

# Humik Asitin Renal Üzerinde Renoprotektif Etkisi İ skemi-Reperfüzyon Yaralanması: Sıç anlarda Deneysel Bir Çalışma

Alpaslan Akbas,1,5 Coskun Silan,2 Murat Tolga Gulpinar,1 Eyup Burak Sancak,1  
Sidika Seyma Ozkanli,3 and Dilek Ulker Cakir4

**Özet**—Hümik asit tıpta olduğu kadar tarım ve hayvancılıkta da kullanılan bir antioksidan moleküdür. Amacımız, bir renal iskemik reperfüzyon modelinde hümik asidin potansiyel renoprotektif etkilerini araştırmaktır. Yirmi bir rat rastgele üç eşit gruba ayrıldı. 1, 12 ve 24. saatlerde intraperitoneal serum veya humik asit enjekte edildi. İ skemik olmayan grup I sahte olarak değerlendirildi. Sol renal arter serum (grup II) ve intraperitoneal humik asit (grup III) içinde klemlenerek sol renal iskemik reperfüzyon işlemine tabi tutuldu. İ skemi ve reperfüzyon süresi her biri için 60 dakika idi. Serum örneklerinden toplam antioksidan durumu, toplam oksidatif durum, oksidatif stres indeksi ve iskemik ile modifiye edilmiş albümin seviyeleri biyokimyasal olarak analiz edildi. Böbrekler histopatolojik ve immünohistokimyasal olarak değerlendirildi. Biyokimyasal sonuçlar hümik asit grubunda (III) iskemik grubuna (II) göre total oksidatif durumu, iskemik ile modifiye edilmiş albümin ve oksidatif stres indeksi düzeylerinin önemli ölçüde azaldığını, ancak total antioksidan durumunun arttığını gösterdi. Histopatolojik incelemede renal tübül hümik asit grubunda (III) iskemik grubuna (II) kıyasla dilatasyon, tübül hücre hasarı ve nekroz, Bowman kapsülünün dilatasyonu, hiyalin silendirler ve tübül hücre dökülmesi azalmıştır. İ mmünohistokimyasal sonuçlar, grup III'te apoptozun kötüleştiğini gösterdi. Renal iskemik reperfüzyon hasarı hümik asit uygulaması ile hafifletilmiştir. Bu gözlemler, hümik asidin oksidatif stresi önleyerek renal iskemik reperfüzyon hasarı üzerinde potansiyel bir terapötik etkiye sahip olabileceğini göstermektedir.

**ANAHTAR KELİ MELER:** böbrek; hümik asit; iskemik reperfüzyonu.

GİRİŞ

Böbrek yetmezliği i nedenleri arasında şok, renal transplantasyon ve renal iskemik ve reperfüzyona (I/R) yol açan parsiyel nefrektomi ameliyatları yer alır. Renal doku başlangıçta iskemik ile hipoksi yaşarken reperfüzyon ile durum daha karmaşık hale gelir. Yüksek miktarda oksijen anoksik dokuya saldırır ve yüksek oranlarda reaktif oksijen radikallerinin salınmasına neden olur. Böbrekte biriken serbest oksijen radikalleri gibi problemlere

apoptoz ve nekroz meydana gelir. Ayrıca reperfüzyon ile birlikte inflamatuvar kaskad, kompleman sistemi ve sitokin aktivasyonları da meydana gelebilir. Endotelial, mitokondriyal ve parankimal hücreler tarafından salınan serbest oksijen radikalleri, reperfüzyon sırasında oluşan hasardan sorumlu tutulur. Sonuç olarak bu serbest oksijen radikallerinin salınımını engellemek I/R yaralanmasında kritik öneme sahiptir. Literatürde antioksidan özelliği olan malzemelerin bu hasarı önlediğini bildiren birçok çalışma bulunmaktadır.

Hümik asit (HA), güçlü bir serbest radikal temizleyici olarak bilinen bir polifenolik antioksidandır. Hümik asit toprak, okyanus suyu, turba ve kömür gibi organik yapılarda bulunur [1]. Aromatik halkalardan, fenolik hidroksil ve karboksil gruplarından ve benzen halkalarına bağlı metoksil gruplarından oluşur. Hümik asitler uzun yıllardır bitkilerde büyümeyi uyarmak için ve hayvanlarda terapötik olarak kullanılmaktadır [2]. Lokal analjezik özelliklere, anti-HIV aktivitesine, immüno-uyarıcı, antioksidan, antimikrobik, antiinflamatuvar ve antiviral etkilere sahiptir. Bu nedenle farmakolojik ajan olarak da kullanılırlar.

