

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

**RATLARDA RENAL İSKEMİ REPERFÜZYON
HASARINA İKİ FARKLI ZAMANDA
UYGULANAN DEKSMEDETOMİDİNİN
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

DR. EDİP GÖNÜLLÜ

UZMANLIK TEZİ

İZMİR2011

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

**RATLARDA RENAL İSKEMİ REPERFÜZYON
HASARINA İKİ FARKLI ZAMANDA
UYGULANAN DEKSMEDETOMİDİNİN
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. EDİP GÖNÜLLÜ

Danışman Öğretim Üyesi

Doç.Dr. SEVDA ÖZKARDEŞLER BİRLİK

İÇİNDEKİLER	Sayfa No
TEŞEKKÜR.....	ii
TABLO LİSTESİ.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
GRAFİK LİSTESİ.....	v
RESİM LİSTESİ.....	vi
KISALTMALAR.....	vii
ÖZET.....	1
SUMMARY.....	2
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1.İskemi.....	5
2.2.Reperfüzyon.....	9
2.3.Böbrek İskemi Reperfüzyon Hasarı.....	10
2.4.Deksmedetomidin.....	12
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	14
3.1.Anestezi Uygulaması.....	14
3.2.Deney Grupları ve Protokol.....	14
3.3.Deneysel Çalışma Modeli.....	15
3.4.Biyokimyasal Tetkikler İçin İdrar ve Kan Örneklerinin Alınması.....	18
3.5.Böbrek Hücre Histomorfolojisinin Değerlendirilmesi.....	18
3.6.Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü.....	19
3.7.İstatiksel Değerlendirme.....	19
4.BULGULAR.....	20
4.1.Böbrek Histomorfolojisinin Hasar Skoru.....	20
4.2.Biyokimyasal Bulgular.....	28
5. TARTIŞMA.....	30
6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	34
7.KAYNAKLAR.....	35
Ek-1:Etik Kurul Onayı	42

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini bizlerle paylaşan başta Anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Zahide Elar olmak üzere tüm hocalarıma;

Tez çalışmamın her aşamasında desteğini ve anlayışını esirgemeyen, büyük bir titizlikle hatalarımı düzelten danışman hocam Sayın Doç.Dr.Sevda Özkardeşler Birlik'e;

Tezimde emeği geçen Doç.Dr.Bekir Ergür, Doç.Dr.M. Ensari Güneli, Yrd.Doç.Dr.Tuncay Küme ve Uz.Dr.Leyla Seden Duru'ya;

Hayvan deneyleri laboratuvarında yardımlarını esirgemeyen Dr.Can Yakut, Dr.Tansu Altıntaş, Dr.Baha Arslan, Dr.Onur Tunk'a;

Bütün özlemlere ve ayrılığa rağmen; her gün biraz daha fazla özleyen ve özlenen kızım Helin Berçem'e ve eşim Hayriye'ye;

Sonsuz saygı,sevgi ve teşekkürler...

Dr. Edip GÖNÜLLÜ

TABLO LİSTESİ**Sayfa No**

Tablo 1: Grupların reperfüzyon sonrası 24. saatteki kan üre nitrojeni (KÜN), kan kreatinin (KKr) düzeyi, kreatin klirensi (K_{Kr}), idrar hacmi (İH) ve fraksiyonel Na atılımına (FA_{Na}) ait biyokimyasal veriler.....	29
--	----

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1: İskemide pürin metabolizmasının gelişimi ve ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza çevrilmesi, reperfüzyonda oksijen radikalının oluşumu.....	6
Şekil 2: Serbest oksijen radikalının dokudaki doğrudan ve dolaylı etkileri.....	7
Şekil 3: Hücre zedelenmesinde sitoplazmik kalsiyum artışının kaynakları ve sonuçları....	8
Şekil 4: İskemik ve akut tübüler nekroz (ATN) patogenezinde rol oynayan faktörlerin şematik görünümü.....	10
Şekil 5: Deksmetomidin'in yapısal formülü.....	12
Şekil 6: Deney protokolünün şematik görünümü.....	15

GRAFİK LİSTESİ**Sayfa No**

Grafik 1: Böbrek histomorfolojik incelemesinde proksimal tübüslardaki hasar skorları	20
Grafik 2: Böbrek histomorfolojik incelemesinde mononükleer lenfosit infiltrasyonu skorları	21
Grafik 3: Böbrek histomorfolojik incelemesinde eritrosit ekstrevasyonu skorları.....	22

GRAFİK LİSTESİ**Sayfa No**

Resim 1: Renal pediküle mikrovasküler klip yerleştirilmesi.....	16
Resim 2: Mikrovasküler klip sonrası böbrekte solukluk oluşması.....	16
Resim 3: Metabolizma kafesindeki ratlar.....	17
Resim 4: Metabolizma kafeslerinde tek tek takip edilen ratlar.....	17
Resim 5A-5B: Sham Grubu'na ait kesitler.....	23
Resim 6A-6B: İskemi Reperfüzyon Grubu'na ait kesitler.....	24
Resim 7: İskemi Reperfüzyon Grubu'na ait kesitler.....	25
Resim 8: İskemi Reperfüzyon Grubu'na ait kesitler.....	25
Resim 9: Reperfüzyonun 5. dakikasında deksmedetomidin verilen gruba ait kesitler.....	26
Resim 10A-10B: İskemiden 5 dk. önce deksmedetomidin verilen gruba ait kesitler.....	27

KISALTMALAR

İR	: İskemi Reperfüzyon
Deks.R	: Reperfüzyonun 5. dakikasında Deksmetomidin
Deks.İ	: İskemiden 5 dk önce Deksmetomidin
KÜN	: Kan Üre Nitrojeni
BUN	: <i>Blood Urea Nitrogen</i>
Kr	: Kreatinin
ATP	: Adenozin Trifosfat
Ca⁺²	: Kalsiyum
SOR	: Serbest Oksijen Radikalleri
i.p.	: İntra Peritoneyal
AMP	: Adenozin Monofosfat
ADP	: Adenozin Difosfat
SOD	: Süper Oksit Dismutaz
CAT	: <i>Catalase</i>
NADPH	: <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
O₂⁻	: Süperoksit
ATN	: Akut Tübüler Nekroz
AT II	: Anjiyotensin II
ABY	: Akut Böbrek Yetersizliği
i.v.	: İntravenöz
K_{Kr}	: Kreatinin Klirensi
İH	: İdrar Hacmi
FA_{Na}	: Fraksiyone Sodyum Atılımı
UNaV	: <i>Urine Sodium Value</i> (İdrar Sodyumu)
PNa	: Plazma Sodyumu
ss	: Standart Sapma

ÖZET

Ratlarda Renal İskemi Reperfüzyon Hasarına İki Farklı Zamanda Uygulanan Deksmetomidinin Etkilerinin Karşılaştırılması

Dr.Edip Gönüllü, DEÜTF Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD, İZMİR

Amaç: İskemi-reperfüzyon (İR) hasarı, akut böbrek yetersizliğine neden olan bir durumdur. Bu deneysel çalışmanın amacı, deksmedetomidinin ratlarda iskemik böbrek yetersizliği üzerine olan etkisini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada ağırlıkları 230-300 g arasında değişen 26 adet Wistar albino cinsi erişkin erkek ratlar dört gruba ayrıldı. *Sham* grubu (n=5), İR Grubu (n=7), İR+reperfüzyonda deksmedetomidin uygulanan grup (Deks.R Grubu) (n=7) ve İR + iskemi öncesi deksmedetomidin uygulanan grup (Deks.İ Grubu) (n=7). *Sham* grubunda abdomen diseke edildikten sonra bilateral renal pediküller açığa çıkarıldı ve renal pediküllere klip konulmadı. İR Grubunda iskemik akut böbrek yetersizliği 60 dk.lık bilateral renal arter ve ven oklüzyonunun ardından 24 saatlik reperfüzyonla sağlandı. Deks.R Grubunda; İR grubunun aynı cerrahi işlem uygulandı ve reperfüzyonun beşinci dakikasında [100 µg/kg intra peritoneal (i.p.)] deksmedetomidin verildi. Deks.İ Grubunda; iskemiden beş dk. önce (100 µg/kg i.p.) deksmedetomidin uygulandı ve İR Grubundaki işlemler yapıldı. Ratlar 24. saatin sonunda sağ atriumdan kan örnekleri alınıp, sol böbrekleri çıkarıldıktan sonra sakrifiye edildi.

Bulgular: Renal fonksiyon testleri *Sham* Grubunda diğer gruplara göre anlamlı olarak düşük bulundu. Deks.R ve Deks.İ grupları İR Grubuna göre daha düşük kan üre nitrojeni (KÜN) değerlerine sahipti (p=0,015, p=0,043) ve Deks.R Grubu İR Grubuna göre daha fazla idrar çıkardı (p=0,003). Böbrek histopatolojik hasar skoru *sham* grubunda diğer gruplara göre anlamlı olarak düşük bulundu. İskemi reperfüzyon grubundaki hasar skorları Deks.R ve Deks.İ gruplarından anlamlı olarak yüksek değerli saptandı. Deks.R ve Deks.İ grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu.

Sonuç: Bu çalışmada, hem iskemi öncesi hem de reperfüzyon başlangıcında uygulanan deksmedetomidin ile renal İR hasarının histomorfolojik olarak azaldığı gösterilmiştir. Her iki yöntem arasında anlamlı bir fark saptanmamış olsa bile reperfüzyon döneminde verilen deksmedetomidinin İR grubu ile kıyaslandığında daha etkin olduğu bulunmuştur. Histomorfolojik olarak elde edilen bu veriler artmış aköz diürez ve azalmış KÜN değerlerinden ibaret olan biyokimyasal tetkiklerle de desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Böbrek, reperfüzyon, iskemi, iskemi reperfüzyon hasarı, deksmedetomidin.

SUMMARY

The Effects of Dexmedetomidine Administrated at Two Different Times in Rat Renal Ischaemia Reperfusion Injury Model

Dr.Edip GÖNÜLLÜ, Dokuz Eylul University, School of Medicine, Dept. of Anesthesiology, IZMIR

Objective: Ischemia-reperfusion (IR) injury remains the leading cause of acute renal failure. The aim of this experimental study was to investigate the effect of dexmedetomidine in the rat renal IR injury model.

Materials and Methods: In the present study, 26 Wistar albino male rats weighing 230-300 g were randomly divided into four groups: the sham group (n=5), the IR group (n=7), the IR/ reperfusion treatment with dexmedetomidine (Dex. R group) (n=7) and the IR/ preischemic treatment with dexmedetomidine (Dex. I group) (n=7) . In the sham group, the abdomen was dissected and then bilateral renal pedicles were exposed. Renal clamping was not applied. For IR group, ischemic acut renal failure was induced by occlusion of the bilateral renal artery and vein for 60 minutes followed by reperfusion for 24 hours. For Dex. R group, the same surgical procedure as in IR group was performed, and dexmedetomidine (100 mcg/kg intraperitoneal) was administrated at the 5th min after reperfusion. For Dex. I group, dexmedetomidine (100 mcg/kg intraperitoneal) was used at the 5th min before ischemia, and then the same surgical procedure as in IR group was performed. At the end of 24th hour, blood samples were drawn from the right atrium, the rats were sacrificed and the left kidney was processed for conventional histopathology.

Results: Renal function tests were significantly lower in the sham group when compared with the other groups. The blood urea nitrogen (BUN) levels in group Dex. R and Dex. I were significantly lower than group IR (p=0,015, p=0,043), although urine flow was significantly higher in group Dex.R (p=0,003). The histopathological score of the sham group was significantly lower than the other groups. This score in group IR was significantly higher than the o Dex. R and Dex. I groups. There was no significant difference in histopathological scores between the Dex. R and Dex. I groups.

Conclusions: This results indicate that dexmedetomidine reduce histomorphologically the renal injury caused by IR of the kidney. Although, significant difference was not found between two treatment groups, the effect of dexmedetomidine was better when used in reperfusion period. The histomorphological results were supported with biochemical parameters including increased aqueous diuresis and decreased BUN levels.

Key words: Kidney, reperfusion, Ischemia-reperfusion, dexmedetomidine.

1.GİRİŞ VE AMAC

Akut böbrek yetersizliği hipotansiyon, hipovolemi ve dehidratasyona sekonder gelişen hipoperfüzyonun yanı sıra, iskemi reperfüzyon (İR) hasarına bağlı olarak da oluşabilen klinikte yüksek mortalite ve morbidite ile seyreden böbreklerin akut iskemik bir yanıtıdır (1-3). Renal İR hasarının altta yatan mekanizması kompleks bir tablo olup adenozin trifosfat (ATP) tüketimi, intrasellüler kalsiyum (Ca^{+2}) ve serbest oksijen radikalleri (SOR)'nin birikimi, mitokondriyal disfonksiyon, birçok litik enzim sistem aktivasyonu ve pro-enflamatuvar sitokin üretimini içerir (4-6). 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 (ATN) geliştiği gösterilmiştir (7-9). Edelstein ve ark. (10) tarafından da ATP tüketimine bağlı gelişen bu tübüler hasarın glomerüler filtrasyon hızında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Ratlarda yapılan deneysel çalışmalarda gerek Williams ve ark. nın (11) oluşturduğu bilateral renal iskemi modelinde gerekse Billings ve ark. (12) tarafından kullanılan radyokontrast nefropati modelinde hem İR hasarı sonucu hem de radyokontrast maddenin yarattığı nefropati sonucu oluşan histolojik değişikliklerin 24. saatte tepe yaptığı ve böbrek fonksiyonlarının bir göstergesi olan kan üre nitrojeni (KÜN) ve serum kreatinin (Kr) düzeylerinin de bu değişikliklerle korele olarak arttığı saptanmıştır.

Deksmetomidin medetomidinin aktif bir dekstro-streoizomeri olup selektif bir α_2 adrenoseptör agonistidir (13). Etkileri deneysel serebral iskemi modellerinde araştırılmış; ratlarda inkomplet (14), tavşanlarda ise fokal iskemiye (15) karşı koruyucu olduğu rapor edilmiştir. Bu nöroprotektif etkide azalmış sempatik tonus ve N- Metil D-Aspartat reseptör aracılıklı iyon akışının inhibisyonu yanı sıra anti-apoptotik protein konsantrasyonlarındaki artışın sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (16).

Villela ve ark. (17) köpeklerde deksmedetomidinin renal sistem ve vazopressinin plazma düzeylerine etkilerini araştırdıkları bir deneysel çalışmada deksmedetomidinin düşük dozlarının (1-2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ yükleme dozunu takiben 1-2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 'lık 1 saatlik intravenöz infüzyon uygulaması) santral vazopressin sekresyonunu azaltarak aköz diürece neden olduklarını ve bu etkinin böbrekleri olası bir iskemiye karşı da koruyabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Benzer şekilde, Frumento ve ark. (18) da daha öncesinde renal hastalığı bulunmayan torasik cerrahi uygulanmış olgularda postoperatif renal fonksiyonların preoperatif 24 saat boyunca uygulanan 0.4 µg/kg/sa dozundaki deksmedetomidin infüzyonu ile anlamlı olarak düzeldiğini göstermişlerdir.

Renal İR hasarında deksmedetomidinin etkisi ilk kez Koçoğlu ve ark. (19) tarafından çalışılmıştır. Bir saatlik komplet renal iskemiyi takiben reperfüzyonun 5. dakikasında 100 µg/kg dozunda intraperitoneal (i.p.) yolla deksmedetomidin uygulayan bu çalışmacılar 45 dakikalık reperfüzyon sonunda histolojik olarak renal hasarın önlendiğini göstermişlerdir.

