

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

**RATLARDA DİREKT VE UZAK İSKEMİK ÖN
KOŞULLAMANIN RENAL İSKEMİ
REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE ETKİLERİ**

Dr. KEZİBAN ORAL

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2010

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

**RATLARDA DİREKT VE UZAK İSKEMİK ÖN
KOŞULLAMANIN RENAL İSKEMİ
REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. KEZİBAN ORAL

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. Mert AKAN

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini bizlerle paylaşan hocalarım Sayın Prof. Dr. Zahide Elar, Sayın Prof. Dr. Emel Sağıroğlu, Sayın Prof. Dr. Ali Günerli, Sayın Prof. Dr. Atalay Arkan, Sayın Prof. Dr. Erol Gökel, Sayın Prof. Dr. Semih Küçükğüçlü, Sayın Prof. Dr. Ali Necati Gökmen, Sayın Prof. Dr. Sermin Öztekin ve diğer değerli hocalarıma;

Tez çalışmamın her aşamasında desteğini ve anlayışını esirgemeyen danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Mert Akan' a;

Uzmanlık eğitimim boyunca, beraber çalıştığım tüm öğretim üyelerine, uzman ve asistan arkadaşlarıma;

Tezimin hazırlanmasındaki yardımları için Sayın Doç. Dr. Çimen Olguner , Sayın Doç. Dr. Sevdâ Özkardeşler Birlik ve Sayın Prof. Dr. Mustafa Olguner'e;

Anestezi teknikerlerine, ameliyathane, yoğun bakım, ağrı ünitesi, gündüz hastanesi hemşire ve personeline;

Onlara istediğim zamanı ayıramadığım halde sevgi ve desteklerini hiç esirgemeyen, beni hep kollayan aileme;

Hayatı benimle paylaşan, hep yanımda olan ve hep olacağımı bildiğim yol arkadaşım, canım eşim Mehmet'e;

Sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürler.....

Dr. Keziban ORAL

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ŞEKİL LİSTESİ	i
GRAFİK LİSTESİ.....	i
RESİM LİSTESİ	i
KISALTMALAR.....	ii
ÖZET	iii
SUMMARY	iv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1.İskemi	2
2.2.Reperfüzyon	4
2.3.Böbrek İskemi Reperfüzyon Hasarı	6
2.4.İskemi Reperfüzyon Hasarında Önemli Mediyatörler.....	7
2.5.İskemik Ön Koşullama.....	8
2.6.Direkt İskemik Ön Koşullama	9
2.7.Uzak İskemik Ön Koşullama	9
3. GEREÇ VE YÖNTEM	11
4. BULGULAR	16
5. TARTIŞMA.....	25
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	29
7. KAYNAKLAR.....	30

SEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 1.** İskemi reperfüzyon hasarı sonrası uzak organ hasarı oluşumu..... 3
- Şekil 2.** Serbest oksijen radikalinin dokudaki doğrudan ve dolaylı etkileri..... 5

GRAFİK LİSTESİ

Sayfa No

- Grafik 1.** Böbrek histopatolojik incelemesinde proksimal tübülüslerde yapısal değişiklikler..... 16
- Grafik 2.** Böbrek histopatolojik incelemesinde MNL hücre infiltrasyonu..... 17
- Grafik 3.** Böbrek histopatolojik incelemesinde eritrosit ekstravazasyonu 18
- Grafik 4.** Böbrek histopatolojik incelemesinde interstisyel alan yapı değişikliği 19

RESİM LİSTESİ

Sayfa No

- Resim 1:** Ratın böbrek kan akımının kesilmesi 12
- Resim 2:** Ratta İÖK öncesi bacak akımının lazer akımölçerle gösterilmesi..... 13
- Resim 3:** Ratın bacak kan akımının kesildiğinin lazer akımölçerle gösterilmesi 13
- Resim 4:** Böbrek dokusu *sham* grubuna ait H&E ile boyanmış kortekse ait kesit görüntüleri 21
- Resim 5:** Böbrek dokusu İR grubuna ait H&E ile boyanmış kesit görüntüleri 22
- Resim 6:** Böbrek dokusu DİÖ + İR grubuna ait H&E ile boyanmış kesit görüntüleri 23
- Resim 7:** Böbrek dokusu UİÖ + İR grubuna ait H&E ile boyanmış kesit görüntüleri 24

KISALTMALAR

İR:	İskemi Reperfüzyon
DiÖK:	Direkt İskemik Ön Koşullama
UiÖK:	Uzak İskemik Ön Koşullama
SOR:	Serbest Oksijen Radikali
İÖK:	İskemik Ön Koşullama
ÇOY:	Çoklu Organ Yetersizliği
SEYS:	Sistemik Enflamatuvar Yanıt Sendromu
ATP:	Adenozin Trifosfat
H₂CO₃:	Karbonik Asit
NO:	Nitrik Oksit
TxA₂:	Tromboksan A ₂
TNF-α:	Tümör Nekrozis Faktör Alfa
PMNL:	Polimorf Nüveli Lökositler
MPO:	Myeloperoksidaz
GFH:	Glomerüler Filtrasyon Hızı
ET1:	Endotelin 1
ETA:	Endotelin A
ETB:	Endotelin B
HSP-72:	<i>Heat Shock Protein 72</i>
cGMP:	Siklik Guanozin Monofosfat
cAMP:	Siklik Adenozin Monofosfat,
H&E:	Hematoksilen Eozin

ÖZET

Ratlarda Direkt ve Uzak İskemik Ön Koşullamanın Renal İskemi Reperfüzyon Hasarı Üzerine Etkileri

Dr.Keziban ORAL, DEÜTF Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD, İZMİR

Amaç: Şok, böbrek transplantasyonu, kısmi nefrektomi, kardiyopulmoner *bypass*, sepsis, ürolojik girişimler ve hidronefroz gibi çeşitli klinik durumlarda, böbrek kan akımının durması sonrası böbrekte iskemi; kan akımının yeniden sağlanması ile reperfüzyon ortaya çıkmaktadır. İskemi reperfüzyon hasarını azaltmak amacıyla kullanılan yöntemlerden biri iskemik ön koşullamadır. Bu çalışmanın amacı rat renal iskemi reperfüzyon (İR) modelinde tek taraflı alt ekstremiteye uygulanacak uzak iskemik ön koşullama (UIÖK) ile böbreğe uygulanacak direkt iskemik ön koşullamanın (DİÖK) etkilerinin araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: DEÜTF Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alındıktan sonra ağırlıkları 250-300 g arasında değişen 28 adet erkek Wistar Albino rat 7'şerli 4 gruba ayrıldı. Tüm gruplara genel anestezi altında laparotomi uygulandı ve sol renal pedikül diseksiyonu yapıldı. Grup I (*Sham* Grubu, n=7): Laparotomi ve sol renal pedikül diseksiyonundan sonra başka bir işlem yapılmadan batın kapatıldı. Grup II (İR, n=7): Sol böbreğe 45 dakika böbrek iskemisi sonrası 4 saat reperfüzyon uygulandı. Grup III (DİÖK+İR, n=7): Sol böbreğe uygulanan 4 döngü iskemik ön koşullama sonrası böbrekte iskemi reperfüzyon gerçekleştirildi. Grup IV (UIÖK+İR, n=7): Sol arka bacağa uygulanan 3 döngü iskemik ön koşullama sonrası sol böbrekte iskemi reperfüzyon oluşturuldu. Tüm gruplarda ratların anestezi süresi eşit tutuldu, histopatolojik değerlendirme için sol böbrek çıkarıldıktan sonra ratlar sakrifiye edildi.

Bulgular: Böbrek histopatolojik hasar skoru *sham* grubunda diğer gruplara göre anlamlı düşük bulundu. İskemi reperfüzyon grubundaki hasar skorları DİÖK+İR ve UIÖK+İR gruplarının skorlarından yüksek saptandı. Uzak İÖK+İR grubunda ise eritrosit ekstravazasyonu skoru DİÖK+İR grubunun skorundan anlamlı olarak daha düşük bulundu.

Sonuç: Bu çalışmada UIÖK ve DİÖK'nin böbrek İR hasarını azalttığı, UIÖK'nin ise DİÖK'ye göre daha etkili olduğu gösterilmiştir. Bu olumlu etkinin klinik ve deneysel çalışmalar ile ayrıntılandırılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Böbrek, reperfüzyon hasarı, iskemik ön koşullama.

SUMMARY

The Effects of the Direct Ischaemic Preconditioning and Remote Ischaemic Preconditioning on Renal Ischaemia Reperfusion Injury in Rats

Dr.Keziban Oral, Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Anaesthesiology, IZMIR

Background: Cessation of renal blood flow causes renal ischaemia and restoration of blood flow causes reperfusion in several clinical conditions like shock, renal transplantation, cardiopulmonary bypass, sepsis and urological procedures as partial nephrectomy. One of the methods that can be used to prevent ischaemia reperfusion (IR) injury is ischaemic preconditioning. The aim of this study was to evaluate the effects of remote and direct ischaemic preconditioning (RIP and DIP) in the rat renal IR injury model.

Materials and Methods: After obtaining approval from the Institutional Ethics Committee, 28 Wistar Albino male rats weighing approximately 250-300 g were divided into 4 groups. Laparotomy and left renal pedicle dissection were performed to all groups under general anaesthesia. Group I(Sham, n=7): Laparotomy and left renal pedicle dissection were performed but nothing else was done. Group II (IR, n=7): After 45 minutes of left renal pedicle occlusion, 4 hours of reperfusion was performed. Group III (DIP+IR, n=7): After 4 cycles of ischemic preconditioning applied to left kidney, renal IR was performed. Group IV (RIP+IR, n=7): After 3 cycles of ischemic preconditioning applied to left hind leg, renal IR was performed. Durations of anaesthesia were equal in all groups. All rats were sacrificed and the left kidney was processed for conventional histopathology.

Results: The histopathological injury score of kidney was significantly lower in the sham group compared with the other groups. The injury score of IR group was significantly higher than the DIP+IR and RIP+IR groups. In RIP+IR group, injury score for erythrocyte extravasation was found significantly lower than the DIP+IR group.

Conclusions: In the present study, it was demonstrated that both DIP and RIP decreased renal IR injury but RIP was found more effective than DIP. This protective affect needs more detailed further experimental and clinical studies.

Key words: Kidney, reperfusion injury, ischaemic preconditioning.

1. GİRİŞ VE AMAC

Böbrek transplantasyonu, kısmi nefrektomi, kardiyopulmoner *bypass*, sepsis, ürolojik girişimler ve hidronefroz gibi çeşitli klinik durumlarda geçici olarak kan akımının durması ile iskemi, kan dolaşımının tekrar sağlanması ile de reperfüzyon oluşmaktadır. İskemi reperfüzyon (İR), doku veya organa giden kan akımının bir süre azalması veya durması sonrasında yeniden kanlanma olarak tanımlanır . Kan akımının tekrar başlaması dokulara iskemik hasardan daha fazla zarar verebilmektedir (1). İskemik periyod süresince dokuda toksik serbest oksijen radikalleri (SOR) üretilir. Reperfüzyon sırasında SOR ve süperoksit radikalleri endotelial hasar, artmış mikrovasküler permeabilite ve doku ödemeine neden olmaktadır (2,3). Ayrıca aktive olan adezyon molekülleri ve sitokinler sistemik enflamatuvar yanıtı başlatabilir. Bu yanıtlar İR hasarı olarak tanımlanır (3). İskemi reperfüzyon hasarından korunmak için değişik yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan biri, ilk kez 1986 yılında Murry ve ark. (4) tarafından kalpte tarif edilen iskemik ön koşullamadır (İÖK). İskemik ön koşullama, kısa iskemik epizodları izleyen reperfüzyon periyodları ile dokunun sonradan gelecek uzun süreli iskemiye dayanıklılığını artıran süreç olarak tanımlanmıştır (5). Bir diğer yöntem uzak iskemik ön koşullamadır (UIÖK). Bir organa uygulanan iskemi reperfüzyon epizodlarının başka bir organda iskemiye karşı dayanıklılığı artırmasına UIÖK denilmektedir (6).

Böbrekte uygulanan İÖK' nin, reperfüzyonla ortaya çıkan enflamatuvar yanıtı baskıladığı öne sürülmektedir. Böbrekte direkt iskemik ön koşullama (DİÖK) yöntemi, renal arter veya pedikülün çeşitli sürelerle klemplenip açılmasıyla gerçekleştirilmiş olmakla birlikte en çok kabul gören yöntem 4 dk. klemp, 11 dk. reperfüzyonun 4 döngü olarak gerçekleştirilmesidir (7,8).

