



**BÖBREK İSKEMİ-REPERFÜZYON MODELİ
OLUŞTURULAN RATLARDA ASTAKSANTİN
MADDESİNİN OTOFAJİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Ayşegül KISAOĞLU

ANATOMİ ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Evren KÖSE
Yüksek Lisans Tezi – 2020**

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BÖBREK İSKEMİ-REPERFÜZYON MODELİ OLUŞTURULAN RATLARDA
ASTAKSANTİN MADDESİNİN OTOFAJİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Ayşegül KİSAOĞLU

**Anatomi Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Evren KÖSE**

**Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL-2020-2009
proje numarası ile desteklenmiştir.**

**MALATYA
2020**

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Böbrek anatomisi	2
2.1.1. Nefron	4
2.1.2. Böbreğin Kanlanması	5
2.1.3. Böbrek Fonksiyonları	6
2.1.4. Sıçan Böbrek Anatomisi	7
2.2. Böbrek İskemi-Reperfüzyon Hasarı	7
2.2.1. İskemi.....	7
2.2.2. Reperfüzyon.....	8
2.2.3. İskemi-Reperfüzyon Hasarı	9
2.2.4. İskemi-Reperfüzyon Hasar Mekanizmaları	9
2.2.5. Böbrek İskemi-Reperfüzyon.....	12
2.3. Antioksidanlar.....	13
2.3.1. Endojen Antioksidanlar	13
2.3.2. Eksojen Antioksidanlar.....	14
2.4. Karotenoidler	14
2.4.1. Astaksantin.....	14
2.4.2. Astaksantin'in Antioksidan Etkisi ve Yararları	15
2.5. Otofaji	16
2.5.1 Otofajinin Moleküler Mekanizması.....	17
2.5.2. Beclin-1.....	18
2.5.3. LC3	18
2.5.4. p62	19
3. MATERYAL VE METOT	20
3.1. Çalışmanın Şekli.....	20

3.2. Deney Gruplarındaki Hayvan Sayılarının Belirlenmesi	20
3.3. Deney Hayvanları ve Deney Gruplarının Belirlenmesi	20
3.4. Bilateral Böbrek İ/R Modelinin Uygulanması ve Örneklerin Toplanması	22
3.5. Biyokimyasal Analizler	24
3.5.1. Protein Tayini	25
3.5.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	25
3.5.3. Malondialdehit (MDA) Ölçümü	25
3.5.4. Böbrek Dokularında TAS ve TOS Ölçümü	25
3.5.5. BUN ve Kreatin Değerlerinin Ölçülmesi.....	25
3.6. Histolojik Analizler.....	26
3.7. İstatistiksel Analizler	27
4. BULGULAR.....	28
4.1. Astaksantin'in BUN ve Kreatin Düzeyi Üzerine Etkisi	28
4.2. Astaksantin'in böbrek dokusunda SOD Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	30
4.3. Astaksantin'in böbrek dokusunda MDA Seviyesi Üzerine Etkisi.....	31
4.4. Astaksantin'in TAS ve TOS Miktarı Üzerine Etkisi	32
4.5. Histolojik Bulgular	34
4.5.1. Histopatolojik Bulgular.....	34
4.5.2. Beclin-1 İmmünreaktivitesi	35
4.5.3. LC3 immünreaktivitesi	36
4.5.4. p62 İmmünreaktivitesi	37
5. TARTIŞMA	39
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	42
KAYNAKLAR	43
EKLER.....	51
EK-1. Özgeçmiş.....	51
EK-2. Etik Kurul Kararı.....	52

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca bilgi, tecrübe ve desteğini benden esirgemeyerek bana yol gösteren kıymetli danışmanım Prof. Dr. Evren KÖSE'ye,

Bilgi ve yardımlarını esirgemeyen kıymetli hocalarım Anatomi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Davut ÖZBAĞ'a, Dr. Öğr. Üyesi Aymelek ÇETİN'e, Dr. Öğr. Üyesi Mustafa CANBOLAT'a, Dr. Öğr. Üyesi Turgay KARATAŞ'a,

Tez çalışmamın histolojik analizlerinde yardımcı olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan Dr. Öğr. Üyesi Azibe YILDIZ'a, biyokimyasal analizler ve çalışmam sırasındaki yardımlarından ötürü Fizyoloji Anabilim Dalı'ndan Arş. Gör. Dr. Kevser TANBEK ve Arş. Gör. Dr. Ümit YILMAZ'a,

İstatiksel analizlerde yardımcı olan Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Cemil ÇOLAK'a

Hiçbir konuda desteğini esirgemeyen, beni teşvik edip yönlendiren, her soruma sabır ve sevgiyle yaklaşan değerli büyüğüm Arş. Gör. Dr. Nesibe YILMAZ'a,

Desteğini her daim hissettiğim değerli büyüğüm Dr. Öğr. Üyesi Deniz ŞENOL'a, Anatomi Anabilim Dalı'dan Arş. Gör. Dr. Furkan ÇEVİRGEN başta olmak üzere tüm asistan ve lisansüstü öğrenci arkadaşlarıma,

TYL-2020-2009 nolu yüksek lisans tez projeme maddi destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Destekleri ve sevgileriyle her zaman yanımda olan, maddi manevi yardımlarını benden esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

Ayşegül KISAOĞLU

ÖZET

Böbrek iskemi-reperfüzyon modeli oluşturulan ratlarda astaksantin maddesinin otofaji üzerine etkisinin araştırılması

Amaç: Çalışmanın amacı böbrek iskemi reperfüzyon hasarı olan ratlarda astaksantin otofaji üzerine etkilerinin araştırılmasıdır.

Materyal ve Metot: Çalışmada 40 adet Spraque-Dawley cinsi erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar Grup 1 (Sham), Grup 2 (İ/R), Grup 3 (Atx 5 mg/kg+İ/R), Grup 4 (Atx 10 mg/kg+İ/R), Grup 5 (Atx 25 mg/kg+İ/R) olmak üzere 5 gruba ayrıldı. 1 ve 2. gruplardaki sıçanlara 7 gün boyunca gavajla astaksantin çözücüsü (zeytinyağı) verildi. 3, 4 ve 5. gruplardaki sıçanlara ise 7 gün boyunca gavajla zeytinyağında çözülmüş farklı dozlarda astaksantin verildi. 7. günün sonunda tüm gruplardaki sıçanlara bilateral olarak 45 dk böbrek iskemi sonrası 24 saat reperfüzyon yapıldı. Serum örneklerinden BUN ve Kreatinin seviyeleri ölçüldü. TAS-TOS düzeyleri ELİSA yöntemi ile ölçüldü. Böbrek dokusundan SOD ve MDA düzeyleri ölçüldü. Böbrek dokuları hematoksilen-eozin boyama metodu ile boyandı. Böbrek dokularında Beclin-1, LC3 ve p62 seviyeleri immünohistokimyasal yöntemle belirlendi.

Bulgular: İ/R grubunun BUN ve kreatinin seviyelerinin sham grubuna göre artış gösterdiği, astaksantin uygulanan gruplarda ise anlamlı derecede düşük olduğu belirlendi ($p<0.05$). SOD ve TAS değerlerinin İ/R grubunda azaldığı, astaksantin uygulamasıyla arttığı belirlendi ($p<0.05$). MDA ve TOS değerlerinin İ/R grubunda arttığı ve astaksantin uygulamasıyla azaldığı belirlendi ($p<0.05$). İ/R grubunda tübüllerde nekrotik değişiklikler ve dilatasyon gözlemlendi. İ/R grubunda izlenen histopatolojik bulguların Atx 10 mg/kg+İ/R ve Atx 25 mg/kg+İ/R gruplarında belirgin derecede azaldığı tespit edildi ($p<0.05$). Beclin-1 ve LC3 immünreaktivitesi diğer gruplar ile karşılaştırıldığında en yüksek Atx 25 mg/kg+İ/R grubunda tespit edildi ($p<0.05$). p62 immünreaktivitesi ise en düşük Atx 25 mg/kg+İ/R grubunda tespit edildi ($p<0.05$).

Sonuç: Çalışmamızda astaksantin otofajinin indüksiyonu yoluyla dokuları hasara karşı koruduğu tespit edildi.

Anahtar kelimeler: Astaksantin, böbrek, iskemi/reperfüzyon, oksidatif stres, otofaji

ABSTRACT

Investigation of the Effect of Astaxanthin on Autophagy in Renal Ischemia-Reperfusion Modeled Rats

Aim: The aim of this study is to investigate effect of astaxanthin on autophagy in rats with renal ischemia reperfusion injury.

Material and Method: In this study 40 male Sprague-dawley rats were used. The rats were divided into 5 groups; Group1 (Sham), Group2 (I/R), Group3 (Atx 5 mg/kg+I/R), Group4 (Atx 10 mg/kg+I/R) and Group 5 (Atx 25 mg/kg+I/R). The rats in groups 1 and 2 were given astaxanthin solvent (olive oil) by gavage for 7 days. The rats in groups 3, 4 and 5 were given different doses of astaxanthin dissolved in olive oil by gavage during 7 days. At the end of 7th day, rats in all groups were performed bilateral renal ischemia for 45 minutes then reperfusion for 24 hours. BUN and creatinine levels from serum samples were measured. TAS-TOS levels were measured by ELISA method. SOD and MDA levels from renal tissue were measured. Kidney tissues were stained with Hematoxylin-eosin method. Beclin-1, LC3, p62 levels in renal tissues were detected by immunohistochemistry method.

Results: The levels of BUN and creatinine in the I/R group were detected to increase relative to the sham group, while in the astaxanthin groups it was lower. ($p<0.05$). It was determined that the TAS and SOD values decreased in the I/R group and increased with astaxanthin administration ($p<0.05$). It was determined that MDA and TOS values increased in the I/R group and decreased with astaxanthin administration ($p<0.05$). Necrotic changes and dilatation were observed in the tubules in area in the I/R group. It was detected that the histopathological findings observed in the I/R group decreased significantly in the Atx 10 mg/kg+I/R and Atx 25 mg/kg+I/R groups ($p<0.05$). LC3 and Beclin-1 immunoreactivity were detected the highest in Atx 25 mg/kg+I/R group when compared another groups ($p<0.05$). p62 immunoreactivity was detected the lowest in the Atx 25 mg/kg+I/R group ($p<0.05$).

Conclusion: In our study, it was determined that astaxanthin protects the tissues against damage via induction of autophagy

Keywords: Astaxanthin, renal, ischemia/reperfusion, oxidative stress, autophagy

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADP	: Adenozin difosfat
AMP	: Adenozin monofosfat
ATG	: Otofaji ile ilişkili genler
ATP	: Adenozin trifosfat
Atx	: Astaksantin
BUN	: Kan üre azotu
CAT	: Katalaz
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GST	: Glutasyon S-Transferazlar
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
İ/R	: İskemi-reperfüzyon
KDH	: Ksantin dehidrojenaz
KO	: Ksantin oksidaz
LC3	: 1A/1B-hafif zincir 3
MDA	: Malondialdehit
mg/dL	: miligram/desilitre
mg/kg	: miligram/kilogram
mg/ml	: miligram/mililitre
NAD⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotit
O₂	: Oksijen molekülü
O₂⁻	: Süperoksit radikali
PAS	: Preautophagosomal structure (Otofaji oluşum merkezi)
PMNL	: Polimorf nüveli lökositler
RNA	: Ribonükleik asit
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOR	: Serbest oksijen radikali
TAS	: Toplam antioksan kapasite
TOS	: Toplam oksidan kapasite

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Böbreğin lokalizasyonu ve komşulukları	2
Şekil 2.2. Hilum renale ve içindeki yapılar	3
Şekil 2.3. Böbreğin koronal kesiti	4
Şekil 2.4. Nefron ve Tubulus collectivus	5
Şekil 2.5. Böbreğin Arterleri	6
Şekil 2.6. Sıçan Böbrek Görüntüsü	7
Şekil 2.7. Otofajinin moleküler mekanizması	18
Şekil 3.1. Sıçan gavaj uygulaması	22
Şekil 3.2. Böbrek iskemi modelinin uygulanması	24
Şekil 4.1. Grupların serum örneklerinden ölçülen BUN seviyesi	29
Şekil 4.2. Grupların serum örneklerinden ölçülen kreatin seviyesi.....	30
Şekil 4.3. Grupların böbrek dokularında SOD enzim aktivitesi.....	31
Şekil 4.4. Grupların böbrek dokularında MDA seviyesinin ölçülmesi	32
Şekil 4.5. Grupların böbrek dokularındaki TAS miktarı	33
Şekil 4.6. Grupların böbrek dokularındaki TOS miktarı	34
Şekil 4.7. Histopatolojik bulgular	35
Şekil 4.8. Beclin-1 İmmünreaktivitesi	36
Şekil 4.9. LC3 İmmünreaktivitesi.....	37
Şekil 4.10. p62 İmmünreaktivitesi.....	38

TABLolar DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 3.1. Deney gruplarının oluşturulması	21
Tablo 4.1. Sıçanların böbrek dokularında oksidatif stres parametre bulguları ve kan örneklerinde BUN ve Kreatin değerleri	28
Tablo 4.2. Histopatolojik değerlendirme sonuçları.....	35
Tablo 4.3. İmmünohistokimyasal değerlendirme sonuçları.....	38



1. GİRİŞ

İskemi; dokulara giden kan akımının çeşitli nedenlerle kesilmesi, reperfüzyon ise; dokulara kan akımının tekrardan sağlanmasıdır (1). Reperfüzyonda, iskemik periyotta meydana gelen hasardan daha ciddi doku hasarı meydana gelmektedir (2). Böbrek iskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarı; böbrek nakli, kardiyopulmoner bypass, düşük kalp debisi, kardiyojenik şok, nefrotoksik ilaç kullanımı, çoklu organ disfonksiyonu, şok gibi çeşitli durumlardan kaynaklanan akut böbrek hasarının önemli nedenidir (3).

Vücutta oksidan ve antioksidan sistemler arasında bir denge bulunur. Oksidan düzeyindeki artış ve antioksidan sistemin yetersiz kalması durumunda oksidatif hasar meydana gelir (4). Otofaji besin yokluğunda veya hücrel stres durumunda hücre içi homoestazinin sağlanmasında önemli etkiye sahiptir (5). Otofajinin indüksiyonu, hücre ölümüne katkıda bulunabilir veya hücreleri hasara karşı koruyabilir (6).

Astaksantin yüksek antioksidan özelliğe sahip bir antioksidandır. Astaksantin antioksidan özelliğinin yanı sıra antiinflamatuvar, antikanser, immün yanıtı güçlendirme, nörodejeneratif hastalıklara karşı etki gösterme gibi özellikleri olduğu bildirilmiştir (7). Son yıllarda gerçekleştirilen bazı çalışmalar astaksantin otofaji regülasyonunda da önemli rol oynadığını göstermektedir (8).

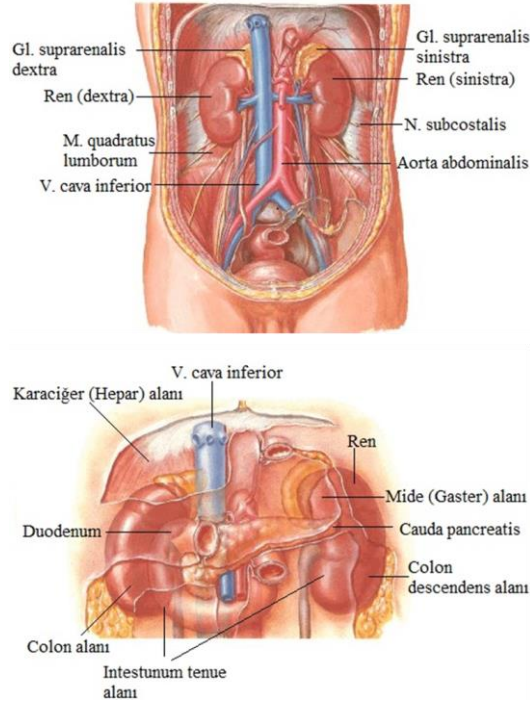
Literatürde astaksantin böbrek İ/R hasarı üzerine etkilerini inceleyen çok az sayıda çalışma yer almaktadır. Astaksantin farklı dokularda otofaji üzerine etkilerini inceleyen çalışmalar mevcut olmasına rağmen böbrek İ/R hasarı üzerine etkilerini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlayamadık.

Bu çalışmada böbrekte İ/R hasarında astaksantin farklı dozlarının oksidatif stres ve otofaji üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma ile böbrek İ/R'un neden olduğu yaygın klinik durumlarda ortaya çıkacak doku hasarını önleyebilecek bir antioksidan olduğunu düşündüğümüz astaksantin otofaji mekanizmasını nasıl etkileyeceği ve doku hasarı üzerine etkilerinin neler olabileceği aydınlatılmak istenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

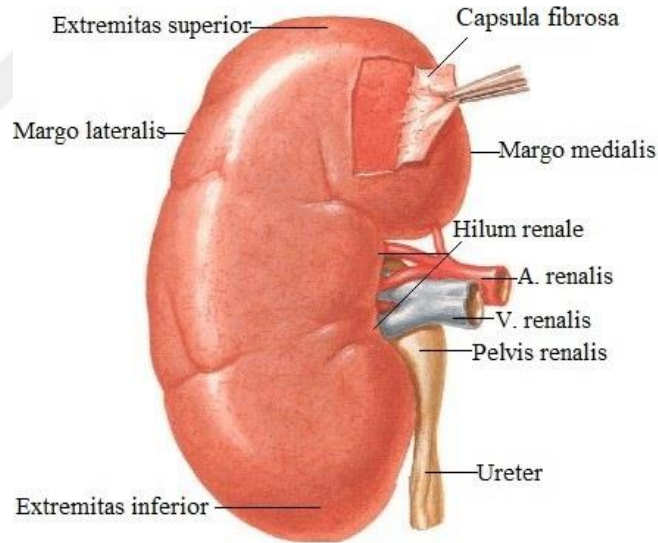
2.1. Böbrek anatomisi

Böbrek; karın arka duvarında, columna vertabralis'in her iki yanında, retroperitoneal olarak yerleşmiş fasulye şeklinde bir çift organdır. Sağ böbrek T12-L3 ve sol böbrek T11-L2 vertebra seviyesinde yerleşmişlerdir. Karaciğerin büyük bir bölümünün karın boşluğunun sağ-üst tarafında yerleşiminden dolayı sağ böbreğin yerleşimi sol böbreğe göre biraz daha aşağıdadır. Böbrekler etraflarındaki birçok oluşum ile komşuluk yaparlar. Sağ böbrek ön yüzde; glandula suprarenalis dextra, karaciğer, duodenum'un 2.parçası, jejenum kıvrımları, colon ascendens, flexura coli dextra ile, sol böbrek ön yüzde; glandula suprarenalis sinistra, mide, pankreas, dalak, jejenum kıvrımları, colon descendens ve flexura coli sinistra ile komşuluk yapar. Her iki böbrek arka yüzde; m. psoas major, m. quadratus lumborum, m. transversus abdominis, glandula suprarenalis, v. a. n. subcostalis, n. iliohypogastricus, n. ilioinguinalis ve a. v. lumbalis ile komşuluk yapar. Sağ böbreğin iç kenarı v. cava inferior ile sol böbreğin iç kenarı ise aorta abdominalis ile komşudur (Şekil 2.1) (9).