Bu çalışmanın amacı bilateral rat böbrek iskemi-reperfüzyon modelinde 2 farklı zamanda (iskemi öncesi ve reperfüzyon başlangıcında) i.p. yolla 100 µg/kg dozunda uygulanan deksmedetomidinin böbrek hasarına olan 24. saatteki etkilerinin histopatolojik ve biyokimyasal olarak değerlendirilmesidir.

2.GENEL BİLGİLER

İskemi ve reperfüzyon, tıbbın pek çok alanında sık olarak karşılaşılan klinik bir tablodur. Hipovolemik şok, yanık, sepsis, pankreatit gibi durumlar sonucunda ortaya çıkan iskeminin tedavisine bağlı olarak, reperfüzyon hasarı oluşabilmektedir. İskemik inme ve miyokard enfarktüsünde uygulanan trombolitik tedavi veya revaskülarizasyon ameliyatlarına bağlı reperfüzyon hasarı gelişmektedir (20).

Kardiyovasküler cerrahide aortik ya da periferik arteriyel klemp uygulaması, sonrasında da bu uygulamanın sonlandırılması ile İR hasarı oluşabilir (20). Buna ek olarak vasküler, ortopedik ve rekonstrüktif cerrahide kullanılan turnike uygulaması iyatrojenik bir İR modeli olarak bilinmektedir. Ortaya çıkan toksik ajanlar hem turnike uygulanan organda hem de uzak organlarda hasara yol açabilmektedir (21,22).

Parsiyel nefrektomi ameliyatları, koroner arter *bypass* greftleme ve ürolojik bir takım girişimler böbrek iskemisine bağlı geri dönüşümsüz böbrek yetersizliği ile sonuçlanabilmektedir (23).

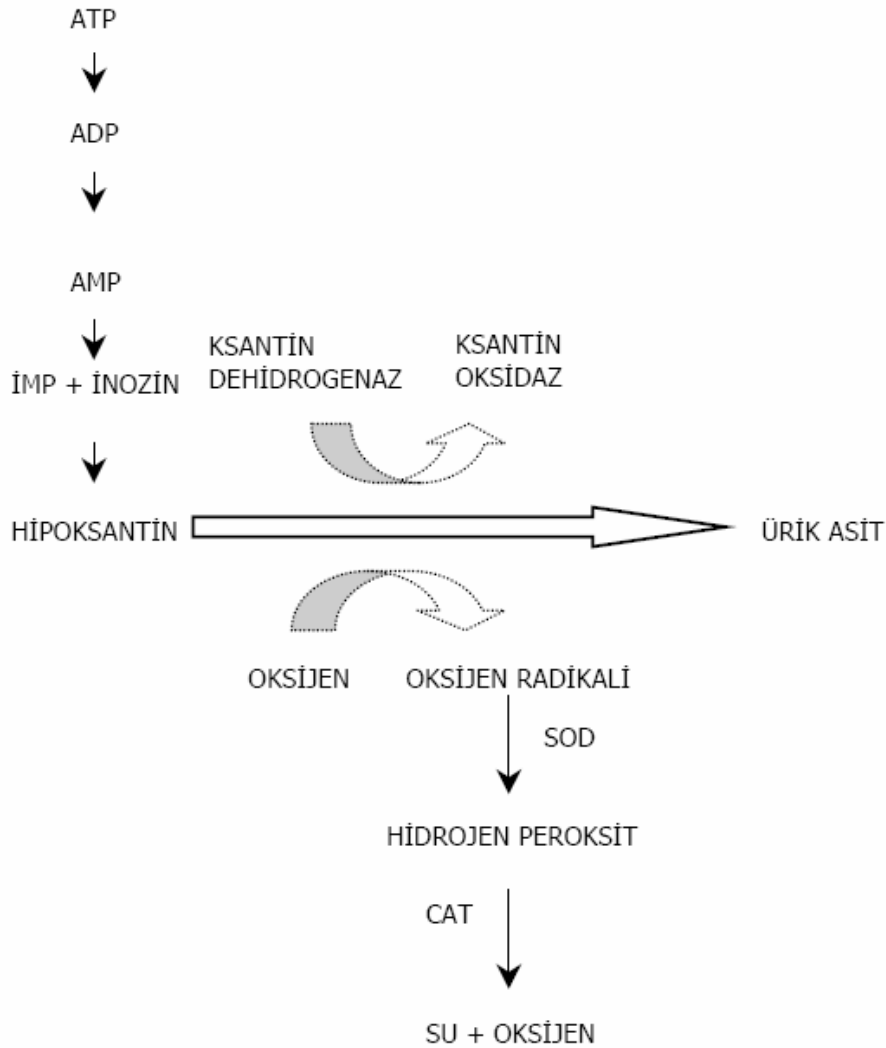
Transplantasyon cerrahisinde, transplante edilecek organın iskemi ve reperfüzyonu kaçınılmaz olup, oluşan hasar greft fonksiyonlarını olumsuz yönde etkilemektedir. Birçok cerrahi girişimde doku iskemisi ve bunu takip eden reperfüzyon sürecinin varlığı kaçınılmazdır (20).

2.1.İskemi

Dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan gereksiniminin dolaşım tarafından sağlanamaması ve bu süreçte oluşan atık ürünlerin yine dolaşım tarafından uzaklaştırılmaması iskemi olarak tanımlanır. İskemi, kardiyak infarktüsde ve inmede olduğu gibi akut veya kladikasyoda olduğu gibi kronik olabilir (24,25). Bir organı perfüze eden kan akımındaki azalma geri dönüşümlü veya dönüşümsüz bir şekilde hücre zedelenmesine sebep olur (26). İskemik hasarın derecesi hipoksinin derinliğine ve şiddetine bağlıdır. İskemiye bağlı doku hasarında hücresel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi hücre ölümüne yol açar (24,25).

İskemik periyod süresince dokuda toksik SOR üretilir (26,28) (Şekil 1). Eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküllere serbest radikal denir (29). Serbest oksijen radikallerinin üretimi ile ilgili çeşitli mekanizmalar ileri sürülse de en önemli basamak ksantin oksidaz sistemidir (30). Hipoksi sırasında ATP üretimi durmasına rağmen kullanımı devam eder. Yüksek enerjili ATP'nin fosfat bağlarının kopmasıyla adenozin monofosfat (AMP) oluşur ve

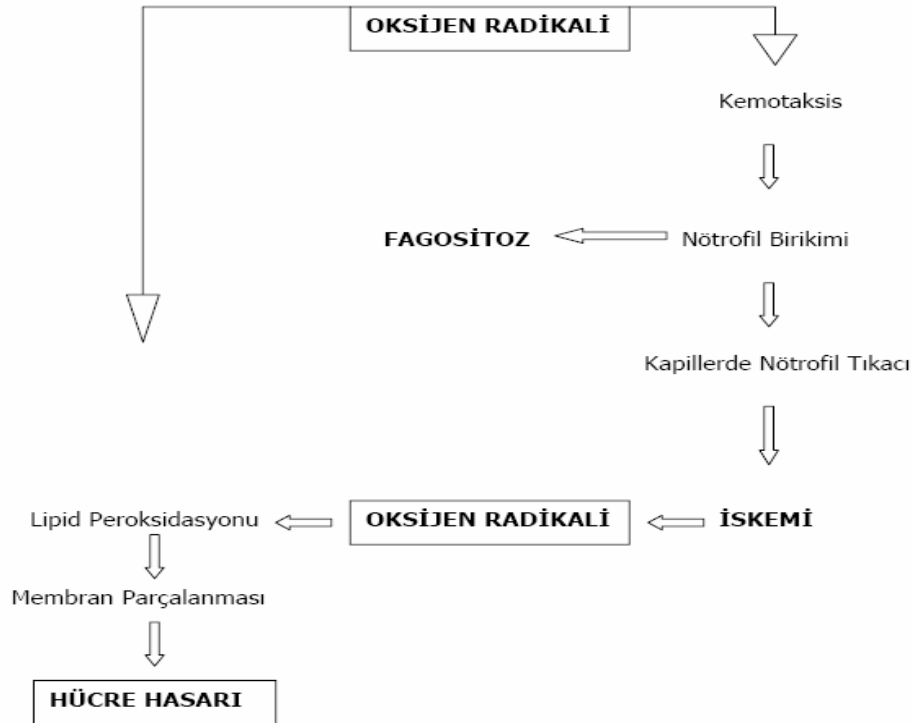
ATP adenoze kadar indirgenir. Adenozin, inozin üzerinden hipoksantine indirgeneceği ekstrasellüler aralığa hızla dağılır. Normal dokularda hipoksantin, ürik aside dönüşür. Hipokside ise hipoksantin daha fazla metabolize edilemez ve birikir. Aynı zamanda iskeminin başladığı ilk dakikada ksantin dehidrogenazın büyük bir kısmı ksantin oksidaza dönüşür. Reperfüzyonun başlaması ile ksantin oksidaz hipoksantini ksantine, ksantini de ürik aside dönüştürür. Bu sırada serbest oksijen radikalleri oluşur (29,31,32) (Şekil 1).



Şekil 1: İskemide pürin metabolizmasının gelişimi ve ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza çevrilmesi, reperfüzyonda oksijen radikalinin oluşumu (28).

ADP: Adenozin Difosfat, SOD: Süperoksit Dismutaz, CAT: Katalaz AMP: Adenozin Monofosfat, İMP: İnozin Monofosfat

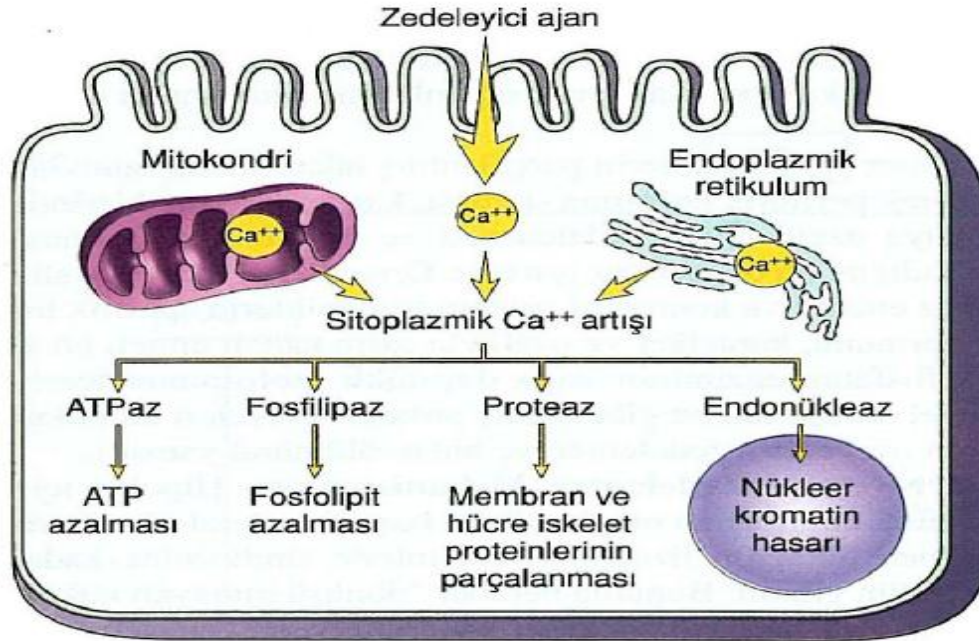
Serbest oksijen radikallerinin ilk oluşumu ve öncüsü genellikle stabil olmayan ve hidrojen peroksit (H_2O_2) ile oksijene dönüşen süperoksit (O_2^-) radikalidir (33). Fagositoz görevi yapan makrofaj, nötrofil ve monositler tarafından enzimatik olarak üretilirler (34). Hidrojen peroksit hücre membranlarından kolaylıkla geçebilen, endotel hücreleri hasarlayabilen güçlü bir sitokindir. Serbest radikal olmadığı halde birçok reaktifin oluşum reaksiyonlarına katıldığı için H_2O_2 de toksik metabolitler içinde yer alır. Toksik özellik gösterebilmesi için hidroksil radikaline dönüşmek zorundadır (Haber-Weiss reaksiyonu) (33). Hidroksil radikali, bilinen serbest radikaller içinde en güçlü olan ve doku hasarında sorumlu ana radikaldir (34). Çok kısa ömürlü ve reaktif olan bu radikal, protein, polisakkarit, nükleik asit ve ansatüre yağ asitleri gibi birçok biyolojik madde ile reaksiyona girer. Bu radikalın en önemli özelliği, hidrojen atomlarını hücre membranındaki poliansatüre yağ asitlerinden ayırmasıdır. Lipid peroksidasyonunu başlatarak hücre membranında çözülme ve buna bağlı hücre ölümü olur (35). 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 (36) (Şekil 2).



Şekil 2: Serbest oksijen radikalinin dokudaki doğrudan ve dolaylı etkileri (28).

İskemi sırasında, hücre membranında bulunan sodyum/potasyum pompasının çalışması için gerekli olan enerji sağlanamaz. Potasyum iyonları hücre dışına çıkarken, sodyum ve klor iyonları da hücre içine girerler. Kontrolsüz olarak, potasyumun hücre dışına, sodyum, kalsiyum (Ca^{+2}) ve klor iyonlarının hücre içine geçişi ile hücrelerde şişme meydana gelir. Anaerobik glikolizle enerji üretilirken laktik asit ve karbondioksit birikir. Karbondioksitin birikimi karbonik asit üretimi ile sonuçlanır ve asidozu artırır. İki dakikalık iskemi sonrasında, özellikle beyin hücrelerinde, ekstrasellüler pH 7.3' ten 6.7' e kadar düşer ve asidoz ortaya çıkar (31,37).

Adenin trifosfat bağımlı çalışan diğer bir pompa da Ca^{+2} pompasıdır (38,39). Hücre içerisindeki Ca^{+2} miktarındaki artış İR hasarında ilk olarak göze çarpan olaylardan biridir ve iskeminin süresi ile yakından ilişkilidir (40) (Şekil 3).



Şekil 3: Hücre zedelenmesinde sitoplazmik kalsiyum artışının kaynakları ve sonuçları (41).

ATPaz: Adenozin Trifosfataz

Hücre içi Ca^{+2} 'un artması hücreye potansiyel zararlı etkilere sahip çok sayıda enzimin aktif hale gelmesine neden olur. İntrasellüler Ca^{+2} artışı ile fosfolipazlar ve proteolitik enzimler aktive olurlar. Fosfolipaz A_2 aktivasyonu ile membran fosfolipidleri bozulmaya başlar; plazma ve mitokondriyal membran biyoenerjetikleri ve geçirgenlikleri de değişir (32). Araşidonik asit fosfolipazların aktivasyonu sonucu oluşur. Araşidonik asit, direkt etkiyle mitokondriyal enzimleri inhibe ederek serbest radikal oluşumunu artırır (37).

2.2.Reperfüzyon

İskemik dokudaki kan dolaşımının ilaçlarla veya mekanik müdahalelerle yeniden sağlanmasına reperfüzyon denir. İskemi sonrası kan akımının tekrar başlaması paradoksal olarak iskeminin oluşturduğu hasarı artırır ve iskemik dokularda iskeminin oluşturduğu hasardan daha fazla hasara yol açabilir (26,42). İskemi ve reperfüzyon periyotlarından oluşan bu zararlı etkilerin tümü İR hasarı olarak adlandırılır (43).