Uzak İÖK'nin iskelet kası, böbrek, akciğer, barsak, karaciğer ve beyinde İR ile indüklenmiş doku hasarını azalttığı gösterilmiştir (9-13). Ancak ekstremiteye uygulanan İÖK' nin böbrek İR'sine etkisini gösteren bir araştırmaya literatürde rastlanmamıştır.

Bu çalışmanın amacı rat renal İR modelinde tek taraflı alt ekstremiteye uygulanacak UIÖK ile böbreğe uygulanacak DİÖK'nin böbrek İR hasarına etkilerini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

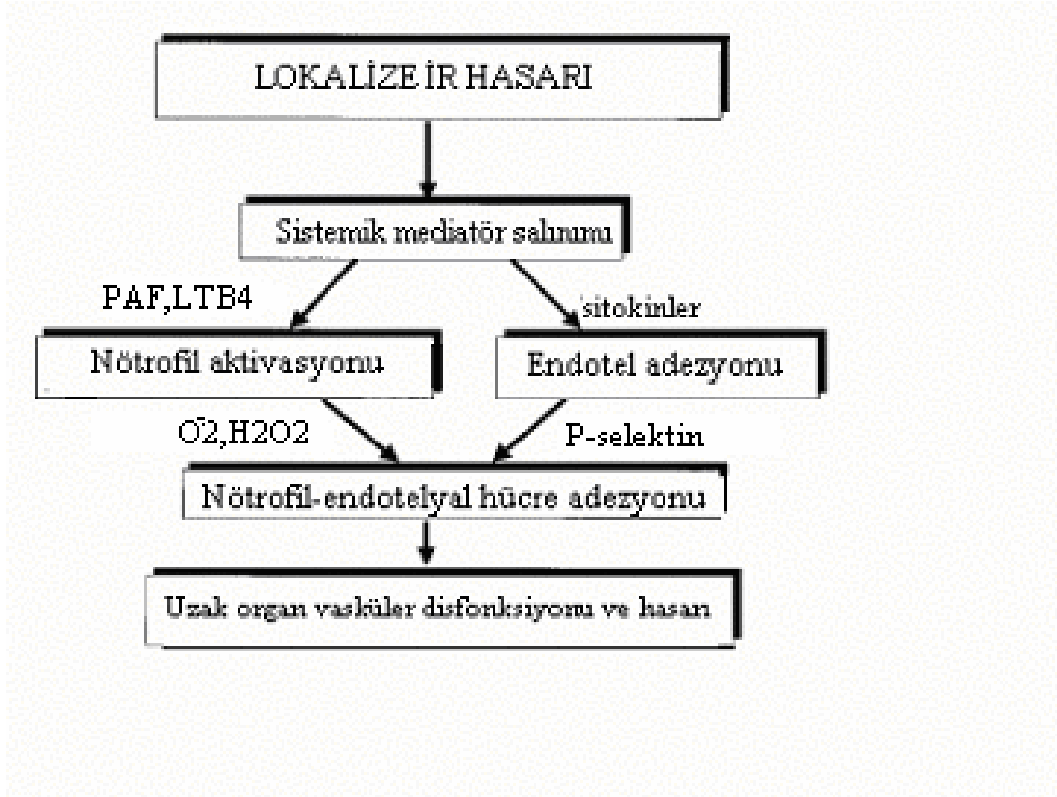
Günlük uygulama içerisinde İR tıbbın pek çok alanında sık karşılaşılan bir olaydır. Transplantasyon cerrahisinde de kaçınılmaz olarak transplante edilecek organın iskemi ve reperfüzyonu söz konusu olup oluşan hasar greft fonksiyonlarını etkilemektedir. Böbrek transplantasyonu, kısmi nefrektomi, kardiyopulmoner *bypass*, sepsis, ürolojik girişimler, travma ve hidronefroz gibi çeşitli klinik durumlarda görülen böbrek iskemisinden sonra bilateral renal kortikal nekroz ve geri dönüşümsüz böbrek yetersizliği gelişebilir (14). Oluşan hasar bu bölgede sınırlı kalmayıp, aktive olan birçok mekanizma ile ortaya çıkan toksik ürünler, başta akciğer olmak üzere kalp, beyin gibi uzak organlarda da hasar oluşturur ve uzun süreli yoğun bakım izlemi gerektirebilecek çoklu organ yetersizliğine (ÇOY) neden olabilmektedir (15,16).

2.1 İskemi

İskemi, organ veya doku kan akımındaki yetersizliğe bağlı olarak gelişen geri dönüşümlü veya dönüşümsüz hücre ve doku hasarıdır (17). Geri dönüşümsüz hücre hasarını önleyebilmek için dokuya yeniden kan akımının sağlanması (reperfüzyon) gerekmektedir. Ancak reperfüzyonun gerçekleşmesi, iskemik dokularda 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 (18-20).

İskemi reperfüzyon lokal-uzak etki ve komplikasyonlara neden olabilen bazı mekanizmaları tetikler (3). İskemik periyod süresince dokuda toksik SOR üretilir. Serbest oksijen radikalleri ve süperoksit radikalleri reperfüzyon sırasında endotelial hasar, artmış mikrovasküler permeabilite ve doku ödemeine neden olmaktadır (2,3). Ayrıca aktive olan adezyon molekülleri ve sitokinler sistemik enflamatuvar yanıt sendromunu (*SEYS*) başlatabilir. Bu yanıtlar İR hasarı olarak tanımlanır (3).

İskemi reperfüzyon sonrası oluşan hasar diğer organları da etkileyebilir. İskemi reperfüzyonun uzak organ etkileri sıklıkla akciğer ve kardiyovasküler sistemde görülmektedir. Uzak organ İR hasarı mekanizması Şekil 1'de gösterilmiştir (15).



Şekil 1. İskemi reperfüzyon hasarı sonrası uzak organ hasarı oluşumu (15).

PAF: Trombosit Aktive Edici Faktör, LTB4 : Lökotriyen B4 , $O_2\cdot$, H_2O_2 : Oksijen radikalleri

Uzamış iskemi 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 (18).

İskemi sırasında hücre membranında bulunan Na^+/K^+ pompasının çalışması için gerekli olan enerji sağlanamaz. K^+ iyonları hücre dışına çıkarken Na^+ ve Cl^- iyonları da hücre içine girerler. Anaerobik glikolizle adenin trifosfat (ATP) üretilmeye çalışılır, bu da laktik asit üretimi ile sonuçlanır. 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'e kadar düşebilmektedir. Adenin trifosfat bağımlı çalışan diğer bir pompa ise ekstrasellüler ve intrasellüler Ca^{+2} 'u dengelemektedir. İnasellüler Ca^{+2} artışı ile proteolitik enzimler ve fosfolipazlar aktive olurlar. Fosfolipazların aktivasyonu araşidonik asit oluşumu ile

sonuçlanır. Araşidonik asit direkt etkiyle mitokondriyal enzimleri inhibe eder ve serbest radikal oluşumunu artırır (18).

Uzamış hipoksi; membran potansiyeli, iyon geçişi ve endotelyal hücrelerin iskelet yapısını bozmakta ayrıca intrasellüler volümü artırmaktadır. Bu değişiklikler enerji depolarının, prostasiklin ve nitrik oksit (NO) gibi bazı biyoaktif maddelerin yapımının azalması, endotelin ve tromboksan A₂ (TxA₂) gibi maddelerin yapımının artması ile birlikte (1).

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 hasarlanma ortaya çıkar. Hasara, mitokondrilerde şiddetli vakuolizasyon ve matrikste kalsiyumdan zengin şekilsiz yoğunluk birikimi eşlik eder (21).

2.2 Reperfüzyon

İskemik dokuda kan akımının yeniden sağlanması, enerji gereksiniminin yeniden yapılması ve toksik metabolitlerin ortadan kaldırılması gibi yararlı etkileri olmaktadır (18). Ancak iskemik dokunun reperfüzyonu paradoksik olarak daha fazla hasara yol açmaktadır (20). Klinik olarak İR hasarı sıklıkla transplantasyon, iskemik serebrovasküler olay (*stroke*), miyokard enfarktüsü, şok/resüsitasyon ve turnike uygulamaları sonrasında görülmektedir (22).

İskemi reperfüzyon şokta organ yetmezliğine yol açmada önemli patolojik bir mekanizmadır (23). Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α), nötrofil aktivasyonu, İR'nin indüklediği organ hasarında önemli rol oynar (24).

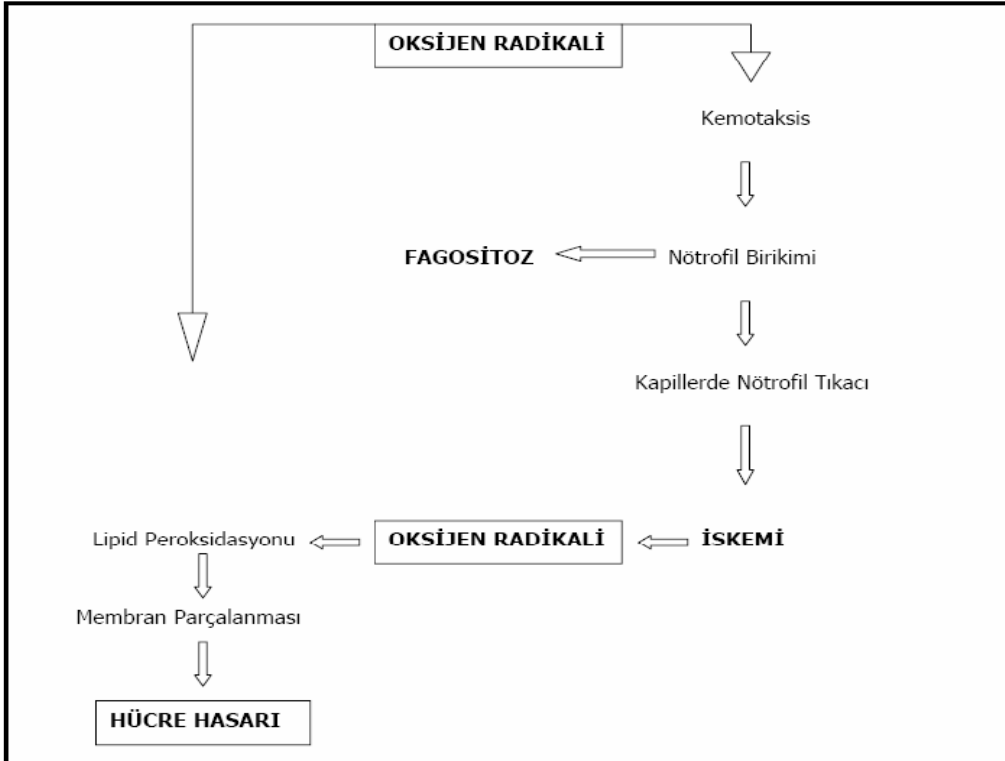
İskemi reperfüzyon hasarının fizyopatolojisi ile ilgili çeşitli faktörler ileri sürülmüştür. Bunlar birbiriyle ilişkileri karmaşık, hücrel ve humoral olaylar serisidir.

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 (19).

Reperfüzyon hasarının oluşmasında esas iki mekanizma söz konusudur. Bunlardan ilki SOR'un açığa çıkması, diğeri ise hidrolitik bir enzim olan fosfolipaz A₂'nin iskemik dönemde Ca⁺² etkisiyle aktive olarak membranlardaki yağ asitlerini parçalamasıdır (25). Reperfüzyon sonucu dokuya kan ve oksijen sağlanır. Dokuda iskemi süresince biriken hipoksantin atılmaya çalışılır. Oksijen varlığında ksantin oksidaz enzimi aktive olarak SOR'u oluşturur (26). Artan SOR'un başlattığı lipid peroksidasyonu ve protein hasarı sonucu hücre fonksiyonları bozulur ve doku nekrozu ortaya çıkar (27). Serbest oksijen radikalleri hem dokuya doğrudan zarar vermekte hem de PMNL'nin hasarlı dokuda birikmesine yol açmaktadır. Dokuya gelen aktive PMNL, myeloperoksidaz (MPO), elastaz, proteaz, kollajenaz gibi enzimleri açığa çıkarırlar. Bu enzimler dokudaki hasarı arttırırken daha fazla SOR oluşmasına neden olurlar (28) (Şekil 2).



Şekil 2. Serbest oksijen radikalinin dokudaki doğrudan ve dolaylı etkileri (29).

