

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

**RAT RENAL İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI  
MODELİNDE MAGNEZYUM SÜLFATIN  
KORUYUCU ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. YEŞİM ERGÜL KORKMAZ**

**UZMANLIK TEZİ  
İZMİR - 2013**

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

**RAT RENAL İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI  
MODELİNDE MAGNEZYUM SÜLFATIN  
KORUYUCU ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. YEŞİM ERGÜL KORKMAZ**

**Danışman Öğretim üyesi**

**Yrd. Doç. Dr. Mert AKAN**



## İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

<b>TEŞEKKÜR.....</b>	<b>i</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ .....</b>	<b>ii</b>
<b>GRAFİK LİSTESİ .....</b>	<b>iii</b>
<b>RESİM LİSTESİ .....</b>	<b>iv</b>
<b>TABLO LİSTESİ.....</b>	<b>v</b>
<b>KISALTMALAR.....</b>	<b>vi</b>
<b>ÖZET .....</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>2</b>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ.....</b>	<b>3</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>5</b>
2.1. İskemi .....	5
2.2.Reperfüzyon .....	9
2.3.Böbrek İskemi Reperfüzyon Hasarı .....	10
2.4.Farmakolojik Koşullama .....	13
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>16</b>
3.1.Anestezi Uygulaması.....	16
3.2.Deney Grupları ve Protokol .....	16
3.3.Deneysel Çalışma Modeli .....	17
3.4.Histomorfolojik Değerlendirme .....	18
3.5.Dışlama Kriterleri.....	22
3.6.İstatiksel Değerlendirme .....	22
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>23</b>
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>37</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>39</b>
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>40</b>
<b>8. EKLER.....</b>	<b>46</b>

## TEŞEKKÜR

*Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım ve anesteziyolojinin temel ilkelerini öğrendiğim hocalarım; Prof .Dr. Atalay Arkan, Prof .Dr. Ali Günerli, Prof. Dr. Zahide Elar, Prof. Dr. Erol Gökel, Prof. Dr. Semih Küçükgüçlü, Prof. Dr. Ali Necati Gökmen, Prof. Dr. Sermin Öztekin, Prof. Dr. Bahar Kuvaki Balkan, Prof. Dr. Deniz Özzeybek, Prof. Dr. Leyla İyilikçi, Prof. Dr. Hasan Hepağuşlar, Doç. Dr. Ayşe Karcı, Doç. Dr. Fikret Maltepe, Doç. Dr. Uğur Koca, Doç. Dr. Çimen Olguner, Doç. Dr. Sevda Özkardeşler, Doç. Dr. Volkan Hancı, Doç. Dr. Serhan Yurtlu, Doç. Dr. Ferim Günenç, Yrd. Doç. Dr. Yüksel Erkin, Yrd. Doç. Dr. Aydın Taşdöğen' e*

*Tez çalışmamın her aşamasında desteğini esirgemeyen, çok kıymetli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Mert Akan' a; tez yürütücülerim Doç. Dr. Sevda Özkardeşler ,Doç. Dr. Volkan Hancı ve Uzm. Dr. Nilay Boztaş' a; yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Bekir Ergür ve Arş.Gör. Dr.Gonca Kamacı' ya,*

*Uzmanlık eğitimim boyunca, beraber çalıştığımız öğretim üyelerine, uzmanlara ve asistan arkadaşlarıma, anestezi teknikerleri, ameliyathane, yoğun bakım, ağrı ünitesi, derlenme, gündüz hastanesi hemşire ve personeline;*

*Sevgisini ve desteğini hep hissettiren sevgili aileme ,*

*Sonsuz Teşekkürler...*

*Dr.Yeşim Ergül Korkmaz*

<b>Şekil 1:</b> İskemi reperfüzyon hasarı sonrası uzak organ hasarı oluşumu .....	6
<b>Şekil 2:</b> Hücre zedelenmesinde sitoplazmik kalsiyum artışının sebepleri ve sonuçları.....	7
<b>Şekil 3:</b> Serbest oksijen radikalinin dokudaki doğrudan ve dolaylı etkileri.....	8
<b>Şekil 4:</b> İskemik ve akut tübüler nekroz (ATN) patogenezinde rol oynayan faktörlerin şematik görünümü .....	11
<b>Şekil 5:</b> Deney protokolünün şematik görünümü.....	17

## **GRAFİK LİSTESİ**

## **Sayfa No**

<b>Grafik 1:</b> Böbrek histomorfolojik incelemesinde kapiller vazodilatasyon skorları .....	24
<b>Grafik 2:</b> Böbrek histomorfolojik incelemesinde mononükleer hücre infiltrasyonu skorları..	25
<b>Grafik 3:</b> Böbrek histomorfolojik incelemesinde tübüler değişiklik skorları .....	26
<b>Grafik 4:</b> Böbrek histomorfolojik incelemesinde glomerüler değişiklik skorları .....	27
<b>Grafik 5:</b> Böbrek histomorfolojik hasar toplam skorları.....	28

## **TABLO LİSTESİ**

## **Sayfa No**

<b>Tablo 1:</b> Rutin doku takibi.....	19
<b>Tablo 2:</b> Hematoksilen-Eozin boyama protokolü.....	21
<b>Tablo 3:</b> Gruplara ait histomorfolojik hasar skorları.....	23

## **RESİM LİSTESİ**

## **Sayfa No**

<b>Resim 1:</b> Böbrek dokusu <i>Sham</i> grubuna ait H-E ile boyanmış kesit görüntüler.....	30
<b>Resim 2:</b> Böbrek dokusu <i>Sham</i> grubuna ait H-E ile boyanmış kesit görüntüler.....	31
<b>Resim 3:</b> Böbrek dokusu İR grubuna ait H-E ile boyanmış kesit görüntüler.....	32
<b>Resim 4:</b> Böbrek dokusu İR grubuna ait H-E ile boyanmış kesit görüntüler.....	33
<b>Resim 5:</b> Böbrek dokusu İR grubuna ait H-E ile boyanmış kesit görüntüler.....	34
<b>Resim 6:</b> Böbrek dokusu Mg-İ grubuna ait H-E ile boyanmış kesit görüntüler.....	35
<b>Resim 7:</b> Böbrek dokusu Mg-R grubuna ait H-E ile boyanmış kesit görüntüler.....	36

## **KISALTMALAR**

<b>ATN:</b>	Akut Tübüler Nekroz
<b>ATP:</b>	Adenozin Trifosfat
<b>cAMP:</b>	Siklik Adenozin Monofosfat
<b>cGMP:</b>	Siklik Guanozin Monofosfat
<b>GFH:</b>	Glomerüler Filtrasyon Hızı
<b>H-E:</b>	Hematoksilen Eozin
<b>İR:</b>	İskemi-Reperfüzyon
<b>i.p.:</b>	İntraperitoneal
<b>i.v.:</b>	İntravenöz
<b>MNH:</b>	Mononükleer Hücre
<b>MOF:</b>	<i>Multiple Organ Failure</i> (Çoklu Organ Yetersizliği)
<b>MPO:</b>	Myeloperoksidaz
<b>NO:</b>	Nitrik Oksit
<b>PMNL:</b>	Polimorf Nüveli Lökosit
<b>SIRS:</b>	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i> (Sistemik Enflamatuvar Yanıt Sendromu)
<b>SOR:</b>	Serbest Oksijen Radikali
<b>TNF-<math>\alpha</math>:</b>	Tümör Nekrozis Faktör Alfa
<b>TxA<sub>2</sub>:</b>	Tromboksan A2

## **ÖZET**

### **Rat Renal İskemi Reperfüzyon Hasarı Modelinde Magnezyum Sülfatın Koruyucu**

#### **Etkinliğinin Araştırılması**

Dr.Yeşim Ergül Korkmaz, DEÜTF Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD, İZMİR

**Amaç:** Böbrek transplantasyonu, kısmi nefrektomi, kardiyopulmoner *bypass* gibi çeşitli klinik durumlarda böbrek kan akımının durması sonrası böbrekte iskemi görülür. İskemi reperfüzyon (İR); iskemi sonrasında yeniden kanlanma olarak tanımlanır. Reperfüzyon dokulara iskemik hasardan daha fazla zarar verebilmektedir. Bu çalışmanın amacı; rat renal İR hasarı modelinde iskemi öncesi veya reperfüzyon sonrası uygulanan magnezyum sülfatın koruyucu etkinliğinin araştırılmasıdır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmada ağırlıkları 250-300 g arasında değişen 28 adet Wistar albino cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlar her birinde yedişer denek olacak şekilde dört gruba ayrıldı. Grup I (*Sham*): Laparotomi sonrası sol renal pedikül diseke edilip başka bir girişim yapılmadı. Grup II (İR): Laparotomi sonrasında sol böbreğe 45 dk. total iskemi sonrası 5 saat reperfüzyon uygulandı. Grup III (Mg-İ): Laparotomi sonrasında renal iskemiden 5 dakika önce 200 mg/kg magnezyum sülfat intraperitoneal verilip sol böbreğe İR (45 dk. iskemi + 5 saat reperfüzyon) uygulandı. Grup IV (Mg-R): Laparotomi sonrasında sol böbreğe İR (45 dk.iskemi + 5 saat reperfüzyon) uygulanıp reperfüzyonun 5. dakikasında 200 mg/kg magnezyum sülfat intraperitoneal verildi. Tüm gruplarda ratların anestezi süresi eşit tutuldu, histomorfolojik değerlendirme için reperfüzyon sonrası sol böbrek çıkarıldıktan sonra ratlar sakrifiye edildi.

**Bulgular:** Böbrek histomorfolojik hasar toplam skoru (HHTS) *Sham* grubunda diğer gruplara göre anlamlı olarak düşük bulundu ( $p < 0,05$ ). İskemi Reperfüzyon grubu ile Mg-İ grubu karşılaştırıldığında Mg-İ grubunda HHTS anlamlı olarak düşük bulundu ( $p < 0,05$ ). İskemi Reperfüzyon grubu ile Mg-R grubu karşılaştırıldığında HHTS değerleri arasında anlamlı fark saptanmadı ( $p = 0,38$ ). Mg-İ ile Mg-R grupları arasında HHTS değerleri arasında anlamlı fark bulunmadı ( $p = 0,31$ ).

**Sonuç:** Bu çalışmada; rat renal İR modelinde iskemi öncesi uygulanan magnezyum sülfatın böbrek İR hasarını histomorfolojik olarak anlamlı düzeyde azalttığı saptandı.

**Anahtar Kelimeler:** Böbrek, reperfüzyon hasarı, magnezyum sülfat.



## **SUMMARY**

### **Investigation of the Protective Effects of Magnesium Sulfate in Rat Renal Ischaemia Reperfusion Injury Model**

Dr.Yeşim Ergül Korkmaz, Dokuz Eylül University, Medical Faculty, Dept.of Anaesthesiology, IZMIR

**Background:** Renal ischaemia can develop after cessation of the renal blood flow in some clinical situations such as renal transplantation, partial nephrectomy and cardiopulmonary bypass. Ischaemia reperfusion (IR) is defined as the returning of blood flow after ischaemic cessation. Reperfusion can be more harmful than the ischaemia itself. The aim of this study was to evaluate the protective effects of magnesium sulfate administration before ischaemia or after reperfusion in the rat renal IR injury model.

**Materials and Methods:** 28 Wistar albino male rats weighing approximately 250-300 g were divided into 4 groups. Group I (Sham): Laparotomy and left renal pedicle dissection were performed and the rats were observed without any intervention. Group II (IR): Following laparotomy and 45 minutes of left renal pedicle occlusion, 5 hours of reperfusion was performed. Group III (Mg-I): Following laparotomy and five minutes before the ischaemia, magnesium sulfate was administered intraperitoneally (200 mg/kg) and then IR was applied to the left kidney. Group IV (Mg-R): Following laparotomy and left renal ischaemia, magnesium sulfate was administered intraperitoneally (200 mg/kg) at the fifth minute of reperfusion. Durations of anaesthesia were equal in all groups. All the rats were sacrificed after the left kidney was processed for conventional histomorphology.

**Results:** The total histomorphological renal injury score was significantly lower in the Sham group compared with the other groups ( $p < 0.05$ ). The total renal injury score of Mg-I group was significantly lower than the IR group ( $p \leq 0.05$ ). There were no significant differences in the total renal injury scores between the IR and Mg-R groups ( $p = 0,38$ ) and also between the Mg-I and Mg-R groups ( $p = 0,31$ ).

**Conclusions:** In the present study, it was demonstrated histomorphologically that magnesium sulfate administration before the renal ischaemia decreased IR injury significantly in this experimental model.

**Key words:** Kidney, reperfusion injury, magnesium sulfate.

## **1.GİRİŞ VE AMAC**

İskemi, doku perfüzyonunun durması sonucunda oksijen (O<sub>2</sub>) ve diğer substratların dokulara yeterli düzeyde sağlanamaması ve bu süreçte oluşan atık ürünlerin dolaşım tarafından uzaklaştırılmaması olarak tanımlanır. Bu durum geri dönüşümlü veya dönüşümsüz hücre hasarı ile sonuçlanır (1).

İskemi reperfüzyon (İR), doku veya organa giden kan akımında bir süre azalma veya kesilme sonrasında yeniden kanlanma olarak tanımlanır. Kan akımının tekrar başlaması dokulara iskemik hasardan daha fazla zarar verebilmektedir (2).

İskemi reperfüzyon hasarı; platelet agregasyonu, lökosit enfiltrasyonu, hücre içi kalsiyum yüklenmesi, serbest oksijen radikali oluşumu ile karakterize lokal ve sistemik enflamatuvar bir yanıttır (3). İskemik periyod süresince dokuda mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun değişmesi, adenozin trifosfat (ATP) azalması, hücre içi Ca<sup>+2</sup> artışı ve hücre iskeleti ile membran fosfolipitlerinin bozulmasına öncülük eden proteaz ve fosfatazların aktive olması sonucu aşırı miktarda serbest oksijen radikalleri (SOR) oluşarak oksidatif strese neden olur (4-6). İskemi reperfüzyon hasarında, iskemik dokunun reperfüzyonu, sıklıkla endotel bağımlı dilatasyonda bozulma, sıvı enfiltrasyonu ve plazma protein ekstravazasyonu ile kendini gösteren mikrovasküler disfonksiyon ile birlikte (7).

Reperfüzyonu izleyen periyotta aktive endotel hücrelerinde sentezlenen oksijen radikalleri artarken, nitrit oksit (NO) düzeyi azalır. Bunun sonucunda NO ve oksijen radikalleri arasındaki denge bozulur. İskemiye maruz kalmayan uzak organlardaki aktive endotel hücrelerden de reperfüzyon sonrası enflamatuvar mediyatörlerin salındığı görülmüştür. İskemi reperfüzyonun uzak organ etkileri en sık akciğer ve kardiyovasküler sistemde görülmekle beraber İR; sistemik enflamatuvar yanıt sendromu [*Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)*] ile de sonuçlanabilir (8). İskemi reperfüzyona karşı gelişen bu uzak organ cevabı mikrovasküler hasara yol açarak çoklu organ yetersizliği [*Multiple Organ Failure (MOF)*] gelişmesine neden olabilir (8). Böbrek iskemisi; *böbrek transplantasyonu, kısmi nefrektomi, kardiyopulmoner bypass, sepsis, ürolojik girişimler ve hidronefroz* gibi çeşitli klinik durumlarda görülür.