Reperfüzyon hasarının oluşmasında iki mekanizma etkilidir. Bu mekanizmalardan biri hidrolitik bir enzim olan fosfolipaz A₂' nin iskemik dönemde kalsiyum etkisiyle aktive olarak membranlardaki yağ asidlerini parçalaması ve diğer mekanizma ise serbest oksijen radikallerinin açığa çıkmasıdır (44). İskemik periyod süresince dokuda üretilen toksik SOR ve O₂⁻ radikalleri reperfüzyon sırasında endotelial hasar, artmış mikrovasküler permeabilite ve doku ödemeine sebep olmaktadır (26,27). Ayrıca aktive olan adezyon molekülleri ve sitokinler sistemik enflamatuvar yanıtı başlatabilir. İskemi reperfüzyon lokal-uzak etki ve komplikasyonlara neden olabilen bazı mekanizmaları da tetikleyebilir (27).

Post-iskemik dokuda diğer önemli bir SOR kaynağı da nötrofillerdir. Nötrofillerin membranlarında bulunan Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH)'ya bağlı oksidaz enzim sistemleri serbest oksijen radikali oluşumunun en önemli kaynağıdır. Bu enzim normalde inaktiftir. Bakteriler, mitojenler veya sitokinlerce aktive edildiklerinde oksijenin H₂O₂ ve O₂⁻ anyonuna dönüşmesine sebep olurlar. Süperoksit oluşumunda nötrofil kemotaksisinin de önemli rolü vardır. Kalsiyum, fosfolipaz A₂ aktivitesinin sağlanması sonucunda ortaya çıkan lökotrienlerin aktive ettiği polimorfonükleer hücreler üzerinden de O₂⁻ oluşumu gerçekleşmektedir (45).

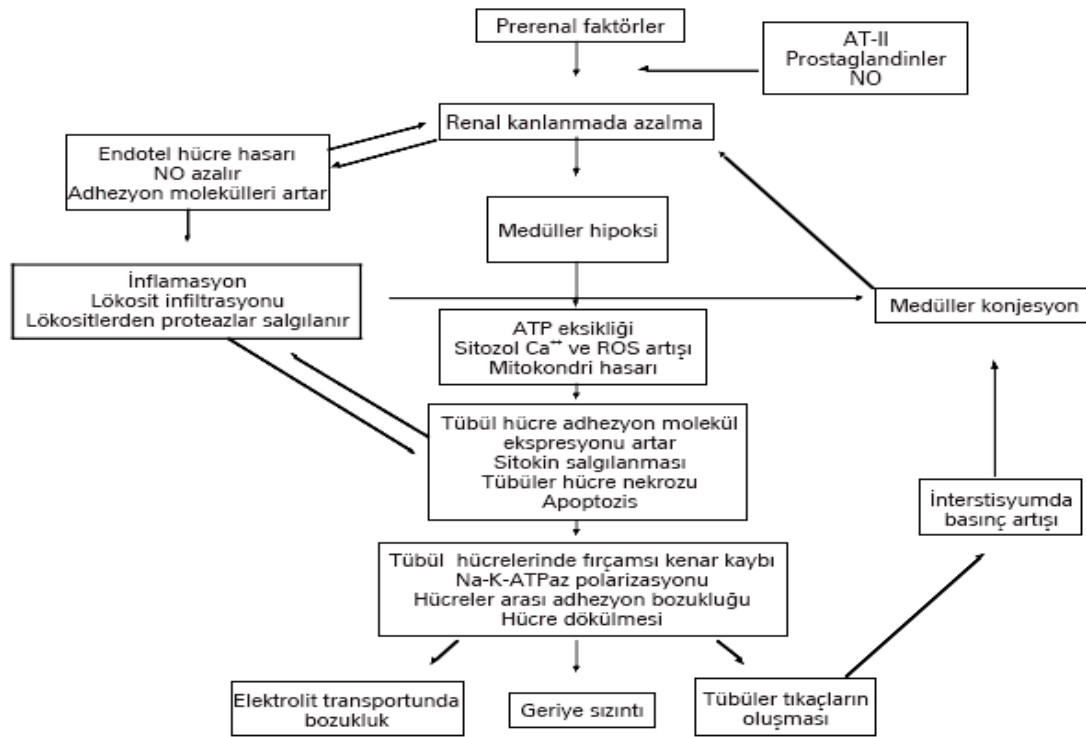
Grisham ve ark. (46) İR etkisinin dokuda nötrofil birikimi ile doğrudan ilişkili olduğunu ve bu akümülyasyonun normal hemostaza göre iskemik dönemde 5 kat ve reperfüzyon döneminde ise 18 kat daha fazla gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Nötrofillerin mikrovasküler endotele adezyonunda en önemli rolü nötrofil membran molekülü olan glikoprotein CD18 oynamaktadır. Monoklonal antikolar CD18 reseptörlerini inhibe ederek nötrofillerin kapiller endotele kemotaksi, agregasyon ve adezyon etkilerini inhibe ederler. Nötrofil bağımlı reperfüzyon hasarında nötrofil adezyonu en önemli basamaktır (47).

Ancak önemli olan bir başka nokta ise ksantin oksidaza bağımlı SOR'nin etkinliğinin saniyeler içinde kaybolması ve hipoksantin substratının tükenmesiyle tamamen durmasıdır. Buna rağmen, nötrofil bağımlı SOR oluşumu sınırsızdır. Nötrofillerin aktivasyonu devam ettiği

ve ortamda oksijen bulunduğu sürece NADPH bağımlı serbest oksijen radikali üretimi devam etmektedir (20).

2.3.Böbrek İskemi Reperfüzyon Hasarı

Böbreklerdeki İR hasarının mekanizması multifaktöriyel ve birbirine bağlı hipoksi, serbest radikal hasarı ve enflamatuvar cevaplarla ilişkilidir (48-51) (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 (53).



Şekil 4: İskemik ve tübüler akut tübüler nekroz (ATN) patogenezinde rol oynayan faktörlerin şematik görünümü (52). NO: Azot Monoksit , AT-II: Anjiyotensin, ROS: Serbest Oksijen Radikalleri

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 kanlanmasını sağlayan vaza rektaya çok az kan gider; bu da renal medüllayı hipoksiye daha duyarlı hale getirir (8,53-55). İskemik hasar tübüler disfonksiyona ve sodyum geri emiliminde azalmaya neden olur; böylece distal kısımlara giden sodyum miktarı artar, glomerüller

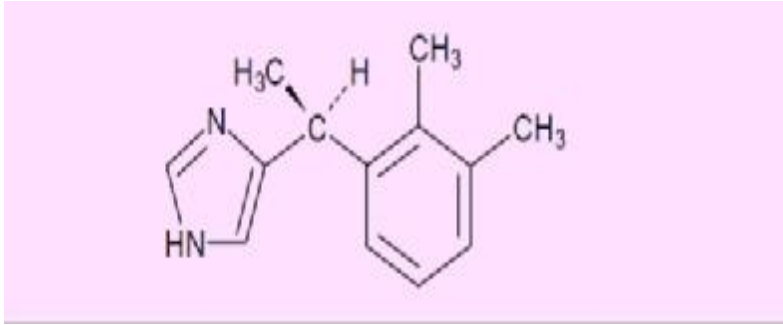
vazokonstriksiyon ve glomerüler filtrasyonda azalmaya sebep olan tübüloglomerüler *feedback* denen refleksin aktifleşmesi sağlanır. Medüller hipoksi ayrıca hücresel enerji depolarının azalmasına, endotel ve düz kas hücrelerindeki aktin hücre iskeletinin bozulmasına neden olur. Bu da hücresel şişme ve çevre dokularda hipoksinin artmasına yol açar (54). 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 (53,54). Tübüler hasar gelişimindeki bir diğer mekanizma da oksidatif strestir. Proksimal tübül hücrelerinin metabolik açıdan yoğun olmaları, ATN sırasında mitokondriyal hasar ve intrasitoplazmik Ca^{+2} artışı nedeniyle, oksidatif moleküller fazla miktarlarda oluşur (53-55).

Preglomerüler vazokonstriksiyon glomerüler filtrasyon hızının 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 (53).

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 sırasında kan akımında % 40-50 oranında azalma devam eder. Kan akımındaki bu azalma tam açıklanamamakla birlikte endojen vazokonstriktörlere karşı antagonistler kullanıldığı zaman kan akımının düzeldiğine dair bulgular rapor edilmiştir. 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 (50, 53,56,57).

2.4.Deksmedetomidin

Deksmedetomidin medetomidinin aktif bir dekstro-sterioizomeri olup selektif bir α_2 adrenoseptör agonistidir (13)(Şekil 5). Deksmedetomidinin α_2 reseptör affinitesi klonidinden 8 kat fazladır (α_2 : α_1 oranı 1600:1) (58). Alfa-2 reseptörler periferik ve santral sinir sistemi, trombositler, karaciğer, pankreas, böbrek ve gözde bulunur. Beyin ve spinal korddaki reseptörlerin stimülasyonu nöronal ateşlemeyi inhibe ederek hipotansiyon, bradikardi, sedasyon ve analjeziye neden olur. Diğer organ yanıtları ise salivasyon ve sekresyonlarda azalma, barsak motilitesinde azalma, renin salınımında inhibisyon, glomerüler filtrasyonda artma, böbreklerden sodyum ve su sekresyonunda artma, intraoküler basınçta azalma ve pankreastan insülin salınımında azalmadır (59). Deksmedetomidin yüksek derecede lipofilik olup, kandan beyine ve periferik dokulara hızla distribüsyona uğrar. Proteine % 94 oranında bağlanır, tam kan ile plazma konsantrasyon oranı 0,66'dır. Karaciğerde metabolize olup, idrar ve feçes yoluyla atılır (60).



Şekil 5: Deksmedetomidinin yapısal formülü (58).

Deksmedetomidin konsantrasyon bağımlı lineer olmayan farmakokinetik özellik sergiler. Farmakokinetiği yaş, ağırlık ve böbrek yetersizliğinden etkilenmemektedir (61,62).

Terminal eliminasyon yarılanma süresi 2-4 saattir. İnfüzyon sonrası yarılanma süresi infüzyon süresine göre değişkenlik gösterir; 10 dakikalık infüzyon sonrası yarılanma süresi 4 dakika iken, 8 saatlik infüzyon sonrası 250 dakikadır (62,63).

Deksmedetomidinin etkileri birçok deneysel serebral iskemi modelinde araştırılmış; ratlarda inkomplet (14) tavşanlarda ise fokal iskemiye (15) karşı koruyucu olduğu rapor edilmiştir. Bu nöroprotektif etkide azalmış sempatik tonus ve N- Metil D-Aspartat reseptör aracılıklı iyon akışının inhibisyonu yanı sıra anti-apoptotik protein konsantrasyonlarındaki artışın sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (16). Villela ve ark. (17) köpeklerde deksmedetomidinin renal sistem ve vazopressinin plazma düzeylerine etkilerini araştırdıkları bir deneysel çalışmada

deksmedetomidinin düşük dozlarının (1-2 µg/kg yükleme dozunu takiben 1-2 µg/kg'lık 1 saatlik intravenöz (i.v.) infüzyon uygulaması) santral vazopressin sekresyonunu azaltarak aköz diürece neden olduklarını ve bu etkinin böbrekleri olası bir iskemiye karşı da koruyabileceğini ileri sürmüşlerdir. Benzer şekilde, Frumento ve ark. (18) da daha öncesinde renal hastalığı bulunmayan torasik cerrahi uygulanmış olgularda idrar akımı yanı sıra glomerüler filtrasyon indekslerini kullanarak postoperatif renal fonksiyonları değerlendirdikleri çalışmalarında renal fonksiyonların preoperatif 24 saat boyunca uygulanan 0.4 µg/kg/sa dozundaki deksmedetomidin infüzyonu ile anlamlı olarak düzeldiğini göstermişlerdir.

Renal İR hasarında deksmedetomidinin etkisi ilk kez Koçoğlu ve ark. (19) tarafından çalışılmıştır. Bir saatlik komplet renal iskemiye takiben reperfüzyonun 5. dakikasında 100 µg/kg dozunda intraperitoneal (i.p.) yolla deksmedetomidin uygulayan bu çalışmacılar 45 dakikalık reperfüzyon sonunda histolojik olarak renal hasarın önlendiğini göstermişlerdir.

Deksmedetomidinin renal hasarı önleyici mekanizması kesinlik kazanmamakla birlikte böbreklerden presinaptik noradrenalin salınımının azalmış olması, strese bağlı olarak artan dolaşımdaki noradrenalin düzeylerinin düşmesi ile sağlanan glomerüler filtrasyon ve renal kan akımındaki düzelmenin etkili olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Deksmetomidin cerrahi sırasında uygulandığında katekolamin plazma düzeylerini düşürmekte (64,65) hemodinamik stabilite sağlamakta (66,67) ve idrar debisini artırmaktadır (68). Böylece endokrin-metabolik yanıtla bağlı oluşan renal değişiklikler de azalmış olmaktadır. Billings ve ark. nın (12) yaptığı çalışmada da, klonidin ve deksmedetomidinin İR yanı sıra böbrek yetersizliğine sıklıkla yol açan diğer bir neden olan radyokontrast enjeksiyonundan sonra gelişen renal kan akımındaki azalmayı düzelttiği ve nefropati gelişimini azalttığı gösterilmiştir.

3.GEREC VE YÖNTEM

Çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEUTF) Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu onayı alındıktan sonra Dokuz Eylül Üniversitesi Multidisipliner Deney Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmada ağırlıkları 230-300 g arasında değişen 26 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 yemi ve suyla beslendi. Cerrahi işlemden 12 saat öncesinden itibaren sadece su içmelerine izin verildi.

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 ketamin (yarı dozda, 25 mg/kg) refleks yanıtla (pensetle ayağa ağrılı uyaran verilmesi-pedal refleks, palpebral ve korneal refleksler) bakılarak tekrarlandı.

3.2.Deney Grupları ve Protokol

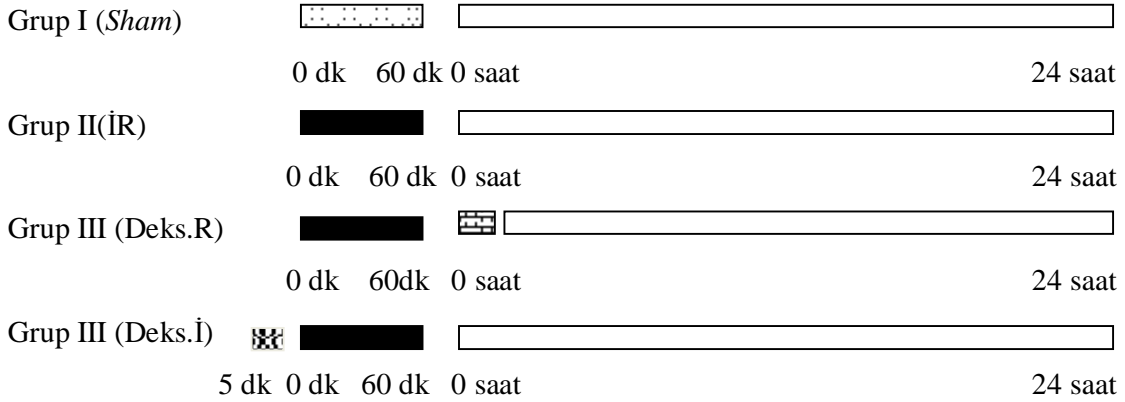
I) Sham Grubu (n=5): Laparotomi sonrası bilateral renal pedikül diseke edilip başka bir girişim yapılmadan ratlar 60 dk. anestezi altında bekletildi. Altmışıncı dakikadan sonra batın anatomik katlaa uygun olarak kapatıldı. Derlenmesi sağlanan ratlar 24 saatlik reperfüzyon için metabolizma kafesine koyuldu, 24. saatin sonunda tekrar anestezi verilip sağ atriyumdan kan örnekleri alınıp, sol nefrektomi uygulandı.