<sup>1</sup> Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, Türkiye

<sup>2</sup> Tıp Fakültesi, Eczacılık Anabilim Dalı, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, Türkiye

<sup>3</sup> Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Medeniyet Üniversitesi, İstanbul, Türkiye

<sup>4</sup> Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, Türkiye

<sup>5</sup> Anabilim Dalı'na yazışmaların yapılması gereken kişiler, Çanakkale, Türkiye. E-posta: alpaslanakbas@comu.edu.tr

Bildiğ imiz kadarıyla, HA'nın böbreğ i I/R hasarından koruyup koruyamayacağı na dair yayınlanmış bir rapor bulunmamaktadır. Çalışmamızda indüklenmiş I/R yaralanması modeli ile ratlarda hü mik asidin etkinliğ ini değ erlendirdik. Değ erlendirme oksidatif stres parametreleri, histopatoloji ve immünohisto kimyasal sonuçlara dayandırıldı.

#### MALZEMELER VE YÖNTEMLER

Bu deneysel çalışma için etik onay Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Araştırmaları Etik Kurulu'ndan alınmıştır.

#### Hayvanlar ve Tedaviler

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nden 280±30 g ağı ırlığı nda, 21 adet erkek Wistar albino sıç an (8-12 haftalık) temin edildi. Deney protokolleri, Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı Kılavuzuna (ABD Ulusal Sağ lık Enstitüleri, revize edilmiş 1985) göre gerç ekleştirilmiştir. Tüm ratlar, çalışma boyunca standart laboratuvar koşullarında, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsünde, oda sıcaklığı nda ayrı kafeslere yerleştirildi. Hayvanlar 25±1 °C sıcaklığı a ve %45±5 neme sahip standart barınaklarda tutuldu. Sıç anlara ad libitum yiyecek ve su verildi. Ameliyat sırasında steril koşullar sağ landı.

Sıç anlar rastgele üç eşit gruba ayrıldı (her biri n=7). İ lk gruba sahte grup adı verildi. İ kinci ve üç üncü gruplara renal iskemi/reperfüzyon uygulandı. Üç üncü gruba intraperitoneal olarak 10 mg/kg hü mik asit enjekte edildi. Maddeler işlem den 1, 12 ve 24 saat önce verildi.

#### Deney protokolü

Yirmi bir adet Wistar albino rat aşağı ıdaki şekilde üç gruba ayrıldı:

- Grup I (sham grubu, n=7): İ skemi ve madde uygulaması yapılmadan sol böbrekler alındı.
- Grup II (serum+İ /R grubu, n=7): Serum ameliyattan önce (1., 12. ve 24. saatlerde) verildi. Daha sonra sıç anlar operasyona alındı. Sol renal arter 60 dakika kleplendi ve 60 dakika yeniden kaynaştırıldı. Ameliyat sonunda sol böbrekler alındı.
- Grup III (HA+ İ /R grubu, n=7): HA (10 mL/kg doz) ameliyat öncesi (1., 12. ve

24. saat). Aşağ ıdaki prosedürler grup II ile aynıydı. Sol renal arter 60 dakika kleplendi ve 60 dakika reperfüze edildi. Ameliyat sonunda sol böbrekler alındı.

#### Cerrahi prosedür

Deneysel işlem den önce tüm hayvanların vücut ağı ırlıkları kaydedildi. Sıç anlara intraperitoneal ksilazin (Rompun, Bayer, İ stanbul, Türkiye) 5 mg/kg ve ketamin hidroklorür (Ketalor, Eczacıbaşı, İ stanbul, Türkiye) 50 mg/kg enjeksiyonu ile anestezi uygulandı. Karın derisi povidon iyot ile hazırlandı. Cilt insizyonu sonrası sol renal arter bulundu. İ skemi grubunda sol renal artere 3-0 monofilaman sütür ile turnike uygulandı. 60. dakikada turnike aç ıldı ve sol nefrektomi uygulanmadan önce 1 saat reperfüzyon sağ landı.

Sham grubunda sol böbrek yerleştirildi ve acil nefrektomi yapıldı. Alınan böbrekler servisten hemen sonra formalin solüsyonuna konularak histopatolojik ve immünohistokimyasal inceleme için patolojiye gönderildi. Nefrektomi öncesi abdominal aorttan kan örnekleri alındı. Ameliyat bitiminde tüm ratlar servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi.

#### Biyokimyasal Analizler

##### Kan Örneklerinin Hazırlanması

Kan örnekleri antikoagüan tüplere yerleştirildi ve toplam antioksidan durum (TAS), toplam oksidan durum (TOS) seviyeleri için 5000 rpm'de 5 dakika, iskemi modifiye albümin (IMA) analizleri için 3500 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. 30 dakikalık pıhtılaşmayı takiben seviyeler. Serum örnekleri daha sonra ayrıldı ve biyokimyasal analiz için incelenene kadar -80 °C'de saklandı.