Renal İR hasarı akut renal yetmezliğin major bir nedenidir. Ratlarda iskemi reperfüzyon ile oluşturulmuş akut renal yetmezlik; renal tüp epitelinde yapısal değişiklikler ve glomerüler filtrasyon hızı (GFH) azalması ile karakterizedir (9).

Yapılan histopatolojik çalışmalarda İR hasarı sonucu böbreklerde mikrovasküler permeabilitede artış, interstisyel ödem, vazoregülasyonda bozulma, enflamatuvar hücre infiltrasyonu, parankimal hücre disfonksiyonu ve iskemi sırasında ya da sonrasında akut tübüler nekroz geliştiği gösterilmiştir (7,10).

İskemi reperfüzyon hasarının etkilerini azaltmak için kullanılan yöntemler arasında uzak iskemik ön koşullama (UİÖK) ve farmakolojik koşullama en sık tercih edilenlerdir (11).

Farmakolojik koşullama koruyucu (ön koşullama) ve/veya tedavi edici (ard koşullama) olarak uygulanabilir (12). Bu amaçla böbrek İR hasarında farklı ilaçların kullanıldığı birçok çalışma yapılmıştır. Magnezyum (Mg), N-asetil sistein, aktive protein C, alfa melanosit stimüle edici hormon, statin ve deksmedetomidin gibi ajanların İR hasarını azalttığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (9, 13,14,15).

Magnezyum vücutta en çok bulunan 4. katyondur. Baskın olarak hücre içi katyondur. Magnezyum kan mononükleer hücreleri dahil çeşitli hücrelerde enzimatik reaksiyonlar, hücre kanalları, reseptörler ve hücre içi sinyal molekülleri üzerinde etkilidir. İyon kanal düzenleyicisidir, hücresel iyon dengesinin korunmasına katkıda bulunur. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu azaltarak düz kaslarda gevşeme ve vazodilatasyon sağlar. Magnezyum aynı zamanda endokrin fonksiyonlar ve protein sentezi için gereklidir (9).

Literatür taramalarımızda rat renal iskemi reperfüzyon hasarı modelinde Mg sülfatın iskemi öncesi ve reperfüzyon sonrası bolus uygulanmasının koruyucu etkinliğini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasının amacı; rat renal iskemi reperfüzyon hasarı modelinde iskemi öncesi veya reperfüzyon sonrası uygulanan Mg sülfatın koruyucu etkinliğinin araştırılmasıdır.

## **2.GENEL BİLGİLER**

İskemi akut renal yetmezliğin en sık nedenidir (16). Böbrekler iskemiye özellikle duyarlı organlardır. Renal transplantasyon, suprarenal anevrizma tedavisi, kontrast madde nefropatisi , kardiyak arrest ve şok gibi durumlarda böbrek iskemisine bağlı akut böbrek yetmezliği gelişebilir (17-19). Böbreklerin iskemiye duyarlı olmasının bir nedeni karmaşık mikrovasküler yapıları ve yüksek enerji gereksinimidir.

İskemi reperfüzyonun uzak organ etkileri en sık akciğer ve kardiyovasküler sistemde görülmekle beraber iskemi reperfüzyon *SIRS* ile de sonuçlanabilir (8). İskemi reperfüzyona karşı gelişen bu uzak organ cevabı mikrovasküler hasara yol açarak *MOF* gelişmesine neden olabilir (8).

### **2.1 İskemi**

İskemi, organ veya doku kan akımındaki yetersizliğe bağlı olarak gelişen geri dönüşümlü veya dönüşümsüz hücre ve doku hasarındır (20). Bu olay, organı perfüze eden kan akımındaki azalmaya bağlı olarak gelişen hücre zedelenmesine yol açar. İskemik hasarın derecesi hipoksinin derinliğine ve şiddetine bağlıdır. İskemi, kardiyak enfarktüste ve inmede olduğu gibi akut veya kladikasyoda olduğu gibi kronik olabilir (21,22).

Geri dönüşümsüz hücre hasarını önleyebilmek için dokuya yeniden kan akımının sağlanması (reperfüzyon) gerekmektedir. Ancak reperfüzyonun gerçekleşmesi, iskemik dokularda paradoksal olarak iskeminin dokuda oluşturduğu hasardan daha fazla hasara yol açmaktadır. Bir dokuda İR sonucu oluşan hasar, dokunun aynı toplam sürede sadece iskemiye maruz kalması sonucu oluşan hasardan daha fazladır (23).

İskemi reperfüzyon lokal-uzak etki ve komplikasyonlara neden olabilen bazı mekanizmaları tetikler (4). İskemik periyod süresince dokuda toksik SOR üretilir. Reperfüzyon sırasında SOR ve süperoksit radikalleri endotelial hasar, artmış mikrovasküler permeabilite ve doku ödemeine neden olmaktadır (5). Ayrıca aktive olan adezyon molekülleri ve sitokinler *SIRS* gelişimini başlatabilir. Bu yanıtlar İR hasarı olarak tanımlanır (4).

Böbrek iskemisi reperfüzyonuna bağlı olarak uzak organ hasarı görülebilir. İskemi reperfüzyonun uzak organ etkileri sıklıkla akciğer ve kardiyovasküler sistemde görülmektedir. Uzak organ İR hasarı mekanizması Şekil 1’ de gösterilmiştir (7).



### Şekil 1: İskemi -reperfüzyon hasarı sonrası uzak organ hasarı oluşumu

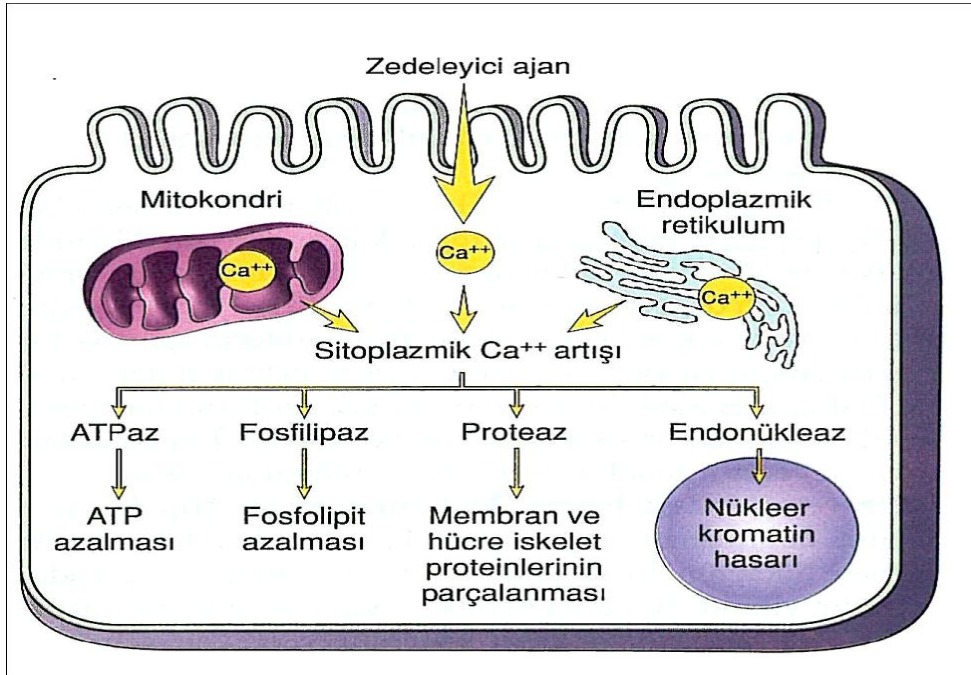
PAF: Trombosit Aktive Edici Faktör, LTB4 : Lökotriyen B4 , O<sub>2</sub> - , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Oksijen radikalleri

Uzamış iskemide hücrede metabolik ve yapısal değişikliklere neden olur ve iskemik dokuların reperfüzyonu ile iskeminin şiddetine ve süresine bağlı olarak, bir kısım hücre nekroz veya apoptozis ile ölüme gider (23).

İskemi sırasında hücre membranında bulunan Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pompasının çalışması için gerekli olan enerji sağlanamaz. K<sup>+</sup> iyonları hücre dışına çıkarırken Na<sup>+</sup> ve Cl<sup>-</sup> iyonları da hücre içine girerler. Bu iyonların hücre içine geçişi ile hücrelerde şişme meydana gelir. Anaerobik glikolizle enerji ATP üretilmeye çalışılırken, laktik asit ve karbondioksit birikir. Karbondioksitin birikimi

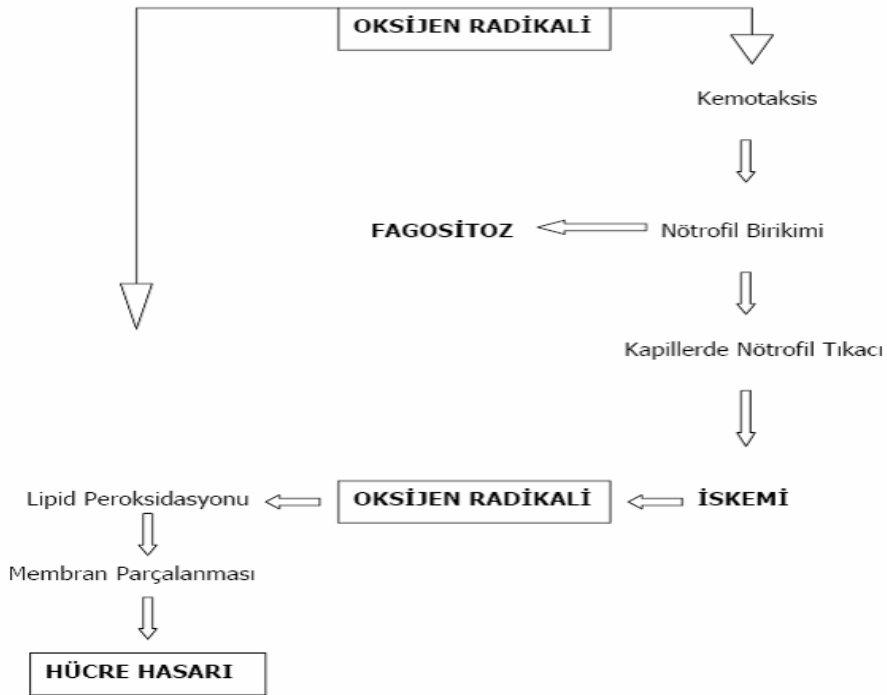
karbonik asit ( $H_2CO_3$ ) üretimi ile sonuçlanır, böylece asidoz artar. İki dakikalık iskemi sonrasında özellikle beyin hücrelerinde ekstrasellüler pH 7.3'ten 6.7'ye kadar düşebilmektedir (24). Adenin trifosfat bağımlı çalışan diğer bir pompa ise ekstrasellüler ve intrasellüler  $Ca^{+2}$  u dengelemektedir. Hücre içerisindeki  $Ca^{+2}$  miktarındaki artış İR hasarında ilk olarak göze çarpan olaylardan biridir ve iskeminin süresi ile yakından ilişkilidir (25).

Hücre içi  $Ca^{+2}$ 'un artması potansiyel zararlı etkilere sahip çok sayıda enzimin aktif hale gelmesine neden olur. İntrasellüler  $Ca^{+2}$  artışı ile fosfolipazlar ve proteolitik enzimler aktive olur. Fosfolipaz  $A_2$  aktivasyonu ile membran fosfolipidleri bozulmaya başlar; plazma ve mitokondriyal membran biyoenerjetikleri ve geçirgenlikleri de değişir (26). Araşidonik asit fosfolipazların aktivasyonu sonucu oluşur. Araşidonik asit, direkt etkiyle mitokondriyal enzimleri inhibe ederek serbest radikal oluşumunu artırır (24).



Şekil 2. Hücre zedelenmesinde sitoplazmik kalsiyum artışının sebepleri ve sonuçları (27)

İskemik periyod süresince dokuda üretilen toksik serbest oksijen radikalleri (SOR) lokal-uzak etki ve komplikasyonlara neden olabilen bazı mekanizmaları tetikler. Serbest oksijen radikallerinin ilk oluşunu ve öncüsü genellikle stabil olmayan ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ile oksijene dönüşen süperoksit ( $O_2^-$ ) radikalidir (23). Fagositoz görevi yapan makrofaj, nötrofil ve monositler tarafından enzimatik olarak üretilirler. Hidrojen peroksit hücre membranlarından kolaylıkla geçebilen, endotelial hücreleri hasarlayabilen güçlü bir sitokindir. Hidroksil radikali, bilinen serbest radikaller içinde en güçlü olan ve doku hasarında sorumlu ana radikaldir (28). Bu radikalın en önemli özelliği, hidrojen atomlarını hücre membranındaki poliansatüre yağ asitlerinden ayırmasıdır. Lipid peroksidasyonunu ile hücre membranında çözülme ve buna bağlı hücre ölümü olur (29). Hidroperoksil radikali ise  $O_2^-$  radikalinin protonlanmasıyla oluşan ve süperoksitten daha güçlü olan bir ajandır. Biyolojik membranlardan kolay geçebilme ve yağ asitleriyle direkt olarak reaksiyona girebilme özelliği vardır (30)(Şekil 3).



**Şekil 3: Serbest oksijen radikalinin dokudaki doğrudan ve dolaylı etkileri**

Uzamış hipoksi nedeniyle membran potansiyeli, iyon geçişi ve endotelial hücrelerin iskelet yapısı bozulmakta; ayrıca intrasellüler volüm artmaktadır. Bu değişiklikler sonucunda enerji depoları ile prostasiklin ve NO gibi bazı biyoaktif maddelerin yapımı azalır, endotelin ve tromboksan  $A_2$  gibi maddelerin yapımı artar (7).

Hücre içerisinde oluşan bu sitotoksik olaylar sonucunda ribozomlar granüllü endoplazmik retikulumdan ayrılır. Polizomlar monozomlara parçalanır ve protein sentezi azalır. Bu aşamadan sonra iskemi hala devam ederse geri dönüşümsüz zedelenme ortaya çıkar. Hasara, mitokondrilerde şiddetli vakuolizasyon ve matrikste kalsiyumdan zengin, şekilsiz yoğunluk birikimi eşlik eder (27).