II) İR Grubu (n=7): Laparotomi sonrası bilateral renal pedikül diseke edilip mikrovasküler klipe bilateral renal pedikül oklüzyonu yapıldı ve 60 dk. renal iskemi uygulandı. Altmışıncı dk.da mikrovasküler klip kaldırıldıktan sonra *Sham* Grubu'ndaki işlemler tekrar edildi.

III) Deks.R Grubu (n=7): Laparotomi sonrası bilateral renal pedikül diseke edilip mikrovasküler klipe bilateral renal pedikül oklüzyonu yapıldı ve 60 dk. renal iskemi uygulandı. Altmışıncı dk.da mikrovasküler klip kaldırıldıktan sonra reperfüzyonun beşinci dakikasında 100 µg/kg i.p. deksmedetomidin (*Precedex flk., Abbott*) uygulanıp, *Sham* Grubu'ndaki işlemler tekrar edildi.

IV) Deks.İ Grubu (n=7): Laparotomi sonrası bilateral renal pedikül diseke edilip mikrovasküler klipler konmadan beş dk. önce 100 µg/kg i.p. deksmedetomidin uygulandı, mikrovasküler klipe bilateral renal pedikül oklüzyonu yapıldı, 60 dk. renal iskemi uygulandı.

Altmışıncı dk.'da mikrovasküler klip kaldırıldıktan sonra *Sham* Grubu'ndaki işlemler tekrar edildi.

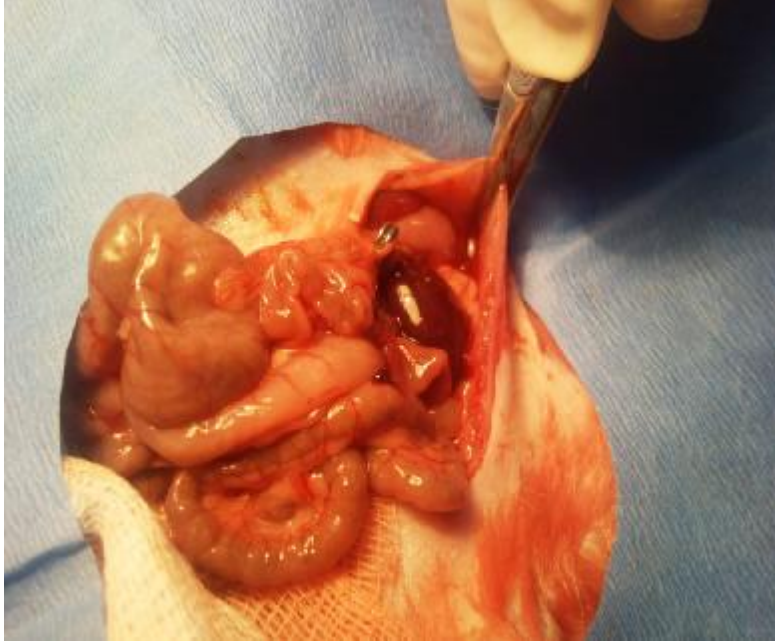


[dotted box];*Sham* için operasyon ve bekleme süresi, [empty box]; Reperfüzyon süresi 24 saat
[solid black box];İskemi süresi 60dk., [cross-hatched box]; Reperfüzyonun 5.dakikasında i.p. 100 µg/kg dekmedetomidin verilmesi, [cross-hatched box]; İskemiden 5 dakika önce i.p. 100 µg/kg dekmedetomidin verilmesi

Şekil 6: Deney protokolünün şematik görünümü.

3.3.Deneysel Çalışma Modeli

Tüm ratlarda anestezi uygulamasından sonra operasyon masasına sabitlenerek supin pozisyonunda, karın cildi traş edilerek % 10 poviyyodin ile temizlendikten sonra abdomen 2 cm'lik üst orta hat insizyonu ile açıldı, bilateral böbrekler açığa çıkarıldı ve renal pediküller diseke edildi. Son üç gupta mikrovasküler klipler (*Aneurysmen-Clip Aesculap-Yaşargil-phynox system fe723 k*) kullanılarak bilateral renal pediküller oklüde edilip 60 dk.'lık renal iskemi (19) uygulandı (Resim 1). Total bilateral böbrek iskemisi; böbrekte solukluk oluşması ve renal arter nabızlarının alınmaması ile doğrulandı (Resim 2). Ratları hipotermiden korumak için çalışma süresince operasyon masası ısıtıcı bir lamba ile ısıtıldı ve rektal vücut sıcaklığı 37-37,5 °C arasında tutuldu. Laparatominin kapatılmasından önce rat ağırlığının % 2,5'i kadar fizyolojik salin solüsyonu i.p. olarak verildi. Bekleme süreleri boyunca batın ıslak steril tamponlar ve cerrahi pens ile kapatıldı. İskemi sonrası mikrovasküler klipler reperfüzyon için çıkartıldı. Abdominal bölgedeki insizyon hattı 3/0 ipek sütür ile kapatıldı.



Resim 1: Renal pediküle mikrovasküler klip yerleştirilmesi.



Resim 2: Mikrovasküler klip sonrası böbrekte solukluk oluşması.

Operasyon sonrası derlenme döneminde ratlar kafeslerinde gözlem altında tutuldu. Anestezi etkisi geçtikten sonra ratlar metabolizma kafeslerine tek tek konularak yem ve su ihtiyaçları karşılanmaya devam edildi (Resim 3-4). Ayrıca bu süre zarfında içtikleri su ve

yedikleri yem miktarları da takip edildi. Yirmidört saat sonra, *Sham* Grubu dahil tüm hayvanlara anestezi uygulanarak laparotomi yapıp, histopatolojik inceleme için sol nefrektomi uygulanarak biyokimyasal testler için kardiyak ponksiyon ile tüm kanları alındı. Ratlarda 120 mg/kg intravenöz fenobarbital (Ekipental 1gr flk., Tüm Ekip İlaç A.Ş.) kullanılarak sakrifikasyon işlemi gerçekleştirildi.



Resim 3: Metabolizma kafesindeki rat.



Resim 4: Metabolizma kafeslerinde tek tek takip edilen ratlar.

3.4.Biyokimyasal Tetkikler İçin İdrar ve Kan rneklerinin Alınması

Anestezi altındaki ratlardan, abdominal insizyon öncesi biyokimyasal tetkikler için 24 *gauge* branül (Bıçakçılar İstanbul, Türkiye) ile lateral kuyruk veninden 1 ml kan örnekleri alındı. Yirmi dört saat boyunca metabolizma kafesinde barındırılan sıçanların idrarları toplandı ve çıkan idrar miktarları kayıt edildi. Yirmidört saatlik reperfüzyon dönemi sonrası anestezi altındaki ratların abdominal bölgelerindeki dikişler alındıktan sonra batınları tekrar açıldı; sağ atriyumdan biyokimyasal örnekler için enjektör ile tüm kanları alındı.

Ratların deney başında kuyruk veninden alınan ve deney sonunda intrakardiyak yöntemle elde edilen kan örnekleri düz tüplere konuldu. Tüpler 1200 g hızında 10 dakika santrifüj edilerek serumları *ependorf* tüplerine konarak ayrıldı. Örnekler alışılncaya kadar -70 C’de saklandı. İdrar rnekleri ise metabolik kafeslerde 24 saat boyunca toplanarak, 1000 g 10 dk santrifügasyon sonrası *ependorf* tüplerine konularak -70 C’de saklandı.

3.5.Böbrek Hücre Histomorfolojisinin Değerlendirilmesi

Histomorfolojik inceleme için sıçanlardan elde edilen böbrek dokuları, ışık mikroskopik inceleme için % 10’luk tamponlu formaldehid içinde fikse edildikten sonra parafine gömüldü. Daha sonra hazırlanan parafin bloklardan 4-5 m kalınlığında kesitler (Leica RM2225 Köln, Almanya) alındı. Elde edilen kesitler hematoksilen-eozin boyası ile boyandı. Boyama işleminde sonra kesitler ışık mikroskopik olarak incelendi (Olympus BX-50 Tokyo, Japonya) ve kesitlerden elde edilen görüntüler yüksek rezolüsyonlu bir kamera (Olympus DP-70, Japonya) içeren bilgisayara aktarılarak, dijital olarak fotoğrafları çekildi. Çekilen dijital fotoğraflar dijital görüntü analiz programı (UTSCSA; *Image tool version 3,0*) ile değerlendirildi.

Deney gruplarına ait böbrek dokusu kesitlerinde ışık mikroskopik olarak; mononükleer hücre enfiltrasyonu, eritrosit ekstravazasyonu, kapiller dilatasyon, renal korpüskül morfolojisi, proksimal tblularda vakuolizasyon, apoptoz, fırçamsı kenar kaybı, tübüler dilatasyon, kast formasyonu değerlendirildi. Kesitlerden elde edilen görüntüler değerlendirilirken semikantitatif olarak tübülointertisyel hasar için (tübüler fırçamsı kenar kaybı, tübüler dilatasyon, kast formasyonu, vakuolizasyon, mononükleer hücre enfiltrasyonu, eritrosit ekstravazasyonu, renal korpüskül morfolojisi gibi parametreler için) skorlama yapıldı. Skorlama 0 = hiç yok, 1 = % 0-10, 2 = % 11-25, 3 = % 26-45, 4 = % 46-75, 5 = % 76-100 olarak uygulandı (69).

3.6.Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü

Serumda ve idrarda Kr seviyeleri, serumda KÜN Abbott Architect c16000 otoanalizöründe iyonlar iyon selektif elektrot yöntemi, diğerleri ise spektrofotometrik yöntemle dayanan orijinal ticari kitler kullanılarak kantitatif olarak saptandı.

Fraksiyonel sodyum atılımı $FA_{Na} = UNaV / (PNa \times \text{kreatin klirensi}) \times 100$ ($UNaV$: idrar sodyumu, PNa : plazma sodyumu) (70); Kr klirensi (KKr) ($\text{İdrar Kr} \times \text{İdrar hacmi} / (\text{Plazma Kr} \times 1440)$) formülü kullanılarak hesaplandı (71).

3.7.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 uygulandı. Grupların ikili karşılaştırmaları için Mann-Whitney U testi kullanılarak tüm veriler ortalama \pm standart sapma ($\text{ort} \pm \text{ss}$) olarak gösterildi. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi.

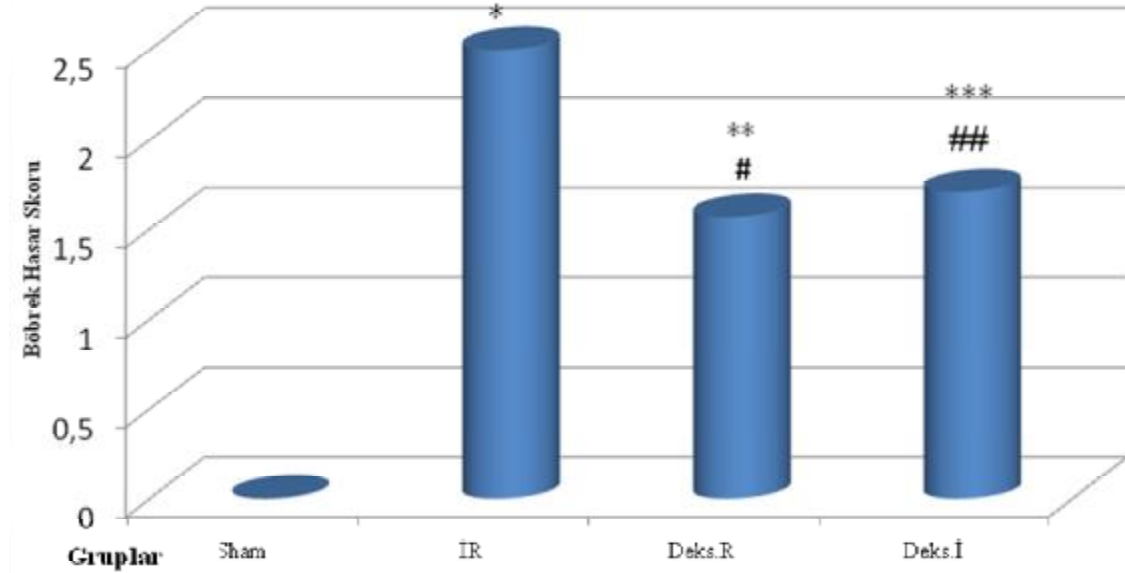
4. BULGULAR

Dokuz Eylül Üniversitesi Multidisipliner Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda gerçekleştirilen çalışmaya toplam 26 rat dahil edildi ve İR grubundan 1 rat iskemi döneminde eksitus olması nedeniyle çalışmadan çıkarıldı, 25 denek çalışmayı tamamladı.

4.1.Böbrek Histomorfolojik Hasar Skoru

Proksimal Tübüluslarda Yapısal Değişiklikler

Sham ($0,00 \pm 0,00$), İR ($2,50 \pm 0,54$), Dek.s.R ($1,57 \pm 0,53$) ve Dek.s.İ ($1,71 \pm 0,48$) grupları incelendiğinde *Sham* Grubu histomorfolojik hasar skorları İR, Dek.s.İ ve Dek.s.R gruplarından anlamlı düşük bulundu (sırasıyla, $p=0,003$, $p=0,002$, $p=0,002$). İskemi reperfüzyon, Dek.s.R ve Dek.s.İ gruplarının skorları arasında anlamlı fark bulundu (sırasıyla, $p=0,018$, $p=0,026$). İskemi reperfüzyon grubu ile Dek.s.R ve Dek.s.İ gruplarının skorları karşılaştırıldığında İR grubunda anlamlı yükseklik saptanırken ($p<0,05$), Dek.s.R grubu ile Dek.s.İ grubunun skorları arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=0,59$) (Grafik 1).