Şekil 2.1. Böbreğin lokalizasyonu ve komşulukları (10)

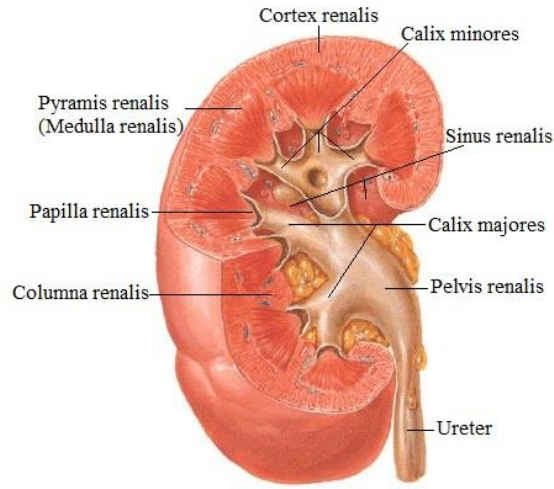
Böbreklerin uzunluğu yaklaşık 11.5 cm, genişliği 5-7 cm ve ön-arka kalınlığı 2.5 cm civarındadır. Yetişkin erkeklerde 125-170 gram ve yetişkin kadınlarda 115-155 gram ağırlığındadır (11). Böbreklerin extremitas superior ve extremitas inferior olmak üzere iki ucu, facies anterior ve facies posterior olmak üzere iki yüzü, margo medialis ve margo lateralis olmak üzere iki kenarı vardır. Margo medialis üzerinde vertikal bir yarık şeklinde hilum renale bulunur. Hilum renale içerisinde önden arkaya doğru; v.renalis, a.renalis ve pelvis renalis bulunur (Şekil 2.2). Ayrıca hilum renale'den lenf damarları ve sinirlerde geçer (9, 12). Böbreği içten dışa doğru üç kılıf sarar. Bunlar capsula fibrosa, capsula adiposa ve fascia renalis'tir. Capsula fibrosa böbreği dıştan saran ve hilum yakınlarında iki yaprağa ayrılan bağ dokusu yapısında bir kılıftır. Capsula fibrosa sağlam kollagen liflerden oluştuğu için genişleme yeteneği azdır. Capsula adiposa, capsula fibrosa'yı dıştan saran böbreğin yağ tabakasıdır. Bu yağ tabakası böbreğin arkasında fazla bulunurken, böbreğin ön kısmında peritonla örtülü yerlerde hiç bulunmaz. Fascia renalis (Gerota fasciası), böbreği en dıştan saran kılıftır. Böbreklerin etrafındaki bağ dokusunun kalınlaşması ile oluşan kılıftır (9, 12, 13).



Şekil 2.2. Hilum renale ve içindeki yapılar (Netter) (10)

Böbrekten koronal bir kesit alınıp incelendiğinde iki cevherden oluştuğu görülür. Dış kısımda böbreği kabuk gibi saran kısma cortex renalis, iç kısımdaki kısma medulla renalis denilir. Cortex renalis idrarı yapan oluşumları (Malpighi cisimcikleri) içerir ve nefrogen dokudan gelişmiştir. Medulla renalis ise yapı bakımından Henle kulpu ve toplayıcı kanallardan oluşur. Henle kulpu nefrogen, toplayıcı kanallar üreter tomurcuğu kaynaklıdır. Daha da içte böbrek şeklinde bir boşluk sinus renalis bulunur (12). Cortex

renalis, böbreğin dış kısmını oluşturur ve medulla renalis'e columna renalis (Bertin kolonları) adlı uzantılar gönderir. Cortex renalis'de glomerulus denilen kapiller yumaklar yerleşmiştir. Glomerulus, Bowman kapsülü denilen yapıya gömülü halde olup, glomerulus ve Bowman kapsülüne birlikte Malpighi cisimciği denir. Medulla renalis, böbreğin iç kısmını oluşturur ve Henle kulpu ve toplayıcı kanalları içeren 8-12 adet pyramis renalis'den (malpighi piramitleri) oluşur. Pyramis renalis'lerin tepe kısmında papilla renalis, papilla renalis'ler üzerinde de toplayıcı kanalların açılış delikleri olan foramina papillaria bulunur. Her bir foramina papillaria calix renalis minor ile sarılıdır. 2-3 calix renalis minor'un birleşmesiyle calix renalis major oluşur (9). Calix renalis major'lerin birleşmesi ile de pelvis renalis oluşur. Medulla renalis'in cortex renalis'deki uzantılarına Ferrein uzantıları (pars radiata=stria medullaris), cortex renalis'in medulla renalis'e olan uzantılarına columna renalis (Bertin kolonları) denir. Bir pyramis renalis ve etrafını saran cortex renalis bölümü bir böbrek lobu (lobus renalis), iki Ferrein uzantısı arasında kalan cortex bölümü bir böbrek lobcuğu (lobulus renalis) olarak adlandırılır (Şekil 2.3) (9, 12).

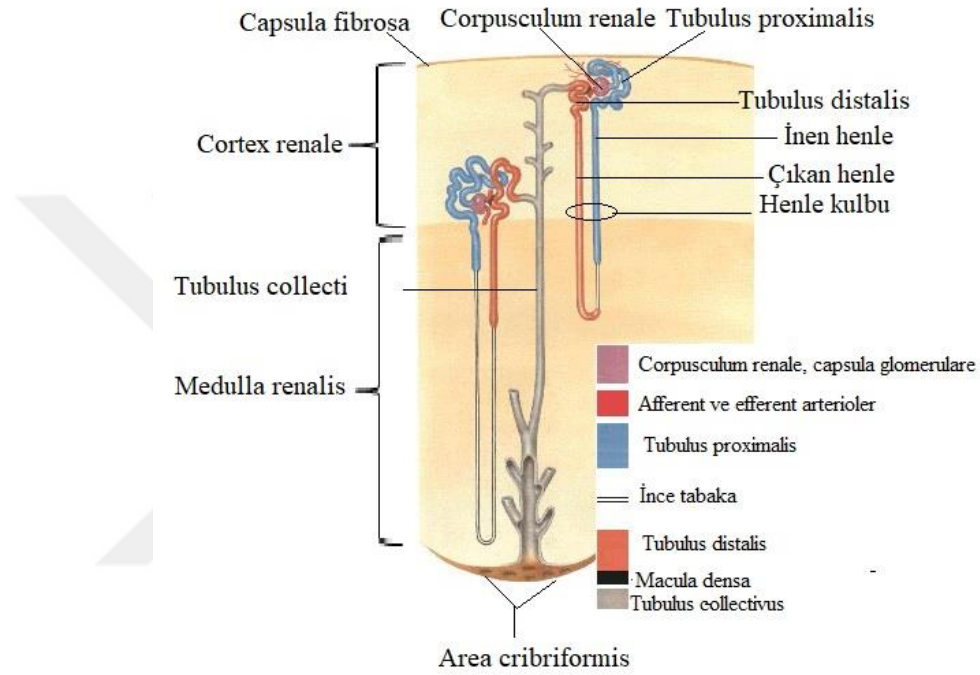


Şekil 2.3. Böbreğin koronal kesiti (Netter) (10)

2.1.1. Nefron

Böbreğin fonksiyonel en küçük yapısal birimi nefronudur. Bir insan böbreğinde yaklaşık 1 milyon nefron bulunur. Nefronların yenilenme özellikleri yoktur. Nefron, başlıca Malpighi cisimciği ve tubuler sistemden meydana gelir. Malpighi cisimciğini glomerul denilen kapiller yumağı ve onu çevreleyen Bowman kapsülü oluşturur. Glomerul kapillerden süzülen filtrat önce Bowman kapsülüne sonra tubulus proximalis'e

akar. Tubulus proximalis'in kıvrımlı parçasını düz kısmı izler ve bu parça Henle kulpu'nun inen kalın kolu olarak adlandırılır. Henle kulpu medulla renalis'e indikten sonra U şeklinde bir dönüşle cortex renalis'e ilerler. Henle kulpunun çıkan kalın kolu tubulus distalis olarak devam eder. Tubulus distalis tubulus collecti aracılığıyla toplayıcı tubullere bağlanır. Toplayıcı tubuller medulla renalis'de foramina papillare aracılığıyla papilla renalis'e açılmaktadır (13, 14).

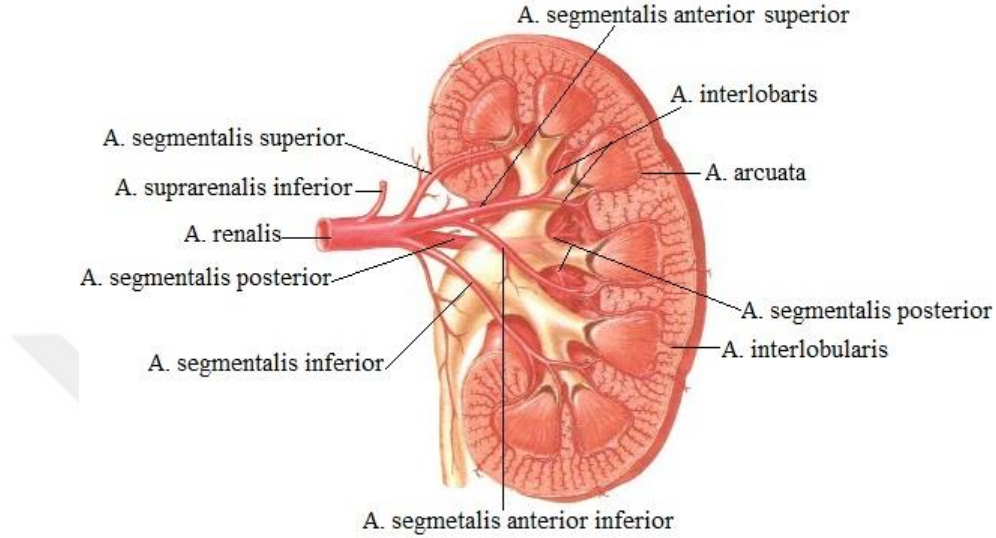


Şekil 2.4. Nefron ve Tubulus collectivus (Netter) (10)

2.1.2. Böbreğin Kanlanması

Böbreklerin kanlanması a. renalis'ler aracılığı ile olur. A. renalis'ler L₁₋₂ vertebra hizasında aorta abdominalis'den ayrılır. Böbreğe hilum renale'den giren a. renalis kalp debisinin yaklaşık 5'te 1'ini taşır. A. renalis'ler hilum renalis'de böbreğin segmentlerine uygun olarak 5 dala ayrılır. A. segmentalis'ler sinus renalis'de dallara ayrılarak loblar arasında a. interlobaris olarak devam eder. A. interlobaris'ler pyramis'lerin taban kısmında bir kavis çizerek a. arcuata adını alırlar. A. arcuata'nın cortex renalis'e uzanan dallarına a. interlobularis adı verilir. A. interlobularis, arteriola glomerulus afferens denilen ince dallarına ayrılır. Bowman kapsülünün damar kutbundan giriş yapan bu dallar rete capillare glomerulare adı verilen damar ağını oluşturur. Bu damar ağı yeniden

birleşerek arteriola glomerularis efferens'i oluşturur ve Bowman kapsülünün damar kutbundan çıkarak v. interlobularis'e açılır. V. interlobularis v. arcuata'ya, v. arcuata v. interlobularis'e v. interlobularis v. segmentalis'e ve v. segmentalis de v.renalis'e açılır (12).



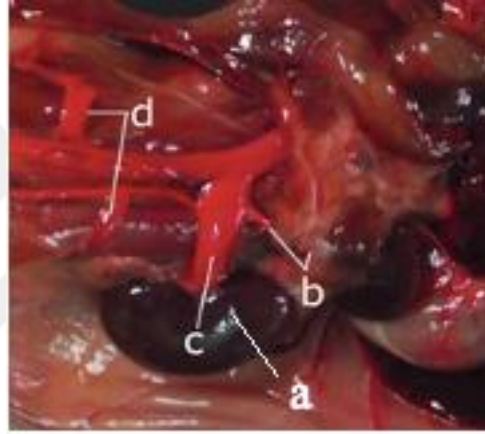
Şekil 2.5. Böbreğin Arterleri (Netter) (10)

2.1.3. Böbrek Fonksiyonları

Böbrekler hayati pek çok fonksiyonun yürütülmesinde rol alır. Metabolizma sonucu üretilen atık maddelerin ve yabancı maddelerin uzaklaştırılması, su, elektrolit ve asit-baz dengesinin düzenlenmesi, enzimlerin ve hormonların üretimi ve salgılanması böbreklerin görevleri arasında en önemlileridir. Böbrekler vücudun ihtiyacı ile ilişkili olarak plazmayı süzerek süzüntüdeki maddeleri uzaklaştırır ve böylece ihtiyaç duyulan maddeler kana geri dönerken, istenmeyen maddeler idrar yolu ile atılır. Böbrekler vücutta ihtiyaç duyulmayan atık maddeleri uzaklaştırmanın birinci yoludur. Bu ürünler arasında; üre, ürik asit, hemoglobin yıkımının son ürünü ve çeşitli hormonların metabolitleri bulunur. Ayrıca böbrekler; vücut sıvısı ozmolalitesinin ve elektrolit konsantrasyonlarının düzenlenmesinde, arteriyel basıncın düzenlenmesinde ve glukoneogenez'de rol oynar (14, 15).

2.1.4. Sıçan Böbrek Anatomisi

Sıçan böbreği karın arka duvarında yerleşmiş ve periton ile sarılı bir çift organdır (16). Sıçan böbreği 2 (± 0.5) cm uzunluğunda, 1-1.5 cm genişliğinde, 1 cm kalınlığındadır. Ağırlığı 180-280 gram olan bir sıçanın böbrek ağırlığı 0.73-1.2 g'dır (17). Böbreği dıştan sarı daha açık renkli olan bölümüne cortex renalis, içteki koyu renkli bölümüne medulla renalis denir. Yetişkin bir sıçanda yaklaşık 30000 nefron bulunur. İnsan böbreği ile karşılaştırıldığında daha az renal tubülü vardır. Sıçan her bir böbreğinde bir adet papilla renalis bulunur. Üretere tek bir calix ile bağlanır (18, 19). Sıçanlarda sağ a.renalis sol a.renalis'e göre daha cranialde bulunduğu için a. mesenterica cranialis'e yakın olarak aorta'dan origin alır. A. renalis'ler hilus içinde 2 dala ayrılmaktadır (20).



Şekil 2.6. Sıçan Böbrek Görüntüsü (a; böbrek, b; a. suprarenalis, c; a. renalis, d; a. circumflexa ilium profunda) (21)

2.2. Böbrek İskemi-Reperfüzyon Hasarı

2.2.1. İskemi

İskemi, arteriyal veya venöz kan akımının çeşitli nedenlerle azalması veya tamamen kesilmesine bağlı doku ve organların oksijenden yoksun kalıp beslenememesi durumudur (1). İskemiye bağlı doku hipokside kalır ve hipoksik doku hasarı meydana gelir. İskemi, hücresel enerji depolarının boşalması ve hücre içinde toksik metabolitlerin toplanması sonucu hücre ölümü ile sonuçlanabilmektedir. Hücrede iskemi döneminde bir takım metabolik ve yapısal değişiklikler ortaya çıkar. İskemide, dokuya gelen kan akımının kesilmesi ile oksidatif fosforilasyon azalır, adenozin trifosfat (ATP) ve fosfokreatin sentezi azalır (1). ATP azlığı fosfofruktokinaz enzimini uyarır ve oksijen yetersizliğinde glikojenden ATP oluşumu anaerobik glikoliz ile sağlanır. Böylece hücre

enerji kaynakları korunur. Glikoliz, laktik asit ve fosfat türevlerinden hidroliz sonucu oluşan inorganik fosfat birikimine neden olur ve hücre içi pH'ı düşürür (22). Hücrede ATP'nin azalması hücre zarında bulunan Sodyum-Potasyum-ATPaz (Na^+/K^+ -ATPaz) pompasında işlev yetersizliğine neden olur. Bu da hücre içerisinde iyon dengesizliğine yol açarak hücre içerisine aşırı miktarda Na^+ ve su girmesine ve akut hücre şişmesine sebep olur (23). Bu Na^+ seviyesindeki artış $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ pompasının Ca^{++} 'yı hücre dışına göndermeyi bırakıp ters yönde çalışmasına sebep olur. Hücre içinde artan Ca^{++} fosfolipazları, ATPaz'ları, proteazları, endonükleazları aktive eder. Fosfolipaz A_2 'nin aktivasyonu membran fosfolipid yapısını bozarak membrandaki hasarı daha da ilerletir (24).

İskemide hücre içerisinde meydana gelen iyon seviyelerinin değişimi proinflatuar sitokinler ve lökosit adezyon moleküllerinin üretiminde artış, bunun sonucu antiinflatuar sitokinler ve antioksidan enzimlerin üretiminde azalma meydana getirir. Tüm bu olaylar hücreyi daha savunmasız bir hale getirir (25). İskemi sırasında ATP sentezi durmasına rağmen, ATP kullanımı devam eder. ATP'den ADP (Adenozin difosfat), AMP (Adenozin monofosfat) ve adenozin oluşur. Adenozin hücre dışına difüze olduktan sonra inozin ve hipoksantine dönüşür. İskemik olmayan hücrede hipoksantin ksantin dehidrojenaz aracılığı ile ksantin ve ürik asite dönüşür. Bu reaksiyonda elektron alıcısı okside nikotinamid adenin dinükleotit (NAD^+)'dir. İskemik hücrede ise ATP yıkımı dokuda ksantin ve hipoksantin gibi pürin metabolitleri birikimine ve ksantin dehidrojenaz'ın (KDH) ksantin oksidaz'a (KO) dönüşmesine neden olur. Dokunun tekrar oksijenlenmeye başlamasıyla hipoksantin'in ksantin'e ve ksantin'in ürik asite dönüşümü ksantin oksidaz aracılığıyla olur. Bu reaksiyonda elektron alıcısı olarak moleküler oksijen kullanılır ve bunun sonucu SOR oluşur (26, 27).