## 2.2 Reperfüzyon

İskemik dokudaki kan dolaşımının ilaçlarla veya mekanik müdahalelerle yeniden sağlanmasına reperfüzyon denir. Klinik olarak İR hasarı sıklıkla transplantasyon, iskemik serebrovasküler olay, miyokard enfarktüsü, şok/resüsitasyon ve turnike uygulamaları sonrasında görülmektedir (31). İskemi sonrası kan akımının tekrar başlaması paradoksal olarak iskeminin oluşturduğu hasarı artırır ve iskemik dokularda iskeminin oluşturduğu hasardan daha fazla hasara yol açabilir (32). İskemi ve reperfüzyon periyotlarından oluşan bu zararlı etkilerin tümü İR hasarı olarak adlandırılır (2).

İskemi-reperfüzyon hasarının fizyopatolojisi ile ilgili çeşitli faktörler ileri sürülmüştür. Bunlar birbiriyle ilişkileri karmaşık, hücresele ve humoral olaylar serisidir.

Özellikle;

- 1) Serbest oksijen radikalleri,
- 2) Polimorf nüveli lökositler (PMNL),
- 3) Kompleman sistemi,
- 4) Endotel hücreleri olmak üzere başlıca dört faktör hasarın nedenleri arasında yer almaktadır (33).

Reperfüzyon hasarının oluşmasında iki mekanizma etkilidir. Bu mekanizmalardan biri hidrolitik bir enzim olan fosfolipaz  $A_2$ ' nin iskemik dönemde kalsiyum etkisiyle aktive olarak membranlardaki yağ asitlerini parçalaması ve diğer mekanizma ise SOR açığa çıkmasıdır (34). İskemik periyod süresince dokuda üretilen toksik SOR ve  $O_2^-$  radikalleri reperfüzyon sırasında



endotelial hasar, artmış mikrovasküler permeabilite ve doku ödemeine sebep olmaktadırlar (4,5). Ayrıca aktive olan adezyon molekülleri ve sitokinler sistemik enflamatuvar yanıtı başlatabilir.

Dolaşım tekrar başladığında fazla miktardaki nikotin amid dinükleotid (NADH) oksijen ile reaksiyona girerek süperoksit oluşturur. Nötrofillerin membranlarında bulunan nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH)'ya bağlı oksidaz enzim sistemleri serbest oksijen radikali oluşumunun en önemli kaynağıdır.

Araşidonik asitten oluşan lökotrienler trombosit ve lökositlerin, süperoksit ise lökositlerin damar duvarına adezyonunu artırır (6,7). Enflamatuvar olaylarda salınan tümör nekrosis faktör alfa (TNF- $\alpha$ ), İR hasarında önemli yeri olan mikrovasküler disfonksiyona neden olur. Permeabilitedeki artış proteinlerin interstisyuma ekstravaze olmasına neden olmakta, bu da ödemle sonuçlanmaktadır (35). Şekil bozukluğu olan, adezyona ve migrasyona uğrayan lökosit sayısında, İR sonrası çok büyük artışlar olduğu gösterilmiştir (5,7,31). Ayrıca fonksiyonel kapiller damar sayısında azalma olduğu saptanmıştır (24).

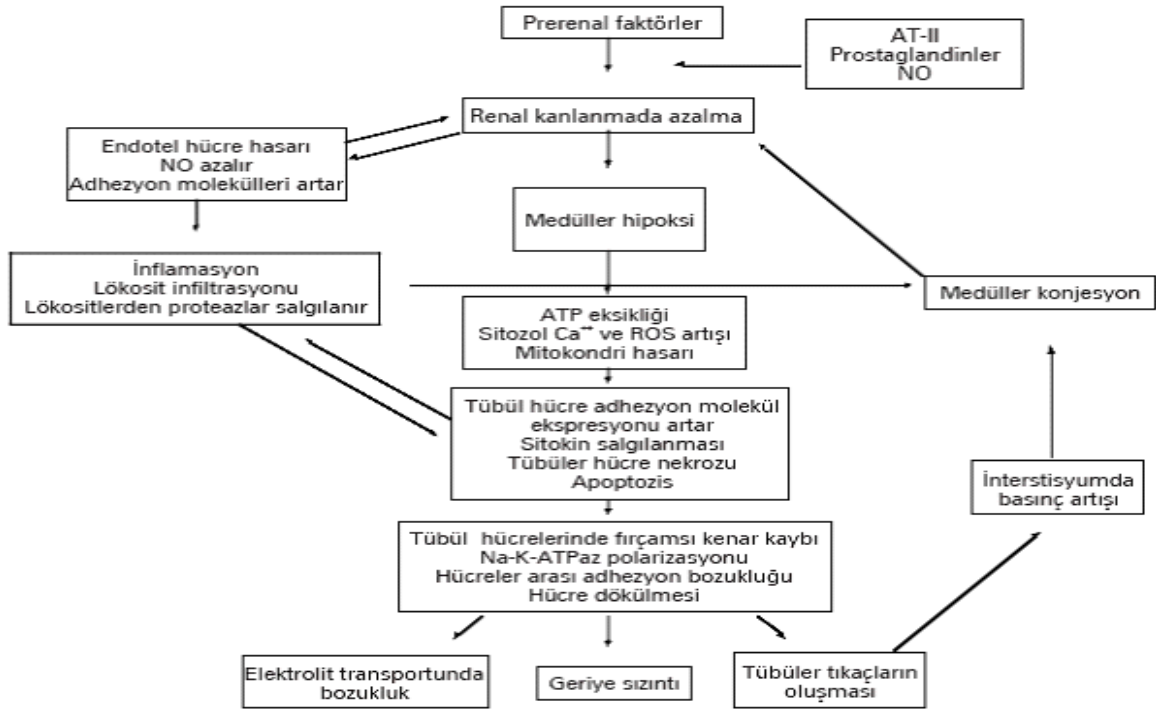
Artan SOR'nin başlattığı lipid peroksidasyonu ve protein hasarı sonucu hücre fonksiyonları bozulur ve doku nekrozu ortaya çıkar (36). Serbest oksijen radikalleri hem dokuya doğrudan zarar vermekte hem de PMNL' rin hasarlı dokuda birikmesine yol açmaktadır. Dokuya gelen aktive PMNL'ler, myeloperoksidaz (MPO), elastaz, proteaz, kollajenaz, laktoferrin ve katyonik proteinler gibi enzimleri açığa çıkarırlar. Bu enzimler dokudaki hasarı artırırken daha fazla SOR oluşmasına neden olurlar (37).

### **2.3.Böbrek İskemi Reperfüzyon Hasarı**

İskemi reperfüzyon hasarı renal transplantasyon ve septik şokla ilişkili akut renal yetersizlik gelişiminde en önemli patolojik mekanizmalardan biridir (34). İskemi reperfüzyon hasarına sekonder akut renal yetersizlik kötü prognoz ve yüksek mortalite oranı ile ilişkilidir (38). Hayvan ve insan modellerinde uzamış iskeminin renal kan akımında ve GFH'de azalmayla sonuçlandığı gösterilmiştir (39). İskemik akut renal yetersizlik, yetersiz kan akımıyla başlar. Yetersiz kan akımı da azalmış kardiyak debi yanında renal arter stenozu ya da tıkanıklığı veya intrarenal küçük damarların ateroskleroz, ateroemboli, vaskülit gibi nedenlerle hasarlanması sonucu gelişir (34).

Böbreklerdeki İR hasarının mekanizması multifaktöriyel ve birbirine bağlı hipoksi, serbest radikal hasarı ve enflamatuvar cevaplarla ilişkilidir (40,41) (Şekil 4).

İskemik böbrekte vazodilatör maddelerin etkisine karşı bir direnç, vazokonstriktör maddelerin etkisine karşı da aşırı duyarlılık vardır. Oksijenlenmenin bozulması ile artan intrasellüler  $Ca^{+2}$  birikimi afferent arteriyollerdeki direnç artışına neden olur (42).



**Şekil 4: İskemik ve akut tübüler nekroz (ATN) patogenezinde rol oynayan faktörlerin şematik görünümü**

NO: Nitrik oksit , AT-II: Anjiyotensin, ROS: Serbest Oksijen Radikalleri

Aktive nötrofiller İR'nin indüklediği endotelial hücre hasarlanmasıyla oluşan renal hasar patogenezinde rol oynar ve böylece renal kan akımı azalır. Kelly ve ark. (43) nötrofil adezyon inhibisyonunun iskemik renal hasarı önlediğini göstermişlerdir. Aktive nötrofiller endotelial hasar yapabilen çeşitli enflamatuvar mediyatörleri salgırlarlar . Nötrofil elastaz ve serbest oksijen radikallerini içeren bu mediyatörler vasküler permeabilityi artırır, böylece doku kan akımında azalmaya yol açarlar (44,45).

TNF- $\alpha$  üretimi İR'nun indüklediği renal hasarı artırır (46). TNF- $\alpha$ , nötrofilleri aktive eder. Renal kan akımında azalma yüksek enerjili fosfatların azalması ve hücre membranından iyon geçişinin bozulması sonucu hücre hasarıyla sonuçlanır. Hasarın ciddiyeti iskeminin süresine ve kollateral dolaşımın yeterliliğine bağlıdır. Böbreğe kan akımının yeniden sağlanmasıyla akım korteksten medullaya doğru yön değiştirir, böylece kortikal perfüzyon ve glomerular filtrasyonun bozulması pahasına metabolik olarak hassas olan medullanın oksijenasyonu korunur (47).

Normal fizyolojik şartlarda oksijen parsiyel basıncı korteksten medullaya doğru inildikçe azalmaktadır. Böbreğin İR hasarı öncelikle böbreğin hipoksiye duyarlı olduğu medullasından başlar. Böbreğe gelen kan akımının büyük kısmı renal korteksten geçer ve renal medullanın kanlanması sağlayan vaza rektaya çok az kan gider; bu da renal medüllayı hipoksiye daha duyarlı hale getirir (48,49). İskemik hasar tübüler disfonksiyona ve sodyum geri emiliminde azalmaya neden olur; böylece distal kısımlara giden sodyum miktarı artar, glomerüler vazokonstriksiyon ve glomerüler filtrasyonda azalmaya sebep olan tübüloglomerüler *feedback* denen refleksin aktifleşmesi sağlanır. Medüller hipoksi ayrıca hücresel enerji depolarının azalmasına, endotel ve düz kas hücrelerindeki aktin hücre iskeletinin bozulmasına neden olur. Bu da hücresel şişme ve çevre dokularda hipoksinin artmasına yol açar (48). Hücrelerde aktin hücre iskeleti yapısında da bozulma izlenir. Bu bozulma kan akımındaki değişikliklerde de rol oynamaktadır. Hipoksi sırasında intrasellüler  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu artışına bağlı kalpain ( $Ca^{+2}$  bağımlı nötral sistein proteaz) aktivitesi artış gösterir. İskemik renal hasar sırasında da spektrin ve ankirin gibi aktin bağlayıcı proteinlerin bazolateral membrandan sitoplazmaya yöneldiği ve sonra da bu proteinlerin yıkımının arttığı görülmüştür. Tübüler hücrelerde izlenen bu değişiklikler proksimal tübül hücrelerinin fırçamsı kenarlarının ve hücrelerin bazal membrandan koparak tübül lümenine dökülmesine ve tübül lümeninde tıkanmaya sebep olur (42,48). Tübüler hasar gelişimindeki bir diğer mekanizma da oksidatif strestir. Proksimal tübül hücrelerinin metabolik

açından yoğun olmaları, akut tübüler nekroz (ATN) sırasında mitokondriyal hasar ve intrasitoplazmik  $Ca^{+2}$  artışı nedeniyle, oksidatif moleküller fazla miktarlarda oluşur (49).

Preglomerüler vazokonstriksiyon GFH' nin azalmasındaki en önemli nedendir. Nörohormonal cevabın uyarılması ile renin anjiyotensin (AT-II) aldosteron sistemi aktive olur. Sempatik sinir sistemi de nörohumoral uyarı ile aktive olur ve vazopressin salgılanması artar. Afferent ve efferent arteriyollerde vasküler rezistans artar. Glomerüler plazma akımı %30-50 oranında azalır. Katekolaminlerin, AT-II 'nin ve endotelinin seviyeleri artar. Bunun sonucunda vazokonstriksiyon gelişir. Vazokonstriksiyonun erken döneminde kompanzatuvar mekanizmalar da oluşur. Başlangıçta, lokal miyenterik refleks, AT-II ve prostaglandin sentezi ile renal kan akımı kompanse edilir.

Hipoksinin devam etmesi ve enflamatuvar cevap, akut böbrek yetersizliğinin (ABY) uzama fazında rol oynar. Akut tübüler nekrozun başlangıcındaki iskemik olay düzelse bile kan akımı bozuklukları ATN geliştikten sonra da devam etmektedir. Reperfüzyon sonrasında böbrek kan akımında % 50 'ye varan azalma görülür (50). Renal kan akımındaki bu kalıcı azalma *no-reflow* fenomeni olarak tanımlanmıştır (51). Bu fenomeni açıklamak için birkaç faktör öne sürülmüştür. Vazodilatör ve vazokonstriktör mediyatörler arasında dengesizlik, artmış endotelial geçirgenlik, artmış lökosit adezyonu, ekstrasvasküler lökosit birikimi bu faktörlerden bazılarıdır. Hayvan modellerinde endotel geçirgenliğinin iskemik ABY sonrasında arttığı bilinmektedir. Gelişen interstisyel ödem kan akımını, medulladaki damarlara bası uygulayarak daha da bozabilmektedir. Bu durum lökositlerin endotel hücreleri ile karşılaşması olasılığını artırmaktadır. Eritrositler ve lökositlerin medullada biriktikleri deney hayvanlarında gösterilmiştir (52,53).

#### **2.4.Farmakolojik Koşullama**

İskemi reperfüzyon hasarının etkilerini azaltmak için kullanılan yöntemler arasında farmakolojik koşullama en sık tercih edilenlerden biridir (11).

Farmakolojik koşullama koruyucu (ön koşullama) ve/veya tedavi edici (ard koşullama) olarak uygulanabilir (12). Bu amaçla böbrek İR hasarında farklı ilaçların kullanıldığı birçok çalışma yapılmıştır. Magnezyum, N-asetil sistein, aktive protein C, alfa melanosit stimüle edici

hormon, statin ve deksmedetomidin gibi ajanların İR hasarını azalttığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (9,14,15).

#### **2.4.1.Magnezyum**

Magnezyum vücutta en çok bulunan 4. katyondur. Baskın olarak hücre içi katyondur. Magnezyum kan mononükleer hücreleri dahil çeşitli hücrelerde enzimatik reaksiyonlar, hücre kanalları, reseptörler ve hücre içi sinyal molekülleri üzerinde etkilidir. İyon kanal düzenleyicisidir, hücrel iyon dengesinin korunmasına katkıda bulunur. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu azaltarak düz kaslarda gevşeme sağlar ve vazodilatatör etki gösterir. Aynı zamanda endokrin fonksiyonlar ve protein sentezi için gereklidir (9).