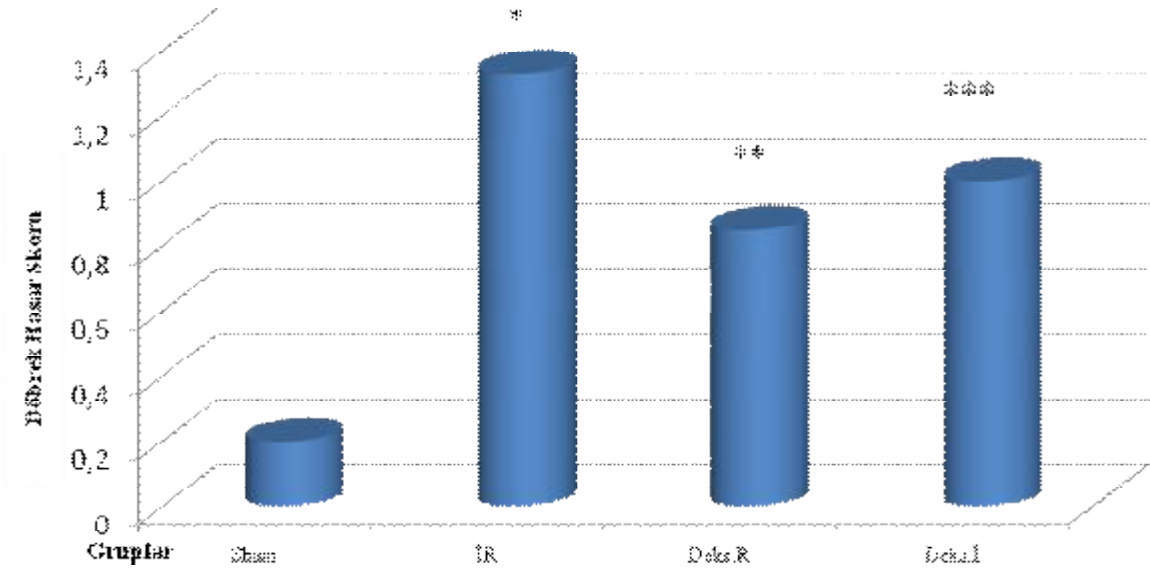
Grafik 1: Böbrek histomorfolojik incelemesinde proksimal tübüluslardaki hasar skorları.

Veriler ort \pm ss olarak sunuldu.

- * İR Grubu ile *Sham* Grubu karşılaştırıldığında ($p<0,01$)
- ** Dek.s.R Grubu ile *Sham* Grubu karşılaştırıldığında ($p<0,01$)
- *** Dek.s.İ Grubu ile *Sham* Grubu karşılaştırıldığında ($p<0,01$)
- # Dek.s.R Grubu ile İR Grubu karşılaştırıldığında ($p<0,05$)
- ## Dek.s.İ Grubu ile İR Grubu karşılaştırıldığında ($p<0,05$)

Mononükleer Hücre İnfiltrasyonu

Sham ($0,20 \pm 0,44$), İR ($1,33 \pm 0,51$), Deks.R ($0,85 \pm 0,37$) ve Deks.İ ($1,00 \pm 0,57$) grupları incelendiğinde *Sham* Grubu histomorfolojik hasar skorları İR, Deks.R ve Deks.İ gruplarından anlamlı düşük saptandı (sırasıyla, $p=0,01$, $p=0,029$, $p=0,03$). İskemi reperfüzyon, Deks.R ve Deks.İ gruplarının skorları arasında anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla, $p=0,08$, $p=0,29$). Reperfüzyonun 5. dakikasında deksmedetomidin uygulanan grup ile Deks.İ grubunun skorları arasında anlamlı fark bulunmadı ($p=0,59$) (Grafik 2).

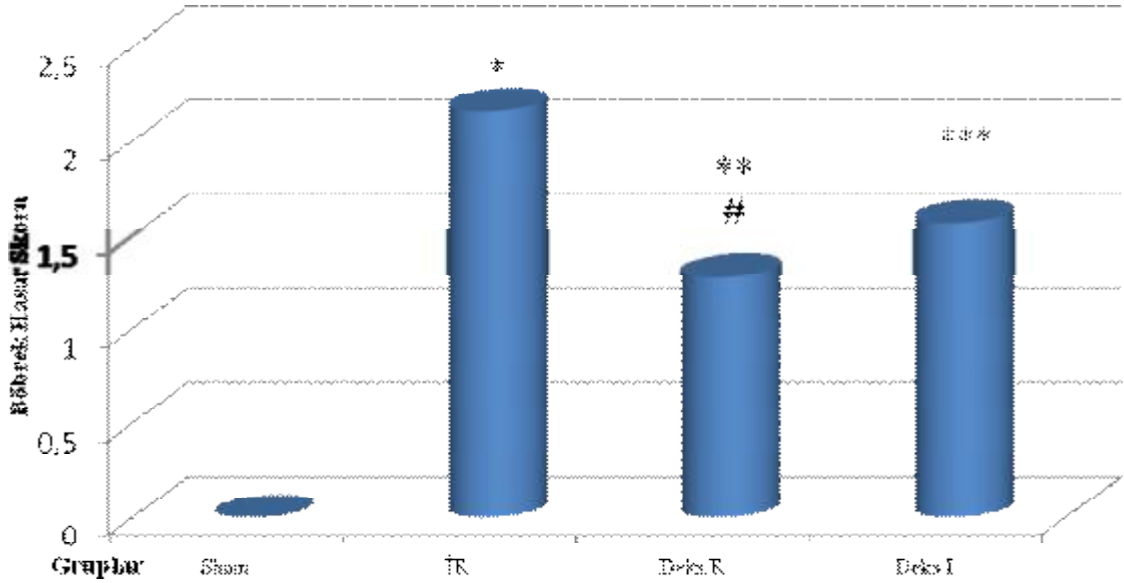


Grafik 2: Böbrek histomorfolojik incelemesinde mononükleer lenfosit infiltrasyonu skorları Veriler ort \pm ss olarak sunuldu.

- * İR Grubu ile *Sham* Grubu karşılaştırıldığında ($p<0,05$)
- ** Deks.R Grubu ile *Sham* Grubu karşılaştırıldığında ($p<0,05$)
- *** Deks.İ Grubu ile *Sham* Grubu karşılaştırıldığında ($p<0,05$)

Eritrosit Ekstravazasyonu

Sham ($0,00 \pm 0,00$), İR ($2,16 \pm 0,75$), Dek.s.R ($1,28 \pm 0,48$) ve Dek.s.İ ($1,57 \pm 0,53$) grupları incelendiğinde *Sham* Grubu histomorfolojik hasar skorları İR, Dek.s.R ve Dek.s.İ gruplarından anlamlı düşük saptandı (sırasıyla, $p=0,004$, $p=0,002$, $p=0,002$). İskemi reperfüzyon ve Dek.s.R gruplarının skorları arasında fark anlamlı ($p=0,03$) iken İR ve Dek.s.İ gruplarının skorları arasında fark anlamlı bulunmadı ($p=0,13$). İskemi reperfüzyon grubu ile Dek.s.R grubunun skorları karşılaştırıldığında İR grubunda anlamlı yükseklik ($p<0,05$) saptanırken Dek.s.R grubu ile Dek.s.İ grubunun skorları arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=0,29$) (Grafik 3).



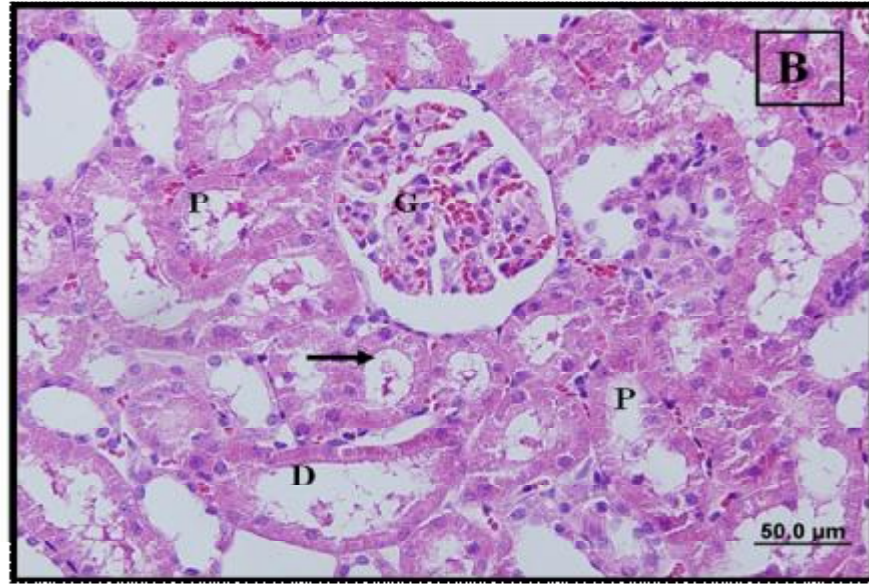
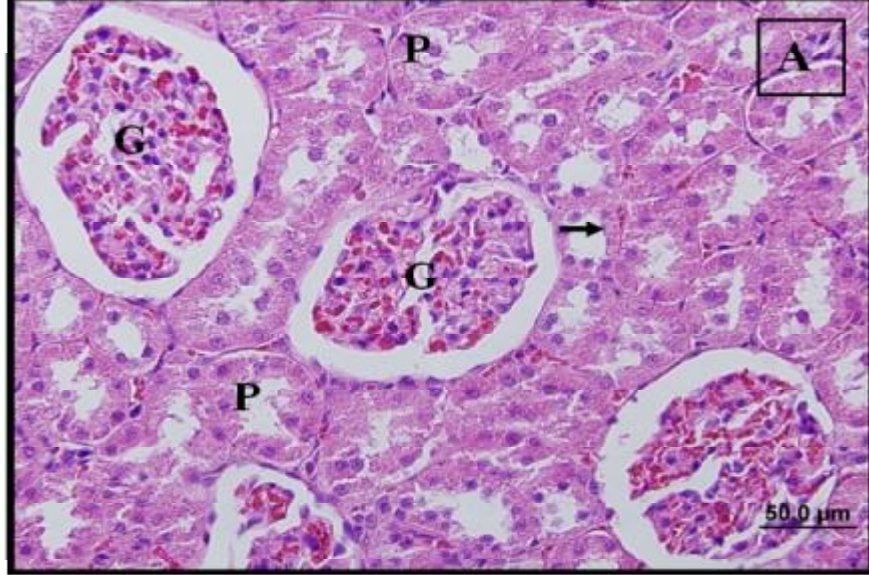
Grafik 3: Böbrek histomorfolojik incelemesinde eritrosit ekstravazasyonu skorları.

Veriler Ort ± ss olarak sunuldu.

- * İR Grubu ile *Sham* Grubu karşılaştırıldığında ($p<0,01$)
- ** Dek.s.R Grubu ile *Sham* Grubu karşılaştırıldığında ($p<0,01$)
- *** Dek.s.İ Grubu ile *Sham* Grubu karşılaştırıldığında ($p<0,01$)
- # İR Grubu ile Dek.s.R Grubu karşılaştırıldığında ($p<0,03$)

Sham grubuna ait böbrek kesitleri incelendiğinde, böbrek dokusuna ait korteks ve medulla ayrımının rahatlıkla yapılabildiği, korteksin dışında fibröz kapsülün sağlam olarak yer aldığı gözlemlendi.

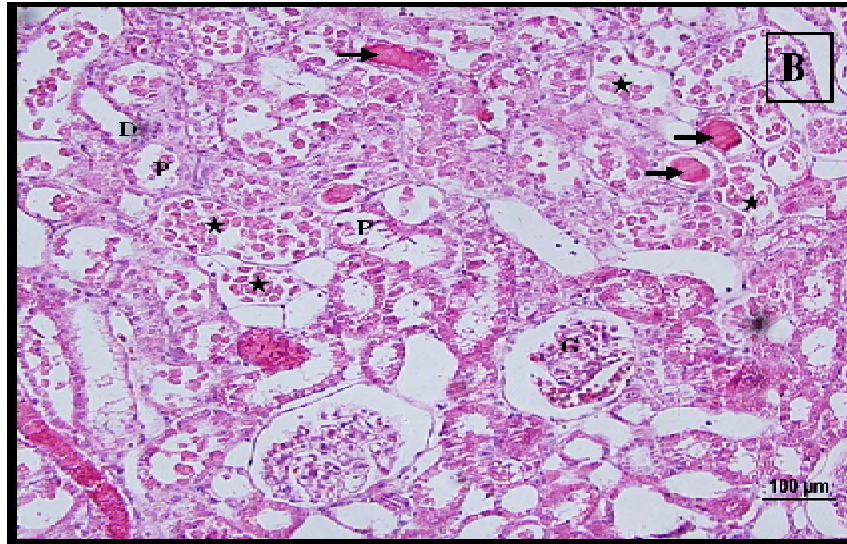
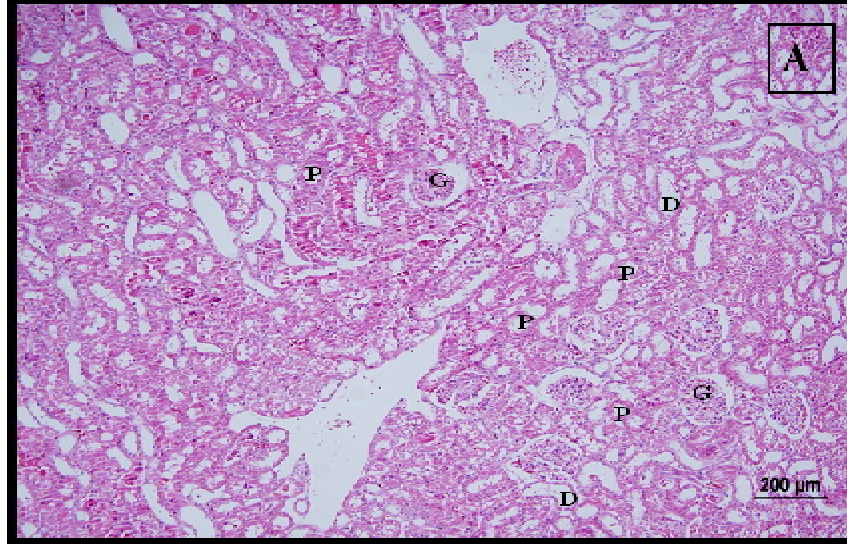
Korteksteki renal korpüsküllerin normal yapıda olduğu, *bowman* kapsülünün pariyetal ve visseral yaprağının normal histolojik yapıda olduğu belirlendi. Proksimal tübül ve distal tübül, henle kulbu, kollektör tübüllerde yapıların normal olduğu gözlemlendi. Epitel hücreleri karakteristik yapı ve özelliklerini korumaktaydı. *Sham* Grubunda normal morfolojik özellikler gözlemlendi. *Sham* Grubuna ait kesitlerde herhangi bir hücre infiltrasyonu ve fırçamsı kenar kaybı gözlemlenmedi (Resim 5A, Resim 5B).



Resim 5A-5B: *Sham* Grubu'na ait kesitler.

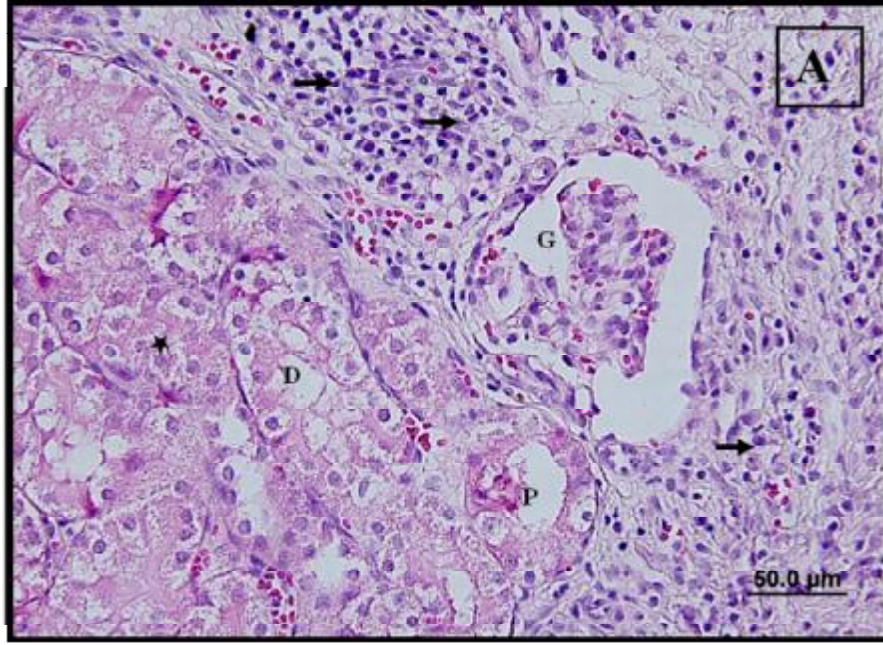
G:glomerül, P:proksimal tübül, D: distal tübül, (→): fırçamsı kenar.

