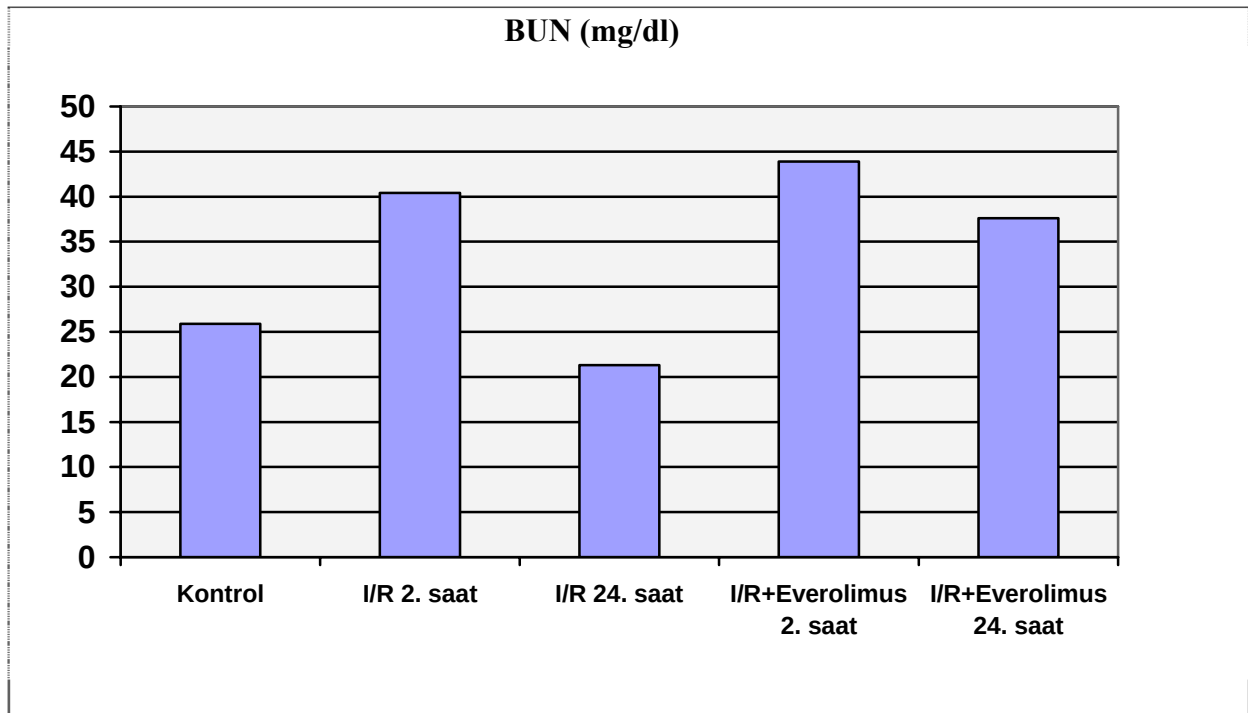
Bu çalışmada elde edilen veriler SPSS.13 paket programı yardımı ile değerlendirilmiştir. İki gruplu karşılaştırmalarda veriler normal dağılmadığı için Mann-whitney U testi kullanılmıştır. Anlamlılık seviyesi olarak 0,05 alınmış olup, $p > 0,05$ olması durumunda gruplar arasında anlamlı farklılığın olmadığı, $p < 0,05$ olması durumunda gruplar arasında anlamlı farklılığın olduğu belirtilmiştir. Kategorize edilebilen histopatolojik bulgulara ait veriler ise Fischer Exact ki-kare testi ile karşılaştırılmıştır.

SONUÇLAR

1. BİYOKİMYASAL İNCELEME SONUÇLARI

1.1.Ortalama BUN Değerleri

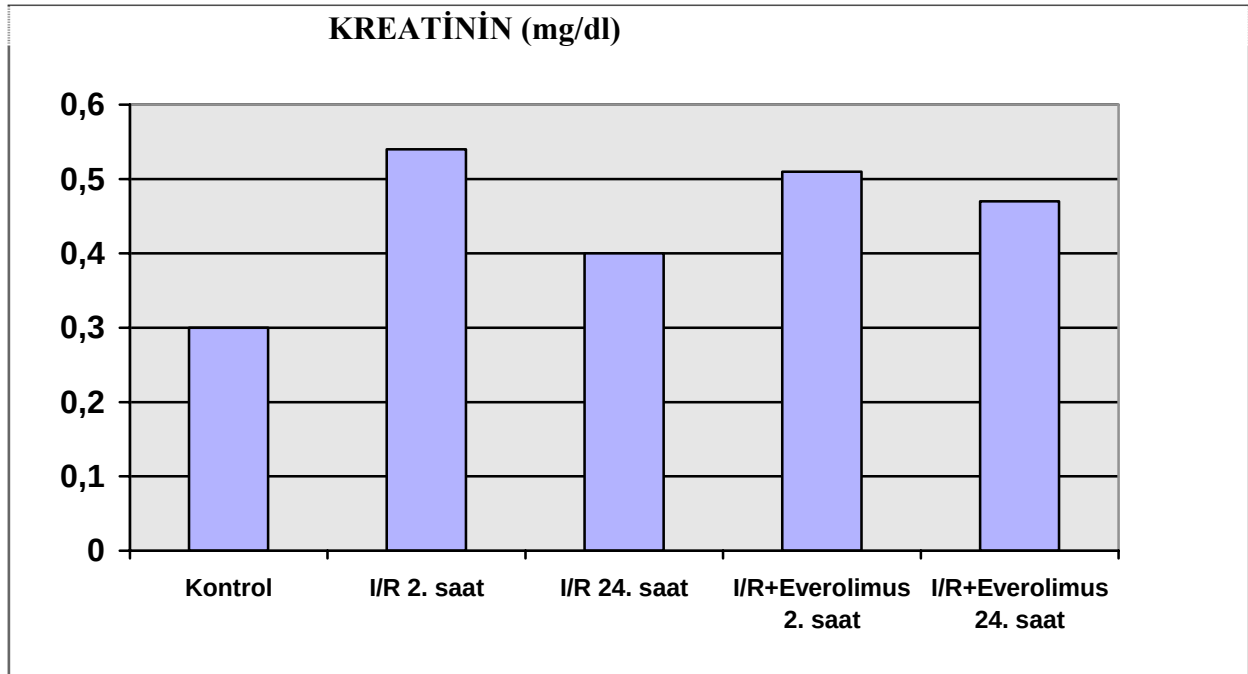
Ortalama serum BUN düzeyleri kontrol grubunda 25,9 mg/dl ($25,9 \pm 2,96$), I/R grubunun 2. saatinde 40,4 mg/dl ($40,4 \pm 7,9$), 24. saatinde 21,3 mg/dl ($21,3 \pm 2,1$), everolimus grubunun 2. saatinde 43,9 mg/dl ($43,9 \pm 3,4$) ve 24. saatinde 37,6mg/dl ($37,6 \pm 27$) olarak bulundu (Şekil 5). Kontrol grubu ile I/R grubunun 2. saati ve kontrol grubu ile everolimus grubunun 2. saati BUN değerleri arasında anlamlı istatistiksel fark saptandı ($p < 0,05$). İskemi-reperfüzyon grubu 24. saatinde ortalama BUN değeri kontrollerin ortalama BUN değerleriyle benzer düzeylere dönerken tedavi grubunda hala anlamlı yüksek BUN değerleri mevcuttu.



Şekil 5: Ortalama BUN değerlerinin gruplara göre dağılımı

1.2. Ortalama Kreatinin Değerleri

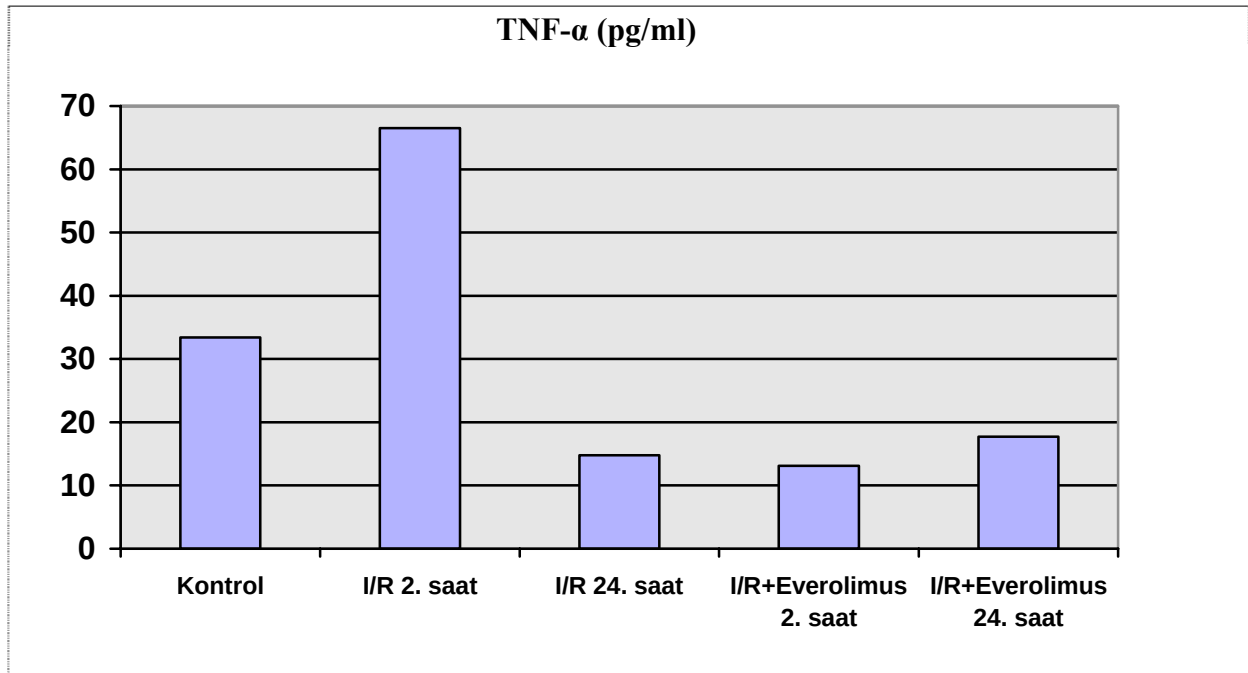
Ortalama kreatinin değerleri kontrol grubunda 0,3 mg/dl ($0,3 \pm 0,07$), I/R grubunun 2. saatinde 0,54 mg/dl ($0,54 \pm 0,14$), 24. saatinde 0,4 mg/dl ($0,4 \pm 0,1$), everolimus grubunun 2. saatinde 0,51 mg/dl ($0,51 \pm 0,11$) ve 24. saatinde 0,47 mg/dl ($0,47 \pm 0,22$) olarak bulundu (Şekil 6). Kontrol grubu ile I/R grubunun 2. saati, kontrol grubu ile everolimus grubunun 2. saati ve kontrol grubu ile everolimus grubunun 24. saati kreatinin değerleri arasında anlamlı istatistiksel fark saptandı ($p < 0,05$). İskemi-reperfüzyon grubunun 2. saatinde ortalama kreatinin değerleri kontrol grubuna göre anlamlı yüksek iken, I/R grubunun 24. saatinde serum kreatinin düzeyleri anlamlı olarak geriledi ve ortalama kreatinin değerleri kontrol grubunun kreatininleriyle benzerdi. Tedavi grubunda ise ortalama kreatinin düzeyleri hala anlamlı yüksekti.



