

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

RİOSİGUAT ÖN TEDAVİSİNİN SIÇAN BÖBREK İSKEMİ-REPERFÜZYON
MODELİNDE RENAL FONKSİYONLARA ETKİSİ

Dr. Yaşar Can ALTINIŞIK

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ANKARA

2024

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
RİOSİGUAT ÖN TEDAVİSİNİN SIÇAN BÖBREK İSKEMİ-REPERFÜZYON
MODELİNDE RENAL FONKSİYONLARA ETKİSİ

Dr. Yaşar Can ALTINIŞIK

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Alper Bektaş İSKİT

Doç. Dr. Güray SOYDAN

ANKARA

2024

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimi ve tez çalışması süreçlerimde emekleri olan başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Alper İSKİT'e ve tez danışmanım Doç. Dr. Güray SOYDAN'a

Akademik alanda bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan Prof. Dr. Yıldırım SARA ve Doç. Dr. Mert ERTUNÇ'a,

Dört yıl boyunca aynı laboratuvarında dayanışma içinde birlikte çalıştığım Dr. Sinan KAYA ve Dr. Saltuk SONGÜR'e,

Muhabetini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Dr. Volkan TÜMER ve Dr. Kübra KARADAĞ'a,

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalıştığım, sohbetleriyle ve destekleriyle yanımda olan, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı araştırma görevlilerine ve yardımsever çalışanlarına,

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Kemal KÖSEMEHMETOĞLU'na,

Desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen güzel aileme ve Hakk'a yürüyen aile büyüklerime,

Asistanlık eğitimimin ilk günü tanıştığım ve Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalında uzun süre beraber görev yaptığım ve bu süreçte beraber yol yürüdüğüm, desteğini ve ilgisini her daim yanımda hissettiğim sevgili eşim Mukaddes'e,

Cumhuriyetimizin kurucusu Gazi Mustafa Kemal ATATÜRK'e,

Tüm kalbi duygularıyla teşekkür ederim.

Dr. Yaşar Can ALTINIŞIK

ÖZET

İskemi-reperfüzyon (İ-R) hasarı vücütta birçok organı etkileyebilen patolojik bir durumdur. Özellikle böbrekte gelişen İ-R hasarı doğrudan böbrek içi vasküler hasara yol açarak akut böbrek hasarı (ABH) gelişimini kolaylaştırır ve mortaliteyi belirgin şekilde artırır.

Nitrik oksit (NO) / solubl guanilat siklaz (sGC) / siklik guanozin monofosfat (cGMP) yolağı, vasküler sistem üzerine koruyucu etkisi olan bir yolaktır. Bir sGC stimülatörü olan riosiguat pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH) tedavisinde onaylı olarak kullanılmaktadır. Vasküler sistem üzerindeki olumlu etkilerinden dolayı bu ilacın diğer sistemler ve hastalıklar üzerine olan etkileri yaygın olarak incelenmektedir. Çalışmalarda riosiguatın antiinflamatuvar etkisi olabileceğı, akciğer, kalp ve böbrekler üzerine doğrudan koruyucu etkilerinin olduğu da gösterilmiştir.

Bu çalışmada riosiguat ön tedavisinin, renal İ-R hasarı modelinde meydana gelen akut böbrek hasarında, fizyolojik ve renal fonksiyonlar üzerine olan etkisi incelendi. Riosiguat ön tedavisi, böbrekte renal İ-R hasarı sonucu azalan renal arter kan akımını ve bozulan böbrek doku perfüzyonunu artırdı. İzole perfüze böbrek düzeneğinde kasıcı ve gevşetici ajanlarla böbrek damar yatağının fonksiyonel yanıtları değerlendirildi. İ-R hasarı, asetilkolin (ACh) ve sodyum nitroprusiyat (SNP) ile oluşturulan gevşeme yanıtlarını belirgin olarak azalttı, riosiguat ön tedavisi bozulan gevşeme yanıtlarını geri döndürdü. Anjiyotensin II ve fenilefrin ile oluşturulan kasılma yanıtları arasında anlamlı fark bulunmadı. Renal iskemi reperfüzyon hasarı sonrası bozulan böbrek histopatolojisi, riosiguat ön tedavisi ile düzelme eğilimi gösterdi. Yapılan ELISA deneylerinde, interlökin-1 β düzeylerinde anlamlı farklılık bulunmadı. Riosiguat ön tedavisi anti-inflamatuvar bir sitokin olan IL-10 düzeylerini anlamlı ölçüde artırdığı gösterildi.

Bu sonuçlar, riosiguatın İ-R hasarına bağılı olarak ABH gelişme riski bulunan hastalarda koruyucu tedavi olarak kullanılabilmesi için ileride yapılacak klinik çalışmalara temel oluşturmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Riosiguat, Arter, İskemi-Reperfüzyon, Böbrek, Soluabl
guanilat siklaz

ABSTRACT

Ischemia-reperfusion (I-R) injury is a pathological condition that can affect many organs in the body. Ischemia-reperfusion damage, especially in the kidney, directly causes intrarenal vascular damage by facilitating the development of acute kidney injury and significantly increasing mortality.

The nitric oxide (NO) / soluble guanylate cyclase (sGC) / cyclic guanosine monophosphate (cGMP) pathway has a protective effect on the vascular system. Riociguat, a soluble guanylate cyclase stimulator, is approved for use in the treatment of pulmonary arterial hypertension. Due to its beneficial effects on the vascular system, the effects of this drug on other systems and diseases are widely investigated. Studies have shown that riociguat has an anti-inflammatory effects and has also shown that it has direct protective effects on the lungs, heart and kidneys.

In this study, the effect of riociguat pretreatment on physiological and renal functions in acute kidney injury in a rat renal ischemia-reperfusion injury model was examined. Riociguat pretreatment reversed the decreased renal artery blood flow and impaired renal tissue perfusion as a result of renal ischemia-reperfusion in the kidney. Functional responses of the renal vascular bed to vasoconstricting and vasodilating agents were evaluated in the isolated perfused kidney setup. Ischemia-reperfusion injury significantly reduced acetylcholine and sodium nitroprusside induced relaxation responses, whereas riociguat pretreatment increased the impaired relaxation responses. No significant differences were found in the contractile responses produced by angiotensin II and phenylephrine. Deteriorated renal histopathology after renal ischemia reperfusion injury showed a tendency to improve with riociguat pretreatment. In ELISA experiments, no significant differences were found in interleukin-1 β levels. Riociguat pretreatment significantly increased levels of IL-10 which is an anti-inflammatory cytokine.

These results paved the way for future clinical studies to use riociguat as a preventive treatment in patients at risk of developing AKI due to I-R injury.

Keywords: Riociguat, Artery, Ischemia-Reperfusion, Kidney, Soluble guanylate cyclase

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	3
ÖZET	4
ABSTRACT	6
SİMGELER VE KISALTMALAR	11
ŞEKİL DİZİNİ	13
TABLO DİZİNİ	14
1. GİRİŞ	15
2. GENEL BİLGİLER	17
2.1. Böbrek Anatomisi ve Fizyolojisi	17
2.2. İskemi-Reperfüzyon Hasarı	18
2.3. İskemi-Reperfüzyon Hasarının Organlardaki Etkileri	21
2.4. Renal İskemi-Reperfüzyon Hasarı	23
2.5. NO, sGC ve cGMP Yolağı	26
2.6. İskemi-Reperfüzyon Hasarında NO ve sGC'nin Rolü.....	29
2.7. sGC Stimülatörlerinin Tanımı ve Etkileri	31
2.8. Riosiguat	32
2.9. Hipotez.....	35
2.10. Amaç.....	35
3. YÖNTEMLER	36
3.1. Deney Hayvanları.....	36
3.2. Etik Kurul İzni	36
3.3. Deney Protokolü ve İlaç Uygulamaları	36
3.4. Fonksiyonel Değerlendirme.....	39

3.4.1. <i>In vivo</i> Renal Kan Akımı Ölçümü	39
3.4.2. <i>In vivo</i> Böbrek Doku Perfüzyonu Ölçümleri	40
3.4.3. <i>Ex vivo</i> Deneysel Model	41
3.4.3.1. İzole Perfüze Böbrek Düzenegi.....	41
3.5. Histopatoloji için Örneklerin Toplanması	42
3.6. Histopatolojik Değerlendirme	43
3.7. Biyokimyasal Değerlendirme.....	44
3.8. İstatistiksel Analiz	45
4. BULGULAR	46
4.1. Genel Değerlendirmeler	46
4.1.1. Hayvan Vücut Ağırlığı Oranları Sonuçları	46
4.2. Fonksiyonel Değerlendirmeler	47
4.2.1. <i>In Vivo</i> Ölçümler.....	47
4.2.1.1. Renal Arter Kan Akımı Ölçümü Sonuçları.....	47
4.2.1.2. Böbrek Doku Perfüzyon Ölçümü Sonuçları.....	51
4.2.2. <i>Ex Vivo</i> Ölçümler	54
4.2.2.1. İzole Perfüze Böbrek Düzenegi Sonuçları	54
4.2.2.1.1. Bazal Perfüzyon Basıncı.....	54
4.2.2.1.2. Fenilefrin	55
4.2.2.1.3. Norepinefrin.....	57
4.2.2.1.4. Anjiyotensin-II.....	58
4.2.2.1.5. Asetilkolin.....	59
4.2.2.1.6. SNP.....	61
4.2.2.1.7. Böbrek Ağırlığı.....	63
4.2.2.1.8. Böbrek Ağırlığının Hayvan Vücut Ağırlığına Oranı.....	64
4.3. ELISA sonuçları.....	65
4.3.1. IL-1 β ELISA sonuçları.....	65
4.3.2. IL-10 ELISA sonuçları.....	66

4.4. Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları.....	67
4.4.1. Böbrek Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları.....	67
5. TARTIŞMA.....	69
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	81
7. KAYNAKLAR.....	83

SİMGELER VE KISALTMALAR

AT-II	Anjiyotensin-II
ACh	Asetilkolin
Emax	Maksimum yanıt
g	Gram
IL	İnterlökin
İ-R	İskemi-Reperfüzyon
NF-kB	Nükleer faktör kappa beta
MI	Miyokard enfarktüsü
MRG	Manyetik rezonans görüntüleme
GFR	Glomerüler filtrasyon oranı
ATP	Adenozin trifosfat
cGMP	Siklik guanozin monofosfat
ROS	Reaktif oksijen türleri
DNA	Deoksiribonükleik asit
BH4	Tetrahidrobiopterin
GC	Guanilat siklaz
GTP	Guanozin-5-trifosfat
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
L-NAME	L-arjinin metil ester
KOAH	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı

CMC	Karboksimetil selüloz
PAH	Pulmoner arteriyel hipertansiyon
VKI	Vena kava inferior
SEM	Ortalamanın standart hatası
i.v.	İntravenöz
KCl	Potasyum klorür
LPS	Lipopolisakkarit
NE	Norepinefrin
ODQ	1H- [1,2,4] Oksadiazolo[4,3-a] kuinokalin-1
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
OAB	Ortalama arter basıncı
PE	Fenilefrin
sGC	Solubl guanilat siklaz
SNP	Sodyum nitroprusiyat
TNF- α	Tümör nekroz faktörü-alfa
KIM-1	Böbrek hasar molekülü-1
EDHF	Endotel bağımlı hiperpolarize faktör
PKG	Protein kinaz G
ABH	Akut böbrek hasarı
TXA₂	Tromboksan A ₂
OD	Optik Yoğunluk

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. Böbrek anatomisi

Şekil.2.2. Peroksinitrit oluşumu

Şekil.2.3. Nitrik oksit (NO) sentezi

Şekil.2.4. NO / sGC / cGMP yolağı

Şekil.2.5. Riosiguatın kimyasal yapısı

Şekil.2.6. Riosiguat etki mekanizması

Şekil 3.1. Deney protokolü

Şekil 3.2. Kan akımı ölçümünde kullanılan cihaz ve prob

Şekil 3.3. Böbrek perfüzyon değişimi ölçümünde kullanılan cihaz ve prob

Şekil 3.4. ELISA ölçümlerinde kullanılan spektrofotometre cihazı

Şekil 4.1. Hayvan vücut ağırlığı ölçümleri

Şekil 4.2. Renal arter kan akım hızı ölçümleri

Şekil 4.3. Renal arter kan akım hızının vücut ağırlığına oranlanarak yapılan ölçümler

Şekil 4.4. Kontrol (Sham) ve Rio gruplarında böbrek doku perfüzyonu ölçümleri

Şekil 4.5. İR ve İR-Rio gruplarında böbrek doku perfüzyonu ölçümleri

Şekil 4.6. İzole perfüze böbrek düzeneğinde böbrek bazal basınç düzeyleri ölçümü

Şekil 4.7A. İzole perfüze böbrek düzeneği böbrek damar yatağında tek doz fenilefrin (PE) kasılma yanıtları

Şekil 4.7B. İzole perfüze böbrek düzeneğinde böbrek ağırlığına oranlanmış tek doz fenilefrin (PE) yanıtları

Şekil 4.8. İzole perfüze böbrek düzeneği böbrek damar yatağında norepinefrin (NE) kasılma yanıtları

Şekil 4.9. İzole perfüze böbrek düzeneği böbrek damar yatağında tek doz anjiyotensin-II (AT-II) kasılma yanıtları

Şekil 4.10. İzole perfüze böbrek düzeneği böbrek damar yatağında asetilkolin (ACh) gevşeme yanıtları

Şekil 4.11. İzole perfüze böbrek düzeneği böbrek damar yatağında sodyum nitroprusiyat (SNP) gevşeme yanıtları

Şekil 4.12. Böbrek ağırlığı ölçümleri

Şekil 4.13. Standardize böbrek ağırlığı

Şekil 4.14. Sıçan serum örneklerinde ölçülen IL-1 β konsantrasyonu

Şekil 4.15. Sıçan serum örneklerinde ölçülen IL-10 konsantrasyonu

Şekil 4.16. Sıçan böbrek İskemi-Reperfüzyon (İ-R) hasarı deneysel modelinde oluşan böbrek hasarına riosiguatinin etkisi

Şekil 4.17. Sıçan böbrek İskemi-Reperfüzyon (İ-R) hasarı patolojik bulgularını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafları

TABLO DİZİNİ

Tablo 3.1. Gruplar ve deney protokolünde gruplara verilen ilaçlar

Tablo 3.2. Böbrek histopatolojik değerlendirme kriterleri

1. GİRİŞ

İskemi, organın bir kısmının ya da tamamının kanla beslenmesinin kesilmesine veya ciddi şekilde azalmasına bağlı olarak doku perfüzyonundaki yetersizlik sonucunda dokuların ve organların oksijenden yoksun kalması olarak tanımlanır. Reperfüzyon ise bu dokunun tekrar kanlanması durumudur. İ-R sonrasında doku ya da organlarda ortaya çıkan hasar ise İ-R hasarı olarak adlandırılmaktadır (1).

Renal İ-R, akut böbrek yetmezliğinin en yaygın nedenlerinden biridir. Artan morbidite, uzun süreli hastanede yatış ve artan mortalite ile ilişkili olan bu durum sağlık sistemi üzerinde önemli bir yük oluşturmaktadır (2).

İskemi, hücre içi adenosin trifosfat (ATP) konsantrasyonunu belirgin şekilde azaltır ve reperfüzyon sırasında oksidatif stres ve inflamasyonun artmasıyla daha da kötüleşen hücresel hasarı başlatır (3, 4). İ-R'yi takiben gelişen renal kan akımındaki azalma, mikrovasküler hasar, bozulmuş renal vasküler reaktivite ve inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu ve artan parankimal basınç nedeniyle ortaya çıkabilir (3, 5). Böbrek naklini takiben post-iskemik böbrek yetmezliği olan hastalarda ve çok sayıda deneysel çalışmada uzun süreli İ-R'yi (>45 dakika) takiben böbrek kan akımında sürekli azalmalar görülmektedir (6, 7). İskemi sonrasındaki renal kan akımındaki azalma, reperfüzyonu takiben renal doku hasarının uzamasında kritik bir süreç olarak rol oynayabilir. Bu hemodinamik değişikliklerin İ-R hasarı patogeneziindeki önemi göz önüne alındığında, renal kan akımı azalmasına katkıda bulunan araçların tedavide hedeflenmesi ABH için yeni tedavilerin geliştirilmesinde önemlidir.