2.2.2. Reperfüzyon

Reperfüzyon, iskemiye uğramış doku veya organlara tekrardan kan akımının sağlanması ile kan ve dolayısıyla oksijenin doku veya organlara ulaşmasıdır. Reperfüzyon sonrası aerobik ATP için gerekli oksijen doku veya organa ulaşır. Hücre içerisinde birikmiş H^+ kan akışı sayesinde hücreden uzaklaştırılır ve hücre içi pH normale döner. Fakat iskemik dokunun yeniden kanlanması dokuda iskemik dönemde meydana gelen hasardan çok daha ciddi hasarlara neden olur (2). Reperfüzyon döneminde meydana gelen bu hasarda hücre içine oksijen girmesiyle oluşan serbest oksijen radikal (SOR)

türevleri, polimorf nüveli lökositler (PMNL), kompleman sistemi ve endotel hücreleri rol oynar. Membranda bulunan lipitler, proteinler, nükleik asit ve deoksiribonükleik asit molekülleri reperfüzyon hasarına karşı en hasas hücresel yapılardır (28).

2.2.3. İskemi-Reperfüzyon Hasarı

İ/R hasarı oksijen yetersizliği ile başlayan, nötrofil ve SOR'ler aracılığıyla inflamatuvar yanıtlarla devam eden patolojik bir durumdur (29, 30). Dokuya giden kan akımının kesilmesi bir takım kimyasal olayların başlamasına ve fonksiyon bozukluğuna neden olur. Normal şartlarda ATP aerobik metabolizma ile sentezlenir. Ancak oksijen yetersizliğinde anaerobik metabolizma devreye girer ve laktik asit birikimi artar. Hücre de meydana gelen bu asidoz sonucu normal enzim aktiviteleri değişir, yüksek enerji bağları parçalanır, hücre canlılığını sürdürülebilmesi için gerekli enerjiyi yitirir (29, 31). Dokuya tekrar kan akımı sağlanması ile enerji sağlanır, hasar gören hücre onarılır ve toksik maddeler uzaklaştırılır. İskemik hasarın geri dönebilmesi için reperfüzyon gereklidir ancak daha ciddi hasarlara yol açar. İ/R'un neden olduğu doku hasarı büyük ölçüde reperfüzyon döneminde olur (29, 32).

2.2.4. İskemi-Reperfüzyon Hasar Mekanizmaları

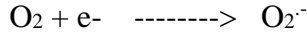
İ/R hasarının nedenleri arasında özellikle;

- Serbest oksijen radikalleri (SOR)
- Polimorf nüveli lökositler (PMNL)
- Kompleman sistemi
- Endotel hücreleri olmak üzere dört faktör yer almaktadır.

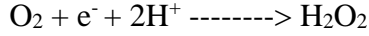
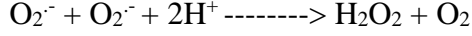
Serbest Oksijen Radikalleri (SOR)

Serbest radikaller, yörüngesinde eşlenmemiş elektron bulunduran molekül veya atomlardır (33). Eşlenmemiş elektronlarından ötürü stabil olmayan serbest radikallerin reaktiviteleri yüksektir ve kolayca reaksiyona girme eğilimindedirler. Serbest radikaller organizmalarda endojen ve eksojen kaynaklar tarafından üretilir (34).

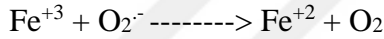
Süperoksit radikali, oksijen molekülü bir elektron alması ile oluşur. Aslında bu form direkt zararlı bir form değildir, süperoksit radikalının asıl önemi H₂O₂ (Hidrojen Peroksit) oluşturması ve indirgeyici olmasıdır.



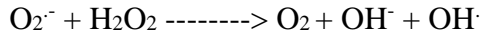
Hidrojen peroksit serbest radikal olmamasına karşın SOR arasında çok önemlidir. Serbest oksijen moleküllerinin üretilmesinde aracı görev yapar ve ayrıca hücre içinde sinyal molekülü görevi yapar (35-37).



Hidrojen peroksit, süperoksit ile reaksiyona girip en reaktif SOR olan hidroksil radikalini oluşturur. Hidroksil radikali büyük hasarlara neden olur (33). Hidrojen peroksit'in Fe^{+2} ve Cu^+ veya diğer geçiş metalleri ile Fenton reaksiyonuna girmesiyle hidroksil iyonu ve hidroksil radikali oluşur (38).



Süperoksit radikali hidrojen peroksitle Haber-Weiss reaksiyonuna girmesiyle hidroksil radikali oluşur (39).



Serbest Oksijen Radikallerinin Etkileri

SOR hücrenin yapı ve fonksiyonlarında hasar meydana getirir. Bu hasara duyarlı yapılar membran lipitleri, proteinler, nükleik asitler ve DNA molekülleridir.

SOR hücre içi organellerin membranlarında bulunan lipitlerle reaksiyona girerek lipit peroksidasyonuna neden olur. Lipit-SOR reaksiyonları sonucu toksik yan ürünler oluşur. Lipit peroksidasyonun sebep olduğu hasar hücre fonksiyonları için zararlıdır (40). Lipit peroksidasyonu biyolojik membran akıcılığında bozulma, membran potansiyelinde azalma ve membranın iyonlara karşı geçirgenliğinde artma sonucu membranların yırtılması ve organel içeriğinin hücre sitozolüne sızmasına neden olur. Bu olaylar sonucunda hücre hasarı ve ilerleyen dönemlerde hücre ölümü gerçekleşir (41).

Malondialdehit (MDA), lipit peroksidasyonu sonucu oluşan stabil son üründür. İ/R'da lipit peroksidasyon derecesini belirlemek için doku MDA düzeylerine bakılır (42).

Proteinlerin serbest radikallerin meydana getirdiği hasardan etkilenme dereceleri aminoasit dizilimlerine bağlıdır. Serbest radikaller ile oluşan protein oksidasyonun kimyasal sonucu olarak proteinler serbest radikal hasarına maruz kalır. Serbest radikaller proteinlerin fonksiyonlarını ve enzim aktivitelerini etkileyerek proteinlerin hasarına neden olur. Bu hasarlar hücre fonksiyonlarının bozulmasına neden olabilir (42).

Nükleik asitler, serbest radikaller için hedef konumundadır. Serbest radikallerin nükleotitleri etkilemesi sonucu DNA zincirinde kırılmalar ve yapısındaki değişiklikler sonucu mutasyonlar oluşabilir (40). SOR, DNA'yı etkileyerek oksidatif hasara neden olur. Hidroksil radikali bazlarla ve deoksiriboz şekeri ile kolaylıkla reaksiyona girerek DNA'yı hasara uğratabilir. Ek olarak inflamatuvar hücrelerin aktivasyonu sonucu solunumsal patlama ile hidrojen peroksit oluşur. Oluşan hidrojen peroksit hücrede membranlı yapıları geçerek çekirdekte bulunan DNA üzerinde yıkıcı etkiye sahiptir (4).

Polimorf Nüveli Lökositler (PMNL)

İ/R ile lökosit aktivasyonu meydana gelir ve endotel düzeyindeki patolojik değişiklikler ile membran geçirgenliği artar (43). Ayrıca PMNL İ/R hasar mekanizmasında yüksek miktarda SOR üretme kapasitesine sahip olduğu için önemli rol oynar. Reperfüzyonda doku hasarının ilerlemesine yol açan en önemli etkenlerden biriside iskemik dokuda serbest radikallerin ve diğer bazı kimyasalların etkisi ile göç eden nötrofillerdir. Nötrofiller salgıladığı proteinler aracılığıyla endotel hücresinin parçalanmasına ve hasarın ilerlemesine neden olur. Aktive olmuş nötrofillerin kapillerlerde yığılması ile kan akımının geri dönmesini engelleyen kapiller tıkaçlar oluşur bu durum reperfüzyon döneminin en önemli patolojilerinden birisidir. Lökositlerin başlattığı yanıt dokuda çeşitli mekanizmalar ile gerçekleştirilir (44, 45).

- Fosfolipaz A₂ aktivasyonu,
- Degranülasyon sonucu lizozomal enzimlerin salınması,
- SOR üretimi

Endotel hasar ve doku zedelenmesinin güçlü araçları olan bu ürünler, başlangıçtaki inflamatuvar uyarının etkisini güçlendirir (25, 45).

Kompleman Sistem

İ/R komplement aktivasyonun bir indükleyicisidir. İskemiden sonra reperfüzyon kompleman sistemin lokal aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır (46). Kompleman sistemin etkinleşmesi sonrası C3a, C5a, C3b ve C5b-9 proinflamatuvar bileşenleri oluşur. Kompleman bileşenlerinden anaflatoksinler (kompleman C3a ve C5a) ve membran atak kompleksi (C5b-9) reperfüzyon hasar mekanizmasında önemlidir. Anaflatoksinler, sitokin sentezini uyarmakta ve bu da enflamatuvar yanıtı artırmaktadır. Kompleman bileşenlerinden C5b-9 ve C3b vasküler tonusu düzenleyerek iskemik dokuya kan akımının sağlanmasını ve böylece lökosit-endotel adezyonunun artmasını sağlar (47, 48).

Endotel Hücresinin Rolü

Endotel hücreleri İ/R hasarının oluşmasında büyük öneme sahiptir ve SOR üretimini artırır. İ/R'da endotel hücreleri, adhezyon molekülleri aracılığıyla lökosit birikmesini ve dolayısıyla SOR üretimini artırır. Endotel hücrelerinin oksidatif stresi endotel aktivasyonu ve fonksiyonlarının bozulmasına neden olur (49, 50).

İ/R'da endotel hücreleri daha fazla SOR daha az nitrik oksit üretir. Endotel hücrelerindeki bu dengesizlik inflamatuvar mediatörlerin üretim ve salınımını artırırken adhezyon moleküllerinin biyosentezine sebep olur (51, 52).

2.2.5. Böbrek İskemi-Reperfüzyon

Böbrek, İ/R hasarına karşı duyarlı bir organdır. Böbrekte iskemi; düşük kalp debisi, renal vasküler tıkanıklık veya obstrüksiyon, sepsis ve böbrek nakli gibi çeşitli durumlardan kaynaklanan akut böbrek hasarının önemli nedenidir (3). Böbreğin korteksinden medullasına doğru gidildikçe kanlanması azalır. En çok kanlanan kısım böbrek korteksi iken vasa recta tarafından kanlanan böbrek medullası daha az kanlanır. Bu yüzden iskemi, iskemiye en duyarlı bölge olan böbrek medullasından başlar. İskemi hasarı tübüllerde fonksiyon eksikliğine neden olur (53).

Meduller hipoksi, hücresel enerji depolarının tükenmesine ve endotel hücrelerinde ve vasküler düz kas hücrelerinde aktin hücre iskeletinin bozulmasına neden olur. Ortaya çıkan tablo hücresel deformiteler ve çevre doku hipoksisi şeklindedir (54).

2.3. Antioksidanlar

Vücutta serbest radikallerin meydana getirdiği oksidatif hasara karşı çeşitli savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Bunlar; koruyucu mekanizmalar, onarım mekanizmaları, fiziksel savunmalar ve antioksidan savunmalar olarak adlandırılır. SOR veya serbest radikallerin meydana getirdiği hasarı engelleyen maddelere antioksidan denir. Sağlıklı vücutta oksidan düzeyi ile antioksidan sistem arasında bir denge bulunur. Oksidan düzeyinin yükselmesi veya antioksidan sistemin yetersiz kalması durumunda denge bozulur ve SOR hücre içi protein, lipit, karbonhidrat, nükleik asit ve enzimlerin fonksiyonlarını bozarak zarar verir. (55, 56).

Antioksidanlar oksidantlara karşı etkilerini 4 farklı yolla gösterir;

1) Toplayıcı (Süpürücü) etki; antioksidanlar SOR'ni etkileyerek tutar veya etkisiz hale getirirler. SOR'nin aksiyonlarının bu şekilde engellenmesi toplayıcı etki olarak adlandırılır. Antioksidan enzimler bu şekilde etki gösterir (33, 57).

2) Bastırıcı (Söndürme) etki; antioksidanlar SOR ile aktivasyona girerek onlara bir hidrojen iyonu verip aktivitelerini azaltır veya nötr hale dönüştürerek inaktif hale getirir. Vitaminler ve flavonoidler bu şekilde etki gösterir (33).

3) Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi; antioksidanlar SOR ile aktivasyona girerek reaksiyon zincirlerini kırar ve fonksiyonlarını engeller. Hemoglobinin, ağır minareller ve seruloplazmin bu şekilde etki gösterir (33).

4) Onarıcı etki; SOR'nin ortaya çıkardığı zarara karşı onarıcı etki gösteren antioksidanlardır (33).

Antioksidanlar vücutta sentezlenebilen endojen kaynaklı antioksidanlar ve dışarıdan alınması gereken eksojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere iki grupta incelenir.

2.3.1. Endojen Antioksidanlar

Vücutta sentezlenebilen antioksidanlara endojen kaynaklı antioksidanlar denilir. Endojen antioksidanlar enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak iki gruba ayrılır. Oksidasyon hasarına karşı savunmada etkili enzimatik

antioksidanlar arasında; Süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), Glutasyon S-Transferazlar (GST), Katalaz (CAT), Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi ve Hidroperoksidaz yer alır (55).

Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit radikalini (O_2^-) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüştüren enzimatik antioksidanlardan biridir. Süperoksit radikalinin fonksiyonunu engelleyerek hücreleri bu radikalın neden olduğu oksidatif hasara karşı korur. Dokuda oksijen basıncı artınca SOD aktivitesi artar (58).

Glutasyon Peroksidaz

Serbest radikallerin detoksifikasyonunda önemli rol oynayan ve lipid peroksidasyonunu engelleyen önemli bir enzimdir. Hidrojen peroksitlerin indirgenmesini katalize ederek hücreleri oksidatif hasara karşı korur (58).

2.3.2. Eksojen Antioksidanlar

Vücutta sentezlenemeyen ve dışarıdan alınması gereken antioksidanlara eksojen kaynaklı antioksidanlar denilir. Eksojen antioksidanlar; vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olarak sınıflandırılabilir (55).

2.4. Karotenoidler

Karotenoidler bir tür antioksidan grubudur. Fitoplanktonlar, algler, bitkiler ve sınırlı sayıda mantar ve mikroorganizmalar tarafından üretilen sarı, turuncu ve kırmızı renkli pigmentlerden oluşan antioksidan grubudur (59). Karotenoidler havuç, domates, portakal gibi sebze ve meyvelere rengini veren maddelerdir. Alglerin fotosentetik pigmentleri arasında yer almalarına karşın fotosentezde aktif rol oynamazlar (60). Karotenoidler yapısında 40 karbon atomu içeren çoklu doymamış hidrokarbonlardır. Yapısında oksijen atomu bulunan karotenoidler ksantofiller olarak adlandırılırken, sadece hidrojen ve karbon atomundan oluşan karotenoidler karotenler olarak adlandırılır (61).

2.4.1. Astaksantin

Astaksantin karotenoidlerin keton grubuna ait bir karotenoid türüdür. Astaksantin ilk defa 1938 yılında bir ıstakoz ekstresinden elde edilen ve önceleri "Haematochrom"

olarak bilinen bir pigmentken, 1944 yılında Tisher tarafından *Haematococcus*'un temel pigmenti olduğu bildirilmiştir (62). Astaksantin lipid peroksidasyonu ve oksidatif stres hasarına karşı hücre zarını ve dokuyu koruma özelliğine sahiptir. Güçlü antioksidan özellik gösterir. Doğadaki en zararsız ve en kuvvetli antioksidan olarak bilinen astaksantin antioksidan aktivesi karotenden, E vitamininden, Koenzim Q10'dan, C vitamininden daha fazladır (7). Astaksantin kırmızı-turuncu renkli hem lipofilik hemde hidrofilik özellik gösteren bir karotenoid türüdür. Bileşiğin ortasındaki konjuge çift bağ astaksantine kırmızı rengini vermektedir (63).

Astaksantin denizel ortamda, besin zincirinde birincil üretim olarak mikroalgler ve fitoplanktonlar tarafından üretilmektedir. Üretilen bu astaksantin daha sonra böcekler, zooplanktonlar veya kabuklular tarafından tüketilir ve son olarak diğer canlıların vücutlarında biriktirilir (64, 65). Astaksantin doğal kaynakların yani sıra laboratuvar ortamında kimyasal olarak da sentezlenir. Kimyasal olarak sentezlenen sentetik formdaki astaksantin, yapısal olarak ve biyoaktivite özelliği bakımından doğal formdan farklıdır. Doğal formdaki astaksantin bu nedenle daha değerlidir (7, 66). Astaksantin mantarlar ve algalardan stresli ortamlarda üretilip biriktirilmektedir. En yüksek oranda *Haematococcus pluvialis* denilen mikroalgden elde edilir. *Haematococcus pluvialis*, ışık, yüksek tuzluluk, besin eksikliği gibi koşullarda strese girerek astaksantin sentezini sağlar (67).

2.4.2. Astaksantin'in Antioksidan Etkisi ve Yararları

Astaksantin, serbest radikalleri etkileyerek etkisiz hale getirir ve serbest radikallerin neden olabileceği zincir reaksiyonlarına karşı koruma veya oluşmuş zincir reaksiyonlarını sonlandırma görevi üstlenir. Astaksantin antioksidan özelliğinden dolayı besin takviyesi olarak kullanımı yaygındır. Astaksantin canlılar üzerinde çeşitli yararlı etkileri bulunmaktadır. Bağışıklık sistemini güçlendirir, anti-inflamatuar etkiye sahiptir ve kan beyin bariyerinden geçebildiği için nörodejeneratif hastalıklara karşı koruyucu etki göstermektedir (7). Son yıllarda İ/R hasarına karşı koruyucu etkisine dikkat çeken çalışmalar da bulunmaktadır (68).