Magnezyum sülfat potent antiinflamatuvar ve antioksidan etkiye sahiptir. Endotoksin bağımlı inflamatuvar molekül upregülasyonunu inhibe eder (54).

Magnezyum L tipi kalsiyum kanal blokeridir. L tipi kalsiyum kanal uyarımı ile hücre içi kalsiyum artar, hücre içi kalsiyum artışı inflamatuvar yanıtı artırır. Bunun sonucunda mitokondriyal fonksiyon hasarı, nekroz yada apopitozis meydana gelir. L tipi kalsiyum kanal blokajı IR hasarından korumada etkili olabilir (54).

Magnezyum endoteliyal prostosiklin salınımı yoluyla vazodilatasyona neden olur. Ayrıca platelet aktivasyonunu azaltarak trombozu önler. Lipid peroksidasyonunu direkt inhibe ederek endoteliyal ve nöronal reperfüzyon hasarını azaltır (55).

Magnezyum sülfat kullanımı reperfüzyonda mikrosirkülasyonu yeniden düzenler, organa total kan akışını artırır, hücre ödemi azaltır. Kalsiyum taşıyıcı mekanizmasındaki etkisi ile kalsiyum yüklenmesini ve doku hasarını azaltır, aynı zamanda iskemide azalan ATP seviyelerini restore eder. Magnezyum iyi bilinen bir NMDA reseptör antagonistidir (55).

Ming-Chang ve ark (54); bilateral alt ekstremite IR hasarına bağlı akciğer zedelenmesinde Mg sülfatın koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, reperfüzyondan hemen sonra 100 mg/kg intravenöz (i.v.) Mg sülfat vermişler ve Mg sülfat ile bilateral alt ekstremite IR hasarına bağlı akut akciğer hasarının azaldığını göstermişlerdir.

Kaptanoğlu ve ark (56); intrauterin IR hasarında Mg sülfatın fetal deride koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmalarında ratlara IR hasarından 20 dakika önce 600 mg/kg Mg sülfat intraperitoneal (i.p.) olarak vermişler ve Mg sülfatın koruyucu etkisi olduğunu göstermişlerdir.

Hwang ve ark (57); spinal kord iskemik hasarında Mg sülfatın koruyucu etkilerini araştırmışlardır. Ratlar 3 gruba ayrılmış, 30 mg/kg, 100 mg/kg ve 300 mg/kg Mg sülfat cerrahiden 30 dk önce ve 10 dk süreyle infüzyon şeklinde verilmiştir. Magnezyum sülfatın bu dozlarda spinal kord iskemisinde koruyucu etkisi gösterilememiştir.

Xiao ve ark (58); tavşan renal iskemi reperfüzyon modelinde Magnezyum sülfatın koruyucu etkisini araştırmışlardır. Çalışmalarında renal iskemiden önce ve iskemi sırasında 1ml/kg/sa (25mg/kg) Mg sülfat vermişler ve sonuç olarak Mg sülfatın renal iskemide koruyucu etkinlik gösterdiğini belirtmişlerdir.

### **3.GEREC VE YÖNTEM**

Çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEÜTF) Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alındıktan sonra DEÜ Multidisipliner Deney Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmada ağırlıkları 250-300 g arasında değişen 28 adet Wistar albino cinsi erişkin erkek rat kullanıldı. Ratlar araştırma başlangıcına kadar oda sıcaklığında (21-22 °C ) % 40-60 nisbi nemde 12 saat aydınlık - 12 saat karanlık ortamda tutulup standart pellet yem ve suyla beslendi. Deney öncesi herhangi bir yem ve su kısıtlamasına gidilmedi.

#### **3.1.Anestezi Uygulaması**

Anestezi i.p. 50 mg/kg ketamin ( Ketalar flk., *Pfizer Pharma GMBH, Germany*) ve 10 mg/kg ksilazin hidroklorid (Alfazyne % 2, *Alfasan International, Holland*) ile sağlandı, gerektiğinde ratların anestezi derinliğini sabit tutmak için idame ketamin (yarı dozda, 25 mg/kg) refleks yanıtla (pensetle ayağa ağırlı uyarın verilmesi-pedal refleks, palpebral ve korneal refleksler) bakılarak tekrarlandı.

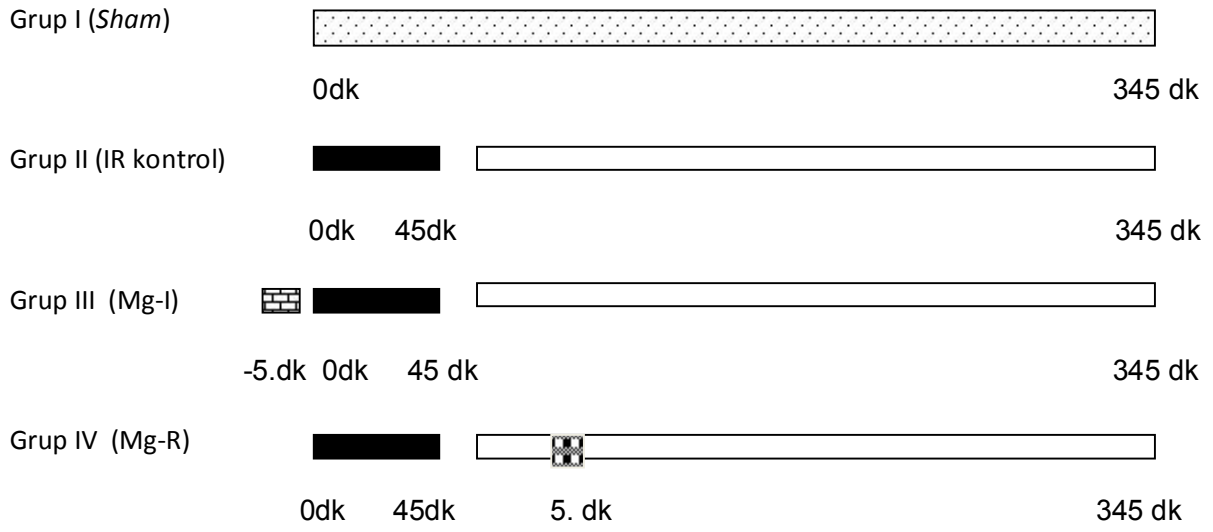
#### **3.2.Deney Grupları ve Protokol**

**Grup I (Sham, n=6):** Laparotomi sonrası sol renal pedikül diseke edilip başka bir girişim yapılmadan ratlar 345 dk. daha anestezi altında bekletildi. Böylelikle tüm gruplarda İR süresi kadar ( 345 dk.) anestezi süresi sağlanmış oldu.

**Grup II (İR- kontrol, n=7):** Laparotomi sonrasında sol böbreğe 45 dk. total iskemi sonrası 5 saat reperfüzyon uygulandı.

**Grup III (Mg-İ, n=7):** Laparotomi sonrasında renal iskemiden 5 dakika önce 200 mg/kg (yaklaşık 0.25-0.35 ml) Mg sülfat (Magnezyum sülfat ; 1500 mg/ 10 ml amp, Biofarma, Türkiye) i.p. verilip sol böbreğe İR (45 dk. İskemi + 5 saat reperfüzyon) uygulandı.

**Grup IV (Mg-R, n=7):** Laparotomi sonrasında sol böbreğe İR (45 dk. İskemi + 5 saat reperfüzyon) uygulanıp reperfüzyonun 5. dakikasında 200 mg/kg (yaklaşık 0.25-0.35 ml) Mg sülfat (Magnezyum sülfat ; 1500 mg/ 10 ml amp, Biofarma, Türkiye ) i.p. verildi.



**Şekil 5: Deney protokolünün şematik görünümü.**

☐; *Sham* için operasyon ve bekleme süresi, □ ; Reperfüzyon süresi 300 dk  
 ■ ; İskemi süresi 45 dk., ☐ ; iskemiden 5 dk önce intraperitoneal 200 mg/kg Mg sülfat bolus  
 ☐ reperfüzyonun 5. dakikasında intraperitoneal 200 mg/kg Mg sülfat bolus

### 3.3. Deneysel Çalışma Modeli

Tüm ratlar anestezi uygulamasından sonra supin pozisyonda operasyon masasına sabitlenerek abdomen orta hat insizyonu ile açıldı, sol böbrek açığa çıkarılıp renal pedikül diseke edildi. Ratları hipotermiden korumak için çalışma süresince operasyon masası ısıtıcı bir lamba ile ısıtıldı ve rektal prob ile ölçülen vücut sıcaklığı 37-37,5 °C arasında tutuldu. Dehidratasyonu önlemek amacıyla saat başı i.p. serum fizyolojik solüsyonu 3 ml/kg uygulandı. Bekleme süreleri boyunca batin ıslak steril tamponlar ve cerrahi pens ile kapatıldı.



### ***Böbrek İskemi Reperfüzyon Modeli***

Sol böbrek total iskemisi; atravmatik mikrovasküler klemp ile renal pedikül sıkıştırılarak oluşturuldu. Yeterli oklüzyon renal pedikülde pulsasyon olmaması ve böbrekte solukluk oluşması ile doğrulandı. İskemi süresi (45 dk.) tamamlandıktan sonra mikrovasküler klemp serbestleştirilip reperfüzyon sağlanıp kan akımının döndüğü fizik muayene (renal pediküllerde arter nabzının alınması ve solukluğun geçmesi) ile doğrulandı.

Tüm gruplarda total çalışma süresi sonunda histomorfolojik inceleme için sol böbrek çıkarıldı ve ratlar yüksek doz anestezi uygulaması ile sakrifiye edildi. Doku örnekleri % 10'luk tamponlu formaldehid içinde fikse edilip böbrek hasarı histomorfolojik olarak değerlendirildi.

### **3.4.Histomorfolojik değerlendirme**

Histomorfolojik inceleme için ratlardan elde edilen böbrek dokuları %10'luk tamponlu formaldehid solüsyonunda fikse edildikten sonra fiksatifin uzaklaştırılması amacıyla 1 gece akarsu altında yıkandı. Dehidratasyon için sırasıyla %70, %80 ve %96'lık etil alkol serilerinde 20'şer dakika (dk.); ardından 3 farklı aseton serisinde 20'şer dk tutuldu. Şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki farklı ksilene tabi tutulduktan sonra 1'er saatlik 2 kez parafin ile immersiyonu sağlandı. Daha sonra dokular parafin bloklar içerisine gömüldü. Rotary mikrotom (RM 2255, Leica,Köln, *Germany*) aracılığı ile 5 µm'lik (Feather S35 mikrotom bıçağı) parafin kesitler alındı (Tablo1).

**Tablo:1 Rutin Doku Takibi**

<b>İşlem</b>	<b>Madde</b>	<b>Süre</b>
Fiksasyon	%10'luk Formaldehit	3 gün
Fiksatiften Uzaklaştırma	Akarsu	1 Gece
Dehidratasyon	%70'lik Alkol	20 dk
Dehidratasyon	%80'lik Alkol	20 dk
Dehidratasyon	%96'lık Alkol	20 dk
Post Fiksasyon	Aseton 1	20 dk
Post Fiksasyon	Aseton 2	20 dk
Post Fiksasyon	Aseton 3	20 dk
Şeffaflandırma	Xylol 1	30 dk
Şeffaflandırma	Xylol 2	30 dk
Bloklama	Parafin 1	60 dk
Bloklama	Parafin 2	60 dk
Bloklama	Parafin	

### ***Hematoksilen-Eozin (H-E) Boyaması***

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 30 dk. 60°C'lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 20 dk. (etüvde) diğer ikisi 10'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için 2 değişim absolü alkol ve %96'dan %70'e azalan alkol serilerinden geçirildi, kesitler distle su ile çalkalandıktan sonra 10 dk. Hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dk akarsuda yıkanan kesitler, 2 dk. Eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri Absolü alkol serilerinden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dk üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı.

**Tablo 2. Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü**

<b>İşlem</b>	<b>Madde</b>	<b>Süre</b>
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	30 dk
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (Etüvde)	20 dk
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (Oda Isısında)	10 dk
Deparafinizasyon	Ksilen 3	10 dk
Rehidratasyon	Absolü Alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	Absolü Alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	% 96 Alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	% 80 Alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	% 70 Alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Hematoksilen	10 dk
Yıkama	Akarsu	10 dk
Boyama	Eosin	2 dk
Yıkama	% 70 Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	% 80 Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	% 96 Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolü Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolü Alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 dk
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 dk
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 dk
Kapama	Entellan	

### **Böbrek dokusunun histomorfolojisinin değerlendirilmesi**

Boyama işleminden sonra elde edilen kesitler ışık mikroskopik olarak incelendi (Olympus BX-50 Tokyo, Japonya) ve kesitlerden elde edilen görüntüler yüksek çözünürlüklü bir kamera (Olympus DP-70, Japonya) içeren bilgisayara aktararak dijital olarak fotoğrafları çekildi. Çekilen dijital fotoğraflar dijital görüntü analiz programı (UTSCSA; *Image tool version 3,0 for Windows.Texas, USA*) ile değerlendirildi. Deney gruplarına ait böbrek dokusu kesitlerinde ışık mikroskopik olarak; mononükleer hücre (MNH) enfiltrasyonu, eritrosit ekstrevasyonu, kapiller dilatasyon, renal korpusköl morfolojisi, proksimal tübüslarda vakuolizasyon, apoptoz, fırçamsı kenar kaybı, tübüler dilatasyon, kast formasyonu DEÜTF görevli bir histolog tarafından kör olarak değerlendirildi. Kesitlerden elde edilen görüntüler değerlendirilirken semikantitatif olarak tübülointerstisyel hasar için (tübüler fırçamsı kenar kaybı, tübüler dilatasyon, kast formasyonu, vakuolizasyon, mononükleer hücre infiltrasyonu, eritrosit ekstrevasyonu, renal korpusköl morfolojisi gibi parametreler için) skorlama yapıldı. Skorlama 0=hiç yok, 1= % 0-25, 2= % 26-50, 3= % 51-75, 4= % 76-100 olarak uygulandı.

### **3.5.Dışlama Kriterleri**

Resüsitasyon gereksinimi olan ratların çalışma dışı tutulması kararı alınmış olup *Sham* grubunda 1 deneğe resüsitasyon uygulandığından çalışma dışı bırakıldı.

### **3.6.İstatistiksel Değerlendirme**

İstatistiksel değerlendirme için *Statistical Package of Social Sciences 15 (SPSS 15.0,Chicago, IL, USA)* programı kullanıldı. Verilerin analizinde Kruskal-Wallis varyans analizi, grupların ikili karşılaştırmaları için Mann-Whitney U testi uygulandı. Tüm veriler ortalama  $\pm$  standart sapma (ort  $\pm$  ss) olarak gösterildi. İstatistiksel olarak  $p \leq 0.05$  değeri anlamlı kabul edildi.