NO/sGC/cGMP yolağı, renal ve vasküler fonksiyonların düzenlenmesi için ana basamaklardan biridir. Böbrekte İ-R'yi takiben nitroerjik sistemde bozulma, NO üretiminde azalma ve vasküler disfonksiyon gelişmektedir (8). İ-R hasarı sonucunda vazodilatör ve vazokonstriktör faktörler arasındaki denge bozulur (1). Ayrıca, renal İ-R hasarı sonucu böbrekte, proliferatif ve fibrotik tetikleyici sonuçlar ortaya çıkmaktadır (9).

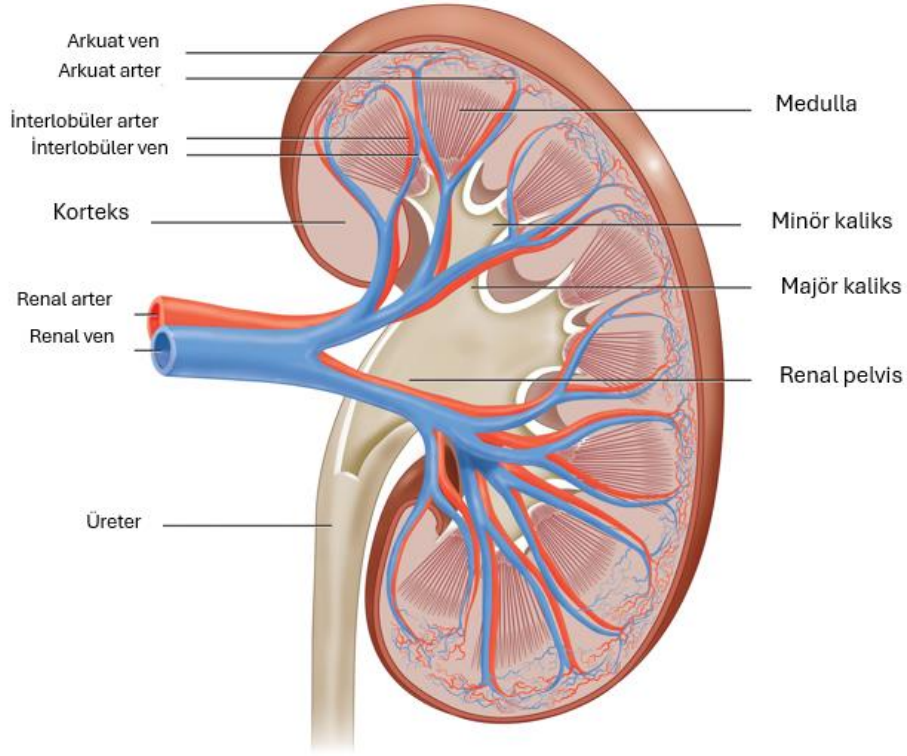
Riosiguat, sGC stimülatörü ilaçtır. Klinik değerlendirmeler sonucunda, riosiguat PAH ve kronik tromboembolik pulmoner hipertansiyon tedavisi için onay almıştır (10). Riosiguat, dual etki şekliyle NO'dan bağımsız olarak sGC'yi doğrudan uyarır ve NO-sGC bağlanmasını stabilize ederek sGC'yi endojen NO'ya duyarlı hale getirir (11). Bunun sonucunda gelişen vazodilatör etkilerinin yanı sıra, hücre dışı matriks üretimini inhibe ettiği ve fibrozisde azalma oluşturduğu gösterilmiştir (12). Riosiguatın antifibrotik, antiproliferatif ve antiinflamatuvar etkileri yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (13).

Riosiguat ile farklı organ ve dokularda yapılan İ-R hasarı çalışmalarında olumlu ve faydalı sonuçlar elde edilmiş (14-16), ayrıca bozulan vasküler tonusu iyileştirdiği (17) gösterilmiştir. Riosiguatın renovasküler patolojilerde de olumlu sonuçlar oluşturabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte riosiguatın böbrekte İ-R sırasında ve sonrasında gelişen akut hemodinamik ve vasküler değişiklikler üzerine olan etkileriyle ilgili detaylı bir araştırma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, riosiguat ön tedavisinin sıçan böbrek İ-R modelinde gelişen akut böbrek hasarında bozulan renal fonksiyonlara etkisi fonksiyonel, histopatolojik ve biyokimyasal açıdan değerlendirilerek ortaya konması hedeflenmiştir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Böbrek Anatomisi ve Fizyolojisi



Şekil 2.1. Böbrek anatomisi, (18) numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.

Renal sistem; iki böbrek, iki üreter, mesane ve üretradan oluşur. Böbrekler, karnın arka kısmında, vertebral kolonun her iki yanında yer alan boşaltım organlarıdır. Böbreklerin dış tarafta korteks ve iç tarafta medulla olmak üzere iki kısmı vardır. Böbreklere kan akışı renal arterler vasıtasıyla olur. Abdominal aortadan renal arter, böbrek parankimal lobları arasında dallanarak interlobar arterleri oluşturur ve bu arterler kortikomedüller bileşkeye kadar uzanarak arkuat arterleri oluşturur. İnterlobüler arterler afferent arteriyollere, oradan da glomerüler kılcal damarları oluştururlar. Bu kılcal damarlar glomerulustan efferent arterioller olarak çıkarlar. Böbrekler kalp debisinin yaklaşık %25'ini alır; renal kan akınının %85'i kortekste,

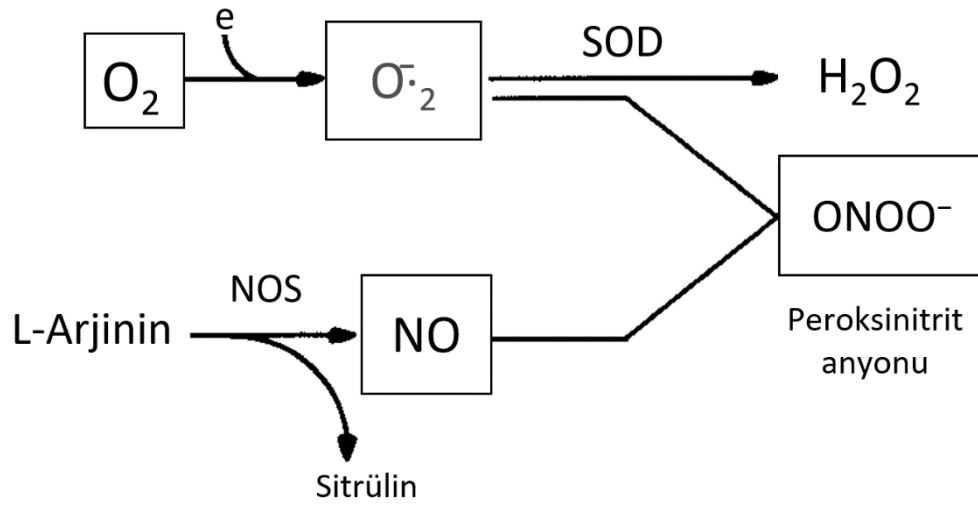
%14'ü dış medullada ve yalnızca %1'i iç medulladadır (19). Böbreklerde intrarenal kan akımı, 60 ila 100 mmHg arasındaki renal perfüzyon basınçlarında otomatik olarak düzenlenir (20). Genel olarak böbrekler kan akımından günde yaklaşık 200 litre sıvıyı filtreleyerek, gerekli maddeleri kanda tutarken toksinlerin, metabolik atık ürünlerin ve fazla iyonların atılmasına olanak tanır. Böbrekler, kandaki su, çözünen maddeler ve elektrolitlerin miktarını modüle ederek plazma ozmolaritesini düzenler (21).

2.2. İskemi-Reperfüzyon Hasarı

İskemi, bir organa gelen kan akımındaki kısıtlanma, reperfüzyon ise kan akımının restorasyonudur. Eşlik eden reoksijenasyon sonrasında gelişen patolojik durum İ-R hasarı olarak adlandırılır. Temel olarak, arteriyel kan akışının azalması ya da tamamen kesilmesi metabolik arz ve talep arasında ciddi bir dengesizliğe yol açarak doku hipoksisine neden olur. Dahası, kan akımının ve reoksijenasyonun yeniden sağlanması sıklıkla doku hasarının alevlenmesi ve reperfüzyon hasarı ile ilişkilidir (22). İ-R hasarı çok çeşitli durumlarda patolojiye katkıda bulunur. İskemi, anaerobik solunumu indükler ve hücre içi laktat ve asit birikimine neden olarak hücre içi pH'yi azaltır. Hücre içi azalan pH'yi düzeltmek için Na^+ / H^+ değişim pompasının aktivitesi artar. Hücre içinde artan Na^+ daha sonra hücre zarında bulunan $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ transport aktivitesinde artışa yol açarak hücre içi kalsiyum düzeylerini artırır (23). İskemi sırasında azalan oksijen, mitokondriyal fonksiyonları doğrudan etkiler. İ-R hasarı, mitokondriyal solunum zincirinde elektron taşınmasının inhibisyonuna ve ATP seviyelerinde azalmaya neden olur (24). Bu durum Na^+ / K^+ -ATPaz pompasının başta olmak üzere ATP'ye bağımlı enzimlerin işlevinde bozulmaya, membran depolarizasyonuna ve hücre içi aşırı Ca^{2+} birikimine yol açar. Reperfüzyon ile birlikte hücrede artan asidik ortam eski haline döner, hücre zarı boyunca proton gradiyenti artar ve sitozolik Ca^+ birikmesine neden olarak reaktif oksijen ürünleri (ROS) üretimine yol açar (25). Hücre içi sitozolik kalsiyum artışı, membran fosfolipitlerinin bozulmasına ve fosfolipazlar gibi kalsiyuma duyarlı birçok enzimin aktivasyonuna yol açar (26). Hücre içi pH'nin normale dönmesiyle oluşan bu sitozolik hiperkalsemi, mitokondriyal geçiş gözeneklerini, kalpainleri ve kalsiyuma bağımlı kinazları aktive ederek hücre yapısının

bozulmasına, inflamatuvar aktivasyonla ürik asit oluşumuna ve inflamatuvar sitokin oluşumuna yol açar (27, 28). Ayrıca, reperfüzyon hasarının kemotaksis ve endotelial adezyon faktörlerinin üretimini artırması sonucu olarak nötrofiller, CD4+ T lenfositler ve vasküler alanda dolaşan trombositler harekete geçer. Nötrofiller ROS, tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) ve lokal inflamatuvar mediyatörlerin üretimini uyararak doku hasarını şiddetlendirir (29). Ayrıca reoksijenasyon, dokuya sızan parankimal, endotelial ve lenfositik hücrelerdeki serbest oksijen radikallerinin miktarını da artırır. Süperoksit anyonları, mitokondriyal hasar sonucu nötrofiller, endotel hücreleri veya parankimal hücreler tarafından üretilir. Reoksijenasyon sonrası oluşan süreç, hücre hasarına yol açan serbest radikallerin birikmesine neden olur (30). Mikrovasküler sistemi oluşturan endotel hücreleri, İ-R'nin zararlı etkilerine karşı oldukça hassastır; bu duyarlılık, ROS üretiminde artış ve NO üretimindeki azalmanın aracılık ettiği bir süreçtir (31-34). İ-R hasarı sonucu mikrovasküler alanda geçirgenlikte bir artış meydana gelir ve sonuç olarak ödem oluşumuna ve interstisyel sıvı basıncında artışa yol açar. Ödem oluşumu, oksijen ve besinler için difüzyon mesafesini artırırken, doku basıncındaki artış mikrovasküler yapıları fiziksel olarak daraltarak kan akımının azalmasına neden olur (35). İ-R hasarı, bozulmaya katkıda bulunan endotelial genlerin (örn. adezyon molekülleri, sitokinler) ekspresyonunu artırırken koruyucu genlerin (örn. trombomodülin) ekspresyonunu baskılar (36). Vasküler endotel hemostazı, immün hücre trafiğini, vasküler geçirgenliği ve anjiyogenezi düzenler. Özellikle endotel doku perfüzyonunu kontrol etmek için damar tonüsünü düzenler (37). Endotel disfonksiyonu, büyük arterleri, dirençli damarları ve küçük damarları etkileyen sistemik bir patolojidir (38). İ-R hasarı sonucu meydana gelen endotelial hücre hasarı, vazokonstriktör ve vazodilatör faktörler arasındaki dengenin bozulmasına neden olur ve bunun sonucunda vasküler tonüs bozulur. Ayrıca İ-R hasarı sonrası pıhtılaşma ve kompleman sistemleri aşırı aktive olarak vasküler hasarı ve sonuçlarını daha da belirginleştirir (1). Ayrıca ROS üretimi, NO biyoyararlanımını azaltan bir mekanizma ile arteriollerde endotel bağımlı vazodilatasyonda iskemi sonrası oluşan hasara katkıda bulunur (39, 40). İskemi sonrası artan süperoksit anyonları, peroksinitrit üretmek için NO ile reaksiyona girer ve NO aracılı

vazodilatasyonu ortadan kaldırır (41-45). NO üretiminde bozulma sGC enzim aktivitesini azaltarak NO bağımlı gevşemeyi ortadan kaldırır. NO biyoyararlanımını azaltan bir neden de ROS üretimini tetikleyen güçlü bir vazokonstriktör ajan olan endotelinin endotel hücreleri tarafından üretilmesidir (43). Oksidatif hasara ek olarak selektinler, immüoglobülinler ve β 2-integrin gibi hücre adezyon moleküllerindeki artış, hasarlı endotelde immün hücre birikimine ve inflamasyonun şiddetlenmesine yol açarak reperfüzyon hasarını artırır (46).



Şekil 2.2. Peroksinitrit oluşumu.

İ-R hasarı vasküler endotel, hücrelerarası kompartmanlar, dolaşımdaki hücreler ve çok sayıda biyokimyasal parametrenin arasındaki etkileşimleri içeren karmaşık bir süreçtir (47). Antioksidan enzimlerden olan katalaz, süperoksit dismutaz ve glutasyon peroksidaz enzimlerindeki fonksiyon bozuklukları İ-R hasarının patofizyolojisine katkıda bulunur (48). İ-R hasarı, akut inflamasyonun temel belirteçlerinden olan nükleer faktör kappa-beta (NF- κ B; (49), TNF- α , IL-1 ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin düzeylerini artırırken, IL-10 gibi antiinflamatuvar sitokinlerin seviyesini azaltır (50). IL-10, IL-1 β ve TNF- α 'nın salgılanmasını inhibe ederek bu sitokinlerin meydana getirdiği inflamatuvar yanıtları baskılar (51).

İ-R hasarında apoptoz yolağının aktive olduğu gösterilmiştir (52). Hücre ölümünün önemli mekanizmalarından biri olan apoptoz, İ-R hasarının neden olduğu ABH

gelişiminin önemli bir nedenidir (53). Apoptozun önemli bir belirteci olan kaspaz-3 enziminin aktivasyonu, apoptozis kaskadının başlatılmasına yol açar (54). Kaspaz-3'ün önemli bir proteaz olduğu ve tek başına veya apoptozla ilişkili proteinlerle birlikte etki ederek hidrolizde rol oynayan önemli bir efektör madde olduğu kabul edilmektedir (55). Ayrıca reperfüzyonu takiben, hidrojen peroksit ve süperoksit gibi oksidan ürünler, kaspaz enzimleri yoluyla endotel hücre apoptozunu indükleyerek vasküler hasarın etkisini artırır (56). Sonuçta oksidan hasarın ve apoptozun neden olduğu endotel fonksiyon bozukluğu ve dokuya gelen kan akımında azalma, İ-R ilişkili organ hasarına yol açar (57).

2.3. İ-R Hasarının Organlardaki Etkileri

İ-R hasarı, felç, kanama ve travma gibi birçok patofizyolojik sürece katkıda bulunur. Reperfüzyon hasarı özellikle organ nakli, koroner arter revaskülarizasyonu ve periferik vasküler hastalıkların medikal ve cerrahi tedavileri sonrası görülür ve organ fonksiyonlarındaki iyileşmeyi etkiler (58). Organlar İ-R hasarına karşı değişken derecede duyarlıdır. İ-R hasarına en duyarlı organların başında beyin, kalp ve böbrek gibi hayati öneme sahip organlar gelmektedir. İ-R hasarı lokal etkiler haricinde sistemik inflamasyonu indükleyerek vasküler fonksiyon bozukluğuna ve yaygın organ disfonksiyonuna yol açabilir (59).