Şekil 6: Ortalama kreatinin değerlerinin gruplara göre dağılımı

1.3. Ortalama TNF- α Değerleri

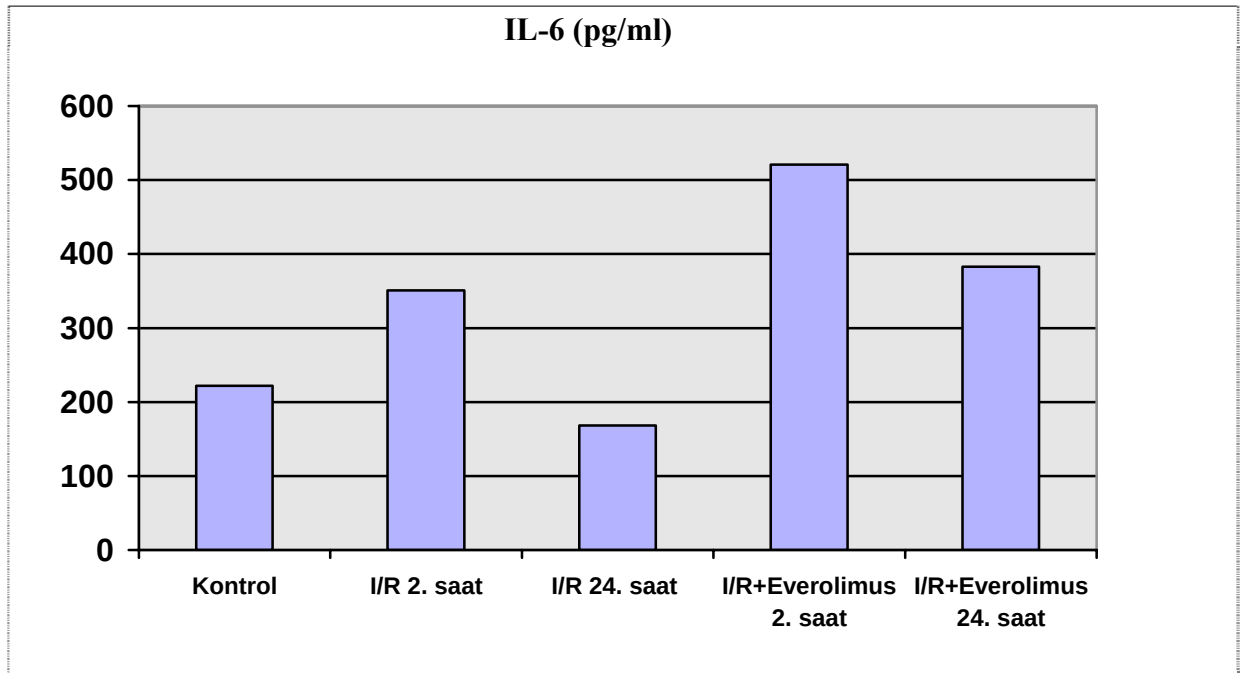
Ortalama TNF- α değerleri kontrol grubunda 33,4 pg/ml ($33,4 \pm 39,5$), I/R grubunun 2. saatinde 66,5 pg/ml ($66,5 \pm 62,8$), 24. saatinde 14,8 pg/ml ($14,8 \pm 5,1$), everolimus grubunun 2. saatinde 13,1 pg/ml ($13,1 \pm 1,6$) ve 24. saatinde 17,7 pg/ml ($17,7 \pm 9,2$) olarak bulundu (şekil 7). İskemi-reperfüzyon grubunun 2. saati ile everolimus grubunun 2. saati TNF- α düzeyleri arasında anlamlı istatistiksel fark saptandı ($p < 0,05$). İskemi-reperfüzyon grubunun 2. saatindeki ortalama TNF- α düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı yüksek idi ve I/R grubunun 24. saatinde bu yükseklik tekrar anlamlı azalma gösterdi. Everolimus grubunun 2. ve 24. saatindeki TNF- α düzeyleri kontrol grubundan farksız iken I/R grubu 2. saatindeki ortalama TNF- α düzeylerine göre anlamlı düşük saptandı.



Şekil 7: Ortalama TNF- α değerlerinin gruplara göre dağılımı

1.4. Ortalama IL-6 Değerleri

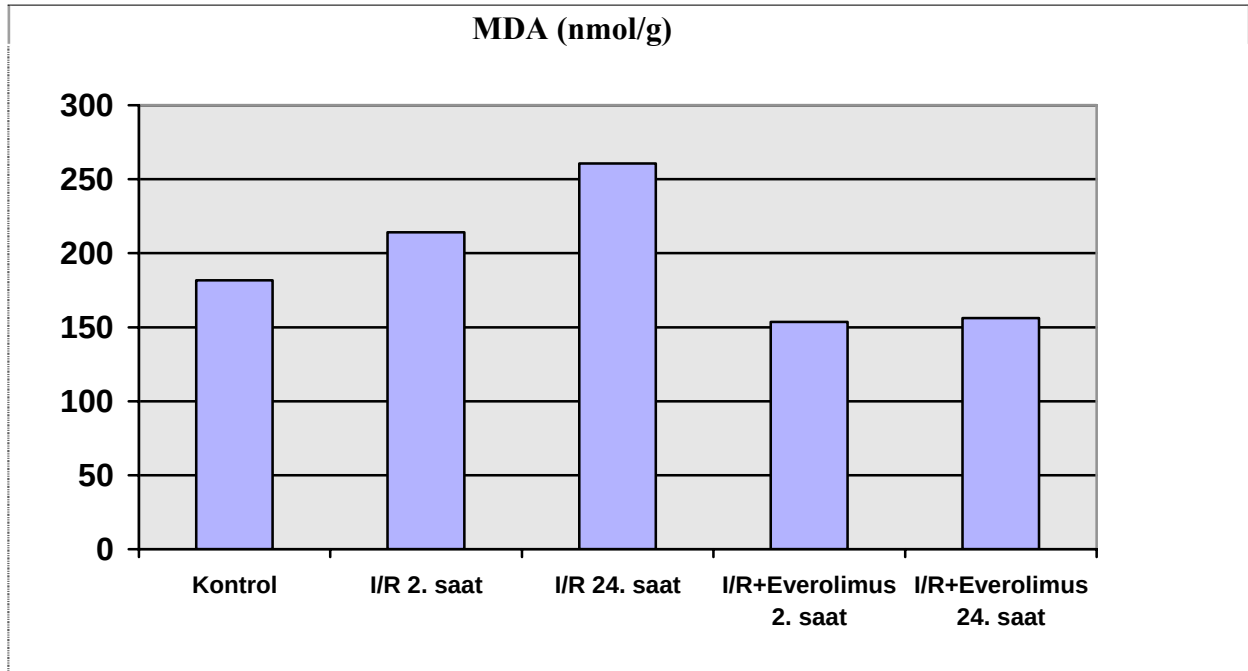
Ortalama IL-6 düzeyleri kontrol grubunda 221,9 pg/ml ($221,9 \pm 78,6$), I/R grubunun 2. saatinde 350,8 pg/ml ($350,8 \pm 184,9$), 24. saatinde 168,4 pg/ml ($168,4 \pm 62,8$), everolimus grubunun 2. saatinde 520,7 pg/ml ($520,7 \pm 230$) ve 24. saatinde 382,9 pg/ml ($382,9 \pm 246,7$) olarak bulundu (Şekil 8). Kontrol grubu ile everolimus grubunun 2. saati ve I/R grubunun 24. saati ile everolimus grubunun 24. saati IL-6 düzeyleri arasında anlamlı istatistik fark saptandı ($p < 0,05$). I/R grubunda 2. saatte anlamlı IL-6 yüksekliği saptanırken 24. saatinde IL-6 düzeyleri kontrol grubundaki bazal düzeylere geri dönmekteydi. Everolimus grubunun 2. saatinde IL-6 düzeyleri anlamlı yüksek idi ve bu yükseklik 24. saatin sonunda halen anlamlı olarak devam etmekte idi.