#### **4. BULGULAR**

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda gerçekleştirilen çalışmaya toplam 28 rat dahil edildi. Resüsitasyon uygulanan bir rat çalışma dışı bırakıldığından 27 denek çalışmayı tamamladı.

**Tablo 3: Gruplara ait histomorfolojik hasar skorları**

	<b>KV</b>	<b>MNHE</b>	<b>TD</b>	<b>GD</b>	<b>HHTS</b>
<b>Grup I(Sham)</b> (n=6)	0,16±0.40	0,16±0.40	0,00±0,00	0,00±0,00	0,33±0,51
<b>Grup II(İR)</b> (n=7)	1,42±0,53	1,42±0,53	1,42±0,53	0,71±0.75	5,00±2,23
<b>Grup III(Mg - İ)</b> (n=7)	0,57±0,53	0,85±0,69	1,00±0,57	0,28±0,48	2,71±1,38
<b>Grup IV(Mg- R)</b> (n=7)	1,00±0,81	1,14±0,69	1,28±0,75	0,57±0,53	4,00±2,38
<b>p<sup>a</sup></b>	<b>*</b> 0,01	<b>*</b> 0,01	<b>*</b> 0,003	0,10	<b>*</b> 0,001

Veriler ort ± ss olarak belirtildi.

<sup>a</sup>Kruskal Wallis testi, \*p ≤ 0,05: Gruplar arası karşılaştırma.

KV: Kapiller Vazodilatasyon

MNHE: Mononükleer Hücre Enfiltrasyonu

TD: Tübüler Değişiklikler

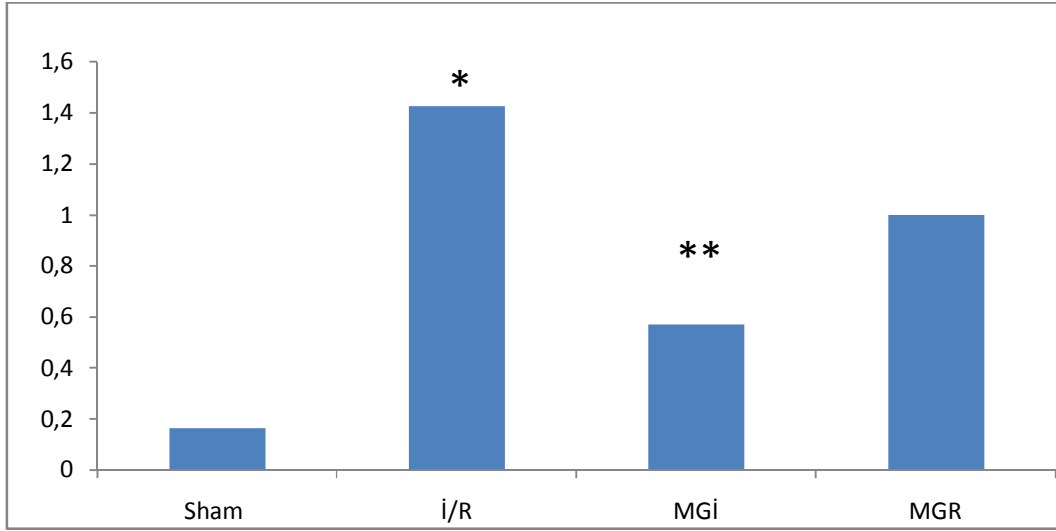
GD: Glomerüler Değişiklikler

HHTS: Histomorfolojik Hasar Toplam Skoru

## Böbrek Histomorfolojik Hasar Skorları

### 1) Kapiller vazodilatasyon

*Sham* ( $0,16 \pm 0,40$ ), İR ( $1,42 \pm 0,53$ ), Mg-İ ( $0,57 \pm 0,53$ ), Mg-R ( $1,00 \pm 0,81$ ) grupları incelendiğinde *Sham* grubunda vazodilatasyon skorları İR grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ( $p= 0.005$ ). *Sham* grubu ile Mg-İ ve Mg-R gruplarının vazodilatasyon skorları arasında anlamlı fark bulunmadı ( $p= 0,23$ ;  $p =0,07$ , sırasıyla ). İskemi Reperfüzyon grubu ile Mg-İ grubunun kapiller vazodilatasyon skorları karşılaştırıldığında Mg-İ grubunda hasar skoru anlamlı olarak daha düşük saptandı ( $p =0.03$ ). İskemi Reperfüzyon grubu ile Mg-R grubu karşılaştırıldığında kapiller vazodilatasyon skorlarında iki grup arasında anlamlı fark bulunmadı ( $p= 0,38$ ). Mg-İ ile Mg-R grupları arasında kapiller vazodilatasyon skorlarında anlamlı fark saptanmadı ( $p= 0,38$ ).

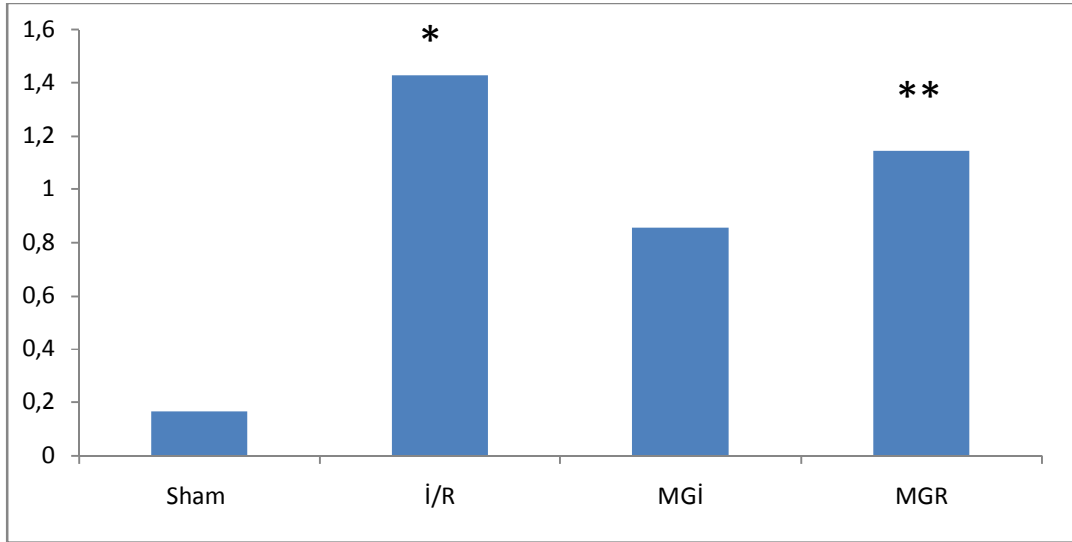


**Grafik 1: Böbrek histomorfolojik incelemesinde kapiller vazodilatasyon skorları**

- \* İR Grubu ile *Sham* Grubu karşılaştırıldığında ( $p= 0,005$ )
- \*\* Mg -İ Grubu ile İR Grubu karşılaştırıldığında ( $p= 0,03$ )

## 2) Mononükleer Hücre Enfiltrasyonu

*Sham* ( $0,16\pm0,40$ ), İR ( $1,42\pm0,53$ ), Mg-İ ( $0,85\pm0,69$ ), Mg-R ( $1,14\pm0,69$ ) grupları incelendiğinde *Sham* grubunda mononükleer hücre infiltrasyonu (MNHE) skorları İR grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ( $p= 0,005$ ). *Sham* grubu ile Mg-İ grubu karşılaştırıldığında MNHE skorları arasında anlamlı fark saptanmadı ( $p=0,10$ ). Mg-R grubunda infiltrasyon skorları *sham* grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu ( $p = 0,02$ ). İskemi Reperfüzyon grubu ile Mg-İ ve Mg-R grupları karşılaştırıldığında MNHE skorları arasında anlamlı fark saptanmadı ( $p= 0,16$  ;  $p= 0,53$ , sırasıyla). Mg-İ ile Mg-R grupları arasında MNHE skorlarında anlamlı fark bulunmadı ( $p= 0,53$ ).



**Grafik 2. Böbrek histomorfolojik incelemesinde mononükleer hücre infiltrasyonu skorları**

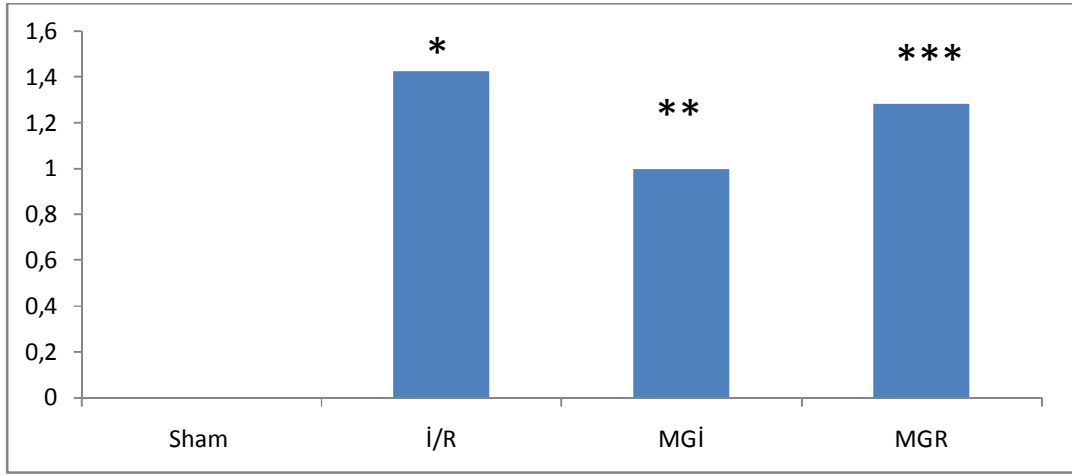
\* İR Grubu ile *Sham* Grubu karşılaştırıldığında ( $p= 0,005$ )

\*\* Mg-R Grubu ile *Sham* Grubu karşılaştırıldığında ( $p = 0,02$ )



### 3) Tübüler Değişiklikler

*Sham* (0,00±0,00), İR (1,42±0,53), Mg-İ (1,00±0,57), Mg-R (1,28±0,75) grupları incelendiğinde *Sham* grubunda tübüler değişiklik (TD) hasar skorları İR, Mg-İ ve Mg-R gruplarından anlamlı olarak düşük bulundu (p=0,001, p=0,008, p=0,008,sırasıyla). İskemi Reperfüzyon grubu ile Mg-İ ve Mg-R gruplarının TD skorları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı (p= 0,25; p= 0,80, sırasıyla ). Mg-İ ile Mg-R grupları arasında TD skorlarında anlamlı fark bulunmadı (p= 0,45).

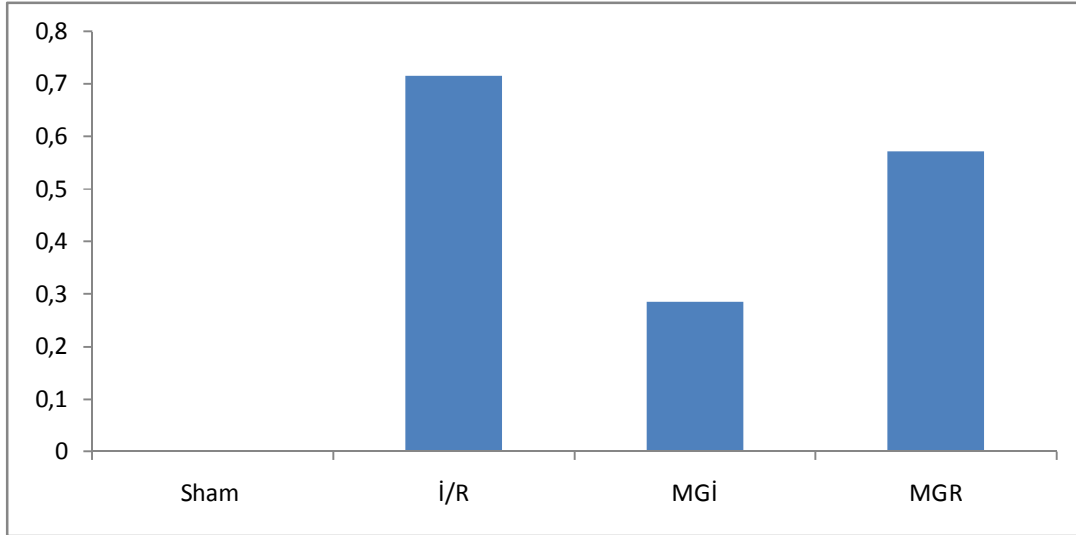


**Grafik 3: Böbrek histomorfolojik incelemesinde tübüler değişiklik skorları**

- \* İR Grubu ile *Sham* Grubu karşılaştırıldığında (p=0,001)
- \*\* Mg-İ Grubu ile *Sham* Grubu karşılaştırıldığında (p=0,008)
- \*\*\* Mg-R Grubu ile *Sham* Grubu karşılaştırıldığında (p=0,008)

#### 4) Glomerüler Değişiklikler

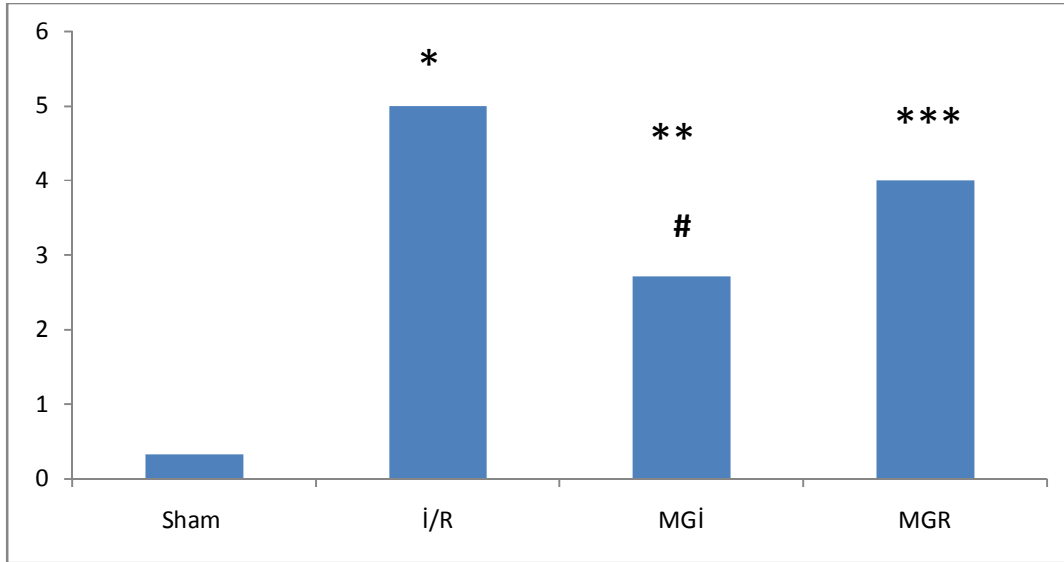
*Sham* ( $0,00 \pm 0,00$ ), İR ( $0,71 \pm 0,75$ ), Mg-İ ( $0,28 \pm 0,48$ ), Mg-R ( $0,57 \pm 0,53$ ) grupları incelendiğinde ( $p=0,03$ ,  $p=0,44$ ;  $p=0,10$ , sırasıyla). İskemi Reperfüzyon grubu ile Mg-İ grubu karşılaştırıldığında GD skorları arasında anlamlı fark bulunmadı ( $p=0,31$ ). İskemi Reperfüzyon grubu ile Mg-R grubu karşılaştırıldığında GD skorları arasında anlamlı fark saptanmadı ( $p=0,80$ ). Mg-İ ile Mg-R grupları arasında GD skorlarında anlamlı fark bulunmadı ( $p=0,38$ ).