2.3 Böbrek iskemi reperfüzyon hasarı

İskemi reperfüzyon hasarı renal transplantasyon ve septik şokla ilişkili akut renal yetersizlik gelişiminde en önemli patolojik mekanizmalardan biridir (30). İskemi reperfüzyon hasarına sekonder akut renal yetersizlik kötü prognoz ve yüksek mortalite oranı ile ilişkilidir (31). Hayvan ve insan modellerinde uzamış iskeminin renal kan akımında ve glomerüler filtrasyon hızında (GFH) azalmayla sonuçlandığı gösterilmiştir (32). 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 (30).

Aktive nötrofiller İR'nin indüklediği endotelial hücre hasarlanmasıyla oluşan renal hasar patogenezinde rol oynar ve böylece renal kan akımı azalır (23,33). Ayrıca renal İR'ye maruz bırakılan hayvanlarda azalmış GFH'ye glomerüllerde biriken fibrin depozitleri de katkıda bulunur (34,35).

Kelly ve ark. (36) nötrofil adezyon inhibisyonunun iskemik renal hasarı önlediğini göstermişlerdir. Aktive nötrofiller endotelial hasar yapabilen çeşitli enflamatuvar mediyatörleri salgırlar (37). Nötrofil elastaz ve serbest oksijen radikallerini içeren bu mediyatörler vasküler permeabilityi artırır, böylece doku kan akımında azalmaya yol açarlar (23,38,39).

TNF- α üretimi İR'nin indüklediği renal hasarı artırır (40). TNF- α , 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 (41).

2.4 İskemi reperfüzyon hasarında önemli mediyatörler

Adenozin

İskemi sırasında ATP adenozine yıkılır. Adenozin lökosit adezyonunu, nötrofil ve trombosit fonksiyonunu, SOR oluşumunu inhibe eder ve adezyon moleküllerinin oluşumunu azaltır (42,43).

İskemi reperfüzyon hasarında muhtemel mediyatör adenozindir. İskeminin indüklediği renal vazokonstriksiyonun adenozin A₁ reseptörleri yoluyla olduğu gösterilmiştir. A₁ reseptör antagonizması iskemiye bağlı renal vazokonstriksiyona karşı kısmen koruyucu etkiye sahiptir (44).

Denerve böbrekte de oluşan kortikomedüller şant, adenozinin adenin nükleotidlerini dönüştüremeyen iskemik endotelial ve parankimal hücrelerden salınmasıyla açıklanabilir. Adenozin, A₁ reseptör aktivasyonu ile afferent arteriyollerde vazokonstriksiyona yol açarak kan akımı redistribusyonunu sağlarken, A₂ reseptörleri yoluyla efferent arteriyollerde vazodilatasyon ve medullar vazodilatasyonu indükler. A₁ ilişkili kortikal vazokonstriksiyon dominanttır. Böbrekte kortikomedullar şantın tersine dönüşü selektif A₁ antagonizmasıyla uyumludur. Perfüzyonun sağlanmasıyla böbreğe oksijen sunumunun yeterliliği güvenceye alınır (41).

Nitrik Oksit

Nitrik oksit endotelial hücrelerden salınan kontraktıl elemanları, lökosit ve trombositlerin adezyon ve aktivasyonlarını inhibe eder (41). İskemi reperfüzyon NO metabolitlerinin düzeyinin azalmasına neden olur (9).

Endotelin

Hasarlı ya da iskemik endotelial hücrelerden salınan potent bir vazokonstriktördür. Üç izoformundan en potent vazokonstriktör olan endotelin 1 (ET₁), endotelin A (ETA) ve endotelin B (ETB) adlı 2 farklı reseptörle etkileşir. Endotelin A, ET₁' e yüksek spesifite gösterir ve primer olarak vasküler düz kas hücrelerinde bulunur. Endotelin B tübüler epitelyal hücrelerde bulunur.

Endotelin antikor ya da selektif ETA reseptör antagonisti infüzyonu iskemi ve erken faz reperfüzyonda renal hasarı azaltır (41).

Isı şok proteinleri

Isı şok proteinleri hipertermi ve iskemi sonrası arttığı gösterilen intrasellüler stres proteinleridir (42). Isı stresinin yol açtığı artmış *heat shock protein 72 (HSP-72)* böbrekte iskemi ve reperfüzyonu izleyen hasarı azaltır ve renal tübüler hücre kültürlerini kimyasal iskemiden korur (45, 46).

2.5 İskemik ön koşullama

Organlar kısa süreli iskemi ve reperfüzyona maruz bırakıldıklarında, ardından gelen uzun süreli iskemi sonrası reperfüzyonda hasar daha az olmaktadır. Bu durum İÖK olarak adlandırılmaktadır (5). Yöntem ilk kez 1986 yılında Murry ve ark. (4) tarafından köpek kalbinde yapılan araştırma ile gösterilmiştir. Kalpte 40 dk.'lık tek bir iskemiye takiben ciddi bir ATP düşüşü ve hücre ölümü olduğu halde dört kez tekrarlanan 10 dk.'lık İR periyodunun İR hasarını azalttığı gösterilmiştir. Bu koruyucu etkinin mekanizması tam olarak açıklanamamakla birlikte takip eden iskemi periyodlarında ilk iskemi dönemine göre ATP düşüşünde azalma olduğu, ayrıca laktat, H⁺ ve NH₃ gibi zararlı maddelerin her perfüzyonla birlikte ortamdan uzaklaştırıldığı gösterilmiştir. İskemik ön koşullamada en önemli hedef son-organ olasılıkla vasküler endoteldir (47).

Başta kalp (4) olmak üzere İÖK' nin çeşitli doku ve organlarda (iskelet kası, böbrek, akciğer, barsak, karaciğer ve beyin) İR ile indüklenmiş doku hasarını azalttığı gösterilmiştir (7,9,10,11,12,13).

İskemik ön koşullama böbrek transplantasyonu veya cerrahisi sırasında renal hasarı azaltmada rol almaktadır (8). Ön koşullamanın koruyucu etkisinde kininlerin (48), ATP duyarlı K⁺ kanallarının (49), adenozin A₁ reseptörlerinin (50), protein kinaz C aktivasyonunun (51) ve HSP'nin (52,53) rolü araştırılmıştır.

İskemik ön koşullamanın koruyucu etkileri iskemi süresi ve kaç döngü İR yapıldığı ile de ilişkilidir. İskelet kasında yapılan çalışmalarda 3 döngü İR ile en iyi sonuç alınmıştır (54). Renal İÖK'de da tek olana göre çoklu ön koşullama protokollerinin renal İR hasarına karşı daha iyi koruduğı bildirilmiştir (55).

İskemik ön koşullamanın böbrek İR hasarına karşı koruyucu etkisi hakkındaki bilgiler kısıtlı ve tartışmalıdır (7,56,57). İskemik ön koşullamanın intrarenal hemodinamik etkileri, iskemik periyottaki adenozin ve adenin nükleotidlerinin renal interstisyel konsantrasyonlarının azalma mekanizması da bilinmemektedir (55).

Ön koşullamanın hem siklik guanozin monofosfat (cGMP) hem de siklik adenozin monofosfat (cAMP) düzeylerinde artışa neden olduğı gösterilmiş olup İÖK'de tetikleyici bir rolleri olabileceğı düşünölmüştür (58).

Dokuda İÖK sonrası ATP'nin stabil kaldığı, adenozin, ksantin ve inozinin ise arttığı bulunmuştur (59). Başka bir deneysel çalışmada ise İÖK grubunda reperfüzyon sonrası ATP'de hızlı bir artış olduğı saptanmıştır (60).

Glikoliz ve ATP yıkımının, bunun sonucunda da laktat oluşumunun İÖK ile azaldığı bulunmuştur. ATP miktarının korunması azalmış ATP kullanımı ile ilgilidir, bu da İÖK' nin enerji koruyucu mekanizmaları tetiklediğini düşöndürmektedir (61).

2.6 Direkt iskemik ön koşullama

İskemi uygulanacak organa uzun süreli iskemi öncesi kısa süreli İR periyodlarının uygulanmasıdır.

Böbrekte DİÖK farklı yöntemlerle uygulanabilir; 1) Renal arter klemplenmesi (7,8,55), 2) Renal pedikül klemplenmesi (62,63,64).

2.7 Uzak iskemik ön koşullama

Bir organa uygulanan İR epizodları başka bir organa iskemiye karşı dayanıklılık sağlamaktadır; bu yöntem UİÖK olarak adlandırılır (6). Uzak İÖK ilk olarak 1993'te kalpte

gösterilmiştir (65). Deneysel ve klinik araştırmalar kalbe uygulanan İÖK'nin kalp dışında akciğer ve diğer organlarda da İR hasarını azalttığını göstermiştir. Uzak İÖK'nin mekanizmasında adenozin, bradikinin, norepinefrin ve ATP bağımlı K⁺ kanallarının rol oynadığı düşünölmektedir (66,67).

Cheung ve ark. (68) kardiyak cerrahi geğiren çocuklarda, alt ekstremiteye uygulanan İÖK'nin (4 döngü beşer dk.'lık) miyokard fonksiyonuna etkilerini araştırmışlar ve UIÖK grubunda miyokard hasarının daha az olduğunu bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada kısa periyodlar halindeki ekstremitte iskemisinin miyokarddaki enfarkt alanını %50 oranında azalttığı gösterilmiştir (66). Harkin ve ark. (69) bilateral, Olguner ve ark. (3) ise tek taraflı alt ekstremiteye uygulanan uzak İÖK'nin akciğerde oluşan İR hasarını azalttığını göstermişlerdir.

Kharbanda ve ark. (66) yaptıkları deneysel çalışmada alt ekstremiteye uygulanan 5 dk.'lık 4 döngü İÖK'nin miyokard iskemisi sonrası ejeksiyon fraksiyonundaki azalmayı belirgin olarak önlediğini ve miyokard enfarkt alanını anlamlı olarak küçölttüğünü bulmuşlardır.

şahin ve ark. (16) yaptıkları deneysel çalışmada alt ekstremiteye uygulanan 10 dk.'lık 3 döngü UIÖK ile karaciğere uygulanan 10 dk.'lık tek döngü DİÖK'yi karşılaştırmışlar ve UIÖK'nin DİÖK'ye göre karaciğer İR hasarını önlemede daha etkili olduğunu göstermişlerdir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma DEÜTF Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alındıktan sonra Dokuz Eylül Üniversitesi Multidisipliner Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda ağırlıkları 250-300 g arasında değişen 28 adet Wistar-Albino cinsi erişkin erkek rat kullanılarak gerçekleştirildi. Ratlar araştırma başlangıcına kadar oda sıcaklığında (21-22 °C), % 40-60 nisbi rutubette, 12 saat aydınlık - 12 saat karanlık ortamda tutuldu, standart pellet yemi ve suyla beslendi. Cerrahi işlemden önceki 12 saat boyunca sadece su içmelerine izin verildi.

Anestezi intraperitoneal 50 mg/kg ketamin (*Ketalar, Pfizer Pharma GMBH, Germany*) ve 10 mg/kg ksilazin hidroklorid (*Alfazyne %2, Alfasan International, Holland*) ile sağlandı ve gerektiğinde deneklerin anestezi derinliğini sabit tutmak için ketaminin yarı dozu refleks yanıtı (Pensetle ayağa ağırlı uyaran verilmesi) bakılarak tekrarlandı.

Deney grupları ve protokol

Grup I (Sham, n=7) : Laparotomi sonrası sol renal pedikül diseke edilip başka bir girişim yapılmadı.

Grup II (İR, n=7): Laparotomi sonrasında sol böbreğe 45 dk. total iskemi sonrası 4 saat reperfüzyon uygulandı.

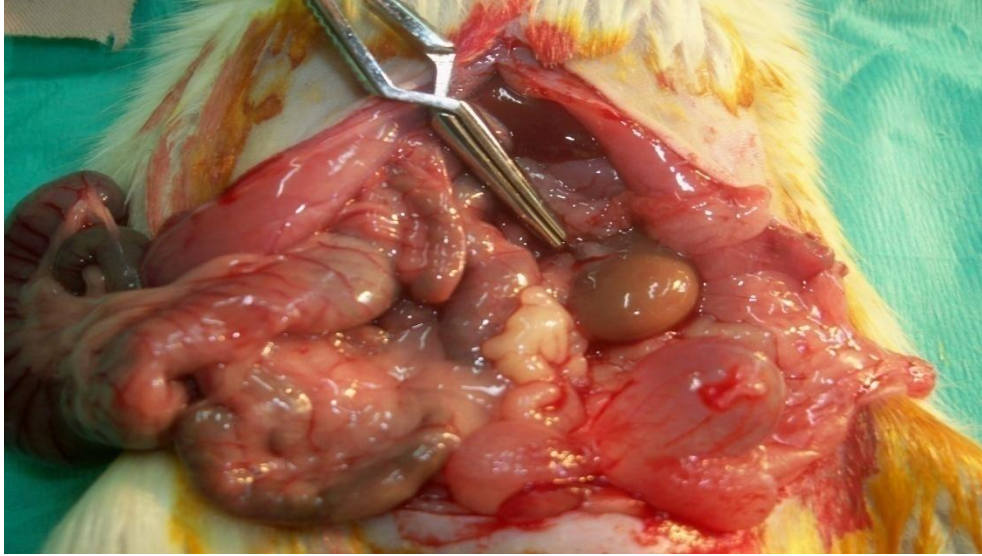
Grup III (DİÖK+İR, n=7): Sol böbreğe 4 dk. iskemi ve 11 dk. reperfüzyon 4 döngü uygulanarak, 5 dk. sonra Grup 2 deki işlemler tekrarlandı.

