



**MERAM  
TIP FAKÜLTESİ**

**T.C.**

**NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
MERAM TIP FAKÜLTESİ**

**ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON ANABİLİM DALI**

**RATLARDA SEPSİSE BAĞLI AKUT BÖBREK HASARININ ÖNLENMESİNDE  
UZAK İSKEMİK ÖNKOŞULLANMA**

**DR. EYÜP FATİH CİHAN**

**UZMANLIK TEZİ**

**KONYA, 2020**



**T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
MERAM TIP FAKÜLTESİ**

**ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON ANABİLİM DALI**

**RATLARDA SEPSİSE BAĞLI AKUT BÖBREK HASARININ ÖNLENMESİNDE  
UZAK İSKEMİK ÖNKOŞULLANMA**

**DR. EYÜP FATİH CİHAN**

**UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
PROF. DR. ALPER YOSUNKAYA**

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince klinikte her zaman çalışmaktan büyük onur ve gurur duyduğum, iyi bir anestezi ve reanimasyon uzmanı olarak yetişmemizi sağlayan, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım hocalarım; Anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Sema TUNCER UZUN'a ve değerli hoclarım Prof. Dr. Şeref OTELCİOĞLU, Prof. Dr. Selmin ÖKESLİ, Prof. Dr. Ruhiye REİSLİ, Prof. Dr. Aybars TAVLAN, Prof. Dr. Atilla EROL, Prof. Dr. Ahmet TOPAL, Doç. Dr. Alper KILIÇASLAN, Doç. Dr. Gamze SARKILAR, Doç. Dr. Funda GÖK, Dr. Öğr. Üyesi Gülçin HACIBEYOĞLU, Dr. Öğr. Üyesi Şule ARICAN ve Dr. Öğr. Üyesi Resul YILMAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Her biriyle çalışmaktan büyük keyif aldığım sevgili asistan arkadaşlarıma ve kliniğimizin tüm anestezi teknikerlerine, hemşirelerine, personellerine ve sekreterlerine çok teşekkür ederim.

Tez çalışması sürecinde bilgilerini, desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Fahriye KILINÇ ve patoloji çalışanlarına, tezimin istatistiksel analizine katkılarından ötürü Dr. Öğr. üyesi Mehmet UYAR'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın her aşamasında yanımda olan, her türlü zorluğun üstesinden beraber geldiğimiz sevgili dostum Dr. Sinan Oğuzhan Ulukaya' ya teşekkürlerimi sunarım.

Tez projemin hayata geçirilmesinin birçok aşamasında yardımlarını esirgemeyen Ph.Dr. Rahim KOCABAŞ'a ve Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi çalışanları, Mevlüt KARAKAYA ve Mustafa AYAN'a teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde büyük emekleri olan, hayatım boyunca sevgi, şefkat ve desteklerini esirgemeyen anneme, babama ve kardeşlerime, sevgisi, sabrı ve desteğiyle hep yanımda olan sevgili eşime ve biricik kızıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ağustos 2020

Dr. Eyüp Fatih CİHAN

# ÖZET

## RATLARDA SEPSİSE BAĞLI AKUT BÖBREK HASARININ ÖNLENMESİNDE UZAK İSKEMİK ÖNKOŞULLANMA EYÜP FATİH CİHAN, UZMANLIK TEZİ, KONYA, 2020

### Amaç

Bu çalışmanın amacı, kısa iskemik aralıklarla, tek taraflı alt ekstemiteye uygulanan uzak iskemik önkoşullamanın (UİÖK); ratlarda sepsise bağlı akut böbrek hasarı (ABH) üzerindeki etkilerini histopatolojik incelemeyle, kan ve idrar belirteçleriyle değerlendirmektir.

### Yöntem

Ratlar altı gruba ayrıldı. Her grupta on adet Wistar Albino cinsi sıçan kullanıldı. Sepsis modelini oluşturmak için çekal ligasyon ve ponksiyon (CLP) yöntemi kullanıldı. Grup1 (Sham)'de sadece abdominal insizyon yapıldı ve CLP uygulanmadı. Grup2 ve Grup3'te CLP işlemi uygulandı ve sırasıyla 24. Saatte ve 48.saatte işlem sonlandırıldı. Grup 4'te UİÖK uygulandı, CLP uygulanmadı. Grup 5 ve 6'da CLP işlemi öncesinde UİÖK uygulandı ve sırasıyla 24. ve 48. Saatte işlem sonlandırıldı. Kan, idrar ve doku örnekleri alınarak prosedür sonunda ratlar sakrifiye edildi. Bütün girişimsel işlemler anestezi altında ratların spontan solunumları korunarak gerçekleştirildi. Sonuçların ilaca bağlı böbrek hasarı ile karışmaması için hayvanlara antibiyotik tedavisi uygulanmadı. Kan örneklerinden kreatinin ve laktat değerleri çalışıldı. IGFBP-7 (Insulin Like Growth Factor Binding Protein-7) ve TIMP-2 (Tissue İnhibitör of Metalloproteinaze-2) düzeyleri idrardan ELISA yöntemi ile ölçüldü. Histopatolojik değerlendirme bütün ratların sol böbreğinden gerçekleştirildi.

### Bulgular

Böbrek histomorfolojik hasar toplam skoru *Sham* grubunda, diğer gruplara göre anlamlı olarak düşük bulundu ( $p<0,01$ ). Tübüler Hasar Skoru *sham* grubuna göre sepsisin 24. ve 48. Saatinde (Grup2 ve 3'te) istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ve en fazla hasar skoru Grup3'te (sepsisin 48.saati grubunda) görülmüştür. UİÖK uygulanan ratlarla uygulanmayanların kıyaslamasında da sepsis sonrası 24. saat ve 48.saate gruplarında; UİÖK yapılanlarda (Grup5 ve 6'da) tübüler hasarın azalması ileri derecede anlamlı şekilde bulunmuştur ( $p<0,001$ ), apoptozisin azalması da anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ). İdrar numunesinden ölçülen hücre siklus arrest biyobelirteçleri, hem IGFBP-7 hem de TIMP-2 sepsis sonrası 24.saat ve 48. Saat gruplarında (Grup2 ve 3 'te); *sham* grubuna ve

birbirlerine göre anlamlı artış gösterdi. ( $p<0.05$ ). Ayrıca sepsis sonrası 24. ve 48. saatlerde; işlem öncesi UIÖK yapılan gruplarda (Grup5 ve 6'da), yapılmayanlara göre IGFBP7\*TIMP2 değerlerinde anlamlı azalma görülmüş ( $p<0.05$ ), kreatinin ve laktat değerlerindeki değişim anlamsız bulunmuştur. ( $p>0,05$ )

### **Sonuç**

Yapmış olduğumuz bu deneysel hayvan çalışmasında UIÖK'nın, sepsise bağlı akut böbrek hasarında tübüler hasarı ve apoptozisi azaltarak böbrekleri koruduğu sonucuna vardık.

**Anahtar Kelimeler:** Uzak İskemik Önkoşullanma, Sepsis, Akut Böbrek Hasarı, Hücre Siklus Arrest Biyobelirteçleri



# ABSTRACT

## REMOTE ISCHEMIC PRECONDITIONING TO PREVENT SEPSIS INDUCED ACUTE KIDNEY INJURY IN RATS

EYÜP FATİH CİHAN, MASTER THESIS, KONYA, 2020

### Aim

The aim of this study is to evaluate the effects of remote ischemic preconditioning (RIPC) by brief ischemia of unilateral hind limb on sepsis induced acute kidney injury (SI-AKI) by histopathology, blood and urinary markers in rats.

### Method

Rats were divided into six groups. Ten Wistar Albino rats were used in each group. The cecal ligation and puncture (CLP) method was used to create sepsis model. In Group 1 (the sham group), only abdominal incision was performed and CLP was not applied. Group 2 and Group 3 underwent CLP, and the procedure was terminated at 24 hours in Group 2 and 48 hours in Group 3. In Group 4 only RIPC and abdominal incision were applied, CLP wasn't. Group 5 and 6 underwent CLP immediately prior to the application of RIPC and procedure was terminated at 24 hours and 48 hours, respectively. Blood, urine and tissue samples were collected and rats were sacrificed at the end of the procedure. Serum creatinin and lactate levels were measured from blood. IGFBP-7 (Insulin Like Growth Factor Binding Protein-7) and TIMP-2 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2) levels were measured by urine ELISA. Histopathological examinations were performed from the left kidney of all rats.

### Results

The total score of kidney histomorphological damage was significantly lower in the Sham group compared to the other groups ( $p < 0.01$ ). The Tubular Damage Score increased significantly in the 24th and 48th hour of sepsis (in Group 2 and Group 3) compared to the sham group, and the highest damage score was seen in Group 3. In comparison of the rats applied with RIPC and those not applied; in the 24th hour and 48th hour groups after sepsis (Group 5 and group 6); decrease in tubular damage was found to be highly significant in rats with RIPC applied (in Group 5 and 6) ( $p < 0.001$ ), and also decrease in apoptosis was significant ( $p < 0.05$ ). Cell cycle arrest biomarkers measured from the urine sample (both IGFBP-7 and TIMP-2), showed a significant increase in the 24th hour and 48th hour groups after sepsis (in Group 2 and Group 3) compared to the

Sham group and each other. In addition, at the 24th and 48th hours after sepsis; There was a significant decrease in IGFBP7 \* TIMP2 in the groups with RIPC before the procedure ( Group 5 and Group 6) compared to those which were not applied (Group 2 and group 3) ( $p < 0.05$ ) Creatinine and lactate values did not change significantly. ( $p > 0.05$ )

### **Conclusion**

In this experimental animal study, we concluded that RIPC protects the kidney by reducing tubular damage and apoptosis in sepsis induced acute kidney injury.

### **Keywords**

Remote ischemic preconditioning, Sepsis, Acute kidney injury, Cell cycle arrest biomarkers

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	viii
TABLOLAR DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ.....	x
GRAFİKLER DİZİNİ.....	xi
KISALTMALAR.....	xii
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Sepsis.....	3
2.2. Akut Böbrek Hasarı (ABH).....	5
2.2.1 Tanım ve Sınıflama:.....	6
2.2.2 Nedene bağlı olarak ABH'nın Tipleri.....	9
2.2.3 Sepsise Bağlı Akut Böbrek Hasarı.....	11
2.2.4 Akut Böbrek Hasarının Erken Tespitinde Yeni Biyobelirteçler.....	16
2.3. Uzak İskemik Önkoşullanma.....	18
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	21
3.1.Çalışmada Kullanılan Deney Hayvanları.....	21
3.2. Kullanılan Cihazlar ve Tıbbi İlaçlar.....	21
3.3.Yöntem.....	21
3.3.1 Uzak iskemik Önkoşullanma Uygulanması.....	23
3.3.2. CLP yöntemiyle Sepsis Modeli Oluşturulması.....	23
3.3.3. İdrarda IGFBP-7 ve TIMP-2 Seviyesinin Ölçülmesi.....	24
3.4.Histopatolojik İncelemeler.....	25
3.5. İstatistiksel Analiz.....	27

4.BULGULAR.....	28
4.1. Böbreklerin Histopatolojik İncelenmesi .....	28
4.2. Serum Kreatininin Düzeyinin Değerlendirmesi .....	34
4.3. Serum Laktat Düzeyinin Değerlendirmesi.....	35
4.4 Hücre Siklus Arrest Biyobelirteçlerinin Düzeylerinin Değerlendirmesi.....	37
4.5 Patolojik Bulgular ile Kreatinin, Laktat ve IGFBP7*TIMP2 Korelasyonu .....	39
5.TARTIŞMA.....	41
6.SONUÇ.....	50
KAYNAKLAR.....	52



## TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1: Sequential (Sepsis-Related) Organ Failure Assessment (SOFA) Skoru.....	4
Tablo 2.2: qSOFA Kriterleri.....	5
Tablo 2.3: Böbreğin Temel Fonksiyonları.....	6
Tablo 2.4 AKIN Evreleme Kriteri .....	8
Tablo 2.5: KDIGO Rehberine göre ABH Evreleme .....	9
Tablo 2.6: Prerenal ABH nedenleri.....	10
Tablo 2.7: Renal ABH Nedenleri:.....	11
Tablo 4.1 Tübüler Hasar Skoru.....	29
Tablo 4.2. Grupların Tübüler Hasar Skoru ve Apoptozis dereceleri.....	29
Tablo 4.3. Tübüler Hasar Skoru ve Apoptozisin Gruplar Arası Karşılaştırması. ....	30
Tablo 4.4 Grupların, Kreatinin, Laktat, IGFBP-7, TIMP-2, [IGFBP-7*TIMP-2] Değeri.....	36
Tablo 4.5. Gruplar Arası İstatistiksel Karşılaştırma.....	37

## ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

Şekil 2.1: RIFLE kriterleri .....	7
Şekil 2.2: Sepsis ilişkili ABH Patofizyolojisinde Patojenik Yolaklar .....	13
Şekil 2.3: Mikrovasküler Fonksiyon Bozukluğunun Gelişiminde Rol Oynayan Mekanizmalar .....	16
Şekil 2.4: Akut Böbrek Hasarında IGFBP-7 ve TIMP-2 'nin mekanizması .....	18
Şekil 2.5: UİÖK'nın böbrek koruyucu mekanizması.....	20
Resim 3.1: Ratların Monitorizasyonu, Anestezi Uygulanması, Uzak İskemik Önkoşullanmanın Uygulanması ve CLP işlemi.....	24
Resim 4.1: Sepsis dönemlerinde gruplarda sık görülen histopatolojik bulguların örneklerinden tübül dilatasyonu .....	31
Resim 4.2: Sepsis dönemlerinde gruplarda sık görülen histopatolojik bulguların örneklerinden vakuolizasyon.....	32

Resim 4.3: Sepsis dönemlerinde gruplarda sık görülen histopatolojik bulguların örneklerinden fırçamsı kenar kayıpları .....	33
Resim 4.4 Sepsis dönemlerinde gruplarda apoptozise yönelik histopatoloji örneklerinin TUNEL boyama ile mikroskopik görüntüleri .....	34

## GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 4.1 Grupların Tübüler Hasar Skoru ve Apoptozis derecelerinin karşılaştırılması ....	30
Grafik 4.2. Serum kreatinin değerlerinin gruplara göre değişimi (mg/dL) .....	35
Grafik 4.3. Serum laktat düzeylerinin gruplara göre değişimi .....	36
Grafik 4.4. İdrar IGFBP-7 düzeylerinin gruplara göre değişimi (ng/mL) .....	38
Grafik 4.5. İdrar TIMP-2 düzeylerinin gruplara göre değişimi (ng/mL) .....	38
Grafik 4.6. İdrar IGFBP7*TIMP 2 düzeylerinin gruplara göre değişimi [(ng/mL) <sup>2</sup> /1000] .....	39
Grafik 4.7 Kreatinin Laktat ve IGFBP-7*TIMP-2 Değerlerinin Patolojik Hasar ile Korelasyonu .....	40

## KISALTMALAR

- ABH: Akut Böbrek Hasarı  
ABY: Akut Böbrek Yetmezliği  
OAB: Ortalama Arter Basıncı  
SOFA: Sequential Organ Failure Assessment  
SI-ABH: Sepsise bağlı olarak gelişen Akut Böbrek Hasarı  
CLP: Çekal ligasyon ve ponksiyon  
KBY: Kronik Böbrek Yetmezliği  
ROS: Reaktif oksijen türleri  
RRT: Renal Replasman Tedavisi  
UİÖK: Uzak İskemik Önkoşullanma  
rIPC: Remote Ischemic Preconditioning  
IPC: İskemik Önkoşullanma  
qSOFA: Quick Sepsis Related Organ Failure Assessment  
TEH: Tübüler Epitelyal Hücreler  
IL-: İnterlökin  
TNF: Tümör Nekrozis Faktör  
TLR: Toll-Like Reseptor  
SD: Standart Deviasyon (Standart Sapma)  
NGAL: Nötrofil Jelatinaz ilişkili Lipokalin  
KIM-1: Böbrek Hasarı Molekülü-1  
IGFBP-7: Insulin Like Growth Factor Binding Protein-7  
TIMP-2: Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2  
DAMP: Hasarla İlişkili Moleküler Paternler

## 1.GİRİŞ

Sepsis günümüzde oldukça yaygın karşılaşılan ve görülme sıklığı her geçen gün artan çok önemli bir sağlık problemidir. Dünyada her yıl 20 milyondan fazla sepsis vakası görülmektedir ve yaklaşık 5 milyonu ölümlle sonuçlanmaktadır (1). Tanıda ve tedavideki gelişmelere karşın, yüksek mortaliteyle seyreden ve tedavi sürecinde genellikle yoğun bakım ünitelerine yatış gerektiren bu hastalarda bakım maliyeti de oldukça yüksektir.(2)

Akut Böbrek Hasarı (ABH), sepsis gibi kritik hastalıklara sıklıkla eşlik eden ve hastanede yatış süresinde uzama, yoğun bakım gereksinimi, morbidite ve mortalite artışı ile ilişkili önemli bir komplikasyondur.(3) . Hastanede yatan, özellikle komorbiditesi olan hastalar ABH gelişimi açısından yüksek risk altındadır. Sepsis kritik hastalarda ABH'nın en sık nedenidir. ABH, septik hastaların yaklaşık % 50'sinde görülürken mortaliteyide 6-8 kat artırmaktadır.(4) Mortal seyretmeyen vakalarda ise kronik böbrek yetmezliği gelişme riski artmaktadır.(5) Sepsise bağlı ABH'da hastaların yaklaşık %30'unda Renal Replasman Tedavisine (RRT) ihtiyaç duyulmakta ve bu oran diğer nedenlere bağlı gelişen ABH'ya göre daha fazla görülmektedir.(6)

Böbrek tehlikede olduğu zaman kısa sürede tespit edebilme kabiliyetimiz sınırlıdır ve sıklıkla hasar geliştikten sonra tamamen fark edilebilmektedir. Bu nedenle en iyi renal koruma önlemektir. ABH'nın gelişimini teorik olarak engellemek ya da en azından ABH'nı kötüleşmekten kurtarmak için birçok önlem öne sürülse bugün daha çok kabul gören yöntemler non-farmakolojik yöntemlerdir.

Uzak İskemik Önkoşullanma da (UİÖK, *Remote Ischemic Preconditioning/rIPC*) non-farmakolojik yöntem olarak son birkaç dekaddır üzerinde durulmaktadır. 1986'da kalpte iskemik ön koşullandırmanın iskemi reperfüzyon hasarını azaltabildiği (lokal iskemik ön koşullandırma) gösterildikten sonra diğer birçok hedef organda da faydalı olabileceği bildirilmiştir.(7) Daha sonraki çalışmalar, uzaktaki organların ve dokuların iskemik ön koşullandırmasının, hedef organı iskemi reperfüzyon hasarından koruyabildiğini göstermiştir (Przyklenk 1993).(8) Ekstremitelerin uzak doku olarak kullanılması, viseral dokulara kıyasla iskemi reperfüzyon hasarına daha az duyarlı olduğundan, bu amaç doğrultusunda avantaj sağlar. Birkaç kısa ekstremitte iskemi döngüsü ile elde edilen UİÖK, bir kan basıncı manşonunun şişirilmesiyle elde edilmektedir. Bu sayede elde edilen vasküler yataklarda döngüsel, ölümcül olmayan iskeminin indüksiyonu- miyokardiyal iskemi, akut böbrek hasarı ve felç dahil olmak üzere hasarlanmanın etkilerini hafifletmenin bir yolu olarak savunulmuştur. Bu yöntem iskemik kalp hastalığı, inme, kalp cerrahisi, transplantasyon ve akut böbrek hasarı dahil olmak üzere birçok klinik ortamda çalışılmış ve potansiyel olarak yararlı birçok sonuç ortaya konmuştur.(9-11).

Kalp cerrahisinde birkaç tek merkezli randomize kontrollü çalışmada, düşük ABH insidansı ve daha az RRT'ye ihtiyaç olduğunu göstermiştir(12-14). Bununla birlikte, dört büyük ve çok merkezli randomize kontrollü çalışma da (15-18) dahil olmak üzere diğerleri bu yararlı etkileri doğrulamamıştır. Kardiyak cerrahideki çelişkili sonuçlar; düşük riskli hastaların hiçbir fayda göstermeyen denemelere dahil edilmesi, UİÖK'nin yararlı etkilerini azaltabilecek tedaviler olan propofol ve opioidlerin kullanılmasıyla açıklanabilir. Ancak yine de UİÖK'nin ABH'nı önleyici etkisi büyük çalışmalar ve meta-analizlerde tutarlı değildir(19)

ABH'nın önlenmesi için UİÖK, esas olarak kardiyovasküler cerrahide ve kontrast madde uygulamasından sonra değerlendirilmiştir. Günümüzde sepsisli hastalarda gelişen ABH üzerine etkisinin değerlendirildiği geniş randomize kontrollü çalışmalar mevcut değilken çok az sayıda sepsise bağlı gelişen ABH'nın önlenmesinde bu yöntemin değerlendirildiği farklı deneysel modellemeler mevcuttur. Biz yapmış olduğumuz bu deneysel hayvan çalışmasında, UİÖK'nin polimikrobiyal sepsis modelinde ABH'ye karşı önleyici etkinliğini değerlendirmeyi amaçladık.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1 Sepsis

Vücutun enfeksiyona cevabının kişinin doku ve organlarında hasara neden olmasıyla ortaya çıkan, hayatı tehdit eden bir durumdur. Sepsis kelimesinin anlamına baktığımızda; hayvansal veya bitki bazlı organik materyallerin bakteriler tarafından ayrıştırılması anlamına gelen eski Yunanca'dan türetilmiş bir kelimedir. Bu terim, Aristoteles, Plutarch ve Galen tarafından bu anlamla kullanılmıştır ve 2700 yılı aşkın bir süredir neredeyse hiçbir anlam değişikliği olmaksızın kullanılmaktadır.(20, 21)

Çoğu klinisyen, klinik uygulamada sepsis tanımı konusunda fikir birliği olmadığına, tedavinin geç başlandığına, erken sepsis teşhisi için daha hassas göstergelerin belirlenmesi gerektiğine ve daha basit ve net tanım ortaya konulmadığından halkın sepsis hakkında yeterince bilgi sahibi olamadığına inanmaktadır. 1990'lardan günümüze kadar yayınlanan uzlaşma raporları bu eksiklikleri gidermeye çalışmıştır. 1991 yılındaki ilk sepsis konsensüs raporundan sonra 2001'de (Sepsis-2) ve son olarak 2016 (Sepsis-3) yıllarında sepsis tanımlamalarında değişikliğe gidilmiştir. Sepsis için tanımlar en son 2016'da Sepsis-3 isimli toplantıda ESICM (European Society of Intensive Care Medicine) ve SCCM (Society of Critical Care Medicine) tarafından yeniden düzenlendi (22). Bu en son tanımlamada Sepsis; enfeksiyona karşı bozulmuş konak yanıtının sebep olduğu, akut gelişen organ disfonksiyonunun da eşlik ettiği yaşamı tehdit eden bir durum olarak tanımlandı. Septik şok ise hipovolemi olmaksızın; laktat düzeylerinin 2mmol/L den daha fazla ve ortalama arter basıncını (OAB) 65mm/Hg üstünde tutmak için vazopressör ilaç ihtiyacının olması şeklinde belirtildi. Önceden kullanılan ciddi sepsis tanımı da bu son tanımlarda kullanımdan kalkmıştır.(22)

Organ disfonksiyonu ise SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) skorunda en az 2 puanlık değişikliğin olması ile belirlenmektedir. (Tablo 2.1) Ayrıca yoğun bakım ünitesi dışında ve acilde, klinisyenlerin sepsisi erkenden tanınması, sepsisle ilişkili organ disfonksiyonlarını atlamaması ve uygun tedaviye erken başlamak amacıyla qSOFA (Quick Sepsis Related Organ Failure Assessment) skoru geliştirilmiştir. (Tablo-2.2). Bu skora sisteminin yoğun bakımda yatmayan hastalarda diğerlerine göre uygulanması daha kolay ve başarılı olduğu belirtilmiştir.(23) Veriler, bu koşullardan iki veya daha fazlasına sahip hastaların, uzun süreli yoğun bakım ünitesi kalışına (3 gün veya daha fazla) sahip olma veya hastanede ölme riskinin önemli ölçüde daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bu hastalar için bu bulguların ortaya konması, klinisyenlerin organ disfonksiyonu için daha fazla

araştırma yapmasını, uygun şekilde tedaviyi başlatmasını veya artırımını ve kritik bakıma sevk etmeyi veya izleme sıklığını artırmayı düşünmesini önerir. qSOFA skorunda; her birinden 1 puan alınan bu kriterlerden toplamda 2 veya daha fazla puan alınması yaşamı tehdit eden bir enfeksiyon varlığını göstermektedir.

Sepsis-3 tanımının klinik uygulamadaki performansı da sistemik inflamuar yanıt sendromuna (SIRS) göre duyarlılık kaybı ve uygulama ortamına dayalı değişken performans tanımlamanın yayınlandığı ilk haftadan itibaren tartışılmaya başlanmış ve halen de tartışma konusu olmaya devam etmektedir. Belki ilerde tanımlanacak olan yeni modeller daha doğru tanı ve tahmin sağlayabilir.