İskemi reperfüzyon grubunda ise kortikal bölgede daha fazla olmak üzere peritübüler alanda mononükleer hücre enfltrasyonu, proksimal tübül hücrelerinde fırçamsı kenar kaybı, tübüler atrofi, tübüler dilatasyon ve vakuolizasyon gözlendi. Bazı tübüllerde proteinöz madde birikimi ile birlikte kast formasyonu ve tübül lümeninde hücre debrisleri izlendi. Kortekste bazı bölgelerde, damarlarda vazodilatasyon ve eritrosit ekstravazasyonu dikkati çekti (Resim 6A, Resim 6B, Resim 7, Resim 8).



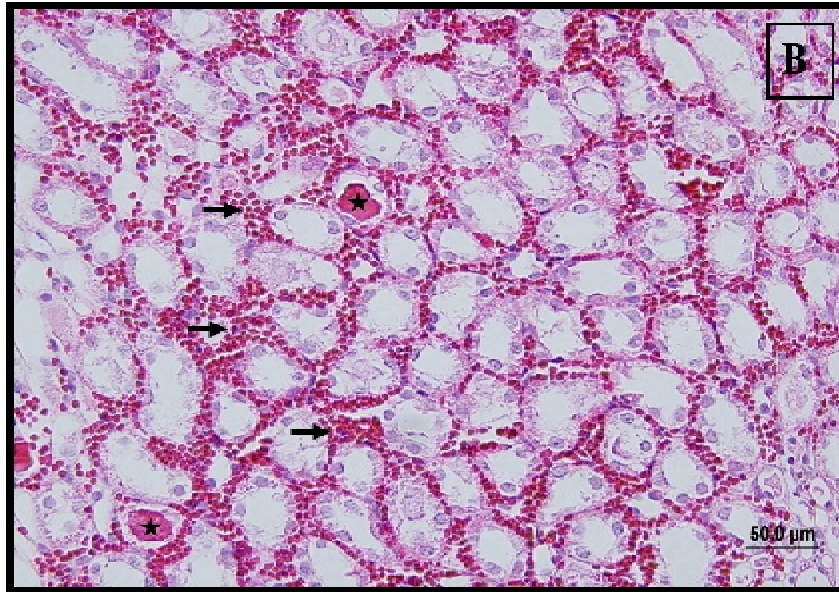
Resim 6A-6B: İskemi Reperfüzyon Grubu'na ait kesitler.

G:glomerül, P:proksimal tubul, D: distal tubul, (→): tübüllerde proteinöz madde birikimi, (★) lümeneye dökülmüş proksimal tübül epitel hücreleri.



Resim 7: İskemi Reperfüzyon Grubu'na ait kesitler.

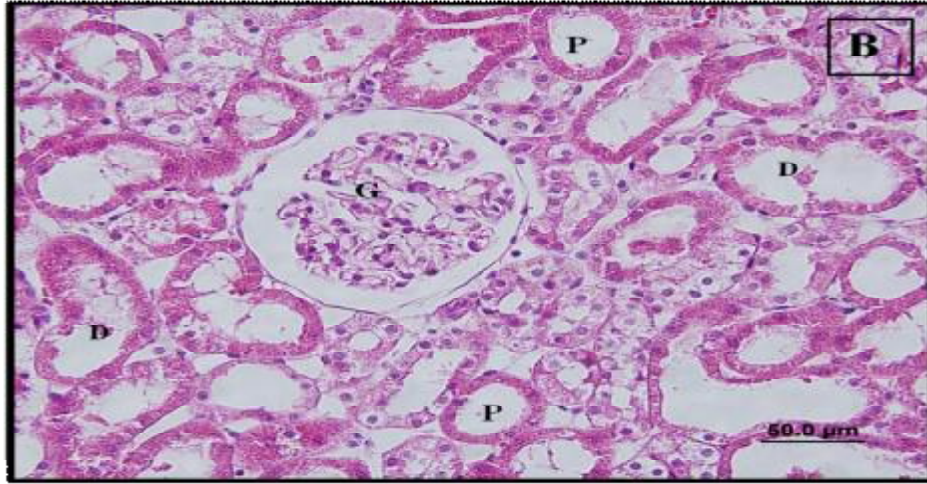
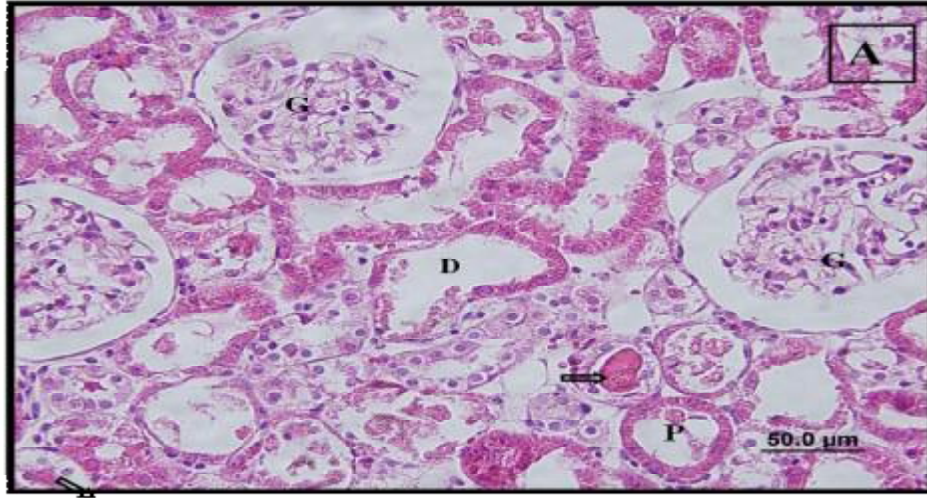
G: glomerül, P: proksimal tübül, D: distal tübül, (→): mononükleer hücre infiltrasyonu, (★) lümene dökülmüş proksimal tübül epitel hücreleri.



Resim 8: İskemi Reperfüzyon Grubu'na ait kesitler.

G: glomerül, P: proksimal tübül, D: distal tübül, (→): eritrosit ekstravazasyonu, (★) tübüllerde proteinöz madde birikimi.

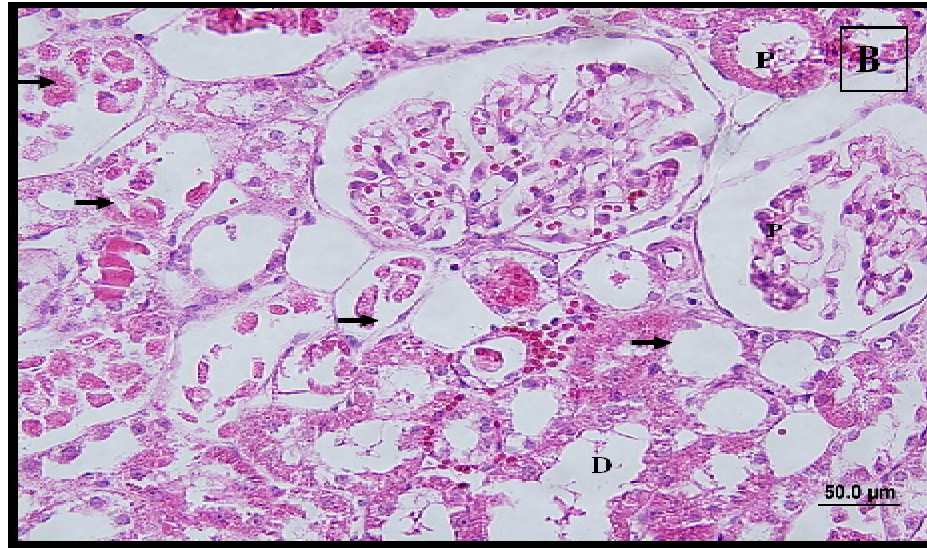
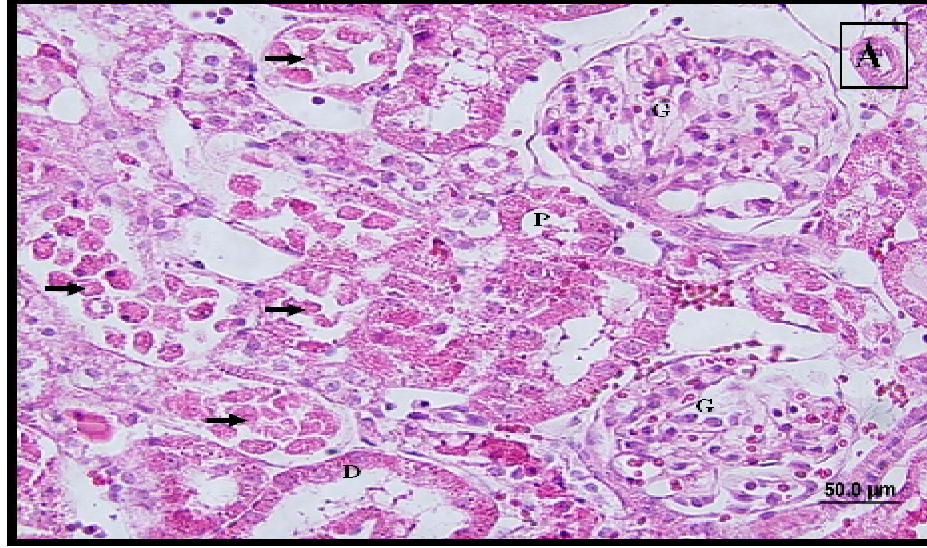
Deks.R grubunda ise, İR grubuna göre peritübüler alanda mononükleer hücre infiltrasyonunda ve eritrosit ekstravazasyonunda azalma gözlemlendi. İR grubunda tübüllerde gözlenen tübül atrofi, tübül dilatasyon ve vakuolizasyon ile tübüllerde proteinöz madde birikimi ile birlikte tübül lümenine hücre debrisleri ve fırçamsı kenar kaybı Deks.R grubunda daha az oranda gözlemlendi. Deks.İ grubuyla karşılaştırıldığında eritrosit ekstravazasyonu, mononükleer hücre infiltrasyonu ve tübül değişiklikleri de azalma gösterdiği saptandı (Resim 9A, Resim 9B).



Resim 9A-9B: Reperfüzyonun 5. dakikasında deksmedetomidin verilen gruba ait kesitler

G:glomerül, P:proksimal tübül, D: distal tübül, (→): tübüllerde proteinöz madde birikiminin diğer gruplara göre azalmış olduğu görünüm.

Deks.İ grubunda kortikal bölgede özellikle peritübüler alanda mononükleer hücre infiltrasyonunda, tübül hücrelerinde gözlenen dejenerasyonlarda ve kortekste eritrosit ekstravazasyonunda İR grubuna göre azalma gözlemlendi. Mikroskopik alanlarda, tübüluslarda gözlenen fırçamsı kenar kaybı, tübüler atrofi, tübüler dilatasyon, vakuolizasyon, tübüllerde proteinöz madde birikimi ile birlikte tübül lümenine hücre debrisleri Deks.İ grubunda İR grubuna göre daha az oranda gözlemlendi (Resim 10A, Resim 10B).



Resim 10A-10B: İskemiden 5 dk. önce deksmedetomidin verilen Gruba ait kesitler.

G:glomerül, P:proksimal tübül, D: distal tübül, (→): lümenine dökülmüş proksimal tübül epitel hücreleri.

Deks.R grubunun Deks.İ grubuyla karşılaştırılmasında, histomorfolojik olarak Deks.R grubundaki proksimal tübül hücrelerinde gözlenen fırçamsı kenar kaybı, tübüler atrofi, tübüler dilatasyon, vakuolizasyon, bazı tübüllerde proteinöz madde birikimi ile birlikte kast formasyonu ve tübül lümeninde hücre debrislerinin daha az oranda olduğu gözlenmiştir.Yapılan semikantitatif ışık mikroskopi skorlamasının bu gruplar için istatistiksel olarak analizinde ise eritrosit ekstravazasyonunda, proksimal tübül ve mononükleer hücre infiltrasyonu açısından anlamlılık gözlenmemiştir. Ancak genel olarak değerlendirildiğinde İR hasarına karşı Deks.R grubunda böbrek dokusunun daha iyi korunduğu gözlenmiştir.

4.2.Biyokimyasal Bulgular

İdrar Hacmi, Kreatin Klirensi

Sham ile İR gurubu karşılaştırıldığında; İR grubunda idrar hacmi ve KKr'nin anlamlı olarak az olduğu saptandı (sırasıyla, $p=0,006$, $p=0,025$).

İskemi reperfüzyon grubu ile Deks.R grubu karşılaştırıldığında; idrar hacminin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde Deks.R grubunda fazla olduğu ($p=0,003$) saptanırken KKr açısından iki grup arasında fark olmadığı belirlendi ($p=0,206$).

İskemi reperfüzyon grubu ile Deks.İ gurubu karşılaştırıldığında; iki grup arasında idrar hacmi ve KKr açısından fark olmadığı belirlendi (sırasıyla, $p=0,116$, $p=0,97$).

Deks.R ile Deks.İ gurubu karşılaştırıldığında; idrar hacmi Deks.R grubunda anlamlı olarak yüksek ($p=0,030$) iken KKr açısından iki grup arasında fark olmadığı saptandı ($p=0,407$).

Kan Üre Nitrojeni, Kan Kreatinin

Sham ile İR gurubu karşılaştırıldığında; KÜN ve kan Kr düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde İR grubunda yüksek olduğu belirlendi (sırasıyla, $p=0,006$, $p=0,006$).

İskemi reperfüzyon grubu ile Deks.R gurubu karşılaştırıldığında; KÜN değerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde Deks.R grubunda düşük ($p=0,015$) olduğu, kan Kr değerleri açısından ise iki grup arasında anlamlı fark olmadığı saptandı ($p=0,568$).

İskemi reperfüzyon grubu ile Deks.İ grubu karşılaştırıldığında; KÜN değerinin Deks.İ grubunda anlamlı olarak düşük ($p=0,043$) olduğu, kan Kr değerlerinin ise iki grup arasında farklı olmadığı belirlendi ($p=0,391$).

Deks.R ile Deks.İ gurubu karşılaştırıldığında; kan KÜN ve Kr değerleri açısından iki grup arasında anlamlı bir fark olmadığı saptandı (sırasıyla, $p=0,749$, $p=0,565$).

Fraksiyone Sodyum Atılımı

Sham ile İR grubu karşılaştırıldığında; FA_{Na} atılımının istatistiksel anlamlı olarak İR grubunda yüksek olduğu saptandı ($p=0,025$).

İskemi reperfüzyon grubu ile Deks.R ve Deks.İ grubu karşılaştırıldığında; FA_{Na} atılımı açısından anlamlı bir fark saptanmadı (sırasıyla, $p=0,210$, $p=0,053$).

Deks.R ile Deks.İ grubu karşılaştırıldığında; FA_{Na} atılımı açısından iki grup arasında anlamlı fark olmadığı belirlendi ($p=0,223$).