2.5. Otofaji

Otofaji kelime anlamı olarak kendi kendini yeme anlamına gelen katabolik bir olaydır. Hücre içi makromoleküllerin ve organellerin lizozomal aktivasyon ile parçalanmasını sağlayan bir mekanizmadır. Otofaji besin yokluğunda veya hücrel stres durumunda hücre içi moleküllerin homeostazisinin korunmasında önemli etkiye sahiptir (5). Otofaji hücre içinde yıkıma uğrayacak organel ve proteinlerin otofagozom adı verilen çift zarlı bir vezikül içine alınarak lizozomlara yönlendirilmesi ve içeriğinin lizozom aktivitesi ile yıkımıdır. Otofaji sayesinde hücreler enerji için hammadde olarak organel ve proteinlerini kullanırlar bu da hücrelerin çeşitli stres durumlarında canlı kalmalarını sağlamaktadır (69).

Günümüzde otofajinin üç farklı mekanizması tanımlanmaktadır; makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofaji. Her üç mekanizmada da hücrelerin içeriği lizozomlar tarafından yıkılır fakat üçünün de biyolojik özellikleri birbirinden farklıdır. Makrotofaji; yıkıma uğrayacak hedef molekülleri diğer moleküllerden ayıran çift katlı membran sistemi olan otofagozomu oluşturur. Yıkıma uğrayacak protein, karbonhidrat, lipid, mitokondri, RNA ve peroksizom gibi yapılar otofagozom içine hapsedilerek lizozomal enzimler tarafından parçalanır. Mikrotofaji; küçük sitoplazmik içeriklerin lizozomlar tarafından pinositozla alınması ve sindirilmesidir. Şaperon aracılı otofaji; proteinler bir şaperon ve reseptörü aracılığıyla lizozoma taşınır ve parçalanır. Şaperon aracılı otofajide vezikül oluşmaz (70, 71).

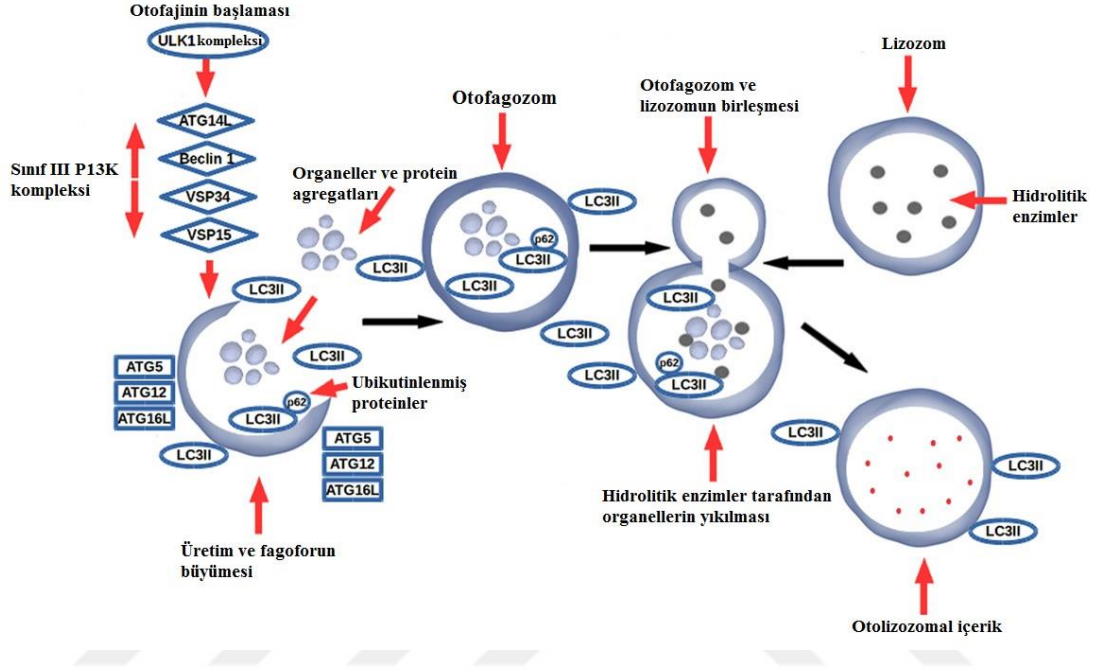
Otofaji mekanizmasında rol alan proteinler Oshumi ve arkadaşlarının 1992 yılında mayalar üzerinde yaptıkları çalışmalarla “otofaji ile ilişkili genler” ya da ATG (Autophagy Related Genes) proteinleri olarak tanımlanmıştır. Model organizma olarak kullanılan *Saccharomyces cerevisiae* mayasında 30'un üzerinde ATG geni tanımlanmıştır. ATG proteinlerinin çoğu otofajik sürecin farklı aşamalarında rol almaktadır. Bu genler diğer organizmalarda da bulunmuştur (72, 73). Otofaji esnasında otofagozom veya otofajik vakuol olarak adlandırılan çift veya daha fazla membran yapıları oluşur. Memelilerde otofagozomun dış membranı lizozom ile, maya ve bitkilerde ise vakuolle kaynaşır (74).

2.5.1 Otofajinin Moleküler Mekanizması

Otofajinin moleküler mekanizması beş temel aşamadan oluşur. Bunlar; indüksiyon, genişleme, tamamlama, yapışma ve degradasyondur. Fagozom oluşumu ile otofaji başlar. Fagozomun oluşumu ile protein agregatları, organeller ve ribozomların alınması sonucu fagofor zarı genişler ve otofagozom olgunlaşır. Otofagozomda parçalanan organeller metabolizma için tekrardan kullanılmak üzere sitozole gönderilir. Otofaji sayesinde hücreler işlevi olmayan organel ve proteinlerini enerji üretimi için kullanıp kendilerini metabolik stresten koruyup hücre canlılıklarını devam ettirirler (75). Besin azalması, hipoksi, patojen enfeksiyonu ya da SOR gibi hücrel stres ile otofaji tetiklenebilir.

Otofajinin başlatılmasında ULK1 protein kinaz kompleksi ve sınıf III fosfatidilinositol 3-kinaz kompleksi I (PI3KC3-C1) olmak üzere iki protein kompleksi rol oynar (76). ULK (UNC-51) otofajinin başlamasından sorumludur. ULK, mayalardaki ATG1'in memelilerde karşılığıdır ULK proteinlerinde ULK1, ULK2 ve ULK3 makrotofajinin düzenlenmesinde görev alırlar (77). Memelilerde ATG13'ün homoloğunun ULK1 ve ULK2 ile etkileşime girdiği ve otofagozom oluşumunda önemli rol oynadığı belirtilmektedir (78). Fagofor oluşumu Beclin1(ATG6), VPS15 ve ATG14'ü içeren VPS34 lipid kinaz kompleksi (sınıf III fosfatidilinositol 3-kinaz) aktivasyonunu içerir (79). Otofajide rol oynayan protein ve protein gruplarını kendisine bağlayan fosfatidilinositol-3-fosfat (PI3P), oluşan bu kompleks PAS bölgesine yönlendirir. Fagofor uzaması ve otofagozom oluşumu; ATG12-ATG5 ve ATG8- fosfatidiletanolamin konjugasyon sistemleri olmak üzere iki ubikuitin benzeri sistem tarafından kontrol edilir. Bu iki ubikuitin benzeri konjugasyon sistemleri otofagozom membranının uzaması ve kesecik haline gelmesini kontrol eder. Birinci sistem, ATG7 ve ATG10 yardımıyla ATG12'nin ATG5'e kovalent konjugasyonunu içerir. Daha sonra ATG12'ye bağlanmış ATG5, daha büyük bir kompleks oluşturmak için ATG16 ile birleşerek ATG12-ATG5-ATG16 3'lü konjugasyon sistemini oluşturmakta ve daha sonra bu kompleks otofagozom yapısına bağlanmaktadır. İkinci sistemde ise, LC3 (ATG8) proteaz ATG4 tarafından bölünür ve LC3-I oluşur. Daha sonra fosfatidilmetanoamin (PE) yağ molekülüne bağlanması ile LC3-I yapısındaki LC3'ün, LC3-II'ye dönüşümü sağlanır. Otofagozom tamamlandıktan sonra, genişlemiş fagofor ile ilişkili ATG proteinleri yeni veziküllerin biyogenezi için tekrar kullanılmak üzere sitoplazmada serbest bırakılır. Otofagozom yapısının lizozom ile füzyonu için LC3-II ve ATG12-ATG5-ATG16 kompleksleri birbirine bağlanır. Memelilerde füzyon olayının gerçekleşmesi için lizozomal membran

proteini-2 (LAMP-2) ve küçük guanozin trifosfataz Rab7'ye gerek vardır. Otofagozomlar lizozomla füzyon yoluyla olgunlaşarak otolizozomu oluştururlar. Lizozomal enzimler tarafından otolizozomlarda gerçekleştirilen yıkım sonucu oluşan küçük moleküller protein sentezi ve açlık koşullarında hücresel fonksiyonların devamlılığı için sitosole geri taşınır (72, 73, 80-83).



Şekil 2.7. Otofajinin moleküler mekanizması

2.5.2. Beclin-1

Maya otofaji geni olan Atg6'nın memeli homoloğu olarak tanımlanan Beclin-1, 60 kDa ağırlığında bir proteindir (84). Birçok insan ve fare dokusunda eksprese edilen Beclin-1, öncelikle endoplazmik retikulum, mitokondri ve perinükleer membranı içeren sitoplazmik yapılar içinde lokalizedir (85). BECN1 geni tarafından kodlanan protein olan Beclin 1, otofaji için gereklidir. Hücre stres periyodlarında artan otofajide önemli rol oynayan bu protein otofagozom oluşumunun ilk aşamalarında, otofajik vezikül enükleasyonunda rol oynayan bir kompleksin yapısında katılır (84, 86). Otofagozomun oluşumu ve lizozomal enzimlerin sınıflandırılması için gerekli olan Beclin-1, erken otofaji belirteci olarak kullanılmaktadır (87, 88).

2.5.3. LC3

İlk olarak memeli ATG8'in homoloğu olarak tanımlanan LC3, otofaji mekanizmasında rol oynayan bir başka önemli proteindir (88). Otofajideki fonksiyonu ilk

olarak Kabeya ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Araştırmacılar translasyonunun tamamlanmasından sonra LC3'ün proteolitik reaksiyonlar sonucunda iki forma dönüştüğünü göstermişlerdir. Biri sitoplazmada LC3-I olarak bulunurken diğeri LC3-II olarak zara bağılı otofagozomlarda fosfatidiletanolamine (PE) konjuge edilir (88). LC3-II otofagozom oluşumuna katılmaktadır. LC3-II'nin artan seviyesi ile otofagozom oluşumu ilişkilidir. Bu nedenle LC3-II geç otofaji belirteci olarak kullanılmaktadır (87).

2.5.4. p62

Sektozom 1 (SQSTM1) veya p62 olarak bilinen p62/SQSTM1, stres tarafından indüklenen bir hücre içi proteindir ve çeşitli hücrel işlemlerde bir adaptör molekül olarak işlev görür (89). p62'nin otofaji, apoptoz, inflamasyon, hücre sağkalımı, hücre ölümü, sinyal transdüksiyonu ve tümörigenez gibi birçok süreçte çeşitli fonksiyonları olduğu bilinmektedir. p62 bir otofaji reseptörüdür ve otofaji için seçici bir substrattır (90). Otofaji, hücrenin zararlı maddeleri sitoplazmadan temizlediği ve otofagozomların bu hedef yükü parçalanma için lizozomal sisteme gönderdiği ana yoldur. p62, otofagozom oluşumu için doğrudan LC3 ile etkileşime girebilir (91, 92). p62 proteini, ubikitinlenmiş proteinlere bağlanır. p62 ayrıca otofagozomlara birleştirilmek üzere LC3'e bağlanır ve sonunda otolizozomlarda ubikitinlenmiş bir protein olarak bozunur. Otofaji belirteçlerinden birisi olan p62'nin azalmış seviyesi aktifleşmiş bir otofaji yolağı ile ilişkilidir (93, 94).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Çalışmanın Şekli

Bu çalışma İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınan izin (Protokol no: 2019/A-48) ile gerçekleştirildi. Çalışma boyunca deney hayvanlarının bakımı ve hayvanlara uygulanacak olan tüm işlemler İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nde (İNÜ-DEHÜM) yapıldı. Hayvanlardan alınan kan ve doku örneklerinde ELISA yöntemiyle bakılacak olan parametreler İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD laboratuvarında, immünohistokimyasal analizler İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji AD laboratuvarında yapıldı.

3.2. Deney Gruplarındaki Hayvan Sayılarının Belirlenmesi

Deneylerde kullanılacak hayvanların sayısı (örneklem büyüklüğü), I. Tip hata miktarı (alfa) 0.05, testin gücü (1-beta) 0.8, ve etki büyüklüğü 0.83 iken bu test kullanılarak anlamlı bir fark bulunabilmesi için gerekli olan minimum örneklem büyüklüğü grup sayısı 5 olduğunda her bir grupta 8 olmak üzere toplam 40 hayvan olması gerektiği güç analizi ile hesaplandı (95).

3.3. Deney Hayvanları ve Deney Gruplarının Belirlenmesi

Bu çalışmada Sprague-Dawley cinsi, ortalama 220-280 gr ağırlığında 40 adet erkek sıçan kullanıldı. Hayvanların tümü tartıldı ve gruplar arasında ağırlıklar açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmayacak şekilde 5 gruba (n=8) ayrıldı. İstatistiksel değerlendirme Kruskal Wallis H testi ile yapıldı (Tablo 3.1). Deneyler süresince $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve 12 saat ışık/karanlık periyoduna sahip ortamda tutulan hayvanlar, normal musluk suyu ve standart sıçan yemi ile ad libitum olarak beslendi.

Tablo 3.1. Deney gruplarının oluşturulması

Gruplar	Ortalama ağırlık	En küçük ağırlık (g)	En büyük ağırlık (g)	P değeri
Sham	269.550	266.300	276.400	
İ/R	267.900	263.500	276.300	
Atx 5 mg/kg+İ/R	271.050	265.700	276.300	0.96
Atx 10 mg/kg+İ/R	269.050	263.100	278.300	
Atx 25 mg/kg+İ/R	269.750	263.900	276.600	

Deney grupları ve gruplardaki hayvanlara uygulanan işlemler aşağıda belirtildi.

Sham Grubu: Bu gruptaki hayvanlara 7 gün boyunca gavaj ile astaksantin (Atx) çözücüsü (zeytinyağı) verildi. 7. günün sonunda hayvanların karın yan duvarlarından kesi açıldı. Sağ ve sol böbrek ile böbreklere giden a. renalis'ler izole edildikten sonra kesi yeri kapatıldı.

İ/R Grubu: Bu gruptaki hayvanlara 7 gün boyunca gavaj ile astaksantin çözücüsü (zeytinyağı) verildi. 7.günün sonunda bu gruptaki sıçanların bilateral böbrek dokularındaki a. renalis'leri klemplenerek 45 dk iskemi yapıldı ve sonrasında ise 24 saat reperfüzyon sağlandı. Reperfüzyon sonrası sıçanlar sakrifiye edilerek kan örnekleri ve doku örnekleri alındı.

Atx 5 mg/kg + İ/R Grubu: Bu gruptaki sıçanlara 7 gün boyunca gavaj ile zeytinyağında çözülmüş astaksantin (Galenik, Cas no:742-61-7) (5 mg/kg) verildi. 7.günün sonunda bu gruptaki sıçanların bilateral böbrek dokularındaki a. renalis'leri klemplenerek 45 dk iskemi yapıldı ve sonrasında ise 24 saat reperfüzyon sağlandı. Reperfüzyon sonrası sıçanlar sakrifiye edilerek kan örnekleri ve doku örnekleri alındı.

Atx 10 mg/kg + İ/R Grubu: Bu gruptaki sıçanlara 7 gün boyunca gavaj ile zeytinyağında çözülmüş astaksantin (10 mg/kg) verildi. 7.günün sonunda bu gruptaki sıçanların bilateral böbrek dokularındaki a. renalis'leri klemplenerek 45 dk iskemi yapıldı ve sonrasında ise 24 saat reperfüzyon sağlandı. Reperfüzyon sonrası sıçanlar sakrifiye edilerek kan örnekleri ve doku örnekleri alındı.

Atx 25 mg/kg + İ/R Grubu: Bu gruptaki sıçanlara 7 gün boyunca gavaj ile zeytinyağında çözülmüş astaksantin (25 mg/kg) verildi. 7.günün sonunda bu gruptaki sıçanların bilateral böbrek dokularındaki a. renalis'leri klemplenerek 45 dk iskemi yapıldı ve sonrasında ise

24 saat reperfüzyon sağlandı. Reperfüzyon sonrası sıçanlar sakrifiye edilerek kan örnekleri ve doku örnekleri alındı.

Gavaj uygulamalarından ötürü sıçanlarda hiçbir komplikasyon gelişmedi.



Şekil 3.1. Sıçan gavaj uygulaması

3.4. Bilateral Böbrek İ/R Modelinin Uygulanması ve Örneklerin Toplanması

7 gün boyunca sham ve İ/R grubundaki hayvanlara günlük miktarı 1 ml olacak şekilde astaksantin çözücüsü (zeytinyağı), deney gruplarındaki hayvanlara ise günlük miktarı 1 ml olacak şekilde 5 mg/kg, 10 mg/kg, 25 mg/kg astaksantin (Galenik, Cas no:742-61-7) verildi. 7. günün sonunda son doz verildikten sonra cerrahi uygulamalar yapıldı. Tüm sıçanlara intramüsküler olarak uygulanan 70 mg/kg ketamin (Richter Pharma AG, Avustralya) ve 8 mg/kg ksilazin (Bioveta PLC, Çek Cumhuriyeti) ile anestezi sağlandı. Anestezi, denekler ağrıya yanıtızsız olacak ve deney sırasında spontan solunumlarına devam edecek şekilde ayarlandı. Sıçanların karın yan duvarı bölgesi traşlandı (Şekil 3.1-A) ve bu bölge antiseptik özellikteki %10'luk povidon-iyot solüsyonu ile muamele edildi (Şekil 3.1-B). Sıçanların karın yan duvarından bistüri ile bir kesi açılarak her iki böbrek ve bu böbreklere giden a. renalis'ler ortaya çıkarıldı (Şekil 3.1-C,D). A. renalis'lere birer klemp takıldı (Şekil 3.1-E) ve 45 dk boyunca böbreklere giden kan akımı durdurularak iskemi sağlandı (96). İskemi sırasında böbrek dokularında

meydana gelen renk değişimi gözlemlendi. Sıçanlara iskemi sırasında meydana gelen sıvı kaybı nedeniyle intraperitoneal olarak 0.5 ml serum fizyolojik verildi. 45 dk'lık iskeminin ardından a. renalis'lerdeki klempler çıkarıldı ve böbreklere tekrar kan akımı sağlandı. Böbrek renginin açılması ve pulsasyonun görülmesi ile arteriovenöz akımın tekrar başladığı anlaşıldı. Ardından önce periton dokusu daha sonra da deri prolene dikiş (3/0 polypropylene, Prolene®; Ethicon, USA) ile dikildi ve insizyon bölgesine povidon-iyot solüsyonu sürülerek hayvanlar kafeslere alındı. 24 saat boyunca reperfüzyon sağlandıktan sonra sıçanlardan anestezi altında sakrifiye edildi. Sonrasında sıçanlardan alınan kan örnekleri 3000 g'de 10 dk santrifüj edilerek serum kısmı ayrıldı ve biyokimyasal analizlerde (BUN ve kreatin değerlerinin ölçülmesi) kullanılmak üzere analiz gününden bir gün öncesine kadar -80 °C'de derin dondurucuda saklandı. Sıçanlardan alınan sağ böbrek dokuları biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere kuru buz üzerinde dondurulduktan sonra analiz gününe kadar -80 °C'de saklanırken, sol böbrek dokuları ise histolojik analizlerde kullanılmak üzere %10'luk formaldehit solüsyonu içine alındı.