**Tablo 2.1: Sequential (Sepsis-Related) Organ Failure Assessment (SOFA) Skoru**

SİSTEM	SKOR				
	0	1	2	3	4
<b>SOLUNUM</b>					
PaO <sub>2</sub> / FiO <sub>2</sub> mm/Hg	≥400	<400	<300	<200 solunum desteğiyle birlikte	<100 solunum desteğiyle birlikte
<b>PIHTILAŞMA</b>					
Platelet (x 10 <sup>3</sup> /μL)	≥150	<150	<100	<50	<20
<b>KARACİĞER</b>					
Bilirubin (mg/dL)	<1.2	1.2 - 1.9	2.0 – 5.9	6.0 – 11.9	≥12
<b>KARDİYOVASKÜLER</b>					
Hipotansiyon	*OAB≥70 mm/Hg	*OAB<70 mm/Hg	Dopamin<5 Dobutamin (herhangibir doz) **	Dopamin 5.1-15 Epinefrin ≤ 0.1 Norepinefrin≤0.1**	Dopamin> 15 Epinefrin> 0.1 Norepinefrin> 0.1**
<b>NÖROLOJİK</b>					
Glaskow Koma Skoru	15	13- 14	10- 12	6- 9	<6
<b>RENAL</b>					
Kreatinin (mg / dL)	< 1.2	1.2 – 1.9	2.0 – 3.4	3.5 – 4.9	>5
İdrar çıkışı (ml/ gün)				<500	<200

\*ortalama arter basıncı \*\*en az 1 saat μg/kg/dk dozunda verilmiş olmalı

**Tablo 2.2: qSOFA Kriterleri**

Solunum Sayısı $\geq 22$ nefes / dakika
Bilinç Değişikliği; Glasgow Koma Skoru $<13$
Sistolik Kan Basıncı $\leq 100$ mm/ Hg

Dünyada her yıl yaklaşık 27 milyon insanda sepsis gelişmekte ve bunun 8 milyonu yaşamını yitirmektedir.(24) Aynı zamanda dünya çapında sepsis tanısı konulan hastaların oranında da her yıl artış görüldüğü belirtilmektedir (25). Bu artışın nedeni ise yaş ortalamasının artması, ilaçlara direncin gelişmesi, immünsupresyon gibi durumlara bağlanmaktadır(26).

Tedavi basamaklarında en son 2018 yılında yayınlanan Sepsiste Sağkalım Kampanyasında (SSC – 2018) “ilk 1. saatte tedavi demeti” güncellemesi gelmiştir. Bu güncellemeye göre ilk aşama tedavide izlenecek yol:

- Laktatin ölçümü; Laktat $> 2$ mmol/L ise 2-4 saat sonra tekrar ölçümü,
- Antibiyoterapi başlamadan evvel kan kültürlerinin alınması,
- Geniş spektrumlu antibiyotik başlanması,
- Hipotansiyon varsa ya da Laktat yüksekse ( $>4$  mmol/l), 30 ml/kg kristalloid mayi hemen verilmesi,
- Sıvı tedavisi sırasında ve sonrasında hasta hipotansif seyrediyorsa OAB  $> 65$  mmHg olacak şekilde vazopressör desteğinin başlanmasıdır (27).

Eğer sepsis, erkenden tanı konulmaz ve tedavi edilmezse şoka, çoklu organ yetersizliğine ve ölüme yol açar. Sepsisteki hastalar genellikle çoklu organ yetmezliği nedeniyle ölmekte olduğu için organ yetmezliği ile etkili bir mücadele, sepsis tedavisinin en önemli kısımlarından biridir (28). Sepsisteki her bir organın yetmezliği için ölüm riskinde %15-20 oranında artış olmaktadır. İki organ yetmezliği için mortalite oranı %30-40 a ulaşmaktadır (29). Solunum yetmezliği ile birlikte koagülasyon sistemi, karaciğer, santral sinir sistemi, gastrointestinal sistem ve renal yetmezlik sepsiste sık görülebilen ve mortaliteyi artıran sebeplerdir. Bu çalışmamızda sepsise bağlı akut böbrek hasarı tartışılacaktır.

## **2.2. Akut Böbrek Hasarı (ABH)**

Böbrekler retroperitoneal bölgede bulunurlar ve her biri yaklaşık 100-150 gr ağırlığındadır. Glomerüler filtrasyon, tübüler reabsorbsiyon ve sekresyon ile kandaki atık maddelerin

uzaklaştırılması, su- tuz ile asit-baz dengesinin düzenlenmesi, kan basıncı regülasyonu gibi birçok görevleri olan böbreğin temel fonksiyonları Tablo 2.3'te özetlenmiştir.(30)

**Tablo 2.3: Böbreğin Temel Fonksiyonları**

1. Vücut sıvı elektrolit dengesinin korunması: Su, sodyum, potasyum, hidrojen, bikarbonat, kalsiyum, fosfor, magnezyum...
2. Metabolik artık ürünlerin atılımı: Üre, kreatinin, ürik asit..
3. İlaçların, toksinlerin ve metabolitlerinin detoksifikasyonu ve atılımı
4. Ekstrasellüler sıvı hacmi ve kan basıncının hormonal regülasyonu: Renin-anjiyotensin sistemi, prostaglandinler, renal kinin- kallikrein sistemi
5.Hormon üretimi ve metabolizmasına katkı: D vitamini, eritropoietin,...
6.Peptit hormonlarının yıkımı: İnsülin, glukagon, kalsitonin, parathormon, büyüme hormonu...
7.Düşük molekül ağırlıklı proteinlerin yıkımı: Hafif zincirler, beta2-mikroglobülin
8.Metabolik etkiler: Glukoneogenez, lipid metabolizması...

Akut böbrek hasarı (ABH) glomerul filtrasyon hızında, hızlı azalma ile üre ve kreatinin gibi nitrojen artık ürünlerinin birikimi; sıvı, elektrolit, asit ve baz dengesinin bozulması ile kendini gösteren klinik bir sendromdur. ABH, toplumda %0.25 ve hastanede yatan hastaların ise yaklaşık %18'inde görülebilen ciddi bir halk sağlığı problemidir. Her geçen gün güncellenen tedavi yöntemlerine rağmen ABH; hastane yatışında uzama, artmış mortalite, diyaliz bağımlılığı ve tedavi maliyetlerinde artış ile ilişkilidir (31).

Toplum kökenli ABH'ya yol açan en sık sebepler kalp yetmezliği, maligniteler, ilaç yan etkileri, idrar yolu obstrüksiyonlarıyken; hastane kökenli ABH'da en sık nedenler arasında sepsis, büyük cerrahi girişimler, kalp yetmezliği, karaciğer yetmezliği ve nefrotoksik ilaçlar bulunmaktadır (Harrison 20th edition). Sepsis; kritik hastalarda ABH'nın en sık nedenidir ve vakaların % 40-50'sinde rol oynamaktadır. Sepsis ilişkili Akut Böbrek Hasarı (SI-ABH), hastane içi mortaliteyi 6-8 kat artırmaktadır. Mortal seyretmeyen hastalarda ise kronik böbrek yetmezliği (KBY) riskini artırmaktadır (32).

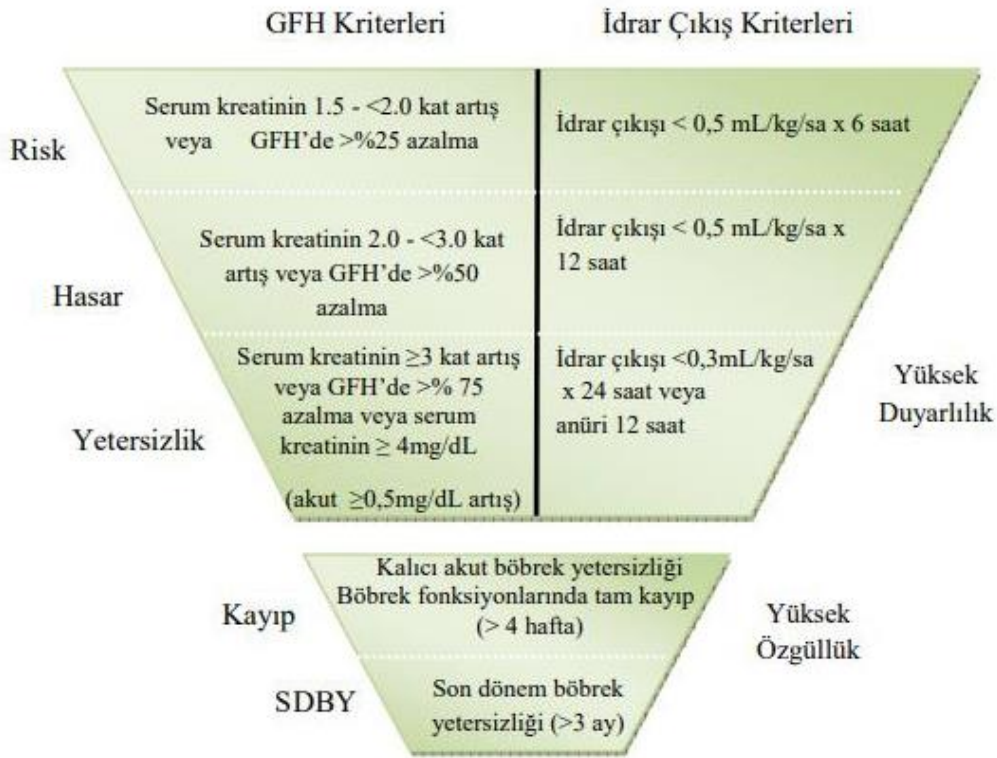
### **2.2.1 Tanım ve Sınıflama:**

Akut Böbrek Hasarı (ABH), çeşitli klinik tablolarda ortaya çıkan serum kreatinin değerindeki minimal yükseklikten anürik böbrek yetmezliğine kadar geniş bir aralıkta görülebilen karmaşık bir tablodur.(33) Böbrek fonksiyonunda meydana gelen ani değişiklikler tıp tarihi boyunca farklı isimlerle tanımlanmıştır. 19. yüzyılın başlarında "Böbreklerin idrar tutması" manasına gelen "Ischuria Renalis" olarak tanımlanırken 1950'lerde Akut Böbrek Yetmezliği

olarak isimlendirilmiştir. 2004 yılından sonra Akut Böbrek Hasarı (ABH) ve 2012'den itibaren daha genel bir tanım olan "Akut Böbrek Hastalıkları ve Bozuklukları" şeklinde adlandırılmıştır(34).

Bu kavram kargaşası içerisinde fikir birliği amacıyla, Akut Diyaliz Kalite *Girişimi* "Acute Dialysis Quality Initiative" (ADQI) tarafından ABH tanısında ve evrelemesinde kullanılmak üzere "RIFLE" sınıflaması önerilmiştir (35). Buna göre ABH; *risk* (Risk), *hasar* (Injury), *yetmezlik* (Failure), *kayıp* (Loss) ve *son dönem böbrek yetmezliği* (End stage renal disease) olarak derecelendirilmiş baş harfleri, bu sınıflandırmayı oluşturan RIFLE kelimesini oluşturmuştur (Şekil 2.1). ABH'yı tanımlamak için bu tanımlamada, klinik olarak idrar çıkışı ve laboratuvar testi olarak serum kreatinin düzeyleri kullanılmıştır. RIFLE sınıflamasında Risk, hasar ve yetmezlikten oluşan ilk üç harf ABH tanımını kapsarken; kayıp ve son dönem böbrek yetmezliğinden oluşan son iki harfi böbrek fonksiyonlarının sonuç durumunu belirtir (35).

**Şekil 2.1: RIFLE kriterleri**



RIFLE kriterlerinin, her ne kadar renal hastalığın teşhisi, sınıflandırması, progresyonu açısından uygun olduğu çalışmalarda gösterilse de RIFLE; ABH'nın etiyolojisi ve Renal Replasman Tedavisi (RRT)'ni hesaba katmamaktadır. Ayrıca ABH'yı tanımlamak ve sınıflandırmak için bazal kreatinin değerine ihtiyaç duymaktadır; sıklıkla klinik pratikte bu değer bilinmemektedir ve bu değer için KBY'li hastalardaki formüllerin kullanılması gerekmektedir. Bu nedenle 2007 yılında, AKIN (Acute Kidney Injury Network) tarafından

(33) RIFLE kriterleri üzerinde yeni birtakım güncellemeler ile ABH tanı ve evreleme kriterleri yayınlamıştır (33). (Tablo2.4)

#### AKIN tanı kriterleri

- Böbrek fonksiyonlarında ani bir azalma, (48 saat içinde)
- Serum kreatinin değerinde  $\geq 0,3$  mg/dl artış olması,
- Serum kreatinin değerinde  $\geq \%50$  artış (bazal kreatinininden 1,5 kat) olması,
- İdrar çıkışında azalma ( $\geq 6$  saat bir süre için saatte 0.5 ml / kg'dan az idrar çıkışı) olması

**Tablo 2.4 AKIN Evreleme Kriteri (33)**

Evre	Serum Kreatinin Kriteri	İdrar Çıkışı Kriteri
1	0,3 mg/dl ve üzerinde yükselme veya 1.5-2 kat yükselme	6 saatlik içinde idrar çıkışı <0.5 ml/kg/saat
2	Kreatinin artışı 2-3 kat	12 saat içinde idrar çıkışı <0.5 ml/kg/saat
3	3 kattan fazla yükselme veya Serum kreatinin >4 mg/dl iken 0,5 mg/dl ve üzerinde ani artış ya da RRT gereksinimi	24 saat içinde idrar çıkışı <0.3 ml/kg/saat veya 12 saat boyunca anüri

RRT uygulanan hastalar, AKIN sınıflamasına göre 3. Derece ABH olarak yorumlanmaktadır. Bu sınıflama, teorik olarak RIFLE kriterlerinin spesifite ve sensitivitesini düzeltilmiştir. Kayıp ve son dönem böbrek yetmezliği, sınıflamadan çıkarılmıştır (33, 36). RIFLE ile AKIN kriterlerinin karşılaştırıldığı çalışmalarda, AKIN kriterlerinin tanı koymada daha duyarlı olduğu gösterilmiş olsa da mortaliteyi öngörmede üstünlüğü gösterilememiştir (37-39).

2012 senesinde, KDIGO (*The Kidney Disease; Improving Global Outcomes*), RIFLE ve AKIN kriterlerini temel alarak, klinik uygulamalar ve bilimsel araştırmalar için modifiye bir sınıflama geliştirmiştir. KDIGO kriterine göre, ABH tanısı koyabilmek için;

- 48 saat içerisinde serum kreatinin seviyesinde  $>0,3$ mg/dL daha fazla artışın olması veya
- Son 7 gün içerisinde 1,5 kat artış olması gerekir.
- İdrar çıkışının 6 saat içinde 0.5 ml/kg/sa'ten az olması

ABH, bu kriterde de yine 3 evreye ayrılmıştır (40). Tablo2.5

**Tablo 2.5:KDIGO Rehberine göre ABH Evreleme (40)**

Evre	Serum kreatinin	İdrar çıkışı
1	SCr, bazal düzeyine göre 1,5-1,9 kat artışı veya $\geq 0,3$ mg/dl'den fazla artış	<0,5 ml/kg/saat (6-12 saat içinde)
2	SCr, bazal düzeyine göre 2-2,9 kat artışı	<0,5 ml/kg/saat (>12 saat)
3	SCr >3 kat artışı veya SCr > 4 mg/dl iken (en az $\geq 0,5$ mg/dl ani artış) veya RRT ihtiyacı	<0,3 ml/dk (24 saat) veya $\geq 12$ saat boyunca anüri

### 2.2.2 Nedene bağlı olarak ABH'nin Tipleri

ABH klinikte birçok nedene bağlı olarak görülebilir. Tanı ve tedavide klinisyenlere kolaylık sağlaması açısından temel olarak 3 gruba (prerenal – renal – postrenal) ayrılabilir;

#### 2.2.2.1 Prerenal ABH (Prerenal Azotemi)

Prerenal azotemi ABH'in en sık formudur ve renal hipoperfüzyona bağlı gelişir. ABH'nin yaklaşık %50'sini oluşturur.(41) Yetersiz renal plazma akımı ve glomerüler hidrostatik basınç sebebiyle; glomerüler filtrasyonda azalma ve buna bağlı olarak serum kreatinin ve/veya BUN (Böbrek üre nitrojeni) konsantrasyonunda artış meydana gelmesi olarak tanımlanabilir. Böbrekler, kardiak outputun %25'ini aldığı için; genel olarak doku perfüzyonunun azalması durumunda veya direkt renal iskemi varlığında renal perfüzyonda azalma olur. Prerenal azotemi, böbrek parankimine başlangıçta zarar vermez. Ayrıca prerenal azotemi, parankimal kan akımı ve intraglomerüler hemodinami restore edildiğinde hızlı bir şekilde geri dönüşümlüdür. (41). Prerenal ABH sebepleri Tablo2.6 da özetlenmiştir.

**Tablo 2.6: Prerenal ABH nedenleri**

<b>1.Hipovolemi</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Kanama</li><li>• Gastrointestinal sıvı kaybı: kusma, ishal, enterokutanöz fistül</li><li>• Üçüncü boşluğa sıvı kaçağı: Pankreatit, peritonit, travma, yanıklar</li><li>• Renal sıvı kaybı: diüretikler, ozmotik diürez, hipoadrenalizm, nefrotik sendrom</li><li>• Dehidratasyon, oral alımda bozukluk</li></ul>
<b>2.Kalp Debisinin Azalması</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Kalp Yetmezliği</li><li>• Miyokard, perikard ve kalp kapağı hastalıkları</li><li>• Masif pulmoner emboli</li><li>• Pulmoner hipertansiyon</li><li>• Venöz dönüşü bozan durumlar: Abdominal kompartman sendromu gibi.</li></ul>
<b>3.Sistemik Vazodilatasyon</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Sepsis, anafaksi,</li><li>• Antihipertansifler</li><li>• Ard yükün azalmasına neden olan ilaçlar</li></ul>
<b>4.İlaçlar</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Renal vazokonstriksiyon: katekolaminler, hiperkalsemi, calcineurin inhibitörleri, amfoterisin B</li><li>• Renal otoregülasyonda bozulma: siklooksijenaz inhibitörleri (non-steroidal anti-inflamatuar ilaçlar), angiotensin-converting enzim inhibitörleri, angiotensin 2 reseptör blokerleri, siklosporin</li></ul>
<b>5.Hepatorenal Sendrom</b>

### **2.2.2.2 Renal ABH (İntrensek Renal Parankimal Hastalık)**

Böbrek dokusundaki sorunlardan kaynaklanan ABH ipidir. Renal ABH hastaneye yatan hastalarda daha sık görülür. Böbrekte glomerül, tübüller, interstisyum veya intrarenal vasküler yapıların etkilenmesi söz konusudur. İntrensek ABH'nın en yaygın nedenleri sepsis, iskemi, endojen veya eksojen nefrotoksinlerdir (41). Renal ABH toplum kökenli geliştirse sebebi daha çok ilaç kullanımı veya enfeksiyon ile ilişkilidir.(42) Renal ABH'nın başlıca nedenleri şu şekilde sıralanabilir.(Tablo 2.7).

**Tablo 2.7: Renal ABH Nedenleri:**

<b>1.Glomerüler</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Akut Glomerülonefritler</li></ul>
<b>2.Tübüler ve İnterstisyel</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• İskemi</li><li>• Sepsis/ enfeksiyon</li><li>• Nefrotoksinler (radyonkontrast madde, ilaçlar, rabdomyoliz, hemoliz..)</li></ul>
<b>3.Vasküler</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Dissemine İntravasküler Koagülasyon (DIC)</li><li>• Malign hipertansiyon</li><li>• Trombotik Trombositopenik purpura (TTP)</li><li>• Hemolitik üremik sendrom (HÜS)</li></ul>

### **2.2.2.3 Postrenal ABH (Postrenal Obstrüksiyon)**

Postrenal ABH, idrar akımının akut olarak obstrüksiyonuna bağlı retrograd hidrostatik basınç artışına ve glomerüler filtrasyona etki etmesiyle meydana gelir. Bu obstrüksiyon renal pelvis, üreter, mesane ya da üretra, düzeyinde olabilir. En sık mesane boynunun fonksiyonel veya yapısal obstrüksiyonundan kaynaklanır. Anatomik olarak erkek üretrasının daha uzun olması nedeniyle ve prostat patolojilerinin de görülebmesinden dolayı erkeklerde daha sık görülür (43). Üriner sistemin neoplastik hastalıkları (erkeklerde genelde benign prostat hipertrofisi, kadınlarda ise servikal kanserler) ve üriner sistem taş hastalığı nedenlerindedir. Obstrüksiyonun erken evresinde devam eden glomerüler filtrasyon, obstrüksiyonun yukarısına doğru retrograd lümen içi basıncın artmasına neden olur. Sonuç olarak proksimal üreter, renal pelvis ve kalikslerde distansiyon gelişir ve GFH'de azalma meydana gelir. (41)

### **2.2.3 Sepsise Bağlı Akut Böbrek Hasarı**

Sepsis, serviste yatan hastalarda ve özellikle de yoğun bakım ünitelerinde ABH'nın en önemli nedenlerindedir.(41) Yoğun bakımlarda septik şoklu hastaların %50'sinden fazlasına ABH eşlik etmektedir. ABH, sepsisin seyrinde kötüleşmeye neden olmakla birlikte sepsis gelişimi için de risk faktörüdür.(44) Yapılan birçok gözlemsel çalışmada görülmüştür ki sepsisle ilişkili ABH, sepsis dışı ABH'dan demografik ve klinik özellikleri açısından farklılıklar gösterir. Sepsis ilişkili ABH olan hastaların sepsis dışı ABH olanlara göre akut hastalığın daha ciddi olduğu, birçok yandaş hastalığa sahip olduğu ve fizyolojik değişikliklerin daha belirgin olduğu saptanmıştır.(45) Sepsis ilişkili ABH'nın mortalite riski yüksektir bu nedenle hızlı tanı konulmalıdır ve uygun tedavilere erken başlanmalıdır.

ABH çoğu kez, sepsis ve septik şokun erken döneminde multi organ yetmezliği sendromunun bir parçası olarak gelişir.(46). Diğer organların işlevsel yetersizliklerinden sorumlu patofizyolojik mekanizmaları paylaşmasına rağmen nefronun ileri derecede organize yapısı hasara karşı farklı yanıtlar oluşmasına neden olur. Bununla birlikte yeni kanıtlar sepsisle ilişkili ABH ve sepsis dışı ABH'nın farkı patolojik mekanizmalara sahip olduğunu göstermiştir(47).

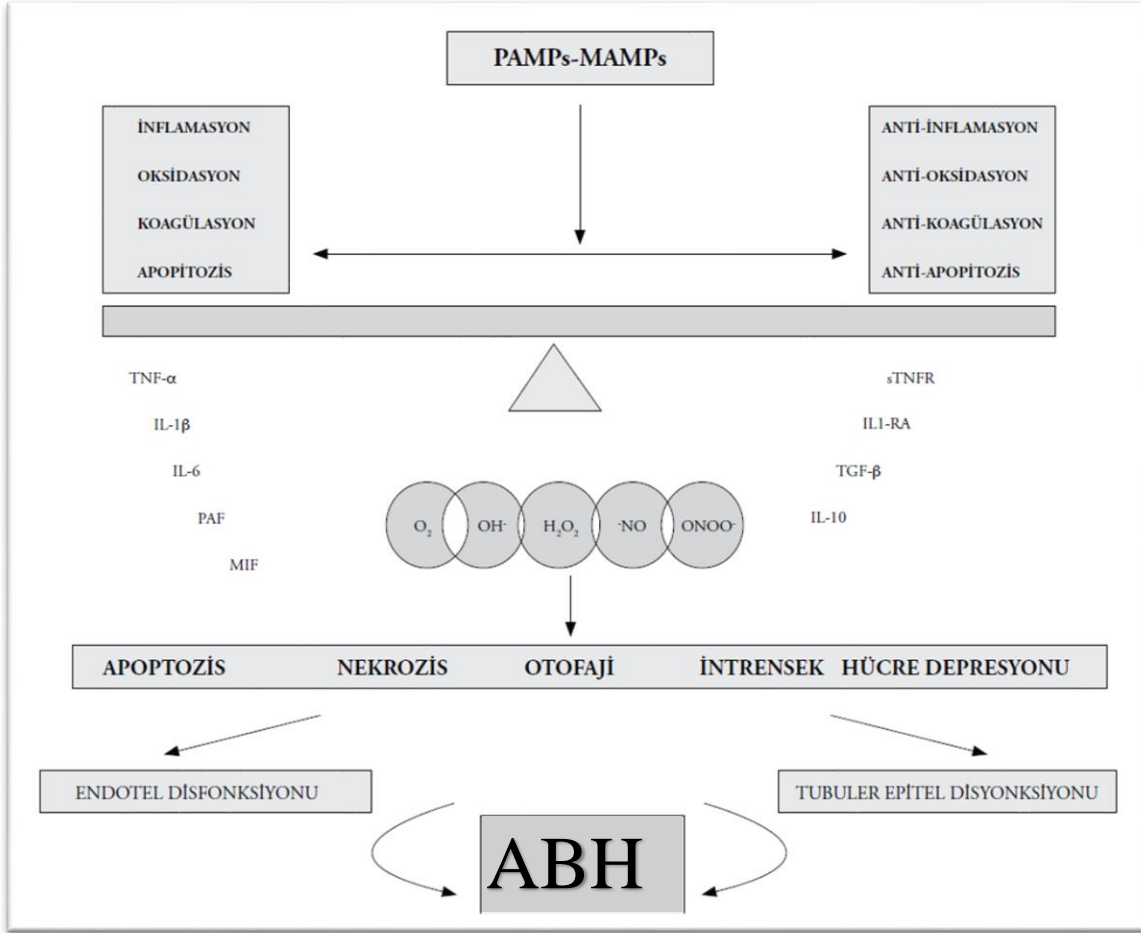
### **2.2.3.1 Patogenez**

Sepsis ilişkili ABH'nın (SI-ABH) patofizyolojisi karmaşık ve multifaktöryeldir. Böbrekteki hemodinamik değişiklikler, endotelial işlevsel bozukluk, renal parankime inflamatuvar hücre infiltrasyonu, intraglomerüler tromboz, tübüllerin nekrotik hücreler ve atıklar tarafından tıkanması; SI-ABH patogenezinde önemli rol üstlenir.(48)

Daha önceden SI-ABH'nın; sistemik hipotansiyon ve renal vazokonstrüksiyona bağlı böbrek hipoperfüzyonu ile böbreklerde reperfüzyon hasarı sonucunda meydana geldiği düşünülmekteydi. Son yıllarda sorgulanan bu teori üzerine yeni mekanizmalar öne sürüldü. Yakın zamanda yapılan hayvan ve insan çalışmalarında da sepsis sırasında böbreğin kan akımının korunduğu gösterilmiştir.(49) SI-ABH'nın patofizyolojisinde öne sürülen güncel kavramlar; inflamasyon, mikrovasküler disregülasyon ve hasara karşı Tübüler Epitelyal Hücrelerin (TEH) metabolik yanıtı olup, bunların SI-ABH'da global renal hipoperfüzyondan çok daha önemli olabileceği düşünülmektedir.(32, 49)

Sepsiste inflamatuvar yanıt, enfeksiyonu temizlemek ve sonrasında doku iyileşmesini gerçekleştirmek için temel olmakla birlikte doku hasarına ve organ disfonksiyonuna neden olabilir. Sitokin düzeyleri ile sepsis ilişkili ABH gelişmesi arasındaki güçlü ilişki; sistemik inflamasyonun, bu sürecin önemli bir aracı olduğu hipotezini desteklemektedir.(32, 50) Pro- inflamatuvar ve anti- inflamatuvar mekanizmaların sıralı şekilde aktivasyonu sepsisle ilişkili immün yanıtta görülmektedir (Şekil 2.2) (51, 52).