##### IMA Düzeylerinin Hesaplanması

Tüm donmuş serum numuneleri, ç özdürme işlem inden sonra iyice karıştırıldı ve ölç ümden önce yeniden santrifüjlendi. Serum IMA seviyeleri, Bar-Or'un yöntemi [8] kullanılarak ACB testi ile hızlı ve kolorimetrik yöntem kullanılarak analiz edildi. 200 µL hasta serumu cam tüplere aktarıldı ve 50 µL %0,1 CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, MO, ABD) eklendi. Hafifçe ç alkalandıktan sonra karışım, yeterli kobalt albu min bağ lanmasını sağ lamak için 10 dakika süreyle inkübe edildi. Daha sonra 50 µL 1.5 mg/mL ditiyotreitöl (DTT) (Sigma-Aldrich, MO, ABD) ç özelti olarak eklendi.

renklendirici ajan 2 dakika sonra 1 mL %0.9 NaCl eklendi. DTT'siz bir kör elde etmek için 50 uL 1.5 mg/mL DTT yerine elli mikrolitre damıtılmış su kullanıldı. Numune absorbanları, bir spektrofotometre (Shimadzu UV1601 spectrophotometer, Tokyo, Japonya) ile 470 nm'de analiz edildi ve sonuçlar absorban birimleri (ABSU) olarak not edildi.

#### Toplam Antioksidan Durumunun Analizi

Serum TAS, Erel [9] tarafından geliştirilen ticari olarak temin edilebilen bir kit (Fully Automated 3rd Generation Total Antioxidant Status (TAS) ASSAY KIT, ürün kodu: RL0017, REL Assay Diagnostics, Mega Tıp, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak ölçüldü. Bu ölçümde, bu analiz yönteminin prensibi hidrojen peroksit varlığına 2,20-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) molekülünün ABTS molekülüne yükseltgenmesine dayanmaktadır. Kalibrasyonda Trolox eşdeğeri olarak bir E vitamini analogu kullanılmıştır. Sonuçlar, litre başına milimol Trolox eşdeğeri (mmol Trolox eşdeğeri/L) olarak not edilir.

#### Toplam Oksidan Durumunun Analizi

Serum TOS, ticari olarak temin edilebilen bir kit (Tam Otomatik Toplam Oksidan Durumu (TOS)) kullanılarak ölçüldü. TEST KİT, ürün kodu: RL0024, REL Assay Diagnostics, Mega Tıp, Gaziantep, Türkiye) Erel tarafından geliştirilmiştir [10]. Bu yöntemin prensibi, numunede bulunan oksidanlar tarafından ferröz iyon-o-dianisidin kompleksinin ferrik iyonlara oksidasyonuna dayanır. Numunedeki oksidan miktarını gösteren rengin yoğunluğu spektrofotometri ile ölçüldü. Bu tahlilde, kalibratör olarak hidrojen peroksit kullanıldı. Sonuçlar, litre başına mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri (Imol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eşdeğeri/L) cinsinden not edilir.

#### Oksidatif Stres Endeksinin Hesaplanması

TOS'un TAS'a yüzde oranı oksidatif stres indeksini (OSI) verir. Hesaplamayı yapmak için TAS birimi, mmol Trolox eşdeğeri/L, μmol Trolox eşdeğeri/L'ye dönüştürüldü ve OSI şu şekilde hesaplandı:  $OSI = [(TOS, \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ eşdeğeri/L}) / (TAS, \mu\text{mol Trolox eşdeğeri/L}) \times 100]$ . OSI değeri şu şekilde hesaplandı:  $OSI = [(TOS, \text{Imol/L}) / (TAS, \text{Imol Trolox eşdeğeri/L}) / 100]$ .

Vacutainer® içine venöz ponksiyon tekniği ile açıldıktan sonra tüm deneklerden kan örnekleri alındı. (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tüpleri

biyokimyasal belirlemeler için antikoagüanlar. Kan örnekleri 4000 rpm'de 10 dakika santrifülden sonra serum örnekleri elde edildi. İMA için toplanan serum örnekleri analizlere kadar -80 °C'de saklandı. İMA analizleri tamamlandı ve OSI hesaplandı.

#### Histopatolojik Değerlendirme

Böbrekler formalin çözeltisinden çıkarıldı, parafine gömüldü 3 um'de kesildi ve hematoksilin ve eozin (H ve E) ile boyandı. Deneyimli nefropatologlar histolojik preparatları ışık mikroskobu (Olympus BX51) ile inceledi ve Olympus DP72 kamera ile fotoğrafı çekildi.