Kalpte meydana gelen İ-R hasarı, glikojen depolarının tükenmesine, nükleer kromatin kondensasyonu, mitokondriyal şişme ve sarkolemmal kırılmalar gibi hücre yapısında bozulmalarla karakterize ilerleyici ve geri dönüşü olmayan hasara neden olur. Sonuç olarak miyokard enfarktüsüne (MI) yol açar (60). Beyin dokusunda serebral arterlerde gelişen oklüzyon sonucu etkilenen bölgede iskemik değişiklikler başlar ve dokunun yeniden kanlanması sonucu reperfüzyon hasarı meydana gelir. Reperfüzyon hasarı sonucu, kan beyin bariyerinde bozulma, oksidatif strese artış ve trombosit agregasyonunda artış meydana gelir. Bu durum özellikle vasküler bütünlüğün bozulmasına ve damarın beslediği bölgenin nekroza uğramasına yol açar (61). Yapılan bir çalışmada, beyinde İ-R hasarı sonrası kan beyin bariyerinin 144 hastadan 33'ünde bozulduğu manyetik rezonans görüntülemesi (MRG) ile

gösterilmiştir. Ayrıca etkilenen bölgede fokal nekrotik odaklar ve hücresel şişme de saptanmıştır (62).

Akciğer dokusunda özellikle cerrahi sonrası akut dönemde gelişen trombotik komplikasyonlar vasküler yapılarda tıkanmaya yol açar. Pulmoner damarlarda meydana gelen oklüzyon akciğer İ-R hasarına yol açarak mikrovasküler yapılarda hasara ve ventilasyonda bozulmaya yol açar (26). Karaciğerde İ-R hasarı, karaciğer naklindeki başarısızlığın önemli bir nedenidir (63). Yapılan bir çalışmada, karaciğer İ-R hasarı modelinde sinüzoidlerde ve portal ven çevresinde konjesyon ve hepatositlerde dejenerasyon saptanmıştır (64).

2.4. Renal İ-R Hasarı

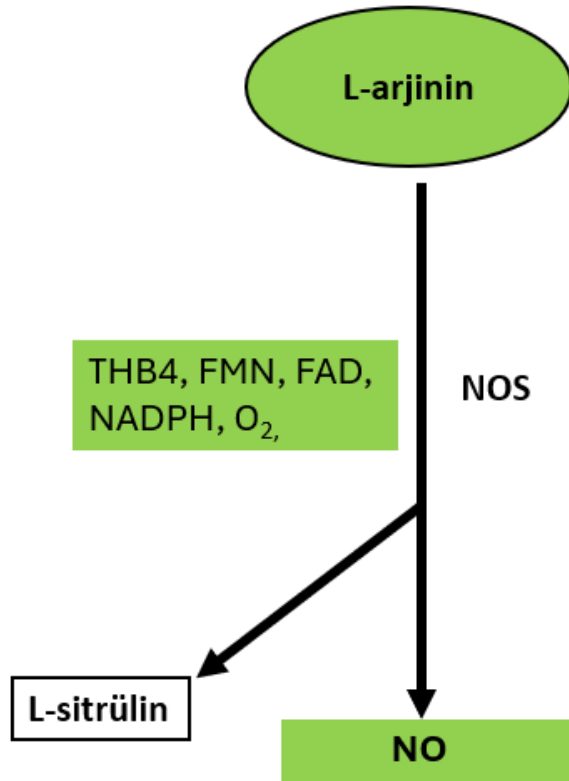
ABH, esas olarak renal sistemde kan akımındaki azalmaya bağlı olarak ortaya çıkan ve sonuç olarak böbrek oksijenasyonunda azalmaya yol açan patolojik bir durumdur. Ayrıca ABH, glomerüler filtrasyon hızında (GFR) ve böbrek çıkışında da azalmaya yol açarak morbidite ve mortalite oranını artırır. ABH tedavi edilmediği takdirde kronik böbrek hastalığına ilerlemektedir. ABH'nin önemli nedenlerinden biri İ-R hasarıdır (65, 66). Böbrekler, yüksek metabolizması ve vasküler anatomisi nedeniyle İ-R hasarına karşı oldukça hassastır (67). Renal İ-R hasarının patofizyolojisinde, temel olarak inflamasyon artışı rol oynamaktadır. Renal İ-R hasarında böbrek fonksiyonlarında bozulmaya yol açan kemokinler, IL-6, TNF- α , adezyon molekülleri ve lökosit infiltrasyonu inflamasyonu oluşturan temel faktörlerdir (68). İ-R hasarının reperfüzyon fazı sırasında restore edilen kan akımı, üretilen serbest radikalleri olay yerine getirir ve doku hasarının temeli olan lipid peroksidasyonuna yol açar (69). Serbest radikallerin oluşumu, membran lipidlerinin peroksidasyonu yoluyla böbrek dokusu hasarına sebebiyet verir ve proteinlerde ve deoksiribonükleik asit (DNA) de oksidatif hasara, apoptoz ve hücre ölümüne katkıda bulunur (70). Ayrıca İ-R hasarı, renal vasküler disfonksiyona ve kan akımında bozulmaya yol açarak başlangıçtaki renal hasarı daha da arttırır (71).

Renal İ-R hasarı sonrası, yaygın tübüler nekroz, fırçamsı hücrelerde kayıp ve kortikomedüller bileşkede dilatasyon gösterilmiştir. Elektron mikroskopu kullanılarak yapılan morfolojik çalışmalar, belirli derecede fırçamsı hücrelerde sınır kaybı, bleb oluşumu, sitoplazmik vakuolizasyon, hücresel nekroz, mitokondriyal kayıp, çekirdeklerin çevresinde kromatin yoğunlaşması, nükleer parçalanma, tübüler epitel hücrelerinde dökülme ve tübül lümenlerinde tıkanma gibi birçok yapısal bozulmaları göstermiştir (42). İskemi temel olarak, tübül epitel hücrelerinin yapı ve fonksiyonunu etkiler (72). Renal İ-R hasarında, özellikle proksimal epitel hücrelerinin dökülmesi sonucu lümen tıkanır ve intratübüler basınç artarak filtratın geri sızmasına ve iyon geri emiliminin bozulmasına neden olur (73). Tübüler tıkanıklık aynı zamanda reperfüzyon sonrasında GFR'nin azalmasına da katkıda bulunur. Ayrıca hasarlı proksimal tübüller de sodyum geri emilimi bozulacak ve maküla densa'nın yüksek solüt seviyelerini

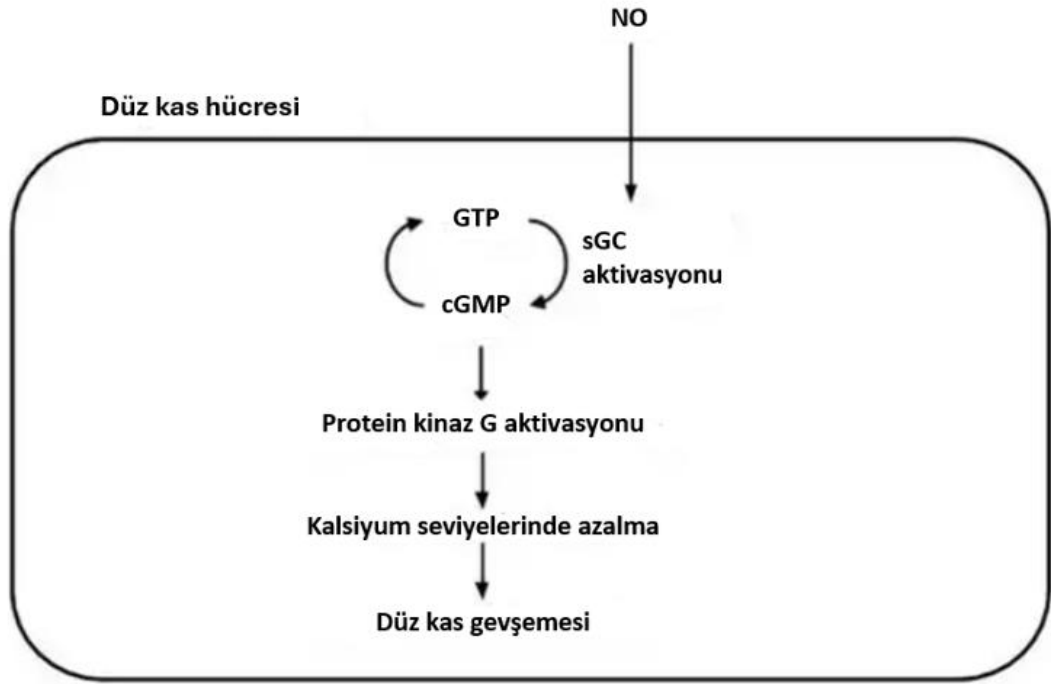
algılamasına ve tübülo-glomerüler feedback mekanizmayı tetiklemesine neden olacaktır. Artan feedback mekanizma sonucu GFR'yi azaltan glomerüler arteriyel daralma daha da belirginleşecek (74) ve ilerleyen dönemde, epitel hücre nekrozu gelişecektir (72). Ayrıca renal İ-R hasarı, trombosit agregasyonunu ve aktivasyonunu uyarak pıhtılaşmayı artırır (75). Artan koagülan etki, damarlarda daralma ve GFR'de meydana gelen azalmaya katkıda bulunur (76). Ayrıca, İ-R hasarı sonucu vasküler endotel de meydana gelen yapısal değişimler inflamatuvar yanıtı (77) ve vazokonstriktör maddelerin (trombosit kaynaklı büyüme faktörü-B ve endotelin-1) üretimini uyarak vazokonstriksiyonu artırabilir (78). İ-R hasarı sonucu bozulan vasküler yapılar, AT-II, tromboksan A2 (TXA₂), prostaglandin H₂, lökotrien C₄ ve adenozin gibi birçok endojen vazokonstriktör mediyatörlere karşı artan reaktivite sergileyebilir (79). Hasara ikincil gelişen değişiklikler sonucu kapiller yoğunluk azalır ve bu durum böbreklerde geri dönüşümsüz fonksiyon bozukluğuna ve fibrozise sebep olur (80). İntrarenal kılcal damarların azalması nedeniyle bozulan böbrek perfüzyonu, tübüler hasarı şiddetlendirerek doku hipoksisini daha da derinleştirebilir. Sonuç olarak, renal vasküler sistemdeki bu bozulma, geri dönüşümsüz fibrozise yol açar (81). Vasküler endotel, vasküler geçirgenliği düzenleyen ayrıca vazomotor, inflamatuvar ve hemostatik yanıtları modüle eden fonksiyonel bir yapıdır. Renal İ-R hasarı sonrasında, endotel hücre fonksiyonlarının bozulması böbrek perfüzyonunun bozulmasına dahası böbrek hipoksisinin devam etmesine ve bunu takip eden epitel hücre hasarına yol açar. Sonuç olarak, GFR azalır ve ABH meydana gelir (5). Yapılan farklı çalışmalarda, uzun süreli İ-R (>45 dakika) sonrası, böbrek transplantasyonunu takiben iskemik böbrek yetmezliği olanlarda böbrek kan akımında azalma gösterilmiştir (6, 7). Yapılan bir çalışmada kısa süreli iskemide kortikal ve iç medüller kan akımı reperfüzyon sonrası tamamen düzelirken dış medüller kan akımı tamamıyla eski haline dönemediği gösterilmiştir. İskemi sonrası dış medüller kan akımındaki düşüş, reperfüzyon sonrası gelişen renal doku hasarının uzamasına neden olabilir (82-84). Yapılan sıçan böbrek İ-R hasarı çalışmalarında, İ-R hasarının patogenezinde uzun süreli iskemi sonrası medüller kan akımındaki azalmanın önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada, reperfüzyondan bir saat sonra floresan prob

kullanılarak ölçülen medüller plazma kan akımında belirgin bir azalma olduğu gösterilmiştir (82). Farklı bir çalışmada, reperfüzyonu takiben dış medüller kan akımında belirgin ve devamlılık gösteren azalmalar lazer doppler flowmetre ölçümleriyle gösterilmiştir (85).

2.5. NO, sGC ve cGMP Yolağı



Şekil 2.3. Nitrik Oksit (NO) sentezi.



Şekil 2.4. NO /sGC /cGMP yolağı.

NO, çok sayıda moleküler hedefi olan önemli bir haberci moleküldür. NO, nörotransmisyon, vasküler tonüs, gen transkripsiyonunu, mesajcı ribonükleik asit (mRNA) translasyonunu ve proteinlerin posttranslasyonel modifikasyonları gibi düzenleyici fonksiyonları kontrol eder. NO, L-arjininden L-sitrülin dönüşümü sırasında NO sentaz (NOS) enzimi tarafından üretilir. Bu enzimatik reaksiyonda kofaktör olarak tetrahydrobiopterin (BH4), flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN), Ca^{2+} / kalmodulin ve NADPH kullanılır (Şekil 1.2; (86, 87). NOS enzimleri 3 izoformdur bunlar; nöronal 'n'NOS (veya NOS I), indüklenebilir 'i'NOS (veya NOS II) ve endotelial 'e'NOS (veya NOS III) olarak adlandırılır (88). Guanilat siklaz (GC), bir α -alt birimi ve bir β -alt birimi olan heterodimer hem proteindir. β -alt birimi, guanozin-5'-trifosfatın (GTP) cGMP ve pirofosfata dönüşümünü katalize eden demirli hem grubu içerir. GC enziminin membrana bağlı ve sitozolik (solubl) formları bulunur (89). sGC bir sensör modülü, bir dönüştürücü modül ve bir katalitik modülden oluşan allosterik olarak aktive edilen bir enzimdir (17). NO'nun sGC enzimi sensör modülüne

bağlanması, enzimin β -alt ünitesinde demirli hem (Fe^{2+}) kısmının varlığında gerçekleşir. Sensör modülüne bağlanma sonrası dönüştürücü modüle iletilen ve aktive olması için allosterik olarak katalitik modüle aktarılan bir konformasyonel değişiklik meydana gelir. Bunların sonucunda, GTP bağlanma bölgesini ve cGMP'yi üretir (89). cGMP sinyal iletiminin net etkisi, vasküler düz kaslarda hücre içi kalsiyumun azalması ve kontraktıl proteinlerin kalsiyuma olan duyarlılığında azalma sonucu gelişen vasküler gevşemedir (90). NO-sGC-cGMP sinyal yolağı, metabolik fonksiyonlar, kardiyovasküler, renal ve santral sinir sistemleri üzerinde düzenleyici etkilere sahiptir (91). nNOS, beyindeki spesifik nöronlarda, spinal kordda, sempatik gangliyonlarda ve adrenal medullada bulunur (88). nNOS'un öğrenme, hafıza, nörogenез (92) ve kan basıncının santral etkiyle düzenlenmesi (93) gibi fizyolojik fonksiyonların modüle edilmesinde rol oynadığı gösterilmiştir. Artmış nNOS sinyalinin inme sonrası eksitotoksisite, multipl skleroz, Alzheimer ve Parkinson hastalıkları gibi çeşitli nörodejeneratif patolojilere katkıda bulunduğu gösterilmiştir (94). iNOS genellikle hücrelerde eksprese edilmeyen, ekspresyonu bakteriyel lipopolisakaritler ve sitokinler tarafından uyarılan NOS izoformudur (95). Makrofajlar ve nötrofiller tarafından üretilen yüksek NO seviyeleri, sadece bakteriler, parazitler veya tümör hücreleri için toksik olmakla kalmaz, aynı zamanda sağlıklı hücrelere de zarar verebilir. Septik şok gelişiminde iNOS önemli rol oynamaktadır. Ayrıca septik şok kliniğinde görülen kan basıncı düşüşü ağırlıklı olarak iNOS'un neden olduğu aşırı NO üretiminden kaynaklanmaktadır (96). Bir diğer izoform olan eNOS, çoğunlukla endotel hücrelerde eksprese edilir. Ayrıca kardiyak miyositlerde, trombositlerde, beyin bazı nöronlarında, insan plasentasındaki sinsityotrofoblastlarda da gösterilmiştir (95). eNOS aktivitesi transkripsiyonel ve translasyon sonrası düzenlemelerle kontrol edilir. eNOS transkripsiyonu, endotel sürtünme gerilimi, hidrojen peroksit gibi oksidan ajanlardan, oksitlenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve hipoksi tarafından güçlendirilir (97). Prostaglandinler, adenosin, ATP'ye duyarlı potasyum kanalı aktivatörleri ve endotel kaynaklı hiperpolarizasyon faktörleri vasküler tonüsü etkilerken, endotele bağımlı vazodilatasyon büyük ölçüde NO'nun bir fonksiyonudur (98). eNOS, asetilkolin uyarısı sonucu vazodilatör yanıtı aracılık eden ve vasküler

yatakta artan sürtünme stresi ile oluşan NO'nun ana kaynağıdır (87). eNOS çok sayıda temel kardiyovasküler ve renovasküler fonksiyonun homeostatik düzenleyicisi olarak görev alır. eNOS kaynaklı NO, sGC'yi uyarıp vasküler düz kas hücrelerinde cGMP'yi artırarak arterlerde gevşemeye yol açar (99). Vasküler gevşeme etkilerine ek olarak, trombosit aktivasyonunu, agregasyonunu ve adezyonunu azaltarak pıhtılaşmayı engeller (100, 101). Ayrıca NO'nun fibrozisi, mitogenezi ve vasküler düz kas proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (102).