**Şekil 2.2: Sepsis ilişkili ABH Patofizyolojisinde Patojenik Yolaklar (52)**



**PAMP:** patojen ilişkili moleküler paternler; **MAMP:** mikrobiyal ilişkili moleküler paternler; **TNF:** tümör nekrozis faktör; **IL:** interlökin ; **PAF:** proteaz aktive edici faktör; **MIF:** migrasyon inhibitör faktör; **sTNFR:** çözümlü tümör nekrozis faktör reseptörü; **ABH:** Akut böbrek hasarı

Konak ile mikroorganizmanın ilk etkileşiminin ardından, hücresel ve humoral bileşenleri de içeren geniş immün bir yanıt oluşur (53) IL-1, IL-6, TNF-α gibi sitokinlerin salınımına yol açar. Sonrasında da bu süreç sitokin fırtınası, hemodinamik bozulma, organ disfonksiyonuna ve septik şoka ilerler (54, 55). Pro-inflamatuar süreci, anti-inflamatuar süreç takip eder. Ancak son yıllarda bu sürecin birlikte olduğu ancak başlangıçta proinflamatuar yanıtın daha belirgin olduğu ortaya konmuştur. Bu süreçteki immünsüpresif durum; monositlerdeki sitokin üretimi ve antijen sunumundaki değişim, lenfosit proliferasyonunda azalma ve apoptoziste artış ile karakterizedir (56).

Toll-like reseptörler (TLR), moleküler paternleri tanıma reseptörlerinin bir türüdür ve immün savunma sisteminin ilk basamağında rol oynar. Patojenlerdeki, patojen ya da mikrobiyal ilişkili moleküler paternler (PAMPs, MAMPs) enfeksiyon esnasında sadece immün sistem hücreleri (makrofaj/ monosit) değil epitel hücreleri de TLR'ler aracılığı ile

tanırlar (Şekil 2.2) (57). Sağlıklı insanlarla kıyaslandığında; sepsis hastalarının monositik TLR-2 ve TLR-4 tanımlanmasında önemli bir artış görülür.(58)

### **2.2.3.2 İnflamasyona karşı Tübüler Epitelyal Hücrelerin (TEH) Adaptif Yanıtları**

Sepsis sırasında ortaya çıkan apoptozu tetikleyici birçok faktöre rağmen; ABH'da böbreklerde belirgin bir nekroz ve apoptoz oluşmaz (59-61). Bu, akut faz esnasında hücrelerin ölümünün önlenmesinde hücresel yanıtların başarılı olduğunu ve adaptif bir uyarı mekanizması olduğunu göstermektedir. Bu durum tübüler epitelyal hücrelerin (TEH) , TLRs (TLR-2 ve 4 gibi) dahil inflamatuvar sinyalleri tanımak için reseptörlere sahip olduğunu ve yanıtlarının hücresel bütünlüğü korumak için iyi koordine edilmiş bir çabanın olduğunu düşündürmektedir (49).

TEH'lerin pre-apoptotik tetikleyicileri sınırlandırarak hasara karşı verdiği yanıt;

- Enerji tüketimini optimize etmek, önceliklendirmek ve homeostazisi korumak için metabolizmayı yeniden programlayarak,
- Kalite kontrol işlemleriyle (otofaji ve mitofaji) hücresel organel fonksiyonlarını idame ettirerek
- Yüksek enerji gerektiren işlemleri (Hücre siklusu ve DNA replikasyonunu) sınırlandırarak oluşmaktadır(62)

Sepsis esnasında TLR aracılı inflamasyon, oksidatif stres ve elektron transport zincirindeki kopukluklar mitofaji ve biyogenezisin güçlü tetikleyicileridir. (63-65) CLP metoduyla yapılan sepsisten 3 saat sonra böbreklerde mitofaji aktive olur (66) Mitofajinin uyarılmasının sepsiste; hücrelerin ve organ fonksiyonunun korunmasında efektif olduğu ve azalmış otofajinin de ABH belirteçlerinde artışla birlikteliği gösterilmiştir (66).

Ayrıca mitokondrinin hücre siklusunun düzenlenmesi ile yakından ilişkisi olduğu ve hücre döngüsünün durdurulmasının enerji gereksiniminin azaltılması ve korunmasına katkısıyla (cell cycle arrest); sepsis bağlamında önemli bir hücresel savunma stratejisi olabileceğini gösteren kanıtlar vardır (49, 63)

### **2.2.3.3. Renal Mikro dolaşım**

Sepsis makrovasküler ve mikrovasküler kan akımında değişikliklere neden olur. Mikrovasküler değişikliklerle, sürekli kan akışı olan kapiller sayısında azalma ve yetersiz kan akışı (aralıklı) olan kapiller sayısında artma ile ilişkili olarak bölgesel kan akımı heterojenitesinde artış meydana gelir (32). Renal mikrosirkülasyon normal veya artmış böbrek kan akımında bile, sepsis ilişkili ABH sırasında bozulmuştur (67). Endotel disfonksiyonu, glikokaliks tabakasının hasar görmesi ve dökülmesi, artmış lökosit

aktivasyonu, eritrositlerin deforme olabilirliği, koagölasyon kaskadının aktivasyonu ve plateletlerin yapışması dahil birçok mekanizma bu karakteristik mikrosirkölasyon değişikliklerine neden olabilmektedir.(68) Mikrovasköler fonksiyon bozukluğunun gelişiminde rol oynadığı düşünölen mekanizmalar Şekil 2.3 de özetlenmiştir.(62)

Oluşan mikrovasköler şantlar ile hipoperfüzyon ve hipoksi alanları oluşmaktadır. Mikrodolaşımın otoregölasyonu, mikrovasköler akışın doku metabolik taleplerine yanıt sağlaması ve vasköler tonusu düzenlemek için önemli olan retrograd endotel iletişimi sepsis sırasında kaybedilir (69, 70). Endotel disfonksiyonu sonucunda artmış vasköler geçirgenlik ve interstisyel ödem görülür. (71, 72) İnterstisyel ödem sonucunda kapillerdeki oksijenin hücrelere iletimi için gereken difüzyon mesafesi artar ve hipoksi riski artar.(73) Böbrek gibi kapsüllü organlarda doku ödemi; venöz basıncın ve konjesyonun artışına ve sonuç olarak mikrovasköler dolaşımın kötüleşmesine sebep olur.(74, 75) Mikrodolaşımında ve endotel fonksiyonundaki bu değişikliklerin, organ işlev bozukluğunun oluşmasına doğrudan katkıda bulunduğu düşünölmektedir.

Sepsiste glomeröler filtrasyon hızında azalma görülür. Bu azalma üç temel mekanizmayla açıklanabilir; ortalama arter basıncında düşüş (glomeröler kapiller hidrostatik basıncın düşüşü), afferent arteriyolün vazokonstrüksiyonu ve efferent arteriyolün baskın vazodilatasyonu. (76)

Nitrik oksit de (NO) ABH patofizyolojisinde rol oynar. Nitrik oksitin non-selektif olarak inhibisyonu mikrovasköler akımı restore ederek renal fonksiyonları koruyabilir.(77) Sepsis sırasında toplam NO üretimi artmasına rağmen; indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ekspresyonunun heterojenitesi nitrik oksit ve vazodilatatör kapasiteden yoksun alanların oluşmasına ve bu yüzden bu alanlarda şantlaşma ve hipoksi riskinde artışa sebep olur. (78, 79).

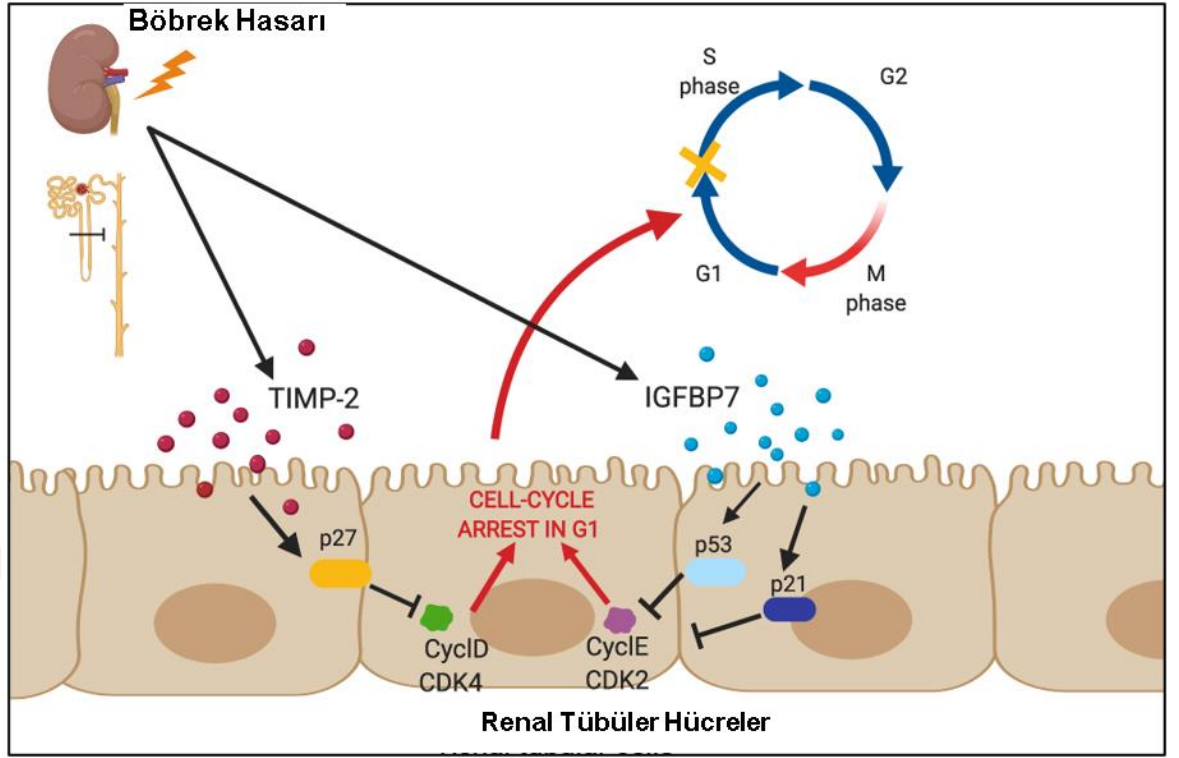


katabolize edilir. Sistatin-C sekrete edilmez, serumda ve idrarda ölçülebilir. Serum kreatinin düzeyinde meydana gelen değişikliklerin monitörizasyonu ile kıyaslandığında, ABH gelişim riskini 1,5 gün önceden belirleyebilmektedir.(86)

Böbrek Hasarı Molekülü-1 (KIM-1 / *Kidney Injury Molecule-1*) normalde bulunmayan fakat iskemi veya sisplatin gibi nefrotoksinler tarafından hasarlanan proksimal tübül hücrelerinin apikal membranından sentez edilen tip-1 transmembran proteindir. Hasarın erken döneminde, ilk 24 saatte idrarda KIM-1 artışı olduğunu ve hasarın boyutuyla orantılı olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. KIM-1 tübüler yaralanma olmadığında çok fazla miktarda tespit edilemez. KIM-1'in işlevsel rolü, tübüler hücrelere fagositik özellik kazandırmak ve akut hasara yol açan inflamatuvar yanıtı azaltmak olabilir. Hasarın tespiti ve tedavinin takibinde, KBY'nin erken dönem tespiti ve progresyonun izleniminde kullanılabilir (41, 87).

IGFBP-7 (Insulin Like Growth Factor Binding Protein-7) ve TIMP-2 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2); erken hücre hasarını gösteren, G1 hücre siklusu duraklama belirteçleridir. Hasar sonrasında renal tübüler hücreler, hücre siklusunun G1 aşamasında kısa süreli duraklamaya girerler. G1 hücre siklusu duraklaması bir tür koruyucu mekanizmadır ve hasarlı DNA'nın bölünmesini engeller (Şekil 2.4). IGFBP7 & TIMP-2 aynı zamanda otokrin ve parakrin yolla hasar bölgesinden salınan bir tür alarm görevi görürler (88) Mitokondrinin hücre döngüsünün düzenlenmesiyle yakından ilişkili olduğunu ve hücre döngüsünün durdurulmasının sepsis bağlamında önemli bir hücresel savunma stratejisi olabileceğini gösteren kanıtlar vardır (49). IGFBP-7 ve TIMP-2'nin birlikte analizi şu an için kritik hastalarda ABH gelişimi riski açısından en spesifik ve sensitivitesi yüksek test olarak tanımlanmaktadır (88-90).

**Şekil 2.4: Akut Böbrek Hasarında IGFBP-7 ve TIMP-2 'nin mekanizması (91)**



### 2.3. Uzak İskemik Önkoşullanma

Kısa süreli ve düşük derecede iskemi ve reperfüzyon periyotlarına maruz bırakılan doku ve organlarda uzun süreli iskemi sonrası hasar daha az olmaktadır. Bu durum İskemik Önkoşullanma (IPC-Ischemic preconditioning) olarak adlandırılmaktadır.(92) Bu yöntem ilk defa 1986'da Murry ve ark.'ı tarafından köpeklerin kalbinde yapılan araştırma ile gösterilmiştir. Miyokard infarktüsü geçiren köpeklerde, kısa iskemik atakların uzamış iskemi sonrası kardiyoprotektif etkisi gösterilerek ortaya çıkarılmıştır.(7)

İskemik önkoşullanmanın moleküler ve hücreyel koruyucu mekanizması tam olarak ispatlanmamış ve klinik kullanıma girmemiş olsa da, iskemik önkoşullanmanın adenozin reseptörlerini modüle ettiğine, K-ATP kanallarını aktive ettiğine, ROS (reaktif oksijen türlerinin) üretimini azalttığına ve TNF $\alpha$  ile NF $\kappa$ B ekspresyonunu azalttığına dair çok fazla kanıt vardır.(93, 94)

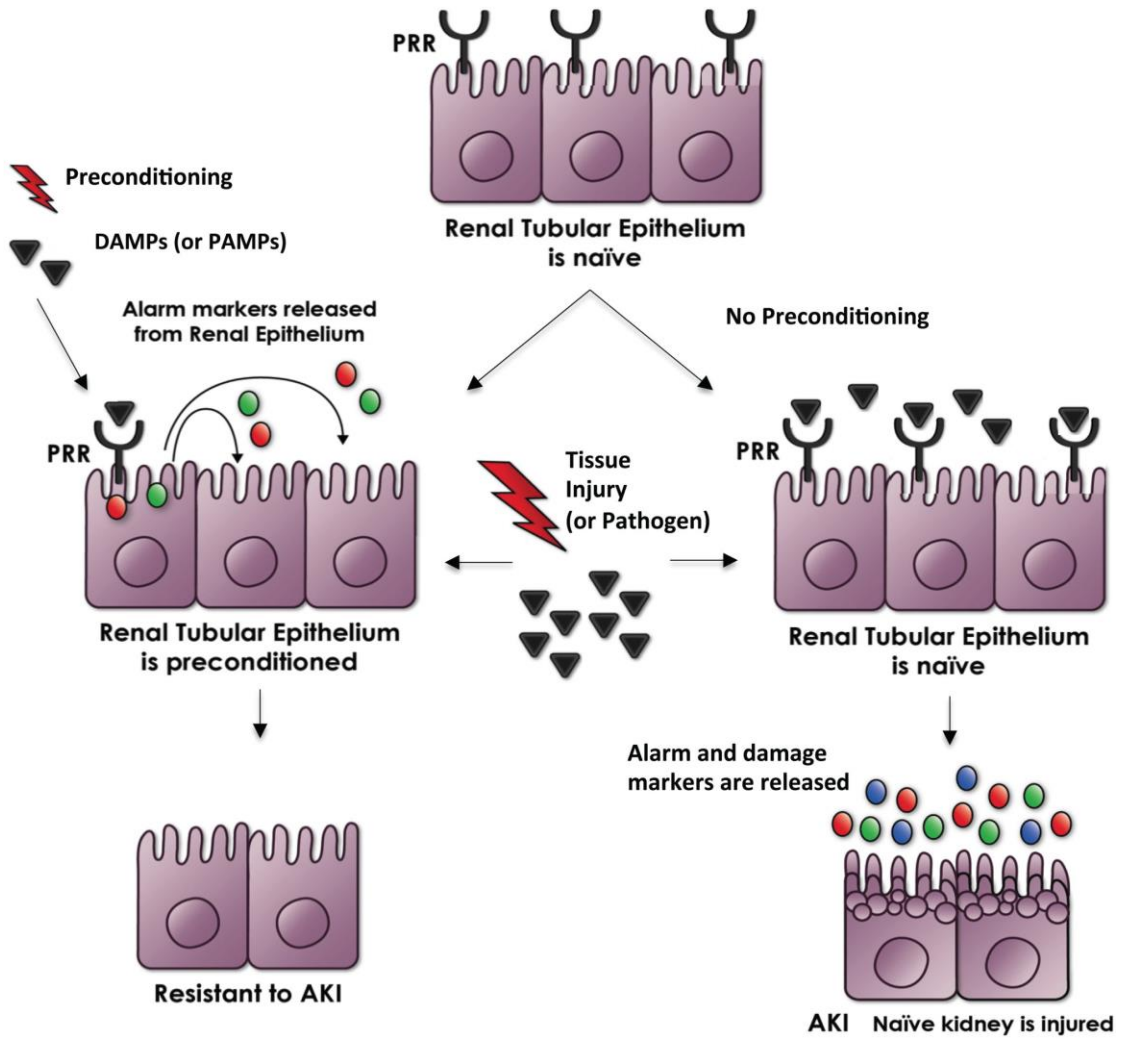
Uzak İskemik Önkoşullanma (Remote Ischemic Preconditioning- UİÖK), iskemik önkoşullanmayı uygulamanın başka bir yöntemidir. Uzak iskemik önkoşullanma ilk olarak 1993'te Przyklenk ve ark. tarafından kalpte gösterilmiştir UİÖK'nın temel mekanizması,

iskemik önkoşullanmanın vücudun başka bir bölgesine (genellikle alt ekstremitte) uygulanmasıyla bir organı iskemik hasara hazırlamaktır. (95, 96) Kol ve bacak gibi hedef dışı organa uygulanan kısa iskemilerin; kalp, böbrek, akciğer, beyin, barsak veya iskelet kası gibi uzaktaki organlarda koruma sağladığı gösterilmiştir. (9-11).

Uzak iskemik önkoşullanmanın sistemik antiinflamatuvar, nöronal ve hümmoral sinyal yollarını içeren çeşitli yolları aktive ettiği düşünülmektedir. (97) İskemiye bırakılan dokudan salınan nöral ve hümmoral mediyatörler, sitokinler ve interlökinler; reperfüzyon esnasında sistemik dolaşıma salınır. Salınan bu koruyucu maddeler, hedef organlarda (kalp, böbrek,beyin gibi ) hücre içi sinyal iletim yollarını aktive ederler. Hücre içi sinyal ileticileri, mitokondriyal fonksiyonları ve bir takım hücre içi kinazların kaskadını aktive eder. (96) Son yapılan çalışmalarla da UİÖK'nın hasar biyobelirteçlerinin salınımını azalttığını ve organ fonksiyonunu sürdürdüğünü gösteren kanıtlar artmaktadır. (11, 12, 98)

Uzak iskemik önkoşullanma kalp cerrahisi sonrası hastalar arasında ABH insidansını azaltmak için denenmiş pratik bir yöntemdir. Zarbock ve ark.'nın yaptığı çalışmada; UİÖK'nın böbrek koruyucu özelliğinin, UİÖK yapılan uzak bölgeden salınan hasar ilişkili moleküler paternler (DAMP) aracılığıyla gerçekleştiği öne sürüldü (Şekil 2.5). Hasar ilişkili moleküler paternler salındıktan sonra böbrek tarafından filtre edilir ve renal tübüler epitel hücrelerinin yüzeyinde TLR gibi, patern tanıma reseptörlerine (PRR-pattern recognition receptors) bağlanır. Bunun sonucunda hücre siklus arresti gibi koruyucu mekanizmaları başlatır. (99) Tübüler epitel hücrelerden salınan IGFB-7 ve TIMP-2 alarm biyobelirteçleri, otokrin ve parakrin sinyallerle hücre fonksiyonunu ve enerji tüketimini down-regüle eder. Daha sonraki cerrahi stress durumunda hem alarm hem de hasar belirteçlerinin salınması ile renal epitelyumda hasarlanma ile sonuçlanırken, bu hasarlanma kontrole kıyasla UİÖK durumunda zayıflatılmıştır.

Şekil 2.5: UİÖK'nın böbrek koruyucu mekanizması (97)



### 3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu deneysel çalışmanın tüm aşamaları Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 18.05.2018 tarihli 2018-019 Karar Sayılı etik kurul onayıyla gerçekleştirilmiştir.

#### 3.1.Çalışmada Kullanılan Deney Hayvanları

Çalışmada ağırlığı 300-375 gram aralığında olan, 60 adet Wistar Albino tipi rat kullanılmıştır. Çalışma hayvanlarının temini, beslenmesi, bakımı, deney ve uygulama aşamaları Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yapılmıştır. Oda ısısında ratlara 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık gün döngüsü uygulanmıştır. Ratlar rahatlıkla hareket edebilecekleri, su ve pellet yemi tüketebilecekleri kafeslere yerleştirilerek çalışma süresince bakılmıştır.

#### 3.2. Kullanılan Cihazlar ve Tıbbi İlaçlar

- Hemodinamik ve solunum monitörü (Bionet BM5, Bionet Co. Ltd. Seul/Kore)
- Anestezi cihazı (Beyza Medikal)
- İzoflurane (FORANE® - Abbott Tıbbi İlaç San. Tic. Ltd. Şti. Türkiye)
- İzoflurane vaporizatörü (Sigma- Penlon Limited Abingdon, United Kingdom)
- Kan gazı analizörü (ABL800 FLEX © -Radiometer Medical ApS, Denmark)
- İzolayt- S solüsyonu ve %0,9 İzotonik Sodyum Klorür (Eczacıbaşı-Baxter Hastane Ürünleri San. Tic. A.Ş.)
- Tansiyon manşonu (Drager Neonatal2 4.3- 8,0 cm) ve mmHG ölçülü basınç pompası

#### 3.3.Yöntem

Deneysel çalışmamız bir sham ve beş çalışma grubu olmak üzere toplam 6 gruptan oluştu. Her grupta 10'ar adet Wistar Albino ratlar kullanıldı. Bütün girişimsel işlemler isofluran inhaler anestezisi altında derinleştirilerek ve deneklerin spontan solunumları korunarak gerçekleştirildi. Çalışmamızda polimikrobiyal sepsis modeli oluşturmak için çekal ligasyon puncture (CLP) yöntemi kullanıldı. Deneklere ilk saatte 10ml/kg'dan sıvı verildi. Sonrasında

deney süresince 5ml/kg/saat olacak şekilde sıvı takviyesi yapıldı. Sıvı takviyesi olarak %0,9 izotonik NaCl veya İsolayt-S dengeli solüsyonu kullanıldı. Sonuçların ilaca bağlı böbrek hasarı ile karışmaması için hayvanlara antibiyotik tedavisi uygulanmadı.