Şekil 8: Ortalama IL-6 düzeylerinin gruplara göre dağılımı

1.5. Ortalama MDA Değerleri

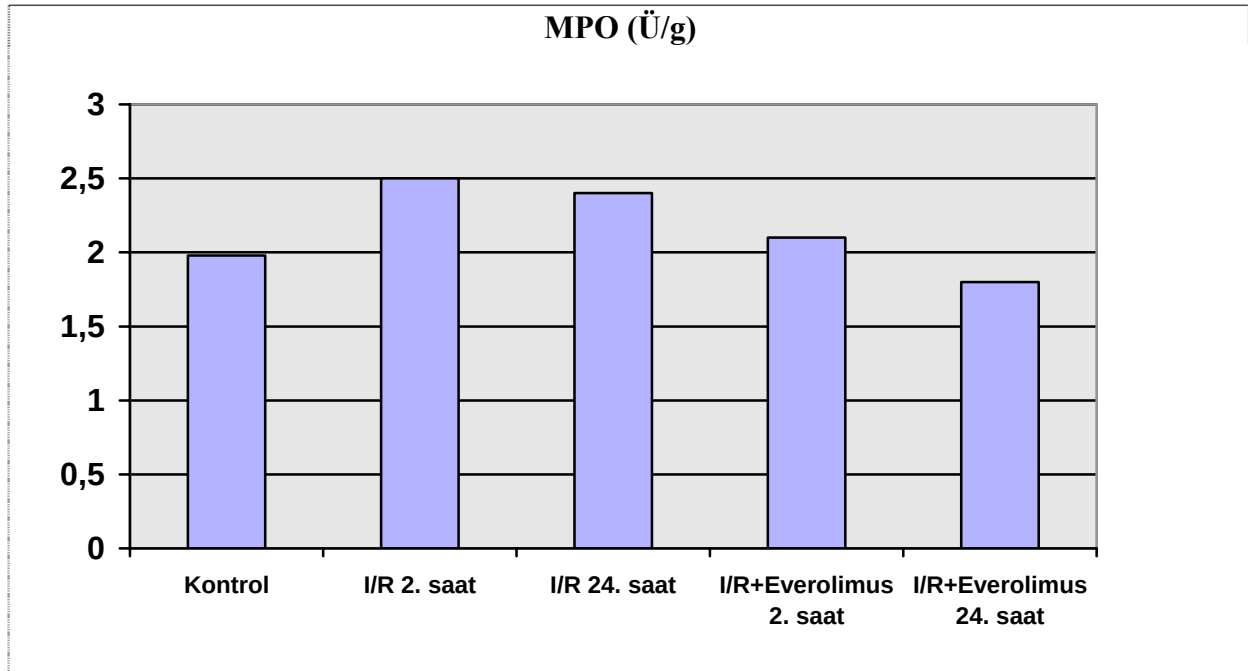
Ortalama MDA değerleri kontrol grubunda 181,7 nmol/g ($181,7 \pm 50,9$), I/R grubunun 2. saatinde 214,1 nmol/g ($214,1 \pm 42,7$), 24. saatinde 260,6 nmol/g ($260,6 \pm 14,5$), everolimus grubunun 2. saatinde 153,6 nmol/g ($153,6 \pm 56,3$) ve 24. saatinde 156,2 nmol/g ($156,2 \pm 48,5$) olarak bulundu (Şekil 9). Kontrol grubu ile I/R grubunun 24. saati, I/R grubunun 2. saati ile everolimus grubunun 2. saati ve I/R grubunun 24. saati ile everolimus grubunun 24. saati MDA değerleri arasında ise anlamlı istatistiksel fark mevcuttu ($p < 0,05$). Ortalama MDA değerleri I/R grubunun 2. saatinde anlamlı yüksek değilken, 24. saatinde kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksekti. Everolimus grubunda ise ne 2. saatte ne de 24. saatte anlamlı bir MDA artışı yoktu.



Şekil 9: Ortalama MDA düzeylerinin gruplara göre dağılımı

1.6. Ortalama MPO Değerleri

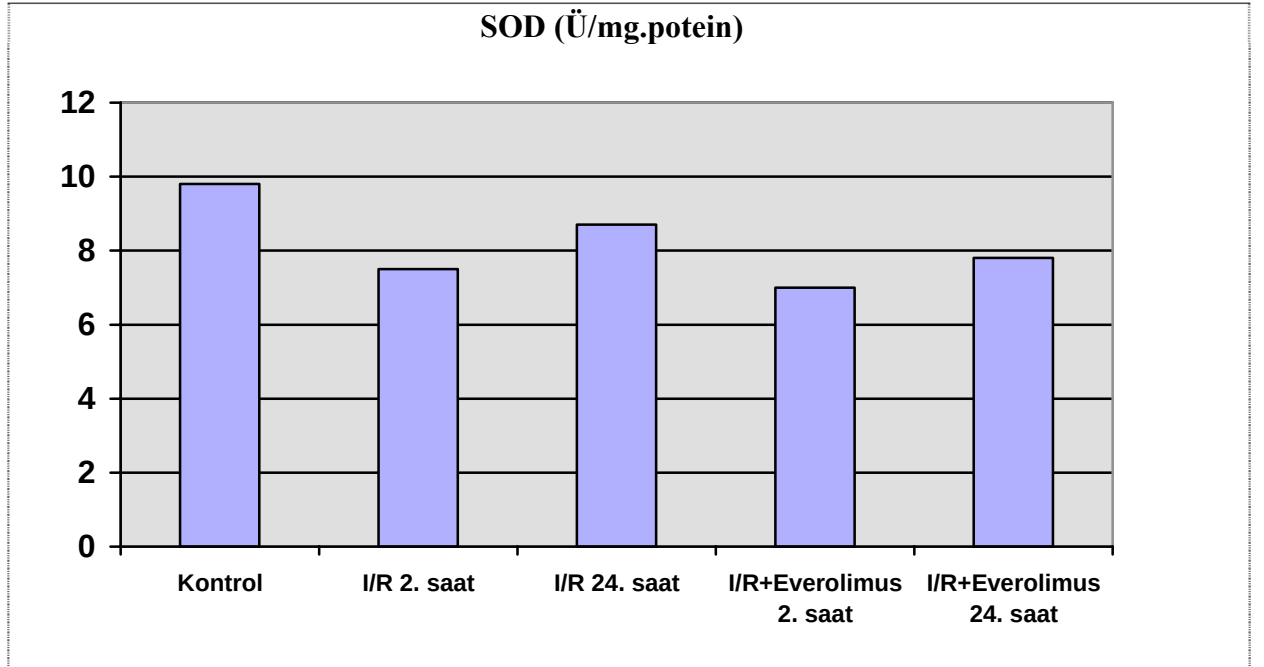
Ortalama MPO değerleri kontrol grubunda 1,98 Ü/g ($1,98 \pm 0,6$), I/R grubunun 2. saatinde 2,5 Ü/g ($2,5 \pm 0,5$), 24. saatinde 2,4 Ü/g ($2,4 \pm 0,4$), everolimus grubunun 2. saatinde 2,1 Ü/g ($2,1 \pm 0,2$) ve 24. saatinde 1,8 Ü/g ($1,8 \pm 0,4$) olarak bulundu (Şekil 10). Kontrol grubu ile I/R grubunun 2. saati ve I/R grubunun 24. saati ile everolimus grubunun 24. saati MPO değerleri arasında anlamlı istatistiksel fark saptandı ($p < 0,05$). Ortalama MPO değerleri I/R grubunun 2. saatinde anlamlı artmakta ve 24. saatinde de hala yüksek kalmakta idi. Everolimus grubunda ise 2. saatte anlamlı bir MPO artışı olmamakta, 24. saatinde ise ortalama MPO düzeyleri kontrol grubunun ortalama değerlerinin de altına inmekteydi.



Şekil 10: Ortalama MPO değerlerinin gruplara göre dağılımı

1.7. Ortalama SOD Değerleri

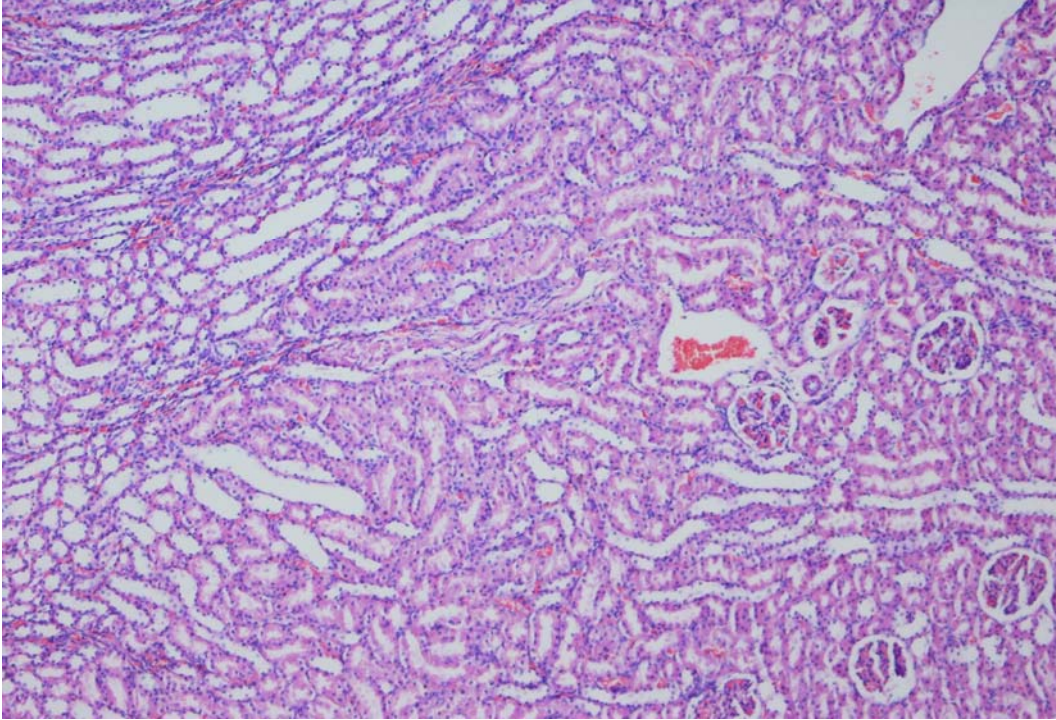
Ortalama SOD değerleri kontrol grubunda 9,8 Ü/mg.protein ($9,8 \pm 1,3$), I/R grubunun 2. saatinde 7,5 Ü/mg.protein ($7,5 \pm 1,6$), 24. saatinde 8,7 Ü/mg.protein ($8,7 \pm 1,5$), everolimus grubunun 2. saatinde 7 Ü/mg.protein ($7 \pm 1,6$) ve 24. saatinde 7,8 Ü/mg.protein ($7,8 \pm 1,3$) olarak bulundu (Şekil 11). Kontrol grubu ile I/R grubunun 2. saati, kontrol grubu ile everolimus grubunun 2. saati ve kontrol grubu ile everolimus grubunun 24. saati SOD değerleri arasında anlamlı istatistiksel fark saptandı ($p < 0,05$). Ortalama SOD aktivitesi I/R grubu 2. saatinde anlamlı olarak baskılanmış, düşük düzeylerde iken 24. saate doğru SOD aktivitesi artmakta ve kontrol grubuna benzer düzeylere ulaşmaktaydı. Everolimus grubunun 2. saatinde de ortalama SOD aktivitesi anlamlı düşük iken 24. saatte biraz artmakla birlikte bu düşüklük kontrol grubuna göre hala anlamlılığını korumakta idi.