Gruplara ait biyokimyasal veriler Tablo 1’de sunuldu.

Gruplar	KÜN	K _r	K _{Kr}	İH	FA_{Na}
<i>Sham</i>	21,80±2,17	0,52±0,01	0,81±0,11	3,73±0,56	105,32±18,56
İR	129,33±11,32 ^a	2,98±0,84 ^a	0,01±0,02 ^b	0,95±1,25 ^d	19542,82±27244,54 ^b
<i>Sham</i>	21,80±2,17	0,52±0,01	0,81±0,11	3,73±0,56	105,32±18,56
Deks.İ	92,00±43,23 ^d	2,35±1,23	0,17±0,19	2,95±2,44	943,28±1378,02

Tablo 1: Grupların reperfüzyon sonrası 24. Saatteki kan üre nitrojeni (KÜN), kan kreatinin (KKr) düzeyi, kreatin klirensi (K_{Kr}), idrar hacmi (İH) ve fraksiyonel Na atılımına (FA_{Na}) ait biyokimyasal veriler.

Veriler ort ± ss olarak sunuldu.

^a $p<0,01$, İR grubu *Sham* Grubu ile karşılaştırıldığında

^b $p<0,05$, İR grubu *Sham* Grubu ile karşılaştırıldığında

^c $p<0,05$, Deks.R grubu ile İR Grubu karşılaştırıldığında

^d $p<0,05$, Deks.İ grubu ile İR Grubu karşılaştırıldığında

^e $p<0,05$, Deks.R grubu ile Deks.İ Grubu karşılaştırıldığında

5.TARTISMA

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. Bu deneysel çalışmada rat renal İR (60 dk.) modeli kullanılmış ve 24. saatteki renal fonksiyon ve morfolojik değişimler incelenmiştir. Bu İR modelinde iskemi öncesi ve reperfüzyon sonrası iki ayrı dönemde yapılan deksmedetomidin uygulamasının renal morfoloji ve fonksiyonlara etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Bu çalışma göstermiştir ki renal İR hasarı İR'den 24 saat sonrasında anlamlı olarak İH ve K_{Kr} azaltırken FA_{Na} atılımı, KÜN ve Kr düzeylerinde artışa neden olmaktadır. Böbrekteki tübüler hasarın varlığı *sham* grubu ile kıyaslandığında saptanan anlamlı düzeyde artmış histopatolojik hasar skorları ile desteklenmektedir. Bu histolojik ve biyokimyasal bulgular İR hasarının böbrekte hem glomerüller hem de tübüler fonksiyon bozukluğuna neden olduğunu göstermektedir ve bu konuda daha önce yapılmış çalışmalar ile uyumludur (19, 70, 72).

Yapılan çalışmalarda böbrek İR hasar modeli oluşturmak için farklı iskemi ve reperfüzyon süreleri uygulanmıştır (11, 19, 70, 72). Koçoğlu ve ark. (19) yaptıkları çalışmada, sağ nefrektomi uygulanmış ratlarda sol böbreğe 60 dk iskemi ve sonrasında 45 dk reperfüzyon uygulayarak İR modeli oluşturmuşlardır. Williams ve ark. (11) ise, bilateral renal arter ve veni klemplayerek oluşturdukları iskemi modelinde iskemi süresini 45 dk. tutup reperfüzyondan sonraki 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 9, 24. saatlerde ve 1 hafta sonra İR hasarının kan KÜN ve Kr düzeyleri ile böbrek histolojisine etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmacılar renal hasarın 45 dk.lık iskemiye takiben en erken 4. saatte başladığını; hasarın 24. saatte pik yaptığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde Yamamoto K ve ark. (73) ile William JA ve ark.(74) da ATN ve medüller perfüzyon defektinin reperfüzyonun 22 ila 48. saati arasında bir sürede daha belirgin hale geldiğini göstermişlerdir.

Çalışmamızda İR modelinde deksmedetomidinin etkilerini histopatolojik olarak ilk kez araştıran Koçoğlu ve ark. nın (19) çalışması model alınarak iskemi süresi 60 dk., reperfüzyon süresi ise hasarın pik etki yaptığı 24 saat olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada renal pediküle iskemi uygulamak için konan klip bir saatin sonunda kaldırılmış, akımın döndüğü fizik muayene (renal pediküllerde arter nabzının alınması ve solukluğun geçmesi) ile doğrulanmıştır.

İskemiye bağlı akut böbrek yetmezliği; renal vazokonstriksiyon, tübüler hasar, tübüler hücre nekrozu, glomerüller filtrasyon yetmezliği ve glomerüller hasardan oluşan kompleks bir sendromdur (75, 76). Bu hasara katkıda bulunan çeşitli faktörler üzerine etkili olabileceği

düşünülen ilaçlar, proflakside ve tedavide kullanılmıştır. İskemi reperfüzyon hasarına bağlı gelişen ABY'nin olası mekanizmalarından biri olarak böbrekte noradrenalinin presinaptik salınımı ile oluşan sempatik aktivasyon ve dolaşımda stresle indüklenen noradrenalin düzeyinin artışı, buna bağlı olarak da renal kan akımı ve glomerüler filtrasyonun azalması ileri sürülmüştür. Fujii ve ark. (70) yaptıkları çalışmada, preiskemik ve postiskemik olmak üzere iki ayrı dönemde İR hasarı üzerine L-karnozin'in etkilerini araştırmışlardır. İskemik akut renal yetersizlik kontrateral nefrektomiden 2 hafta sonra sol renal arter ve venin 45 dk oklüzyonu sonrası böbreğin reperfüzyonu ile oluşturulmuştur. Renal perfüzyon ABY gelişmiş ratlarda reperfüzyon sonrası 1. günde belirgin azalmış, L-karnozin doza bağlı (1-10 mcg/kg iv) preiskemik tedavi ile İR'nun oluşturduğu renal disfonksiyonu azaltmıştır. Bu çalışmada, böbreğin histopatolojik bakışında tedavi edilmemiş ratlarda ciddi böbrek hasarı olduğu gösterilirken, L-karnozinle ön tedavi yapılmış ratlarda bu hasarın belirgin olarak önlendiği bildirilmiştir. Çalışmacılar, İR hasarında etkili olduğu öne sürülen noradrenalin düzeyinin artışının preiskemik dönemde uygulanan 10 µg/kg dozundaki L-karnozinle azaldığını göstermişlerdir. Aynı zamanda, reperfüzyonun 5. dk.sında yüksek doz L-karnozin verilmesinin de preiskemik tedavi almış ratlarla benzer sonuçlara sahip olduklarını rapor etmişlerdir. Bu sonuçlar İR hasarı ile tetiklenen artmış renal sempatik aktivitenin baskılanmasına dair bir gösterge olarak kabul edilmiştir.

Deksmedetomidin selektif ve potent α_2 -adrenoseptör agonistidir. Deksmedetomidinin tavşanlarda fokal iskemi, ratlarda kardiyak iskemi reperfüzyon hasarı ve inkomplet ön beyin iskemisine karşı efektif koruyucu etkinliği olduğu bildirilmiştir (14, 77, 78). Alfa₂-adrenerjik agonistlerin beyin koruyucu etkisinin mekanizması kesin olarak belli değildir. Etkinin katekolaminerjik nörotransmisyon ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Deksmedetomidin, iskemi sebebiyle gelişen noradrenalin aşırı salınımını presinaptik alfa adrenoseptörleri aktive ederek azaltmaktadır. Bu sayede serbest radikal oluşumuna sebep olan aşırı noradrenalin metabolizması engellenmektedir. Katekolaminlerin oksidatif deaminasyonunun engellenmesi ile reperfüzyonda H₂O₂ üretiminin azaldığı, buna bağlı olarak da beyin hasarında koruma sağlandığı ileri sürülmektedir (79,80.). Ayrıca, deksmedetomidinin azalmış sempatik tonus yanısıra N-Metil-D- Aspartat reseptör aracılı iyon akımlarının inhibisyonu ile de nekrotik hücre ölümünde azalmaya neden olduğu kabul edilmektedir (16). Bu olası mekanizmalar dışında, Engelhard ve ark. (16) deksmedetomidinin antiapoptotik protein konsantrasyonunda da artışa neden olduğunu bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada, Duminda ve ark. (81) α_2 -adrenerjik

agonistlerin vasküler cerrahide mortaliteyi ve myokardiyal infarktüsü azalttığını ileri sürmüşlerdir. Deksmetomidinin klinik kullanımı dışında renal İR hasarına etkisi henüz yeterince araştırılmamıştır. *Pubmedde* yaptığımız literatür taramasına göre bu çalışma rat İR modelinde İR hasarının pik etki yaptığı 24. saatte iskemi öncesi ve reperfüzyon sonrası olmak üzere iki ayrı dönemde uygulanan deksetomidinin böbrek histolojisi yanı sıra böbrek fonksiyonlarına etkisinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Yapılan daha önceki çalışmalarda, deksetomidinin anti-iskemik etkisinin 100 µg/kg'a varan yüksek dozlarında olduğu gösterilmiş; bu nedenle çalışmamızda da renal İR hasarında deksetomidinin 100 µg/kg dozu (14,82) kullanılmış ve ilaç Koçoğlu ve ark.nın (19) çalışması örnek alınarak i.v. uygulama ile eşdeğer kabul edilen i.p. yolla uygulanmıştır.

Koçoğlu ve ark. (19) i.p. 100 µg /kg dozunda reperfüzyonun başında uyguladıkları deksetomidin ile 60 dk.lık iskemi 45 dk reperfüzyon sonucu oluşan ABY'e bağlı hasarın histopatolojik olarak tedavi edilmeyen gruba göre düzelmeye gösterdiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda Koçoğlu ve ark. (19) ile benzer şekilde İR grubunda görülen mononükleer hücre infiltrasyonu, proksimal tübül hücrelerinde fırçamsı kenar kaybı, tübüler atrofi, tübüler dilatasyon, vakuolizasyon, bazı tübüllerde protein ve hücre debris birikimi ile eritrosit ekstrasvazyonunu içeren değişikliklerden proksimal tübül değişikliklerinin her iki deksetomidin verilen grupta, eritrosit ekstrasvazyonunun da reperfüzyon döneminde uygulanan deksetomidin ile anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Bu bulgular göstermektedir ki, deksetomidinin profilaktik (preiskemik) veya terapötik (reperfüzyon başlangıcı) kullanımı İR hasarını önlemede kısmen etkilidir.

Deksetomidinin renal İR'daki koruyucu rolü kesin olarak bilinmemekle birlikte, noradrenalin salınımını azaltarak renal kan akımı ve glomerüler filtrasyonu arttırdığı kabul edilmektedir (83). Deksetomidinin olası etki mekanizmalarından biri de cerrahi stres yanıtı inhibe ederek adrenerjik sistem aracılı vazokonstriksiyonun etkilerinden böbreği korumasıdır (84-87). Ayrıca, böbrek üzerinde direkt vasküler etkiler ile renal arteriyal vazodilatasyonu da arttırabilmektedir (19). Biz de bu çalışmada deksetomidinin böbreği hangi mekanizmalarla koruduğu üzerine bir araştırma yapmadık. Ancak, bu korumanın yukarıda açıkladığımız mekanizmalarla bağlantılı olabileceği kanısındayız.

Villela ve ark. (17) yaptıkları deneysel çalışmada; anestezi altındaki köpeklere düşük doz (1 ve 2 mcg/kg bolus doz uygulamasını tabiben 1 ve 2 µg/kg 1 saatlik i.v. infüzyon) deksetomidin uygulanmasının idrar osmolalitesini ve plazma vazopressin düzeyini

azaltarak serbest su diürezine neden olduğunu bildirmişlerdir. Frumento ve ark. (18) renal bir hastalığı olmayan torasik cerrahi uygulanmış hastalarda deksmedetomidin infüzyonu ile idrar akımı, serum Kr düzeyi ve serum Kr değerindeki fraksiyonel değişimi içeren glomerüler filtrasyon göstergelerini kullanarak postoperatif renal fonksiyonlarda iyileşme olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada, serum Kr değerlerindeki azalma postoperatif birinci haftada pik yapmıştır. İlaç uygulamasının devam etmediği dönemde de saptanan bu iyilik hali ilacın glomerüler filtrasyon üzerindeki faydalı etkisinin bir kanıtı olarak kabul edilmiştir. Frumento ve ark. a (18) göre renal fonksiyonlarda gözlenen bu düzelmelerin olası iki sebebi olabilir; birincisi deksmedetomidinle kan basıncında olabilecek azalmanın daha fazla sıvı infüzyonu ile düzeltilmesi, ikincisi ise azalmış renal vazokonstriksiyondur. Bu çalışmacılardan farklı olarak biz İR hasarında biyokimyasal renal parametrelerde sadece sınırlı bir iyileşme olduğunu saptadık. Bu çalışmada, deksmedetomidin uygulanan her iki grupta da KÜN değerlerinde İR grubuna göre anlamlı düzeyde azalma gözlenmiştir. Buna ek olarak, deksmedetomidinin reperfüzyonun 5. dakikasında verilmesi ile anlamlı aköz diürez sağlanmıştır. Ancak, diürez ve KÜN değerlerinde saptanan bu düzelmeler, böbrek için daha spesifik testler olan kan Kr düzeylerinde ve K_{Kr} gösterilememiştir. Çalışmamızın sonuçları, renal İR hasarında deksmedetomidin ile histomorfolojik bir düzelmeler sağlanırken yeterli fonksiyonel bir düzelmeler sağlanmadığını düşündürmektedir. Biz, vazopressin düzeyleri ile idrar ozmolalitesine bakmadığımız ve her grupta ratların almış olduğu sıvı miktarını her ne kadar tüm ratlara sabit bir sıvıyı operasyon sonunda vermiş olsak da kesin olarak bilmediğimiz için Frumento ve ark. (18) nın ileri sürdüğü hipotezi bu çalışma ile doğrulayamıyoruz.

6.SONUC VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, hem iskemi öncesi hem de reperfüzyon başlangıcında uygulanan deksmedetomidin ile renal İR hasarının histopatolojik olarak azaldığı gösterilmiştir. Her iki yöntem arasında anlamlı bir fark saptanmamış olsa bile reperfüzyon döneminde verilen deksmedetomidinin İR hasar grubu ile kıyaslandığında daha etkin olduğu bulunmuştur. Histopatolojik olarak elde edilen bu veriler artmış aköz diürez ve azalmış KÜN değerlerinden ibaret olan biyokimyasal parametrelerle de reperfüzyon döneminde verilen deksmedetomidinin olumlu etkileri olarak değerlendirilmiştir. Ancak, bu ilacın renal İR hasarındaki etkisini göstermek için daha sensitif ve spesifik renal fonksiyon testlerini kullanarak mekanizmayı da açıklayacak tarzda daha ileri deneysel çalışmalar yapmak gerektiği kanısındayız.