Çalışmamızda sepsise bağlı gelişen ABH'nın önlenmesinde UİÖK'nın etkisinin sepsis evrelerine göre belirlenmesinde ratlar 6 gruba ayrılarak incelendi:

**Grup 1 (Sham):** Bu gruptaki ratlara anestezi altında İ.V kanül yerleştirildi, sıvı resüsitasyonu uygulandı. Ancak çekal ligasyon ve delme işlemi yapılmadı. UİÖK uygulanmadı. Prosedür sonunda deneklerden idrar, kan ve histopatolojik örnekler alınarak sakrifiye edildi.

**Grup 2:** Bu gruptaki ratlara anestezi altında CLP uygulandı. Çekal ligasyon ve delme işleminden **24 saat** sonra idrar, kan ve histopatolojik örnekleri alındı. UİÖK uygulanmadı.

**Grup 3:** Bu gruptaki deneklere anestezi altında CLP işlemi uygulandıktan **48 saat** sonra idrar, kan ve histopatolojik örnekler alınarak çalışma sonlandırıldı. UİÖK uygulanmadı.

**Grup 4:** Bu gruptaki ratlara prosedür başında UİÖK uygulandı. Anestezi altında CLP işlemi yapıldıktan **hemen** sonra idrar, kan ve histopatolojik örnekler alındı.

**Grup 5:** Başlangıçta UİÖK uygulanan bu grup ratlarda CLP işlemi yapıldıktan **24 saat** sonra çalışma sonlandırılıp idrar, kan ve histopatolojik örnekleri alındı.

**Grup 6:** Anestezi altında CLP işlemi uygulanmadan önce UİÖK uygulanan bu grup deneklerde cerrahi prosedürden **48 saat** sonra çalışma sonlandırılarak idrar, kan ve histopatolojik örnekleri alındı.

Prosedür sonlandırma ve örneklerin alınması yine Isofluran anestezisi altında yapıldı. Sonlandırma saatinde mesaneden aspirasyon ile idrar örnekleri alındı. İdrardan ELISA yöntemi ile TIMP-2 ve IGFBP-7 çalışılması için alınan idrar örnekleri -80 °C de saklandı. Sonrasında sol böbrek alınıp histopatolojik çalışmaya ayrıldı. Son olarak intrakardiyak kan örneği alınıp ötanazi kurallarına uygun olarak servikal dislokasyon ile prosedür sonlandırıldı.

Ratlardan alınan sol böbrekler histopatolojik çalışma için 24-72 saat formol ile fikse edilecek, sonrasında doku takip işlemi ve paraffin bloklama yapıldı. Hücresel düzeyde inceleme yapmak için Hematoksilen-Eozin boyama, PAS (Periodic Acid-Schiff) boyama ve TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling) yöntemi uygulandı.

### **3.3.1 Uzak iskemik Önkoşullanma Uygulanması**

Uzak iskemik önkoşullanma uygulanacak olan ratlar, CLP işlemi öncesinde alt ekstremiteye tansiyon manşonu bağlanarak 160 mmHg basıncın üzerinde tutulacak şekilde 5 dakika iskemi uygulandı. Uzak iskemik önkoşullanma her seferinde 5 dakika süreyle iskemi ve 5 dakika süreyle reperfüzyondan oluşmak suretiyle toplamda 3 siklus olarak uygulandı (100) (Resim 3.1.)

### **3.3.2. CLP yöntemiyle Sepsis Modeli Oluşturulması**

CLP yöntemiyle polimikrobiyal sepsis modeli oluşturuldu. Bütün ratlar isofluran inhalasyon anestezisi altında sırt üstü pozisyonda rektal prob ile vücut sıcaklığı ölçülerek, ısıtıcı operasyon masasına alındı. Abdominal bölgeleri ciltte hasar oluşturmamaya özen gösterilerek traş edildi. İki kez seyreltilmiş povidon iyot ile silinerek aseptik ortam sağlandı. 2 cm' lik orta hat insizyonu ile batın açıldı. Çekum bulunarak eksplore edildi. İlioçekal valvin distalinden çekumun %25' lik kısmı antimezenterik yerinden 3/0 ipek süturla bağlanarak 18 gauge iğne ile 2 kez delindi. Feçes çıkışı gözlemlendikten sonra çekum tekrar batına yerleştirildi. Batın 3/0 ipek süturla tekrar kapatıldı. Sham grubunda ise orta hat insizyonu yapıldı ve sonrasında herhangi bir işlem yapılmadan batın iki tabaka halinde 3/0 ipek süturla kapatıldı. Ratlara bu süreç içerisinde femoral ven kullanılarak sıvı resüsitasyonu uygulandı (Resim 3.1).

**Resim 3.1: Ratların Monitorizasyonu, Anestezi Uygulanması, Uzak İskemik Önkoşullanmanın Uygulanması ve CLP işlemi**



### **3.3.3. İdrarda IGFBP-7 ve TIMP-2 Seviyesinin Ölçülmesi**

Çalışmamızda idrarda IGFBP-7 ve TIMP-2 düzeyleri ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay technique) yöntemi ile ölçüldü (SinoGeneClon Biotech Co.,Ltd).

Uygulanan yöntemler özetle; Standart kuyucuklarına 50  $\mu$ L standart, numune kuyucuklarına 40  $\mu$ L numune diluenti ardından 10 $\mu$ L numune eklendi. İnkübasyon: Mikroplate üzeri kapatılarak 30 dakika 37°C'de inkübe edildi. Distile su ile yıkama çözeltisi 30 kat seyreltildi. Mikroplate içindeki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra 5 kez yıkama işlemi

yapıldı. 50µL HRP-Conjugate reaktifi eklendi. Tekrar inkübasyon ve yıkama işleminden sonra her bir kuyucuğa 50µL Kromojen solüsyon A ve ardından 50µL Kromojen solüsyon B eklendi. Işıktan koruyarak 15 dakika 37° C de inkübe edildi. Stop reaksiyonu: Herbir kuyucuğa 50µL Stop solüsyonu eklendi ve reaksiyon durduruldu (mavi-sarı renk değişimi). Okuma: 15 dakika içinde 450nm de absorbans okundu. Bu işlemler için Tıbbi Biyokimya Araştırma Laboratuvarında bulunan BioTek marka mikroplate strip yıkayıcı (ELx50) ve BIO-RAD x Mark Mikroplate marka spektrofotometre cihazları kullanıldı.

Akut böbrek hasarının öngörülmesinde idrarda ölçülen IGFBP-7 ve TIMP-2 moleküllerin tek başına değerlendirilmesinden daha değerli olduğu iddia edilen her iki molekülün ortak değerlendirilmesi olan [IGFBP-7\*TIMP-2] aşağıdaki formülle belirlendi:

$$[\text{IGFBP} - 7 * \text{TIMP} - 2] = [(\text{IGFBP} - 7 \times \text{TIMP} - 2) \div 1000 ]$$

### 3.4.Histopatolojik İncelemeler

Tüm gruptaki ratların sol böbrekleri işlem sonunda alınarak %4' lük formaldehit içeren patoloji kaplarına konuldu ve aşağıdaki belirtilen sıraya göre doku takip işlemleri yapıldı:

1. Suda yıkama (gün boyu)
2. %70'lik alkolde (Merck)<sup>®</sup> bir gece bekletme,
3. %80'lik alkolde 1 saat bekletme,
4. %96'lık alkolde 1 saat bekletme,
5. %96'lık alkolde 1 saat bekletme,
6. %100'lük alkolde 1 saat bekletme,
7. %100'lük alkolde 1 saat bekletme,
8. Ksilende (Merck)<sup>®</sup> 10 dakika bekletme,
9. Ksilende 10 dakika bekletme,
10. Ksilin+ boncuk parafin (Merck)<sup>®</sup> karışımında 60°C' lik etüvde 1 saat bekleme,
11. Boncuk parafinde 60°C' lik etüvde 1 saat bekleme,
12. Boncuk parafinde 60°C' lik etüvde 2 saat bekleme,

Ardından parafin bloklara gömülerek kesit alma işlemlerine hazır hale getirildi. Sonrasında parafin bloklardan Mikrotom (Leica RM2125RT) ile kesilen 5µm'lik kesitler cam lamlar üzerine alındı ve boyama amacı ile aşağıda sıralanan işlemlere tabi tutuldu:

1. Ksilolde 20 dakika bekletme,
2. Ksilolde 10 dakika bekletme,
3. %80'lik alkolde 10 dakika bekletme,
4. İki ayrı %96'lık alkol serisinde 5 er dakika bekletme,

5. Çeşme suyunda yıkama,
6. Hematoksilen boyasında 10 dakika bekletme,
7. Asit- Alkol karışımına batırıp çıkarma,
8. Eozin solüsyonunda 1 dakika bekletme,
9. Suda 1 dakika yıkama,
10. %80'lik alkolde 10 dakika bekletme,
11. İki ayrı %96'lık alkol serisinde 10 dakika bekletme,
12. Ksilol serilerinde 20 dakika bekletme,
13. Entellan ile kaplama işlemleri uygulandı.

Periyodik Asit Schiff (PAS) boyası ile boyamak için aşağıda sıralanan işlemler uygulandı:

1. Kesitler, deparafinize edildi.
2. Yıkayıp distile suya alındı.
3. Periyodik asit solüsyonunda 20 dakika bekletildi.
4. Distile suda yıkama yapıldı.
5. Schiff solüsyonunda 20 dakika bekletildi.
6. Çeşme suyunda 10 dakika yıkandı.
7. Harris hematoksilende 1 dakika boya uygulandı.
8. Distile suda iyice yıkayıp amonyaklı sudan geçirildi.
9. Distile suda yıkayıp alkol, aseton ve ksilolden geçirildi.
10. Balzamlı kapatıldı.

TUNEL Boyama yöntemi ile apoptozis değerlendirilmesi (ApopTag®, Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit) için aşağıdaki işlemler sırası ile uygulandı:

1. Parafin bloklardan 4 mikron kalınlığında kesilen dokular lam üzerine alındı.
2. Etüvde 55°C derecede 1-2 saat bekletildi.
3. İki kez 10'ar dakika ksilen, iki kez 5'er dakika absolü alkolde, iki kez 5'er dakika %96'lık alkolde bekletildi. 3 kez 2'şer dakika distile suda bekletildi. 5 dakika PBS (Phosphate buffered saline) içinde bekletildi.
4. Deparafinizasyonun ardından 15 dakika proteinaz K uygulandı.
5. İki defa 2'şer dakika PBS ile yıkandı. 20 dakika %3'lük hidrojen peroksit uygulandı.
6. 5 dakika distile su ile yıkama, iki defa 2'şer dakika PBS ile yıkama
7. 10 saniye ecalibration buffer uygulandı. İki defa 2'şer dakika PBS ile yıkandı.
8. TDT enzim (antikor) ile 1 saat 37 °C derecede etüvde bekletildi.
9. 10 dakika Stop Wash Buffer uygulandı. 2 defa 2'şer dakika PBS ile yıkandı
10. 30 dakika Anti –Digoksinin uygulandı. 2 defa 2'şer dakika PBS ile yıkandı.

11. 15 dakika DAB (peroksidaz substrat) uygulandı. 3 defa 2'şer dakika distile su ile yıkandı.
12. 5 dakika %0,5'lik metilen gr n uygulandı. 5 dakika distile suyla yıkandı, havada kurutuldu, ksilen bazlı kapama malzemesi ile kapatıldı.

İncelemeye hazır hale gelen doku kesitleri, ışık mikroskopuyla (Olympus BH-40 kamera ataçmanlı) incelenerek ilgili bütün grupların fotoğrafları çekildi. İncelemeler, bu konuda daha önce de çalışmaları olan deneyimli bir patolog tarafından k r olarak yapılmıştır. Hazırlanan preparatlarda nekroz, fırçamsı kenar kaybı, cast formasyonu oluşumu, vakuolizasyon ve tübüler dilatasyon incelenmiştir.

İncelemelerin sonucunda Tübüler Hasar Skoru (Tubular Damage Score) olarak da bilinen skorlama sistemine göre(101, 102).

- 0- (Hasar yok),
- 1-(%1-10),
- 2-(%11-25),
- 3-(%26-50),
- 4-(%51-75),
- 5-(>%75) olmak üzere 5 dereceye (grade) ayrılmıştır.

Ek olarak apopitozis incelenmesi için TUNEL yöntemi uygulanan preparatlardan da total apopitoz miktarı değerlendirilmiştir.

### **3.5. İstatistiksel Analiz**

IBM SPSS Statistics 22 bilgisayar programına veriler girildi. Normal dağılıma göre uygunluk analizleri yapıldı. Ortaya çıkan değerler ortalama  $\pm$  standart deviasyon şeklinde gösterildi. Çoklu karşılaştırmalarda "Kruskal Wallis" varyans analizi yapıldı. İkili grup karşılaştırmalarında ise "Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi" kullanıldı. Deėiřkenler arası ilişki "Spearman korelasyonu" analiziyle elde edildi. Bütün analizlerde anlamlılık düzeyi  $p < 0,05$  olarak belirlendi.

## 4.BULGULAR

Septik ratlarda UİÖK'nın ABH gelişimi üzerine etkisini incelediğimiz bu çalışmamızda ratlar, her bir grupta 10 adet olacak şekilde altı gruba ayrıldı. Sepsis modeli olarak çekal ligasyon ve ponksiyon (CLP) yöntemi kullanıldı. Grup 1 (Sham)'de sadece abdominal insizyon uygulanırken, Grup 2 ve 3'te sırasıyla CLP işleminden 24 ve 48 saat sonra örnekler elde edildi. UİÖK'nın uygulandığı gruplardan Grup 4'de CLP uygulanmazken, Grup 5 ve 6'da sırasıyla CLP işleminden 24 ve 48 saat sonra çalışma sonlandırılarak biyokimyasal ve histolojik örnekler alındı.

### 4.1. Böbreklerin Histopatolojik İncelenmesi

Çalışmamızda histopatolojik inceleme amaçlı olarak ratların sol böbrekleri kullanılırken, incelemede Hematoksilen-Eozin, Pas boyama ve apoptozisi değerlendirmek için TUNEL yöntemi kullanılmıştır. Hazırlanan preparatlarda nekroz, fırçamsı kenar kaybı, vakuolizasyon, cast formasyonu oluşumu ve tübüler dilatasyon incelenmiştir. Çalışmamızda histopatolojik incelemelerde tübüler hasar tespit edilen preparatlarda ağırlıklı olarak fırçamsı kenar kaybı, tübüler dilatasyon ve vakuolizasyon bulguları görülmüştür (Resimler 4.1, 4.2, 4.3,).

Böbrekteki patolojik hasarın derecelendirilmesi için "Tübüler Hasar Skoru" kullanılmıştır (Tablo 4.1) (101, 102). Hasarsızlık durumunun sıfır kabul edildiği bu skorlama sistemi 5 sınıf (*grade*) üzerinden derecelendirilmiştir. Çalışmamızda Tübüler Hasar Skoru; sham grubuna göre CLP uyguladığımız yani sepsisli ratlarda 24 (Grup 2) ve 48. (Grup 3) saatte anlamlı olarak artmıştır ( $p<0.05$ ). Bu artış sepsisin 24. saatine (Grup 2'ye) göre; 48. saatte (Grup 3'te) anlamlı olarak yüksek tespit edilmemiştir ( $p>0.05$ ). CLP işleminden önce UİÖK uygulanan ratlarda sham ve Grup 4'e göre tübüler hasar skoru sepsisin 24 (Grup 5) ve 48. saatinde (Grup 6) yüksek olarak belirlenirken ( $p<0.05$ ), yine sepsisin 24. (Grup 5) ve 48. saatti arasında (Grup 6) tübüler hasar skoru açısından anlamlı fark gözlenmedi ( $p>0.05$ ). Polimikrobiyal sepsis oluşturulup UİÖK uygulanan (Grup 5 ve 6) ve uygulanmayan (Grup 2 ve 3) grupların tübüler hasar skorları kıyaslandığında istatistiksel açıdan UİÖK uygulanan gruplarda anlamlı olarak düşük hasar skorları elde edildi. Grupların Tübüler Hasar Skoru derecelerinin ortalama  $\pm$  SD değerleri, değişim grafiği ve istatistiksel karşılaştırmaları Tablo 4.2, Grafik 4.1 ve Tablo 4.3 'te verilmiştir.

Çalışmamızda sepsise bağlı gelişen ABH'nın patolojisini anlamak ve UİÖK'nın apoptozise yönelik koruyucu etkisini değerlendirmek içinde apoptozis histopatolojik olarak incelenmiştir: Sham grubuna göre tübüler hasar görülen guruplarda (Grup 2 ve 3) apoptosiz

yönünden anlamlı fark tespit edilmemiş, benzer olarak bulunmuştur ( $p>0.05$ ). Sepsis sonrası 24.(Grup 2) ve 48. saatlerdeki gruplara göre (Grup 3); işlem öncesi UİÖK yapılan gruplarda (Grup 5 ve Grup 6), apoptozisteki azalma anlamlı olarak belirlenmiştir ( $p<0.05$ ). Apoptozise yönelik histopatoloji örneklerinin TUNEL boyama ile mikroskopik görüntüleri Resim 4.4.'de, grupların apoptozis derecelerinin ortalama  $\pm$  SD değerleri, değişim grafiği ve istatistiksel karşılaştırmaları Tablo 4.2, Grafik 4.1 ve Tablo 4.3 'te verilmiştir.

**Tablo 4.1 Tübüler Hasar Skoru (101, 102).**

Hasar Yüzdesi	Hasar Skoru Derecesi
%0	0 (Hasar Yok)
%1-10	Grade 1
%11-25	Grade 2
%26-50	Grade 3
%51-75	Grade 4
$\geq$ %76	Grade 5

**Tablo 4.2. Grupların Tübüler Hasar Skoru ve Apoptozis dereceleri (Ort  $\pm$  SD).**

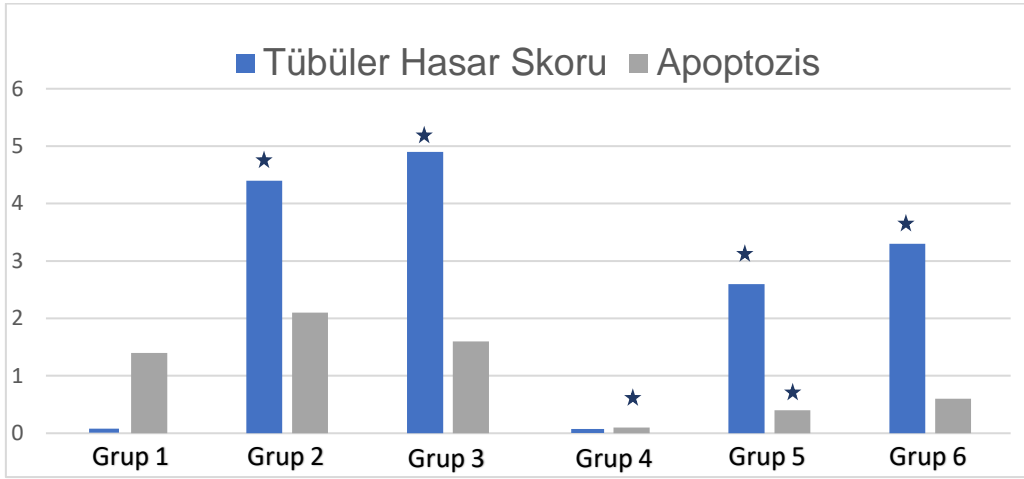
Gruplar	Tübüler Hasar Skoru	Apoptozis
<b>Grup 1</b> (Sham)	0	1,4 $\pm$ 0,97
<b>Grup 2</b> (CLP + 24.saat)	4,4 $\pm$ 0,52*	2,1 $\pm$ 1,1
<b>Grup 3</b> (CLP + 48.saat)	4,9 $\pm$ 0,32*	1,6 $\pm$ 1,17
<b>Grup 4</b> (UİÖK)	0 <sup>ε°</sup>	0,1 $\pm$ 0,32* <sup>ε°</sup>
<b>Grup 5</b> (UİÖK+CLP 24.saat)	2,6 $\pm$ 0,52* <sup>ε°#</sup>	0,4 $\pm$ 0,52* <sup>ε°</sup>
<b>Grup 6</b> (UİÖK+CLP 48.saat)	3,3 $\pm$ 0,82* <sup>ε°#</sup>	0,6 $\pm$ 0,84 <sup>ε°</sup>

\*  $P<0,05$ , Sham grubu ile karşılaştırıldığında; <sup>ε</sup>  $P<0,05$ , Grup 2 ile karşılaştırıldığında;

<sup>°</sup> $P<0,05$ , Grup 3 ile karşılaştırıldığında; #  $P<0,05$ , Grup 4 ile karşılaştırıldığında;

Ort  $\pm$  SD: (ortalama  $\pm$  standart sapma)