Böbrek dokuları değerlendirilirken tübül dilatasyon (TD), tübül hücre dejenerasyonu ve nekrozu (TCDN), Bowman kapsülünün dilatasyonu (DBS), tübül hiyalin silendirler (THC), interstisyumun lenfositik infiltrasyonu (LI) ve tübül hücre dökülmesindeki değişiklikler (TCS) araştırıldı ve puanlandı. Puanlar görünür değişiklik yok (0), minimal veya hafif değişiklik (1), orta düzeyde değişiklik (2) ve şiddetli değişiklik (3) idi. Her numune için bölüm başına en az on yüksek güçlü alan (HPF; büyüme, ×400) incelenmiştir.

#### İmmünohistokimyasal Yöntemler

Apoptotik hücre ölümüsürasında in situ çekirdekte DNA parçalanmasını saptayan terminal deoksinkinleotidil transferaz dUTP nick end etiketleme (TUNEL) yöntemi, bir apoptoz tespit kiti (In Situ Apoptosis Detection Kit, ApopTag, Millipore, ABD) kullanılarak kullanıldı. Aşağıda listelenen tüm reaktifler kiti aittir ve üreticinin talimatları izlenerek hazırlanmıştır. Kesitler, ksilen içinde deparafinize edildi ve dereceli bir etanol serisi ile yeniden hidratlandı. Daha sonra 20 μg/mL proteinaz K ile oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi ve dH<sub>2</sub>O'da durulandı. Endojen peroksidaz aktivitesi, oda sıcaklığında 15 dakika PBS içerisinde %3 hidrojen peroksit ile inkübasyon yoluyla inhibe edildi. Kesitler daha sonra 10-30 s dengeleme tamponu ve ardından TdT-enzim ile 37 °C'de nemli bir atmosferde 60 dakika inkübe edildi. Daha sonra, oda sıcaklığında 10 dakika önceden ısıtılmış çalışma gücünde durdurma/yıkama tamponuna konuldu ve 30 dakika anti-digoksinin konjugatı ile inkübe edildi. Her adım, PBS içinde iyice yıkanarak ayrıldı. Etiketleme, peroksidaz substrat uygulanarak ortaya çıkarıldı, metil yeşili kullanılarak karşı boyama yapıldı ve kesitler kurutuldu, temizlendi ve monte edildi.

Apoptoz indeksi olarak TUNEL pozitif hücre/dört yüksek güçlü alan (HPF) hücre oranı kullanıldı. Apoptotik hücreleri saymak için her bölümde dört mikroskobik alan

Tablo 1. Tüm Gruplarda Biyokimyasal Oksidan ve Antioksidan Parametre Düzeyleri

	İ MA (ABSU)	TOS (nmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> eşdeğ eri/L)	TAS (nmol Trolox eşdeğ eri/L)	OSI (keyfi birimler)
Şam	0,588 ± 0,041	12,24 ± 1,33	1,97± 0,18	6,25 ± 0,95
I/R grubu	3,438 ± 1,075#	22,52 ± 1,73#	1,23± 0,18#	18,62 ± 2,97#
I/R+HA grubu	0,660 ± 0,030*	14,29 ± 2,39*	2,12± 0,48*	6,99 ± 1,95*

Tüm veriler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

I/R iskemi-reperfüzyon, HA humik asit, İMA iskemi ile modifiye edilmiş albümin, TOS toplam oksidan durumu, TAS toplam antioksidan durumu, OSI oksidatif stres indeksi

# p< 0.05 - sahte grup; \*p< 0,05 - I/R grubu

sıcak noktalardan seçildi ve ×400 büyütme ile incelendi.

İstatistiksel analiz

İstatistiksel analiz, Windows için Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) sürüm 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) ile yapıldı. Gruplar arası karşılaştırmalarda Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testleri kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık ap değ eri <0.05 olarak ayarlandı.

## SONUÇLAR

### Biyokimyasal Analiz

Kruskal-Wallis testi ile değ erlendirildiğ inde tüm gruplarda bulunan kan İMA, TAS, TOS ve OSI değ erlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark vardı. Mann-Whitney U analizi kullanılarak her grup kendi kendisiyle karşılaştırıldığ ında anlamlı bir fark bulundu.

Şam grubunda İMA değ erleri 0,588 iken iskemi grubunda 3,438'e yükseldi ve I/R+HA grubunda 0,6'ya geriledi (p<0,05).

Şam grubunda 1,97 olan TAS değ eri İ /R grubunda 1,23'e gerilerken, İ /R+HA grubunda 2,12'ye yükseldi (p<0,05).