2.6. İ-R Hasarında NO ve sGC'nin Rolü

İ-R hasarı artmış vasküler geçirgenlik, endotelial hücre hasarı, pıhtılaşma ve kompleman sistemlerinin aşırı aktivasyonu, vazokonstriktör ve vazodilatör faktörler arasındaki dengenin bozulması ile karakterize patolojik bir durumdur (1). İ-R hasarı, özellikle inme, MI, akut böbrek hastalığı, kanama ve periferik damar hastalığı gibi klinik patolojilerde sıklıkla görülmektedir (103). Örneğin kalp gibi tek bir organın İ-R hasarına maruz kalması, böbrek gibi diğer organlarda da inflamatuvar aktivasyona neden olarak çoklu organ yetmezliğine yol açabilir (104). NO / sGC / cGMP yolağındaki hasar veya inhibisyon esas olarak kardiyovasküler ve renal sistemler olmak üzere birçok organ sistemi patogenezinde rol oynar (15). Vazomotor tonüs, eNOS kaynaklı NO'dan güçlü bir şekilde etkilenir. NO, vaza rekta kılcal damarlarında gevşemeyi artırarak ve vazokonstriktörlerin etkilerini azaltarak renal medüller perfüzyonun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (105-107). Bu açıdan NO'nun renal İ-R hasarı üzerinde yararlı bir etkiye sahip olması beklenebilir. Ancak iskemiye yanıt olarak üretilen NO, süperoksit ile birleşerek peroksinitrit üretebilir, bu durum oksidatif stresin artmasına ve böbrek hasarının alevlenmesine neden olur (4, 108). Bu nedenle, NO'nun renal İ-R hasarındaki etkisi, özellikle iskemiye takiben aktive edilen NOS enziminin tipi dahil olmak üzere birçok faktöre bağlıdır. Azalmış eNOS fonksiyonu, İ-R hasarı ile ilişkili endotel disfonksiyonunun ayırt edici özelliklerinden biridir. Reperfüzyondan sonra daha yüksek eNOS ekspresyon seviyeleri, artan iyileşme ile bağlantılı olduğu ve iskemi sonrası artan eNOS aktivitesinin de böbrekleri İ-R hasarından koruduğu gösterilmiştir. eNOS'un renal İ-R hasarında önemli bir rolü

olduğu ortaya konmuştur (71). Özellikle, İ-R hasarı sonucu inflamatuvar yanıtın iki ana ürünü olan NO ve süperoksitin reaksiyonuyla oluşan peroksinitrit, eNOS'da bozulmaya ve NO üretiminde azalmaya neden olarak vasküler fonksiyon bozukluğuna yol açar (109). L-arginin ve BH₄'ün süperoksit ve hidrojen peroksit radikalleri tarafından tüketilmesiyle eNOS enziminde kenetsizleşme meydana gelebilir. Ayrıca kenetsizleşen eNOS, NO yerine serbest radikal olan peroksinitrit üretimini artırarak endotel fonksiyonundaki bozulmayı artırır (110).

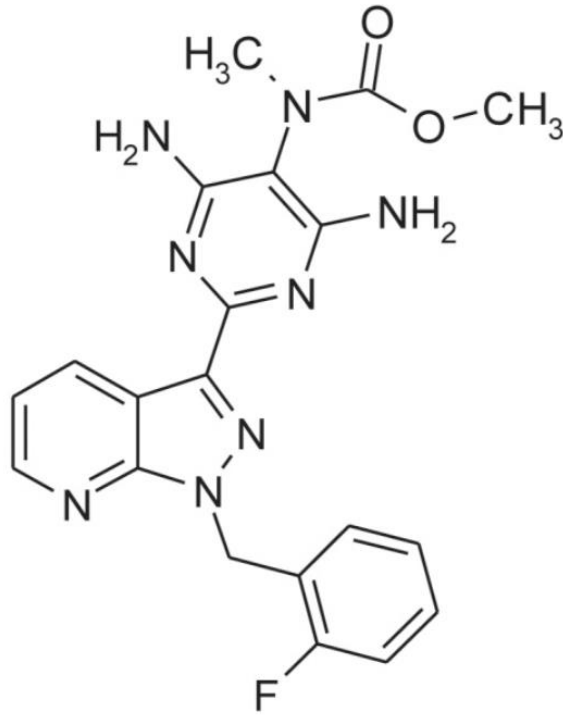
ABH, günümüzde %30 ila %70 arasında değişen yüksek mortaliteden dolayı klinik öneme sahip patolojik bir durumdur. ABH gelişiminde etiyolojide birçok neden olmakla birlikte en önemlisi İ-R hasarıdır (111). ABH, GFR'de hızlı azalma ve nitrojen metabolizmasının son ürünleri olan üre ve kreatinin artışıyla karakterize yüksek morbidite ve mortaliteye sahip tedavi seçenekleri sınırlı olan klinik bir durumdur (112). NO / sGC / cGMP sinyal yolağı, böbrek kan akımı ve glomerüler hemodinaminin düzenlenmesinin yanı sıra tübüler sistemde su ve tuz taşınması dahil birçok temel böbrek fonksiyonunun düzenlenmesinde görev alır (8). Sıçanlarda yapılan bir obstrüktif renal İ-R modelinde, kontrol hayvanlarına kıyasla NOS inhibitörü L-arginin metil ester (L-NAME) kullanımıyla böbrek dokusunda fibrozis ve apoptozisde artış bulunurken renal arter kan akım hızında ve GFR'de azalma tespit edildiği gösterilmiştir (113). Sıçanlarda yapılan farklı bir çalışmada, L-NAME uygulaması ile ortalama arter basıncında (OAB) artış ve renal kan akım hızında azalma gözlenmiştir. NO inhibisyonu sonucu oluşan hemodinamik etkilerin, sGC aktivasyonu ile düzeltildiği, sonuç olarak NO fonksiyonunun cGMP yolağı üzerinden etki gösterdiği belirtilmiştir (114). sGC enziminde bulunan hem grubunun (Fe²⁺ → Fe³⁺) oksidasyonu, İ-R hasarına bağlı oksidatif stresten kaynaklanabilir. sGC enziminin hem grubundaki ayrışma, enzimin NO'ya bağlanma kabiliyetini ortadan kaldırır ve etkisiz hale getirir (115). Yapılan bir çalışmada, NO ve cGMP eksikliğinin hemodinamik fonksiyonlarda bozulma ve fibrotik etkiler yoluyla böbrek hasarının ilerlemesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca, NO'nun böbrek fonksiyonu, renal interstisyel hasar ve renal tübüler apoptoz üzerindeki koruyucu rolünü ortaya koymaktadır (113).

2.7. sGC Stimülatörlerinin Tanımı ve Etkileri

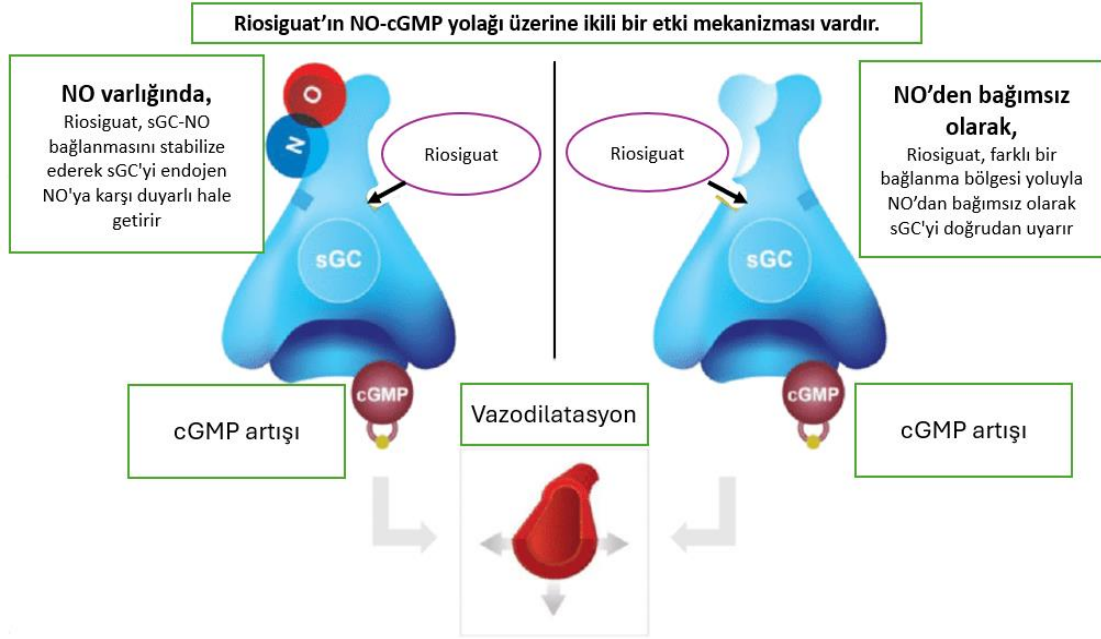
sGC enzimi, α ve β alt birimlerden oluşan ve GTP'den cGMP oluşumunu katalizleyen bir heterodimerik komplekstir. sGC'nin β -alt ünitesindeki prostetik hem kısmı, NO bağlanması ve enzim aktivasyonu için gereklidir (116). sGC, NO sinyal yolunun önemli bir enzimidir (117). sGC stimülatörleri dual etki gösterirler. Hem NO'dan bağımsız olarak doğrudan enzimi uyarırlar (8) hem de NO-sGC bağlanmasını stabilize ederek enzimi aktif konfigürasyonda tutarak sGC'yi düşük NO seviyelerine karşı daha duyarlı hale getirirler (118). sGC stimülatörlerinin, sGC'ye bağlanması ve aktive etmesi için, indirgenmiş ferröz demir varlığı gereklidir. sGC stimülatörleri NO ile güçlü bir sinerjistik etkiye sahiptir dolayısıyla sGC'yi endojen olarak NO üretmeye de duyarlı hale getirirler (119). sGC stimülatörlerinin etkileri, hipertansif nefropati, tek taraflı üreter tıkanıklığı, diyabetik nefropati ve akut glomerüler nefrit dahil olmak üzere çeşitli böbrek hastalığı modellerinde test edilmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda sGC stimülatörlerinin, proteinüriyi ve albüminüriyi azalttığı, ayrıca histopatolojik ve moleküler çalışmalarda renal glomerüloskleroz ve renal fibrozis belirteçlerinde iyileşme sağladığı gösterilmiştir (15, 120-122). Yapılan hayvan deneylerinde, sGC stimülatörlerinin kalp ve böbrek üzerine koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Sıçanlarda oluşturulan obstrüktif renal İ-R hasarı modelinde, tek taraflı üretral obstrüksiyon sonrasında uygulanan sGC stimülatör tedavisinin cGMP üretimini arttırdığı bulunmuştur. Ayrıca tübülointerstisyel hasar ve inflamasyonun yanı sıra tübüler atrofiyi ve apoptozu azalttığı gösterilmiştir (123). Yapılan hayvan deneyi çalışmalarında, sGC stimülatörü ilaçların pulmoner hipertansiyon ve akut dekompanse kalp yetmezliği modellerinde pulmoner vasküler hemodinamiyi iyileştirdiği gösterilmiştir (124-127). Literatürde yapılan sıçan glomerülo nefrit ve glomerüloskleroz modellerinde, sGC stimülatörlerinin antiproliferatif, antifibrotik ve antihipertansif etkileri gösterilmiştir (128, 129). sGC stimülatörleri ilaçlar BAY 41-2272, BAY 41-8543, BAY 60-4552, riosiguat ve verisiguattır (130). Yapılan bir Faz III klinik çalışmada, azalmış sol ventriküler ejeksiyon fraksiyonuna sahip kalp yetmezlikli 5000'den fazla hasta, günlük oral verisiguat veya plasebo ile tedavi edildi. Verisiguatın mortaliteyi ve kalp yetmezliği nedeniyle hastaneye yatış oranını azalttığı gösterildi. Bu

faz III çalışma sonucunda verisiguatın, düşük ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetmezliği tedavisinde kullanımı onaylandı (131, 132). Yapılan bir çalışmada, sinasiguatın kronik böbrek hastalığı hayvan modelinde kreatinin klerensini, glomerüloskleroza ve intrarenal arterlerde perivasküler fibrozisi düzelterek böbrek fonksiyonunu iyileştirdiği gösterilmiştir (133).

2.8.Riosiguat



Şekil.2.5. Riosiguatın kimyasal yapısı.



Şekil.2.6. Riosiguat etki mekanizması, (134) numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.

Riosiguat kimyasal olarak metil 4,6-diamino-2-[1-(2-florobenzil)-1H-pirazolo [3,4-b]piridin-3-yl]-5-pirimidinil (metil) karbamattır (Şekil.2.5.). Molekül $C_{20}H_{19}FN_8O_2$ formülü ve molekül ağırlığı 422,42 dir. Riosiguat hayvan deneylerinden kontrollü klinik çalışmalara başarılı geçiş yapan ilk sGC stimülatörüdür (135). Riosiguat yaklaşık %94'lük mutlak oral biyoyararlanıma sahiptir (136). Oral alımdan yaklaşık 1,5 saat sonra doruk plazma konsantrasyonlarına ulaşır. Riosiguat vücutta yaygın bir şekilde dağılmamaktadır. Dağılım hacmi hem sağlıklı bireylerde hem de pulmoner hipertansiyonu olan hastalarda yaklaşık 30 L'dir. Riosiguat, esas olarak serum albümini ve α 1-asidik glikoprotein olmak üzere insan plazma proteinlerine yaklaşık %95 oranında bağlanır. Riosiguat metabolizmasında çeşitli sitokrom P450 (CYP) enzimleri rol oynar (CYP1A1, CYP3A4/5, CYP2C8 ve CYP2J2), ancak ana aktif metabolit M1'in oluşumu büyük ölçüde CYP1A1 tarafından katalize edilir.

Yarı ömrü yaklaşık 7 saattir. Eliminasyonu büyük ölçüde metabolitler halinde idrarla (% 40) ve dışkıyla (% 53) gerçekleşir. Hepatik metabolizma ve renal eliminasyona uğramasına rağmen, yapılan çalışmalar hepatik veya renal yetmezlik durumlarında doz ayarlaması gerektirmediğini göstermektedir (137). Ayrıca,

riosiguatın ana CYP izoformları ve taşıyıcı proteinler üzerinde terapötik dozlarda etkisinin olmaması nedeniyle ilaç etkileşimleri açısından düşük bir riske sahiptir (138). Riosiguat, sGC'nin aktivitesini *in vitro* olarak tek başına 73 kata kadar artırır ve NO ile sinerjistik olarak çalışarak sGC aktivitesini 122 kata kadar artırabilir (139). Klinik çalışmalar sonucunda, riosiguat PAH ve kronik tromboembolik pulmoner hipertansiyon tedavisi için onay almıştır. Riosiguatın, PAH hastalarında egzersiz kapasitesini önemli ölçüde iyileştirdiği pulmoner arter rezistansını ve kardiyak kan çıkışını anlamlı ölçüde azalttığı gösterilmiştir (140). sGC stimülatörlerinden BAY 41-2272 ve BAY 41-8543, sıçanlarda metabolik instabilite ve düşük oral biyoyararlanım sergilemiş ayrıca BAY 41-2272, CYP enzimlerini güçlü şekilde inhibe ve aktive ettiği gösterilmiştir. Riosiguat (BAY 63-2521) diğer sGC stimülatörlerinin aksine CYP enzimleri ile etkileşime girmemesi ve oral biyoyararlanımının daha iyi olması sebebiyle oldukça iyi farmakokinetik profil sergilemiştir (141). Bu özelliklerden dolayı klinik kullanımda ilk onay alan sGC stimülatörü ilaç olmuştur (142). Riosiguat, farelerde bleomisin ile oluşturulan pulmoner hipertansiyon (PH) modelinde, sağ ventrikül hipertrofisini, pulmoner inflamasyonu ve fibrozisi, sildenafil tedavisine göre anlamlı ölçüde azaltmıştır. Ayrıca riosiguatın, fare kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) modelinde PH'yi, sağ ventrikül hipertrofisini ve vasküler hasarı azalttığı gösterilmiştir (16). Yüksek tuzlu diyetle beslenen tuza duyarlı sıçanlarda yapılan HT modelinde, riosiguat ile tedavi edilen grupta sağkalım oranının arttığı bulunmuş ayrıca sistemik hipertansiyon ve sistolik fonksiyon bozukluğuna bağlı parametrelerde düzelme saptanmıştır. Kalp ve böbreklerde fibrotik doku oluşumunda azalma ve vasküler disfonksiyonda iyileşme gösterilmiştir (119).