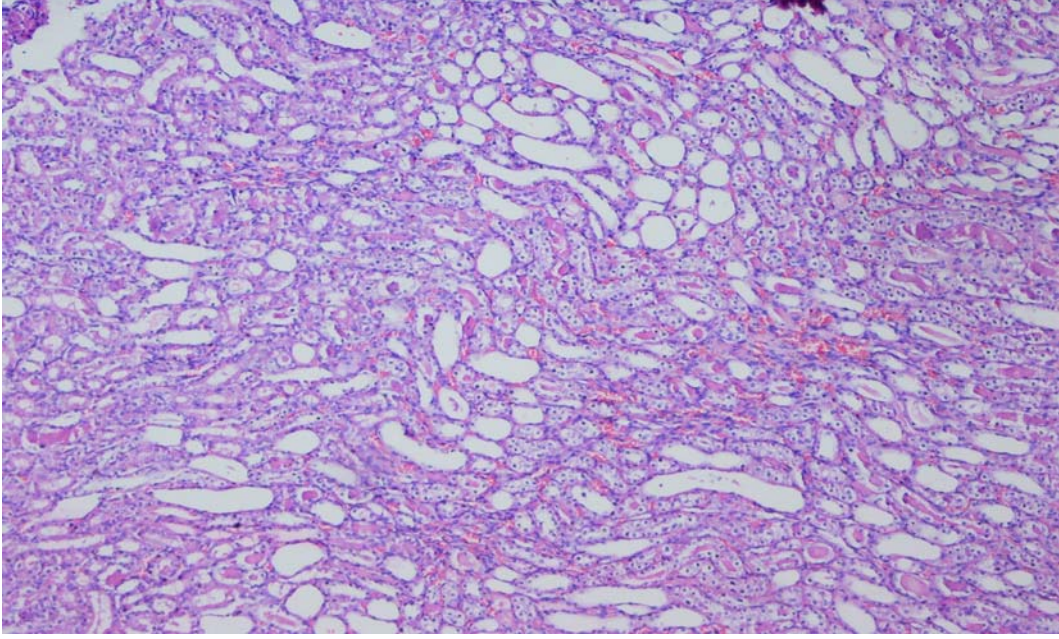
Şekil 11: Ortalama SOD değerlerinin gruplara göre dağılımı

2. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME SONUÇLARI

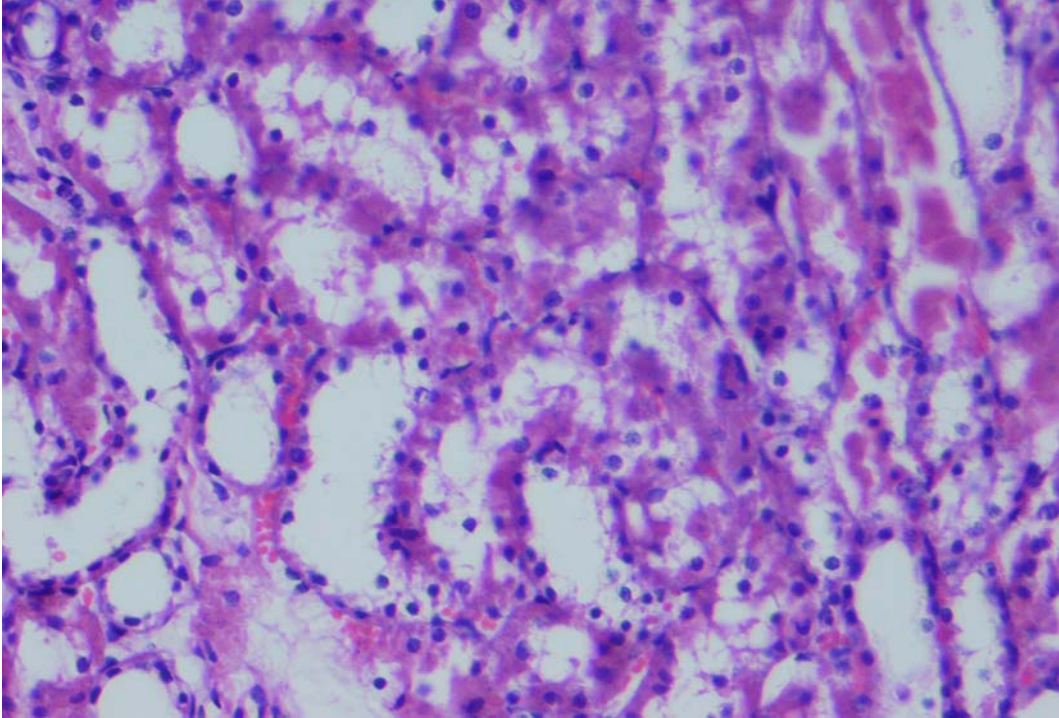
Histopatolojik incelemelerde tüm gruplarda tübüler dilatasyon, tübül epiteli ayrışması, silendir formasyonu ve inflamatuvar hücre infiltrasyonuna bakıldı. Kontrol grubunda normal yapı gözlemlendi (Resim-1). İskemi-reperfüzyon ve everolimus gruplarında tübüler dilatasyon, tübül epiteli ayrışması, silendir oluşumu ve inflamatuvar hücre infiltrasyonları izlendi (Resim-2,3). İskemi-reperfüzyon grubu ve everolimus gruplarının hem 2. saat hem de 24. saat görüntüleri arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı.



Resim 1- Kontrol grubunda histopatolojik incelemede tübüller ve tübül epiteli normal görünümdeydi (HE, x100)



Resim 2- İskemi-reperfüzyon ve tedavi gruplarında tübüler dilatasyon ve intratübüler silendir oluşumu izlendi (HE, x100)



Resim 3- İskemi-reperfüzyon ve tedavi gruplarında tübül epitelinde ayrışma izlendi (HE, x100)

TARTIŞMA ve SONUÇ

Böbreğin hipoperfüzyonuna bağlı olarak oluşan prerenal ABY toplum kaynaklı ABY'nin % 70'ini, hastane kaynaklı ABY'nin ise %40'ını oluşturur (95). Prerenal ABY'nin bu kadar sık görülmesi I/R hasarının patofizyolojisinin aydınlatılması ve önlenmesi için birçok çalışma yapılmasına neden olmuştur. Bu konu ile ilgili çalışmalar ise çoğunlukla hayvan modelleri üzerinde yapılmıştır.

Prerenal ABY ile ilgili koruyucu tedaviye yönelik düşük doz dopamin infüzyonu, diüretikler, kalsiyum kanal blokörleri, allopurinol, N-asetilsistein, eritropoietin, teofilin, atrial natriüretik peptid, adezyon moleküllerine karşı oluşturulan antikolar, serbest oksijen radikal tutucuları, prostaglandinler, amino asit infüzyonu gibi birçok molekülün üzerinde çalışılmıştır (54).

Düşük doz dopamin infüzyonu ($1-3 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$), ABY'yi önlemede, özellikle yoğun bakım ünitelerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Düşük doz dopamin infüzyonunun etkinliği ile ilgili yapılan kontrollü prospektif çalışmalar ve metaanalizler, başlangıçta renal kan akımında, idrar çıkışında ve GFR'de düzelme sağlamakla birlikte, düşük doz dopamin infüzyonunun yüksek riskli hastalarda renal fonksiyonları koruyarak ABY'yi önlemede ve mortalite üzerinde etkili olmadığını göstermiştir (6,25,46).

Diüretikler, dopamin gibi ABY'de yaygın olarak kullanılmaktadır. Mannitolün rabdomiyoliz ve renal transplantasyonda etkinliği kanıtlanmış olup iskemik ABY için aynı durum söz konusu değildir (82). Loop diüretikleri ise oligürik ABY'de diürezi sağlamada etkili olmakta ancak renal fonksiyon kaybının süresi, diyaliz ihtiyacı ve mortalite üzerinde sonucu değiştirecek bir etki göstermemektedir (60,83).

İskemik böbrek hasarında serbest radikal üretiminde rol oynayan ksantin oksidazı inhibe eden allopurinol'ün hayvan çalışmalarında renal I/R'de iskemik hasarı azalttığı gösterilmiştir.

İnsanlarda ise tümör lizis sendromunu engellemede kullanılmakta, ancak prerenal ABY’de rutin kullanımı söz konusu değildir (3,80).

Renal I/R hasarına karşı koruyucu olarak düşünülen bir diğer ilaç grubu kalsiyum kanal blokörleridir. Özellikle kardiyak operasyonlarda ve I/R hasarında kalsiyum kanal blokörleri umut vaat edici görülmektedir (58,73).

N-Asetilsistein ile yapılan metaanalizlerde ise, I/R hasarını önlemeden ziyade, kronik böbrek hastalığı veya diyabeti olan hastalarda kontrast nefropatisi riskini azaltmada etkili bulunmuştur (2,10).

Hiperlipidemi tedavisinde de yaygın olarak güvenli bir biçimde kullanılmakta olan HMG-CoA redüktaz inhibitörlerinin antiinflamatuvar etkileri ile renal I/R’de koruyucu olacağı düşünülmüştür. Buradan yola çıkılarak yapılan hayvan deneylerinde HMG-CoA redüktaz inhibitörlerinin renal iskemik hasardan koruyucu olduğu gösterilmiştir (37,104).

Biz bu çalışmada renal transplantasyon hastalarında immünosüpresyon amacıyla yeni kullanıma giren makrolid grubu bir antibiyotik olan everolimus renal I/R hasarından koruyucu bir ajan olarak kullandık. Çalışmamızda ortalama serum BUN ve kreatinin değerleri I/R grubunda 2. saatte beklenildiği üzere anlamlı bir artış göstermiş, reperfüzyonun 24. saatinde ise anlamlı olarak gerileyerek kontrollerden farksız seviyelere ulaşmıştır. I/R+everolimus uygulanan tedavi grubunda ise reperfüzyonun 2. saatinde yükselen BUN ve kreatinin değerleri 24. saatte de anlamlı olarak yüksek kalmaya devam etmiştir. Çalışmamızda sitokin düzeyleri değerlendirildiğinde, TNF- α düzeyleri I/R grubunun 2. saatinde kontrol grubuna göre anlamlı yüksek saptanırken ,24. saatinde anlamlı olarak azalmış; tedavi grubunda ise TNF- α düzeyleri hem 2. hem de 24. saatte düşük seyretmiştir. Ortalama IL-6 değerleri tedavi grubunda hem 2. hem de 24. saatlerde kontrol ve iskemi gruplarına göre yüksek saptanmıştır. İnflamasyon belirteçlerinden olan MPO düzeyleri 2. saatte tedavi

grubunda, kontrol grubuna göre artış göstermekle birlikte 24. saatte kontrol grubunun ortalama değerlerindeki altında bulunmuştur. Oksidan-antioksidan sistemin önemli göstergelerinden olan MDA düzeyleri, tedavi alan grupta, hem 2. hem de 24. saatte kontrol ve I/R grubuna göre düşük saptanmıştır. SOD değerleri ise reperfüzyonun 2. saatinde her iki grupta da kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulunmuştur. Reperfüzyonun 24. saatinde ise SOD aktiviteleri her iki grupta hafifce artmaya meyletmekle beraber kontrollere göre anlamlı yüksek düzeylere ulaşamamıştır. Histopatolojik değerlendirmede I/R ve I/R+everolimus alan grupların oluşan renal tübüler ve interstisiyel hasar düzeyleri açısından bir farklılık göstermedikleri izlenmiştir.