Şekil 3.2. Böbrek iskemi modelinin uygulanması (A: Sıçanların karın yan bölgesinin traş edilmesi, B: Traş edilen bölgeye povidon iyot sürülmesi, C: Kesinin açılması, D: Böreğin ve a.renalis'in izole edilmesi, E: A. renalis'e klemp takılması)

3.5. Biyokimyasal Analizler

Biyokimyasal analizler için -80 °C'de saklanan doku örnekleri analizden bir gün önce çıkarıldı ve +4 °C'ye alınarak bir gece boyunca buzlarının çözülmesi beklendi. Analiz gününde dokular tartıldı ve cam tüplere alındı. Her bir doku için yaş doku ağırlığının 10 katı kadar soğuk Tris-HCl tamponu (pH=7.4) tüplere eklendi. Örnekler 16000 devir/dakika'da 3 dk süresince homojenize edildi. Homojenat vortekslendi ve ependorf tüplere alındı. Elde edilen homojenatlardan protein tayini ve MDA ölçümleri yapılırken bir bölümü de 1 saat boyunca +4 °C soğutmalı santrifüj kullanılarak 2200 g'de

santrifüj edildi. Santrifüj sonunda ayrılan süpernatantlardan SOD, TAS ve TOS ölçümleri yapıldı.

3.5.1. Protein Tayini

Örneklerdeki protein miktarının tayini Lowry metoduna göre yapıldı (97). Bu metodun prensibi, alkali bir çözeltide bakır protein kompleksi oluşturarak fosfomolibdat-fosfotungstat reaktifini (Folin-Ciocalteu-Fenol reaktifi) redükte etmesi sonucu mavi renk oluşturmasına dayanmaktadır. Oluşan rengin koyuluğu protein konsantrasyonu ile doğru orantılı olup değerler mg/ml olarak verildi.

3.5.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

SOD enzim aktivitesinin tayini Sun ve arkadaşları tarafından tanımlanan metoda göre yapıldı (98). Bu yöntemde göre, ksantin/ksantin oksidaz ile oluşturulan süperoksit radikalleri nitroblutetrazolium'u (NBT) indirgeyerek renk değişimi meydana getirmektedir. Reaksiyon sonucu oluşan bu renk değişimi 560 nm'de spektrofotometrede okutuldu ve elde edilen sonuçlar U/mg protein olarak verildi.

3.5.3. Malondialdehit (MDA) Ölçümü

MDA ölçümü en çok kullanılan lipit peroksidasyon tayin yöntemi olan Esterbauer ve Cheeseman'nin yöntemine göre yapıldı (99). Tiyobarbitürik asit ile MDA'nın 90-95 °C'de reaksiyona girmesi sonucu oluşan pembe renkli kromojen meydana gelmektedir. Örnekler 15 dk kaynatıldıktan sonra hızlı bir şekilde soğutuldu ve absorbans değerleri 532 nm'de spektrofotometrede okundu. Sonuçlar µmol/g doku olarak verildi.

3.5.4. Böbrek Dokularında TAS ve TOS Ölçümü

Deney gruplarının böbrek dokularında toplam antioksan kapasite (TAS) ve toplam oksidan kapasite (TOS) ölçümü ticari olarak satın alınan elisa kitlerinin (SunRed Biotechnology, China) protokolüne uygun olarak ve Biotek HT Snynergy Gen 5 yazılımlı immuno plate reader kullanılarak yapıldı.

3.5.5. BUN ve Kreatin Değerlerinin Ölçülmesi

Deney gruplarının kan örneklerinden elde edilen serumlarda BUN ve kreatin değerleri ticari olarak satın alınan elisa kitlerinin (SunRed Biotechnology, China)

protokolüne uygun olarak ve Biotek HT Snynergy Gen 5 yazılımlı immuno plate reader kullanılarak ölçüldü.

3.6. Histolojik Analizler

Histokimyasal Analizler: Deney sonunda çıkarılan böbrekler, %10'luk formaldehit içerisinde alınarak tespit edildi. Doku takibi işlemlerinden sonra hazırlanan parafin bloklardan 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler genel morfolojik yapının belirlenmesi için hematoksilin-eozin (H-E) boyama metodu ile boyandı.

Böbrek kesitleri; kortikal ve medullar alanda tübüler dejenerasyon (tübüler nekroz ve dilatasyon) yönünden değerlendirildi. Rastgele seçilen 10 alan incelendi ve alanlar histolojik değişikliklerin derecesine göre; 0: değişiklik yok, 1: hafif, 2: orta, 3: şiddetli değişiklik olarak skorlandı.

Analizler, Leica DFC-280 araştırma mikroskopu ile Leica Q Win Image Analiz Sistemi (Leica Micros Imaging Solutions Ltd.,Cambridge, UK) kullanılarak yapıldı.

İmmünohistokimyasal Analizler: İmmünohistokimyasal analizler için deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerinden geçirilen kesitler düdüklü tencereye alınarak 0.01 M sitrat (pH 6.0) içinde 15-20 dk kaynatıldı. Endojen peroksidaz enzim aktivitesini bloke etmek için kesitlere 12 dk boyunca %3'lük hidrojen peroksit uygulandı. PBS ile yıkanan kesitlere 5 dk süresince protein blok (ultra V blok) uygulaması yapıldı. Daha sonra kesitler 37°C'de 60 dk primer antikor (GNRH ve Kisperitin)) ile inkübe edildi. PBS ile yıkanan dokulara 37°C'de 10 dk boyunca biotinli sekonder antikor uygulandı. Bu işlem sonrasında kesitler 37°C'de 10 dk streptavidin peroksidaz ile inkübe edildi. Ardından kromojen uygulaması yapılan kesitler hematoksilin ile boyanarak su bazlı kapatıcı ile kapatıldı.

Böbrek kesitlerine uygulanan Beclin-1, LC3β ve p62 uygulamaları ile tübül epitel hücrelerinde immünreaktiviteye bağlı olarak kahverengi boyanma gözlemlendi. Boyanma, immünreaktivitenin yaygınlığı (0: 0-%25, 1:%26-50, 2:%51-75, 3:%76-100) ve şiddeti (0:yok, +1:hafif, +2: orta, +3: şiddetli) esas alınarak semikantitatif olarak skorlandı. Toplam boyanma skoru; yaygınlık x şiddet hesaplanarak elde edildi (100).

Analizlerde, Leica DFC-280 araştırma mikroskopu ile Leica Q Win Image Analiz Sistemi (Leica Micros Imaging Solutions Ltd.,Cambridge, UK) kullanıldı.

3.7. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler IBM SPSS Statistics 25.0 programı kullanılarak yapıldı. İstatistik analizlerde Kruskal Wallis testi kullanıldı. Çoklu karşılaştırmalarda Kruskal Wallis testi için Conover testi kullanıldı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Veriler medyan (min-maks) ile verildi.

Histolojik değerlendirmeler için istatistiksel analizler, İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı tarafından geliştirilen istatistiksel yazılım programı ile yapıldı. Çalışmada yer alan tüm gruplardaki ölçülebilir değişkenlerin normallik testlerine göre normal dağılım göstermediği saptandı. Buna bağlı olarak, istatistiksel değerlendirmede parametrik olmayan testlerden Kruskal Wallis varyans analizi, tüm değişkenler yönünden grupların genel karşılaştırılmasında kullanıldı. İkili gruplar arası karşılaştırmalar, Mann-Whitney-U testi ile Bonferroni düzeltmesi yapılarak elde edildi. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Veriler dağılıma bağlı olarak medyan (minimum-maksimum) (Med (Min-Mak)) olarak ifade edildi.

4. BULGULAR

4.1. Astaksantin'in BUN ve Kreatin Düzeyi Üzerine Etkisi

Grupların serum örneklerinde BUN düzeyi karşılaştırıldığında İ/R grubunda BUN miktarının sham grubuna göre anlamlı derece yüksek olduğu belirlendi ($p<0.05$). Astaksantin verilen gruplarda da BUN miktarının İ/R grubuna göre azalmış olduğu ($p<0.05$) fakat bu farkın verilen doz miktarına bağlı olmadığı görüldü. Ayrıca astaksantin verilen gruplardaki BUN miktarının sham grubundaki sıçanların BUN düzeyleri ile bir farklılık göstermedikleri görüldü (Şekil 4.1) (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Sıçanların böbrek dokularında oksidatif stres parametre bulguları ve kan örneklerinde BUN ve Kreatin değerleri

Parametreler	Gruplar				
	Sham	İ/R	Atx 5 mg/kg+İ/R	Atx 10 mg/kg+İ/R	Atx 25 mg/kg+İ/R
SOD (U/mg)	14.49 (9.57- 20.65)	7.75 (5.12- 9.92) ^a	13.99 (12.14- 16.73) ^c	11.87 (7.67- 24.69) ^c	13.75 (9.41- 18.61) ^c
MDA (μ mol/g doku)	1.70 (1.47- 3.130)	5.66 (3.10- 12.14) ^b	2.45 (1.40- 4.21) ^d	2.35 (1.33- 3.32) ^d	2.01 (1.14- 2.81) ^d
TAS (μ mol Trolox Equivalent /L)	11.12 (8.72- 13.35)	8.40 (5.73- 11.23) ^a	12.60 (8.15- 15.81) ^c	13.37 (8.50- 17.97) ^c	12.45 (9.81- 15.06) ^c
TOS (μ mol H ₂ O ₂ equivalent/L)	2.21 (1.96- 3.27)	4.54 (3.08- 5.57) ^b	2.75 (2.03- 3.62) ^d	3.00 (1.76- 3.83) ^d	2.91 (2.02- 3.98) ^d
BUN (mg/dL)	5.04 (4.10- 5.45)	5.59 (5.05- 6.99) ^b	4.61 (3.75- 5.88) ^d	4.59 (3.84- 5.21) ^d	4.77 (4.31- 5.74) ^d
Kreatin (mg/dL)	69.51 (54.16- 81.18)	78.28 (71.93- 91.77) ^b	67.69 (36.86- 93.15) ^d	72.20 (28.15- 97.96) ^d	54.04 (41.13- 73.88) ^d

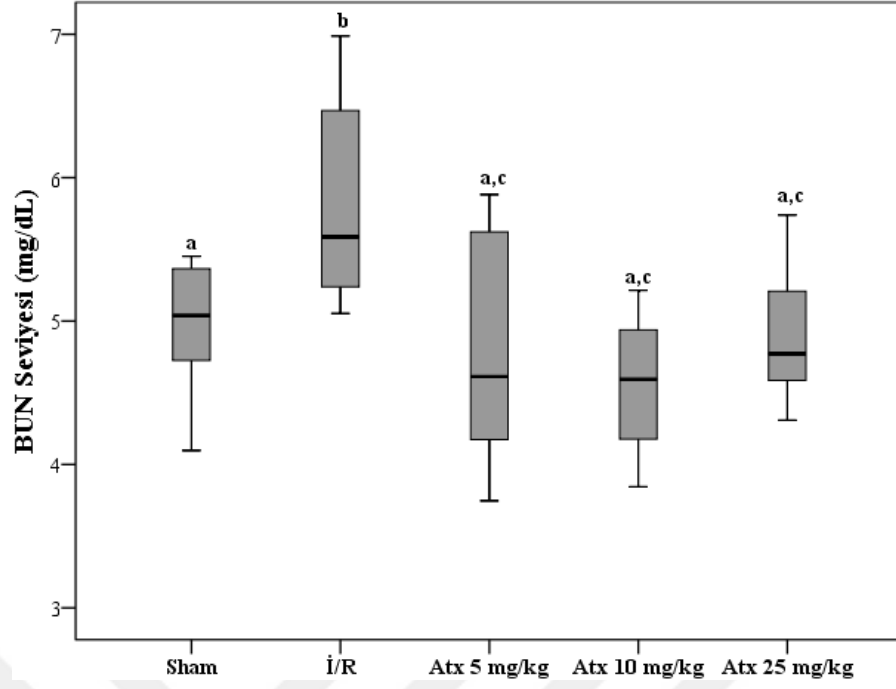
Verilerin değerlendirilmesinde Kruskal Wallis Testi, çoklu karşılaştırmalarda ise Kruskal Wallis testi için Conover testi kullanıldı. Değerler medyan (min.-maks) olarak verildi

^a Sham grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı azalış ($p<0.05$)

^b Sham grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı artış ($p<0.05$)

^c İ/R grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı artış ($p<0.05$)

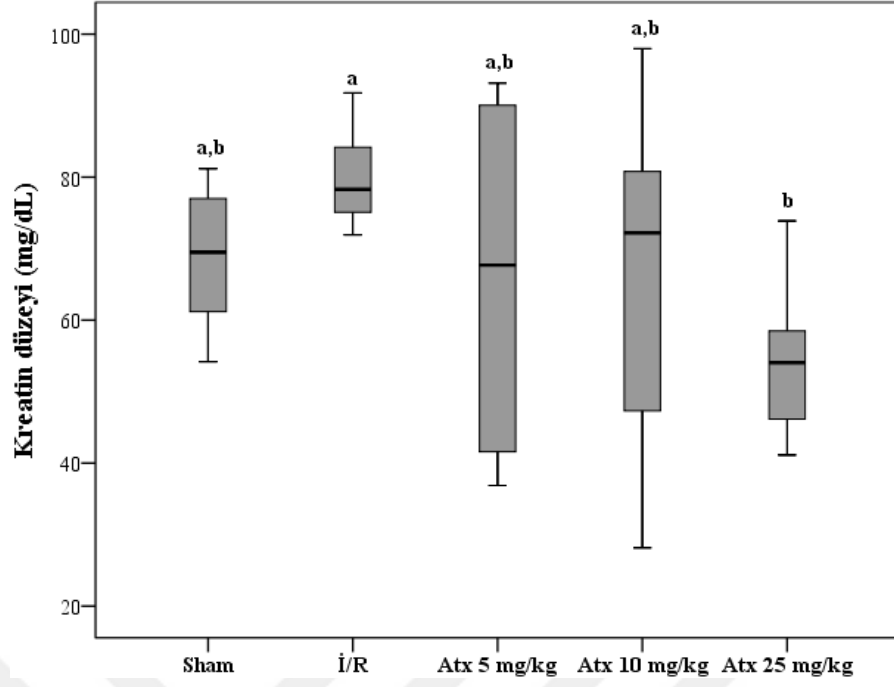
^d İ/R grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı azalış ($p<0.05$)



Şekil 4.1. Grupların serum örneklerinden ölçülen BUN seviyesi

(Verilerin değerlendirilmesinde Kruskal Wallis Testi, çoklu karşılaştırmalarda ise Kruskal Wallis testi için Conover testi kullanıldı. Değerler medyan (min.-maks) olarak verildi.)

Grupların serum örneklerinde kreatin düzeyi karşılaştırıldığında 25 mg/kg astaksantin verilen grupta kreatin miktarının I/R grubuna göre anlamlı derecede azalmış olduğu görüldü ($p < 0.05$) (Şekil 4.2) (Tablo 4.1).

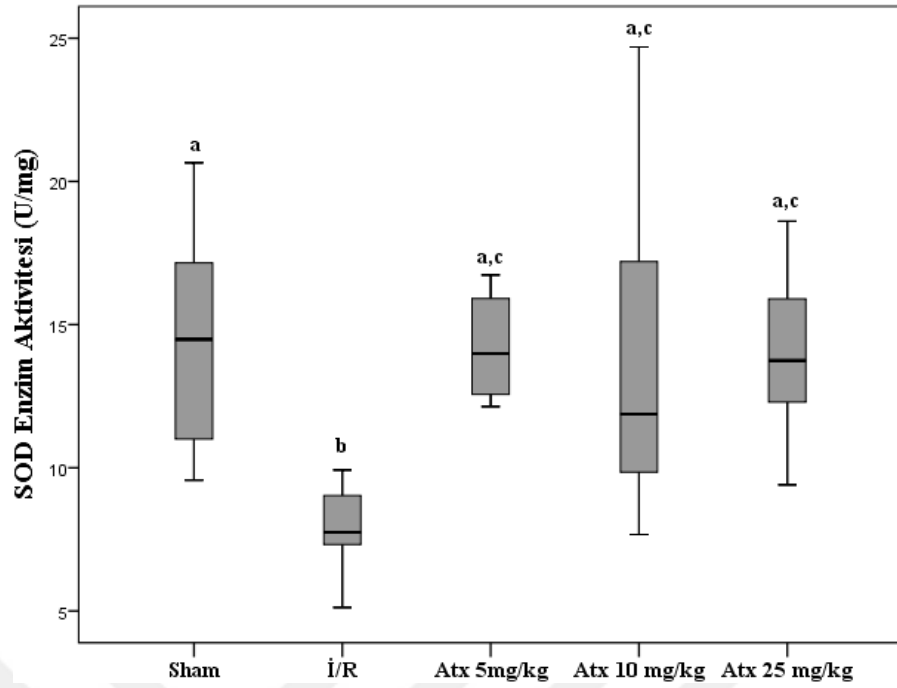


Şekil 4.2. Grupların serum örneklerinden ölçülen kreatin seviyesi

(Verilerin değerlendirilmesinde Kruskal Wallis Testi, çoklu karşılaştırmalarda ise Kruskal Wallis testi için Conover testi kullanıldı. Değerler medyan (min.-maks) olarak verildi.)