2.9. Hipotez

Riosigvat ön tedavisinin sıçan böbrek İ-R modelinde akut dönemde bozulan renovasküler parametreler, böbrek damar yatağı fonksiyonel cevapları, böbrek histopatolojisi üzerine olumlu etkileri vardır.

2.10. Amaç

Bu çalışmanın amacı, böbrek İ-R hasarı ile böbrekte meydana gelen akut ve kronik bir dizi süreç sonucu böbrek yetmezliği gibi çok ciddi bir mortalite sebebi olan ve tedavisi için pek çok çalışma yapılan bir durumda riosigvat ön tedavisinin böbrek İ-R'nin akut dönemindeki fonksiyonel, biyokimyasal ve histopatolojik değişiklikler üzerine olan etkilerini değerlendirmektir.

3.YÖNTEMLER

3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada 200-300 gram (g) ağırlığında 60 adet Sprague–Dawley erkek sıçan kullanılmıştır. Hormon düzeylerinde görülebilecek farklılıklar olabileceğinden erkek sıçanlar tercih edilmiştir. Deney hayvanları Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edilerek Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda bulunan hayvan barınağına getirilerek deney süresi boyunca uygun koşullarda barındırılmıştır. Hayvanlar 18-21°C sıcaklıkta, nem aralığı %50-60'da tutularak, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık olacak şekilde koşulların sağlandığı ortamda, tüm deney süresince *ad libitum* standart laboratuvar yemi ile su ihtiyaçları karşılanarak barınmaları sağlanmıştır. Hayvanlar barınağa geldikten sonra ortama alışana kadar en az 5 gün işlem yapılmamıştır.

3.2. Etik Kurul İzni

Projenin etik kurul izni Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu'nun 24.01.2023 tarihli etik kurul toplantısında 2023 / 01-04 karar numaralı, 52338575-08 sayılı ve 2023 / 04 kayıt numaralı onayı ile alınmıştır. Alınan bu onay doğrultusunda hayvan deneyleleri Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında, histopatolojik değerlendirmeler ise Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında yapılmıştır.

3.3. Deney Protokolü, Cerrahi Uygulamalar ve Kullanılan İlaçlar

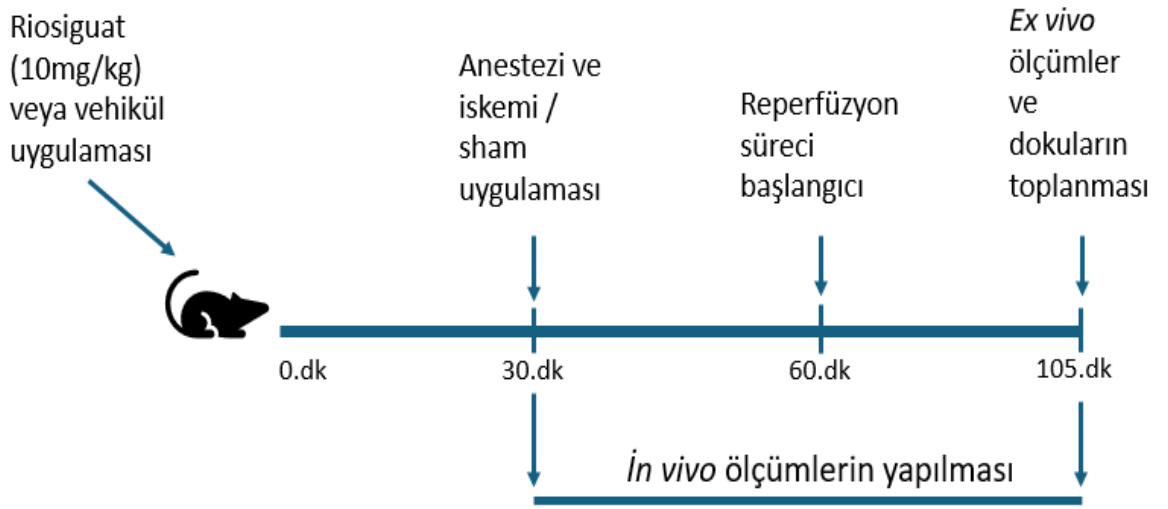
Bu çalışma için Sham-Kontrol (Sham), İskemi-Reperfüzyon (İR), İ-R+Riosiguat (İR-Rio) ve Riosiguat (Rio) olmak üzere dört deney grubu oluşturuldu. Deney protokolü iki tekrardan oluşacak şekilde, birinci tekrar da fonksiyonel çalışmaların yapılması için dokuların çıkarılması, ikinci tekrar da ise histopatolojik ve biyokimyasal çalışmaların yapılması için dokuların toplanması planlandı. Anestezi öncesi tüm hayvanların ağırlıkları tartılarak kaydedildi.

Cerrahi işlemden 30 dakika önce sıçanlara gruplarına göre riosiguat (10 mg kg^{-1}) veya vehikülü olan %1'lik karboksimetil selülöz (CMC) oral gavaj yoluyla uygulandı. Riosiguat (10 mg kg^{-1}) 1 mL %1'lik CMC içinde çözülerek uygulandı. Gruplarda oral gavaj yoluyla hangi ilacın uygulandığı tablo 3.1'de gösterilmiştir. Deneylerde kullanılan ilaç dozu ve vehikül için literatürdeki benzer çalışmalar kaynak olarak kullanıldı (143, 144). Oral gavaj uygulamasından 30 dakika sonra, kloralhidrat (400 mg kg^{-1} , i.p.) ile anestezi uygulandı. Anestezi derinliği parmak veya deri kıstırmaya yanıt ile değerlendirilerek cerrahi işleme başlandı. Umblikusun 1 cm altından, ksifoid–pubis hattı boyunca orta hat insizyonu ile karın boşluğuna girildi. Bağırsaklar orta hattın sağ tarafına alınıp abdomen açılarak sol renal arter, ven ve böbrek çevre dokulardan izole edildi. İR ve İR-Rio gruplarında, 30 dakika boyunca avasküler klemp ile sol renal arter ve ven sıkıştırılarak kan akışı kesildi. İskemi periyodu sonrası klemp kaldırılıp sol böbrek 45 dakikalık reperfüzyon sürecine bırakıldı. Hayvanların vücut sıcaklığı deney süresi boyunca rektal termistör prob ile ölçülerek, hayvanın yaklaşık 40 cm yukarısında yerleşmiş olan 150 W'lık bir lamba ve ısıtıcı fan yardımıyla 37°C 'de sabit kalması sağlandı.

Tablo 3.1. Deney grupları ve deney protokolünde gruplara verilen ilaçlar

DENEY VE KONTROL GRUPLARI	Karboksimetil selülöz (CMC) - 10 mg kg^{-1}	Riosiguat - 10 mg kg^{-1}
Sham	Vehikül	Vehikül
İR	Vehikül	Vehikül
İR-Rio	Vehikül	Riosiguat
Rio	Vehikül	Riosiguat

Sham ve Rio gruplarında vasküler klempleme işlemi haricinde tüm cerrahi işlemler uygulandı. Fonksiyonel çalışmalar ile histopatolojik ve biyokimyasal çalışmalar için yapılan her iki deneysel tekrarda da aynı cerrahi işlemler ve prosedürler uygulandı.



Şekil 3.1. Deney protokolü

Deney protokolünde riosiguat (Y0002238, Sigma Aldrich, Almanya), kloralhidrat (MERCK KGaA, Darmstadt, Almanya), fenilefrin (P6126, Sigma-Aldrich, St. Louis MO, ABD), asetilkolin (A6625, Sigma-Aldrich, St. Louis MO, ABD), anjiyotensin-II (176804, Calbiochem-Behring), sodyum nitroprusiyat (PHR1423, Sigma-Aldrich, St. Louis MO, ABD), norepinefrin (A7381, Sigma-Aldrich, St. Louis MO, ABD), karboksimetil selülöz (AKBEL kimya Bursa, TÜRKİYE) kullanıldı. Riosiguat haricindeki tüm ilaçlar serum fizyolojik içinde çözülerek uygulandı.

3.4 Fonksiyonel Değerlendirme

Fonksiyonel değerlendirmeler *in vivo* ve *ex vivo* deneyler olmak üzere iki farklı deneysel modelle incelendi. Tüm gruplarda *ex vivo* değerlendirmelere geçilmeden önce *in vivo* olarak renal arter kan akım hızı değerleri ve böbrek doku perfüzyonundaki değişimler analiz edilmek üzere kaydedildi.

3.4.1 *In vivo* Renal Kan Akımı Ölçümü

Fonksiyonel değerlendirmelerin *in vivo* kısmında, kloralhidrat ile anestezi verilen hayvanlarda anestezinin derinliği parmak kıstırmaya yanıt ile değerlendirilerek cerrahi işlemlere başlandı. Hayvanın rektal bölgesine yerleştirilen bir termometre probu ile vücut sıcaklığı takibi yapıldı. Sıcaklık takibine *in vivo* değerlendirme boyunca devam edildi. Hayvanın karın ön duvarı açıldıktan sonra renal arter etraf dokulardan izole edilerek ölçüme uygun hale getirildi. Renal arter kan akım hızı, Doppler esasına göre akım algılayan bir damar probu (Perivascular Flow Probes, Transonic Systems) ve akım hızı ölçen cihaz (Small animal blood flowmeter T 106X, Transonic Systems) yardımıyla ölçüldü (Şekil 3.2.). Renal arter, damar probunun çentikli kısmının iç tarafına yavaşça yerleştirildikten sonra uygun pozisyon verilerek renal arter kan akım hızı değerleri mL / dk olarak kaydedildi. Ayrıca tüm renal arter kan akım hızı değerleri hayvan vücut ağırlığına oranlanarak ayrıca hesaplandı.



Şekil 3.2. Kan akımı ölçümünde kullanılan cihaz ve prob. Transonic Systems T106 küçük hayvan kan akım ölçer (Small Animal Blood Flow Meter) (A). Damar probu, Perivascular Flow Probes, Transonic Systems (B).

3.4.2 *In vivo* Böbrek Doku Perfüzyonu Ölçümleri

Böbrek doku perfüzyonundaki değişimleri ölçmek için mikrovasküler perfüzyon monitörü (OxyLab, ABD) ve eritrosit röfle miktarına duyarlı doku probu (TSD145, BioPac, ABD) kullanıldı (Şekil 3.3.). Yaklaşık 1 mm altındaki böbrek dokusunun 1 mm³'ünde kan akım hızıyla orantılı bir voltaj sinyali üreten akım probunun iğne ucu, doğrudan dış medüller bölgedeki böbrek dokusuna temas ettirildi ve yerinde tutuldu. Böbrek doku perfüzyonundaki oransal değişimler böbrek dış medüller kan akımındaki değişiklikler ölçülerek hesaplandı. Elde edilen ilk veri bazal değer olarak kabul edilerek deney boyunca elde edilen değerler bazal değere oranlanarak böbrek doku perfüzyonundaki yüzdesel değişim analiz edildi. Tüm *in vivo* deneyler 75 dakika boyunca kesintisiz olarak yapıldı.



Şekil 3.3. Böbrek perfüzyon değişimi ölçümünde kullanılan cihaz ve prob. OxyLab Mikrovasküler Perfüzyon Monitörü ve eritrosit röfle miktarına duyarlı doku probu (TSD145, BioPac).

3.4.3. *Ex vivo* Deneysel Model

Ex vivo değerlendirmede izole perfüze böbrek düzeneğinde ölçümler yapıldı.

3.4.3.1 İzole Perfüze Böbrek Düzeneği

Sham ve Rio gruplarında klempleme işlemi haricinde tüm cerrahi işlemlerin uygulandığı 75 dakikalık süre ile İR gruplarındaki 30 dakika iskemiye takiben 45 dakikalık reperfüzyon sonrasında hayvanın sol renal arteri ve böbreği çevre dokulardan izole edildi. Abdominal aorta vasküler bir klemple yerleştirilerek sol renal arterin aorttan ayrıldığı noktanın 3 mm üstünden bir kesi yapılarak aorta 22G kanül ile girilip kanül renal artere doğru yavaşça ilerletilerek sabitlendi. Kanül renal arterde sabitlendikten sonra bir enjektör yardımıyla sol böbrek Krebs–Henseleit solüsyonu (118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 1,2 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄, 25 mM NaHCO₃ ve 11 mM glikoz) ile perfüze edildi. Sonrasında böbrek ve aortun kanül ile girilen kısmı çevre dokulardan ayırılarak sol böbrek, sol renal artere takılan kanül vasıtasıyla ölçümler için kullanılacak perfüzyon sistemine bağlandı. Doku %95 O₂ ve %5 CO₂ karışımı ile gazlandırılmış 37° C sıcaklıktaki Krebs–Henseleit solüsyonu ile peristaltik bir pompa (MP-3 akım pompası, Eyela, Japonya) aracılığıyla 6,8 mL/dk olacak şekilde 30 dk boyunca sabit hızda perfüze edilerek dengeleme sürecine bırakıldı. Perfüzyon hızı laboratuvarda önceden yapılan çalışmalar, literatürdeki bazal böbrek perfüzyon basıncı bilgileri ve yapılan ön çalışmalar ile belirlendi. Bu perfüzyon

sistemi ile doku sabit bir akım ile perfüze edilirken böbrek damar yatağının İ-R hasarına ve ilaç tedavisine vereceği yanıtın basınç transduseri aracılığıyla ölçülmesi, ardından MP150 veri kazanım ünitesi (Biopac Systems, ABD) vasıtasıyla veri bilgisayarına aktarılarak değerlendirilmesi planlandı. Bu deneylerde vazokonstriktör ajan olarak fenilefrin (PE), AT-II ve NE, vazodilatör ajan olarak ise SNP ve ACh verilerek renal İ-R hasarında riosigat tedavisinin etkileri incelendi. İzole perfüze böbrek düzeneği tüm deney boyunca 6,8 mL/dk hızla perfüze edildi. İlaç dozları 0,1 mL içinde kanül aracılığıyla bolus enjeksiyon olarak uygulandı.

Kasıcı ajanlardan PE 10 µg/0,1mL, AT-II ise 0,1 µg/0,1mL olarak tek doz uygulanırken NE doz-yanıtları 0,03-10 µg/0,1mL doz aralığında değerlendirildi.

Gevşeme yanıtlarını değerlendirebilmek amacıyla izole böbrekte ön kasılma elde edebilmek için 3×10^{-6} M PE içeren Krebs–Henseleit solüsyonu ile doku perfüze edilerek ön kasılma oluşturuldu ve gevşeme yanıtları kaydedildi. ACh doz-yanıtları 0,001-100 µg/0,1mL doz aralığında, SNP doz-yanıtları ise 0,01-100 µg/0,1mL doz aralığında değerlendirildi.

3.5. Histopatoloji için Örneklerin Toplanması

Araştırma protokolünün ikinci tekrarında da gruplara göre uygulanan cerrahi protokol deneylerin birinci tekrarındaki gibi uygulandı. Deney süreci sonunda dokular izole edilip sol böbrek numuneleri etrafındaki çevre dokularından ayrılarak çıkarıldı. Çıkarılan böbrek dokuları %10'luk tamponlu nötral formalin solüsyonu içinde bekletilerek histopatolojik inceleme için saklandı. Tüm dokular Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'na götürülerek histopatolojik açıdan değerlendirildi.