İ skemi grubunda ölç ülen TOS değ eri sham grubunun iki katıydı (22.52 ve 12.24). Ancak HA uygulamasından sonra bu değ er sham düzeyine (14,29) yakın değ erlere döndü(p<0,05).

TOS'un TAS'a oranından hesaplanan OSI değ eri sham, I/R ve I/R+HA gruplarında sırasıyla 6,25, 18,62 ve 6,99 idi ve bu değ erler istatistiksel olarak anlamlıydı (p<0,05) (Tablo 1, Şekil 1).

### Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal muayene

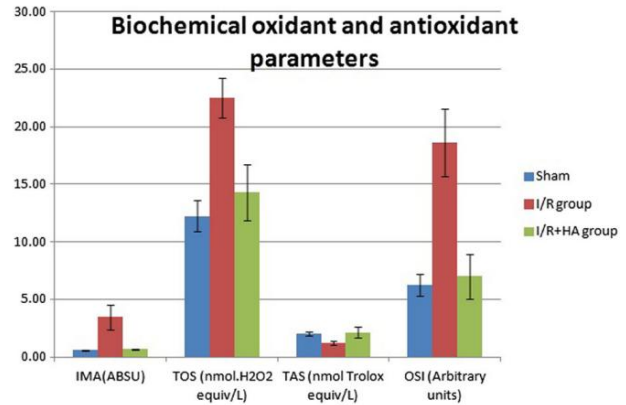
Hematoksilen-eozin boyama, sahte gruba kıyasla I/R grubunda gözlenen TD, TCDN, DBS, THC ve TCS'de yüksek miktarda değ iş iklik gösterdi.

Ancak bu bozulmalar I/R+HA grubunda anlamlı olarak azaldı (p<0,05) (Şekil 2).

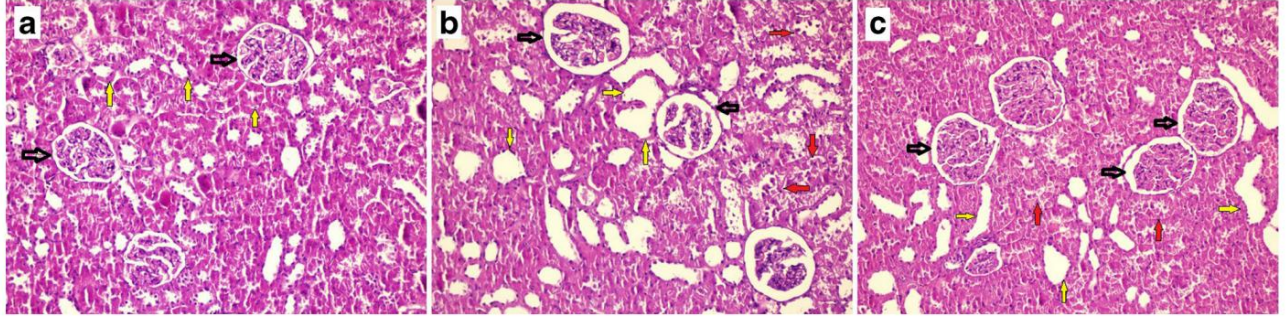
İmmünohistokimyasal boyama ile gözlenen dört yüksek güç lü alanda apoptoz gösteren hücre sayısı sham grubunda 22.8, I/R grubunda 251.4 ve I/R + HA grubunda 112.8 idi (p< 0.05) (Şekil 1). 3) (Tablo 2).

## TARTIŞMA

Renal kan akımı birç ok durumda azalabilir ve birç ok faktörden etkilenir. Kimya sırasında böbrek anoksik kalır. Renal iskemiyeye neden olan ratlarda geri dönüşümsüz hasar baş lar.



Şekil 1. Kan İMA, TAS ve TOS seviyeleri ile hesaplanan OSI değ eri anlamlı bulundu.



Şekil 2. Böbrek dokusunun hematoksilen-eozin boyaması. (H&E ×20). a Sham grubu: normal böbrek dokusu. (sarı ve beyaz kalın oklar sırasıyla tubulus ve glomerulus'u göstermektedir). b İ skemi grubu: şiddetli tübüler dilatasyon, tübüler hücre dejenerasyonu ve nekrozu (TCDN) (kırmızı oklar) ve Bowman kapsülünün genişlemesi (beyaz kalın oklar) gösterilmektedir. c I/R+ hümk asit grubu: Bowman kapsülünün hafif dilatasyonu (beyaz kalın oklar), TCDN (kırmızı oklar) ve TD (sarı oklar) görüyor.