**Grafik 4. Böbrek histomorfolojik incelemesinde glomeruler değişiklik skorları**

##### 5) Histomorfolojik Hasar Toplam Skoru

*Sham* ( $0,33\pm 0,51$ ), İR ( $5,00\pm 2,23$ ), Mg-İ ( $2,71\pm 1,38$ ), Mg-R ( $4,00\pm 2,38$ ) grupları incelendiğinde *Sham* grubunda histomorfolojik hasar toplam skoru (HHTS) İR, Mg-İ ve Mg-R gruplarından anlamlı olarak düşük bulundu ( $p=0,001$ ,  $p=0,002$ ,  $p=0,002$ , sırasıyla). İskemi Reperfüzyon grubu ile Mg-İ grubu karşılaştırıldığında Mg-İ grubunda HHTS anlamlı olarak düşük bulundu ( $p=0,05$ ). İskemi Reperfüzyon grubu ile Mg-R grupları karşılaştırıldığında HHTS skorları arasında anlamlı fark saptanmadı ( $p=0,38$ ). Mg-İ ile Mg-R grupları arasında HHTS değerleri arasında anlamlı fark bulunmadı ( $p=0,31$ ).



**Grafik 5: Böbrek histomorfolojik hasar toplam skorları**

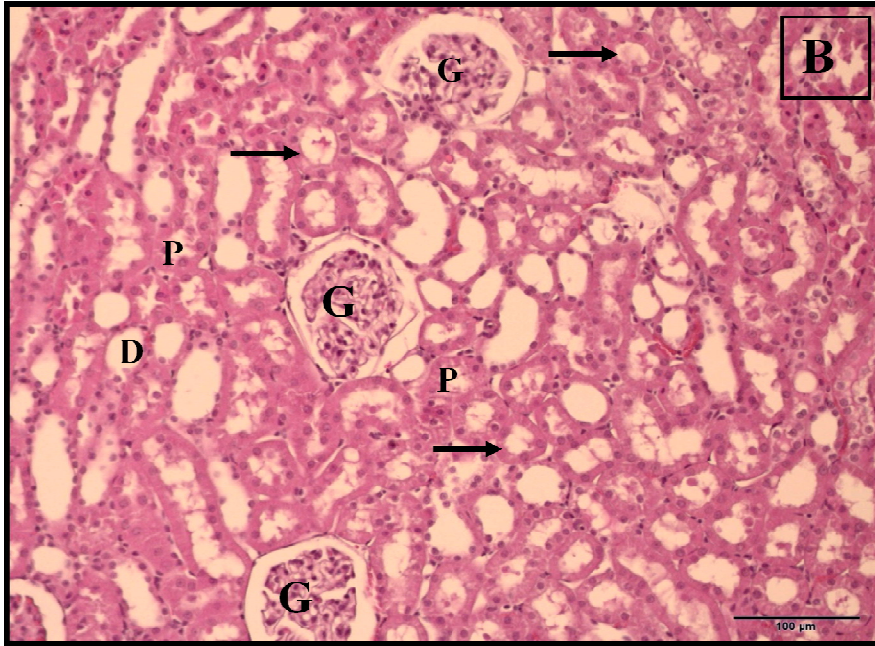
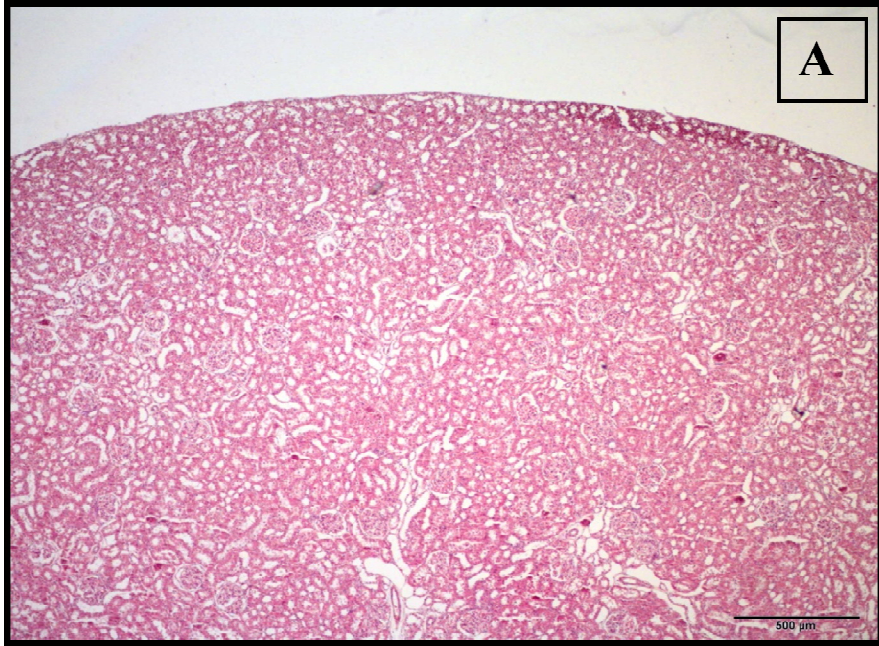
- \* İR Grubu ile *Sham* Grubu karşılaştırıldığında ( $p=0,001$ )
- \*\* Mg-İ Grubu ile *Sham* Grubu karşılaştırıldığında ( $p=0,002$ )
- \*\*\* Mg-R Grubu ile *Sham* Grubu karşılaştırıldığında ( $p=0,002$ )
- # Mg -İ Grubu ile İR Grubu karşılaştırıldığında ( $p=0,05$ )

Histomorfolojik özellikler incelendiğinde; *sham* grubunda korteksin dışında fibröz kapsülün sağlam olarak bulunduğu, kortekste renale korpusküllerin normal yapıda olduğu, Bowman kapsülünün pariyetal ve visseral yaprağının normal histolojik yapıda olduğu belirlendi. Epitel hücreleri karakteristik yapı ve özelliklerini korumaktaydı (Resim 1,2).

İskemi-reperfüzyon grubunda ise kortikal bölgede daha fazla olmak üzere peritübüler alanda mononükleer hücre infiltrasyonu, proksimal tübül hücrelerinde fırçamsı kenar kaybı, tübüler atrofi, tübüler dilatasyon gözlemlendi. Bazı tübüllerde proteinöz madde birikimi ile birlikte tübül lümeninde hücre debrisleri izlendi. Kortekste bazı bölgelerde, damarlarda vazodilatasyon ve eritrosit ekstravazasyonu dikkati çekti (Resim 3,4,5).

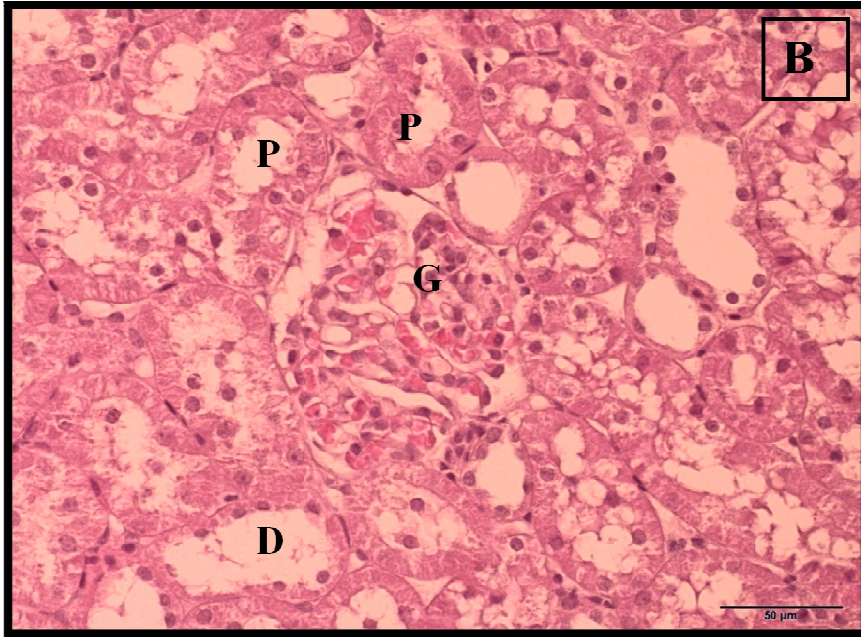
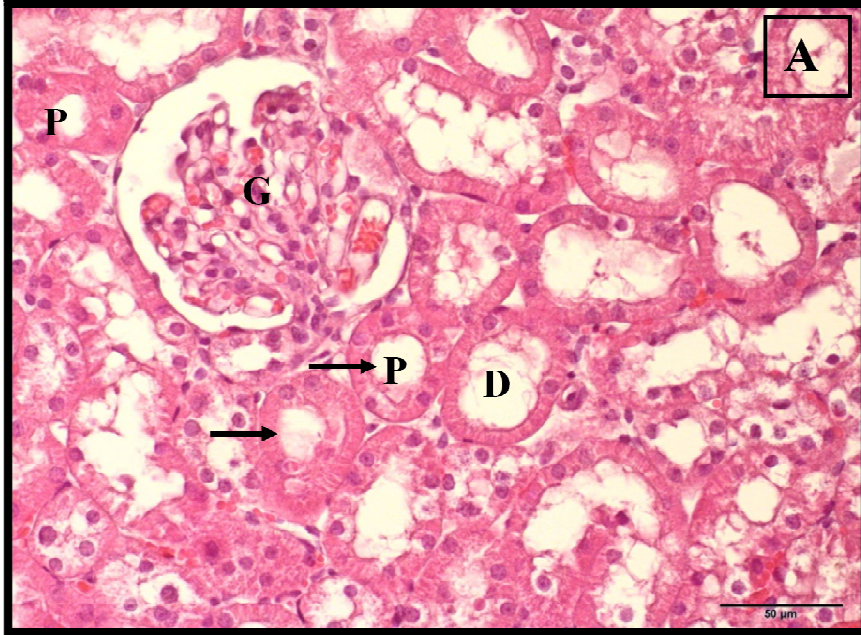
Mg-İ grubunda kortikal bölgede özellikle peritübüler alanda mononükleer hücre infiltrasyonunda, tübül hücrelerinde gözlenen dejenerasyonlarda ve kortekste eritrosit ekstravazasyonunda İR grubuna göre azalma gözlemlendi. İR grubunda incelenen mikroskopik alanlarda, tübülüslerde gözlenen fırçamsı kenar kaybı, tübüler atrofi, tübüler dilatasyon, vakuolizasyon, tübüllerde proteinöz madde birikimi ile birlikte tübül lümenine hücre debrisleri Mg-İ grubunda daha az oranda gözlemlendi (Resim 6).

Mg-R grubunda ise, İR grubuna göre özellikle peritübüler alanda mononükleer hücre infiltrasyonunda, glomerüller değişikliklerinde ve kortekste eritrosit ekstravazasyonunda azalma gözlemlendi. İR grubunda tübüler atrofi, tübüler dilatasyon ve vakuolizasyon ile tübüllerde proteinöz madde birikimi ile birlikte tübül lümenine hücre debrisleri ve fırçamsı kenar kaybının Mg-R grubunda Mg-İ grubuna göre daha az oranda korunduğu gözlemlendi (Resim 7).

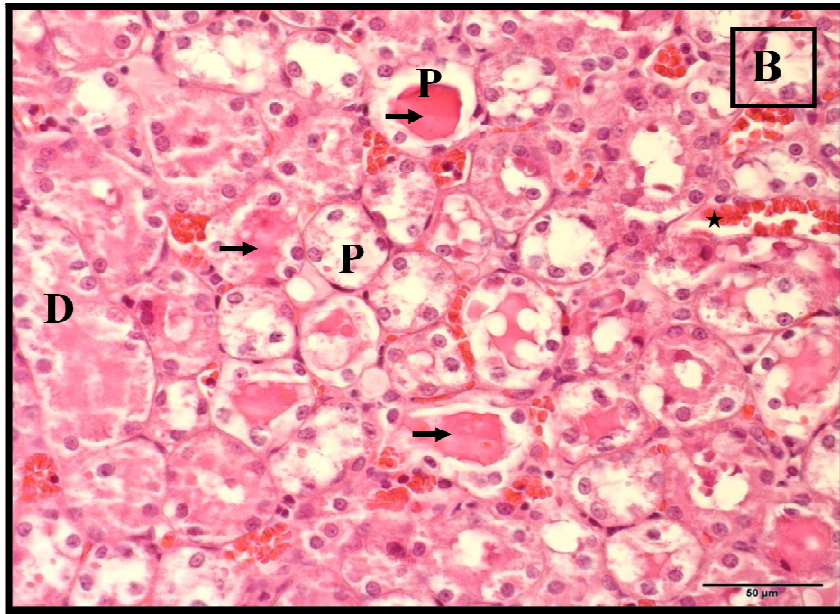
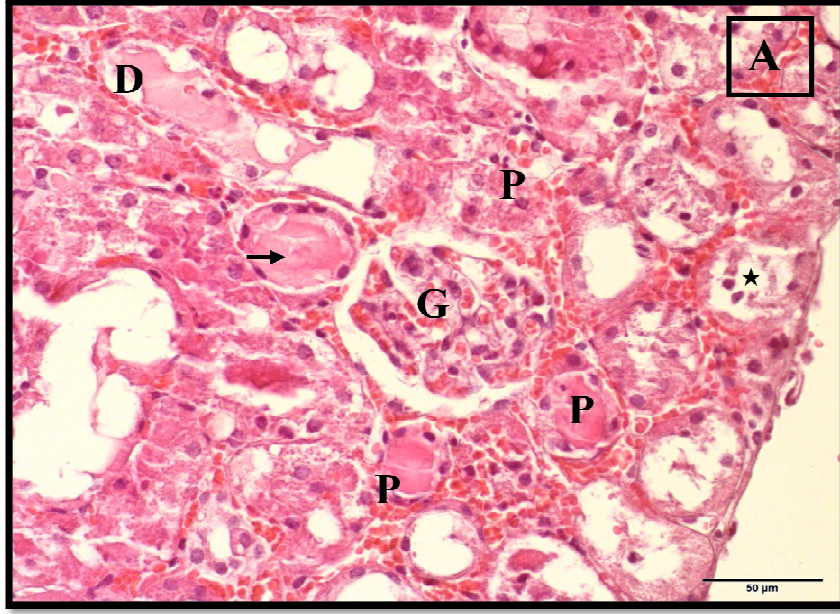