Everolimus solid organ transplantasyonu yapılan hastalarda kullanılmakta olan sirolimusun oral biyoyararlanımını arttırmak için geliştirilmiş, bir sirolimus (rapamisin) derivativesidir (5,49). Everolimus ve sirolimusun etki mekanizmaları aynı olup, everolimus hücre içine girdikten sonra bir immunofilin olan FK506-binding proteine (FKBP12) bağlanır. Everolimus-FKBP12 kompleksi mammalian TOR (target of rapamycin) adı verilen kinaza bağlanarak p70 S6 kinazın aktivasyonunu inhibe eder. Sonuçta hücre siklusu G1'den S fazına geçiş arasında durur ve hücre proliferasyonu inhibe olur. Ayrıca IL-2 reseptörü ve CD28 bağımlı yolları inhibe ederek de T ve B hücre proliferasyonunu inhibe eder (5,94). Everolimus sadece hematopoietik hücre proliferasyonunu değil ayrıca vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu da inhibe eder (5,85).

Everolimus ile aynı etki mekanizmasına sahip olan sirolimusun I/R'den koruyucu etkisi Puglisi ve arkadaşları tarafından ince barsakta çalışılmıştır. Deneklerden bir gruba sirolimus, bir gruba siklosporin, bir gruba her iki ilaç verilmiş ve ksantin oksidaz (I/R'de serbest radikal üretiminde rol oynar), maltaz (ince barsak fonksiyonu ve mukozal bütünlüğü konusunda bilgi verir) ve TNF- α düzeylerine bakılmıştır. Tedavi verilen gruplarda, ksantin oksidaz ve maltaz

düzeyleri kontrol grubuna göre daha yüksek, TNF- α düzeyi istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte düşük bulunmuştur. Bu çalışma ile sirolimusun T-hücre sinyal yolundan bağımsız olarak ince barsak iskemisinde hücre koruyucu ve antiinflamatuvar mekanizmalarla koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (74).

Adkins ve arkadaşları tarafından insan vasküler düz kas hücrelerinden sirolimusun TNF- α salınımını inhibe ettiği gösterilmiştir. Sirolimus koroner arterlere konan ilaç kaplı stentlerde de kullanılmaktadır. Beş hastanın safen veninden alınan segmentlerden yapılan hücre kültürleri TNF- α sekresyonunun artması için bakteriyel lipopolisakkarite maruz bırakılmış, sonrasında bir gruba sirolimus, bir gruba izoproteronol 24 saat boyunca uygulanmış başka bir gruba ise hiç bir şey uygulanmamıştır. Sirolimus uygulanan hücre kültürlerinde TNF- α sekresyonunda %50'lik anlamlı bir azalma dikkati çekmiştir. Vasküler düz kas hücrelerinde sirolimusun inflamatuvar sitokin salınımını anlamlı olarak azalttığı böylece ortaya konmuştur (1).

Lehle ve arkadaşlarının yine hücre kültüründe yaptıkları başka bir çalışmada sirolimus ve everolimusun TNF- α tarafından indüklenen IL-6 salınımını azalttıkları izlenmiştir (55).

Renal I/R'de inflamatuvar sitokinlerin, T ve B hücrelerinin oynadığı rol düşünülecek olursa, bir sirolimus derivativesi olan ve aynı mekanizma ile etkisini gösteren everolimusun renal I/R'den koruyucu etkisi olabileceği düşünülebilir. Bu çalışma renal I/R hasarında profilaktik olarak everolimus kullanımının böbrek fonksiyonları, lipid peroksidasyonu, antioksidan sistem ve sitokinler üzerine olan etkilerini değerlendirmek üzere planlanmıştır.

Ratlarla yapılan deneysel hayvan modellerinde 45 ve 60 dakikalık iskemi uygulandığında iskemik hasar olduğu gösterilmiştir. Deneklerde inflamasyon erken başlamakla birlikte histopatolojik değişiklikler en erken 24 saat sonra ortaya çıkmaktadır. Biz de çalışmamızda 45 dakikalık iskemi uygulayarak reperfüzyonun 2. ve 24. saatlerinde iskemik hasar

değerlendirmesi yaptık (22,33,69,101). İlaç dozunu ve süresini literatürde belirtildiği gibi 1,5 mg/kg olarak ve 7 gün süreyle verdik (23,49).

Renal I/R sırasında üretilen serbest radikaller lipid peroksidasyonu ile yapısal ve fonksiyonel olarak hücre hasarına neden olurlar (20,35,79). Serbest oksijen radikalleri çok reaktif olmaları nedeni ile direkt olarak ölçülememekte, lipid peroksidasyonu sırasında açığa çıkan daha stabil moleküllerin ölçümü yapılmaktadır. Lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak en sık kullanılan ve doku hasarı konusunda fikir veren bu moleküllerden birisi MDA'dır (8,35). Biz de çalışmamızda lipid peroksidasyonunu ve hücresel hasarı değerlendirmek üzere MDA düzeylerini inceledik. Doku MDA değerleri iskemi grubunda hem 2. hem de 24. saatlerde beklenildiği üzere diğer tüm gruplardan yüksek bulundu. Tedavi grubunda ise MDA değerleri diğer tüm gruplara göre daha düşük seviyede saptandı. İskemi-reperfüzyon grubunun 2. saati ile tedavi grubunun 2. saati ve I/R grubunun 24. saati ile tedavi grubunun 24. saatleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı. MDA düzeylerinin doku hasarı konusunda önemli olması nedeniyle everolimusun renal iskemik hasarda lipid peroksidasyonunu azaltıcı yönde etki göstererek oluşabilecek hasar üzerine önleyici yönde bir katkısı olduğu düşünülebilir.

Serbest oksijen radikallerine karşı majör korunma sistemi antioksidan enzim sistemidir. Bu enzim sisteminde yer alanlarından en önemlisi süperoksit radikalini moleküler oksijen ve hidrojen peroksite dönüştüren reaksiyonu katalizleyen SOD'dur (20,35,79). Çalışmamızda beklenenden farklı olarak SOD düzeyi en yüksek kontrol grubunda bulundu. Hem I/R grubunda hem de tedavi grubunda SOD aktivitesi anlamlı olarak düşüktü ve bu düşüklük 24. saatte de devam etmekteydi. İskemi-reperfüzyon hasarı antioksidan aktivitenin aktivasyonu üzerine önemli bir baskılayıcı rol oynamakta, everolimus uygulaması ile bu etkide düzelme sağlanamamaktaydı. Özellikle kısa zamanlı (30 dakika) I/R modellerinde SOD aktivitesinde

artış olmadığı buna karşın 60 ve 90 dakika gibi uzun iskemi uygulanan I/R modellerinde anlamlı SOD artışı olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (27). Dolayısıyla uygulanan iskemi süresi SOD aktivitesinin belirginleşmesinde çok önemli gibi görünmektedir. Çalışmamızda ratlara 45 dakikalık renal iskemi uygulanmış olup SOD aktivitesi artışının hem I/R hem de tedavi grubunda beklenildiği gibi olmaması bu uygulanan süreyle ilişkili görünmektedir. Everolimus tedavisinin kısa süreli I/R uygulamalarında antioksidan SOD enzimi aktivitesini artırıcı yönde olumlu bir etkisi olmadığı izlenmektedir. I/R hasarının 24 saat sonrasında bu enzimatik aktivite düzeylerinin seyrine ait verimiz, bu çalışma planında olmadığı için mevcut değildir.

Çalışmamızda inflamatuvar bir gösterge olan, lökosit ve mononükleer hücrelerden salgılanan MPO düzeylerine de bakıldı. İskemi-reperfüzyon grubunda MPO düzeyleri kontrol ve tedavi gruplarına göre yüksek bulundu. Tedavi grubunun hem 2 hem de 24. saati MPO değerleri I/R grubuna göre düşüktü. Bu düşüklük 24. saatte istatistiksel olarak anlamlıydı. Tedavi grubunda MPO'nun düşük bulunması everolimusun I/R oluşturulmuş dokuya, bilinen T ve B hücre proliferasyonunu azaltıcı etkilerinin yanısıra, lökosit ve mononükleer hücre göçünü de anlamlı ölçüde engellediği ve bu sayede antiinflamatuvar, ilave bir etki oluşturabileceğini göstermektedir. Bu inflamatuvar hücre göçünü azaltıcı etkiler ilacın, I/R hasarı sürecinde bu hücrelere bağlı oluşacak hasarın azaltılmasında da etkili olabileceği konusunda beklentileri artırmaktadır.

TNF- α iskemik renal hasarda, makrofaj, lökosit ve renal tübüler hücreler tarafından sekrete edilir. TNF- α glomerüler kan akımını, glomerüler filtrasyon hızını azaltır; glomerüler albumin permeabilitesini artırır; serbest oksijen radikali, IL-1 gibi endojen pirojen ve diğer proinflamatuvar sitokinlerin üretimini stimüle eder; nötrofil ve monosit (recruitment) infiltrasyonunu artırır; ICAM-1 ve L-selektin ekspresyonunu artırır; hücrel apoptosisi

indükler; glomerüler fibrin depozisyonunu artırır (30). Renal TNF- α üretimi için 30 dakikalık iskemi yeterli olmakla birlikte TNF- α proteininin ekspresyonu ve biyoaktivitesi 1 saatlik iskemi ve bunu takip eden 2 saatlik reperfüzyonda tepe yapmaktadır (28,29). Bizim çalışmamızda beklenildiği üzere I/R grubunda 2. saatte TNF- α düzeyleri en yüksek olarak bulundu. İskemi-reperfüzyon grubunun 2. saatinde beklenildiği üzere oldukça belirgin, istatistiksel olarak kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bir TNF- α artışı mevcuttu. Bu yüksek TNF- α düzeyleri 24. saate doğru anlamlı olarak azalmıştı. Tedavi grubunda ise 2. saatte TNF- α düzeyi anlamlı olarak düşüktü ve 24. saatte de bu düşük düzeylerde devam etmekte idi. Bu gözlenen TNF- α düzeyleri everolimusun anlamlı TNF- α baskılayıcı etkisinin göstergesi olup önemli bir inflamatuvar sitokin olan TNF- α 'nın bu şekilde baskılanmış olması I/R hasarının önlenmesinde everolimusa ait beklentileri güçlendirmektedir.