Grup IV (UİÖK+İR, n=7): Sol arka bacağa 10 dk. iskemi ve 10 dk. reperfüzyon 3 döngü uygulanarak, 5 dk. sonra Grup 2'deki işlemler tekrarlandı.

Tüm gruplarda toplam çalışma süreleri eşit tutulup (350 dk.), doku örnekleri çalışma sonunda alındı.

Deneysel iskemi reperfüzyon ve direkt iskemik ön koşullama yöntemi

Supin pozisyonda abdomen orta hat kesisi ile açıldı, mikro damar klempini ile renal pedikül sıkıştırılarak böbreğe giden kan akımı engellendi. Direkt İÖK amacıyla 4 kez 4 dk. iskemi, 11 dk. reperfüzyon gerçekleştirildi. Sonrasında uzun iskemi olarak 45 dk.'lık klempaj ve ardı sıra klemp açılarak 4 saat boyunca reperfüzyon sağlandı. Yeterli oklüzyon renal pedikülde pulsasyon olmaması ve böbrekte solukluk oluşması ile doğrulandı (Resim 1).



Resim 1. Ratın böbrek kan akımının kesilmesi işlemi.

Deneysel uzak iskemik ön koşullama yöntemi

Ratın sol arka bacağına kasık bölgesinden elastik bandaj (1 cm eninde ve 30 cm uzunluğunda) ile çepeçevre basınç uygulanarak 3 döngü halinde 10 dk. iskemi oluşturulup takiben 10 dk. reperfüzyon sağlandı (70). Kan akımının kesilmesi lazer akımölçer (*LaserFlo BPM2, Vasamedic, USA*) ile doğrulandı (Resim 2,3).



Resim 2 . Ratta İÖK öncesi bacak akımının lazer akımölçerle gösterilmesi.



Resim 3. Ratın bacak kan akımının kesildiğinin lazer akımölçerle gösterilmesi.

Ratları dehidratasyon ve hipotermiden korumak için çalışma süresince operasyon masası ısıtıcı bir lamba ile ısıtıldı ve subkutan izotonik serum fizyolojik solüsyonu 3 ml/kg/saat uygulandı. Bekleme süreleri boyunca batin ıslak steril tamponlar ile kapatıldı. Tüm gruplarda total çalışma süresi sonunda, sol böbrek çıkarıldıktan sonra ratlar eksanguinasyon yöntemi

(kardiyak *puncture*) ile sakrifiye edildi. Doku örnekleri %10'luk tamponlu formaldehid içinde fikse edilip böbrek hasarı histolojik olarak değerlendirildi.

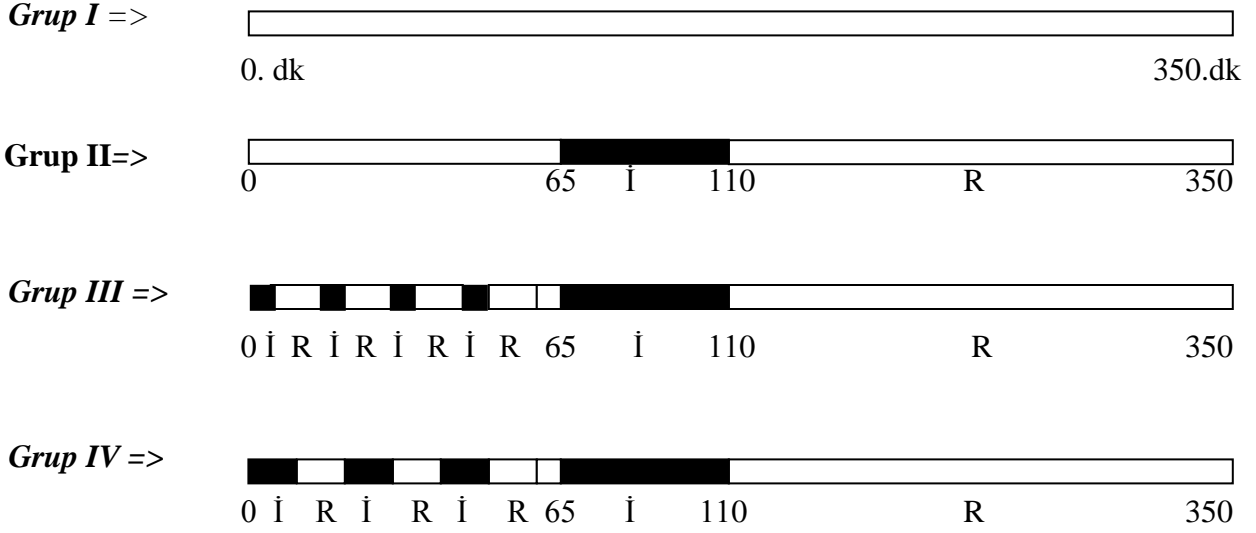
Böbrek hücre histopatolojisinin değerlendirilmesi

Böbrek doku örnekleri DEÜTF Histoloji AD Laboratuvarı'nda incelendi. %10'luk tamponlu formaldehit içinde fikse edilmiş ve parafine gömülmüş olan doku örneklerinden 5 µm'lik kesitler alınarak, hematoksilin eozin (H&E), periyodik asit-*Schiff* (PAS) ve masson-trikrom üçlü boyası ile boyandı. Böbrek dokusu örnekleri ışık mikroskopunda proksimal tübüslardaki yapısal değişiklikler (tübüler atrofi, tübüler fırçamsı kenar kaybı, tübüler dilatasyon, kast formasyonu, vakuolizasyon), mononükleer hücre (MNL) infiltrasyonu, eritrosit ekstrasvazasyonu ve intertisyel alandaki yapısal değişiklikler bakımından DEÜTF Histoloji AD'de görevli bir histolog tarafından kör olarak değerlendirildi. Kesitlerden elde edilen görüntüler semikantitatif olarak 0, +, ++, +++, +++++ (0: değişiklik yok, +: hafif, ++: orta, +++: şiddetli, +++++: çok şiddetli değişiklik) şeklinde hasarlanma oranına göre skorlandı (71).

İstatistiksel değerlendirme

İstatistiksel değerlendirme için *Statistical Package of Social Sciences 15 (SPSS 15.0, Chicago, IL, USA)* programı kullanıldı. Histopatolojik verilerin analizinde *Kruskal-Wallis* varyans analizi, ikili gruplar arasındaki karşılaştırmalarda *Mann-Whitney U* testi kullanıldı. Tüm değerler ortalama ± standart sapma (ort ± ss) olarak verildi. İstatistiksel olarak p <0,05 anlamlı kabul edildi.

Çalışma gruplarının şematik görünümü



İ => İskemi

R => Reperfüzyon

Grup I => Sham, n=7

Grup II => İskemi- reperfüzyon (İR), n=7

Grup III => Direkt iskemik ön koşullama ve iskemi reperfüzyon (DİÖK+İR), n=7

Grup IV => Uzak iskemik ön koşullama ve iskemi reperfüzyon (UİÖK+İR), n=7

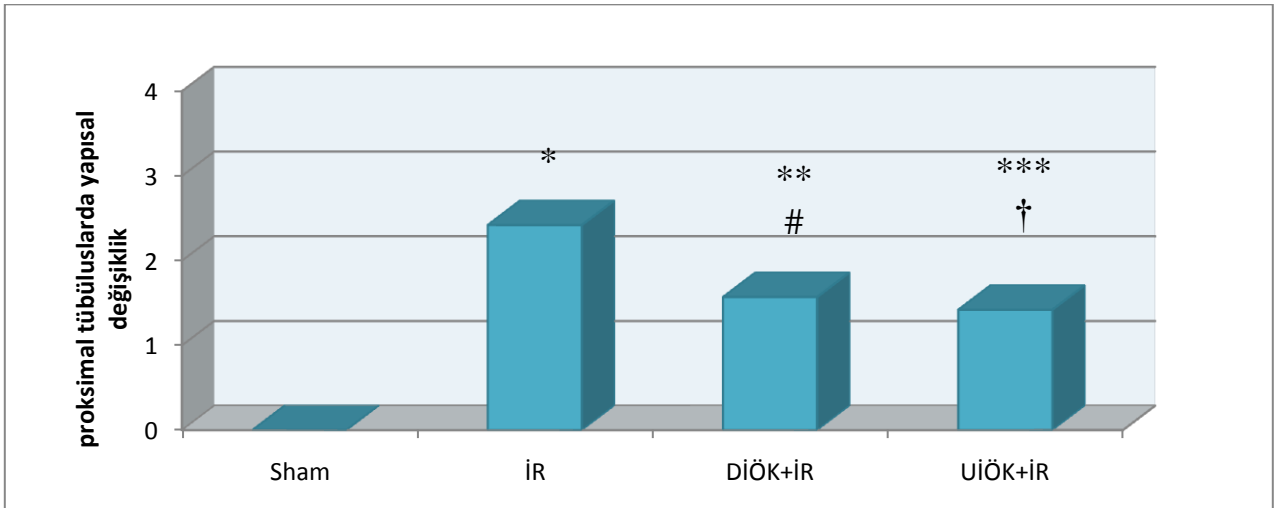
4. BULGULAR

Dokuz Eylül Üniversitesi Multidisipliner Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda gerçekleştirilen çalışmaya toplam 28 rat dahil edildi ve tüm denekler çalışmayı tamamladı.

Böbrek Histopatolojik Hasar Skoru

Proksimal tübüslarda yapısal değişiklikler

Sham ($0,00 \pm 0,00$), İR ($2,42 \pm 0,53$), DİÖK+İR ($1,57 \pm 0,53$) ve UİÖK+İR ($1,42 \pm 0,53$) grupları incelendiğinde *sham* grubu histopatolojik hasar skorları İR, DİÖK+İR ve UİÖK+İR gruplarından anlamlı düşük bulundu ($p<0,01$). İskemi reperfüzyon, DİÖK+İR ve UİÖK+İR gruplarının skorları arasında anlamlı fark bulundu ($p<0,05$). İskemi reperfüzyon grubu ile DİÖK+İR ve UİÖK+İR gruplarının skorları karşılaştırıldığında İR grubunda anlamlı yükseklik saptanırken ($p<0,05$), DİÖK+İR grubu ile UİÖK+İR grubunun skorları arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=0,60$) (Grafik 1).

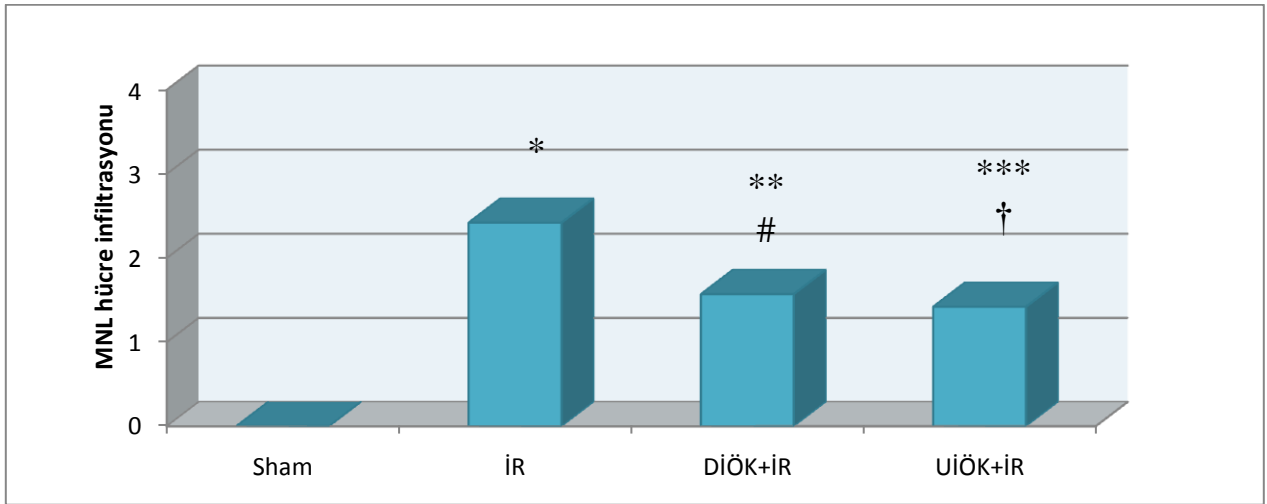


Grafik 1. Böbrek histopatolojik incelemesinde proksimal tübüslardaki hasar skorları.