**Resim 1 A,B:** Sham grubuna ait Hematoksilin – Eozin (H-E) ile boyanmış kesitler. (X10)(X40)G:glomerül, P:proksimal tubul, D: distal tubul, (→): fırçamsı kenar



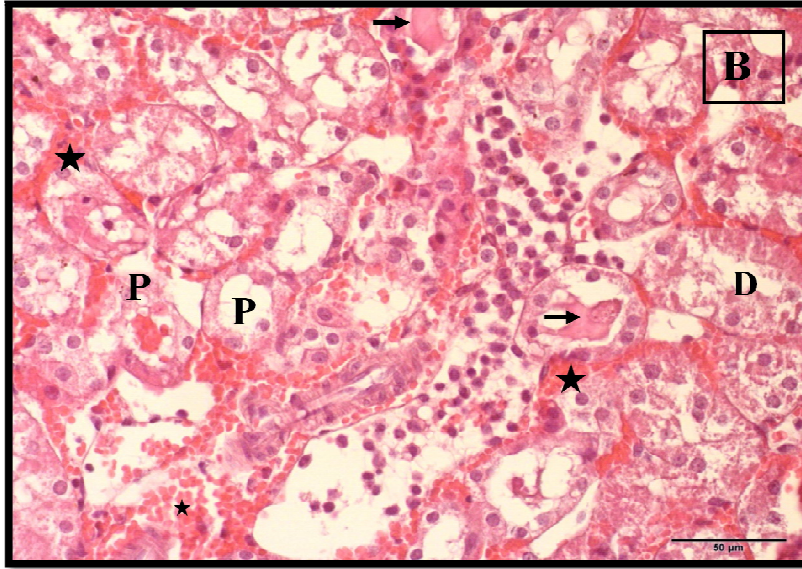
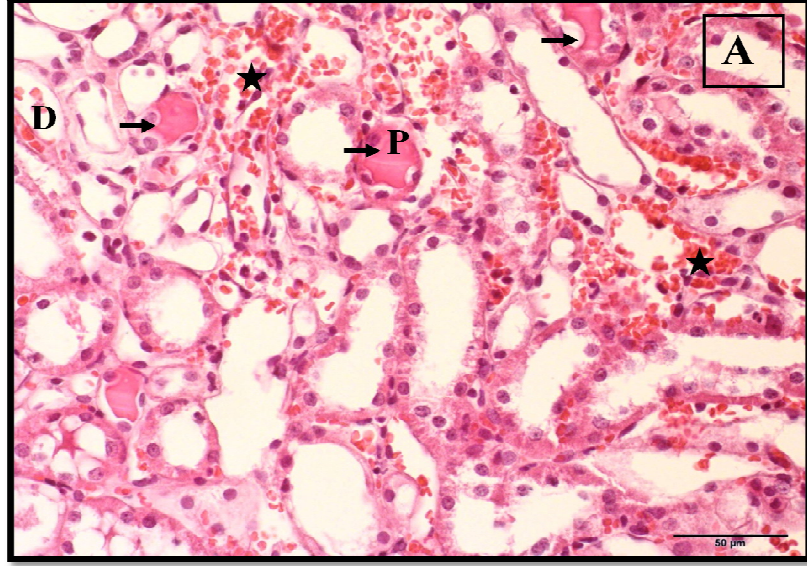


**Resim 2 A,B:** Sham grubuna ait Hematoksilen – Eozin (H-E) ile boyanmış kesitler. (X40).G:glomerül, P:proksimal tubul, D: distal tubul, ( → ): fırçası kenar



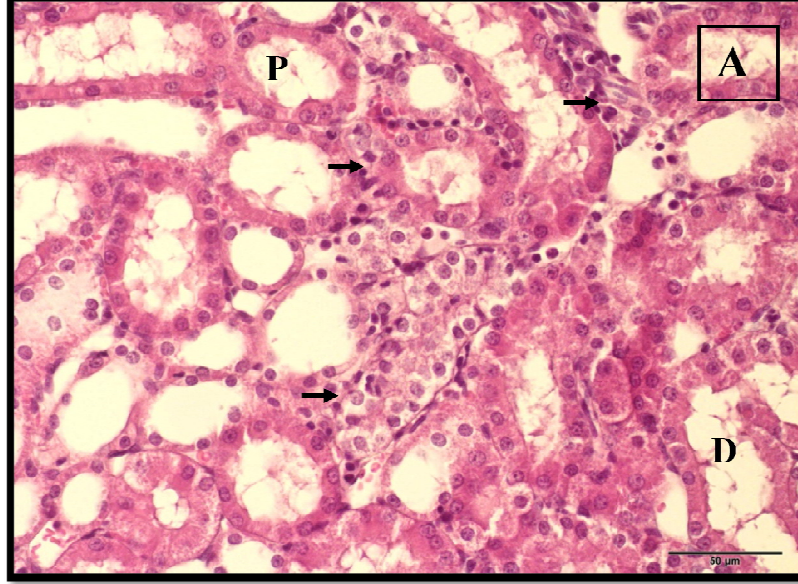
**Resim 3 A,B:** İR grubuna ait Hematoksilen – Eozin (H-E) ile boyanmış kesitler. (X40)..G:glomerül, P:proksimal tubul, D: distal tubul, ( → ): tübüllerde proteinöz madde birikimi, ( ★ ) lümene dökülmüş proksimal tübül epitel hücreleri



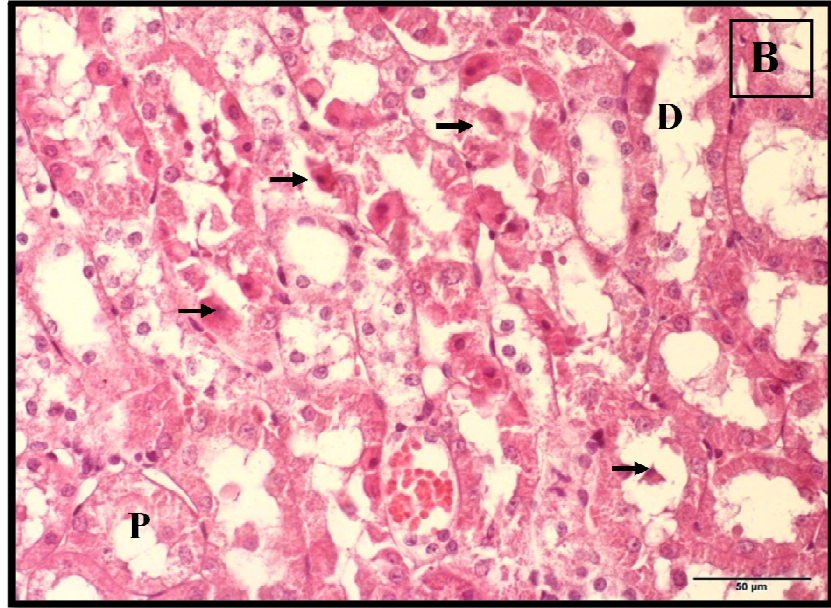


**Resim 4 A,B:** İR grubuna ait Hematoksilen – Eozin (H-E) ile boyanmış kesitler. (X40). **G:** glomerül, **P:** proksimal tubul, **D:** distal tubul, ( → ): tübüllerde proteinöz madde birikimi, ( ★ ) eritrosit ekstravazasyonu



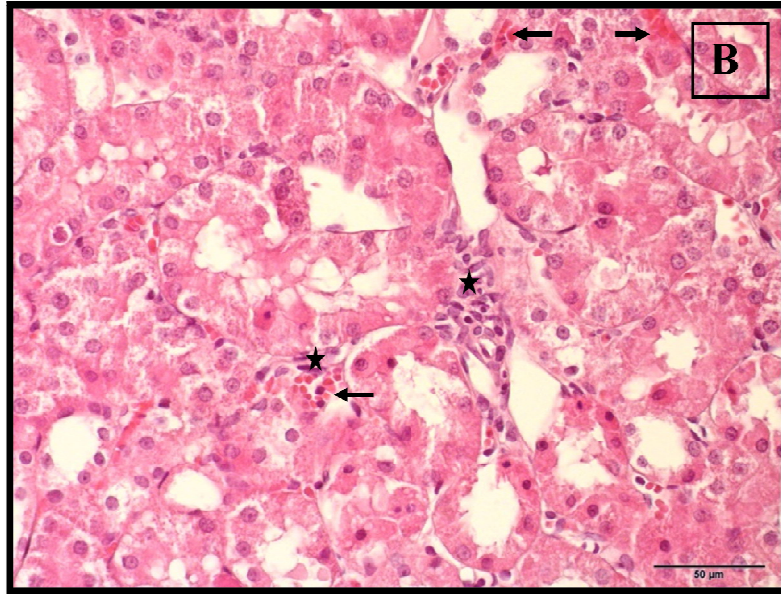
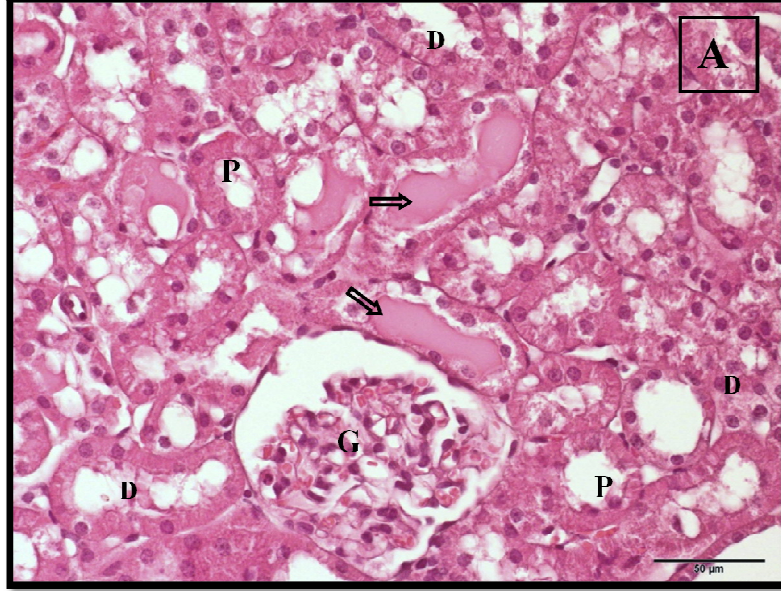


**Resim 5 A,B:** : İR grubuna ait Hematoksilen – Eozin (H-E) ile boyanmış kesitler. (X40).G:glomerül, P:proksimal tubul, D: distal tubul, (→) proksimal ve distal tübüllerde dilatasyon



**Resim 6 A,B:** Mg-İ grubuna ait Hematoksilen – Eozin (H-E) ile boyanmış kesitler. (X40). **G:** glomerül, **P:** proksimal tübül, **D:** distal tübül, ( → lümene dökülmüş proksimal tübül epitel hücreleri (\*) tübüllerde proteinöz madde birikimi





**Resim 7 A,B:** Mg-R grubuna ait Hematoksilen-Eozin (H-E) ile boyanmış kesitler.. (X40).G:glomertül, P:proksimal tubul, D: distal tubul, (→): eritrosit ekstravazasyonu, (★) mononükleer hücre infiltrasyonunun ve (⇨) tübüllerde proteinöz madde birikiminin diğer gruplara göre azalmış olduğu görünüm.

## **5.TARTIŞMA**

Böbrek İR hasarı iskemi ve onu takip eden reperfüzyon sırasında oluşan olaylara bağlı meydana gelen, böbreği fonksiyonel ve morfolojik olarak hasarlayan kompleks enflamatuvar bir durumdur. Renal iskemi hücresel disfonksiyon ve nekroz gibi olaylar serisini başlatmaktadır. İskemi reperfüzyon hasarı patogenezi için birçok mekanizma tarif edilmiş olmakla beraber, tedavisi hakkında bilgiler sınırlıdır (59-62).

Bu deneysel çalışmada; rat renal İR modelinde iskemi öncesi uygulanan Mg sülfatın renal İR hasarını histomorfolojik olarak anlamlı düzeyde azalttığı gösterildi.

Deneysel böbrek İR hasar modeli oluşturmak için farklı iskemi ve reperfüzyon süreleri kullanılmıştır. Williams ve ark. (63) renal arter ve veni 45 dk. klempleyerek iskemi oluşturdukları çalışmalarında, reperfüzyondan sonraki 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 9, 24. saatlerde ve 1 hafta sonra kan ve doku örneklerini almışlardır. Renal hasarın en erken 45 dk.lık iskemi takiben 4. saatte başladığını bildirmişlerdir Bozkurt ve ark.nın(64) çalışmalarında 45 dakika iskemi sonrası 60 dakika reperfüzyon uygulanmış ve 60 dakika sonunda ratlar sakrifiye edilmiştir. Williams ve ark. (63) ile Cochran ve ark.(65) reperfüzyon sonrası renal hasarın en erken 4. saatte görüldüğünü belirtmişlerdir. Bu veriler ile uyumlu olarak bu çalışmadaki deneysel modelde 45 dk.iskemi ve 300 dk. reperfüzyon süresi uygulandı.

Bu çalışmada sol böbrek total iskemisi; atravmatik mikrovasküler klemp ile renal pedikül sıkıştırılarak oluşturuldu. Histomorfolojik değerlendirme sonucunda *Sham* grubunda tüm değerlendirme ölçeklerinde İR grubuna göre anlamlı düşük skorlar saptanması İR modelinin doğru uygulandığını göstermektedir.

Farmakolojik koşullama koruyucu (ön koşullama) ve/veya tedavi edici (ard koşullama) olarak uygulanabilir (12). Magnezyum sülfat böbrek, cilt, beyin, akciğer İR hasarı tedavisinde daha önce kullanılmış bir moleküldür ( 9,13,14,15).

Magnezyum sülfatın farklı organ İR hasarı tedavilerinde farklı dozlarda kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Ming-Chang ve ark. (54) bilateral alt ekstremitte IR hasarına bağlı akciğer zedelenmesinde reperfüzyondan hemen sonra 100 mg/kg i.v. Mg sülfat vermişler ve IR hasarına bağlı akut akciğer hasarının azaldığını göstermişlerdir. Kaptanoğlu ve ark. (56) intrauterin İR hasarında Mg sülfatın fetal deride koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmalarında

ratlara İR hasarından 20 dakika önce 600 mg/kg Mg sülfat i.p. olarak vermişler ve Mg sülfatın koruyucu etkisini göstermişlerdir. Hwang ve ark. (57) spinal kord iskemik hasarında Mg sülfatın koruyucu etkilerini araştırmışlardır. Ratlar 3 gruba ayrılmış, 30 mg/kg, 100 mg/kg ve 300 mg/kg Mg sülfat cerrahiden 30 dk önce ve 10 dk süreyle infüzyon şeklinde verilmiştir. Magnezyum sülfatın bu dozlarda spinal kord iskemisinde koruyucu etkisi gösterilememiştir. Çalışmamızda Mg sülfat tedavisi iskemiden 5 dakika önce ve reperfüzyonun 5. dakikasında 200 mg/ kg i.p olarak uygulanmıştır.