60 ila 90 dakika sonra. İ skemiden sonra, reperfüze dokuya saldıran oksijen miktarını azaltmak için üretilen süperoksitler, hidrojen peroksit ve hidroksil gibi serbest oksijen radikalleri (ROS) doku hasarına neden olur [11]. Bu bileşikler hücre zarlarına bağ lanır, lipitler, proteinler ve nükleik asitlerle reaksiyona girer ve doku hasarına yol açan lipit peroksidasyonuna neden olur. Antioksidan maddeler bu radikalleri endojen ve eksojen olarak temizler. Endojen çalışan moleküllerden bazıları süperoksit dis mutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyondur (GSH). Literatürde eksojen olarak antioksidan etkinliği e sahip olduğ u bildirilen birçok materyal bulunmaktadır.

Örneğ in, fenolik bir bileşik olan rosmarinik asit, biyokimyasal ve patolojik verilerle kanıtlanmış I/R hasarında antioksidan etkinliği e sahiptir [12]. Polifenolik bir bileşik olan HA ile ilgili birçok çalışma olmasına rağmen böbrekler üzerindeki etkisine ilişkin literatürde herhangi bir veri bulunmamaktadır.

Çalışmamızda hümk asitin böbrek hasarının derecesini azaltmada etkili olduğ unu bulduk.

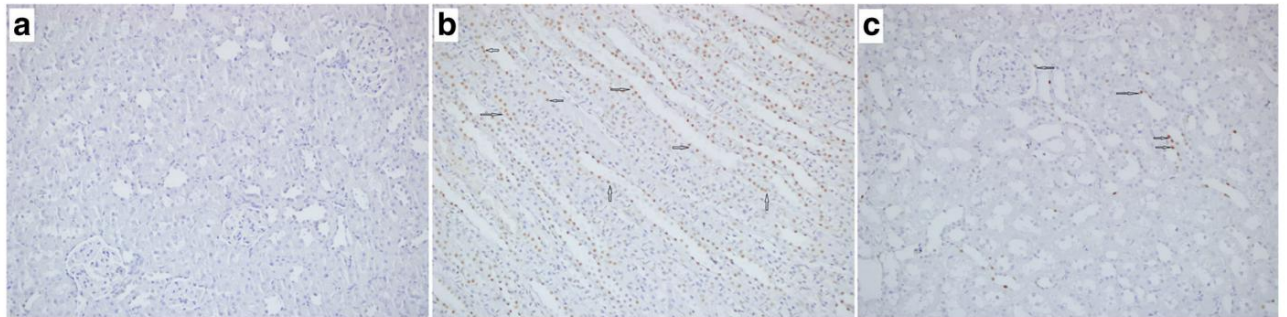
uyarılmış iskemi ve reperfüzyon ile. İ skemik durumlarda yükselen TOS ve IMA değ erleri antioksidan verilmesinden sonra düşmüştür.

Ek olarak, hümk asit verilen grupta iskemi ile bağ lantılı TAS ve OSI değ erlerinin azalması arttı.

İ skemiye bağ lı histopatolojik değ işiklikler, antioksidan verilen grupta minimal seviyelerde kalmıştır.

Miyokard enfarktüsünün erken dönemde saptamak için İ MA ile ilgili ilk çalışmalar tamamlandı. Önceki çalışmalar, kardiyak iskemi ile bağ lantılı geri dönüşü olmayan hasar oluşumundan önce kardiyak troponinin daha duyarlı bir şekilde arttığı nı göstermiştir [8, 13]. Renal iskemi hasarı sırasında İ MA artışı ile ilgili deneysel çalışmalar mevcuttur [14]. Çalışmamızda I/R grubunda IMA artmış, antioksidan verilen grupta sham grubuna yakın değ erlere düşmüştür.

TAS, vücudun oksidatif strese karşı savunma mekanizmasını öngören bir parametredir. Hücreler arasında dolaşan kan kritik bir rol oynar.



Şekil 3. Üç grubun immünohistokimyasal boyanması. (ApoptTag ×20). a Apoptotik hücreler sahte grupta oluşmadı. b İ skemik dokuda yoğun apoptoz vardır. c Antioksidan grupta apoptotik hücreler azalır.

Tablo 2. Tüm Gruplarda İmmünohistokimyasal ve H&amp;E Boyama Bulguları

	Apoptoz (4hpf)	DBC	TD	TCD	TN	HC	Int.Enf.
Şam	22,86 ± 11	0,14± 0,37	0,71 ± 0,48	0,14± 0,37	0,29 ± 0,48	0,14 ± 0,37	0,43± 0,53
I/R	251,43 ± 69#	2,14± 1,73#	1,57 ± 0,53#	1,57± 0,53#	1,57 ± 0,53#	2,14 ± 0,9#	0,86± 0,69 **
I/R+HA	112,86 ± 78*	1,42± 0,39*	0,43 ± 0,78*	0,57± 0,53*	0,86 ± 0,37*	1,43 ± 0,97*	0,57± 0,97**