**Grafik 4.1 Grupların Tübüler Hasar Skoru ve Apoptozis derecelerinin karşılaştırılması**

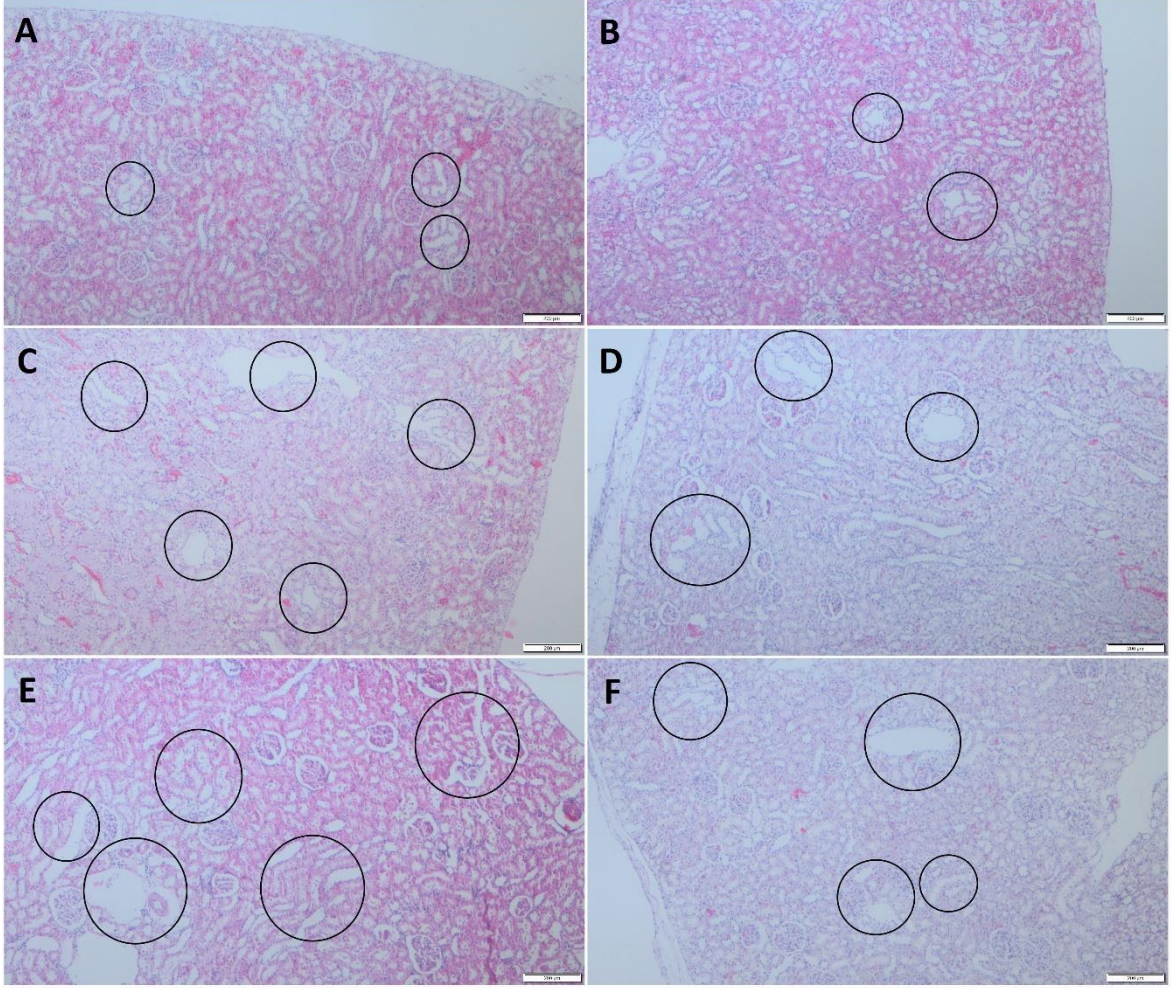


\* P<0,05, Sham grubu ile karşılaştırıldığında

**Tablo 4.3. Tübüler Hasar Skoru ve Apoptozisin Gruplar Arası İstatistiksel Karşılaştırması**

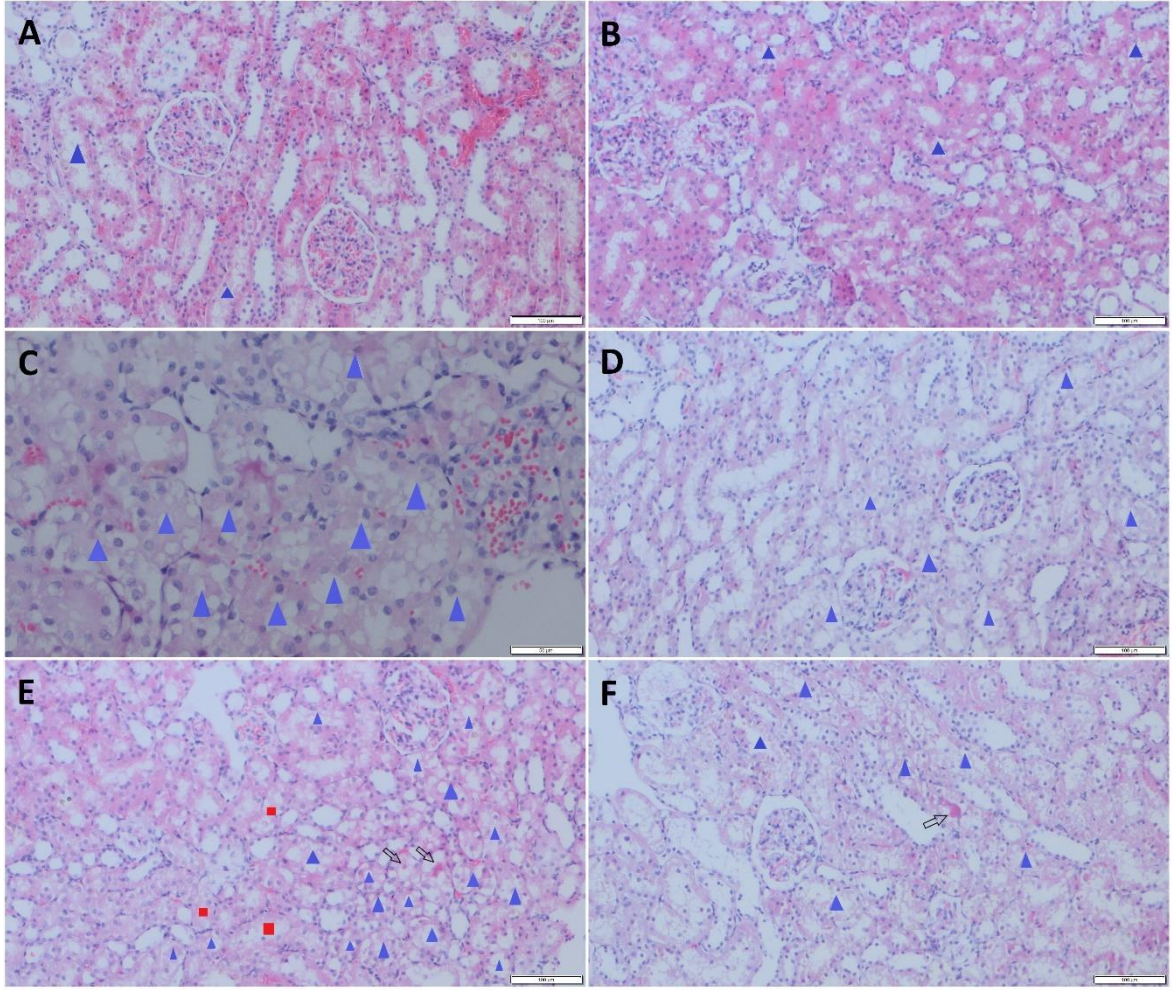
Grupların Karşılaştırması	Tübüler Hasar	Apoptozis
Sham x Grup 2	P=0,000	P=0,24
Sham x Grup 3	P=0,000	P=0,912
Sham x Grup 4	P=1,000	P=0,003
Sham x Grup 5	P=0,000	P=0,023
Sham x Grup 6	P=0,000	P=0,089
Grup 2 x Grup 3	P=0,063	P=0,280
Grup 2 x Grup 4	P=0,000	P=0,000
Grup 2 x Grup 5	P=0,000	P=0,000
Grup 2 x Grup 6	P=0,005	P=0,005
Grup 3 x Grup 4	P=0,000	P=0,001
Grup 3 x Grup 5	P=0,000	P=0,011
Grup 3 x Grup 6	P=0,000	P=0,050
Grup 4 x Grup 5	P=0,000	P=0,280
Grup 4 x Grup 6	P=0,000	P=0,247
Grup 5 x Grup 6	P=0,075	P=0,796

**Resim 4.1 Sepsis dönemlerinde gruplarda sık görülen histopatolojik bulguların örneklerinden tübül dilatasyonu**



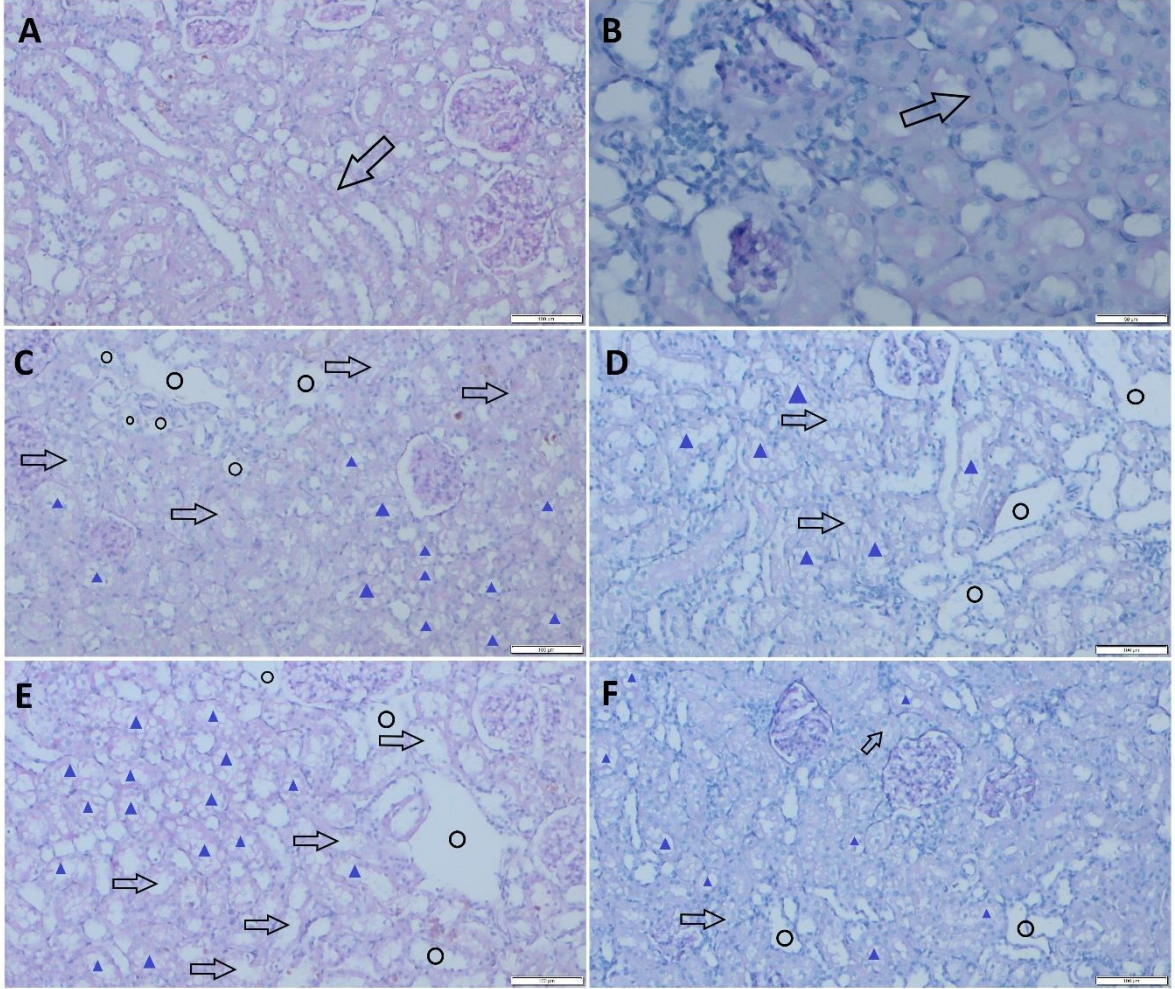
Tübül dilatasyonu ve dilate tübüllerde epitel basıklaşması (yuvarlak işaretli alanlar) sham grubunda (A) ve CLP'siz UİÖK grubunda (B) birkaç tübülde izlenirken, UİÖK uygulanmayan sepsisin 24. (C) ve 48. saattinde (E) artan oranlardadır. UİÖK+24 saat (D) ve 48 saat grubunda ise (F) UİÖK uygulanmayan gruplara göre daha az oranda izlenmektedir (Hemotoksilen/Eozin; A, B, C, D, E, F, 40x).

**Resim 4.2 Sepsis dönemlerinde gruplarda sık görülen histopatolojik bulguların örneklerinden vakuolizasyon**



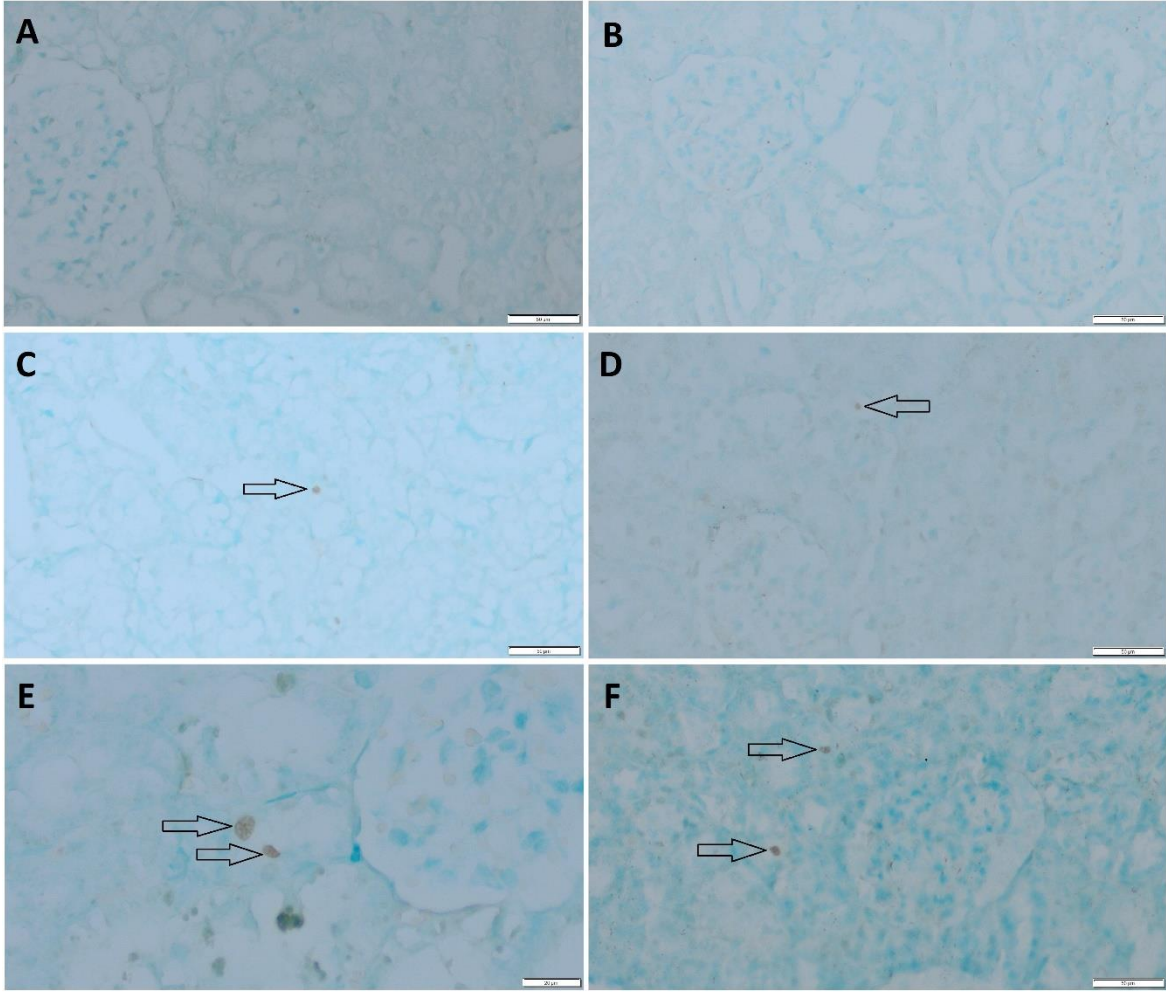
Tübül epitellerinde vakuolizasyon (üçgen işaretli tübüller) sham grubunda (A) ve CLP'siz UİÖK grubunda (B) düşük oranlarda iken, UİÖK uygulanmayan sepsisin 24. (C) ve 48. saatinde (E) artmıştır. UİÖK+24 saat (D) ve 48 saat grubunda ise (F) UİÖK uygulanmayan gruplara göre vakuolizasyon azalmaktadır. E grubunda birkaç tübül epitelinde nekroz (kare işaretli), E ve F grubunda seyrek tübül lümeninde cast oluşumu (oklar) izlenmektedir (Hemotoksilen/Eozin; A, B, D, E, F, 100x; C, 200x).

**Resim 4.3 Sepsis dönemlerinde gruplarda sık görülen histopatolojik bulguların örneklerinden fırçamsı kenar kayıpları**



Sham grubunda (A) ve CLP'siz UİÖK grubunda (B) grubunda tübüllerin fırçamsı kenarları düzenli yapıda izlenmektedir (oklar), seyrek tübül dilatasyonu mevcuttur. UİÖK uygulanmayan sepsisin 24. (C) ve 48. saattinde (E) giderek artan oranda fırçamsı kenar kayıpları (oklar), tübül epitellerinde vakuolizasyonlar (üçgen), tübül dilatasyonları ve epitellerinde basıklaşma izlenmektedir (yuvarlak işaretler). UİÖK+24 saat (D) ve 48 saat grubunda ise (F) UİÖK uygulanmayan gruplara göre daha az oranda tübül dilatasyonu, vakuolizasyon ve fırçamsı kenar kayıpları görülmektedir (PAS; A, C, D, E, F, 100x; B, 200x).

#### Resim 4.4 Sepsis dönemlerinde gruplarda apoptozise yönelik histopatoloji örneklerinin TUNEL boyama ile mikroskopik görüntüleri

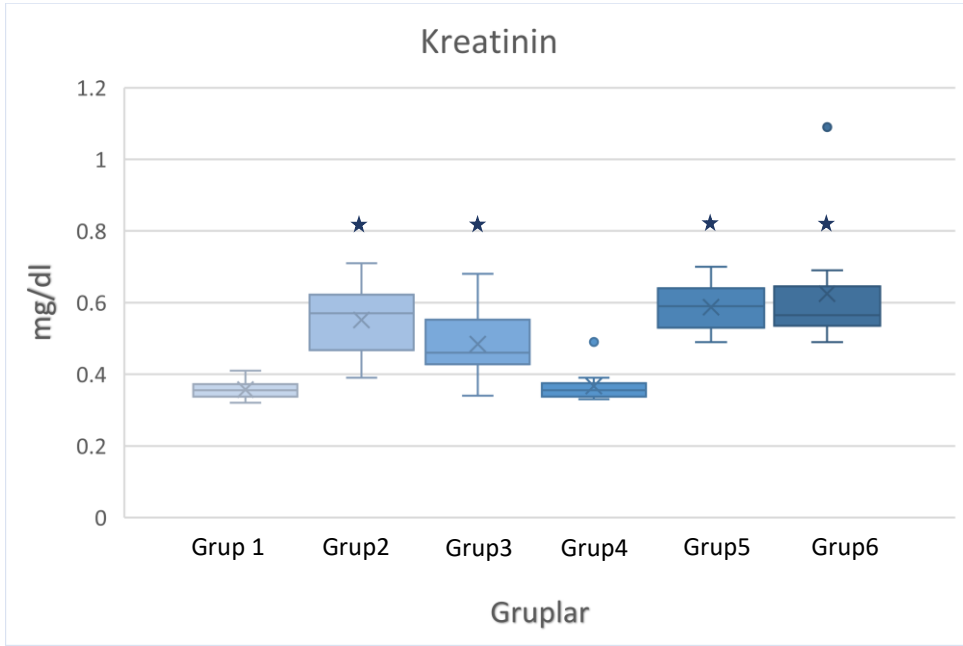


TUNEL boyamada sham grubu (A) ve CLP'siz UİÖK grubunda (B) apoptotik hücre görülmezken, UİÖK uygulanmayan sepsisin 24. saatinde (C) 1 adet, UİÖK +24 saat grubunda (D) 1 adet, UİÖK uygulanmayan sepsisin 48. saatinde (E) 2 adet, UİÖK+48 saat grubunda 2 adet apoptotik hücre (oklar) izlenmektedir (TUNEL; A, B, C, D, F, 200x; E, 400x).

#### 4.2. Serum Kreatininin Düzeyinin Değerlendirmesi

Çalışmamızda serum kreatinin değerleri sepsisin 24. ve 48. saatinde sham grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ( $p < 0,05$ ). Ancak sepsis sonrası 24. ve 48. saatlerde; işlem öncesi UİÖK yapılan gruplarda yapılmayanlara göre kreatininde anlamlı bir değişiklik görülmemiştir ( $p > 0,05$ ). Her bir grubun serum kreatinininin ortalama  $\pm$  SD değerleri Tablo 4.4'te, gruplar arası istatistiksel karşılaştırması Tablo 4.5'te ve değerlerin gruplara göre değişimi Grafik 4.2.'de gösterilmiştir.

**Grafik 4.2. Serum kreatinin değerlerinin gruplara göre değişimi (mg/dL)**



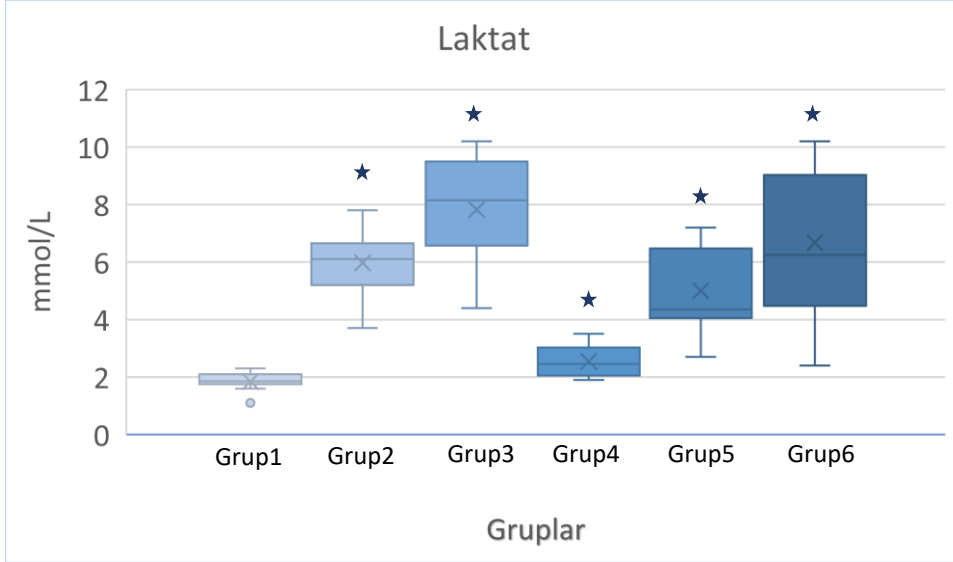
★P<0.05, Sham grubu ile kıyaslandığında

### 4.3. Serum Laktat Düzeyinin Değerlendirmesi

Çalışmamızda serum laktat düzeyi sepsisin 24. ve 48. saatinde sham grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ( $p<0,05$ ). Ayrıca sadece UİÖK uygulanıp CLP yapılmayan grupta da sham grubuna göre anlamlı artış görülmüştür ( $p<0,05$ ). CLP işlemi öncesi UİÖK uygulanan gruplarda, uygulanmayanlara göre laktat düzeylerinin ortalamasında azalma görülmüş fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bir değere ulaşmamıştır.

Her bir grubun serum laktat düzeylerinin ortalama  $\pm$  SD değerleri Tablo 4.4'te, gruplar arası istatistiksel karşılaştırması Tablo 4.5'te ve gruplara göre serum laktat değerlerinin değişimi Grafik 4.3.'de özetlenmiştir.

**Grafik 4.3. Serum laktat düzeylerinin gruplara göre değişimi**



★P<0.05, Sham grubu ile kıyaslandığında

**Tablo 4.4 Grupların, Kreatinin, Laktat, IGFBP-7, TIMP-2, [IGFBP-7\*TIMP-2] Değerleri (Ort ± SD).**

Gruplar	Kreatinin	Laktat	IGFBP.7	TIMP.2	IGFBP 7* TIMP-2
<b>Grup 1</b> (Sham)	0,35±0,02	1,84±0,32	47,10±4,58	5,20±0,85	0,24± 0,05
<b>Grup 2</b> (CLP + 24.saat)	0,55±0,09*	5,97±1,18*	177,12±34,52*	29,09±6,74*	5,16± 1,89*
<b>Grup 3</b> (CLP + 48.saat)	0,48±0,09*	7,82±1,95* <sup>ε</sup>	370,01±164,88* <sup>ε</sup>	53,29±29,56* <sup>ε</sup>	23,69±19,5* <sup>ε</sup>
<b>Grup 4</b> (ÜİÖK)	0,36±0,04* <sup>°</sup>	2,54±0,54* <sup>°</sup>	55,63±6,55 * <sup>°</sup>	7,88±0,98 * <sup>°</sup>	0,44±0,08 * <sup>°</sup>
<b>Grup 5</b> (ÜİÖK+CLP 24.saat)	0,58±0,06* <sup>°</sup> #	5±1,49* <sup>°</sup> #	111,24±18,29* <sup>°</sup> #	21,15±5,98* <sup>°</sup> #	2,43±1,01* <sup>°</sup> #
<b>Grup 6</b> (ÜİÖK+CLP 48.saat)	0,62±0,17* <sup>°</sup> #	6,67±2,59* <sup>#</sup>	209,5±76,54* <sup>°</sup> #	27,85±6,71* <sup>°</sup> #	6,11±3,11* <sup>°</sup> #

\* P<0,05, Sham grubu ile karşılaştırıldığında; <sup>ε</sup> P<0,05, Grup 2 ile karşılaştırıldığında;

<sup>°</sup>P<0,05, Grup 3 ile karşılaştırıldığında; # P<0,05, Grup 4 ile karşılaştırıldığında; Ort ± SD,

ortalama ± standart sapma

**Tablo 4.5. Gruplar Arası İstatistiksel Karşılaştırma.**

Grupların Karşılaştırılması	Kreatinin	Laktat	IGFBP.7	TIMP.2	IGFBP 7* TIMP2
Sham x Grup 2	P=0,000	P=0,000	P=0,000	P=0,000	P=0,000
Sham x Grup 3	P=0,000	P=0,000	P=0,000	P=0,000	P=0,000
Sham x Grup 4	P=0,912	P=0,002	P=0,005	P=0,000	P=0,000
Sham x Grup 5	P=0,000	P=0,000	P=0,000	P=0,000	P=0,000
Sham x Grup 6	P=0,000	P=0,000	P=0,000	P=0,000	P=0,000
Grup 2 x Grup 3	P=0,165	P=0,023	P=0,003	P=0,023	P=0,003
Grup 2 x Grup 4	P=0,000	P=0,000	P=0,000	P=0,000	P=0,000
Grup 2 x Grup 5	P=0,436	P=0,218	P=0,000	P=0,009	P=0,000
Grup 2 x Grup 6	P=0,529	P=0,684	P=0,353	P=0,971	P=0,280
Grup 3 x Grup 4	P=0,003	P=0,000	P=0,000	P=0,000	P=0,000
Grup 3 x Grup 5	P=0,015	P=0,002	P=0,002	P=0,002	P=0,002
Grup 3 x Grup 6	P=0,011	P=0,315	P=0,023	P=0,011	P=0,007
Grup 4 x Grup 5	P=0,000	P=0,000	P=0,000	P=0,000	P=0,000
Grup 4 x Grup 6	P=0,000	P=0,000	P=0,000	P=0,000	P=0,000
Grup 5 x Grup 6	P=0,912	P=0,089	P=0,000	P=0,019	P=0,002

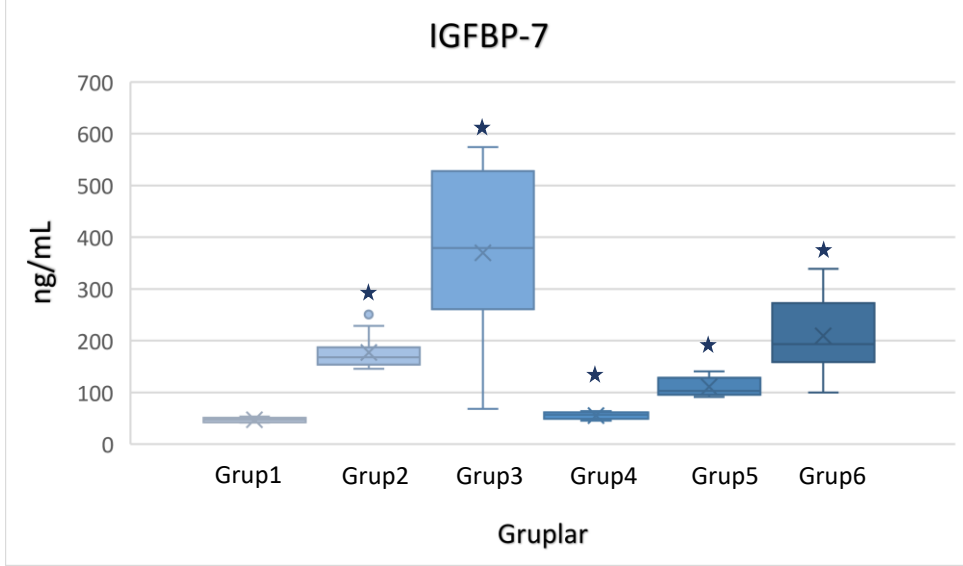
#### 4.4 Hücre Siklus Arrest Biyobelirteçlerinin Düzeylerinin Değerlendirmesi

İdrar numunesinden ölçülen hücre siklus arrest biyobelirteçleri, hem IGFBP-7 hem de TIMP-2 sepsis sonrası 24. (Grup 2) ve 48. saatlerde (Grup 3) sham grubuna göre anlamlı artış gösterdi ( $p<0.05$ ). Bu artış sepsisin 48. saatinde 24. saate göre anlamlı olarak daha yüksekti ( $p<0.05$ ). Sham grubu ile sadece UİÖK uygulanıp CLP uygulanmayan grup arasında bu iki biyobelirteç yönünden anlamlı fark tespit edildi ( $p<0.05$ ). CLP öncesi UİÖK uygulanan gruplarla (Grup 5 ve 6) uygulanmayan gruplar (Grup 2 ve 3) arasında hem IGFBP-7 hem de TIMP-2 değerlerinde UİÖK uygulananlarda anlamlı azalma belirlendi ( $p<0.05$ ).