7.KAYNAKLAR

- 1) Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure. *N Engl J Med* 1996; 334: 1448-60.
- 2) Brezis M, Rosen S, Silva P, Epstein FH. Renal ischemia: A new perspective. *Kidney Int* 1984; 26: 375-83.
- 3) 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.
- 4) Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 1503–20.
- 5) Baud L, Ardaillou R. Involvement of reactive oxygen species in kidney damage. *Br Med Bull* 1993; 49: 621-29.
- 6) Greene EL, Paller MS. Oxygen free radicals in acute renal failure. *Miner Electrolyte Metab* 1991; 17: 124 -32.
- 7) Granger DN, Korthuis RJ. Physiologic mechanisms of postischemic tissue injury. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 311–32.
- 8) Brezis M, Rosen S. Hypoxia of the renal medulla—its implications for disease. *N Engl J Med* 1995; 332: 647–55.
- 9) 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.
- 10) Edelstein CL, Ling H, Schrier RW. The nature of renal cell injury. *Kidney Int* 1997; 51: 1341– 51.
- 11) Williams P, Lopez H, Britt D, Chan C ve ark. Characterization of renal ischemia-reperfusion injury in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1997; 37: 1-7.
- 12) Billings FT, Chen SW, Kim M, Park SW ve ark. α_2 adrenergic agonists protect against radiocontrast-induced nephropathy in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 295: 741-48.
- 13) Wikberg JE, Uhlén S, Chhajlani V. Medetomidine stereoisomers delineate two closely related subtypes of idazoxan (imidazoline) I-receptors in the guinea pig. *Eur J Pharmacol* 1991; 193: 335-400.

- 14) Hoffman WE, Kochs E, Werner C, Thomas C ve ark. Deksmetomidine improves neurologic outcome from incomplete ischemia in the rat. Reversal by the alpha 2-adrenergic antagonist atipamezole. *Anesthesiology* 1991; 75: 328–32.
- 15) Jolkkonen J, Puurunen K, Koistinaho J, Kauppinen R ve ark. Neuroprotection by the α_2 -adrenoceptor agonist, deksmedetomidine, in rat focal cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol* 1999; 372: 31-36.
- 16) Engelhard K, Werner C, Eberspächer E, Bachl M ve ark. The effect of the alpha 2-agonist deksmedetomidine and the N-methyl-D-aspartate antagonist S(+)-ketamine on the expression of apoptosisregulating proteins after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Anesth Analg* 2003; 96: 524–31.
- 17) Villela NR, do Nascimento Júnior P, de Carvalho LR, Teixeira A. Effects of dexmedetomidine on renal system and on vasopressin plasma levels. Experimental study in dogs. *Rev Bras Anesthesiol* 2005; 55: 429-40.
- 18) Frumento RJ, Logginidou HG, Wahlander S, Wagener G ve ark. Deksmetomidine infusion is associated with enhanced renal function after thoracic surgery. *J Clin Anesth* 2006; 18: 422–26.
- 19) Koçoğlu 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.
- 20) Kumbul K. Deneysel intestinal iskemi ve reperfüzyon modelinde caffeic acid phenethyl ester' in akciğer hasarını önlemedeki etkinliği. S.D.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D. uzmanlık tezi 2007.
- 21) Mathru M, Dries DJ, Barnes L, Herbert ME ve ark. Tourniquet-induced exsanguination in patients requiring lower limb surgery. An ischemia-reperfusion model of oxidant and antioxidant metabolism. *Anesthesiology* 1996; 84: 14-22.
- 22) Kam PCA, Kavanagh R, Yoong FF, Kavanaugh R. The arterial tourniquet: pathophysiological consequences and anaesthetic implications. *Anaesthesia* 2001; 56: 534-45.
- 23) Şahsıvar M. Renal arterde oluşturulan iskemi reperfüzyon sonrası böbrekte gelişen fonksiyon bozukluğuna iloprostun etkisi. Uzmanlık Tezi 2007.
- 24) Donna L, Carden D, Granger N. Pathophysiology of ischeamia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000; 190: 255-66.

- 25) Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 2002; 105: 248-58.
- 26) A 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: 1070–75.
- 27) Olguner Ç, Koca U, Kar A, Karcı 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: 150-55.
- 28) Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 1993; 21: 1376-86.
- 29) Göksel Ş, Yeğen BÇ. İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik Fizyopatoloji* 2009; 22: 5-13.
- 30) Schoenberg MH, Fredholm BB, Haglund U, Jung H ve ark. Studies on the oxygen radical mechanism involved in the small intestinal reperfusion damage. *Acta Physiol Scand* 1985; 124: 581-90.
- 31) Grum CM. Cellular energetics. In: Zelenock GB. *Clinical ischemic syndromes: mechanism and consequence of tissue injury*. St. Louis: The C. V. Mosby Company 1990; 47-62.
- 32) McMichael M, Moore MRM. Ischemia–reperfusion injury pathophysiology, part I. *J Vet Emerg Crit Care* 2004; 14: 231-41.
- 33) Grace PA. Ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1994; 81: 637-47.
- 34) Kılınç K. Oksijen radikalleri: üretilmeleri, fonksiyonları ve toksik etkileri. *Biyokimya Dergisi* 1985; 2: 60-89.
- 35) 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
- 36) 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.
- 37) Best B. Ischemia and reperfusion injury in cryonics. <http://www.benbest.com/cryonicsischemia.html>
- 38) Murata M, Monden M, Umeshita K, Nakano H ve ark. Role of intercellular calcium in superoxide-induced hepatocyte injury. *Hepatology* 1994; 19: 1223-28.
- 39) Hatanaka N, Kamike W, Shimizu S, ve ark. Ca²⁺ release from mitochondria induces cytosolic enzyme leakage in anoxic liver, *Journal of surgery research* 1995; 58: 485-90.

- 40) 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
- 41) Kumar V, Cotran R, Robbins SL. *Basic Pathology*. 6th edition 2000; 10: 30-36.
- 42) Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol* 1986 ;250: 749-53.
- 43) Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations and preventations of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* 2001; 94: 1133-38.
- 44) 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.
- 45) Kaminski KA, Bonda TA, Korecki J, Musial WJ. Oxidative stress and neutrophil activation the two keystones of ischemia/reperfusion injury. *Int J Cardiol* 2002; 86: 41-59.
- 46) Grisham MB, Hernandez LA, Granger DN. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am J Physiol* 1986; 251: 567-74.
- 47) Thiagarajan RR, Winn RK, Harlan JM. The role of leukocyte and endothelial adhesion molecules in ischemia-reperfusion injury. *Thromb Haemost* 1997 ;78: 310-14.
- 48) Dillon JJ, Grossman SH, Finn WF Effect of oxypurinol on renal reperfusion injury in the rat. *Renal Failure* 1993; 15: 37-45.
- 49) 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.
- 50) Kelly KJ, Williams WW Jr, Colvin RB, Bonventre JV. Antibody to intercellular adhesion molecule protects the kidney against ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 812-16.
- 51) Rabb H, Mendiola CC, Dietz J, Saba SR ve ark. Role of CD11a and CD11b in ischemic acute renal failure in rats. *Am J Physiol* 1994; 267: 1052-58.
- 52) Koç M, Arıkan H, Odabaşı Z, Akoğlu E. İskemik ve toksik akut tübüler nekroz patofizyolojisi. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi/Office Journal of the Turkish Association* 2006; 15: 13-24
- 53) Noiri E, Gailit J, Sheth D. Cyclic RGD peptides ameliorate ischemic acute renal failure in rats. *Kidney Int* 1994; 46: 1050-58.
- 54) Friedewald JJ, Rabb H: Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. *TKidney Int* 2004; 66: 486-91.

- 55) Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. *J Biochem* 1984; 222 :1-1.
- 56) Chamoun F, Burne M, O' Donnell M, Rabb H. Pathophysiologic role of selectins and their ligands in ischemia reperfusion injury. *Front. Biosci* 2000; 5: 103-09.
- 57) Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Hastalıkların patogenezi ve tedavisinde reaktif oksijen partikülleri ve antioksidanlar. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi/Office Journal of the Turkish Association* 1997; 3-4: 96-101.
- 58) Bhana N, Goa KL, McClellan KJ. Dexmedetomidine. *Drugs* 2000; 59: 263-68.
- 59) Getrler R, Brown HC, Mitchell DH, Silvius EN. Dexmedetomidine: a novel sedative-analgesic agent. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 2001; 14: 13-21.
- 60) Revers JG, Gloss PSA, Luborsky DA, Mc Evay MD. Intravenous nonopioid Anesthetics. *Anesthesia* Edited by Miller RD. Edition Philadelphia Pennsylvania, Churchill Livingstone 2005; 317-78.
- 61) Dyck YB, Shater SL. Dexmedetomidine pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Anesthetic Pharmacology Review* 1993; 1: 238-45.
- 62) De Wolf AM, Fragen RJ, Awam MJ. The pharmacokinetics of dexmedetomidine in volunteers with renal impairment. *Anesthesia Analgesia* 2001; 93: 1205-09.
- 63) Venn RM, Kaval MD, Grounds RM. Pharmacokinetics of dexmedetomidine infusions for sedation of postoperative patients requiring intensive care. *Br. J. Anaesth* 2002; 88: 669-75.
- 64) Scheinin M, Kallio A, Koulu M. Sedative and cardiovascular effects of medetomidine, a novel selective alpha₂-adrenoceptor agonist, in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 1987; 24: 443-51.
- 65) Kallio A, Scheinin M, Koulu M. Effects of dexmedetomidine, a selective alpha₂-adrenoceptor agonist, on hemodynamic control mechanisms. *Clin Pharmacol Ther* 1989; 46: 33-42.
- 66) Aho M, Scheinin M, Lehtinen AM. Intramuscularly administered dexmedetomidine attenuates hemodynamic and stress hormone responses to gynecologic laparoscopy. *Anesth Analg* 1992; 75: 932-39.
- 67) Talke P, Chen R, Thomas B. The hemodynamic and adrenergic effects of perioperative dexmedetomidine infusion after vascular surgery. *Anesth Analg* 2000; 90: 834-39.
- 68) Jalonen J, Hynynen M, Kuitunen A. Dexmedetomidine as an anesthetic adjunct in coronary artery bypass grafting. *Anesthesiology* 1997; 86: 331-45.

- 69) Feng L, Xiong Y, Cheng F, Zhang L ve ark. Effect of ligustrazine on ischemia-reperfusion injury in murine kidney. *Transplant Proc* 2004; 36: 1949–51.
- 70) Fujii T, Takaoka M, Muraoka T, Kurata H ve ark. Preventive effect of L-carnosine on ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. *Eur J Pharmacol* 2003; 474: 261-67.
- 71) Burtis CA, Ashwood ER. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. Third edition W.B.Saunders Company 2006: 1723-24.
- 72) Hussein Ael-A, Shokeir AA, Sarhan ME, El-Menabawy FR ve ark. Effects of combined erythropoietin and epidermal growth factor on renal ischaemia/reperfusion injury: a randomized experimental controlled study. *BJU Int* 2011; 107: 323-28.
- 73) Yamamoto K, Wilson DR, Baumal R. Outer medullary circulatory defect in ischemic acute renal failure. *Am J Pathol* 1984; 116: 253-61.
- 74) William JA, William FF, Carl WG. Pathogenesis of acute renal failure following temporary renal ischemia in the rat. *Circulation Research* 1975; 37: 558-68.
- 75) Bird JE, Milhoan K, Wilson CB ve ark. Ischemic acute renal failure and antioxidant therapy in the rat: The relation between glomerular and tubular dysfunction. *J Clin Invest* 1988; 81: 1630-38.
- 76) Weinberg JM. The cell biology of ischemic renal injury. *Kidney Int* 1991; 39: 476-500.
- 77) Maier CM, Sun GH, Kunis DM, Giffard RG ve ark. Neuroprotection by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist CGP 40116: In vivo and in vitro studies. *J Neurochem* 1995; 65: 652-59.
- 78) Koçoğlu H, Karaaslan K, Gonca E, Bozdoğan O ve ark. Preconditioning effects of dexmedetomidine on myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. *Curr Ther Res Clin Exp* 2008; 69: 150–58.
- 79) Simonson SG, Zhang J, Canada AT Jr, Su YF. Hydrogen peroxide production by monoamine oxidase during ischemia–reperfusion in the rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 1993; 13: 125–34.
- 80) Suzuki T, Akaike N, Ueno K-i, Tanaka Y ve ark. MAO inhibitors, clorgyline and lazabemide, prevent hydroxyl radical generation caused by brain ischemiarreperfusion in mice. *Pharmacology* 1995; 50: 357–62.

- 81) Wijeyesundera DN, Naik JS, Beattie WS. Alpha-2 adrenergic agonists to prevent perioperative cardiovascular complications: A meta-analysis. *Am J Med* 2003; 114: 742–52.
- 82) Hoffman WE, Baughman VL, Albrecht RF. Interaction of catecholamines and nitrous oxide ventilation during incomplete brain ischemia in rats. *Anesth. Analg* 1993; 77: 908-12.
- 83) Taoda M, Adachi YU, Uchihashi Y, Watanabe K ve ark. Effect of dexmedetomidine on the release of [3H]-noradrenaline from rat kidney cortex slices: Characterization of alpha2-adrenoceptor. *Neurochem Int* 2001; 38: 317-22.
- 84) Helbo-Hansen S, Fletcher R, Lundberg D, Nordström L ve ark. Clonidine and the sympatico-adrenal response to coronary artery by-pass surgery. *Acta Anaesthesiol Scand* 1986; 30: 235-42.
- 85) Kulka PJ, Tryba M, Zenz M. Dose-response effects of intravenous clonidine on stress response during induction of anesthesia in coronary artery bypass graft patients. *Anesth Analg* 1995; 80: 263-68.
- 86) Flacke JW, Bloor BC, Flacke WE, Wong D ve ark. Reduced narcotic requirement by clonidine with improved hemodynamic and adrenergic stability in patients undergoing coronary bypass surgery. *Anesthesiology*. 1987; 67 :11-19.
- 87) Kulka PJ, Tryba M, Zenz M. Preoperative alpha2-adrenergic receptor agonists prevent the deterioration of renal function after cardiac surgery: Results of a randomized, controlled trial. *Crit Care Med* 1996; 24: 947-52.

EKLER

Ek-1: Etik kurul onayı



Toplantı No : 05/14/2010
Toplantı Tarihi : 16 Temmuz 2010

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

39/2010 Protokol No'lu; Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı Başkanlığı Doktorlarından Dr.Edip GÖNÜLLÜ'nün yürütücüsü olduğu "Ratlarda renal iskemi reperfüzyon hasarına iki farklı zamanda uygulanan deksmedetomidinin etkilerinin karşılaştırılması" isimli projede;

- Proje özet bölümünün metne eklenmesi,
 - Metin içinde dozun geçtiği yerlerde literatürlerin verilmesi,
 - 1. grup kontrol grubu olarak kabul edilmemektedir. Çalışmaya alınan tüm hayvanların bazal değerleri kontrol grubu olarak kullanılabilir. Etik Kurulun önerileri doğrultusunda çalışma gruplarının tekrar oluşturulması gerekmektedir.
- Projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

Prof. Dr. Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik
Kurul Başkanı

Prof. Dr. A. Necati GÖKMEN
Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Alper SOYLU
Üye

Prof. Dr. Ayşe GELAL
Üye (top. katılmadı)

Prof. Dr. Selman SÖKMEN
Üye

Prof. Dr. O. Nejat SARIOSMANOĞLU

Doç. Dr. Turna İLKNUR
Üye

Doç. Dr. H. Alper BAĞRIYANLI
Üye

Doç. Dr. Abdullah KUMRAL
Üye (top. katılmadı)

Doç. Dr. A. Hüseyin BASKIN
Üye (topl. katılmadı)

Doç. Dr. Tonay INCEBOZ
Üye

Vtr. Hekim Abdullah SERPEN
Üye

Ayşe Nur BALİN
Üye (top. katılmadı)

Doç. Dr. Sermin GENÇ
Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde **bold** karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.