Veriler ortalama ± SD olarak ifade

edilmiştir. hpf yüksek güç alanı, TD tübül dilatasyon, Bowman kapsülünün DBC dilatasyonu, TCD tübül hücre hasarı, TN tübül nekroz, HC hyalin silendirler, Int.Inf geçiş reklamı sızması

# p< 0.05 - sahte grup; \*p< 0.05 - IR grubu; \*\*p> 0,05 - I/R grupları, interstisyel inflamasyon tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı değ ildir

bu antioksidanların taşınması ve serbest oksijen radikallerinin (ROS) temizlenmesi. Kan, oksidatif hasara karşı redoks dengesini korumak için antioksidan maddeleri vücudun tüm bölgelerine taşır. Ek olarak, redoks reaksiyonu tek bir antioksidan tarafından değil, antioksidanların oluşturduğu farklı bileşikler tarafından oluşturulur. Bu duruma en iyi örnek glutatyonun oluşturduğu askorbat [15] ve askorbattan oluşan alfa-tokoferoldür [16].

Sadece antioksidan maddelerin değil bazı ilaçların da TAS düzeylerini arttırdığı gözlemlenmiştir.

Örneğin, tip 2 diabetes mellitus tedavisinde kullanılan pioglitazonun renal iskemi reperfüzyonu ile ilgili iki çalışmada TAS düzeylerini arttırdığı ve tübül nekroz hasarını istatistiksel olarak azalttığı bulunmuştur [17, 18]. Çalışmamızda bu bulgulara ek olarak HA verilen grupta apoptozun gerilediği ve TD, THC, HC, DBS gibi hasarın daha az olduğu görüldü

Tıpkı antioksidan maddeler gibi, oksidan maddeler de endojen ve eksojen olarak üretilebilir. ROS'un başlıca kaynakları olan ksantin oksidaz, glikolat oksidaz ve monoamin oksidaz gibi, oksidaz enzimleri de endojen olarak üretilebilir [19].

Ekzojen oksidanların örnekleri ultraviyole ışık ve sigaradır [20]. Oksidatif stres sırasında bu oksidan maddelerin her birini ayrı ayrı ölçmek pratik olmadığından, TOS'u ölçmek uygundur.

TOS iskemi reperfüzyon gibi durumlarda arttığı gibi başka durumlarda da (romatoid artrit, tüberküloz) artabilir [21, 22].

Literatürde bugüne kadar hümit asitin iskemi reperfüzyon hasarı üzerindeki etkinliği ile ilişkin yalnızca bir makale bulunmaktadır. Özkan ve ark. sıçan beyinlerinde fokal serebral iskemideki histopatolojik ve biyokimyasal değ işlikleri araştırdı [23]. Bu çalışmaya göre hümit asit verilen grupta, gruba göre anlamlı bir iyileşme saptanmıştır.

verilmedi. Çalışmamızda hümit asidin böbrek iskemisine bağlı hasarı önemli ölçüde azalttığı nı bulduk.

Hümit asit birçok farklı sektörde kullanılan bir malzeme olmasına rağmen antioksidan etkilerini gösteren çalışma sayısı sınırlıdır. Çalışmamız hümit asidin böbreği oksidatif hasardan koruduğunu gösterse de daha geniş klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

#### TEŞEKKÜRLER

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir. Proje Numarası 159.

#### REFERANSLAR

- Hartenstein, R. 1981. Çamur ayrıştırma ve stabilizasyon. Bilim 212(4496): 743-9.
- Chen, Y., J. Katan, A. Gamliel, T. Aviad ve M. Schnitzer. 2000. Solarize edilmiş topraklarda bitki büyümesinin artmasında çözünür organik maddenin katılımı. Toprakların Biyolojisi ve Verimliliği 32(1): 28-34.
- Efimova, I., S. Khil'ko ve O. Smirnova. 2012. Radikal zincir oksidasyon süreçlerinde hümit asitlerin antioksidan aktivitesi. Rus Uygulamalı Kimya Dergisi 85(9): 1351-4.
- Gostishcheva, MV, MV Belousov, MS Yusubov, RR Ismatova ve SE Dmitruk. 2009. Tomsk Bölgesi'ndeki farklı orijinli turbalardan hümit asitlerin karşılaştırmalı IR spektral özellikleri. Pharmaceutical Chemistry Journal 43: 418-21.
- Van Rensburg, C., J. Dekker, R. Weis, TL Smith, E. van Janse Rensburg ve J. Schneider. 2002. Oksihumatin anti-HIV özelliklerinin araştırılması. Kemoterapi 48(3): 138-43.
- Van Rensburg, C., A. Van Straten ve J. Dekker. 2000. Oksifülvik asidin antimikrobiyal etkinliği için in vitro araştırılması. Antimikrobiyal Kemoterapi Dergisi 46(5): 853-4.