Akut böbrek hasarının öngörülmesinde bu moleküllerin tek başlarına değerlendirilmesinden daha değerli olduğu iddia edilen her iki molekülün ortak değerlendirilmesi [ $(IGFBP - 7 \times TIMP - 2) \div 1000$ ] çalışmamızda incelendiğinde sham grubuna ve birbirlerine kıyasla sepsisin 24.saatinde ve 48.saatinde anlamlı olarak arttı ( $p<0.05$ ). Ayrıca sepsis sonrası 24. ve 48. saatlerde; işlem öncesi UİÖK yapılan gruplarda, yapılmayanlara göre IGFBP7\*TIMP2 değerlerinde anlamlı azalma görüldü ( $p<0.05$ ). Grup 1 ve Grup 4 arasında anlamlı fark tespit edildi ( $p<0.05$ ).

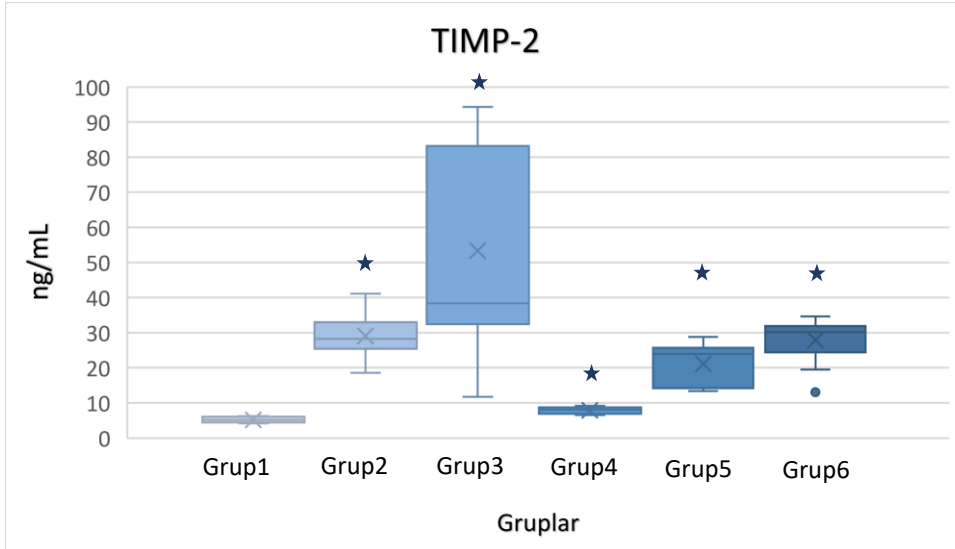
Çalışmamızda ratların idrar numunelerinden ölçtüğümüz hücre siklus arrest biyobelirteçlerinin ortalama  $\pm$  SD değerleri Tablo 4.4'te, gruplar arası istatistiksel karşılaştırması Tablo 4.5'te, gruplara göre IGFBP-7, TIMP-2, IGFBP7\*TIMP2 değişimi sırasıyla Grafik 4.4, 4.5 ve 4.6'da özetlenmiştir.

**Grafik 4.4. İdrar IGFBP-7 düzeylerinin gruplara göre değişimi (ng/mL).**



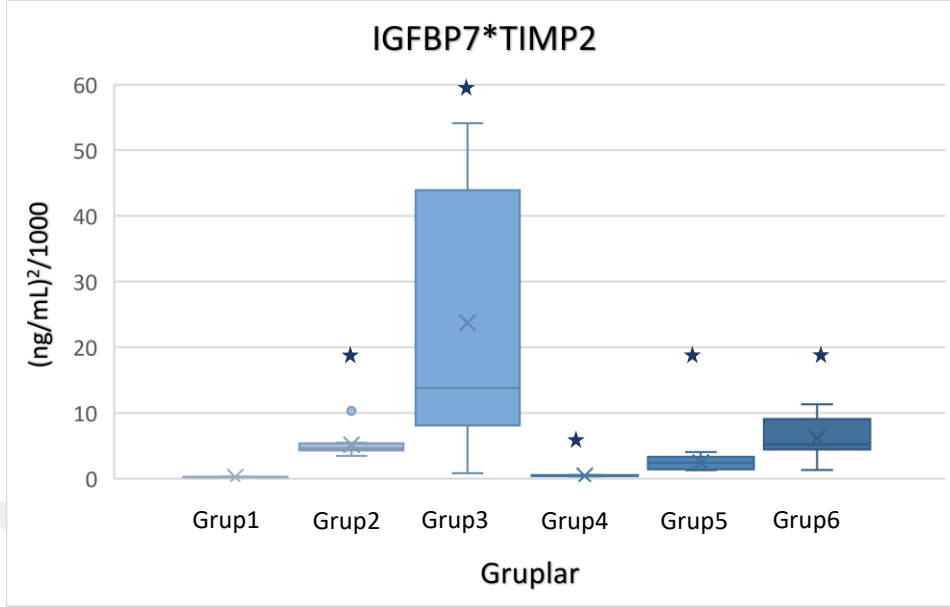
★P<0.05, Sham grubu ile kıyaslandığında

**Grafik 4.5. İdrar TIMP-2 düzeylerinin gruplara göre değişimi (ng/mL).**



★P<0.05, Sham grubu ile kıyaslandığında

**Grafik 4.6. İdrar IGFBP7\*TIMP 2 düzeylerinin gruplara göre değişimi [(ng/mL)<sup>2</sup>/1000]**



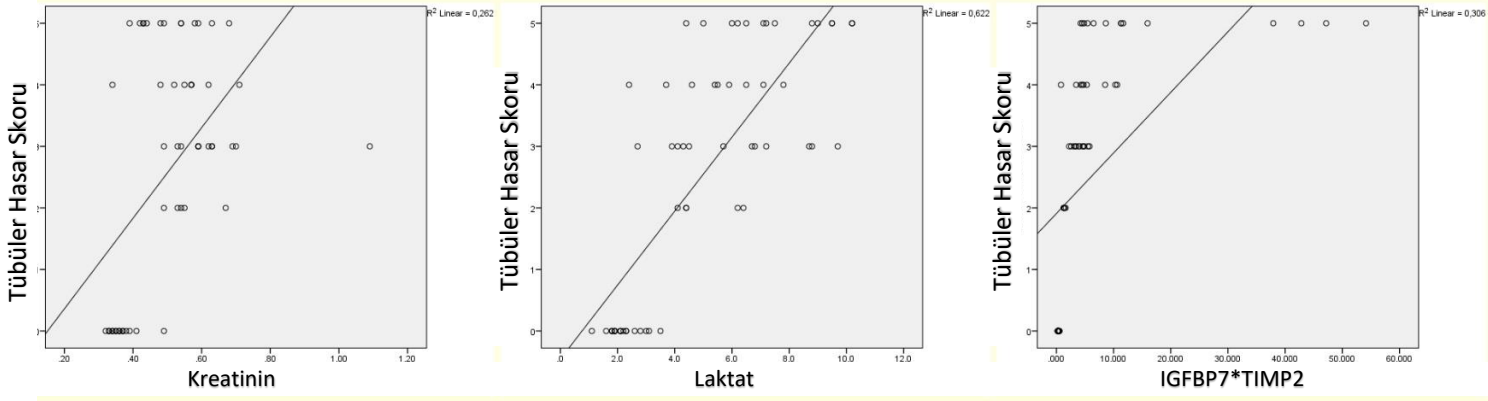
★ P<0.05, Sham grubu ile kıyaslandığında

#### 4.5 Patolojik Bulgular ile Kreatinin, Laktat ve IGFBP7\*TIMP2 Korelasyonu

Sepsise bağlı böbreklerde gelişen histopatolojik hasar ile idrardan ölçtüğümüz hücre siklus arrest biyobelirteçleri arasındaki korelasyon incelendiğinde; IGFBP-7 (Spearman  $\rho = 0.910$ ,  $p < 0.0001$ ), TIMP-2 (Spearman  $\rho = 0.889$ ,  $p < 0.0001$ ) ve [IGFBP-7\*TIMP-2] (Spearman  $\rho = 0.908$ ,  $p < 0.0001$ ) arasında kuvvetli pozitif yönlü korelasyon tespit edildi (Grafik 4.7).

Kandan ölçtüğümüz serum kreatinin değerleri ile histopatolojik hasar arasındaki korelasyon ise orta derecede pozitif yönlü idi (Spearman  $\rho = 0.532$ ,  $P < 0.01$ ) (Grafik 4.7). Sepsis oluşturulan ratlarımızda kan laktat düzeyi ile histopatolojik bulgular arasında da anlamlı korelasyon belirlendi (Spearman  $\rho = 0.795$ ,  $P < 0.001$ ).

**Grafik 4.7 Kreatinin Laktat ve IGFBP-7\*TIMP-2 Değerlerinin Patolojik Hasar ile Korelasyonu**



## 5.TARTIŞMA

Yoğun bakımlarda kritik hastalığı bulunan hastalarda birçok nedene bağlı olarak gelişen ABH çok sık görülen bir sorun olup, sepsis yoğun bakım ünitelerinde gelişen ABH'nın en sık rastlanan sebebidir.(62) . Ancak sepsise bağlı gelişen ABH diğer nedenlere bağlı gelişen hasarlardan başta fizyopatoloji olmak üzere çok farklıdır. Bu nedenle yoğun bakım ünitelerinde bu hastalar diğer nedenlere bağlı gelişen ABH'larından daha farklı olarak takip ve tedavi edilmesi gerekir. Son yıllarda ortaya konulduğu üzere sepsise bağlı ABH'nın erken döneminde oluşan hasar yapısal olmaktan ziyade fonksiyonel olduğu düşünüldüğünde (48) yoğun bakımdaki bu kritik hastalarda böbreklerin tehlike altında olduğunu anlamak ve bu organları korumak önemlidir. En iyi koruma yöntemi ise önlemektir. Önleme yüksek riskli hastaların ortaya konması, böbreklerin risk altında olduğunun erken dönemde belirlenmesi ve bir takım proflaktik önlemlerin uygulamaya sokulmasını gerektirir.

Biz de bu deneysel hayvan çalışmamızda daha önce özellikle perioperatif dönemde gelişen ABH'nın önlenmesinde faydalı olduğu rapor edilen (12, 13, 103) ve sepsisli hastalar üzerindeki etkisi halen randomize kontrollü çalışmalarla ortaya konmamış olan uzak iskemik önkoşullanma (UİÖK)'nin ratlar üzerinde sepsise bağlı akut böbrek hasarını azaltmada etkin bir yöntem olup olmadığını inceledik ve halen etki mekanizmasının tam olarak anlaşılmadığı bu yöntemin alta yatan mekanizmalarına ışık tutmaya çalıştık.

İskemik ön koşullandırma kavramı (İÖK) 1986 yılında miyokard enfarktüsü köpeklerde gelişen sürekli iskemik hasardan önce çok sayıda kısa iskemik atağın kardiyoprotektif etkisini ilk kez tanımlayan Murry ve arkadaşları tarafından tanıtılmıştır (7). İskemik ön koşullandırma uyarısı iskemik yaralanmaya maruz kalan aynı organa veya dokuya uygulandığında lokal İÖK olarak bahsedilirken bu koruma yalnızca lokal olarak değil, aynı zamanda uzak dokuları da koruyabilir. İlk olarak 1993 yılında Przyklenk ve ark. tarafından uzakta uygulanan iskemik önkoşullanmanın kalpte diğer koroner arterlerin perfüzyonunu iyileştirdiği görülmüş ve bu olay uzak iskemik önkoşullanma (UİÖK) olarak tanımlanmıştır (8). Birçok deneysel ve klinik çalışmalarda UİÖK'nin miyokard haricinde böbrek, akciğer, karaciğer, iskelet kası ve barsaklarda koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (104-107).

Böbrekler, UİÖK'nin klinik uygulaması için ana ilgi organlarından biridir. Böbrekler, yüksek enerji talepleri ve karmaşık mikrovasküler ağları nedeniyle, akut böbrek fonksiyon bozukluğunun önemli bir patofizyolojik temeli olan iskemik hasara özellikle duyarlıdır.(108, 109) Buna göre, deneysel ve klinik kanıtlar UİÖK'nin böbrekleri iskemik hasardan korumak için etkili bir araç olabileceğini düşündürmektedir. Ancak farklı patofizyolojiye bağlı olarak gelişen sepsisle ilişkili ABH'da da deneysel çalışmalar UİÖK'nin ABH önleyebileceğini

bildirilmiştir. Bu nedenle eğer sepsiste de bu yöntem akut böbrek yetmezliği insidansını azaltırsa hem invazif olmayan hem de neredeyse maliyetsiz bir tedavi stratejisi olarak cezbedici olacaktır.

Çalışmamızda CLP ile oluşturduğumuz bu polimikrobiyal sepsis modelinde sepsise bağlı gelişen ABH'da patolojik hasarın derecelendirilmesi için "Tübüler Hasar Skoru" kullandık. Hasarsızlık durumun sıfır kabul edildiği bu skorlama sisteminde 5 sınıf üzerinden hasarlanma şiddetini belirledik. Sıfır hasarsızlığı gösterirken 5 en yüksek hasar derecesini göstermekte idi. Tübüler hasar tespit ettiğimiz preparatlarda ağırlıklı olarak fırçamsı kenar kaybı, tübüler dilatasyon ve vakuolizasyon bulgularını gördük. Farklı gruplarda bu tübüler hasar skoru ile böbrek hasarının kantitatif olarak karşılaştırılması birçok çalışmada da benzer olarak kullanılmıştır. (101, 102) Tübüler Hasar Skoru sham grubuna göre CLP uyguladığımız yani sepsisli ratlarda 24 ve 48. saatlerde anlamlı olarak artmıştır. Artış 24. saatte 48. saatte göre anlamlı olarak daha düşük tespit edilmiştir. Bu durum tedavi edilmemiş enfeksiyonun bakteriyemi ardından enflamatuar yanıtın sistemik aktivasyonunu, organ fonksiyon bozukluğu, sepsis, daha sonra septik şok ve multiorgan fonksiyon bozukluğuna gidişi gösteren insan yanıtlarıyla örtüşen doğru bir eksperimental model üzerinde çalıştığımızı göstermiştir. Çalışmamızda sepsis oluşturmadan önce UİÖK uyguladığımız ratlarda, sepsisin erken (24. saat) ve geç (48.saat) dönemlerinde, tübül hasarının UİÖK uygulanmayan ratlara göre anlamlı olarak az olduğunu belirledik. Hatta UİÖK uygulanmayan erken sepsis döneminde UİÖK uygulanan geç sepsis dönemine göre tübüler hasarı anlamlı olarak daha yüksek gözlemledik.

Çalışmamızda apopitozisi gösterebilmek için yaptığımız TUNEL boyama ile 20 kat büyütmede çoğunlukla nekroz olmaksızın 1-2 apoptotik hücre gözlemledik ve sham grubuna göre tübüler hasar görülen sepsisin 24 ve 48.saatinde apopitosiz yönünden anlamlı fark tespit etmedik.

Geleneksel olarak sepsise bağlı ABH'nın sistemik hipotansiyon ve renal vazokonstriksiyona bağlı böbrek hipoperfüzyonunun neden olduğu ve böbreklerde reperfüzyon hasarı sonucu meydana geldiği düşünülmekteydi. Bu teori son yıllarda oldukça fazla sorgulandı ve yeni birçok mekanizma öne sürüldü. Yakın tarihli insan ve hayvan çalışmaları sepsis sırasında böbrek kan akımının korunduğunu göstermiştir.(49) Günümüzde sepsise bağlı ABH'nın fizyopatolojisinde inflamasyon, mikrovasküler disregülasyon ve hasara karşı Tübüler Epitelyal Hücrenin (TEH) metabolik yanıtı gibi kavramlar daha çok öne sürülmekte olup bunların global renal hipoperfüzyondan çok daha önemli olabileceği düşünülmektedir.(41, 49, 62) Sepsise bağlı ABH'da görülen hücre ölümünün böbreklerdeki ciddi fonksiyonel değişiklikleri tam olarak açıklayamadığı göz önüne alındığında (çünkü apopitoz ve nekroz tüm tübüle-epitelyal hücrelerin sadece %5'i gibi azında gerçekleşir) sepsise bağlı gelişen ABH'nın erken döneminde bu değişikliklerin

hayatta kalma stratejisi olarak ortaya çıkan yanıtların klinik ve biyokimyasal yansıması gibi düşünülebilir. Çalışmamızda gözlemlediğimiz apopitoz ve nekroz yokluğu sepsise bağlı ABH'nın fizyopatolojisi ile ilgili son yıllardaki bu görüşleri destekler niteliktedir.

Sepsis sonrası 24. ve 48. saatlerdeki gruplarda tübüler preparatlarda 1-2 adet de olsa görülebilen apopitotik hücreler CLP öncesi UİÖK yapılan gruplarda anlamlı olarak daha az belirlenmiştir. Bu nedenlerle çalışmamız polimikrobiyal sepsis modelinde sepsis gelişiminden önce uygulanan UİÖK'nın tübüler hasarı azaltıp böbrekleri koruyabileceğini göstermiştir.

Bugüne kadar yapılan çalışmaların çoğu, UİÖK'nın hayvanların ve insanların miyokardında iskemi / reperfüzyon hasarına karşı koruma sağladığını gösterse de az sayıda çalışma UİÖK'nin böbreği koruma potansiyelini araştırmıştır. Yapılan hayvan çalışmalarının çoğunda UİÖK uygulaması çarpıcı şekilde renal koruma ile ilişkilendirilmiştir. Ancak çok daha az sayıda çalışma sepsis durumlarında çalışılmıştır.

1980'li yıllarda Zager ve ark.'nın yaptıkları ilk hayvan çalışmaları iskemik olaylardan önce gelen iskemiye karşı böbrek direncinin arttığını göstermiş ve UİÖK'nin böbrek fonksiyonu üzerindeki potansiyel yararlı etkilerinin olabileceğini düşündürmüştür (110, 111). Ateş ve ark. kısa süreli karaciğer iskemi ataklarının, uzak bir organ olarak renal iskemi üzerinde yararlı bir etkiye sahip olduğunu gösterilmiştir(105). Araştırmacılar plazma kreatinin, kan idrar nitrojeni ve malondialdehit seviyelerindeki düşüşler, azalmış renal morfolojik değişim ve süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitelerinin daha iyi korunmasının gösterdiği gibi kısa ince bağırsak iskemi uygulanmasının renal iskemiye ve ardından reperfüzyon hasarını hafiflettiğini ortaya koymuşlardır. Bu sonuçlar, ince bağırsak iskemisinin, lipid peroksidasyonunu inhibe ederek ve antioksidan enzim aktivitelerini koruyarak renal iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruduğunu göstermektedir. Wever ve ark. ise kısa arka bacak tıkanıklığının renal iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruyup koruyamayacağını ve bu korumanın adenozeine bağımlı olup olmadığını araştırdılar (112). Sıçanlara tek taraflı veya iki taraflı UİÖK uyguladılar. 24 saatlik reperfüzyondan sonra, böbrek fonksiyonu hem bilateral UİÖK grubunda hem de tek taraflı grupta iyileştiğini ancak bilateral UİÖK'nın tek taraflı UİÖK'den daha etkili olduğunu rapor ettiler. Bu durumun adenozeinden bağımsız bir mekanizma yoluyla gerçekleştiği sonucuna vardılar.

Hayvan modellerinde elde edilen deneysel verilerin yakın zamanda yayınlanan bir meta-analizi; BUN, serum kreatinin ve renal iskemi reperfüzyon hasarından sonra histolojik böbrek hasarı gibi üç sonuç ölçütünü değerlendirdi (113). İskemik ön koşullanma ile ilişkili koruyucu etkiler üç parametrenin tümü için rapor edildi. Lokal ve uzaktan ön koşullandırma arasında etkinlik açısından hiçbir fark gözlenmedi. İlginç bir şekilde, renoproteksiyon kadın alt grubunda belirgin değildi ve kadın deneklerde gelecekte yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğu araştırmacılar tarafından vurguladı.

Yakın zamanda Pan ve ark., farelerde CLP ile sepsis oluşturdıkları modelde 24.saatte serumda ve böbrekte TNF-alfa ve IL-6 konsantrasyonlarının yükseldiğini ancak UİÖK'nın bu serum ve böbrekteki sitokin seviyelerinin yükselmesini engelleyerek, inflamasyonu ve apoptozisi azalttığını rapor ettiler. Araştırmacılar UİÖK'nın sepsis oluşturulan farelerde, renal fonksiyon bozukluğunu iyileştirme mekanizmasının iskelet kasından dolaşıma salınan eksozomal miR-21 (mikroRNA-21) anahtar molekülü aracılığıyla olduğunu öne sürdüler. Ön koşullandırılmış ekstremitede artan miR-21'in, dolaşımdaki eksozomlar aracılığıyla böbreklere aktarıldığı ve sistemik inflamasyonu ve renal tübüler hücre apoptozisini baskıladığını bildirdiler. Pan ve ark. histopatolojik incelemelerinde çalışmamıza benzer şekilde böbreklerde, medullanın dış kısmında kısmi tübüler vaküolizasyon, fırçamsı kenar kaybı ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunun azaldığını tespit ettiler (114).

Olguner ve ark., ratlarda CLP sonrası sepsise bağlı akut böbrek ve akciğer hasarında UİÖK'nın etkilerini incelemek için, CLP işlemi öncesinde sol alt ekstremiteye 3 er defa iskemi reperfüzyon sikluları uygulamışlardır (115) Bu deneysel çalışmada UİÖK'nın lipid peroksidasyonunu azaltarak anti oksidan etki ile sepsise bağlı akut böbrek ve akciğer hasarında koruyucu etkiye sahip olduğu sonucuna varmışlardır.

Hayvan modellerinde elde edilen deneysel kanıtlara ek olarak, UİÖK kavramının deneysel modellerden klinik uygulamaya dönüştürülmesinde önemli ilerleme sağlanmıştır. Şimdiye kadar, UİÖK'nin insanlarda böbrek hasarını azaltmak için kullanılabileceği kavramını ağırlıklı olarak (ama daha önemlisi hepsi değil) destekleyen birkaç klinik çalışma yapılmıştır.(11, 13, 98, 103, 116-119) Farklı çalışmalar arasındaki tartışmalı sonuçların nedenleri ise; farklı hasta popülasyonları, komorbiditeler (örn., önceden var olan kronik böbrek hastalığı, düşük ejeksiyon fraksiyonu, diyabet, KOAH gibi), ameliyat tipi ve UİÖK protokollerini içeren çok çeşitlilik olabilir. Genellikle renal koruma için çalışılan hasta popülasyonları kardiyovasküler cerrahi girişimleri, renal transplantasyonu, anjiyografi işlemleri uygulanan hasta gruplarını kapsamaktadır. Ancak sepsiste ABH'nin önlenmesi için UİÖK'nın kullanımına yönelik randomize kontrollü klinik bir çalışma literatür taramamızda rastlanmamıştır.

Özellikle UİÖK'nin böbrek üzerindeki etkileri, yetişkin kalp ve damar cerrahisi operasyonlarında kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Yakın zamanda büyük çok merkezli, randomize çift kör bir klinik çalışmada, kardiyak cerrahiden önce yüksek riskli hastalarda UİÖK'nin ABH oluşumunu azaltmada etkili (% 52,5'e kıyasla% 37,5) olduğu rapor edilmiştir (12) Ayrıca, UİÖK uygulanan hastaların daha az RRT gereksinimi (% 15,8' e karşı % 5,8) olmuştur. Bununla birlikte, önemli olarak, bu müdahalenin etkinliğinin hücre siklus arrest biyobelirteçlerinin idrara salınmasıyla güçlü bir şekilde ilişkili olduğu gösterilmiştir.