4.2. Astaksantin'in böbrek dokusunda SOD Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Grupların böbrek dokularında SOD enzim aktivitesi karşılaştırıldığında, İ/R yapılan grupta enzim aktivitesinin sham grubuna göre belirgin düzeyde azaldığı belirlendi ($p < 0.05$). Bunun yanında farklı dozlarda astaksantin verilen gruplarda ise İ/R grubuna göre SOD enzim aktivitesinin doz miktarından bağımsız olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu görüldü ($p < 0.05$) (Şekil 4.3) (Tablo 4.1).

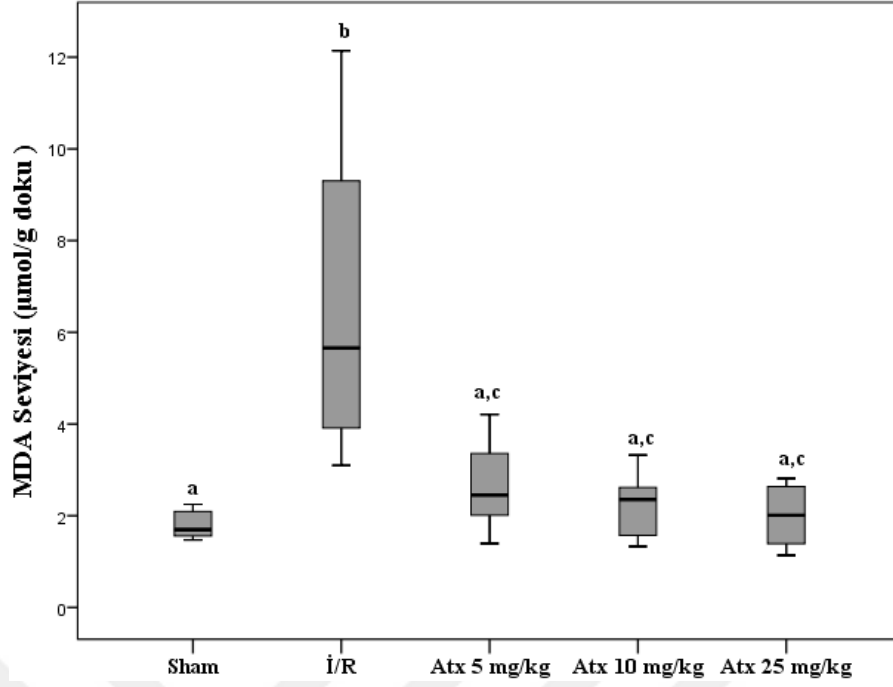


Şekil 4.3. Grupların böbrek dokularında SOD enzim aktivitesi

(Verilerin değerlendirilmesinde Kruskal Wallis Testi, çoklu karşılaştırmalarda ise Kruskal Wallis testi için Conover testi kullanıldı. Değerler medyan (min.-maks) olarak verildi.)

4.3.Astaksantin'in böbrek dokusunda MDA Seviyesi Üzerine Etkisi

Gruplar arasında MDA seviyesi karşılaştırıldığında I/R grubunda MDA düzeyinin sham grubuna göre belirgin derece yüksek olduğu saptandı ($p < 0.05$). Astaksantin verilen gruplarda da MDA düzeyinin I/R grubuna göre anlamlı düzeyde düşük olduğu ($p < 0.05$) ve bu farkın verilen doz miktarına bağlı olmadığı görüldü. Ayrıca astaksantin verilen gruplardaki MDA düzeyinin sham grubundaki sıçanların MDA düzeyleri ile bir farklılık göstermedikleri görüldü (Şekil 4.4) (Tablo 4.1).

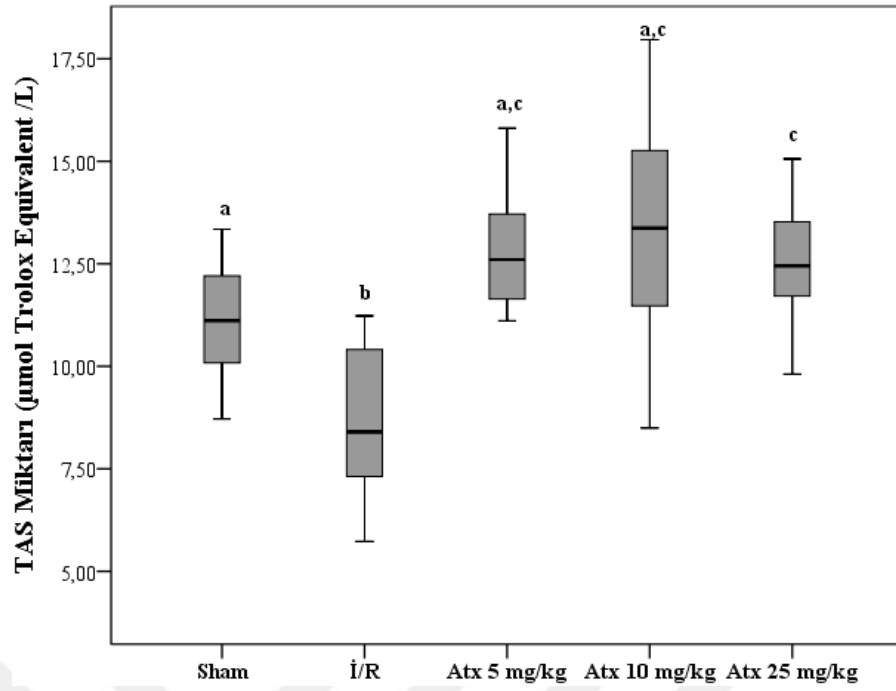


Şekil 4.4. Grupların böbrek dokularında MDA seviyesinin ölçülmesi

(Verilerin değerlendirilmesinde Kruskal Wallis Testi, çoklu karşılaştırmalarda ise Kruskal Wallis testi için Conover testi kullanıldı. Değerler medyan (min.-maks) olarak verildi.)

4.4. Astaksantin'in TAS ve TOS Miktarı Üzerine Etkisi

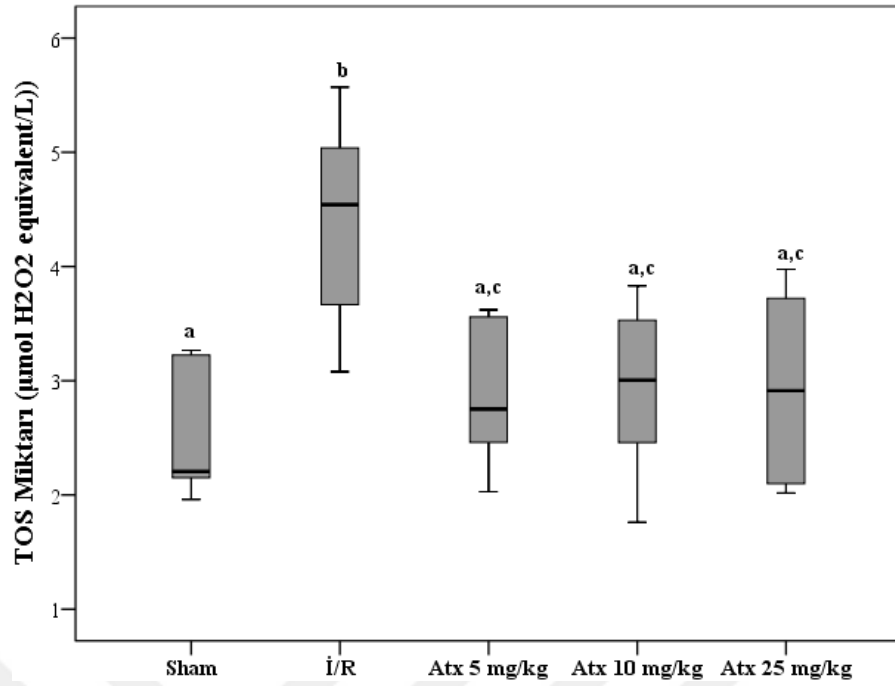
Gruplar arasında böbrek dokusundaki TAS miktarı karşılaştırıldığında İ/R grubunda TAS miktarının sham grubunda göre belirgin derecede azalmış olduğu saptandı ($p < 0.05$). Astaksantin verilen gruplarda da TAS miktarının İ/R grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu ($p < 0.05$) ve bu farkın verilen doz miktarına bağlı olmadığı görüldü. Ayrıca 5 mg/kg ve 10 mg/kg astaksantin verilen gruplardaki TAS miktarının sham grubundaki sıçanların TAS düzeyleri ile bir farklılık göstermedikleri görülürken 25 mg/kg astaksantin verilen grupta TAS miktarının sham grubuna göre yükselmiş olduğu görüldü (Şekil 4.5) (Tablo 4.1).



Şekil 4.5. Grupların böbrek dokularındaki TAS miktarı

(Verilerin değerlendirilmesinde Kruskal Wallis Testi, çoklu karşılaştırmalarda ise Kruskal Wallis testi için Conover testi kullanıldı. Değerler medyan (min.-maks) olarak verildi.)

Gruplar arasında böbrek dokusundaki TOS miktarı karşılaştırıldığında İ/R grubunda TOS miktarının sham grubuna göre anlamlı derece yüksek olduğu belirlendi ($p < 0.05$). Astaksantin verilen gruplarda da TOS miktarının İ/R grubuna göre azalmış olduğu ($p < 0.05$) ve bu farkın verilen doz miktarına bağlı olmadığı görüldü. Ayrıca astaksantin verilen gruplardaki TOS miktarının sham grubundaki sıçanların TOS düzeyleri ile bir farklılık göstermedikleri görüldü (Şekil 4.6) (Tablo 4.1).



Şekil 4.6. Grupların böbrek dokularındaki TOS miktarı

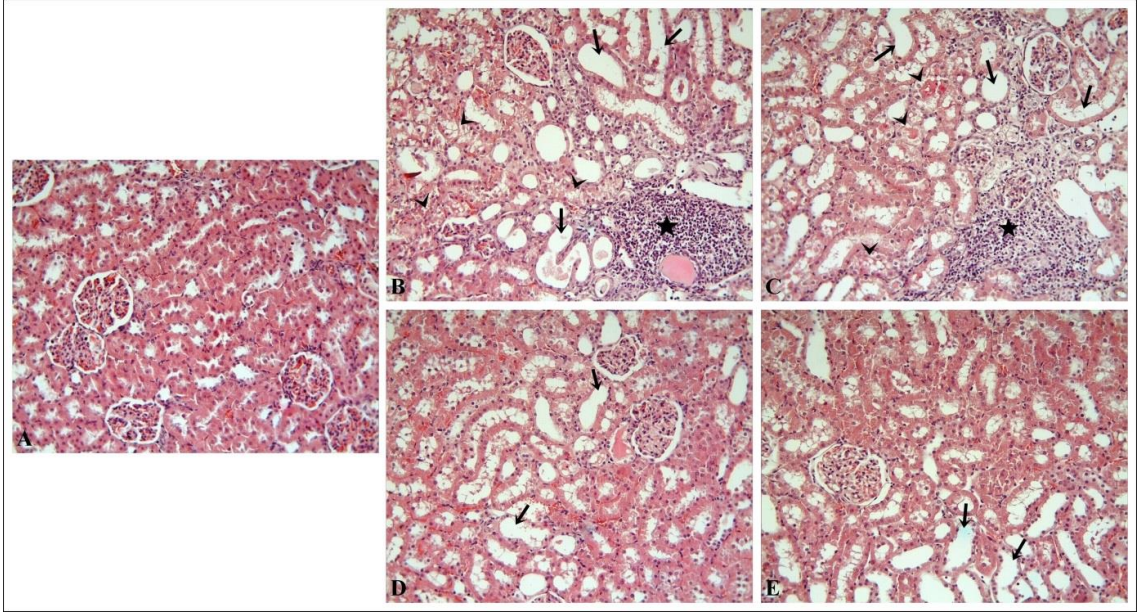
(Verilerin değerlendirilmesinde Kruskal Wallis Testi, çoklu karşılaştırmalarda ise Kruskal Wallis testi için Conover testi kullanıldı. Değerler medyan (min.-maks) olarak verildi.)

4.5. Histolojik Bulgular

4.5.1. Histopatolojik Bulgular

Kontrol grubunda böbrek dokusu, yer yer izlenen hafif düzeydeki tübüler dilatasyon dışında, normal histolojik görünümdeydi (Şekil 4.7A). Diğer yandan, İ/R grubunda hem kortikal hem de medullar alandaki tübüllerde nekrotik değişiklikler ve dilatasyon gözlemlendi. Bu gruptaki bir diğer belirgin bulgu, interstisyel dokuda lokal ve difüz olarak izlenen inflamatuvar hücre infiltrasyonuydu (Şekil 4.7B). Bu değişiklikler yönünden, İ/R ve kontrol grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p < 0.0001$).

Atx 5mg/kg+İ/R grubunda izlenen histopatolojik değişikliklerin İ/R grubuna benzer şekilde devam ettiği gözlemlendi (Şekil 4.7C). Diğer yandan, Atx 10mg/kg+İ/R ve Atx 25mg/kg+İ/R gruplarında, İ/R grubunda izlenen histopatolojik değişikliklerin belirgin şekilde azaldığı tespit edildi ($p < 0.0001$) (Şekil 4.7D). Atx 10mg/kg+İ/R ve Atx 25mg/kg+İ/R grupları ise tüm parametreler yönünden benzer bulundu. Grupların histopatolojik değerlendirme sonuçları Tablo 4.2’de verildi.



Şekil 4.7. Histopatolojik bulgular

(Sham grubunda (A), böbrek kortikal dokusunun normal histolojik görünümde olduğu izlenmekte. İ/R grubunda (B), nekrotik (ok başları) ve dilate olmuş (oklar) tübüller ile intertisyel alanda inflamatuvar hücre infiltrasyonu (yıldız) dikkati çekmekte. Atx 5mg/kg+İ/R grubunda (C), İ/R grubuna benzer şekilde nekrotik tübüller (ok başları), dilate tübüller (oklar) ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (yıldız) izlenmekte. Atx 10mg/kg+İ/R (D) ve Atx 25mg/kg+İ/R (E) gruplarında, tübül dilatasyon (oklar) dışında histopatolojik değişikliklerde belirgin bir hafifleme dikkati çekmekte.)

Tablo 4.2. Histopatolojik değerlendirme sonuçları

Gruplar	Tübüler dejenerasyon	İnfiltrasyon
Sham	0.0 (0.0-1.0)	0.0 (0.0-0.0)
İ/R	2.0 (0.0-3.0) ^a	0.0 (0.0-3.0) ^a
Atx 5mg/kg+İ/R	1.0 (0.0-3.0)	0.0 (0.0-3.0) ^a
Atx 10mg/kg+İ/R	1.0 (0.0-3.0) ^b	0.0 (0.0-2.0) ^b
Atx 25mg/kg+İ/R	1.0 (0.0-3.0) ^b	0.0 (0.0-2.0) ^{b, c}

^a Sham grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı artış ($p<0.0001$).

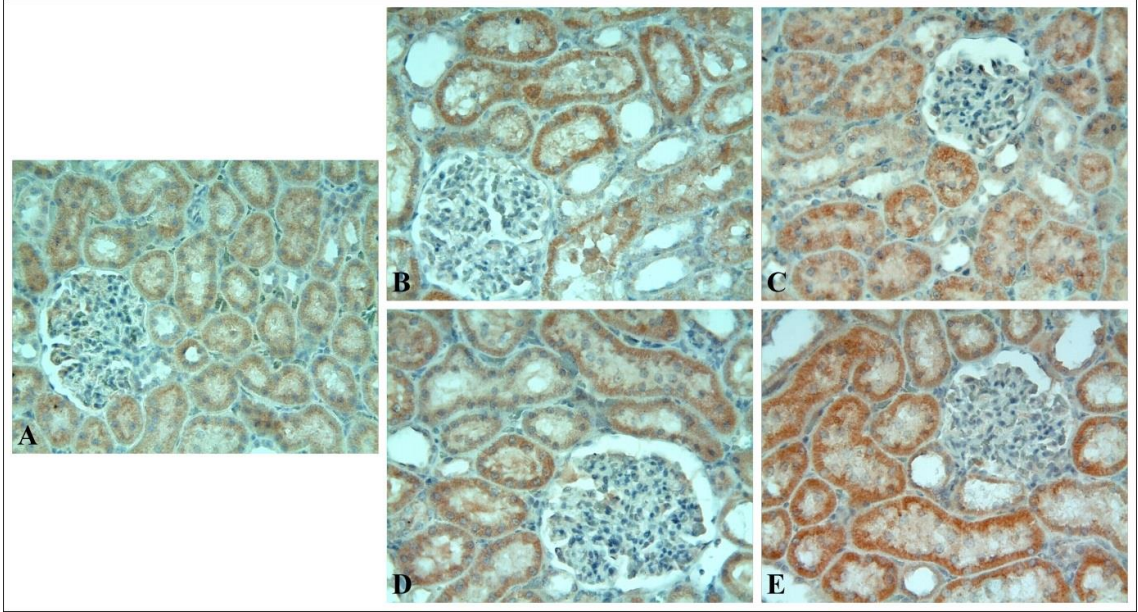
^b İ/R grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı azalış ($p<0.0001$).

^c Atx 5mg/kg+İ/R grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı azalış ($p=0.0180$).

4.5.2. Beclin-1 İmmünreaktivitesi

Beclin-1 immünreaktivitesi tübül epitel hücrelerinin sitoplazmasında belirgin olarak gözlendi (Şekil 4.8). Gruplar arasında en yüksek immünreaktivite Atx 25 mg/kg+İ/R grubunda izlendi. İstatistiksel olarak sham, İ/R, Atx 5mg/kg+İ/R ve Atx

10mg/kg+İ/R gruplarında Beclin-1 immünreaktivitesinin benzer düzeyde olduğu; Atx 25mg/kg+İ/R grubunda, diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış Beclin-1 immünreaktivitesi tespit edildi ($p<0.05$) (Tablo 4.3).