IL-6 primer olarak immün ve inflamatuvar cevabın regülasyonunda rol oynayan bir sitokindir. IL-6 sadece T ve B lenfositlerden değil, monosit/makrofaj, fibroblast, vasküler düz kas hücrelerinden, endotel hücrelerden ve mezangial ile tübüler epitel hücrelerden salgılanmaktadır. Renal I/R'de IL-6 knockout ve IL-6 antikoru verilen farelerde ICAM-1, P selektin gibi adezyon moleküllerinde, TNF- α ve IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinlerde, dolayısıyla iskemik renal hasarda azalma görülmüştür (71). Buna rağmen IL-6'nın renal I/R'a bağlı doku hasarındaki rolü tartışmalıdır. HMG-CoA redüktaz inhibitörleri ile yapılan renal I/R çalışmasında sitatinlerin uygulanması ile IL-6 düzeylerinde anlamlı artış gözlenmiş, bu artışın inflamasyondan koruyucu amaçlı olduğu tezi ortaya atılmıştır (104). Renal iskemik hasarın yanı sıra IL-6 knockout farelerde deneysel olarak serebral I/R oluşturulduğunda, survinin azaldığı, nörolojik durumun daha da kötüleştiği ve enfarkt alanının daha büyük olduğu izlenmiştir (42). Ayrıca eksojen IL-6 verilmesinin barsak ve akciğer I/R hasarına karşı

koruyucu olduğu gösterilmiştir (32,48). Bizim çalışmamızda everolimus alan grubun hem 2. hem de 24. saatleri IL-6 düzeyleri yüksek bulundu. Kontrol grubu ile everolimus grubunun 2. saati ve I/R grubunun 24. saati ile everolimus grubunun 24. saati IL-6 düzeyleri arasındaki fark ise istatistiksel olarak anlamlıydı. İskemik hasarda doku hasarının önemli göstergesi olan MDA ve TNF- α düzeylerinin tedavi verilen grupta düşük olduğu ve IL-6'nın iskemik hasardaki rolünün koruyucu yönde de olabileceği literatüre dayanılarak göz önünde bulundurulacak olursa, IL-6 düzeylerinin tedavi grubunda yüksek olması, everolimusun IL-6 düzeylerini arttırarak iskemik hasarda koruyucu rol alabileceğini düşündürmektedir. Ancak henüz IL-6'nın I/R modellerindeki etkisinin ne yönde olduğuna dair kesin veriler mevcut olmadığı için bu artışın tedavi verilen grupta tamamen antiinflamatuvar amaçlı olabileceğini düşünmek çok iyimser bir yaklaşım olarak kalacaktır. Bu konuda daha fazla modellemeye ihtiyaç olduğu açıktır.

Çalışmamızda serum BUN ve kreatinin değerleri, tedavi alan grupta I/R grubuna göre, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, yüksek olarak bulundu. Hem ortalama BUN hem de ortalama kreatinin değerleri tedavi grubunda kontrol grubuna göre beklenildiği gibi anlamlı yüksek olmakla beraber I/R grubunun 2. ve 24. saatine göre de anlamlı yüksek durumdaydı. Tedavi grubunun ratlarındaki bu yüksek BUN ve kreatinin değerleri everolimusun MDA, MPO, TNF- α ve IL-6 üzerinden oluşturabileceği anlamlı ve olumlu beklenen etkilerinin laboratuvar olarak doğrulanamadığının bir göstergesidir. Reperfüzyonun 72. saat ve sonrasında ait veriler çalışma planımızda olmadığı için elimizde mevcut değildir. Ancak bu kadar olumlu sitokin yolakları, inflamatuvar hücre göçü ve oksidan radikallerin üzerinden bu denli olumlu etkileri olan bir ajanın laboratuvar parametreleri ve histopatolojik göstergeler açısından da olumlu değişimlere yol açabileceği beklentisi vardır ve I/R'nin uzun dönem (24 saat sonrasında) sonuçlarının da değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Literatürde

everolimusun nefrotoksik etkisine dair kesin veriler olmamakla birlikte yüksek doz verildiğinde glomeruloskleroz yaparak nefrotoksik olabileceği belirtilmektedir (24). Bizim çalışmamızda kullandığımız doz ratlar için yüksek kabul edilebilecek doz olmamakla beraber yapılan histopatolojik değerlendirmelerde de glomeruloskleroza ait bir bulguya rastlanmamıştır. Buna rağmen literatürde sirolimusun renal I/R modellemesinde renal fonksiyonların geri dönmesini geciktirdiği gösterilmiştir. Lieberthal ve arkadaşlarının yaptığı hayvan deneyinde bir grup deneğe sirolimus verilirken diğer gruba tedavi verilmemiş, deneklerden bir kısmına sham operasyonu yapılırken, bir kısmında da renal arter oklüzyonu oluşturulup, GFR düzeyleri ve tübül hücrelerindeki apoptosis değerlendirilmiştir. Renal arter oklüzyonu oluşturulan ve sirolimus verilen grupta 3. günde GFR’de bir düzelme olmadığı ve tübüler hücre apoptosisinin arttığı gözlenmiştir. Sirolimusun GFR üzerindeki olumsuz etkisinin $p70^{S6k}$ baskılanması yoluyla tubuler hücre kaybı ve buna karşı oluşan rejenerasyon cevabının baskılanması aracılığıyla olduğu düşünülmektedir (57). Everolimus ile sirolimusun etki mekanizmalarının aynı olduğu düşünülecek olursa, BUN ve kreatinin değerlerindeki yükselme everolimusun tübül hücreleri üzerindeki toksik etkisinden kaynaklanmış olabileceği düşünülebilir. Nitekim everolimusun renal I/R hasarında oksidatif stres, sitokinler ve inflamasyon üzerinde olumlu etkileri olmakla birlikte histopatolojik olarak olumlu bir etkisi izlenmemiştir.

Sonuç olarak everolimus renal iskemik hasarda oksidatif stres, sitokinler ve inflamatuvar göstergelerde iyileşme sağlasa da tübül hücrelerine karşı olası toksik etkisinden dolayı I/R’da renal fonksiyonların korunması ve histopatolojik iyileşme sağlanmasında yeterli görünmemektedir.

ÖZET

Akut böbrek yetmezliği klinikte sık olarak karşımıza çıkmakta, çoğu zaman I/R hasarı etyolojide rol oynamaktadır. Bu kadar sık görülen I/R hasarının patogenezinin aydınlatılması ve koruyucu bir tedavinin bulunması önemli olup, bu konuda pekçok çalışma yapılmaktadır

Çalışmamızda everolimusun profilaktik olarak kullanımının renal I/R hasarından koruyucu etkisinin olup olmadığının gösterilmesi amaçlanmıştır

Bu çalışmada toplam 46 adet erişkin 200-250 gram ağırlığında Wistar albino erkek sıçan üç gruba ayrıldı. Grup I, kontrol grubu olup bu gruptaki deneklere herhangi bir tedavi verilmedi. Bu deneklere laparotomi uygulanarak kan ve böbrek dokusu örnekleri alındı. Grup II, İskemi-Reperfüzyon Grubu olup bu gruptaki deneklere herhangi bir tedavi verilmedi. Laparotomi sonrası bilateral renal arterlere klempe konularak 45 dakika boyunca iskemi uygulandı, 2 saatlik ve 24 saatlik reperfüzyon sonrasında laparotomi yapılarak kan ve böbrek dokusu örnekleri alındı. Grup III tedavi grubu olup bu gruptaki deneklere 7 gün boyunca 1.5 mg/kg/gün peroral everolimus tedavisi verildi. Tedavi bitiminde laparotomi yapılarak bilateral renal arterlere klempe konuldu ve 45 dakika boyunca renal iskemi uygulandı, 2 saatlik ve 24 saatlik reperfüzyon sonrasında laparotomi yapılarak kan ve böbrek dokusu örnekleri alındı.

Tedavi etkinliğinin değerlendirilmesi için doku MDA, MPO düzeyleri, SOD aktivitesi, serum BUN, Kreatinin, IL-6 ve TNF- α düzeylerine bakıldı. Bulguların istatistiksel analizinde, everolimusun renal iskemik hasarda oksidatif stres, sitokinler ve inflamatuvar göstergelerde iyileşme sağlasa da tübül hücrelerine karşı olası toksik etkisinden dolayı I/R'de renal fonksiyonların korunması ve histopatolojik iyileşme sağlanmasında yeterli olmadığı görüldü.

KAYNAKLAR

1. Adkins JR, Silendirresena MR, Wang Z, Newman WH: Rapamycin Inhibits Release of Tumor Necrosis Factor- α from Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Am Surg* 70:384-387, 2004
2. Alonso A, Lau J, Jaber BL, Weintraub A, Sarnak MJ: Prevention of Radiocontrast Nephropathy With N-Acetylcysteine in Patients With Chronic Kidney Disease: A Meta-Analysis of Randomized, Controlled Trials. *Am J Kidney Dis* 43: 1-9, 2004
3. Arıcıoğlu A, Aydın S, Turkozkan N, Durmus O: The Effect of Allopurinol on Na⁺K⁺ ATPase Related Lipid Peroxidation in Ischemic and Reperfused Rabbit Kidney. *Gen Pharmac* 25: 341-344, 1994
4. Ascon DB, Lopez-Briones S, Liu M, Ascon M, Savransky V, Colvin RB, Soloski MJ, Rabb H: Phenotypic and Functional Characterization of Kidney-Infiltrating Lymphocytes in Renal Ischemia Reperfusion Injury. *J Immunol* 177: 3380-3387, 2006
5. Augustine JJ, Hricik DE: Experience With Everolimus. *Transplant Proc* 36(Suppl 2) 500-503, 2004.
6. Australian and New Zealand Intensive Care Society (ANZICS) Clinical Trials Group: Low-dose dopamine in patients with early renal dysfunction: a placebo-controlled randomised trial. *The Lancet* 356: 2139-2143, 2000
7. Azuma H, Nadeau K, Takada M, Mackenzie HS, Tilney TL: Cellular and molecular predictors of chronic renal dysfunction after initial ischemia/reperfusion injury of a single kidney. *Transplantation* 64: 190-197, 1997
8. Baud L, Ardaillou R: Involvement of reactive oxygen species in kidney damage. *Br Med Bull* 49: 621-629, 1993

9. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta R, Palevsky P, and the ADQI workgroup:
Acute renal failure Definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and
information technology needs: the Second International Consensus Conference of
Acute Quality Initiative (ADQI) Group. Crit Care 8: 204-212, 2004
10. Birck R, Krzossok S, Markowetz F, Schnülle P, van der Woude FJ, Braun C:
Acetylcystein for prevention of contrast nephropathy: meta-analysis. The Lancet 362:
598-603, 2003
11. Bonventre JV, Weinberg JM: Recent Advances in the Pathophysiology of Ischemic
Acute Renal Failure. J Am Soc Nephrol 14: 2199-2210, 2003
12. Bonventre JV, Zuk A: Ischemic acute renal failure: An inflammatory disease?. Kidney
Int 66: 480-485, 2004
13. Brady HR, Brenner BM: Acute Renal Failure: Harrison's Principles of Internal
Medicine. Ondördüncü baskı. Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD,
Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL (ed). The McGraw-Hill Companies
USA 1998, S. 1504-1513
14. Brady HR, Singer GG: Acute renal failure. Lancet 346: 1533-1540, 1995
15. Brezis M, Rosen S: Hypoxia of the renal medulla-its implication for disease. N Engl J
Med 332: 647-655, 1995
16. Burne MJ, Daniels F, Ghandour AE, Mauiyyedi S, Colvin RB, O'Donnell MP, Rabb
H: Identification of the CD4⁺T cell as a major pathogenic factor in ischemic acute
renal failure. J Clin Invest 108: 1283-1290, 2001
17. Burne-Taney MJ, Ascon DB, Daniels F, Racusen L, Baldwin W, Rabb H: B Cell
Deficiency Confers Protection from Renal Ischemia Reperfusion Injury. J Immunol
171: 3210-3215, 2003

18. Burne-Taney MJ, Yokota-Ikeda N, Rabb H: Effects of Combined T- and B-Cell Deficiency on Murine Ischemia Reperfusion Injury. *Am J Transplantation* 5: 1186-1193, 2005
19. Chandraker A, Takada M, Nadeau KC, Peach R, Tilney NL, Sayegh MH: CD28-B7 blockade in organ dysfunction secondary to cold ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int* 52: 1678-1684, 1997
20. Cheeseman KH, Slater TF: An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 49: 481-493, 1993
21. Chiao H, Kohda Y, McLeroy P, Craig L, Housini I, Star RA: α -Melanocyte-stimulating Hormone Protects Against Renal Injury after Ischemia in Mice and Rats. *J Clin Invest* 99: 1165-1172, 1997
22. Coux G, Trumper L, Elias MM: Renal function and cortical (Na⁺+K⁺)-ATPase activity, abundance and distribution after ischemia-reperfusion in rats. *Biochim Biophys Acta* 1586: 71-80, 2002
23. Crowe A, Bruelisauer A, Duerr L, Guntz P, Lemaire M: Absorption and intestinal metabolism of SDZ-RAD and rapamycin in rats. *Drug Metab Dispos* 27: 627-632, 1999
24. Daniel C, Renders L, Amann K, Schulze-Lohoff E, Hauser IA, Hugo C: Mechanisms of Everolimus-Induced Glomerulosclerosis After Glomerular Injury in the Rat. *Am J of Transplantation* 5: 2849-2861, 2005
25. Denton MD, Chertovv GM, Bray HR: "Renal-dose" dopamine for the treatment of acute renal failure: Scientific rationale, experimental studies and clinical trials. *Kidney Int* 49: 4-14, 1996

26. De Perrot M, Young K, Imai Y, Liu M, Waddell TK, Fischer S, Zhang L, Keshavjee S: Recipient T Cells Mediate Reperfusion Injury after Lung Transplantation in the Rat. *J Immunol* 171: 4995-5002, 2003
27. Dobashi K, Ghosh B, Orak JK, Singh I, Singh AK: Kidney ischemia-reperfusion: Modulation of antioxidant defenses. *Mol Cell Biochem* 205: 1-11, 2000
28. Donnahoo KK, Meldrum DR, Shenkar R, Chung CS, Abraham E, Harken AH: Early renal ischemia, with or without reperfusion, activates NFkB and increases TNF- α bioactivity in the kidney. *J Urol* 163: 1328-1332, 2000
29. Donnahoo KK, Meng X, Ao L, Ayala A, Shames BD, Cain MP, Harken AH: Differential cellular immunolocalization of renal tumor necrosis factor- α production during ischemia versus endotxaemia. *Immunology* 102: 53-58, 2001
30. Donahoo KK, Shames BD, Harken AH, Meldrum DR: Review article: The role of tumor necrosis factor in renal ischemia-reperfusion injury. *J Urol* 162: 196-203, 1999
31. Dragun D, Tullius SG, Park JK, Maasch C, Lukitsch I, Lippoldt A, Grob V, Luft FC, Haller H: ICAM-1 antisense oligodesoxynucleotides prevent reperfusion injury and enhance immediate graft function in renal transplantation. *Kidney Int* 54: 590-602, 1998
32. Farivar AS, Merry HE, Fica-Delgado MJ, McCourtie AS, Mackinnon-Patterson BC, Mulligan MS: Interleukin-6 Regulation of Direct Lung Ischemia Reperfusion Injury. *Ann Thorac Surg* 82: 472-479, 2006
33. Forbes JM, Hewitson TD, Becker GJ, Jones CL: Ischemic acute renal failure: Long-term histology of cell and matrix changes in the rat. *Kidney Int* 57: 2375-2385, 2000
34. Friedewald JJ, Rabb H: Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 66: 486-491, 2004

35. Greene EL, Paller MS: Oxygen Free Radicals in Acute Renal Failure. *Miner Electrolyte Metab* 17: 124-132, 1991
36. Grinyo JM: Role of Ischemia-Reperfusion Injury in the Development of Chronic Renal Allograft Damage. *Transplant Proc* 33: 3741-3742, 2001
37. Gueler F, Rong S, Park JK, Fiebeler A, Menne J, Elger M, Mueller DN, Hampich F, Dechend R, Kunter U, Luft FC, Haller H: Postischemic Acute Renal Failure Is Reduced by Short-Term Statin Treatment in a Rat Model. *J Am Soc Nephrol* 12: 2288-2298, 2002
38. Guyton AC, Hall JE: Urine Formation by the Kidneys:I. Glomerular Filtration, Renal Blood Flow, and Their Control:Textbook of Medical Physiology. Dokuzuncu baskı. WB Saunders Company Philadelphia, Pennsylvania 1996, S. 315-330
39. Haller H, Dragun D, Miethke A, Park JK, Weis A, Lippoldt A, Grob V, Luft FC: Antisense oligonucleotides for ICAM-1 attenuate reperfusion injury and renal failure in the rat. *Kidney Int* 50: 473-480, 1996
40. Heinzelmann M, Mercer-jones MA, Passmore JC: Neutrophils and Renal Failure. *Am J Kidney Dis* 34: 384-389, 1999
41. Hellberg POA, Kallskog ÖT, Öjteg G, Wolgast M: Peritubular capillary permeability and intravascular RBC aggregation after ischemia: effects of neutrophils. *Am J Physiol* 258: 1018-1025, 1990
42. Herrmann O, Tarabin V, Suzuki S, Attigah N, Coserea I, Schneider A, Vogel J, Prinz S, Schwab S, Monyer H, Brombacher F, Schwaninger M: Regulation of Body Temperature and Neuroprotection by Endogenous Interleukin-6 in Cerebral Ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 23: 406-415, 2003

43. Jacinto SM, Chintala MS, Lokhandwala MF, Jandhyala BS: Efficacy and mechanisms of dopexamine in the prevention of ischemia-reperfusion induced organ damage: Role of oxygen free radicals. *Clin and Exper Hypertension* 19: 181-190, 1997
44. Jo SK, Sung SA, Cho WY, Go KJ, Kim HK: Macrophages contributes to the initiation of ischaemic acute renal failure in rats. *Nephrol Dial Transplant* 21: 1231-1239, 2006
45. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO: *Urinary System: Basic Histology*. Yedinci baskı. Appleton & Lange, Lebanon 1992, S.371-393
46. Kellum JA, Decker JM: Use of dopamine in acute renal failure: A meta-analysis. *Crit Care Med* 29: 1526-1531, 2001
47. Kelly KJ, Williams WW, Colvin RB, Meehan SM, Springer TA, Gutierrez-Ramos JC, Bonventre JV: Intercellular Adhesion Molecule-1-deficient Mice Are Protected against Ischemic Renal Injury. *J Clin Invest* 97: 1056-1063, 1996
48. Kimizuka K, Nakao A, Nalesnik MA, Demetris AJ, Uchiyama T, Ruppert K, Fink MP, Stolz DB, Murase N: Exogenous IL-6 Inhibits Acute Inflammatory Responses and Prevents Ischemia/Reperfusion Injury after Intestinal Transplantation. *Am J Transplant* 4: 482-494, 2004
49. Kirchner GI, Meier-Wiedenbach I, Manns MP: Clinical Pharmacokinetics of Everolimus. *Clin Pharmacokinet* 43: 83-95, 2004
50. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL: *The Kidney and Its Collecting System: Basic Pathology*. Beşinci baskı. Mitchell J (ed) WB Saunders, Philadelphia, Pennsylvania 1992, S. 437-471
51. Kusaka M, Zandi-Nejad K, Kato S, Beato F, Nagano H, Shaw GD, Tilney NL: Exploitation of the continuum between early ischemia/reperfusion injury and host alloresponsiveness: Indefinite kidney allograft survival by treatment with soluble P-

- selectin ligand and low-dose cyclosporine in combination. *Transplantation* 67: 1255-1261, 1999
52. Kwon O, Corrigan G, Myers BD, Sibley R, Scandling JD, Dafoe D, Alfrey E, Nelson WJ: Sodium reabsorption and distribution of Na^+/K^+ -ATPase during postischemic injury to the renal allograft. *Kidney Int* 55: 963-975, 1999
 53. Kwon O, Nelson WJ, Sibley R, Huie P, Scandling JD, Dafoe D, Alfrey E, Myers BD: Backleak, Tight Junctions, and Cell-Cell Adhesion in Postischemic Injury to the Renal Allograft. *J Clin Invest* 101: 2054-2064, 1998
 54. Lameire N, Biesen WV, Vanholder R: Acute renal failure. *The Lancet* 365: 417-430, 2005
 55. Lehle K, Birnbaum DE, Preuner JG: Predominant Inhibition of Interleukin-6 Synthesis in Patient-Specific Endothelial Cells by mTOR Inhibitors Below a Concentration Range Where Cell Proliferation Is Affected and Mitotic Arrest Takes Place. *Transplant Proc* 37: 159-161, 2005
 56. Lemay S, Rabb H, Postler G, Singh AK: Prominent and sustained up-regulation of gp130-signaling cytokines and of the chemokine MIP-2 in murine renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 69: 959-963, 2000
 57. Lieberthal W, Fuhro R, Andry CC, Rennke H, Abernathy VE, Koh JS, Valeri R, Levine JS: Rapamycin impairs recovery from acute renal failure: role of cell-cycle arrest and apoptosis of tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: 693-706, 2001
 58. Lopez-Neblina F, Paez-Rollys AJ, Toledo-Pereyra LH: Mechanism of Protection of Verapamil by Preventing Neutrophil Infiltration in the Ischemic Rat Kidney. *J Surg Res* 61: 469-472, 1996