- * İR Grubu ile *Sham* Grubu karşılaştırıldığında ($p<0,01$)
- ** DİÖK+İR Grubu ile *Sham* Grubu karşılaştırıldığında ($p<0,01$)
- *** UİÖK+İR Grubu ile *Sham* Grubu karşılaştırıldığında ($p<0,01$)
- # DİÖK+İR Grubu ile İR Grubu karşılaştırıldığında ($p<0,05$)
- † UİÖK+İR Grubu ile İR Grubu karşılaştırıldığında ($p<0,05$)

Mononükleer hücre infiltrasyonu

Sham ($0,14 \pm 0,37$), İR ($2,57 \pm 0,53$), DİÖK+İR ($1,85 \pm 0,37$) ve UİÖK+İR ($1,42 \pm 0,53$) grupları incelendiğinde *sham* grubu histopatolojik hasar skorları İR, DİÖK+İR ve UİÖK+İR gruplarından anlamlı düşük saptandı ($p<0,01$). İskemi reperfüzyon, DİÖK+İR ve UİÖK+İR gruplarının skorları arasında anlamlı fark saptandı ($p<0,01$). İskemi reperfüzyon grubu ile DİÖK+İR ve UİÖK+İR gruplarının skorları karşılaştırıldığında İR grubunda anlamlı yükseklik bulunurken (sırasıyla $p<0,05$, $p<0,01$), DİÖK+İR grubu ile UİÖK+İR grubunun skorları arasında anlamlı fark bulunmadı ($p=0,10$) (Grafik 2).

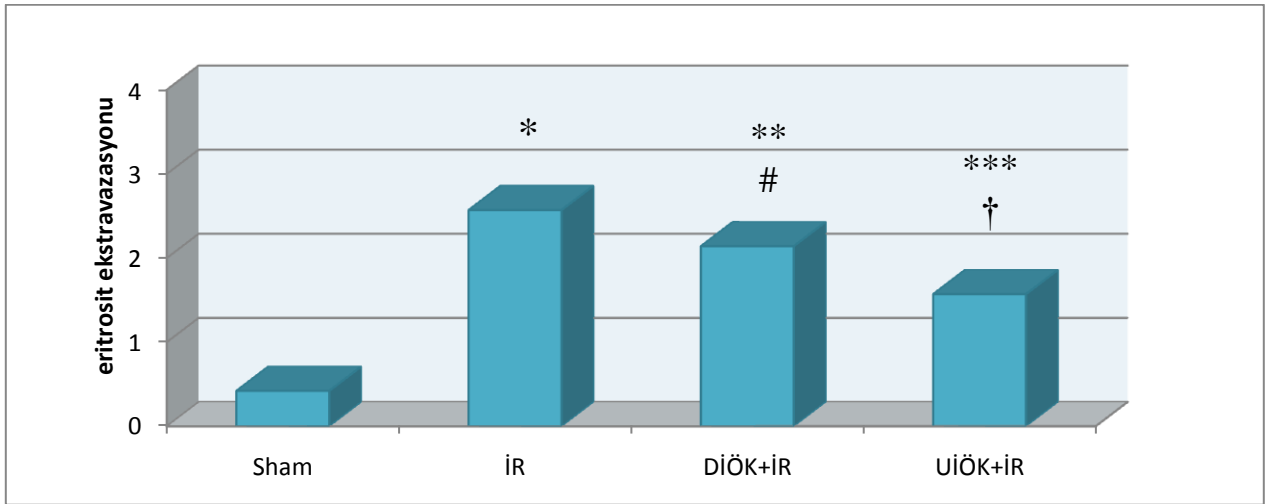


Grafik 2. Böbrek histopatolojik incelemesinde MNL infiltrasyonu skorları.

- * İR Grubu ile *Sham* Grubu karşılaştırıldığında ($p<0,01$)
- ** DİÖK+İR Grubu ile *Sham* Grubu karşılaştırıldığında ($p<0,01$)
- *** UİÖK+İR Grubu ile *Sham* Grubu karşılaştırıldığında ($p<0,01$)
- # DİÖK+İR Grubu ile İR Grubu karşılaştırıldığında ($p<0,05$)
- † UİÖK+İR Grubu ile İR Grubu karşılaştırıldığında ($p<0,01$)

Eritrosit ekstravazasyonu

Sham ($0,42 \pm 0,53$), İR ($2,57 \pm 0,53$), DİÖK+İR ($2,14 \pm 0,37$) ve UIÖK+İR ($1,57 \pm 0,53$) grupları incelendiğinde *sham* grubu histopatolojik hasar skorları İR, DİÖK+İR ve UIÖK+İR gruplarından anlamlı düşük saptandı ($p<0,01$). İskemi reperfüzyon, DİÖK+İR ve UIÖK+İR gruplarının skorları arasında anlamlı fark bulundu ($p<0,05$). İskemi reperfüzyon grubu ile DİÖK+İR grubunun skorları arasında anlamlı fark saptanmazken ($p=0,1$), İR grubu ile UIÖK+İR grubunun ve DİÖK+İR ile UIÖK+İR gruplarının skorları arasında anlamlı fark saptandı ($p<0,05$) (Grafik 3).

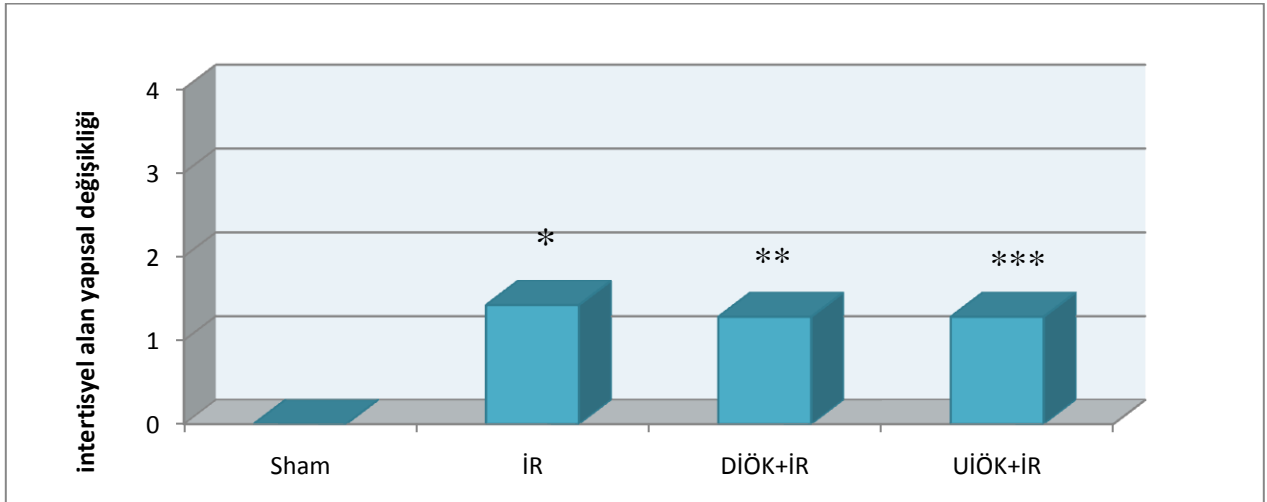


Grafik 3. Böbrek histopatolojik incelemesinde eritrosit ekstravazasyonu skorları.

- * İR Grubu ile *Sham* Grubu karşılaştırıldığında ($p<0,01$)
- ** DİÖK+İR Grubu ile *Sham* Grubu karşılaştırıldığında ($p<0,01$)
- *** UIÖK+İR Grubu ile *Sham* Grubu karşılaştırıldığında ($p<0,01$)
- # DİÖK+İR Grubu ile UIÖK+İR Grubu karşılaştırıldığında ($p<0,05$)
- † UIÖK+İR Grubu ile İR Grubu karşılaştırıldığında ($p<0,05$)

İnterstisyel alandaki yapısal değişiklikler

Sham ($0,00 \pm 0,00$), İR ($1,42 \pm 0,53$), DiÖK+İR ($1,28 \pm 0,48$) ve UİÖK+İR ($1,28 \pm 0,48$) grupları incelendiğinde *sham* grubu histopatolojik hasar skorları İR, DiÖK+İR ve UİÖK+İR gruplarından anlamlı düşük saptandı ($p<0,01$). İskemi reperfüzyon, DiÖK+İR ve UİÖK+İR gruplarının skorları arasında ise anlamlı fark saptanmadı ($p=0,81$). İskemi reperfüzyon grubu ile DiÖK+İR ve UİÖK+İR gruplarının skorları arasında anlamlı fark bulunmadı ($p=0,59$). Direkt İÖK+İR ile UİÖK+İR gruplarının skorları arasında da anlamlı fark saptanmadı ($p=1$) (Grafik 4).



Grafik 4. Böbrek histopatolojik incelemesinde interstisyel alandaki hasar skorları.

- * İR Grubu ile *Sham* Grubu karşılaştırıldığında ($p<0,01$)
- ** DiÖK+İR Grubu ile *Sham* Grubu karşılaştırıldığında ($p<0,01$)
- *** UİÖK+İR Grubu ile *Sham* Grubu karşılaştırıldığında ($p<0,01$)

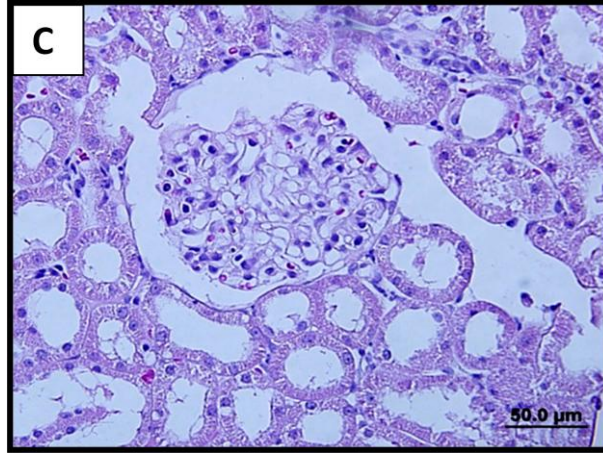
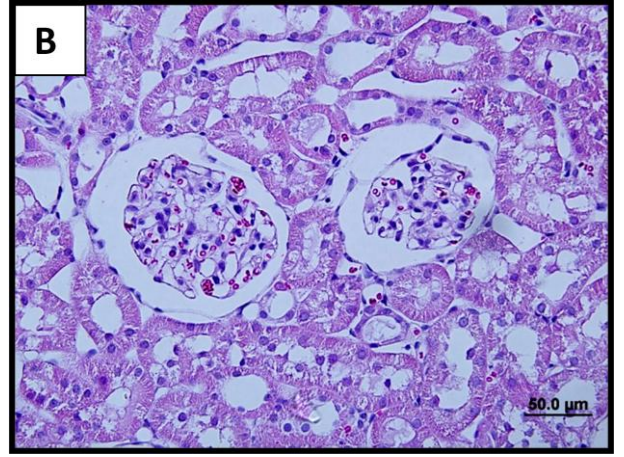
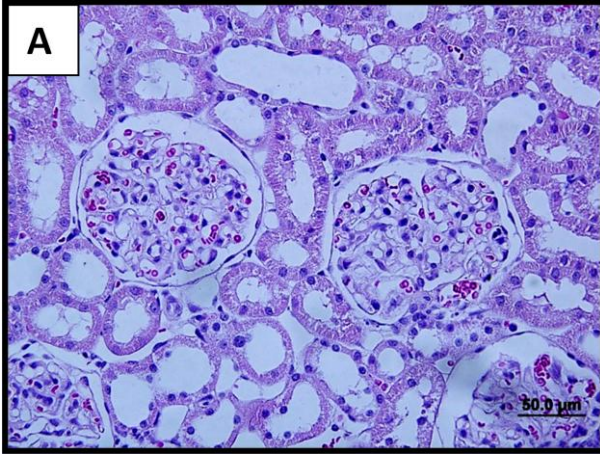
Sham grubuna ait böbrek kesitleri incelendiğinde, böbrek dokusuna ait korteks ve medulla ayrımının rahatlıkla yapılabildiği, korteksin dışında fibröz kapsülün sağlam olarak yer aldığı gözlemlendi. Kortekste renale korpusküllerin normal yapıda olduğu, Bowman kapsülünün pariyetal ve visseral yaprağının normal histolojik yapıda olduğu belirlendi. Proksimal ve distal tübül ile Henle kulbu ve kollektör tübüllerde yapıların normal olduğu görüldü. Epitel hücrelerinin

karakteristik yapılarını koruduğu gözlemlendi. Bu gruba ait kesitlerde herhangi bir hücre infiltrasyonu ve fırçamsı kenar kaybı görülmedi (Resim 4).