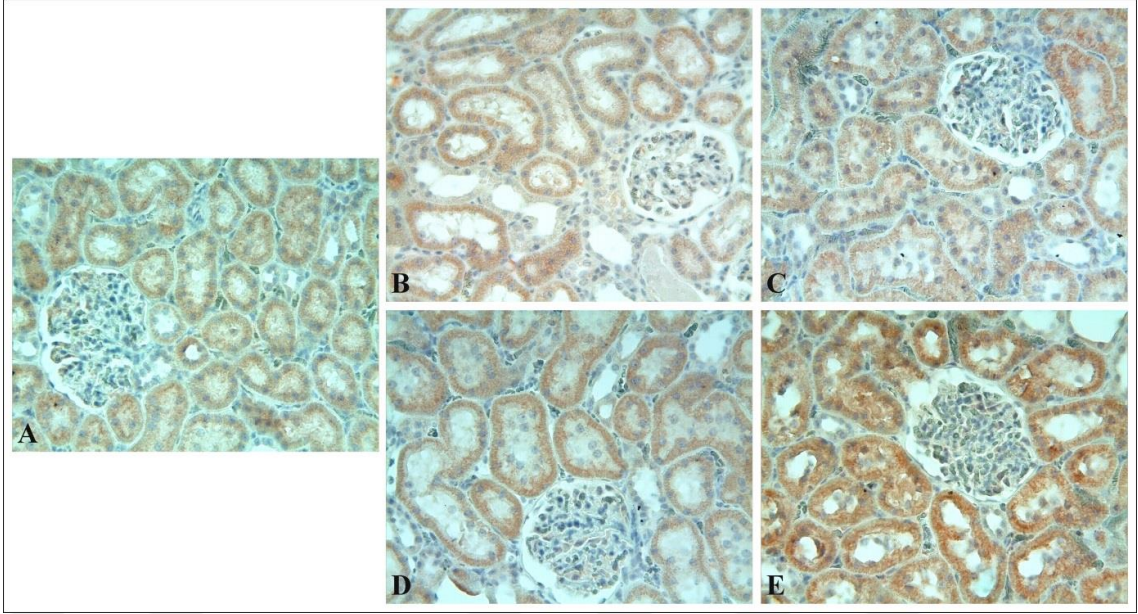


Şekil 4.8. Beclin-1 İmmünreaktivitesi

(A; sham grubu, B; İ/R grubu, C; Atx 5mg/kg+İ/R grubu, D; Atx 10mg/kg+İ/R grubu, E; Atx 25mg/kg+İ/R grubu. Tübül epitel hücrelerinde kavrengimsi olarak izlenen Beclin-1 immünreaktivitesi. Atx 25mg/kg+İ/R grubunda immünreaktivite şiddetinin diğer gruplara göre daha yüksek olduğu izlenmekte. Beclin-1immünreaktivitesi, x40.)

4.5.3. LC3 immünreaktivitesi

LC3 immünreaktivitesi tübül epitel hücrelerinin sitoplazmasında gözlendi (Şekil 4.9). Beclin-1 immünreaktivitesine benzer şekilde, gruplar arasında en yüksek LC3 immünreaktivitesi Atx 25mg/kg+İ/R grubunda izlendi. İstatistiksel olarak sham, İ/R, Atx 5mg/kg+İ/R ve Atx 10mg/kg+İ/R gruplarında Beclin-1 immünreaktivitesinin benzer düzeyde olduğu izlendi. Atx 25mg/kg+İ/R grubunda, İ/R, Atx 5mg/kg+İ/R ve Atx 10mg/kg+İ/R gruplarından istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış LC3 immünreaktivitesi tespit edildi ($p<0.05$) (Tablo 4.3).

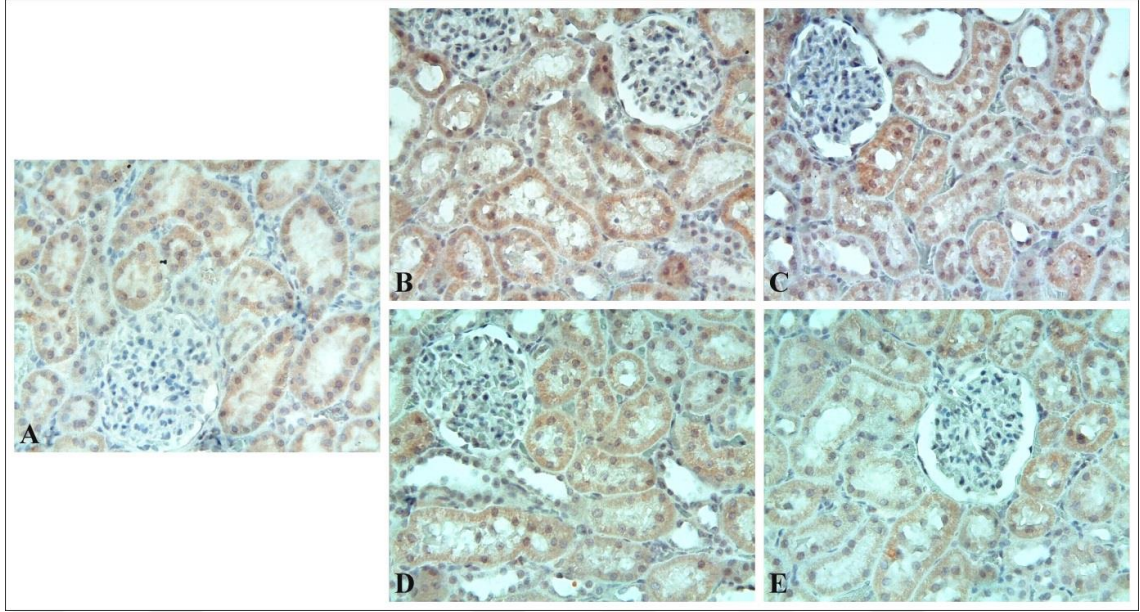


Şekil 4.9. LC3 İmmünreaktivitesi

(A; sham grubu, B; İ/R grubu, C; Atx 5mg/kg+İ/R grubu, D; Atx 10mg/kg+İ/R grubu, E; Atx 25mg/kg+İ/R grubu. Tübül epitel hücrelerinde kavrengimsi olarak izlenen LC3 immünreaktivitesi. Atx 25mg/kg+İ/R grubunda immünreaktivite şiddetinin diğer gruplara göre daha yüksek olduğu izlenmekte. LC3 immünreaktivitesi, x40.)

4.5.4. p62 İmmünreaktivitesi

p62 immünreaktivitesi tübül epitel hücrelerinin sitoplazma ve nükleuslarında gözlemlendi (Şekil 4.10). Gruplar arasında en düşük immünreaktivite Atx 25 mg/kg+İ/R grubunda izlendi. Bununla beraber, istatistiksel olarak p62 immünreaktivitesinin tüm gruplarda benzer düzeyde olduğu tespit edildi (Tablo 4.3).



Şekil 4.10. p62 İmmünreaktivitesi

(A; sham grubu, B; İ/R grubu, C; Atx 5mg/kg+İ/R grubu, D; Atx 10mg/kg+İ/R grubu, E; Atx 25mg/kg+İ/R grubu. Tübül epitel hücrelerinde kahverengimsi olarak izlenen p62 immünreaktivitesi. Atx 25mg/kg+İ/R grubunda immünreaktivite şiddetinin diğer gruplara göre daha hafif olduğu izlenmekte. p62 immünreaktivitesi, x40.)

Tablo 4.3. İmmünohistokimyasal değerlendirme sonuçları

Gruplar	Beclin-1	LC3	p62
Sham	8.0 (4.0-12.0)	8.0 (4.0-12.0)	4.0 (0.0-12.0)
İ/R	8.0 (4.0-12.0)	8.0 (4.0-12.0)	4.0 (0.0-12.0)
Atx 5mg/kg+İ/R	8.0 (4.0-12.0)	8.0 (4.0-12.0)	4.0 (0.0-12.0)
Atx 10mg/kg+İ/R	8.0 (4.0-12.0)	8.0 (4.0-12.0)	4.0 (0.0-12.0)
Atx 25mg/kg+İ/R	12.0 (4.0-12.0) ^a	8.5 (4.0-12.0) ^b	4.0 (0.0-9.0)

^a Sham, İ/R, Atx 5mg/kg+İ/R, Atx 10mg/kg+İ/R ve Atx 25mg/kg+İ/R grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı artış (p<0.05).

^b İ/R, Atx 5mg/kg+İ/R, Atx 10mg/kg+İ/R ve Atx 25mg/kg+İ/R grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı artış (p<0.05).

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, böbrek İ/R hasar modeli oluşturulan ratlarda antioksidan özelliğe sahip astaksantin düşük, orta ve yüksek doz uygulamalarının böbrek dokusunda meydana gelen oksidatif hasar ve otofaji üzerine etkileri incelendi. Astaksantin uygulanan doz miktarından bağımsız olarak böbrek dokusundaki oksidatif hasar üzerine koruyucu etkisi olduğu tespit edildi. Bu çalışma ile 25 mg/kg astaksantin uygulamasının böbrek İ/R hasar modelinde otofajiyi indüklediği belirlendi. Astaksantin uygulaması otofaji mekanizması sayesinde böbrek dokularında meydana gelen İ/R hasarına karşı koruyucu etki gösterdi.

BUN ve kreatinin böbrek fonksiyonlarının değerlendirilmesi için kullanılan parametrelerdendir (101). Artan BUN ve kreatinin düzeyleri böbrek fonksiyonlarının azaldığını gösterir. Bundan dolayı çalışmamızda böbrek fonksiyonlarını değerlendirmek için BUN ve kreatinin düzeyleri ölçüldü. BUN ve kreatinin düzeylerinin sham grubu ile karşılaştırıldığında İ/R grubunda yüksek olduğu ve bu yüksekliğin İ/R grubundaki sıçanların böbrek fonksiyonlarındaki azalma sonucu olduğu tespit edildi. Astaksantin uygulanan sıçanlarda BUN ve kreatinin düzeyleri İ/R grubuna göre anlamlı düzeyde düşük olduğu tespit edildi. Bu azalma astaksantin böbrek fonksiyonlarını korumada etkili olduğunu gösterdi. Yapılan çeşitli çalışmalarda uygulanan astaksantin artmış BUN ve kreatinin düzeylerini anlamlı derecede azalttığı belirtilmektedir (102, 103). Li ve arkadaşları (104) meydana gelen böbrek hasarında, astaksantin artmış BUN düzeyini azalttığını ama kreatinin seviyelerinde anlamlı bir değişiklik yapmadığını bildirmişlerdir. Chen ve arkadaşları (105) ise diyabetik nefropati'li sıçanlarda yaptığı çalışmada astaksantin sadece kreatinin düzeyini azalttığını ifade etmişlerdir.

Sağlıklı bir vücutta oksidan ve antioksidan sistemler arasında bir denge vardır. Oksidan düzeyinin yükselmesi veya antioksidan sistemin yetersiz kalması sonucu bu denge bozulur ve oksidatif stres meydana gelir. Oksidatif stres ise lipidleri, proteinleri ve DNA yapısını etkileyerek hücrel hasara neden olur. Literatürde diyabet (106), ateroskleroz (107), hipertansiyon (108), bağışıklık sistemi hastalıkları (109) ve İ/R (102) sonucu meydana gelen oksidatif stres hasarının etkilerini inceleyen çalışmalar mevcuttur. Çalışmamızda antioksidan özelliğe sahip astaksantin oksidatif stres hasarı üzerine etkileri değerlendirildi. Oksidatif stres parametreleri olarak TAS, TOS, SOD ve MDA

seviyeleri ölçüldü. Total antioksidan düzeyini gösteren TAS değeri ve SOD enzim aktivitesinin sham grubu ile karşılaştırıldığında İ/R grubunda azaldığı ve astaksantin uygulanan gruplarda ise İ/R grubuna göre yüksek olduğu tespit edildi. Total oksidan düzeyini gösteren TOS ve lipid peroksidasyon son ürünü olan MDA düzeylerinin sham grubu ile karşılaştırıldığında İ/R grubunda yüksek olduğu ve astaksantin uygulanan gruplarda ise İ/R grubuna göre düşük olduğu tespit edildi. İ/R grubunda meydana gelen bu değişiklikler bu grupta oksidatif hasar oluştuğunu göstermiştir. Astaksantin uygulanan tüm gruplarda TAS-SOD düzeylerinin yüksek ve TOS-MDA düzeylerinin düşük olması ise astaksantin uygulamasının oksidatif hasara karşı koruyucu etkisi olduğunu gösterdi. Literatürde böbrek İ/R hasarına karşı astaksantin uygulaması ile yapılan çalışmalar az olmakla beraber astaksantin böbrek dokularında meydana gelen oksidatif hasara karşı koruyucu etkiler gösterdiği ve böbrek hasarını azaltabileceği belirtilmiştir (102, 110-112). Çalışmamıza benzer şekilde Qiu ve arkadaşları (113) İ/R'ye bağlı oksidatif hasarın arttığını ve uygulanan astaksantin ise oluşan hasarı azalttığını ifade etmişlerdir. Ayrıca yaptıkları çalışmada astaksantin İ/R'nin neden olduğu akut yaralanmayı önlemede güvenli bir yol olabileceğini belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda, Qiu ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmadan farklı olarak 3 ayrı dozda astaksantin uygulanmıştır ve otofaji üzerinden de değerlendirme yapılmıştır. Önceki çalışmalar ile uyumlu olan sonuçlarımız astaksantin uygulamasının böbrek dokularında oksidatif hasara karşı koruyucu etki gösterdiğini desteklemektedir.

Otofaji çoğu hücrede bazal seviyede meydana gelir ve hücre içi homeostazın korunması için uzun ömürlü organel ve proteinlerin dönüşümüne yardımcı olur (74). Hücrel stres durumlarında otofaji'nin indüksiyonu, hücre ölümüne katkıda bulunabilir ya da hücrenin hayatta kalmasında rol oynayan etkili bir mekanizma görevi görür (6). Otofajinin inhibisyonun böbrek hasarını arttırdığı ve iskemik böbrek hasarında otofajinin koruyucu etkisi olduğu düşünülmektedir (6). Kalıcı otofaji aktivasyonunun ise hücre ölüm yollarını tetikleyebileceği ve böbrek hasarını arttırabileceği üzerine duran farklı bir görüş de vardır (114). Otofaji mekanizması henüz net olarak anlaşılabilmiş değildir. Ancak astaksantin otofajiyi yukarı veya aşağı yönlü regülasyonu sonucu dokuları hasara karşı koruduğu yaygın bir görüştür. Yapılan deneysel bir çalışmada akut pankreatit oluşturulmuş sıçanlarda astaksantin uygulamasının otofajiyi inhibe ederek pankreasta meydana gelen doku hasarını önlediği gösterilmiştir (115). Karaciğer fibrozisi üzerine yapılan bir çalışmada ise, uygulanan astaksantin otofaji yolağını inhibe ederek

karaciğer fibrozisi üzerine koruyucu etki gösterdiği ifade edilmiştir (116). Bu iki çalışmada astaksantin otofaji inhibisyonu yoluyla dokuları hasara karşı koruduğu bildirilmiştir. Yaptığımız literatür taramasında astaksantin uygulamasının otofaji indüksiyonu aracılığıyla dokuları hasara karşı koruduğunu gösteren bir çalışma tespit edebildik (117). Lee ve arkadaşları mide epitel hücrelerinde *Helicobacter pylori*'nin sebep olduğu hasara karşı astaksantin uygulamasının otofaji yolağını indükleyerek bu mekanizma sayesinde dokuları hasara karşı koruduğu bildirilmiştir (117). Çalışmamızda Atx 25 mg/kg+İ/R grubunda Beclin-1 ve LC3 seviyelerini artarken p62 seviyesinin azalması sonucu otofajinin indüklendiği belirlendi. Ayrıca Atx 25 mg/kg+İ/R grubunda, İ/R grubunda görülen kortikal ve medullar alandaki tübüllerde nekrotik değişiklikler ve intertisyel dokuda görülen inflamatuvar hücre infiltrasyonunun azalması astaksantin uygulamasının otofajinin indüksiyonu yoluyla dokuları hasara karşı koruduğunu gösterdi. Atx 10 mg/kg+İ/R grubunda da Atx 25 mg/kg+İ/R grubu ile benzer histopatolojik değişiklikler gözlemlendi fakat bu grupta istatistiksel olarak anlamlı otofaji indüksiyonu söz konusu değildi. Bu durum Atx 10 mg/kg+İ/R grubunda otofajinin meydana geldiğini fakat bunun istatistiksel olarak anlama yansımadığını düşündürdü. Otofaji indüksiyonu ile besin yokluğunda veya hücre stres durumunda hasarlı organeller, protein yığınları ve hücre içi patojenler yok edilerek hücre canlılığının devamı sağlanır ve hücre fonksiyonları korunur.

Özetle astaksantin uygulamasının çalışmamızda uygulanmış doz miktarlarından bağımsız olarak İ/R sonucu azalan böbrek fonksiyonları ve artan oksidatif hasara karşı hücreleri korumada etkili bir yöntem olduğu tespit edildi. Ayrıca doz miktarına bağlı olarak astaksantin uygulamasının otofajinin indüksiyonu yoluyla böbrek dokularını hasara karşı koruduğu tespit edildi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Astaksantin otofaji üzerine etkileri hala tartışmalı bir konu olsa da, İ/R sonrası otofaji aktivasyonu böbrek dokularını korumada önemlidir. Çalışmamızda, böbrek İ/R hasarına karşı astaksantin uygulamasının otofajinin indüksiyonu yoluyla böbrek dokularını hasara karşı koruduğu tespit edildi. Ayrıca astaksantin böbrek İ/R sonrası meydana gelen oksidatif hasara karşı koruyucu etki gösterdiği de tespit edildi.

Yapılan literatür taramasında böbrek İ/R hasarında astaksantin otofaji üzerine rolünü inceleyen çalışma bulunamadığı için çalışmamızın diğer çalışmalar için bir yol gösterici olacağı ve yapılacak yeni çalışmaların böbrek İ/R hasarında astaksantin otofajideki rolünün aydınlatılması için faydalı olacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Jennings RB, Reimer KA. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med* 1991,42:225-46.
2. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surg Clin North Am* 1992, 72(1):65-83.
3. Wei Q, Dong Z. Mouse model of ischemic acute kidney injury: technical notes and tricks. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012, 303(11): 1487-94.
4. Ahmadiasl N, Banaei S, Alihemmati A. Combination antioxidant effect of erythropoietin and melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Iran J Basic Med Sci* 2013, 16(12):1209-16.
5. Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy and cell death. *Curr Top Dev Biol* 2007, 78:217-45.
6. Jiang M, Liu K, Luo J, Dong Z. Autophagy is a renoprotective mechanism during in vitro hypoxia and in vivo ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol* 2010, 176(3):1181-92.
7. Hagen C, Grünewald K, Xyländer M, Rothe E. Effect of cultivation parameters on growth and pigment biosynthesis in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis*. *J Appl Phycol* 2001, 13(1):79-87.
8. Kim SH, Kim H. Astaxanthin Modulation of Signaling Pathways That Regulate Autophagy. *Mar Drugs* 2019, 17(10):546.
9. Arifoğlu Y. *Her Yönüyle Anatomi*, 2. Baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevleri, 2017: 429-44.
10. Netter FH, Colacino S. *Atlas of human anatomy*, Ciba-Geigy Corporation; 1989.
11. Standring S. *Gray's Anatomy*, London, UK., Churchill Livingstone Elsevier; 2008.
12. Arıncı K, Elhan E. *Anatomi*, 1. Cilt. Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 2014.
13. Özbağ D. *İnsan Anatomi*, 1. Baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevleri, 2020.
14. Arınsöy T, Güngör Ö, Koçyiğit İ. *Böbrek Fizyopatolojisi*, 1.baskı. Reaktif, 2017.
15. Hall JE. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*, Jordan, Saunders Elsevier, 2017.
16. Chiasson RB. *Laboratory anatomy of the white rat*, 5th ed. Wm. C. Brown, 1987.
17. Hebel R, Stromberg MW. *Anatomy and embryology of the laboratory rat*, 1th ed. BioMed Verlag, 1986.
18. Çakır ÖO, Yürük E, Binbay M. Üriner Sistem Taş Hastalığında Deneysel Modeller. *Endoüroloji Bülteni* 2014, 7:13-7.
19. Sharp P, La Regina M, Suckow M,. *The laboratory rat*, 1th ed. CRC Press, 1998.