59. Lopez-Neblina F, Toledo-Pereyra LH, Mirmiran R, Paez-Rollys AJ: Time dependence of Na-nitroprusside administration in the prevention of neutrophil infiltration in the rat ischemic kidney. *Transplantation* 61: 179-183, 1996
60. Mehta BL, Pascual MT, Soroko S, Chertow CM: Diuretics, Mortality, and Nonrecovery of Renal Function in Acute Renal Failure. *JAMA* 288: 2547-2553, 2002
61. Meldrum KK, Meldrum DR, Hile KL, Yerkes EB, Ayala A, Cain MP, Rink RC, Casale AJ, Kaefer MA: p38MAPK mediates renal tubular cell TNF- α production and TNF- α dependent apoptosis during simulated ischemia. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: 563-570, 2001
62. Miyazawa S, Watanabe H, Miyaji C, Hotta O, Abo T: Leukocyte accumulation and changes in extra-renal organs during renal ischemia reperfusion in mice. *J Lab Clin Med* 139: 269-278, 2002
63. Molitoris BA, Dahl R, Geerdes A: Cytoskeleton disruption and apical redistribution of proximal tubule Na⁺/K⁺-ATPase during ischemia. *Am J Physiol* 263: 488-495, 1992
64. Molitoris BA, Marrs J: The Role of Cell Adhesion Molecules in Ischemic Acute Renal Failure. *Am J Med* 106: 583-592, 1999
65. Molitoris BA, Sutton TA: Endothelial injury and dysfunction: Role in the extension phase of acute renal failure. *Kidney Int* 66: 496-499, 2004
66. Moore KL: The abdomen: Clinically Oriented Anatomy. Üçüncü baskı. Satterfield TS (ed) Williams&Wilkins Baltimore 1992, S.127-242
67. Nolan CR, Anderson RJ: Hospital-Acquired Acute Renal Failure. *J Am Soc Nephrol* 9: 710-718, 1998
68. Okhawa H, Ohishi N, Yagi K: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95: 351-358, 1979

69. Paller MS, Hoidal JR, Ferris TF: Oxygen Free Radicals in Ischemic Acute Renal Failure in the Rat. *J Clin Invest* 74: 1156-1164, 1984
70. Park P, Haas M, Cunningham PN, Bao L, Alexander JJ, Quigg RJ: Injury in renal ischemia- reperfusion is independent from immunoglobulins and T lymphocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 282: 352-357, 2002
71. Patel NSA, Chatterjee PK, Di Paola R, Mazzon E, Britti D, De Sarro A, Cuzzocrea S, Thiernemann C: Endogenous Interleukin-6 Enhances the Renal Injury, Dysfunction, and Inflammation Caused by Ischemia/Reperfusion. *J Pharmacol and Exper Ther* 312: 1170-1178, 2005
72. Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G: Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 364: 1814-1827, 2004
73. Piper SN, Kumle B, Maleck WH, Kiessling AH, Lehmann A, Röhm KD, Suttner SW, Boldt J: Diltiazem may preserve renal tubular integrity after cardiac surgery. *Can J Anesth* 50: 285-292, 2003
74. Puglisi RN, Strande L, Santos M, Schulte G, Hewitt CW, Whalen TV: Beneficial Effects of Cyclosporine and Rapamycin in Small Bowel Ischemic Injury. *J Surg Research* 65: 115-118, 1996
75. Rabb H: The T cell as a bridge between innate and adaptive immune systems: Implications for the kidney. *Kidney Int* 61: 1935-1946, 2002
76. Rabb H, Daniels F, O'donnell M, Haq M, Saba SR, Keane W, Tang WW: Pathophysiological role of T lymphocytes in renal ischemia-reperfusion injury in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: 525-531, 2000

77. Rabb H, Mendiola CC, Dietz J, Saba SR, Issekutz TB, Abanilla F, Bonventre JV, Ramirez G: Role of CD11a and CD11b in ischemic acute renal failure in rats. *Am J Physiol* 267: 1052-1058, 1994
78. Rabb H, Ramirez G, Saba SR, Reynolds D, Xu J, Flavell R, Antonia S: Renal ischemic-reperfusion injury in L-selectin-deficient mice. *Am J Physiol* 271: 408-413, 1996
79. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB: Pharmacological Approach to Tissue Injury Mediated by Free Radicals and Other Reactive Oxygen Metabolites. *Am J Surg* 161: 488-503, 1991
80. Rhoden E, Telöken C, Lucas M, Rhoden C, Mauri M, Zettler C, Bello-Klein A, Barros E: Protective effect of allopurinol in the renal ischemia-reperfusion in unephrectomized rats. *General Pharmacology* 35: 189-193, 2002
81. Sahna E, Parlakpınar H, Öztürk F, Cigremis Y, Acet A: The protective effects of physiological and pharmacological concentrations of melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Urol Res* 31: 188-193, 2003
82. Schetz M: Should we use diuretics in acute renal failure?. *Best Prac & Res Clin Anaesthesiol* 18: 75-89, 2004
83. Schilliday IR, Quinn KJ, Allison MEM: Loop diuretics in the management of acute renal failure: a prospective, double blind, placebo-controlled, randomized study. *Nephrol Dial Transplant* 12: 2592-2596, 1997
84. Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A: Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest* 114: 5-14, 2004
85. Schuurman HJ, Pally G, Weckbecker G, Schuler W, Bruns C: SDZ RAD Inhibits Cold Ischemia-Induced Vascular Remodeling. *Transplant Proc* 31: 1024-1025, 1999

86. Sheridan AM, Bonventre JV: Pathophysiology of Ischemic Acute Renal Failure. *Contrib Nephrol* 132: 7-21, 2001
87. Shoskes DA: Nonimmunologic Renal Allograft Injury and Delayed Graft Function: Clinical Strategies for Prevention and Treatment. *Transplant Proc* 32: 766-768, 2000
88. Singbarti K, Ley K: Protection from ischemia-reperfusion induced severe acute renal failure by blocking E-selectin. *Crit Care Med* 28: 2507-2514, 2000
89. Sun Y, Oberley LW, Li Y: A Simple Method for Clinical Assay of Superoxide Dismutase. *Clin Chem* 34: 497-500, 1988
90. Tajra LCF, Martin X, Margonari J, Blanc-Brunat N, Ishibashi M, Vivier G, Steghens JP, Kawashima H, Miyasaka M, Dubernard JM, Revillard JP: Antibody-induced modulation of leukocyte CD11b integrin prevents mild but not renal ischaemic injury. *Nephrol Dial Transplant* 15: 1556-1561, 2000
91. Takada M, Chandraker A, Nadeau KC, Sayegh MH, Tilney NL: The role of the B7 costimulatory Pathway in Experimental Cold Ischemia/Reperfusion Injury. *J Clin Invest* 100: 1199-1203, 1997
92. Takada M, Nadeau KC, Shaw GD, Marquette KA, Tilney NL: Prevention of Late Renal Changes After Initial Ischemia Reperfusion Injury By Blocking Early Selectin Binding. *Transplantation* 64: 1520-1525, 1997.
93. Takada M, Nadeau KC, Shaw GD, Marquette KA, Tilney NL: The Cytokine-adhesion Molecule Cascade in Ischemia/Reperfusion Injury of the Rat Kidney. *J Clin Invest* 99: 2682-2690, 1997
94. Tan HP, Basu A, Shapiro R: Everolimus: an update. *Curr Opin Organ Transpl* 8: 323-326, 2003

95. Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV: Acute renal failure. *N Engl J Med* 334: 1448-1460, 1996
96. Thornton MA, Winn R, Alpers CE, Zager RA: An Evaluation of the Neutrophil as a Mediator of In Vivo Renal Ischemic-Reperfusion Injury. *Am J Pathol* 135: 509-515, 1989
97. Tilney NL, Guttman RD: Effects of Initial Ischemia/Reperfusion Injury on the Transplanted Kidney. *Transplantation* 64: 945-947, 1997
98. Tisher CC: Structure and Function of Kidneys: Cecil Textbook of Medicine. Yirmibirinci baskı. Goldman L, Bennet JC (ed). WB Saunders Company Philadelphia, Pennsylvania 2000, S. 532-539
99. Versteilen AMG, Di Maggio F, Leemreis JR, Groeneveld ABJ, Musters RJP, Sipkema P: Molecular mechanisms of acute renal failure following ischemia/reperfusion. *Int J Artif Organs* 27: 1019-1029, 2004
100. Vincent JL, Bota DP, De Backer D: Epidemiology and outcome in renal failure. *Int J Artif Organs* 27: 1013-1018, 2004
101. Williams P, Lopez H, Britt D, Chan C, Ezrin A, Hottendorf R: Characterization of Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *J Pharmacol and Toxicol Methods* 37: 1-7, 1997
102. Yin M, Buurman WA, Daemen JW, Kootstra G: The PAF antagonist TCV-309 reduces graft PMN infiltration and enhances early function of 24-hour-preserved rat kidneys with long warm ischemia. *Transplantation* 61: 1443-1446, 1996
103. Yokota N, Daniels F, Crosson J, Rabb H: Protective effect of T cell depletion in murine renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 74: 759-763, 2002

104. Yokota N, O'Donnell M, Daniels F, Burne-Taney M, Keane W, Kasiske B, Rabb H: Protective Effect of HMG-CoA Reductase Inhibitor on Experimental Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *Am J Nephrol* 23: 13-17, 2003
105. Yseabert DK, De Greef KE, De Beuf A, Van Rompay AR, Vercauteren S, Persy VP, De Broe ME: T cells as mediators in renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int* 66: 491-496, 2004
106. Ysebaert DK, De Greef KE, Vercauteren SR, Ghielli M, Verpooten GA, Eyskens EJ, De Broe ME: Identification and kinetics of leukocytes after severe ischaemia/reperfusion renal injury. *Nephrol Dial Transplant* 15: 1562-1574, 2000