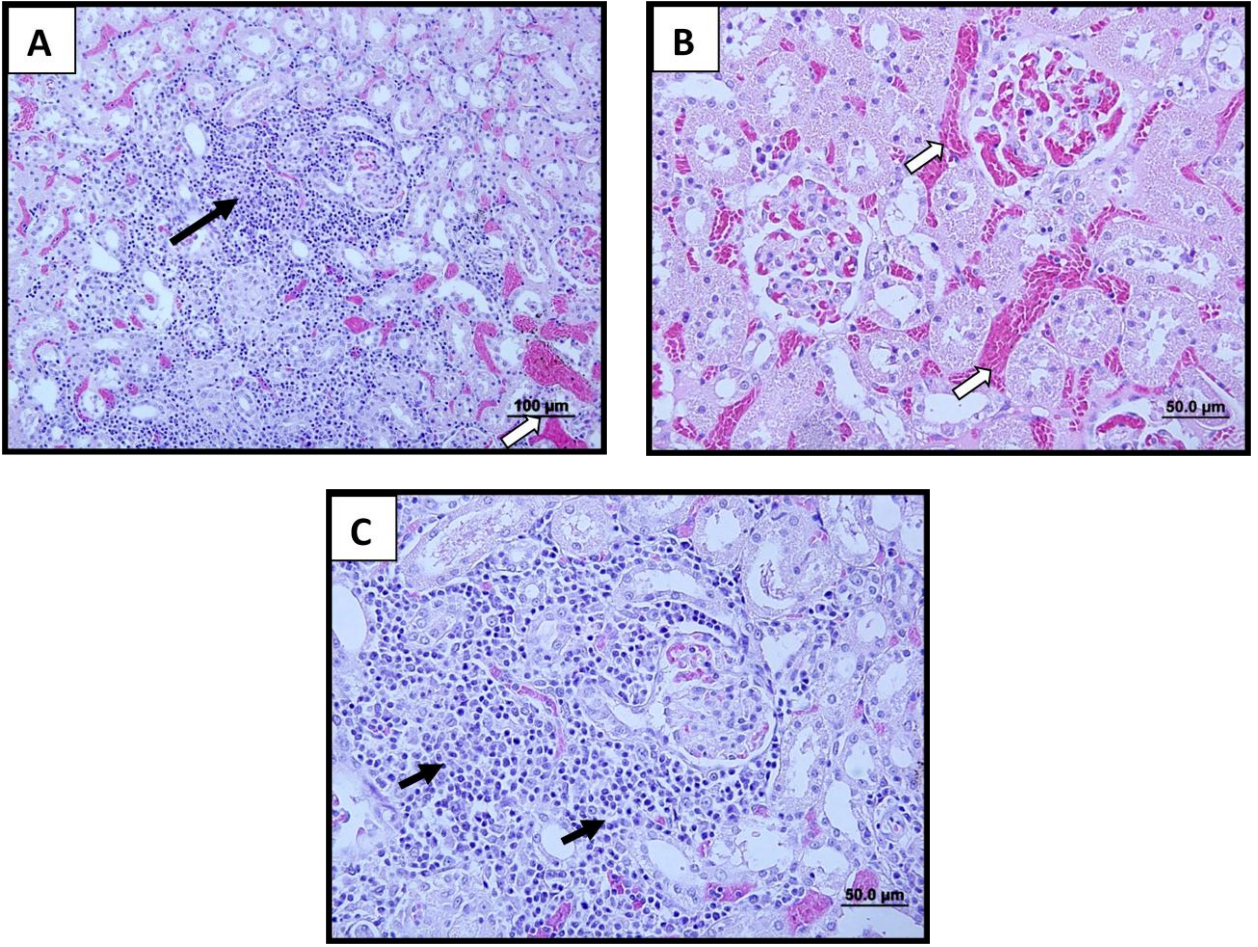
İskemi reperfüzyon grubunda ise kortikal bölgede özellikle yoğun olmak üzere peritübüler alanda MNL infiltrasyonu, proksimal tübül hücrelerinde fırçamsı kenar kaybı, korteksteki damarlarda vazodilatasyon ve eritrosit ekstrasvazasyonu dikkati çekti. Bazı alanlarda proksimal tübüluslarda nadir tübüler atrofi, tübüler dilatasyon, vakuolizasyon görüldü. Tübüllerin bir kısmında proteinöz madde birikimi ile birlikte tübül lümenine hücre debrisleri izlendi (Resim 5).

Direkt İÖK+İR grubunda kortikal bölgede özellikle peritübüler alanda MNL infiltrasyonunda ve proksimal tübül hücrelerinde fırçamsı kenar kaybında azalma görülürken, kortekste eritrosit ekstrasvazasyonunda ise İR grubuna göre azalma olmadığı görüldü. İskemi reperfüzyon grubunda bazı alanlarda proksimal tübüluslarda gözlenen tübüler atrofi, tübüler dilatasyon, vakuolizasyon ile tübüllerde proteinöz madde birikimi ve tübül lümenine hücre debrisleri DİÖK+İR grubunda daha az oranda izlendi (Resim 6).

Uzak İÖK+İR grubunda ise İR grubuna göre kortikal bölgede özellikle peritübüler alanda MNL infiltrasyonunda, proksimal tübül hücrelerinde fırçamsı kenar kaybında ve kortekste eritrosit ekstrasvazasyonunda azalma olduğu görüldü. Bununla beraber UİÖK+İR grubunda DİÖK+İR grubuna göre sadece kortekste eritrosit ekstrasvazasyonunda azalma olduğu izlendi. İskemi reperfüzyon grubunda bazı alanlarda proksimal tübüluslarda gözlenen tübüler atrofi, tübüler dilatasyon, vakuolizasyon ile tübüllerde proteinöz madde birikimi ve tübül lümenine hücre debrisleri UİÖK+İR grubunda daha az oranda görüldü (Resim 7).

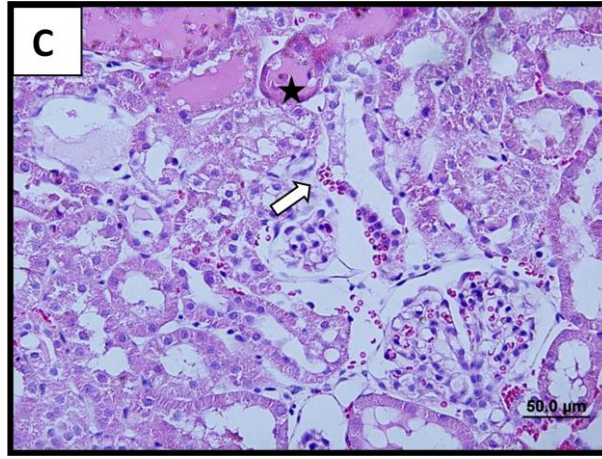
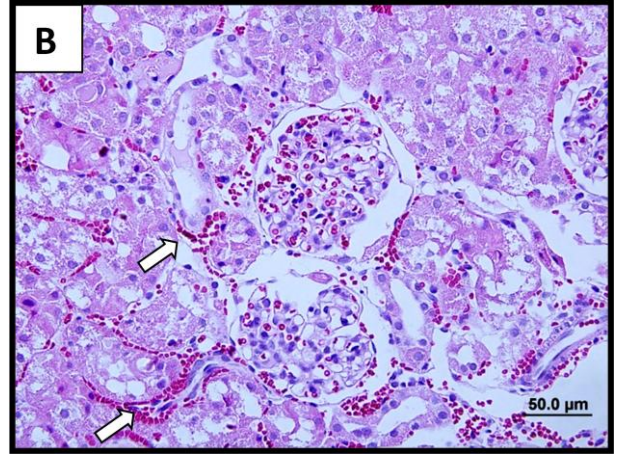
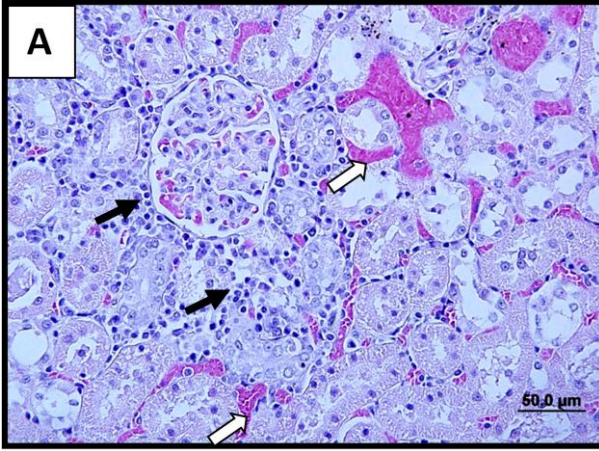


Resim 4. *Sham* grubuna ait H&E ile boyanmış renal kortekse ait kesit görüntüleri (X40).

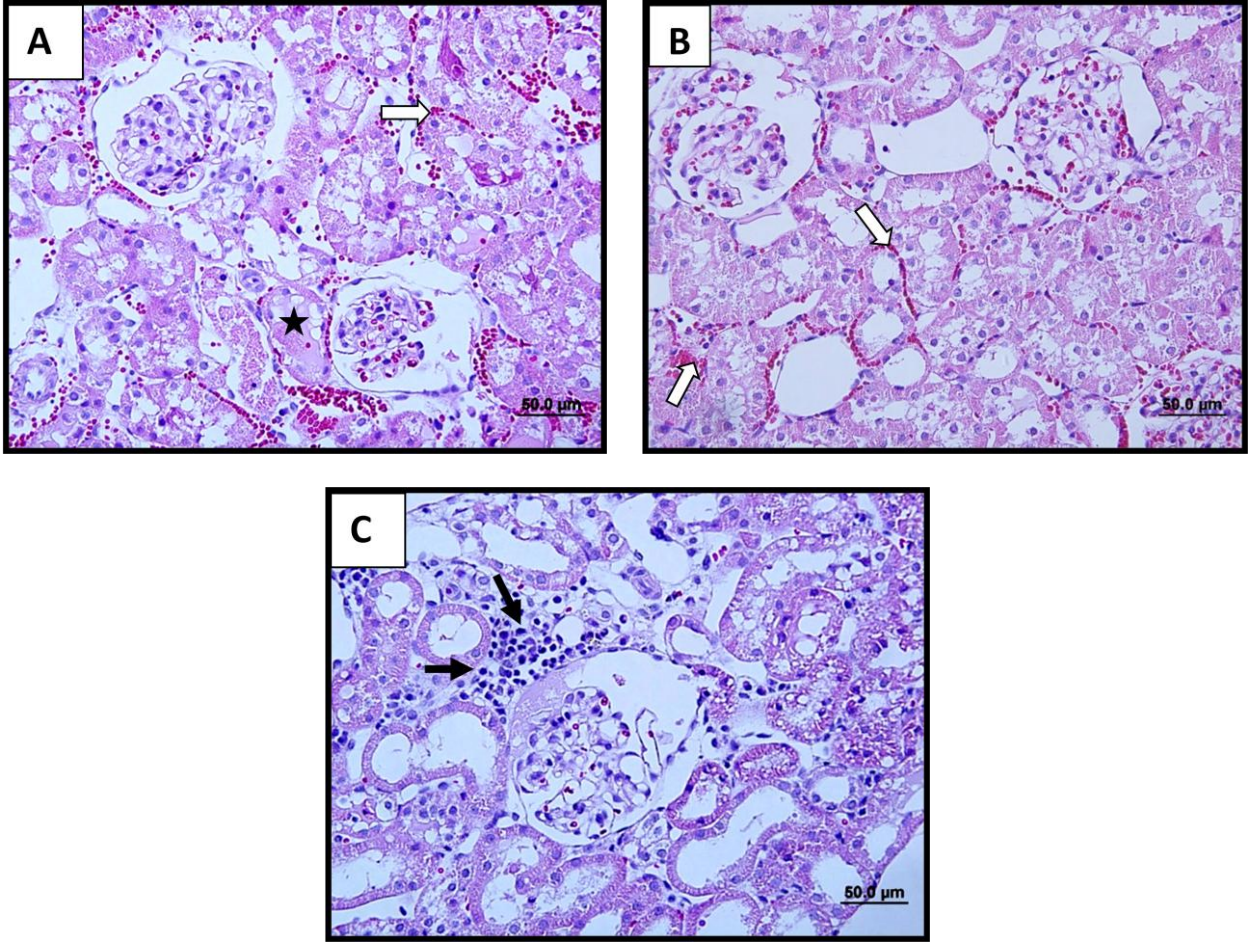


Resim 5. İR grubuna ait H&E ile boyanmış renal dokuya ait kesit görüntüleri.