Magali de Araujo ve ark. (9) böbrek İR hasarında magnezyumun etkilerini incelemişlerdir. Magnezyum ile tedavi edilen ratlarda daha yüksek GFH değerleri ve daha yüksek vazodilatasyon skorları bulmuşlardır. Magnezyumun vazodilatasyon artırıcı etkisi özellikle nitrik oksit salınımını arttırmasına ve eNOS salınımını düzenlemesine bağlanmaktadır. Bu çalışmada ise farklı olarak sham grubu ile Mg-İ ve Mg-R gruplarının vazodilatasyon skorları arasında anlamlı fark bulunamadı.

Magnezyumun kan mononükleer hücreleri dahil birçok hücrede enzimatik reaksiyonlar, hücre iyon kanalları, hücre reseptörleri, hücre içi sinyal üretimi üzerinde etkileri vardır (66). Ancak Magali de Araujo ve ark. (9) çalışmalarında magnezyum sülfat grubunda mononükleer hücre enfiltrasyonunda azalma görmemiştir. Bu çalışmada ise MNHE skorları *Sham* ve Mg-İ grupları arasında benzer olmakla beraber, Mg-R grubunda MNHE skorları *Sham* grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Bu da bize iskemi öncesi uygulanan Mg sülfatın MNH enfiltrasyonunu azalttığını göstermektedir Gözlem periyodlarının daha uzun tutulmasıyla tüm Mg sülfat gruplarında MNH enfiltrasyonunun azalacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmanın kısıtlılıkları; böbrek fonksiyon testleri, doku miyeloperoksidazı gibi biyokimyasal parametrelerin çalışılmadan sadece histomorfolojik değerlendirme yapılması ve daha uzun reperfüzyon süreleriyle (24 saat gibi) çalışılmamasıdır.

## **6. SONUC VE ÖNERİLER**

Sonuç olarak; bu deneysel çalışmada rat renal İR modelinde Mg sülfat ile iskemi öncesi yapılan farmakolojik ön koşullamanın böbrek İR hasarını histomorfolojik olarak anlamlı düzeyde azalttığı saptandı.

Major böbrek ve vasküler ameliyatlarda, İR hasarını önlemek için iskemi öncesi Mg sülfat uygulamasının basit, noninvaziv ve güvenli bir yöntem olabileceği düşünülmektedir. Ancak Mg sülfat uygulamasının etki mekanizmaları ve etkinlikleri açısından farklarının ortaya konacağı, insandaki doz ve sürelerinin belirleneceği daha ayrıntılı çalışmalara gereksinim vardır.

## KAYNAKLAR

1. Atilla K, Coker A, Sagol O, Coker I . Protective effects of carnitine in an experimental ischemia-reperfusion injury. *Clinical Nutrition* 2002; 4: 309-13.
2. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations and preventations of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* 2001;94:1133-38.
3. Shu-Qin Ying, Lu Fang, Mei-Xiang Xiang, Geng Xu. Protective effects of magnesium against ischaemia-reperfusion injury through inhibiton of p-selectin in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* (2007) 34, 1234–1239.
4. Olguner C, Koca U, Kar A, Karci A. Ischemic preconditioning attenuates the lipidperoxidation and remote lung injury in the rat model of unilateral lower limb ischemia reperfusion. *Acta Anaesthesiol Scand* 2006;50: 150-5.
5. Huang SS, Wei FC, Hung LM. Ischemic preconditioning attenuates postischemic leukocyte – endothelial cell interactions role of nitric oxide and protein kinase C. *Circ J* 2006;70: 1070-5.
6. Paller MS, Hoidal JR, Ferris TF.ox ygen free radicals in ischemic acute renal failure in rat. *J Clin Invest* 1984; 74: 1156-64.
7. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000; 190: 255-66.
8. Neary P, Redmond HP. Ischaemia-reperfusion injury and the systemic inflammatory response syndrome. In *Ischemia-Reperfusion Injury*, Grace PA, Mathie RT (eds). Blackwell Science, London 1999: 123-36.
9. Magali de Araujo, Lucia Andrade, Terezila M. Coimbra, Magnesium Supplementation Combined with N-Acetylcysteine Protects against Postischemic Acute Renal Failure. *J Am Soc Nephrol*, 2005; 16: 3339–3349.
10. Koçođlu H, Öztürk H, Öztürk H, Yılmaz F ve ark. Effect of Deksmetomidine on ischemia-reperfusion injury in rat kidney a histopathologic study. *Ren Fail* 2009; 31: 70-74.
11. Tapuria N, Kumar Y, Habib MM, Amara MA ve ark. Remote ischemic preconditioning: A novel protective method from ischemia reperfusion injury-a review. *J Surg Res* 2008; 150: 304-30.

12. Gu J, Pamela S, Hailin Z, Helena R ve ark. Dexmedetomidine provides renoprotection against ischemia-reperfusion injury in mice. *Critical Care* 2011; 15: R153.
13. Mizutani A , Okajima K, Uchiba M, Noguchi T ve ark. Activated protein C reduces ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats by inhibiting leukocyte activation. *Blood* 2000; 95: 3781-7.
14. Chiao H, Kohda Y, McLeroy P, Craig L ve ark. Alpha-melanocyte-stimulating hormone protects against renal injury after ischemia in mice and rats. *J Clin Invest* 1997; 99: 1165-72.
15. Curtis FG, Vianna PT, Viero RM. Dexmedetomidine and S(+)-ketamine in ischemia and reperfusion injury in the rat kidney. *Acta Cir Bras* 2011; 26: 202.
16. Legrand M, Egbert GM, Johannes T, Payen D. Renal Hypoxia and Dysoxia After Reperfusion of the Ischemic Kidney. *Mol Med* 2008 14 (7 - 8) 502 - 516.
17. Hoste EA, Kellum JA. Acute kidney injury: epidemiology and diagnostic criteria. *Curr. Opin. Crit. Care* 2006; 12:531–7.
18. Ellenberger C, *et al.* Incidence, risk factors and prognosis of changes in serum creatinine early after aortic abdominal surgery. *Intensive Care Med.* 2006. 32:1808–16.
19. Wong GT, Irwin MG. Contrast-induced nephropathy. *Br. J. Anaesth.* 2007 99:474–83.
20. Tullis MJ, Brown S, Gewertz BL. Hepatic influence on pulmonary neutrophil sequestration following intestinal ischemia-reperfusion. *J Surg Res* 1996;66:143-6.
21. Edelstein C.L, Ling H, Schrier RW. The nature of renal cell injury. *Kidney Int* 1997; 51: 1341– 51.
22. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 2002; 105: 248-58.
23. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br. J. Surg.* 1994;81:637-47.
24. Best B. Ischemia and reperfusion injury in cryonics. [www.benbest.com](http://www.benbest.com).
25. Sakon M, Ariyoshi H, Umeshita K, Monden M. Ischemia-reperfusion injury of the liver with special reference to calcium-dependent mechanism. *Surgery Today* 2002; 32: 1-12.
26. McMichael M, Moore MRM. Ischemia–reperfusion injury pathophysiology, part I. *J Vet Emerg Crit Care* 2004; 14: 231-41.



27. Kumar V, Cotran R, Robbins SL. Basic Pathology. 6th edition 2000: P:6-10,30-36.
28. Kılınç K. Oksijen radikalleri: üretilmeleri, fonksiyonları ve toksik etkileri. Biyokimya Dergisi 1985; 2: 60-89.
29. Günel E, Çağlayan F, Çağlayan O, Dilsiz A ve ark. Treatment of intestinal reperfusion injury using antioxidative agents. J Pediatr Surg 1998; 33: 1536-39.
30. Oostenbrug GS, Mensink RP, Hardeman MR ve ark. Exercise performance, red blood cell deformability, and lipid peroxidation: effects of fish oil and vitamin E. J Appl Physiol 1997; 83: 746-52.
31. Howell JG, Zibari GB, Brown MF, Burney DL et al. Both ischemic and pharmacological preconditioning decrease hepatic leukocyte/endothelial cell interactions. Transplantation 2000;69:300-6.
32. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. Am J Physiol 1986 ;250: 749-53.
33. Göksel Şener, Berrak Ç. Yeğen. İskemi Reperfüzyon Hasarı. Klinik Gelişim 5-13.
34. Udassin R, Vromen A, Haskel Y. The time sequence of injury and recovery following transient reversible intestinal ischemia. J Surg Res 1994; 56: 221-25.
35. Peralta C, Prats N, Xaus C, Gelpi E ve ark. Protective effect of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion in the rat. Hepatology 1999;30:1481-89.
36. Özçelik N, Dursun V, Pekmezci S. Mezenter iskemi reperfüzyon hasarının önlenmesinde Allopurinol, Süperoksit Dismutaz ve Dimetil sülfoksitin etkisi. Kolon rektum dergisi 1993;3:10-2.
37. Otamiri T. Oxygen radicals, lipid peroxidasyon, and neutrophil infiltration after smallintestinal ischemia and reperfusion. Surgery 1989;105:593-7.
38. Aronson S, Blumenthal R. Perioperative renal dysfunction and cardiovascular anesthesia: concerns and controversies. J Cardiothorac Vasc Anesth 1998; 12: 567-86.
39. Huet F, Gouyou JB, Guignard JP. Prevention of hypoxemia-induced renal dysfunction by perindoprilat in the rabbit. Life Sci 1997; 61: 2157-65.

40. Dillon JJ, Grossman SH, Finn WF Effect of oxypurinol on renal reperfusion injury in the rat. *Renal Failure* 1993; 15: 37-45.
41. Sabbatini M, Sansone G, Uccello F, de Nicola L ve ark. Functional versus structural changes in the pathophysiology of acute ischemic renal failure in aging rats. *ZGdney Znt* 1994; 45: 1355-61.
42. Noiri E, Gailit J, Sheth D. Cyclic RGD peptides ameliorate ischemic acute renal failure in rats. *Kidney Int* 1994; 46: 1050-58.
43. Kelly KJ, Williams WW Jr, Colvin RB, Bonventre JV. Antibody to intercellular adhesion molecule 1 protects the kidney against ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:812-16.
44. Bonventre JV, Colvin RB. Adhesion molecules in renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1996;5(3):254-61.
45. Liu W, Okajima K, Murakami K, Harada N, Isobe H, Irie T. Role of neutrophil elastase in stress-induced gastric mucosal injury in rats. *J Lab Clin Med*. 1998;132:432-9.
46. Daemen MA, van de Ven MW, Heineman E, Buurman WA. Involvement of endogenous interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation*. 1999;27:792-99.
47. R.G.Woolfson, C.G.M.Millar,G H.Neild .Ischaemia and reperfusion injury in the kidney: current status and future direction *Nephrol Dial Transplant* 1994: Editorial Comments.
48. Friedewald JJ, Rabb H: Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. *T.Kidney Int* 2004; 66: 486-91.
49. Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. *J Biochem* 1984; 222 :1-10.
50. Arendshorst WJ, Finn WF, Gottschalk CW. Pathogenesis of acute renal failure following temporary renal ischemia in the rat. *Circ. Res.*1975 .37:558-68.
51. Summers WK, Jamison RL. The no reflow phenomenon in renal ischemia. *Lab. Invest.* 1971.25:635-43.
52. Chamoun F, Burne M, O' Donnel M, Rabb H. Pathophysiologic role of selectins and their ligands in ischemia reperfusion injury. *Front. Biosci* 2000; 5: 103-9.

53. Caron A, Desrosiers RR, Béliveau R. Kidney ischemia reperfusion regulates expression and distribution of tubulin subunits, beta-actin and rho GTPases in proximal tubules. *Arch Biochem Biophys* 2004; 431: 31–46.
54. Ming-Chang Kao, M.D. Woan-Ching Jan, Ph.D. Magnesium Sulfate Mitigates Lung Injury Induced by Bilateral Lower Limb Ischemia-Reperfusion in Rats. *Journal of Surgical Research*. 2011; 171, e97–e106 .
55. Sadi Kaplan, A. Tulga Ulus, Ufuk Tütün, Aysen Aksöyek. Effect of Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Usage on Spinal Cord Ischemia-Reperfusion Injury: Electron Microscopic and Functional Evaluation. *Eur Surg Res* 2004;36:20–25
56. Asli F. Kaptanoglu · Turkan Arca · Kamer Kilinc. Magnesium sulfate protects fetal skin from intrauterine ischemia reperfusion injury. *Arch Dermatol Res* 2012; 304:529–532.
57. Jinyoung Hwang, MD, Jinhee Kim, MD, Sanghyon Park, MD, Sukju Cho, MD, Seongjoo Park, MD, Sunghee Han, MD. Magnesium Sulfate Does Not Protect Spinal Cord Against Ischemic Injury *Journal of Investigative Surgery*, 2011; 24, 250–256.
58. XIAO Bo, MA Lu-lin, XIAO Chun-lei. Protective effect of heat shock protein and magnesium sulfate supplementation on renal ischemia reperfusion injury. *Journal of Pekin university*, 2011; 43- 4, 525-530.
59. Sivarajah A, Chatterjee PK, Patel NS, Todorovic Z, Hattori Y, Brown PA, Stewart KN, Mota-Filipe H, Cuzzocrea S, Thiernemann C: Agonists of peroxisome-proliferator activated receptor-gamma reduce renal ischemia/reperfusion injury. *Am J Nephrol*, 23, 267-276, 2003.
60. Şahin E., Olguner Ç, Bodur H.A., Koca U. ve ark. Uzak ve Doğrudan İskemik Önkoşullamanın Karaciğerin Reperfüzyon Hasarı Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2009;29(2):381-7.
61. Yellon, D. M. and Downey, J. M. (2003). Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev* : 1113-51.
62. Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 1503–20.

63. Williams P, Lopez H., Britt D., Chan C. Characterization of Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 1997;37:1-7.
64. Bozkurt Y, Fırat U, Murat A ve ark. The Protective Effect of Ellagic Acid Against Renal Ischemia – Reperfusion Injury in Male Rats. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2012 18 (5) : 823-828.
65. Cochrane J, Williams B. T., Banerjee A. ve ark. Ischemic Preconditioning Attenuates Functional, Metabolic, and Morphologic Injury from Ischemic Acute Renal Failure in the Rat *Renal Failure* 1999, 21(2), 135-45.
66. Agus ZS: Hypomagnesemia. *J Am Soc Nephrol* 1999. 10: 1616–1622.