3.6. Histopatolojik Değerlendirme

Histopatolojik değerlendirme için formole koyulan örneklerden 4 mikron kalınlığında kesitler alınıp rutin hematoksilin-eozin boyaması uygulanarak ışık mikroskobu ile değerlendirmeleri yapıldı. Histopatolojik değerlendirme için literatürdeki benzer çalışmalar incelenerek oluşturulan skorum sistemi kullanıldı (145, 146). Histopatolojik değerlendirmede böbrekten alınan dokularda İ-R hasarı ile ilişkili değişikliklerin varlığı ve İR-Rio grubunda İ-R hasarı ile ilişkili değişikliklerde görülmesi beklenen olası iyileşmelerin varlığı araştırıldı. Histopatolojik analizde kullanılan değerlendirme parametreleri tabloda gösterilmiştir (Tablo 3.2.).

Tablo 3.2. Böbrek histopatolojik değerlendirme kriterleri

Patolojik Değişiklikler	Skorum
<p>Glomerül: (0) Normal Glomerül (1) Glomerüllerde konjesyon ve büzüşme</p> <p>Renal tübül: (0) Normal Tübül (1) Tübül epitelinde hafif şişme (2) Tübül epitelinde fokal kayıp (3) Tübül epitelinde belirgin nekroz</p>	<p>Genel skorum her böbrekte elde edilen patolojik değişim skorlarının toplamıyla elde edilmiştir.</p>

Histopatolojik değerlendirmede kaydedilen mikro fotoğraflar için mikroskopta böbrekte 50x büyütme uygulandı.

3.7. Biyokimyasal Değerlendirme

Sıçanlarda, vena kava inferiordan (VKI) yaklaşık 4 mL kan örnekleri alındı. Örnekler uygun kan tüplerine aktarıldıktan sonra 2000 G ayarında 20 dakika boyunca santrifüj cihazında bekletildi. Elde edilen serum örnekleri mikrosantrifüj tüplerine alınarak -20 derecede muhafaza edildi. IL-1 β (Elabscience, E-EL-R0012) ve IL-10 (Elabscience, E-EL-R0016) ölçümleri için ticari ELISA kitleri kullanıldı. Kullanılan ELISA kitleri, Sandwich-ELISA prensibine göre çalışmaktadır. İşleme başlamadan önce bütün serum örnekleri oda sıcaklığına getirildi. Kitlerde bulunan mikro ELISA plakası, araştırılan IL'e özgü bağlanan bir antikor ile kaplıdır. Serum örnekleri antikor kaplı mikro ELISA plakası kuyucuklarına eklendi ve kitlerin prosedürlerinde belirtilen sürede inkübe edildi. Antijen-antikor kompleksi oluştuğundan sonra bağlanmamış proteinler yıkama basamakları ile ortamdan uzaklaştırıldı ve hemen ardından araştırılan IL'e spesifik biyotinlenmiş tespit antikoru her bir plakaya eklendi. Prosedürde belirtilen süre kadar solüsyon aspire edildi ve plakalar absorbent kağıdı ile kurulandı. Yıkama işleminden sonra Horseradish Peroksidaz (HRP) eklendi ve inkübasyona bırakıldı. Serbest bileşenler yıkandıktan sonra substrat solüsyonu her bir kuyucuğa eklenerek ışıktan etkilenmeyecek şekilde kapatılarak inkübe edildi. İzleminde enzim-substrat reaksiyonu, durdurma çözeltisi eklenerek reaksiyon sona erdirildi. Renk değişimi gözlenmiş olan plakalarda optik yoğunluğu (OD) belirleyebilmek için spektrofotometri (Multiskan Go, Thermo) kullanılarak 450nm'de ölçüm yapıldı (Şekil 3.4.). Numunelerin OD değerleri standart eğri ile karşılaştırılarak tespit edilen antijene ait konsantrasyon hesaplandı.



Şekil 3.4. ELISA ölçümlerinde kullanılan spektrofotometre cihazı, (Multiskan GO, Thermo Scientific).

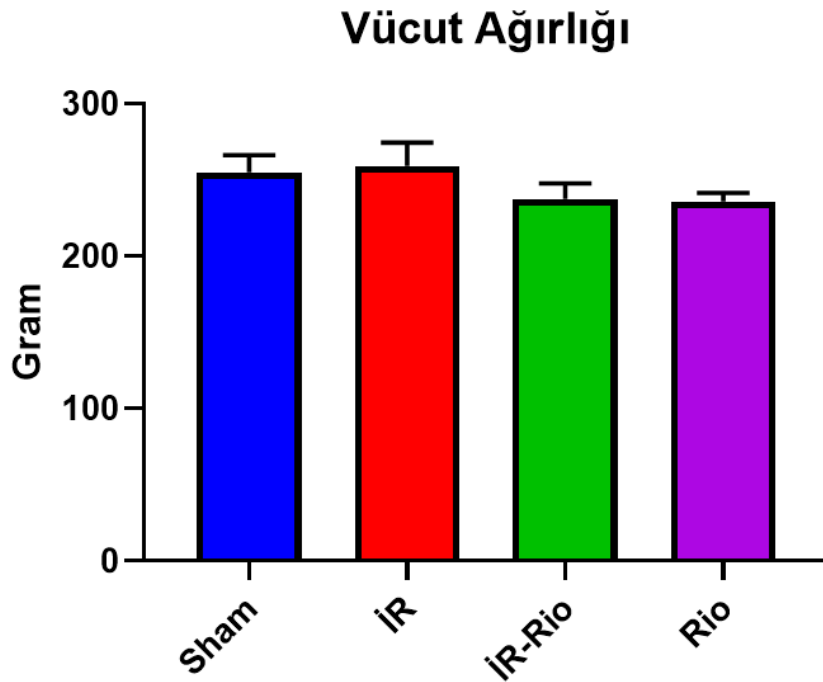
3.8. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için Microsoft Excel 2019 ve Graphpad Prism 9.0.0 (121) yazılımları kullanıldı. Deneylerden elde edilen sonuçların analizinde doz-cevap eğrilerinin karşılaştırılması için çift yönlü varyans analizi, kan akımı ve doku perfüzyonu değerlerinin karşılaştırılması için tekrarlayan ölçümlerde iki yönlü varyans analizi ve histopatolojik değerlendirme dışındaki diğer analizler için tek yönlü varyans analizi kullanıldı. Çoklu karşılaştırma için post hoc Tukey veya Dunnett analizleri kullanıldı. Histopatolojik skorlamaların karşılaştırılması için non-parametrik Kruskal-Wallis testi ve post hoc analizler için Dunn's çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. *P* değerinin 0,05'ten küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Elde edilen veriler aritmetik ortalama \pm ortalamanın standart hatası (SEM) olarak ifade edildi.

4. BULGULAR

4.1.Genel Değerlendirmeler

4.1.1. Hayvan Vücut Ağırlığı Oranları



Şekil 4.1. Hayvan vücut ağırlığı ölçümleri. Veriler aritmetik ortalama \pm ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için tek yönlü varyans analizi testi kullanıldı (n=6-8).

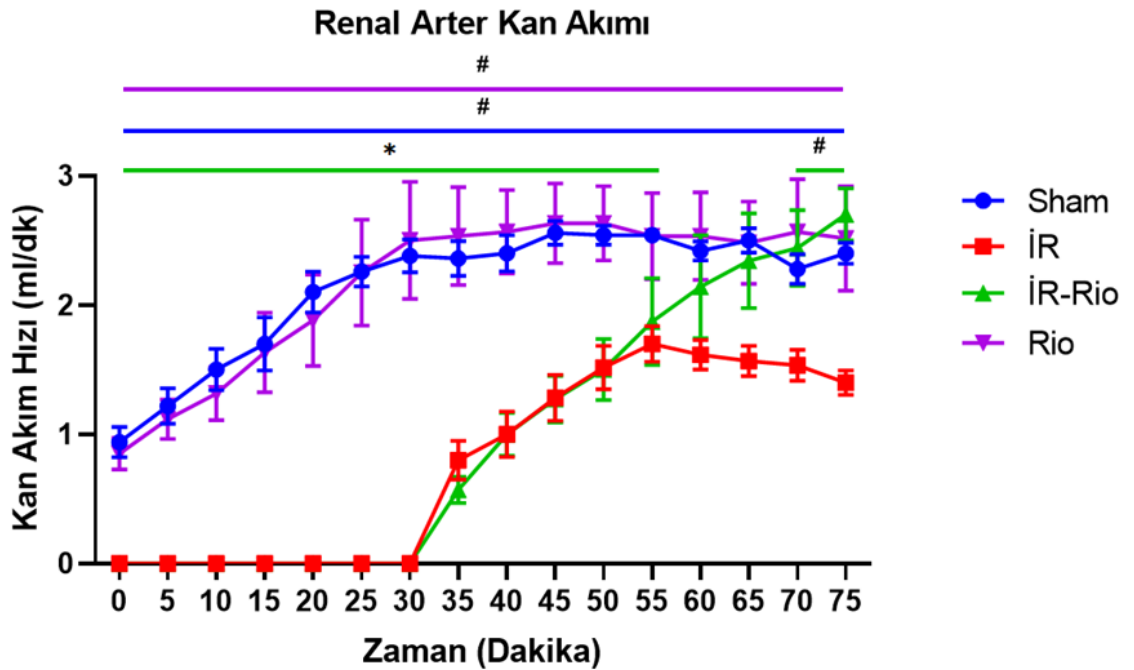
DeneySEL protokol başlangıcında ölçülen ortalama hayvan ağırlıkları sırasıyla Sham: $255 \pm 11,40$, İR: $259,37 \pm 15,16$, İR-Rio: $237,5 \pm 10,35$ ve Rio: $235,83 \pm 5,68$ olarak ölçüldü. Yapılan değerlendirmede gruplar arasında vücut ağırlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.1.).

4.2. Fonksiyonel Değerlendirmeler

4.2.1. *In vivo* ölçümler

Riosiguatin, böbrek İ-R hasarı modelinde, fizyolojik ve renal fonksiyonlara etkisini genel olarak değerlendirmek amacıyla İ-R veya sham uygulaması sürecindeki renal kan akımı ve böbrek doku perfüzyonundaki değişimler incelendi.

4.2.1.1. Renal Arter Kan Akım Hızı Ölçümleri



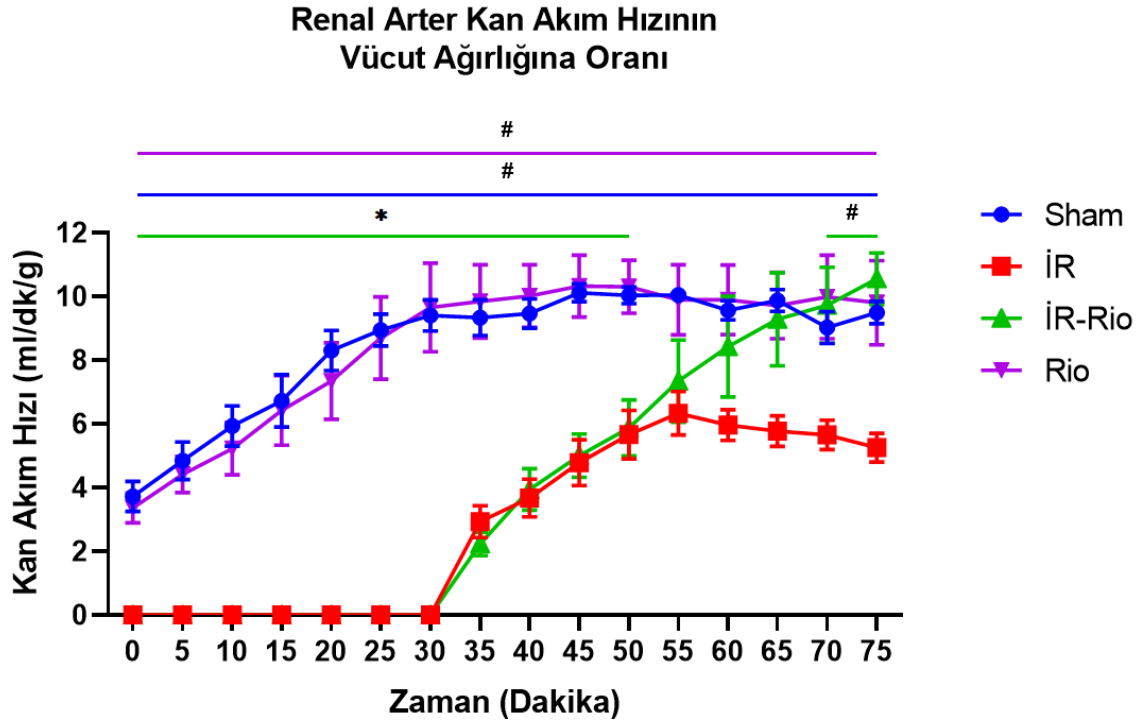
Şekil 4.2. Renal arter kan akım hızı ölçümleri. Veriler aritmetik ortalama \pm ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için tekrarlayan ölçümlerde iki yönlü varyans analizi; çoklu karşılaştırmalar için Dunnett's post-hoc testleri kullanıldı. * Kontrolle göre anlamlılık, # İR'ye göre anlamlılık. * $p < 0,05$, # $p < 0,05$ (n=5-7).

Renal arter kan akım hızları İ-R uygulanan gruplarda tüm iskemi ve takip eden reperfüzyon süresi boyunca, sham ve Rio gruplarında da tüm deney süresi boyunca

kaydedildi. Kontrol (sham) ve sadece riosiguat verilen (Rio) gruplardaki ilk 30 dakika boyunca renal kan akım hızı ölçümlerinde bir artış görüldüğü, bu artışın 30. dakika sonrasında devam etmediği ve kararlı bir seviyeye ulaştığı izlendi (Şekil 4.2.). Deneyin takip eden sürecinde ise bu kararlı seviyenin aynı şekilde devam ettiği görüldü (Sham: 0. dakika: $0,94 \pm 0,11$ mL/dk, 30. dakika: $2,38 \pm 0,12$ mL/dk, 75. dakika: $2,4 \pm 0,08$ mL/dk; Rio: 0. dakika: $0,85 \pm 0,12$ mL/dk, 30. dakika: $2,5 \pm 0,45$ mL/dk, 75. dakika: $2,52 \pm 0,4$ ml/dk).

Sadece İ-R uygulanan grupta (İR) reperfüzyon sonrasında ilk 25 dakika boyunca renal akım hızında bir artış görülürken 25. dakika sonrasında bu durumun devam etmediği ve belli bir ölçüde azaldığı görüldü (İR: 55. dakika: $1,7 \pm 0,13$ mL/dk, 75. Dakika: $1,4 \pm 0,09$ mL/dk; Şekil 4.2.). Riosiguat ön tedavisi uygulanan İ-R grubunda (İR-Rio) ise reperfüzyon sonrasında renal akım hızında aynı şekilde bir artış görülürken İR grubundan farklı olarak bu artışın 25. dakika sonrasında da deney süresi boyunca devam ettiği izlendi (İR-Rio: 55.dakika: $1,87 \pm 0,33$ mL/dk, 75. dakika: $2,7 \pm 0,2$ mL/dk; Şekil 4.2.).

Yapılan istatistiksel değerlendirmede renal kan akım hızı değerlerinin tüm deney süresi boyunca İR grubunda sham ve Rio gruplarına göre anlamlı olarak azaldığı ($p < 0.001$) görüldü (Şekil 4.2.). Sham ve Rio grupları arasında tüm deney süresi boyunca renal arter kan akım hızları arasında anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.2.). Bununla birlikte riosiguat ön tedavisi verilen grup ile sham grubu arasında reperfüzyonu takip eden ilk 35 dakikadaki renal kan akım hızları arasında anlamlı bir fark görülürken ($p < 0.001$) bu anlamlılık reperfüzyonu takip eden 35. dakikadan sonra izlenmedi (Şekil 4.2.). Riosiguat ön tedavisi uygulanan grup (İR-Rio) ile sadece İ-R uygulanan grup (İR) arasında reperfüzyon sonrasında ilk 40 dakika boyunca renal kan akım hızları arasında anlamlı bir fark gözlenmezken, 40. dakikadan sonra riosiguat ön tedavisi verilen grupta renal kan akım hızlarında anlamlı bir artış ($p = 0.003$) görüldü (Şekil 4.2.). Bu sonuçlar riosiguat ön tedavisinin, İ-R sonrasında akut dönemde azalan renal arter kan akımı değerlerini düzelterek kontrol seviyelerine getirdiğini göstermektedir.