(➔) MNL infiltrasyonunu , (⇨) eritrosit ekstravazasyonunu göstermektedir (X20, X40).



Resim 6. DİÖK + İR grubuna ait H&E ile boyanmış renal dokuya ait kesit görüntüleri.
(➡) MNL infiltrasyonunu, (⇨) eritrosit ekstravazasyonunu , (*) tübüler değişiklikleri göstermektedir (X40).



Resim 7. UİÖK + İR grubuna ait H&E ile boyanmış renal dokuya ait kesit görüntüleri. (→) MNL hücre infiltrasyonunu, (⇨) eritrosit ekstravazasyonunu, (*) tübüler değişiklikleri göstermektedir (X40).

5. TARTIŞMA

Bu deneysel çalışmada rat renal iskemi reperfüzyon modelinde UIÖK ve DİÖK'nin böbrek İR hasarını azalttığı, UIÖK'nin ise DİÖK'ye göre daha etkili olduğu histopatolojik olarak gösterilmiştir.

İskemiyle özellikle vasküler ve transplantasyon cerrahisinde sık karşılaşılır. Dokuya reperfüzyonla enerji temini sağlanır ve toksik metabolitler uzaklaştırılır. Ancak toksik metabolitlerin sistemik dolaşıma dönmesi ciddi metabolik sonuçlara yol açar ve reperfüzyon lokal doku hasarını artırır. İskemik dokuda reperfüzyon, miyonefropatik metabolik sendrom olarak adlandırılan metabolik asidoz, hiperkalemi, miyoglobinemiyi, miyoglobinüri ve renal yetersizlikle karakterize sistemik problemlerle sonuçlanır (18). Reperfüzyonla aktive olan birçok mekanizma ile ortaya çıkan toksik ürünler, başta akciğer olmak üzere kalp, beyin, karaciğer gibi uzak organlarda hasar oluşturur ve uzun süreli yoğun bakım izlemi gerektirebilecek çoklu organ yetersizliğine neden olabilmektedir (15,16).

Deneysel böbrek İR hasar modeli oluşturmak için farklı iskemi ve reperfüzyon süreleri kullanılmıştır. Williams ve ark. (63) renal arter ve veni 45 dk. klemplayerek 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 iskemiye takiben 4. saatte başladığını bildirmişlerdir. Cochran ve ark. (64) çeşitli İÖK rejimlerini değerlendirdikleri çalışmalarında uzun süreli iskemi modelini 45 dk. renal pedikülü klemplayerek yapmışlar ve reperfüzyonun 24. saatinde kan ve doku örneklerini almışlardır. İslam ve ark. (7) 20 ve 40 dk. iskemi ile birlikte İÖK yapılan ve yapılmayan grupları karşılaştırdıkları çalışmalarında 9 güne kadar reperfüzyon uygulamışlardır. Bu çalışmacılar iskemik ön koşullamanın koruyucu etkinliğini araştırmak için 20 dk.'lık iskemik hasar zamanının çok kısa, 40 dk.'nın ise ideal olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada İÖK'nin etkinliğini incelemek için Williams ve ark. ları (63) ile Cochran ve ark. larının (64) kullandığı 45 dk. iskemi ve renal hasarın en erken gözlemlendiği 4 saatlik reperfüzyon süresi tercih edilmiştir.

Böbreği İR hasarından koruma yöntemlerinden olan İÖK araştırmacılar tarafından çeşitli şekillerde uygulanmış ve İR hasarını azaltmada etkili olduğu gösterilmiştir (8,62,64). İskemi reperfüzyon hasarında İÖK'nin koruyucu etkisinin mekanizması hala bilinmemektedir. İskemik

ön koşullama, iskemik dokudan salınan proenflamatuvar sitokinlerin salınımını, endotelial disfonksiyonu azaltarak ve TNF nin indüklediği P-selektin artışını inhibe ederek azaltır (72,73). Ön koşullamanın koruyucu etkisinde adenozin A₁ reseptörlerinin (50), protein kinaz C aktivasyonunun (51) ve *HSP* sentezinin (52,53) de rolü vardır.

İskemik ön koşullamanın koruyucu etkileri iskemi süresi ve kaç döngü İR yapıldığı ile de ilişkilidir. Fan-zhu ve ark. (55) köpeklerde yaptıkları çalışmada 1, 2, 3 kez tekrarlanan İÖK protokollerinin böbrek İR hasarına etkisini incelemişler. Renal kan akımı ve idrar akımı iyileşme zamanının 3 döngülü İÖK grubunda, 1 ve 2 döngü yapılan gruplara göre belirgin olarak daha kısa olduğunu; adenozin, inozin, hipoksantin, ksantin ve ürik asit düzeylerinin de 3 döngü İÖK grubunda, 1 ve 2 döngü İÖK uygulanan gruplara ve İÖK uygulanmayan gruba göre daha düşük bulunduğunu bildirmişlerdir. Toosy ve ark. (8) 4 döngü, 4 dk. iskemi, 11 dk. reperfüzyon şeklinde uyguladıkları İÖK protokolünün 40 dk.'lık uzamış iskemiden 5 dk. önce uygulanmasının böbrekte belirgin fonksiyonel koruma sağladığını bildirmişlerdir. İslam ve ark. (7) da aynı İÖK protokolünü kullandıkları halde koruyucu etki gözlemlememişlerdir. Bunun nedeni olarak da İÖK' nin İR' den 30 dk. önce uygulanması gösterilmiştir ki, kritik süre olarak adlandırılan İÖK ile uzamış iskeminin başlangıcı arasındaki bu zaman uzarsa İÖK'nin koruyucu etkinliği progresif olarak azalır. Tavşanlarda yapılan bir çalışmada kritik süre 10 dk.'dan 1 saate uzadığında miyokardiyal enfarkt boyutunun azalma derecesi % 84 den % 45 e düşmüş, 2 saate uzadığında ise azalma gözlenmemiştir (74). Biz de çalışmamızda modelin kendisinden kaynaklanan bir renal hasara neden olmaması için optimal kabul edilen 5 dk.'lık kritik süreyi baz alıp 4 dk. iskemi ve 11 dk. reperfüzyon şeklindeki İÖK protokolünü 4 döngü şeklinde uyguladık (7,8). Çalışmamızda İslam ve ark.'dan farklı olarak Toosy ve ark.'nın sonuçlarıyla benzer şekilde bu İÖK modelinin renal İR hasarını anlamlı olarak azalttığını saptadık.

İlk olarak Pryzklenk ve ark. (65) tarafından uygulanan uzak iskemik ön koşullamanın koroner arterlerin perfüzyonunu iyileştirdiği gösterilmiş ve bu olay UİÖK olarak adlandırılmıştır. Ateş ve ark. (75) hepatik İÖK'nin renal İR hasarına etkisini inceledikleri çalışmalarında reperfüzyondan 45 dk. ve 24 saat sonra böbrek histopatolojisini değerlendirdiklerinde UİÖK uygulanan grupta 45 dk. sonra bulgularda belirgin azalma saptamışlar, 24. saatte ise histolojik bulguları hemen hemen normal olarak gözlemlemişlerdir. Biz de çalışmamızda Ateş ve ark.'nın

sonuçlarını destekler nitelikte uzak iskemik ön koşullamanın böbrek İR hasarında etkili olduğunu saptadık.

Küntscher ve ark. (67) geçici iskemi oluştururken damar kan akımını direkt kesmek yerine noninvaziv turnike uygulamasının uzak İÖK'de alternatif bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Saita ve ark. (54) iskelet kas İR hasarını engelleyen en etkili İÖK yönteminin 3 kez 10 dk. iskemi ve 10 dk. reperfüzyon şeklinde olması gerektiğini bildirmişlerdir. Olguner ve ark. (3) tek taraflı arka bacak İR'si öncesinde turnike yöntemiyle uygulanan UIÖK modelinin histolojik akciğer hasar skorunu ve lipid peroksidasyonunu azalttığını göstermişlerdir. Şahin ve ark. (16) arka bacağa turnike yöntemiyle uygulanan 3 döngülük UIÖK sonrası karaciğer İR hasarını değerlendirdikleri çalışmada, UIÖK'nin serum transaminaz düzeylerini ve karaciğer histolojik hasar puanını DIÖK'ye göre azalttığını bulmuşlardır. Çalışmamızda böbrek İR'sinde ilk kez noninvaziv turnike yöntemiyle 3 döngülük alt ekstremitte UIÖK'si oluşturuldu.

Yapılan çalışmalarda İR sonrası böbreğin histopatolojik incelemelerinde konjesyon, tübüler dilatasyon, tübüler atrofi, dejenerasyon, eosinofilik kastlar ve nekroz görülmüştür (63,64). Bu çalışmada böbreğin histopatolojisi ışık mikroskopunda proksimal tübüluslarda yapısal değişiklikler, tübüler atrofi, tübüler fırçamsı kenar kaybı, tübüler dilatasyon, kast formasyonu, vakuolizasyon, MNL infiltrasyonu, eritrosit ekstravazasyonu, renal korpüskül morfolojisindeki ve interstisiyel alandaki yapısal değişiklikler açısından incelendiğinde, semikantatif olarak hasarlanma skorunun *sham* grubunda diğer 3 gruba oranla belirgin olarak daha düşük olduğu saptandı. Özellikle kortikal bölgede yoğun olmak üzere peritübüler alanda MNL infiltrasyonu, proksimal tübül hücrelerinde fırçamsı kenar kaybı, korteksteki damarlarda vazodilatasyon, bol eritrosit ekstravazasyonu, nadir tübüler atrofi, tübüler dilatasyon ve vakuolizasyon görülen iskemi reperfüzyon grubuyla DIÖK+İR ve UIÖK+İR grupları arasında anlamlı fark bulunmakla beraber, DIÖK+İR ve UIÖK+İR grupları arasında eritrosit ekstravazasyonu dışında anlamlı fark bulunmadı. Işık mikroskobu ile yapılan histolojik değerlendirmeler semikantitatif skorlamalar olarak kabul edilmektedir (3). Bununla birlikte bu çalışmada uzak İÖK'nin böbrek histopatolojik hasar skorunu direkt İÖK'ye oranla daha iyi baskıladığı sonucuna varılmıştır.

Reperfüzyon hasarının kendisi kadar engellenmesini sağlayan mekanizmalar da oldukça karışıktır. İskemik ön koşullamanın etkinliği yaklaşık iki dekat önce gösterilmesine rağmen

aracılık eden yollar hala tam olarak anlaşılamamıştır. Direkt organa uygulanan İÖK'nin vital organ cerrahilerinde kolayca uygulanamayacağı, birincil olarak hedef organın güvenliğini tehlikeye atabileceği, ikincil olarak İÖK'nin cerrahi süreyi ve kanamayı arttırabileceği bildirilmektedir (76). Uzak İÖK, böbrekte ek stres oluşturmadan, operasyon sırasında cerrahi süre veya kan kaybını arttırmaksızın, kolaylıkla uygulanabilen noninvaziv bir klinik yöntem olabilir. Ulaşılabildiğimiz kaynaklar ve literatür taramasında böbrek İR hasar modellerinde direkt İÖK ile uzak İÖK'nin farklarını araştıran bir çalışmaya rastlamadık.

Bu çalışmanın kısıtlılıkları olarak böbrek fonksiyon testleri, doku miyeloperoksidazı gibi biyokimyasal parametrelerin çalışılmadan sadece histopatolojik değerlendirme yapılması ve daha uzun reperfüzyon süreleriyle (24 saat gibi) çalışılmaması belirtilebilir.

Bu çalışmada UIÖK ve DIÖK'nin her ikisinin de böbrek İR hasarını azalttığı histopatolojik olarak gösterilmiştir. Uzak İÖK, DIÖK'ye göre anlamlı olarak biraz daha etkili bulunmuş ancak her iki yöntem arasında çok fazla bir fark saptanmamıştır. Belki yukarıda bahsedilen çalışma kısıtlılıkları dikkate alındığında daha da anlamlı bir fark bulunabilirdi. Böbrek İR hasarını önlemede etkili olan bu iki yöntemin etkinliğini ve etki mekanizmalarını karşılaştırmak için daha ileri deneysel ve klinik çalışmalara gereksinim olduğu sonucuna varılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak; bu deneysel çalışmada rat renal iskemi reperfüzyon modelinde UIÖK ve DİÖK'nın böbrek İR hasarını azalttığı, UIÖK'nın ise DİÖK'ya göre daha etkili olduğu histopatolojik olarak saptanmıştır.