CLP sepsis modeli ile ratlarda UİÖK'nin renal hasar üzerine etkisini incelediğimiz çalışmamızda idrar numunesinden ölçülen hücre siklus arrest biyobelirteçlerinin, hem IGFBP-7 hem de TIMP-2'nin sepsis sonrası 24 ve 48. saatlerde sham grubuna göre önemli artış gösterdiğini gördük. Sepsisle birlikte görülen bu artış tedavi edilmemiş sepsisin ilerlemesiyle yani 24. saate göre 48. saatte anlamlı olarak daha yüksekti. Tübüler hasarla karşılaştırdığımızda ise IGFBP-7 (Spearman  $\rho = 0.910$ ,  $p < 0.0001$ ), TIMP-2 (Spearman  $\rho = 0.889$ ,  $p < 0.0001$ ) ve [IGFBP-7\*TIMP-2] (Spearman  $\rho = 0.908$ ,  $p < 0.0001$ ) aralarında kuvvetli pozitif yönlü korelasyon tespit ettik (Grafik 4.7). Bu bulgularımız Zarbock ve ark., kardiyak cerrahiden önce yüksek riskli hastalara UİÖK uyguladıkları çalışmalarına benzer şekilde bu yöntemin (tübüler hasar ile de korele olarak) hücre siklus arrest moleküllerini idrarda anlamlı olarak düşürdüğünü gördük. Bu sonuç hücre siklüs arrest biyobelirteçlerinin tübüler hasarın teşhisinde ve UİÖK'nin etkinliğinin ortaya konmasında yararlı olduğunu gösterirken, UİÖK'nin etkisinin altında yatan mekanizmalar içerisinde de bu biyobelirteçlerin rolü olabileceğini düşündürmektedir.(118)

TIMP-2 ve IGFBP7, son zamanlarda ABH için keşfedilen biyobelirteçlerdir. Bu hücre siklüs arrest moleküllerinin çalışmamızda uyguladığımız UİÖK yöntemi ile azalmış olması nasıl yorumlanmalı diye düşünürsek şunları söyleyebiliriz. Hasar ve korumayı öngören bu biyobelirteçler için madolyonun iki yüzü vardır.

Hücre döngüsü farklı aşamalardan oluşur ve her aşama, uygun hücre çoğalması için gerekli olan belirli bir işleve sahiptir. Hücreler, potansiyel olarak hasar gördüğünde hücre bölünmesini önlemek ve enerji tasarrufu sağlamak için koruyucu bir mekanizma olarak hücre döngüsü duraklatmasını başlatırlar. Hücre döngüsü durması hücreyi geçici G1 hücre döngüsünde bırakarak böbrek hasarını azaltabileceği düşünülmektedir(120, 121). G1 hücre siklus arresti, DNA'sı hasarlı olan hücrelerin DNA onarımı sağlanana kadar bölünmelerini engeller. Hücre siklus arresti hasarın hemen ardından erken dönemde oluşur. IGFBP-7 ve TIMP-2 hücre hasarının erken döneminde hücre döngüsü arresti ile ilişkilidirler (122). Bu nedenle hasarlı dokulardan salınan bu biyobelirteçler aslında hasara karşı oluşan bir savunma mekanizmasıdır ve hücreleri korumaktadır. Yalnız hasar uzun süre devam ederse bu süreç hücrelere zarar verebilmektedir. Hücre döngüsünün manipülasyonu, ABH'nin önlenmesi ve tedavisinde yeni bir terapötik stratejiyi temsil edebilir. UİÖK, DAMP'ler gibi çeşitli molekülleri uzak dokudan serbest bırakırlar. DAMP'ler daha sonra böbrek tarafından filtrelenir ve proksimal tübül epitelinde Toll-like reseptörü gibi patern tanıma aracılığı ile sinyal verilmesine yol açar. Bu sinyal daha sonra biyoenerjetik aşağı düzenleme ve geçici hücre döngüsü durması gibi doğal savunmaları tetikleyebilir. (120, 121, 123). Bu

savunmalar, bir kez devreye girdikten sonra, sonraki enflamatuvar veya iskemik stres sırasında böbreği koruyabilir. Çalışmamızda CLP uygulamadığımız sadece UİÖK uyguladığımız grupta hücre siklus arrest biyobelirteçlerimizin idrarda anlamlı olarak sham grubundan daha yüksek olması ve UİÖK uyguladığımız sepsisli ratlarda bu yöntemin kullanmadığı gruplardan daha düşük ve hasar skorlarının daha iyi olması bu teoriyi desteklemektedir.

Aynı zamanda böbreklerde hücre siklus arrest biyobelirteçlerindeki artışların idrarda tespit edilebilecek şekilde birden fazla hücre tarafından devreye sokulduğunda, genellikle bunu ABH izlemektedir. Hasara karşı oluşan bu yanıtla dokunun tehlikede olduğu, eğer bu böbrekler ise böbreklerin tehlikede olduğunu, daha ileri fonksiyon bozukluğu gelişmeden bize bildirmekte ve bu durum biyobelirteçlerin ABH'nin tanısındaki değerini yansıtmaktadır.(89, 124, 125)

İdrar IGFBP7\*TIMP-2'nin, kritik hastalarda 12 saat içinde ABH'yı öngörebilme gücünün değerlendirildiği çok merkezli çalışmada, idrarda IGFBP7\*TIMP-2 düzeyinin 0,3'ün üzerinde olması ABH riskini beş kat, 2,0'ın üzerinde ise on yedi kat arttırdığı görülmüştür (90). Kashani ve ark. yaptığı IGFBP7 ve TIMP-2'nin ABH'yı öngörebilme güçlerinin değerlendirildiği çok merkezli çalışmada idrardan IGFBP7 ile TIMP-2 ölçülmüş ve örnek alımından 12 saat sonrasında ABH (KDIGO evre 2-3) varlığı değerlendirilmiştir. İdrardan ölçülen IGFBP7\*TIMP-2, ABH'yı öngörebilmede önceden tanımlanan diğer biyobelirteçlerden daha iyi performans sağlamıştır (88).

Çalışmamızda CLP uyguladıktan sonraki erken dönemde bu biyobelirteçlerde görülen anlamlı artış ve bunun tübüler hasar skoruyla olan iyi korelasyonu ABH'nin erken belirlenmesinde hücre siklus arrest moleküllerinin faydalı olduğunu desteklemektedir. Düzeyinin uygulanan bir yöntemden sonra düşmesi ise o uygulanan yöntemin hasarın şiddetini azaltarak bize yöntemin etkinliğini bildirebilmektedir.

Çalışmamızda ölçtüğümüz serum kreatinin değerleri ABH'nin erken dönemde ön görülmesinde tutarsız ve histopatolojik hasar ile arasındaki korelasyon ise orta derecede pozitif yönlü idi (Spearman  $\rho = 0.532$ ,  $P < 0.01$ ). UİÖK'nin serum kreatinin üzerine etkisi açısından bakıldığında da tutarsızlık devam etmekteydi. Ratlarda CLP modeliyle sepsis prosedürü gerçekleştirilen bir diğer çalışmada da saatlere göre hücre siklus arrest biyobelirteçleri incelenmiş; IGFBP7\*TIMP-2'nin birlikte analizinin ABH tanısında serum kreatinine kıyasla daha fazla duyarlılığa sahip olduğu belirtilmiştir (124).

Serum laktat düzeyi ise çalışmamızda sepsisin 24 ve 48. saatinde anlamlı olarak artmış olmasına rağmen CLP işlemi öncesi UİÖK uygulanan gruplarda, uygulanmayanlara göre azalma görülmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildi. Kan laktat düzeyi ile histopatolojik bulgular arasında anlamlı fakat hücre siklus arrest biyobelirteçlerine göre çok daha düşük korelasyon görüldü. Sadece UİÖK uygulanıp CLP yapılmayan grupta da sham

grubuna göre serum laktat düzeyinde anlamlı artış görüldü. Bu durum çalışmamızda uyguladığımız UİÖK yönteminde kullandığımız ekstremite iskemisinin yeterli ve modelimizin uygun olduğunun kanıtlarından biriydi.

UİÖK'nin altında yatan mekanizmalar çok karmaşıktır ve henüz tam olarak tanımlanmamıştır. UİÖK'nin ağırlıklı olarak, çeşitli iskemik uyarılara yanıt olarak farklılık gösterebilen ve muhtemelen birbirleriyle etkileşime girebilen sistemik anti-enflamatuar, nöronal ve humoral sinyal yolları dahil olmak üzere çeşitli yolları aktive ettiği düşünülmektedir(97) Farklı sinyal yollarının önemi, uygulanan uyarana yanıt olarak farklılık gösterebilir ve yollar muhtemelen birbirleriyle etkileşime girerler. UİÖK'nin hasarlanma biyobelirteçlerinin salınımını azalttığını ve organ işlevini sürdürdüğünü gösteren artan sayıda kanıt vardır. (11-13, 98) Renal korunmanın esas olarak renal tübüler epitel hücrelerindeki patern tanıma reseptörleri ile etkileşime giren hasara bağlı moleküller (DAMP'ler) salınması yoluyla gerçekleştiği düşünülebilir (97). Bununla birlikte, bir dizi başka mekanizma da önerilmekte bu da farklı organların farklı şekillerde etkilenmesini mümkün kılmaktadır.

Herhangi bir şekilde otonom gangliyonun bloke edilmesinin, UİÖK aracılı kardiyak korumayı (126) iskemi / reperfüzyon kaynaklı endotel disfonksiyonun önlenmesini (127)engelleme nöronal faktörlerin; sistemik dolaşıma salınan katekolaminler, bradikinin, adenozin ve diğer faktörler ön koşullandırmanın etkisini taklit edebileceğinden,(128-131) humoral faktörlerin UİÖK'nin altta yatan mekanizmasında önemli olduğunu göstermektedir.

Hausenloy ve ark. tarafından ayrıntılı olarak incelendiği üzere, protein kinazlar önemli bir araştırma alanıdır. Çünkü birkaç sinyal yolu bu moleküller üzerinde aşağı yönde etkiler ortaya çıkarmak için birleşir. Bu etkileri ortaya çıkaran ön koşullandırma tetikleyicileri arasında adenozin, bradikinin ve opioidler bulunur.(132)

Birkaç çalışma, UİÖK'nin zararlı metabolitlerin hücre dışı düzeylerinin azalması dahil olmak üzere antioksidan ve antiinflamatuar etkileri tetikleyerek organ koruması sağlayabileceğini göstermektedir.(131, 133)

Buna ek olarak UİÖK; lökosit kemotaksisi, adezyon ve göçü, sitokin sentezi, ekzositoz, doğal bağışıklık sinyal yolları ve apoptozda yer alan anahtar proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonunu azaltmıştır.(134, 135) Kesin moleküler mekanizmaları tanımlamadaki ilerleme yavaş olsa da moleküler mekanizmaları belirleme çabalarının devam etmesi önemlidir. Çünkü bu yolları farmakolojik olarak hedeflemek mümkün olabilir(97).

Çalışmamızı planlarken başlangıçta kullanacağımız sepsis modeli için çeşitli kriterler belirledik. Bunlar; septik hayvanın toksik ve pozitif kan kültürüne sahip olması, gerçek karakteristik metabolik ve fizyolojik bozulmalar göstermesi, yöntemin hayvanın

sepsis ve ABH oluşumuna cevap vermesine izin verecek kadar zaman içinde ortaya çıkması ve modelin tekrarlanabilir ve ucuz olması idi. Bu amaçla çalışmamızda polimikrobiyal sepsis ve ABH oluşturmak için ratlarda CLP modelini kullandık. (136). Hiçbir mevcut hayvan modeli, insandaki sepsisinin karmaşıklıklarını tam olarak yansıtamıyor olsa da ratlarda ve farelerde uygulanan CLP modeli, benzer büyüklük ve kinetik profile sahip sitokin salınımı, ortalama arter basıncında azalma gibi insanlarda ciddi septik şokun bazı temel özelliklerini taklit eder (137). Bu model, sepsis ve septik şokun en yaygın kullanılan modellerinden biridir.(136)

CLP'nin yaygın kullanımının birincil nedeni çok yönlülüğüdür. Akut, kronik, ölümcül olarak değişebilen sepsis ciddiyeti durumu delinme şekli ve CLP'nin uygulama uzunluğu uyarlanarak ayarlamak mümkündür(138, 139) Ayrıca, çekum ligasyonu, özellikle ağır doku travmasından sonra, klinik sepsiste sıklıkla görülen bir nekrotik doku kaynağı sağlar. Bununla birlikte cerrahi becerileri de zorlayıcı değildir; bu da prosedürü birçok laboratuvar da uygulanabilir kılmaktadır.

Lipopolisakkarit (LPS) gibi bakteri ürünlerini veya tek bir tür organizmayı kullanan yöntemler, belirli bir mikroorganizmaya karşı immün yanıt modellerini ve tedavilerini karakterize etmek için yararlıdır. LPS ya da egzojen bakterilerin dolaşıma verilmesi yöntemi ile sepsis deneysel olarak indüklenebilir, fakat bu yöntemler ile enfeksiyon odağı oluşturulamaz, uzun süreli immün reaksiyon geliştirilemez ve sepsisin karakteristik sitokin profilinin oluşturulması zordur. (140)Ayrıca bakteriyemi veya endotoksemi modelleri, gram-negatif ve gram-pozitif organizmaların yanı sıra aerobik ve anaerobik türlerin bulunduğu polimikrobiyal olan klinik sepsisle tam olarak ilişkilendirmek de zordur. CLP modelinde, enterik patojenlerin tam spektrumu septik odakta bulunur ve enfektif seleksiyon bozulmaz. Sepsise neden olan mikropların eksojen olarak sunulması yerine "konakçı kökenli" bir karışım olma avantajına sahiptir(139, 141, 142)

Yukarıda bahsedilen nedenlerle biz çalışmamızda kemirgenlerde deneysel sepsis için altın standart olarak kabul edilen, sepsisin temel klinik özelliklerini taklit eden iyi tanımlanmış bir yöntem olduğu için ratlarda sepsis modeli olarak Çekal Ligasyon Puncture (CLP) yöntemi kullandık. Çekum endojen bir bakteri kontaminasyon kaynağı olduğundan çekum perforasyonu, bakteriyel peritonit ile sonuçlanır, bunu karışık enterik bakterilerin kan bölmesine translokasyonu izler. Sepsisin başlangıcında, bakteremi daha sonra enflamatuar yanıtın sistemik aktivasyonunu, ardından septik şoku, multiorgan fonksiyon bozukluğunu ve son olarak ölümü tetikler(138, 139)

CLP modeli kemirgenlerde kullanıldığında, tipik sepsis semptomları veya hipotermi, taşikardi ve taşipne gibi septik şok semptomları ortaya çıkaran hastalık paternlerini gösterir. Ratlar CLP işleminden 10 saat sonraya kadar normal görünürken, kanda laktat artışıyla birlikte hiperdinamik, hiperinsülinemik, hipermetabolik durumlar gösterirler. Yaklaşık

16.saatte sepsis, belirgin şekilde yükselen laktat seviyelerinin yanı sıra, hipoglisemi, hipoinsülinemi ve hipodinamik dolaşıma sebep olur. (139) Periton boşluğu asit içerir ve çok sayıda mikrop kültürlenebilir (örneğin, Escherichiacoli, Proteusmirabilis, Enterococcus, Bacteroidesfragilis, vb.)(139). Bu yöntemle göre oluşturulan polimikrobiyal sepsis, erken hiperdinamik faz ve geç hipodinamik faz ile ilişkilidir. Septik insan hastalarına benzer şekilde, CLP yöntemiyle oluşturulan sepsisli kemirgenler de sıvı resüsitasyonuna ve antibiyotiğe yanıt verirler.(143) CLP'yi takiben sıvı resüsitasyonu sağlanmazsa, hayvanların hiperdinamik faz dolaşım durumu göstermeyeceği belirtilmelidir(139, 144)

Biz de çalışmamızda 5 aydan büyük Wistar Albino 300-375 gr ağırlığında 60 adet rat kullandık. Hiperdinamik süreci gösterebilmek için sıçanlara yeterli sıvı resüsitasyonu uyguladık. ABH' nin sepsis haricinde başka bir durumla karışmaması için herhangi bir antibiyoterapi uygulamadık ve anestezi yöntemi olarak spontan solunumu koruyarak isofluran anestezisi kullandık. CLP standardizasyonunu sağlamak için tek uygulayıcı tarafından aynı uzunluktaki çekum bağlanarak 18 G iğne ile 2 kez delme işlemi gerçekleştirdik. Sıçanlarda 6 prosedür için sürekli kan örnekleme yapılmasının hipovolemiye neden olup deney prosedürünü bozacağı için kullanacağımız sıçanları sepsis saatlerine göre ayırarak kan, idrar ve doku örneklerini ayrı ayrı elde ettik.

İskemik önkoşullamanın koruyucu etkileri iskemi süresi ve kaç döngü yapıldığı ile de ilişkilidir. İskelet kasında yapılan çalışmalarda 3 döngü iskemi ve reperfüzyon ile en iyi sonuçlar alınmıştır (107). Renal iskemik ön koşullanmada da çoklu ön koşullama protokollerinin tek olana göre renal iskemi reperfüzyon hasarına karşı daha iyi koruduğu bildirilmiştir (145). Biz de çalışmamızda ön koşullanmayı 5 er dakika iskemi ve 5 er dakika reperfüzyon periyotları şeklinde üç kez uyguladık.

Literatürde uzak iskemik ön koşullanmayla alakalı yan etki ya da komplikasyonları rapor eden fazla çalışma bulunmamaktadır. Teknik olarak ekstremitelerde iskemiye bağlı solukluk, parezi, kapiller dolumda bozulma, periferik nabız kaybı, ciltte beneklenme ve bül oluşumu görülebilir. Kaslarda kompresyona bağlı (baromiyopati) olarak gelişen rabdomiyoliz sonucunda hücre içerisinden dolaşıma geçen potasyum, fosfor, miyogloblin ve laktik asit metabolik bozukluğa neden olabilir. Housenloy ve ark. yaptığı çalışmada UIÖK yapılan hastalarda cilt peteşilerinin kontrol grubuna göre daha sık görüldüğünü rapor etmişlerdir (17). Yaptığımız çalışmada ekstremitelerde lokal herhangi bir komplikasyona rastlamadık.

## 6.SONUÇ

Özetlemek gerekirse çalışmamızda, ratlarda CLP yöntemiyle oluşturduğumuz polimikrobiyal sepsis modelinde kısa iskemik aralıklarla, tek taraflı alt ekstemiteye uygulanan uzak iskemik ön koşullamanın (UİÖK) sepsise bağlı akut böbrek hasarı (ABH) üzerindeki etkilerini histopatolojik ve biyokimyasal parametrelerle değerlendirdik. Ayrıca halen etki mekanizması yönünden tam olarak anlaşılamayan bu yöntemin alta yatan mekanizmalarına ışık tutmaya çalıştık. Histopatolojik incelemede ABH'nı ve UİÖK'nin etkilerini belirlemek için daha önce birkaç çalışmada faydalanılan tübüler hasar skorunu ve TUNEL boyama yöntemi ile apoptozun ortaya konulmasından faydalandık. Biyokimyasal parametreler olarak ise son yıllarda ABH'nın erken teşhisinde ümit vadeden stres biyobelirteçleri arasında yer alan Tissue Inhibitör of Metalloproteinaze-2 (TIMP-2) ve Insulin Like Growth Factor Binding Protein-7 (IGFBP-7) biyobelirteçlerini, serum kreatinin ve laktatını kullandık. Çalışmamız sonunda ise aşağıda maddeler halinde belirttiğimiz sonuçlara ulaştık:

- 1) CLP yöntemiyle oluşturduğumuz polimikrobiyal sepsis modelimizde gelişen ABH'nın histopatolojinde ağırlıklı değişiklik olarak fırçamsı kenar kaybı, tübüler dilatasyon ve vakuolizasyon bulgularını gördük. Son birkaç senedir sepsise bağlı ABH'nin fizyopatolojisinde erken dönemde en belirgin bulgu olarak kabul edilen nekroz ve apoptozun olmayışını histopatolojik incelememizde biz de tespit ettik.
- 2) Çalışmamız sepsis oluşturmadan önce UİÖK uyguladığımız ratlarda, sepsisin erken (24. saat) ve geç (48.saat) dönemlerinde, tübül hasarının ve idrarda hücre siklus arrest molekülerinin azaldığını bu da UİÖK'nin renal koruma sağladığını göstermektedir.
- 3) Çalışmamızda CLP uyguladıktan sonra ki erken dönemde bu biyobelirteçlerde görülen anlamlı artış ve bunun tübüler hasar skoruyla olan iyi korelasyonu ABH'nın erken belirlenmesinde hücre siklus arrest moleküllerinin faydalı olduğunu desteklemektedir.
- 4) Ayrıca idrar numunelerinden ölçülen hücre siklus arrest biyobelirteçlerinden hesaplanan IGFBP7\*TIMP2 değeri, sepsise bağlı akut böbrek hasarında histopatolojik incelemeyle ileri derecede anlamlı bir korelasyon oluşturmuştur ve ABH'nın erken döneminde tanısız amaçlı olarak kullanılabilir.
- 5) CLP ile sepsis oluşturulan ratlarda doku hasarı ile korele olarak hücre siklus arrest biyobelirteçlerinin idrardaki düzeyinin yükselmesi ve uzak iskemik ön koşullamanın uygulandığı gruplarda ise bu biyobelirteçlerin azalması UİÖK bağlı renal korumanın altında yatan mekanizmalar arasında bu stres biyobelirteçlerinin önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir. Ancak UİÖK'nin ilk kanıtı bildirildiğinden beri iskemi uygulanma sahası ile hedef doku arasındaki hücresel, nörojenik ve hümoral yolak ve

mekanizmalar tam olarak ortaya konulamamış olup, aydınlatılması için ileri klinik ve deneysel çalışmalara gereksinim vardır.

- 6) Çalışmamız serum kreatinin değerinin sepsise bağlı akut böbrek hasarının erken dönemde öngörülmesinde ve UİÖK'nin etkinliğinin değerlendirilmesinde tutarsız olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak CLP yöntemiyle polimikrobiyal sepsis oluşturduğumuz bu deneysel çalışmamız sepsisten önce uzak iskemik ön koşullanma uygulanmasının renal tübüler hasarı ve apoptozu azaltarak renal koruma sağladığını göstermiştir. Ancak daha önce yüksek riskli kardiovasküler cerrahide klinik olarak renal koruma sağladığı gösterilen, uygulanabilirliği açısından tecrübe gerektirmeyen, pratik ve ucuz olan bu yöntemin sepsisli hastalarda klinik terapötik değerini aydınlatmak, optimal uygulama yeri, döngü sayısı, süresi ve zamanlamayı belirleyebilmek için büyük ölçekli, çok merkezli, prospektif randomize kontrollü çalışmalara ihtiyaç vardır.

## KAYNAKLAR

1. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, et al. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. Current estimates and limitations. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2016;193(3):259-72.
2. Slade E, Tamber PS, Vincent J-L. The Surviving Sepsis Campaign: raising awareness to reduce mortality. *Critical Care*. 2003;7(1):1.
3. Zarjou A, Agarwal A. Sepsis and acute kidney injury. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2011;22(6):999-1006.
4. Gomez H, Kellum JA. Sepsis-induced acute kidney injury. *Curr Opin Crit Care*. 2016;22(6):546-53.
5. Murugan R, Kellum JA. Acute kidney injury: what's the prognosis? *Nature Reviews Nephrology*. 2011;7(4):209.
6. Network VNARFT. Intensity of renal support in critically ill patients with acute kidney injury. *New England Journal of Medicine*. 2008;359(1):7-20.
7. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74(5):1124-36.
8. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. Regional ischemic preconditioning protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*. 1993;87(3):893-9.
9. Jensen HA, Loukogeorgakis S, Yannopoulos F, Rimpiläinen E, Petzold A, Tuominen H, et al. Remote ischemic preconditioning protects the brain against injury after hypothermic circulatory arrest. *Circulation*. 2011;123(7):714-21.
10. Tapuria N, Kumar Y, Habib MM, Amara MA, Seifalian AM, Davidson BR. Remote ischemic preconditioning: a novel protective method from ischemia reperfusion injury—a review. *Journal of Surgical Research*. 2008;150(2):304-30.
11. Er F, Nia AM, Dopp H, Hellmich M, Dahlem KM, Caglayan E, et al. Ischemic preconditioning for prevention of contrast medium-induced nephropathy: randomized pilot RenPro Trial (Renal Protection Trial). *Circulation*. 2012;126(3):296-303.
12. Zarbock A, Schmidt C, Van Aken H, Wempe C, Martens S, Zahn PK, et al. Effect of remote ischemic preconditioning on kidney injury among high-risk patients undergoing cardiac surgery: a randomized clinical trial. *Jama*. 2015;313(21):2133-41.
13. Zimmerman RF, Ezeanuna PU, Kane JC, Cleland CD, Kempananjappa TJ, Lucas FL, et al. Ischemic preconditioning at a remote site prevents acute kidney injury in patients following cardiac surgery. *Kidney international*. 2011;80(8):861-7.
14. Kim TK, Min JJ, Cho YJ, Hausenloy DJ, Ahn H, Kim K-H, et al. Effects of delayed remote ischemic preconditioning on peri-operative myocardial injury in patients undergoing cardiac surgery—a randomized controlled trial. *International journal of cardiology*. 2017;227:511-5.
15. Meybohm P, Bein B, Brosteanu O, Cremer J, Gruenewald M, Stoppe C, et al. A multicenter trial of remote ischemic preconditioning for heart surgery. *New England Journal of Medicine*. 2015;373(15):1397-407.
16. Hong DM, Lee E-H, Kim HJ, Min JJ, Chin J-H, Choi D-K, et al. Does remote ischaemic preconditioning with postconditioning improve clinical outcomes of patients undergoing cardiac surgery? Remote Ischaemic Preconditioning with Postconditioning Outcome Trial. *European heart journal*. 2014;35(3):176-83.
17. Hausenloy DJ, Candilio L, Evans R, Ariti C, Jenkins DP, Kolvekar S, et al. Remote ischemic preconditioning and outcomes of cardiac surgery. *New England Journal of Medicine*. 2015;373(15):1408-17.
18. Walsh M, Whitlock R, Garg AX, Légaré J-F, Duncan AE, Zimmerman R, et al. Effects of remote ischemic preconditioning in high-risk patients undergoing cardiac surgery (Remote IMPACT): a randomized controlled trial. *CMAJ*. 2016;188(5):329-36.