Şekil 4.3. Renal arter kan akım hızının vücut ağırlığına oranlanarak yapılan ölçümler. Veriler aritmetik ortalama \pm ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için tekrarlayan ölçümlerde iki yönlü varyans analizi; çoklu karşılaştırmalar için Dunnett's post-hoc testleri kullanıldı. * Kontrole göre anlamlılık, # İR'ye göre anlamlılık. * $p < 0.05$, # < 0.05 (n=5-7).

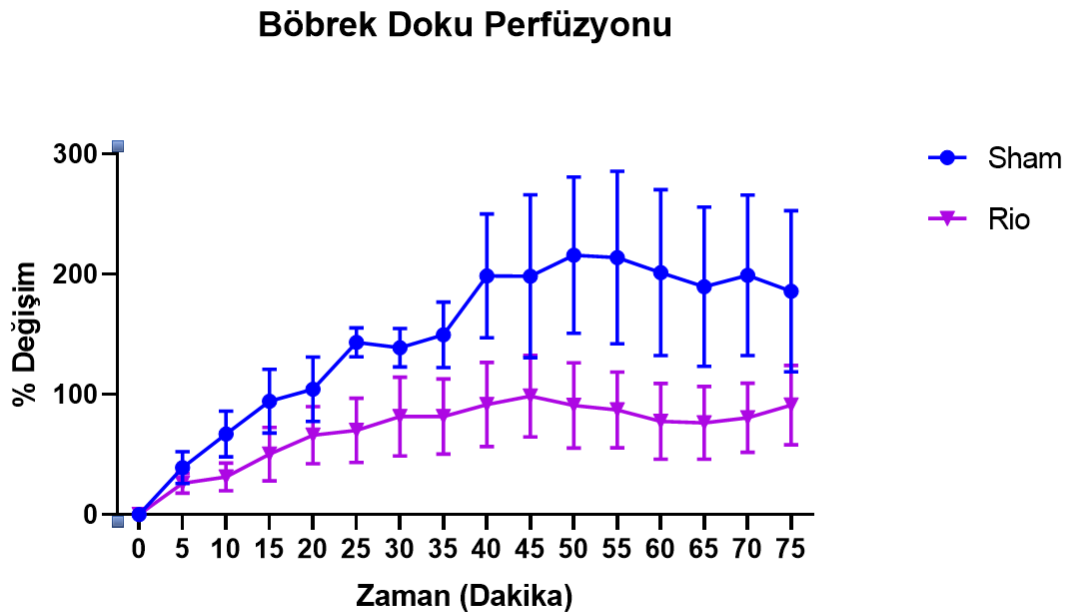
Renal arter kan akım hızları İ-R uygulanan gruplarda tüm iskemi ve takip eden reperfüzyon süresi boyunca, sham ve Rio gruplarında da tüm deney süresi boyunca kaydedildi. Elde edilen renal kan akımı değerleri hayvan vücut ağırlığına oranlandı. Kontrol (sham) ve sadece riosigat verilen (Rio) gruplardaki ilk 30 dakika boyunca renal kan akım hızı ölçümlerinde bir artış görüldüğü ve bu artışın 30. dakika sonrasında devam etmediği ve kararlı bir seviyeye ulaştığı izlendi (Şekil 4.3.). Deneyin takip eden sürecinde ise bu kararlı seviyenin aynı şekilde devam ettiği izlendi (Sham: 0. dakika: $3,73 \pm 0,46$ mL/dk/g, 30. dakika: $9,41 \pm 0,49$ mL/dk/g, 75. dakika: $9,49 \pm 0,35$ mL/dk/g; Rio: 0. dakika: $3,36 \pm 0,46$ mL/dk/g, 30. dakika: $9,65 \pm 1,39$ mL/dk/g, 75. dakika: $9,8 \pm 1,3$ mL/dk/g).

Sadece İ-R uygulanan grupta (İR) reperfüzyon sonrasındaki ilk 25 dakika boyunca renal akım hızında bir artış görülürken 25. dakika sonrasında bu durumun devam etmediği ve belli bir ölçüde azaldığı görüldü (İR: 55. dakika: $6,33 \pm 0,68$ mL/dk/g, 75. Dakika: $5,25 \pm 0,45$ mL/dk/g; Şekil 4.3.). Riosiguat ön tedavisi uygulanan İ-R grubunda (İR-Rio) ise reperfüzyon sonrasında renal akım hızında aynı şekilde bir artış görülürken İR grubundan farklı olarak bu artışın 25. dakika sonrasında da deney süresi boyunca devam ettiği izlendi (İR-Rio: 55.dakika: $7,34 \pm 1,29$ mL/dk/g, 75. dakika: $10,55 \pm 0,81$ mL/dk/g; Şekil 4.3.).

Yapılan istatistiksel değerlendirmede renal kan akım hızı değerlerinin tüm deney süresi boyunca İR grubunda sham ve Rio gruplarına göre anlamlı olarak azaldığı ($p<0.001$) görüldü (Şekil 4.3.). Sham ve Rio grupları arasında tüm deney süresi boyunca renal arter kan akım hızları arasında anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.3.). Bununla birlikte riosiguat ön tedavisi verilen grup ile sham grubu arasında reperfüzyonu takip eden ilk 35 dakikadaki renal kan akım hızları arasında anlamlı bir fark görülürken ($p<0.001$) bu anlamlılık reperfüzyonu takip eden 35. Dakikadan sonra izlenmedi (Şekil 4.3.). Riosiguat ön tedavisi uygulanan grup (İR-Rio) ile sadece İ-R uygulanan grup (İR) arasında reperfüzyon sonrasında ilk 40 dakika boyunca renal kan akım hızları arasında anlamlı bir fark gözlenmezken, 40. dakikadan sonra riosiguat ön tedavisi verilen grupta renal kan akım hızlarında anlamlı bir artış ($p=0.002$) görüldü (Şekil 4.3.). Bu sonuçlar riosiguat ön tedavisinin İ-R sonrasında azalan vücut ağırlığına oranlı renal kan akımı değerlerini düzelterek kontrol seviyelerine getirdiğini göstermektedir.

4.2.1.2. Böbrek Doku Perfüzyonu Ölçümleri

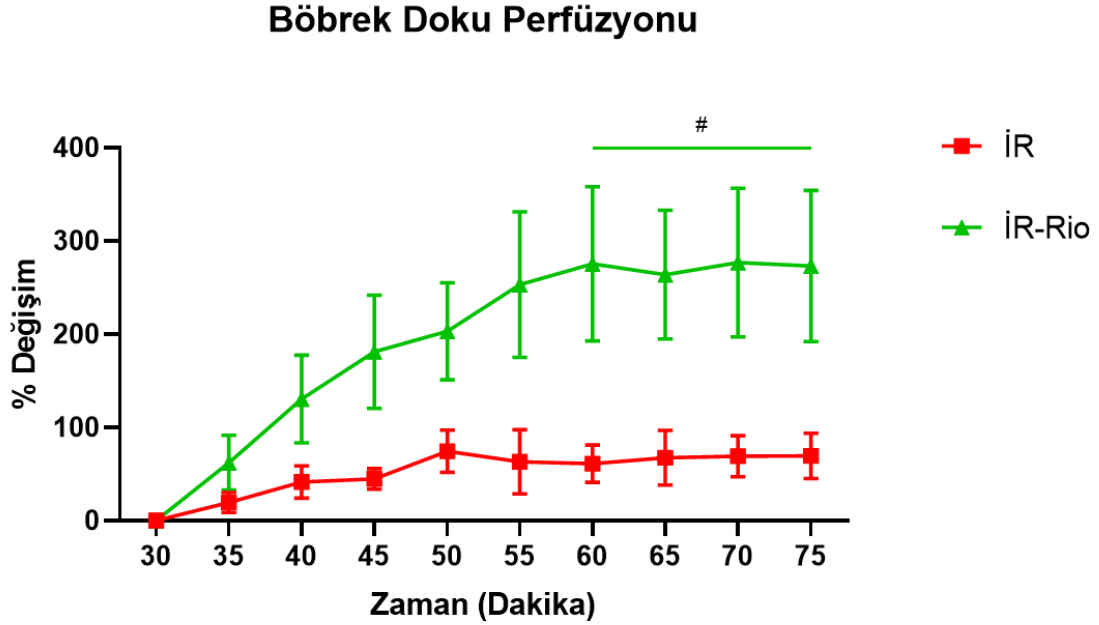
Sıçan böbrek doku perfüzyonundaki yüzdesel değişim, İ-R uygulanan gruplarda tüm iskemi ve takip eden reperfüzyon süresi boyunca, sham ve Rio gruplarında da tüm deney süresi boyunca kaydedildi.



Şekil 4.4. Kontrol (Sham) ve Rio gruplarında böbrek doku perfüzyonu ölçümleri. Veriler aritmetik ortalama \pm ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için tekrarlayan ölçümlerde iki yönlü varyans analizi; çoklu karşılaştırmalar için Tukey's post-hoc testleri kullanıldı. (n=5-7).

Kontrol (sham) ve sadece riosiguat verilen (Rio) gruplardaki ilk 45 dakika boyunca böbrek doku perfüzyonunu ölçümlerinde bir artış görüldüğü bu artışın 45. dakika sonrasında devam etmediği ve kararlı bir seviyeye ulaştığı izlendi (Şekil 4.4.). Deneyin takip eden sürecinde ise bu kararlı seviyenin aynı şekilde devam ettiği izlendi (Şekil 4.4.). Yapılan istatistiksel değerlendirmede Sham ve Rio grupları arasında tüm deney süresi boyunca böbrek doku perfüzyonu değişimlerinde anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.4.). Bu sonuçlar riosiguatın İ-R uygulanmayan sıçanların böbrek

doku perfüzyonu üzerine akut dönemde anlamlı bir değişiklik yapmadığını göstermektedir.



Şekil 4.5. İR ve İR-Rio gruplarında böbrek doku perfüzyonu ölçümleri. Yanıtlar reperfüzyonun başladığı 30. dakikaki değerlere göre değişimin yüzdesi olarak hesaplandı. Veriler aritmetik ortalama \pm ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için tekrarlayan ölçümlerde iki yönlü varyans analizi; çoklu karşılaştırmalar için Tukey's post-hoc testleri kullanıldı. # $p < 0.05$ (n=5-7).

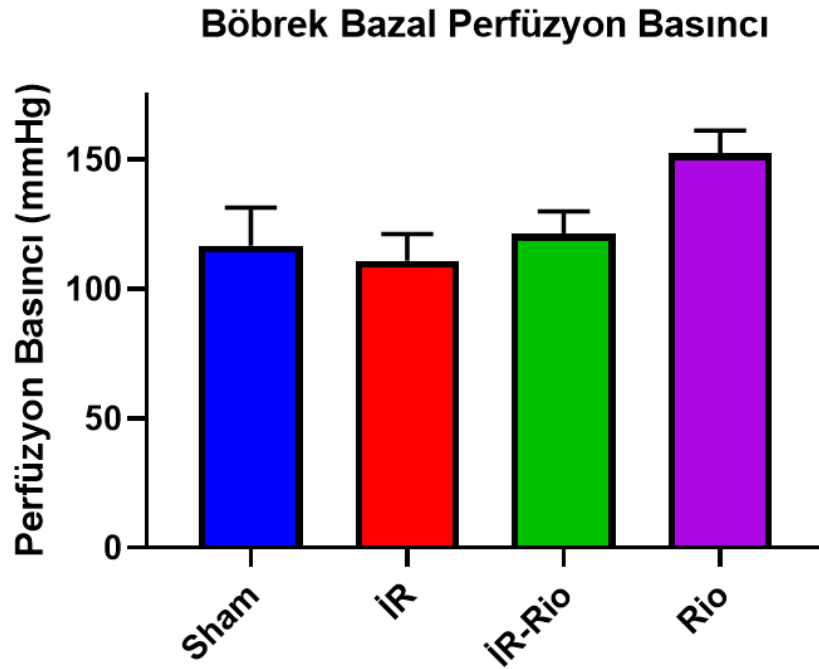
Sadece İ-R uygulanan grupta (İR) reperfüzyon sonrasındaki ilk 20 dakika boyunca böbrek doku perfüzyonunda bir artış görülürken 20. dakika sonrasında bu durumun devam etmediği ve kararlı bir seviyeye ulaştığı izlendi (Şekil 4.5.). Riosiguat ön tedavisi uygulanan İ-R grubunda (İR-Rio) ise reperfüzyon sonrasında böbrek doku perfüzyonundaki artışın reperfüzyon başlangıcından sonra 40.dakikaya kadar devam ettiği ve sonrasında kararlı bir seviyeye ulaştığı görüldü (Şekil 4.5.). Yapılan istatistiksel değerlendirmede, riosiguat ön tedavisi uygulanan grup (İR-Rio) ile İ-R uygulanan grup

(İR) arasında reperfüzyon sonrasında ilk 25 dakika boyunca böbrek doku perfüzyonundaki değişimde anlamlı bir fark gözlenmezken, 25. dakikadan sonra riosigat ön tedavisi verilen grupta (İR-Rio) böbrek doku perfüzyonundaki yüzdesel değişimde anlamlı bir artış görüldü (Şekil 4.5.). Bu sonuçlar riosigat ön tedavisinin iskemiye takip eden reperfüzyon sürecinin akut döneminde azalan böbrek doku perfüzyonunu anlamlı olarak arttırdığını göstermektedir.

4.2.2. Ex vivo ölçümler

4.2.2.1. İzole Perfüze Böbrek Düzenegi Sonuçları

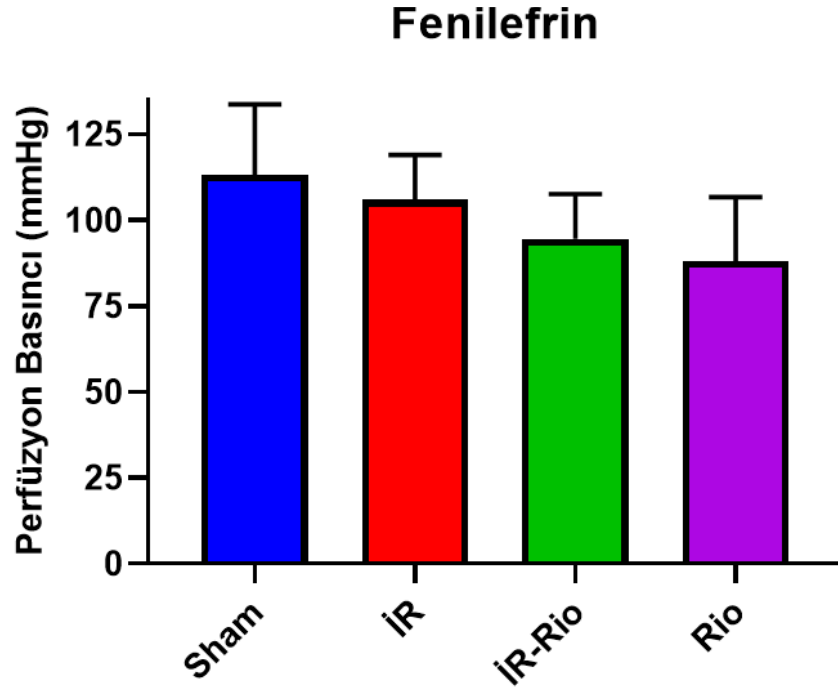
4.2.2.1.1. Bazal Perfüzyon Basıncı



Şekil 4.6. İzole perfüze böbrek düzeneginde böbrek bazal basınç düzeyleri ölçümü. Veriler aritmetik ortalama \pm ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için tek yönlü varyans analizi; çoklu karşılaştırmalar için Tukey's post-hoc testleri kullanıldı (n=6-8).