7. Vucskits, A., I. Hullár, A. Bersényi, E. Andrásófszky, M. Kulcsár ve J. Szabó. 2010. Sıç anlarda fulvik ve hümik asitlerin performans, bağ ışıklık tepkisi ve tiroid fonksiyonu üzerindeki etkisi. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 94(6): 721–8.
8. Bar-Or, D., E. Lau ve JV Winkler. 2000. Kobalt albumin bağ lanması ve bunun miyokardiyal iskemi için bir belirteç olma potansiyeli için yeni bir test — bir ön rapor. *Acil Tıp Dergisi* 19(4): 311–5.
9. Erel, O. 2004. Güçlüserbest radikal reaksiyonlara karşı toplam antioksidan yanıtı ölçmek için yeni bir otomatik yöntem. *Klinik Biyokimya* 37(2): 112–9.
10. Erel, O. 2005. Toplam oksidan durumunu ölçmek için yeni bir otomatik kolorimetrik yöntem. *Klinik Biyokimya* 38(12): 1103–11.
11. McCord, JM 2000. Serbest radikallerin ve oksidatifin evrimi stres. *American Journal of Medicine* 108(8): 652–9.
12. Öztürk, H., H. Öztürk, EH Terzi, U. Özgen, A. Duran ve İ . Uygun. 2014. Sıç anlarda renal iskemi/reperfüzyon hasarına karşı Rosmarinik asidin koruyucu etkileri. *Pakistan Tabipler Birliđ i Dergisi* 64(3): 260–5.
13. Sinha, M., D. Roy, D. Gaze, P. Collinson ve J. Kaski. 2004. Akut koroner sendromların erken tanısında miyokard iskemisinin yeni bir biyokimyasal belirteci olan Bİschemia modifiye albumin<sup>n</sup>in rolü *Acil Tıp Dergisi* 21(1): 29–34.
14. Kocan, H., S. Çitgez, U. Yüçetaş, et al. 2014. İ skemi ile değ iştirilmiş albümin, renal iskemik hasar için objektif bir biyobelirteç olarak kullanılabilir mi? *Wistar albino fareleri ile deneysel bir çalışma. Transplantation Proceedings* 46(10): 3326–9.
15. Packer, JE, TF Slater ve RL Willson. 1979. E vitamini ve C vitamini arasındaki serbest radikal etkileşiminin doğ ruda gözlemlenmesi. *Nature* 278(5706): 737–738.
16. Stocker, R., MJ Weidemann ve NH Hunt. 1986. Plasmo dium vinckei ile enfekte olmuş fare eritrositlerinin artan askorbik asit içeriğ inden sorumlu olası mekanizmalar. *Biochimica et Biophysica Acta* 881(3): 391–7.
17. Hu, H., C. Zou, X. Xi, et al. 2012. Pioglitazonun farelerde renal iskemi-reperfüzyon hasarı üzerindeki koruyucu etkileri. *Journal of Surgical Research* 178(1): 460–5.
18. Zou, C., H. Hu, X. Xi, Z. Shi, G. Wang ve X. Huang. 2013. Pioglitazon, antioksidan kapasiteyi artırarak renal iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruma sağ lar. *Journal of Surgical Research* 184(2): 1092–5.
19. Nohl, H., L. Gille ve K. Staniek. 2005. Mitokondri tarafından hücre iç i reaktif oksijen türleri üretimi. *Biyokimyasal Farmakoloji* 69(5): 719–23.
20. Kösecik, M., O. Erel, E. Sevinç ve S. Selek. 2005. Pasif iç iciliđ e maruz kalan çocuklarda artan oksidatif stres. *Uluslararası Kardiyoloji Dergisi* 100(1): 61–4.
21. Ceylan, E., A. Güsün, M. Gencer ve N. Aksoy. 2005. Tüberküloz aktivitesinin saptanmasında yeni bir parametre: reaktif oksijen metabolitleri. *Solunum* 72(2): 156–9.
22. Nakamura, K., H. Endo ve S. Kashiwazaki. 1986. Serum oksidasyon aktiviteleri ve romatoid artrit. *Uluslararası Doku Reaksiyonları Dergisi* 9(4): 307–16.
23. Özkan, A., HM Şen, İ . Şehitoğ lu, et al. 2015. Hümik asidin fokal serebral iskemi hasarı üzerindeki nöroprotektif etkisi: sıç anlarda deneysel bir çalışma. *Enflamasyon* 38(1): 32–9.