Major böbrek ameliyatlarında, cerrahi süreyi uzatmadan ve organa ek hasar oluşturmadan İR hasarını önlemek için UIÖK'nın uygulanabilir bir yöntem olabileceğini düşünmekteyiz. Ancak bu iki yöntemin etki mekanizmaları ve etkinlikleri açısından farklarının ortaya konacağı daha ileri çalışmalara gereksinim olduğu sonucuna varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations and preventations of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* 2001;94:1133-8.
2. 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.
3. Olguner C, Koca U, Kar A, Karci A ve ark. 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.
4. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124-36.
5. Laurikka J, Zhong-Kai W, Lisalo P, Kaukinen L, ve ark. Regional Ischemic Preconditioning Enhances Myocardial Performance in Off-Pump Coronary Artery Bypass Grafting. *Chest* 2002;121:1183-9.
6. Takaoka A, Nakae I, Mitsunami K, Yabe T ve ark. Renal ischemia/reperfusion remotely improves myocardial energy metabolism during myocardial ischemia via adenosine receptors in rabbits: effects of “remote preconditioning”. *J Am Coll Cardiol* 1999;33:556–64
7. Islam CF, Mathie RT, Dinneen MD, Kiely EA, ve ark. Ischaemia-reperfusion injury in the rat kidney: the effect of preconditioning. *Br J Urol* 1997;79:842-7.
8. Toosy N., McMorris E.L.J., Grace P.A. ve Mathie R.T. Ischaemic preconditioning protects the rat kidney from reperfusion injury. *BJU International* 1999;84:489-94.
9. Papanastasiou S, Estdale SE, Homer-Vanniasinkam S, Mathie RT. Protective effect of preconditioning and adenosine pretreatment in experimental skeletal muscle reperfusion injury. *Br J Surg* 1999;86:916-22.

10. Soncul H, Oz E, Kalaycioglu S. Role of ischemic preconditioning on ischemiareperfusion injury of the lung. *Chest* 1999;115:1672-7.
11. Davis JM, Gute DC, Jones S, Krsmanovic A, ve ark. Ischemic preconditioning prevents postischemic P-selectin expression in the rat small intestine. *Am J Physiol* 1999;277:2476-81.
12. 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;30:1481-9.
13. Heurteaux C, Lauritzen I, Widmann C, Lazdunski M. Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, and ATP-sensitive K⁺ channels in cerebral ischemic preconditioning (forebrain ischemia/gene expression). *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:4666-70.
14. Şahsıvar M. Renal Arterde Oluşturulan İskemi Reperfüzyon Sonrası Böbrekte Gelişen Fonksiyon Bozukluğuna İloprostun Etkisi. Uzmanlık Tezi 2007
15. Carden D. L., Granger D. N. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J. Pathology* 2000;190:255-66
16. Şahin E., Olguner Ç., Bodur H.A., Koca U. et al. Uzak ve Doğrudan İskemik Önkoşullamanın Karaciğerin Reperfüzyon Hasarı Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2009;29(2):381-7.
17. Tullis MJ, Brown S, Gewertz BL. Hepatic influence on pulmonary neutrophil sequestration following intestinal ischemia-reperfusion. *J Surg Res* 1996;66:143-6.
18. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br. J. Surg.* 1994;81:637-47.
19. Göksel Şener, Berrak Ç. Yeğen. İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Klinik Gelişim* 5-13.
20. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol.* 1986; 250(6 Pt 1): 749-53.

21. Kumar V, Cotran R, Robbins SL. Basic Pathology. 6th edition 2000: P:6-10,30-6.
22. Holger K.Eltzschig, Charles D.Collard. Vascular ischaemia and reperfusion injury. British Medical B. 2004;70:71-86.
23. Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure. N Engl J Med. 1996;334:1448-60.
24. Kelly KJ, Williams WW Jr, Colvin RB, et al. Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury. J Clin Invest. 1996;97:1056.
25. Udassin R., Vromen A., Haskel Y. The time sequence of injury and recovery following transient reversible intestinal ischemia. J Surg Res 1994;56(3):221-5.
26. Lewis MS, Whatley RE, Cain P, McIntyre TM ve ark. Hydrogen peroxide stimulates the synthesis of platelet activating factor by endothelium and induces endothelial cell-dependent neutrophil adhesion. J. Clin. Invest. 1988;82:2045-55.
27. 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.
28. Otamiri T. Oxygen radicals, lipid peroxidasyon, and neutrophil infiltration after smallintestinal ischemia and reperfusion. Surgery 1989;105:593-7.
29. Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. Crit Care Med 1993;21(9):1376-86.
30. Bonventre JV. Mechanisms of acute renal failure. Kidney Int. 1993;43:1160-78.
31. Aronson S, Blumenthal R. Perioperative renal dysfunction and cardiovascular anesthesia: concerns and controversies. J Cardiothorac Vasc Anesth 1998; 12: 567–86.
32. Huet F, Gouyou JB, Guignard JP. Prevention of hypoxemiainduced renal dysfunction by perindoprilat in the rabbit. Life Sci 1997; 61: 2157–65.

33. 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.* 1997;99:1165-72.
34. Losonczy G Jr. Early postischaemic renal fibrin deposition and reduction of glomerular filtration rate in the rat: effect of the defibrinating agent Arwin. *Acta Physiol Hung.* 1985;66:183.
35. Druid H, Eneström S, Rammer L. Effect of anticoagulation upon nephron obstruction in experimental acute ischaemic renal failure: a morphological study. *Int J Exp Pathol.* 1998;79:55-66.
36. 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.
37. Inauen W, Granger DN, Meininger CJ, Schelling ME, Granger HJ, Kvietys PR. An in vitro model of ischemia/reperfusion-induced microvascular injury. *Am J Physiol.* 1990;259:G134-9.
38. Bonventre JV, Colvin RB. Adhesion molecules in renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1996;5(3):254-61.
39. 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.
40. Daemen MA, van de Ven MW, Heineman E, Buurman WA. Involvement of endogenous interleukin- 10 and tumor necrosis factor- α in renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation.* 1999;27:792.
41. R. G. Woolfson, C. G. M. Millar and G. H. Neild Ischaemia and reperfusion injury in the kidney: current status and future direction *Nephrol Dial Transplant* 1994: Editorial Comments.

42. Koti RS, Seifalian AM, Davidson BR. Protection of the liver by ischemic preconditioning: a review of mechanisms and clinical applications. *Dig Surg* 2003;20:383-96.
43. Howell JG, Zibari GB, Brown MF, Burney DL ve ark. Both ischemic and pharmacological preconditioning decrease hepatic leukocyte/endothelial cell interactions. *Transplantation* 2000;69:300-6.
44. Nishiyama A, Miyatake A, Aki Y, Fukui T, Rahman M, Kimura S, ve ark. Adenosine A1 receptor antagonist KW-3902 prevents hypoxia- induced renal vasoconstriction. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 291: 988–93.
45. Chatson G, Perdrizet GA, Anderson C, Pleau M, Berman M, Schweizer R. Heat shock protects kidneys against warm ischaemic injury. *Curr Surg* 1990; 6: 420-3.
46. Borkan SC, Schwartz JH. Heat stress protein (HSP) associated cytoprotection during ischemia in vitro. *J Am Soc Nephrol* 1993; 4: 732.
47. Bouchard JF, Lamontagne D. Mechanisms of protection afforded by preconditioning to endothelial function against ischemic injury. *Am J Physiol* 1996; 271: H1801–6.
48. Goto M, Liu Y, Yang X-M, Ardell JL, Cohen MV, Downey JM. Role of bradykinin in protection of ischemic preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res* 1995; 77: 611–21.
49. Gross GJ, Auchampach JA. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res* 1992; 70: 223–33.
50. Neely CF, Keith IM. A1 adenosine receptor antagonists block ischemia-reperfusion injury of the lung. *Am J Physiol* 1995; 268: L1036–46.
51. Baxter GF, Gona FM, Yellon DM. Involvement of protein kinase C in the delayed cytoprotection following sublethal ischaemia in rabbit myocardium. *Br J Pharmacol* 1995;115: 222–4.

52. Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 1993; 88: 1264–72.
53. Marber MS, Mestril R, Chi S-H, Sayen MR, Yellon DM, Dillmann WH. Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J Clin Invest* 1995; 95: 1446–56.
54. Saita Y, Yokoyama K, Nakamura K, Itoman M. Protective effect of ischaemic preconditioning against ischaemia-induced reperfusion injury of skeletal muscle: how many preconditioning cycles are appropriate? *Br J Plast Surg* 2002;55:241-5.
55. Fan-zhu LI, Shoji Kimura, Akira Nishiyama, Ischemic preconditioning protects post-ischemic renal function in anesthetized dogs: role of adenosine and adenine nucleotides I *Acta Pharmacologica Sinica* 2005 Jul; 26 (7): 851–9.
56. Lee HT, Emala CW. Protective effects of renal ischemic preconditioning and adenosine pretreatment: role of A1 and A3 receptors. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 278: F380–7.
57. Turman MA, Bates CM. Susceptibility of human proximal tubular cells to hypoxia: effect of hypoxic preconditioning and comparison to glomerular cells. *Ren Fail* 1997; 19: 47–60.
58. Lochner A, Marais E, Genade S, Moolman JA. Nitric oxide: a trigger for classic preconditioning? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279: H2752–65.
59. Peralta C, Closa D, Xaus C, Gelpí E ve ark. Hepatic preconditioning in rats is defined by a balance of adenosine and xanthine. *Hepatology* 1998;28:768–73.
60. Yoshizumi T, Yanaga K, Soejima Y, Maeda T ve ark. Amelioration of liver injury by ischaemic preconditioning. *Br J Surg* 1998; 85:1636–40.

61. Peralta C, Bartrons R, Serafin A, Blázquez C ve ark. Adenosine monophosphate-activated protein kinase mediates the protective effects of ischemic preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Hepatology* 2001;34:1164–73.
62. Riera M., Herrero I., Torras J., Cruzado J.M., Fatjo M. ve ark. Ischemic Preconditioning Improves Postischemic Acute Renal Failure Transplantation Proceedings, 1999;31:2346-7.
63. Williams P., Lopez H., Britt D., Chan C. ve ark. Characterization of Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 1997;37:1-7.
64. 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.
65. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA ve ark. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation* 1993;87:893–9.
66. Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA, Kristiansen SB ve ark. Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation* 2002;106:2881–3.
67. Kuntscher MV, Kastell T, Sauerbier M, Nobile R ve ark. Acute remote ischemic preconditioning on a rat cremasteric muscle flap model. *Microsurgery* 2002;22:221–6.
68. Cheung MMH, Kharbanda RK, Konstantinov IE, Shimizu M ve ark. Randomized controlled trial of the effects of remote ischemic preconditioning on children undergoing cardiac surgery. First clinical application in humans. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:2277–82.

69. Harkin DW, Barros D'Sa AAB, McCallion K, Hoper M ve ark. Ischemic preconditioning before lower limb ischemia-reperfusion protects against acute lung injury. *Vasc Surg* 2002;35:1264-73.
70. Strock PE, Majno G. Vascular responses to experimental tourniquet ischemia. *Surg Gynecol Obstet* 1969; 129: 309-18.
71. Fujiia T, Takaokaa M, Muraokaa T ve ark. Preventive effect of L-carnosine on ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. *European Journal of Pharmacology* 2003; 474: 261– 7.
72. Kharbanda Kharbanda RK, Peters M, Walton B, Kattenhorn M, Mullen M, Klein N et al. Ischemic preconditioning prevents endothelial injury and systemic neutrophil activation during ischemia-reperfusion in humans in vivo. *Circulation* 2001; 103: 1624-30.
73. Peralta C, Fernandez L, Panes J, Prats N, Sans M, Pique JM et al. Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin upregulation in the rat. *Hepatology* 2001; 33: 100 -13.
74. Van Winkle DM, Thornton J, Downey JM. The natural history of preconditioning: cardioprotection depends on duration of transient ischemia and time to subsequent ischemia. *Coron Artery Dis* 1991; 2: 613-9.
75. Ates E, Genc E, Erkasap N, Erkasap S ve ark. Renal protection by brief liver ischemia in rats. *Transplantation* 2002;74:1247-51.
76. Lai R, Chang K, Chen C, Tsai H. Transient limb ischemia induces remote preconditioning in liver among rats: The protective role of Heme Oxygenase-1. *Transplantation* 2006;81:1311–31.