20. Walker WF, Homberger DG. *Anatomy and Dissection of the Rat*, 3th ed. Macmillan, 1997.
21. https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/113799/mod_resource/content/1/Sıçan.pdf. 02.12.2020.
22. Huether SE, McCance KL. *Study Guide for Understanding Pathophysiology-E-Book*, Elsevier Health Sciences, 2016.
23. Green C, Gower J, Healing G, Cotterill L, Fuller B, Simpkin S. The importance of iron, calcium and free radicals in reperfusion injury: an overview of studies in ischaemic rabbit kidneys. *Free Radic Res* 1989, 7(3-6): 255-64.
24. Kanagasundaram NS. Pathophysiology of ischaemic acute kidney injury. *Ann Clin Biochem* 2015, 52(Pt 2): 193-205.
25. Zimmerman BJ, Granger DN. Mechanisms of reperfusion injury. *Am J Med Sci* 1994, 307(4): 284-92.
26. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol* 2012, 298: 229-317.
27. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008, 454(7203): 428-35.
28. Wilhelm J. Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. *Acta Univ Carol Med Monogr* 1990, 137: 1-53.
29. Khalil AA, Aziz FA, Hall JC. Reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg* 2006, 117(3): 1024-33.
30. Takito AM, Silva JCCB, Bueno V, Franco M, Burihan E. Ischemic and reperfusion syndrome of hind limbs: functional and histological renal changes in rats. *Medicina* 2005, 38(3/4): 294-300.
31. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* 2001, 94(6): 1133-8.
32. Schlag MG, Harris KA, Potter RF. Role of leukocyte accumulation and oxygen radicals in ischemia-reperfusion-induced injury in skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001, 280(4): 1716-21.
33. Akkuş İ. *Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkiler*, Konya, Mimoza Yayınları, 1995.
34. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?. *J Lab Clin Med* 1992, 119(6): 598-620.
35. Rhee SG. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med* 1999, 31(2): 53-9.

36. Sundaresan M, Yu Z-X, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 1995, 270(5234): 296-9.
37. Flora S. Role of free radicals and antioxidants in health and disease. *Cell Mol Biol* 2007, 53(1): 1-2.
38. Lloyd RV, Hanna PM, Mason RP. The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. *Free Radic Biol Med* 1997, 22(5): 885-8.
39. Kehrer JP. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 2000, 149(1): 43-50.
40. Devasagayam TP, Bolor KK, Ramasarma T. Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits. *Indian J Biochem Biophys* 2003, 40(5): 300-8.
41. Catalá A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int J Biochem Cell Biol* 2006, 38(9): 1482-95.
42. Ertan T, Soran A, Kılıç M, Aşlar A, Koç M, Cengiz Ö. Kan Malondialdehid ve total antioksidan seviyesinin (TAS) önemi. *Cerrahi Tıp Bülteni* 2001, 2(4): 154-67.
43. Frangogiannis NG. Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thromb Haemost* 2007, 97(05): 738-47.
44. Regan RF. The vulnerability of spinal cord neurons to excitotoxic injury: comparison with cortical neurons. *Neurosci Lett* 1996, 213(1): 9-12.
45. Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 1993, 21(9): 1376-86.
46. Dong J, Pratt J, Smith R, Dodd I, Sacks S. Strategies for targeting complement inhibitors in ischaemia/reperfusion injury. *Mol Immunol* 1999, 36(13-14): 957-63.
47. Diepenhorst GM, van Gulik TM, Hack CE. Complement-mediated ischemia-reperfusion injury: lessons learned from animal and clinical studies. *Ann Surg* 2009, 249(6): 889-99.
48. Monsinjon T, Richard V, Fontaine M. Complement and its implications in cardiac ischemia/reperfusion: strategies to inhibit complement. *Fund Clin Pharmacol* 2001, 15(5): 293-306.
49. Weight SC, Bell PR, Nicholson ML. Renal ischaemia--reperfusion injury. *Br J Surg* 1996, 83(2): 162-70.
50. Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *J Invest Surg* 2009, 22(1): 46-55.

51. Chamoun F, Burne M, O'Donnell M, Rabb H. Pathophysiologic role of selectins and their ligands in ischemia reperfusion injury. *Front Biosci* 2000, 5(1): 103-9.
52. Furuichi K, Wada T, Iwata Y, Kitagawa K, Kobayashi K, Hashimoto H, Ishiwata Y, Asano M, Wang H, Matsushima K, Takeya M, Kuziel WA, Mukaida N, Yokoyama H. CCR2 signaling contributes to ischemia-reperfusion injury in kidney. *J Am Soc Nephrol* 2003, 14(10): 2503-15.
53. Brezis M, Rosen S. Hypoxia of the renal medulla—its implications for disease. *N Engl J Med* 1995, 332(10): 647-55.
54. Friedewald JJ, Rabb H. Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 2004, 66(2): 486-91.
55. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007, 39(1): 44-84.
56. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997, 82(2): 291-295.
57. Choi H-S, Song HS, Ukeda H, Sawamura M. Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J Agric Food Chem* 2000, 48(9): 4156-61.
58. Matés JM, Sánchez-Jiménez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci* 1999, 4(4): 339-45.
59. Astorg P. Food carotenoids and cancer prevention: an overview of current research. *Trends Food Sci Technol* 1997, 8(12): 406-13.
60. Bağdatlıoğlu N, Demirbükür B. Gıda işlemede karotenoidlerde meydana gelen gelişmeler. *Gıda* 1999, 9:48-51.
61. Cohen Z. Chemicals from microalgae. 1th ed. London, CRC press, 1999.
62. Karuppuswamy R. Extraction And Characterization Of Major Valuable Compounds From Prawn Waste. Doctoral Thesis, University Of New South Wales, 2008.
63. Higuera-Ciapara I, Felix-Valenzuela L, Goycoolea F. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2006, 46(2): 185-96.
64. Kitahara T. Carotenoids in the Pacific salmon during the marine period. *Comp Biochem Physiol B Comp Biochem* 1984, 78(4): 859-62.
65. Foss P, Renstrøm B, Liaaen-Jensen S. Natural occurrence of enantiomeric and Meso astaxanthin 7*-crustaceans including zooplankton. *Comp Biochem Physiol B Comp Biochem* 1987, 86(2): 313-4.

66. Margalith PZ. Production of ketocarotenoids by microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol* 1999, 51(4): 431-8.
67. Ravi S, Ambati RR, Kamath SB, Chandrappa D, Narayanan A, Chauhan VS, Ravishankar GS. Influence of different culture conditions on yield of biomass and value added products in microalgae. *Dyn Biochem Process Biotechnol Mol Biol* 2012, 6(2): 77-85.
68. Mentese A, Turkmen S, Karaguzel E, Karaca Y, Tatli O, Sumer AU, Yulug E, Turedi S. The predictive value of ischemia-modified albumin in long-term results of ischemia-reperfusion injury in an experimental testicular torsion model. *Urology* 2012, 80(3): 689-94.
69. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *N Engl J Med* 2009, 361(16): 1570-83.
70. Casati B. Molecular and morpho-functional effects of starvation on *Bombyx mori* tissues. Department of Biology and Life Sciences, Insect Science and Biotechnology. Doctoral Thesis, Italy: University of Insubria, 2014.
71. Petiot A, Pattingre S, Arico S, Meley D, Codogno P. Diversity of signaling controls of macroautophagy in mammalian cells. *Cell Struct Funct* 2002, 27(6): 431-41.
72. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* 2010, 221(1): 3-12.
73. He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 2009, 43: 67-93.
74. Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* 2005, 115(10): 2679-88.
75. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev* 2007, 21(22): 2861-73.
76. Hurley JH, Young LN. Mechanisms of autophagy initiation. *Annu Rev Biochem* 2017, 86: 225-44.
77. Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, Kundu M, Kim DH. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell* 2009, 20(7): 1992-2003.
78. Hara T, Takamura A, Kishi C, Iemura S, Natsume T, Guan JL, Mizushima N. FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J Cell Biol* 2008, 181(3): 497-510.
79. Amaya C, Fader CM, Colombo MI. Autophagy and proteins involved in vesicular trafficking. *FEBS Lett* 2015, 589(22): 3343-53.

80. Badadani MJICB. Autophagy mechanism, regulation, functions, and disorders. *Int Sch Res Notices* 2012, 2012: 11.
81. Huang R, Liu W. Identifying an essential role of nuclear LC3 for autophagy. *Autophagy* 2015, 11(5): 852-3.
82. Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, Griffiths G, Ktistakis NT. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 2008, 182(4): 685-701.
83. Kamada Y, Yoshino K, Kondo C, Kawamata T, Oshiro N, Yonezawa K, Ohsumi Y. Tor directly controls the Atg1 kinase complex to regulate autophagy. *Mol Cell Biol* 2010, 30(4): 1049-58.
84. Vega-Rubín-de-Celis S. The Role of Beclin 1-Dependent Autophagy in Cancer. *Biology (Basel)* 2019, 9(1): 4.
85. Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ* 2011, 18(4): 571-80.
86. Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 1999, 402(6762): 672-6.
87. Martinet W, De Meyer GR, Andries L, Herman AG, Kockx MM. In situ detection of starvation-induced autophagy. *J Histochem Cytochem* 2006, 54(1): 85-96.
88. Xu HD, Qin ZH. Beclin 1, Bcl-2 and Autophagy. *Adv Exp Med Biol* 2019, 1206: 109-26.
89. Guo C, Zhang Y, Nie Q, Cao D, Wang X, Wan X, Liu M, Cui J, Sun J, Bai Y, Li L. SQSTM1/ p62 oligomerization contributes to A β -induced inhibition of Nrf2 signaling. *Neurobiol Aging* 2020, 98: 10-20.
90. Ichimura Y, Kominami E, Tanaka K, Komatsu M. Selective turnover of p62/A170/SQSTM1 by autophagy. *Autophagy* 2008, 4(8): 1063-6.
91. Wurzer B, Zaffagnini G, Fracchiolla D, Turco E, Abert C, Romanov J, Martens S. Oligomerization of p62 allows for selection of ubiquitinated cargo and isolation membrane during selective autophagy. *Elife* 2015, 4: e08941.
92. Komatsu M. Potential role of p62 in tumor development. *Autophagy* 2011, 7(9): 1088-90.
93. Islam MA, Sooro MA, Zhang P. Autophagic Regulation of p62 is Critical for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci* 2018, 19(5): 1405.

94. Wang Y, Zhang N, Zhang L, Li R, Fu W, Ma K, Li X, Wang L, Wang J, Zhang H, Gu W, Zhu WG, Zhao Y. Autophagy Regulates Chromatin Ubiquitination in DNA Damage Response through Elimination of SQSTM1/p62. *Mol Cell* 2016, 63(1):34-48.
95. Arslan AK, Yaşar Ş, Çolak C, YOLOĞLU S. WSSPAS: An Interactive Web Application for Sample Size and Power Analysis with R Using Shiny. *Turkiye Klinikleri J Biostat* 2018, 10(3): 224-46.
96. Chen CC, Liu ZM, Wang HH, He W, Wang Y, Wu WD. Effects of ulinastatin on renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2004, 25(10): 1334-40.
97. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951, 193(1): 265-75.
98. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988, 34(3): 497-500.
99. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990, 186: 407-21.
100. Ozer EA, Kumral A, Ozer E, Duman N, Yilmaz O, Ozkal S, Ozkan H. Effect of retinoic acid on oxygen-induced lung injury in the newborn rat. *Pediatr Pulmonol* 2005, 39(1): 35-40.
101. Walker HK, Hall WD, Hurst JW. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*, 3th ed. Boston, Butterworths,1990.
102. Gao D, Wang H, Xu Y, Zheng D, Zhang Q, Li W. Protective effect of astaxanthin against contrast-induced acute kidney injury via SIRT1-p53 pathway in rats. *Int Urol Nephrol* 2019, 51(2): 351-8.
103. Iskender H, Yenice G, Dokumacioglu E, Hayirli A, Sevim C, Dokumacioglu A, Terim Kapakin KA. Astaxanthin alleviates renal damage of rats on high fructose diet through modulating NFκB/SIRT1 pathway and mitigating oxidative stress. *Arch Physiol Biochem* 2020, 126(1): 89-93.
104. Li L, Chen Y, Jiao D, Yang S, Li P. Protective Effect of Astaxanthin on Ochratoxin A-Induced Kidney Injury to Mice by Regulating Oxidative Stress-Related NRF2/KEAP1 Pathway. *Molecules* 2020, 25(6): 1386.
105. Chen Z, Li W, Shi L, Jiang L, Li M, Zhang C, Peng H. Kidney-targeted astaxanthin natural antioxidant nanosystem for diabetic nephropathy therapy. *Eur J Pharm Biopharm* 2020,156: 143-54.
106. Pitocco D, Zaccardi F, Di Stasio E, Romitelli F, Santini SA, Zuppi C, Ghirlanda G. Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. *Rev Diabet Stud* 2010, 7(1): 15-25.

107. Singh U, Jialal IJP. Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology* 2006, 13(3): 129-42.
108. Larsen MK, Matchkov VV. Hypertension and physical exercise: The role of oxidative stress. *Medicina (Kaunas)* 2016, 52(1): 19-27.
109. Smallwood MJ, Nissim A, Knight AR, Whiteman M, Haigh R, Winyard PG. Oxidative stress in autoimmune rheumatic diseases. *Free Radic Biol Med* 2018, 125: 3-14.
110. Akca G, Eren H, Tumkaya L, Mercantepe T, Horsanali MO, Deveci E, Dil E, Yilmaz A. The protective effect of astaxanthin against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Biomed Pharmacother* 2018, 100: 575-82.
111. Naito Y, Uchiyama K, Aoi W, Hasegawa G, Nakamura N, Yoshida N, Maoka T, Takahashi J, Yoshikawa T. Prevention of diabetic nephropathy by treatment with astaxanthin in diabetic db/db mice. *Biofactors* 2004, 20(1): 49-59.
112. Liu N, Chen J, Gao D, Li W, Zheng DJ, Liu, nephrology. Astaxanthin attenuates contrast agent-induced acute kidney injury in vitro and in vivo via the regulation of SIRT1/FOXO3a expression. *Int Urol Nephrol* 2018,50(6): 1171-80.
113. Qiu X, Fu K, Zhao X, Zhang Y, Yuan Y, Zhang S, Gu X, Guo H. Protective effects of astaxanthin against ischemia/reperfusion induced renal injury in mice. *J Transl Med* 2015, 13:28.
114. Lin TA, Wu VC, Wang CY. Autophagy in Chronic Kidney Diseases. *Cells* 2019,8(1): 64.
115. Zhang H, Yang W, Li Y, Hu L, Dai Y, Chen J, Xu S, Xu X, Jiang H. Astaxanthin ameliorates cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Int Immunopharmacol* 2018, 56: 18-28.
116. Shen M, Chen K, Lu J, Cheng P, Xu L, Dai W, Wang F, He L, Zhang Y, Chengfen W, Li J, Yang J, Zhu R, Zhang H, Zheng Y, Zhou Y, Guo C. Protective effect of astaxanthin on liver fibrosis through modulation of TGF- β 1 expression and autophagy. *Mediators Inflamm* 2014, 2014: 954502.
117. Lee H, Lim JW, Kim HJN. Effect of Astaxanthin on Activation of Autophagy and Inhibition of Apoptosis in Helicobacter pylori-Infected Gastric Epithelial Cell Line AGS. *Nutrients* 2020, 12(6): 1750.

EKLER

EK-1. Özgeçmiş

20.10.1994 tarihinde Osmaniye’de doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimi Osmaniye’de tamamladım. 2013-2015 tarihleri arasında Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Bölümü’nde lisans eğitimimi tamamladım. 2018 yılında İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anatomi Anabilim Dalı’nda başladığım yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim.



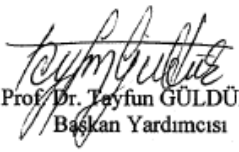



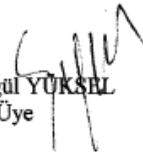
EK-2. Etik Kurul Kararı

İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 23.10.2019
Toplantı Yeri : Tıp. Fak. Toplantı Salonu
Araştırma Protokol no.su : 2019/A-48
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü : Rat
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soyı : Wistar Albino / Sprague-Dawley
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 40
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı : 4-6 ay /220-280 gr

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı'n da Doç. Dr. Evren KÖSE'nin sorumlu araştırmacı olduğu; "Böbrek İskemi-Reperfüzyon Modeli oluşturulan Ratlarda Astaksantin Maddesinin Otofaji Üzerine Etkisinin Araştırılması" isimli 2019/A-48 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmesi şartıyla çalışmanın yapılmasının uygun olduğuna; oy birliği ile karar verildi.

Prof. Dr. Davut ÖZBAĞ Başkan KATILMADI	 Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR Başkan Yardımcısı	 Prof. Dr. Metin ATAMBAY Üye
 Prof. Dr. M. Çağatay TAŞKAPAN Üye	 Prof. Dr. Başak KAYHAN Üye	 Prof. Dr. Şengül YÜKSEL Üye
Vet.Hek. Engin KORKMAZ Üye KATILMADI	Akın ÖZ Sivil Üye KATILMADI	Av. M. Umut YALÇIN Sivil Üye KATILMADI