19. Menting TP, Wever KE, Ozdemir-van Brunschot DM, Van der Vliet DJ, Rovers MM, Warle MC. Ischaemic preconditioning for the reduction of renal ischaemia reperfusion injury. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2017(3).
20. Geroulanos S, Douka ET. Historical perspective of the word “sepsis”. *Intensive care medicine*. 2006;32(12):2077-.
21. Johnson GB, Brunn GJ, Samstein B, Platt JL. New insight into the pathogenesis of sepsis and the sepsis syndrome. *Surgery*. 2005;137(4):393-5.
22. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *Jama*. 2016;315(8):801-10.
23. Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, Brunkhorst FM, Rea TD, Scherag A, et al. Assessment of clinical criteria for sepsis: for the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama*. 2016;315(8):762-74.
24. Kissoon N, Carcillo JA, Espinosa V, Argent A, Devictor D, Madden M, et al. World federation of pediatric intensive care and critical care societies: global sepsis initiative. *Pediatric Critical Care Medicine*. 2011;12(5):494-503.
25. Gaieski DF, Edwards JM, Kallan MJ, Carr BG. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Critical care medicine*. 2013;41(5):1167-74.
26. Esper AM, Martin GS. Extending international sepsis epidemiology: the impact of organ dysfunction. *Critical care*. 2009;13(1):120.
27. Levy MM, Evans LE, Rhodes A. The surviving sepsis campaign bundle: 2018 update. *Intensive care medicine*. 2018;44(6):925-8.
28. Singer M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence*. 2014;5(1):66-72.
29. Pittet D, Thievent B, Wenzel RP, Li N, Auckenthaler R, Suter PM. Bedside prediction of mortality from bacteremic sepsis. A dynamic analysis of ICU patients. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1996;153(2):684-93.
30. SUNGUR İC, AKPOLAT T. BÖBREKLERİN TEMEL FONKSİYONLARI VE DÜZENLENMESİ.
31. Negi S, Koreeda D, Kobayashi S, Yano T, Tatsuta K, Mima T, et al., editors. *Acute kidney injury: Epidemiology, outcomes, complications, and therapeutic strategies*. *Seminars in dialysis*; 2018: Wiley Online Library.
32. Gómez H, Kellum JA. Sepsis-induced acute kidney injury. *Critical Care Nephrology*: Elsevier; 2019. p. 524-33. e3.
33. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care*. 2007;11(2):R31.
34. Roy AK, Mc Gorrian C, Treacy C, Kavanaugh E, Brennan A, Mahon NG, et al. A comparison of traditional and novel definitions (RIFLE, AKIN, and KDIGO) of acute kidney injury for the prediction of outcomes in acute decompensated heart failure. *Cardiorenal medicine*. 2013;3(1):26-37.
35. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P. Acute renal failure—definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Critical care*. 2004;8(4):R204.
36. Stevens PE, Levin A. Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline. *Ann Intern Med*. 2013;158(11):825-30.
37. Bagshaw SM, George C, Bellomo R. A comparison of the RIFLE and AKIN criteria for acute kidney injury in critically ill patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23(5):1569-74.
38. Lopes JA, Fernandes P, Jorge S, Goncalves S, Alvarez A, Costa e Silva Z, et al. Acute kidney injury in intensive care unit patients: a comparison between the RIFLE and the Acute Kidney Injury Network classifications. *Crit Care*. 2008;12(4):R110.

39. Ostermann M, Chang RW. Challenges of defining acute kidney injury. *Qjm*. 2011;104(3):237-43.
40. Kellum JA, Lameire N. Diagnosis, evaluation, and management of acute kidney injury: a KDIGO summary (Part 1). *Crit Care*. 2013;17(1):204.
41. SS W, Bonventre J. Acute Kidney Injury. Jameson JL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Loscalzo J, editors. New York, NY:: McGraw-Hill Education; 2018.
42. Singri N, Ahya SN, Levin ML. Acute Renal Failure. *JAMA*. 2003;289(6):747-51.
43. MW Taal , Chertow GM, Marsden PA, Skorecki K, Alan S, BM. B. Brenner and Rector's The Kidney E-Book: Elsevier Health Sciences; 2011.
44. Mehta RL, Bouchard J, Soroko SB, Ikizler TA, Paganini EP, Chertow GM, et al. Sepsis as a cause and consequence of acute kidney injury: Program to Improve Care in Acute Renal Disease. *Intensive care medicine*. 2011;37(2):241-8.
45. Bagshaw SM, Uchino S, Bellomo R, Morimatsu H, Morgera S, Schetz M, et al. Septic acute kidney injury in critically ill patients: clinical characteristics and outcomes. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2007;2(3):431-9.
46. Bagshaw SM, Lapinsky S, Dial S, Arabi Y, Dodek P, Wood G, et al. Acute kidney injury in septic shock: clinical outcomes and impact of duration of hypotension prior to initiation of antimicrobial therapy. *Intensive care medicine*. 2009;35(5):871-81.
47. Bellomo R, Wan L, Langenberg C, May C. Septic acute kidney injury: new concepts. *Nephron Experimental Nephrology*. 2008;109(4):e95-e100.
48. Wan L, Bagshaw SM, Langenberg C, Saotome T, May C, Bellomo R. Pathophysiology of septic acute kidney injury: what do we really know? *Critical care medicine*. 2008;36(4):S198-S203.
49. Gomez H, Ince C, De Backer D, Pickkers P, Payen D, Hotchkiss J, et al. A unified theory of sepsis-induced acute kidney injury: inflammation, microcirculatory dysfunction, bioenergetics and the tubular cell adaptation to injury. *Shock (Augusta, Ga)*. 2014;41(1):3.
50. Payen D, Lukaszewicz A-C, Legrand M, Gayat E, Faivre V, Megarbane B, et al. A multicentre study of acute kidney injury in severe sepsis and septic shock: association with inflammatory phenotype and HLA genotype. *PloS one*. 2012;7(6).
51. Cinel I, Dellinger RP. Advances in pathogenesis and management of sepsis. *Current opinion in infectious diseases*. 2007;20(4):345-52.
52. Bilgili B, Haliloğlu M, Cinel İ. Sepsis and acute kidney injury. *Turkish journal of anaesthesiology and reanimation*. 2014;42(6):294.
53. Martins PS, Colo Brunialti MK, Fernandes MdL, Martos LS, Gomes NE, Rigato O, et al. Bacterial recognition and induced cell activation in sepsis. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)*. 2006;6(2):183-91.
54. Nechemia-Arbely Y, Barkan D, Pizov G, Shriki A, Rose-John S, Galun E, et al. IL-6/IL-6R axis plays a critical role in acute kidney injury. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2008;19(6):1106-15.
55. Dinarello CA. The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment of the septic shock syndrome. *Journal of Infectious Diseases*. 1991;163(6):1177-84.
56. Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Molecular medicine*. 2008;14(1):64-78.
57. Zhang B, Ramesh G, Uematsu S, Akira S, Reeves WB. TLR4 signaling mediates inflammation and tissue injury in nephrotoxicity. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2008;19(5):923-32.
58. Tsujimoto H, Ono S, Majima T, Kawarabayashi N, Takayama E, Kinoshita M, et al. Neutrophil elastase, MIP-2, and TLR-4 expression during human and experimental sepsis. *Shock*. 2005;23(1):39-44.
59. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Critical care medicine*. 1999;27(7):1230-51.

60. Ferraro E, Cecconi F. Autophagic and apoptotic response to stress signals in mammalian cells. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2007;462(2):210-9.
61. Takasu O, Gaut JP, Watanabe E, To K, Fagley RE, Sato B, et al. Mechanisms of cardiac and renal dysfunction in patients dying of sepsis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2013;187(5):509-17.
62. Gómez H, Kellum JA. Sepsis-induced acute kidney injury. *Curr Opin Crit Care*. 2016;22(6):546-53.
63. Green DR, Galluzzi L, Kroemer G. Mitochondria and the autophagy–inflammation–cell death axis in organismal aging. *Science*. 2011;333(6046):1109-12.
64. Waltz P, Carchman EH, Young AC, Rao J, Rosengart MR, Kaczorowski D, et al. Lipopolysaccharide induces autophagic signaling in macrophages via a TLR4, heme oxygenase-1 dependent pathway. *Autophagy*. 2011;7(3):315-20.
65. Frank M, Duvezin-Caubet S, Koob S, Occhipinti A, Jagasia R, Petcherski A, et al. Mitophagy is triggered by mild oxidative stress in a mitochondrial fission dependent manner. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2012;1823(12):2297-310.
66. Hsiao H-W, Tsai K-L, Wang L-F, Chen Y-H, Chiang P-C, Chuang S-M, et al. The decline of autophagy contributes to proximal tubular dysfunction during sepsis. *Shock*. 2012;37(3):289-96.
67. Holthoff JH, Wang Z, Seely KA, Gokden N, Mayeux PR. Resveratrol improves renal microcirculation, protects the tubular epithelium, and prolongs survival in a mouse model of sepsis-induced acute kidney injury. *Kidney international*. 2012;81(4):370-8.
68. Zafrani L, Payen D, Azoulay E, Ince C. The microcirculation of the septic kidney. *Semin Nephrol*. 2015;35(1):75-84.
69. Tyml K, Wang X, Lidington D, Ouellette Y. Lipopolysaccharide reduces intercellular coupling in vitro and arteriolar conducted response in vivo. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2001;281(3):H1397-H406.
70. Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochemical pharmacology*. 2009;78(6):539-52.
71. Bagshaw SM, Brophy PD, Cruz D, Ronco C. Fluid balance as a biomarker: impact of fluid overload on outcome in critically ill patients with acute kidney injury. *Critical care*. 2008;12(4):169.
72. Prowle JR, Echeverri JE, Ligabo EV, Ronco C, Bellomo R. Fluid balance and acute kidney injury. *Nature Reviews Nephrology*. 2010;6(2):107.
73. Hollenberg SM, Ahrens TS, Annane D, Astiz ME, Chalfin DB, Dasta JF, et al. Practice parameters for hemodynamic support of sepsis in adult patients: 2004 update. *Critical care medicine*. 2004;32(9):1928-48.
74. Prowle JR, Kirwan CJ, Bellomo R. Fluid management for the prevention and attenuation of acute kidney injury. *Nature Reviews Nephrology*. 2014;10(1):37.
75. Rajendram R, Prowle JR. Venous congestion: are we adding insult to kidney injury in sepsis? *Critical care*. 2014;18(1):104.
76. Mårtensson J, Bellomo R. Sepsis-induced acute kidney injury. *Critical care clinics*. 2015;31(4):649-60.
77. Tiwari MM, Brock RW, Megyesi JK, Kaushal GP, Mayeux PR. Disruption of renal peritubular blood flow in lipopolysaccharide-induced renal failure: role of nitric oxide and caspases. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2005;289(6):F1324-F32.
78. Trzeciak S, Cinel I, Phillip Dellinger R, Shapiro NI, Arnold RC, Parrillo JE, et al. Resuscitating the microcirculation in sepsis: the central role of nitric oxide, emerging concepts for novel therapies, and challenges for clinical trials. *Academic Emergency Medicine*. 2008;15(5):399-413.
79. Zarbock A, Gomez H, Kellum JA. Sepsis-induced AKI revisited: pathophysiology, prevention and future therapies. *Current opinion in critical care*. 2014;20(6):588.
80. Liu KD, Glidden DV. Clinical trials for acute kidney injury: design challenges and possible solutions. *Current drug targets*. 2009;10(12):1190-5.
81. Pozzoli S, Simonini M, Manunta P. Predicting acute kidney injury: current status and future challenges. *Journal of nephrology*. 2018;31(2):209-23.

82. Coca S, Yalavarthy R, Concato J, Parikh C. Biomarkers for the diagnosis and risk stratification of acute kidney injury: a systematic review. *Kidney international*. 2008;73(9):1008-16.
83. Haase-Fielitz A, Haase M, Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of acute kidney injury: a critical evaluation of current status. *Annals of clinical biochemistry*. 2014;51(3):335-51.
84. Nguyen MT, Devarajan P. Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Pediatric nephrology*. 2008;23(12):2151.
85. De Geus HR, Betjes MG, Schaick Rv, Groeneveld JA. Plasma NGAL similarly predicts acute kidney injury in sepsis and nonsepsis. *Biomarkers in medicine*. 2013;7(3):415-21.
86. Herget-Rosenthal S, Marggraf G, Hüsing J, Göring F, Pietruck F, Janssen O, et al. Early detection of acute renal failure by serum cystatin C. *Kidney international*. 2004;66(3):1115-22.
87. Bonventre JV. Kidney injury molecule-1: a translational journey. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*. 2014;125:293.
88. Kashani K, Al-Khafaji A, Ardiles T, Artigas A, Bagshaw SM, Bell M, et al. Discovery and validation of cell cycle arrest biomarkers in human acute kidney injury. *Critical care*. 2013;17(1):R25.
89. Meersch M, Schmidt C, Van Aken H, Martens S, Rossaint J, Singbartl K, et al. Urinary TIMP-2 and IGFBP7 as early biomarkers of acute kidney injury and renal recovery following cardiac surgery. *PloS one*. 2014;9(3).
90. Bihorac A, Chawla LS, Shaw AD, Al-Khafaji A, Davison DL, DeMuth GE, et al. Validation of cell-cycle arrest biomarkers for acute kidney injury using clinical adjudication. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2014;189(8):932-9.
91. Fan W, Ankawi G, Zhang J, Digvijay K, Giavarina D, Yin Y, et al. Current understanding and future directions in the application of TIMP-2 and IGFBP7 in AKI clinical practice. *Clin Chem Lab Med*. 2019;57(5):567-76.
92. Laurikka J, Wu Z-K, Iisalo P, Kaukinen L, Honkonen EL, Kaukinen S, et al. Regional ischemic preconditioning enhances myocardial performance in off-pump coronary artery bypass grafting. *Chest*. 2002;121(4):1183-9.
93. Szijártó A, Czigány Z, Turóczy Z, Harsányi L. Remote ischemic preconditioning—a simple, low-risk method to decrease ischemic reperfusion injury: models, protocols and mechanistic background. A review. *Journal of surgical research*. 2012;178(2):797-806.
94. Chen X, Liu X, Wan X, Wu Y, Chen Y, Cao C. Ischemic Preconditioning Attenuates Renal Ischemia-Reperfusion Injury by Inhibiting Activation of IKK $\beta$  and Inflammatory Response. *American journal of nephrology*. 2009;30(3):287-94.
95. Souza Filho M, Loiola R, Rocha E, Simão A, Gomes A, Souza M, et al. Hind limb ischemic preconditioning induces an anti-inflammatory response by remote organs in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2009;42(10):921-9.
96. Kharbanda RK, Nielsen TT, Redington AN. Translation of remote ischaemic preconditioning into clinical practice. *The Lancet*. 2009;374(9700):1557-65.
97. Zarbock A, Kellum J. Remote ischemic preconditioning and protection of the kidney—a novel therapeutic option. *Critical care medicine*. 2016;44(3):607.
98. Thielmann M, Kottenberg E, Kleinbongard P, Wendt D, Gedik N, Pasa S, et al. Cardioprotective and prognostic effects of remote ischaemic preconditioning in patients undergoing coronary artery bypass surgery: a single-centre randomised, double-blind, controlled trial. *The Lancet*. 2013;382(9892):597-604.
99. Fuhrman DY, Zarbock A, Kellum JA. Remote Ischemic Preconditioning. *Critical Care Nephrology: Elsevier*; 2019. p. 314-9. e2.
100. Brandli A, Stone J. Remote Ischemia Influences the Responsiveness of the Retina: Observations in the Rat. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2014;55(4):2088-96.
101. Ko S-F, Chen Y-T, Wallace CG, Chen K-H, Sung P-H, Cheng B-C, et al. Inducible pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cell therapy effectively protected kidney from acute ischemia-reperfusion injury. *American journal of translational research*. 2018;10(10):3053.

102. Al-Harbi NO, Nadeem A, Ahmad SF, Alotaibi MR, Alasmari AF, Alanazi WA, et al. Short chain fatty acid, acetate ameliorates sepsis-induced acute kidney injury by inhibition of NADPH oxidase signaling in T cells. *International immunopharmacology*. 2018;58:24-31.
103. Venugopal V, Laing CM, Ludman A, Yellon DM, Hausenloy D. Effect of remote ischemic preconditioning on acute kidney injury in nondiabetic patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a secondary analysis of 2 small randomized trials. *American Journal of Kidney Diseases*. 2010;56(6):1043-9.
104. Peralta C, Prats N, Xaus C, Gelpí E, Roselló-Catafau J. Protective effect of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology*. 1999;30(6):1481-9.
105. Ates E, Genç E, Erkasap N, Erkasap S, Akman S, Firat P, et al. Renal protection by brief liver ischemia in rats1. *Transplantation*. 2002;74(9):1247-51.
106. Davis JM, Gute DC, Jones S, Krsmanovic A, Korthuis RJ. Ischemic preconditioning prevents postischemic P-selectin expression in the rat small intestine. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1999;277(6):H2476-H81.
107. 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? *British journal of plastic surgery*. 2002;55(3):241-5.
108. Katholi RE, Woods W, Taylor GJ, Deitrick CL, Womack KA, Katholi CR, et al. Oxygen free radicals and contrast nephropathy. *American Journal of Kidney Diseases*. 1998;32(1):64-71.
109. Gleeson TG, Bulughapitiya S. Contrast-induced nephropathy. *American Journal of Roentgenology*. 2004;183(6):1673-89.
110. Zager RA, Baltés LA, Sharma HM, Jurkowitz MS. Responses of the ischemic acute renal failure kidney to additional ischemic events. *Kidney international*. 1984;26(5):689-700.
111. Zager R, Jurkowitz MS, Merola A. Responses of the normal rat kidney to sequential ischemic events. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 1985;249(1):F148-F59.
112. Wever KE, Warlé MC, Wagener FA, van der Hoorn JW, Masereeuw R, van der Vliet JA, et al. Remote ischaemic preconditioning by brief hind limb ischaemia protects against renal ischaemia-reperfusion injury: the role of adenosine. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2011;26(10):3108-17.
113. Wever KE, Menting TP, Rovers M, Van Der Vliet JA, Rongen GA, Masereeuw R, et al. Ischemic preconditioning in the animal kidney, a systematic review and meta-analysis. *PloS one*. 2012;7(2):e32296.
114. Pan T, Jia P, Chen N, Fang Y, Liang Y, Guo M, et al. Delayed remote ischemic preconditioning confers renoprotection against septic acute kidney injury via exosomal miR-21. *Theranostics*. 2019;9(2):405.
115. Olguner CG, Koca U, Altekin E, Ergur BU, Duru S, Girgin P, et al. Ischemic preconditioning attenuates lipid peroxidation and apoptosis in the cecal ligation and puncture model of sepsis. *Exp Ther Med*. 2013;5(6):1581-8.
116. Ali ZA, Callaghan CJ, Lim E, Ali AA, Reza Nouraei S, Akthar AM, et al. Remote ischemic preconditioning reduces myocardial and renal injury after elective abdominal aortic aneurysm repair: a randomized controlled trial. *Circulation*. 2007;116(11\_supplement):I-98-I-105.
117. Huang J, Chen Y, Dong B, Kong W, Zhang J, Xue W, et al. Effect of remote ischaemic preconditioning on renal protection in patients undergoing laparoscopic partial nephrectomy: a 'blinded' randomised controlled trial. *BJU international*. 2013;112(1):74-80.
118. Zarbock A, Schmidt C, Van Aken H, Wempe C, Martens S, Zahn PK, et al. Effect of remote ischemic preconditioning on kidney injury among high-risk patients undergoing cardiac surgery: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2015;313(21):2133-41.
119. Deftereos S, Giannopoulos G, Tzalamouras V, Raisakis K, Kossyvakis C, Kaoukis A, et al. Renoprotective effect of remote ischemic post-conditioning by intermittent balloon inflations in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;61(19):1949-55.

120. Kellum JA, Chawla LS. Full Review Cell-cycle arrest and acute kidney injury: the light and the dark sides. 2015.
121. Jaeschke H. Mechanisms of Liver Injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2006;290(6):G1083-G8.
122. Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2006;17(6):1503-20.
123. Emlet DR, Shaw AD, Kellum JA, editors. Sepsis-associated AKI: epithelial cell dysfunction. *Seminars in Nephrology*; 2015: Elsevier.
124. Arulkumaran N, Sixma ML, Jentho E, Ceravola E, Bass PS, Kellum JA, et al. Sequential analysis of a panel of biomarkers and pathologic findings in a resuscitated rat model of sepsis and recovery. *Critical care medicine*. 2017;45(8):e821.
125. Cuartero M, Ballús J, Sabater J, Pérez X, Nin N, Ordonez-Llanos J, et al. Cell-cycle arrest biomarkers in urine to predict acute kidney injury in septic and non-septic critically ill patients. *Annals of intensive care*. 2017;7(1):92.
126. Ghob BC, Schoemaker RG, van den Doel MA, Duncker DJ, Verdouw PD. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation*. 1996;94(9):2193-200.
127. Loukogeorgakis SP, Panagiotidou AT, Broadhead MW, Donald A, Deanfield JE, MacAllister RJ. Remote ischemic preconditioning provides early and late protection against endothelial ischemia-reperfusion injury in humans: role of the autonomic nervous system. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;46(3):450-6.
128. Hale SL, Kloner RA. Protection of myocardium by transient, preischemic administration of phenylephrine in the rabbit. *Coronary artery disease*. 1994;5(7):605-10.
129. Bankwala Z, Hale SL, Kloner RA. Alpha-adrenoceptor stimulation with exogenous norepinephrine or release of endogenous catecholamines mimics ischemic preconditioning. *Circulation*. 1994;90(2):1023-8.
130. Liem DA, Verdouw PD, Ploeg H, Kazim S, Duncker DJ. Sites of action of adenosine in interorgan preconditioning of the heart. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2002;283(1):H29-H37.
131. Vinten-Johansen J, Yellon DM, Opie LH. Postconditioning: a simple, clinically applicable procedure to improve revascularization in acute myocardial infarction. *Am Heart Assoc*; 2005.
132. Hausenloy DJ, Yellon DM. Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning. *Cardiovascular research*. 2006;70(2):240-53.
133. Kin H, Zhao Z-Q, Sun H-Y, Wang N-P, Corvera JS, Halkos ME, et al. Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovascular research*. 2004;62(1):74-85.
134. Konstantinov IE, Arab S, Kharbanda RK, Li J, Cheung MM, Cherepanov V, et al. The remote ischemic preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans. *Physiological genomics*. 2004;19(1):143-50.
135. Liang J, Wang J, Saad Y, Warble L, Becerra E, Kolattukudy PE. Participation of MCP-induced protein 1 in lipopolysaccharide preconditioning-induced ischemic stroke tolerance by regulating the expression of proinflammatory cytokines. *Journal of neuroinflammation*. 2011;8(1):182.
136. Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nature protocols*. 2009;4(1):31-6.
137. Wang Z, Holthoff JH, Seely KA, Pathak E, Spencer III HJ, Gokden N, et al. Development of oxidative stress in the peritubular capillary microenvironment mediates sepsis-induced renal microcirculatory failure and acute kidney injury. *The American journal of pathology*. 2012;180(2):505-16.
138. Benjamim CF, Hogaboam CM, Kunkel SL. The chronic consequences of severe sepsis. *Journal of leukocyte biology*. 2004;75(3):408-12.
139. Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue III LW, Bland KI, et al. Cecal ligation and puncture. *Shock*. 2005;24:52-7.

140. Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, Call DR. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock* (Augusta, Ga). 2000;13(2):110-6.
141. Deitch EA. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. *Shock* (Augusta, Ga). 1998;9(1):1-11.
142. Esmon CT. Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? *Critical care medicine*. 2004;32(5):S219-S22.
143. Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *Journal of leukocyte biology*. 2007;81(1):137-43.
144. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock—a review of laboratory models and a proposal. *Journal of Surgical Research*. 1980;29(2):189-201.
145. LI Fz, Kimura S, Nishiyama A, Rahman M, ZHANG Gx, Abe Y. Ischemic preconditioning protects post-ischemic renal function in anesthetized dogs: role of adenosine and adenine nucleotides 1. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2005;26(7):851-9.