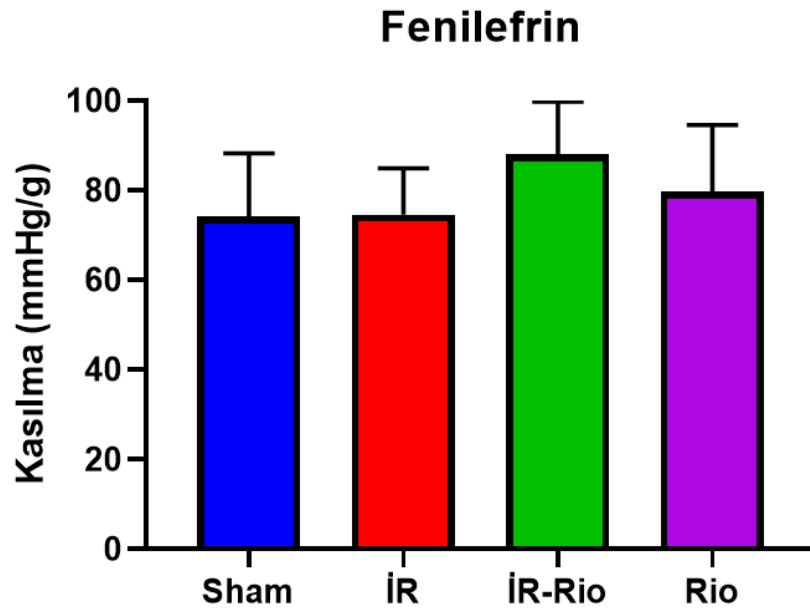
İzole sıçan perfüze böbrek düzeneginde 30 dakikalık istirahat süresi sonunda bazal perfüzyon basıncı değerleri Sham: $116,7 \pm 14,83$ mmHg, İR: $110,9 \pm 10,34$ mmHg, İR-Rio: $121,3 \pm 8,818$ mmHg ve Rio: $152,5 \pm 8,744$ mmHg olarak ölçüldü. Yapılan istatistiksel değerlendirmede böbrek bazal perfüzyon basıncı açısından gruplar arasında anlamlı fark görülmedi (Şekil 4.6.).

4.2.2.1.2. Fenilefrin Yanıtları



Şekil 4.7A. İzole perfüze böbrek düzeneğinin böbrek damar yatağında tek doz fenilefrin (PE) kasılma yanıtları. Veriler aritmetik ortalama \pm ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için tek yönlü varyans analizi testi kullanıldı (n=6-8).

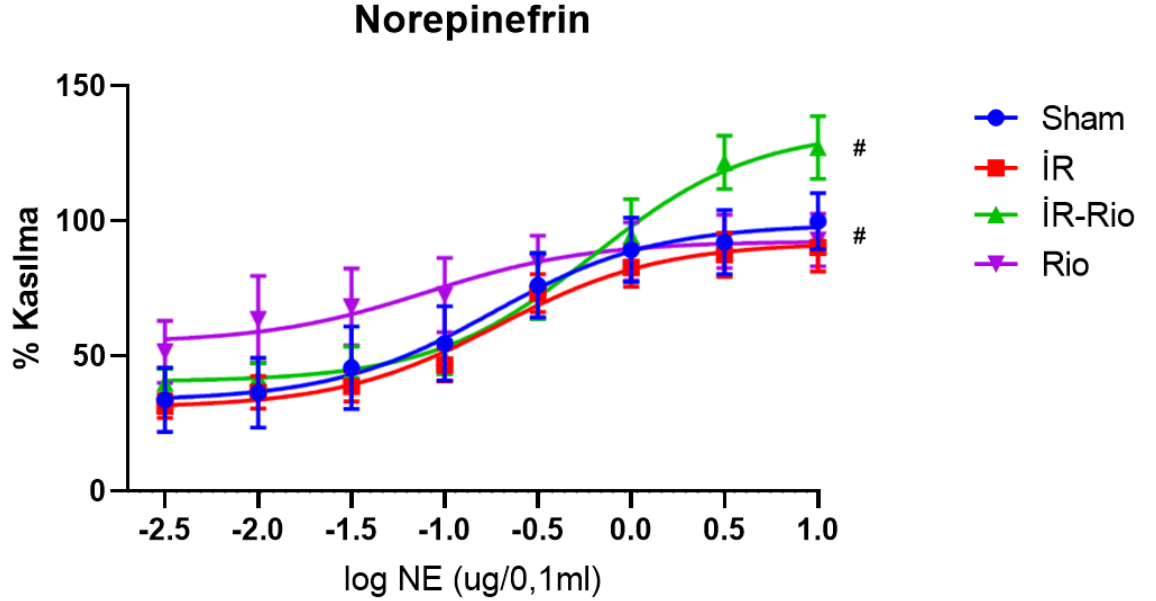
İzole sıçan perfüze böbrek düzeneğinde 10 μ g/0,1mL PE ile tek doz kasılma yanıtları elde edildi. Bazal perfüzyon basınçları sham grubunda 113,19 \pm 20,55 mmHg, İR grubunda 105,89 \pm 13,11 mmHg, İR-Rio grubunda 94,59 \pm 12,99 mmHg ve Rio grubunda 88,09 \pm 18,59 mmHg olarak ölçüldü. Gruplar arasında yapılan istatistiksel değerlendirmede tek doz PE kasılma yanıtları açısından anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.7A.).



Şekil 4.7B. İzole perfüze böbrek düzeneğinde böbrek ağırlığına oranlanmış tek doz fenilefrin (PE) yanıtları. Veriler aritmetik ortalama \pm ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için tek yönlü varyans analizi testi kullanıldı (n=6-8).

İzole sıçan perfüze böbrek düzeneğinde 10 μ g/0,1mL PE ile tek doz kasılma yanıtları elde edildi. Elde edilen değer böbrek ağırlığına oranlanarak analiz yapıldı. Bazal perfüzyon basınçları sham grubunda 74,14 \pm 14,11 mmHg/g, İR grubunda 74,66 \pm 10,26 mmHg/g, İR-Rio grubunda 88,05 \pm 11,84 mmHg/g ve Rio grubunda 79,74 \pm 14,86 mmHg/g olarak ölçüldü. Gruplar arasında yapılan istatistiksel değerlendirmede tek doz PE kasılma yanıtları açısından anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.7B.).

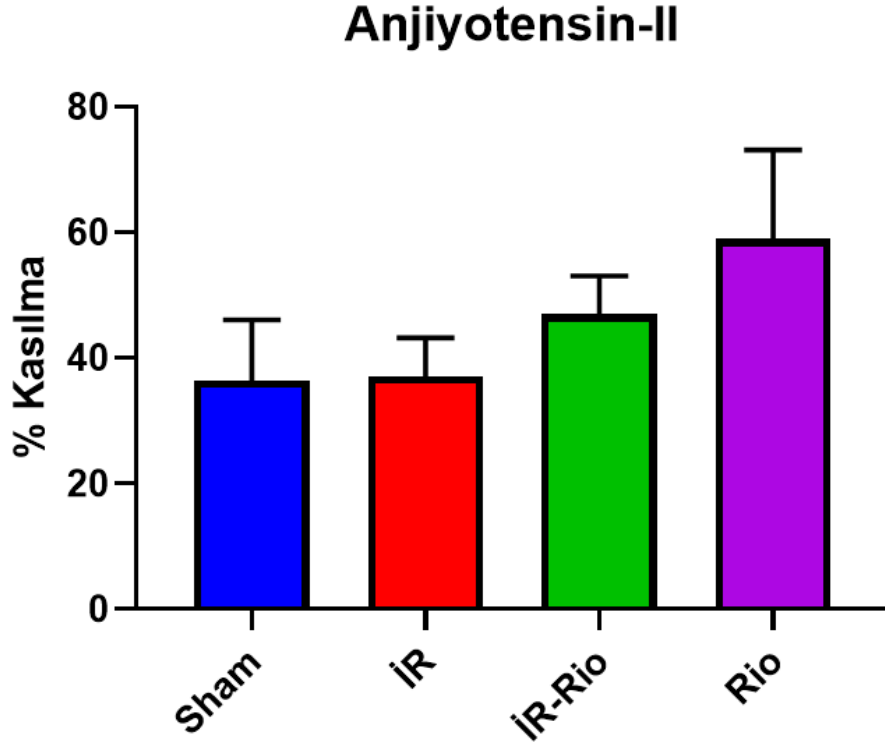
4.2.2.1.3. Norepinefrin Yanıtları



Şekil 4.8. İzole perfüze böbrek düzeneği böbrek damar yatağında norepinefrin (NE) kasılma yanıtları. Yanıtlar $10\mu\text{g}/0,1\text{mL}$ PE kasılmasının yüzdesi olarak hesaplandı. Veriler aritmetik ortalama \pm ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için çift yönlü varyans analizi; çoklu karşılaştırmalar için Dunnett's post-hoc testleri kullanıldı. # İR'ye göre anlamlılık. # $p<0,05$ (n=6-8).

İzole sıçan perfüze böbrek düzeneğinde NE doz-yanıt ($0,003-10\ \mu\text{g}/0,1\text{mL}$) eğrileri tek doz ($10\mu\text{g}/0,1\text{mL}$) PE kasılmasına oranlanarak incelendiğinde İR-Rio ve Rio gruplarında kasılma yanıtlarının İR grubuna göre anlamlı olarak arttığı (sırasıyla $p=0,009$ ve $p=0,005$) bulundu (Şekil 4.8.). Sham ve İR grupları arasında NE kasılma yanıtlarında anlamlı fark görülmedi (Şekil 4.8.). Sham, Rio ve İR-Rio grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.8.).

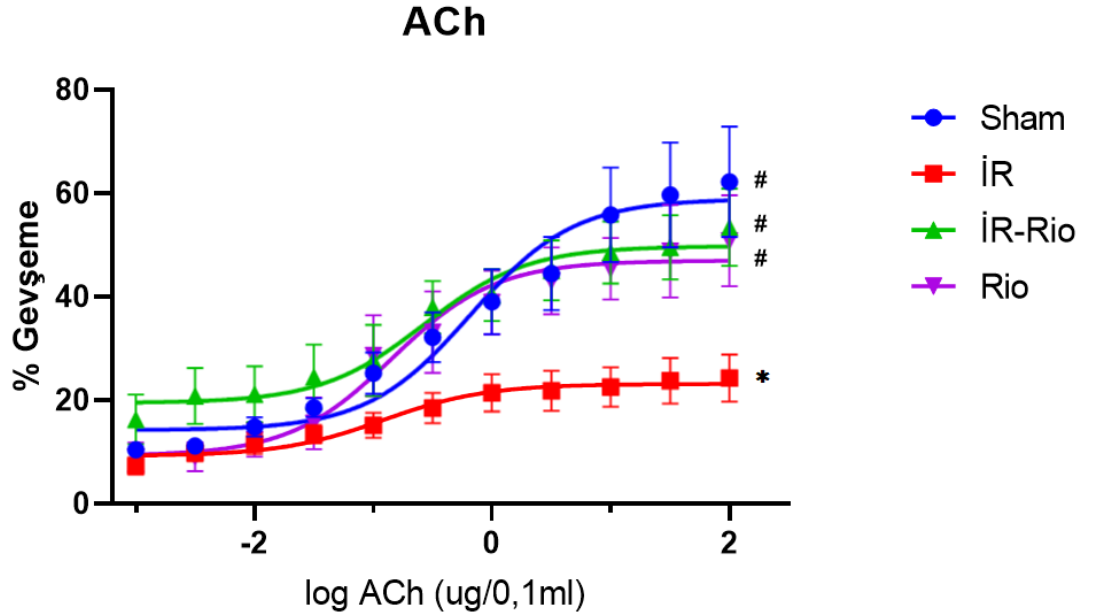
4.2.2.1.4. Anjiyotensin-II Yanıtları



Şekil 4.9. İzole perfüze böbrek düzeneği böbrek damar yatağında tek doz anjiyotensin-II (AT-II) kasılma yanıtları. Yanıtlar $10\mu\text{g}/0,1\text{ml}$ PE kasılmasının yüzdesi olarak hesaplandı. Veriler aritmetik ortalama \pm ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için tek yönlü varyans analizi testi kullanıldı (n=6-8).

İzole sıçan perfüze böbrek düzeneği tek doz ($0,1\mu\text{g}/0,1\text{mL}$) AT-II kasılma yanıtları $10\mu\text{g}/0,1\text{mL}$ PE kasılmasına oranlanarak değerlendirildi (Şekil 4.9.). Kasılma yüzdeleri sham grubunda $36,43 \pm 9,65$ mmHg, İR grubunda $37,12 \pm 6,10$ mmHg, İR-Rio grubunda $47,04 \pm 6,08$ mmHg ve Rio grubunda $59,01 \pm 14,17$ mmHg olarak ölçüldü. Gruplar arasında yapılan istatistiksel değerlendirmede tek doz AT-II kasılma yanıtları açısından anlamlı bir fark görülmedi.

4.2.2.1.5. Asetilkolin Yanıtları

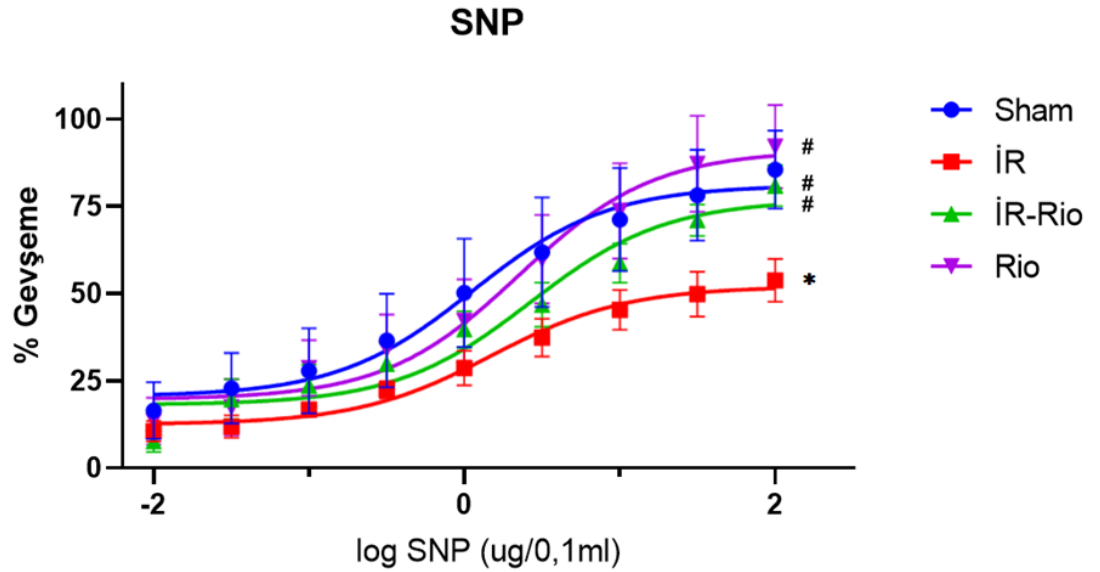


Şekil 4.10. İzole perfüze böbrek düzeneği böbrek damar yatağında asetilkolin (ACh) gevşeme yanıtları. $3 \times 10^{-6} \text{M}$ PE ön kasılmasının yüzdesi olarak hesaplandı. Veriler aritmetik ortalama \pm ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için çift yönlü varyans analizi; çoklu karşılaştırmalar için Dunnett post-hoc testleri kullanıldı. * Kontrolle göre anlamlılık, # İR'ye göre anlamlılık. * $p < 0,05$, # $p < 0,05$ (n=6-8).

İzole sıçan perfüze böbreğinde sürekli perfüzyonla uygulanan $3 \times 10^{-6} \text{M}$ PE içeren Krebs solüsyonu ile oluşturulan ön kasılma sonrası elde edilen ACh doza-bağımlı (0,001-100 $\mu\text{g}/0,1\text{mL}$) gevşeme yanıtları incelendiğinde İR grubunda gevşeme yanıtlarının sham grubuna göre anlamlı olarak azaldığı ($p < 0,001$) görüldü (Şekil 4.10.). İR grubunda azalan ACh gevşeme yanıtları, riosiguat ön tedavisi uygulanan İR-Rio grubunda anlamlı olarak arttı ($p = 0,002$; Şekil 4.10.). Ayrıca İR grubunda azalan ACh gevşeme yanıtları ile Rio grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark görüldü ($p = 0,003$; Şekil 4.10.). İR-Rio ve Rio grupları ile sham grubu arasında ise ACh gevşeme yanıtları açısından anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.10.). Bu sonuçlar İ-R sonrasında sıçan böbrek damar yatağında ACh gevşemelerinin akut dönemde anlamlı olarak

azaldığını, riosigat ön tedavisinin ise İ-R sonrasında azalan ACh gevşemelerini düzelterek kontrol seviyelerine getirdiğini göstermektedir.

4.2.2.1.6. Sodyum Nitroprusiyat Yanıtları

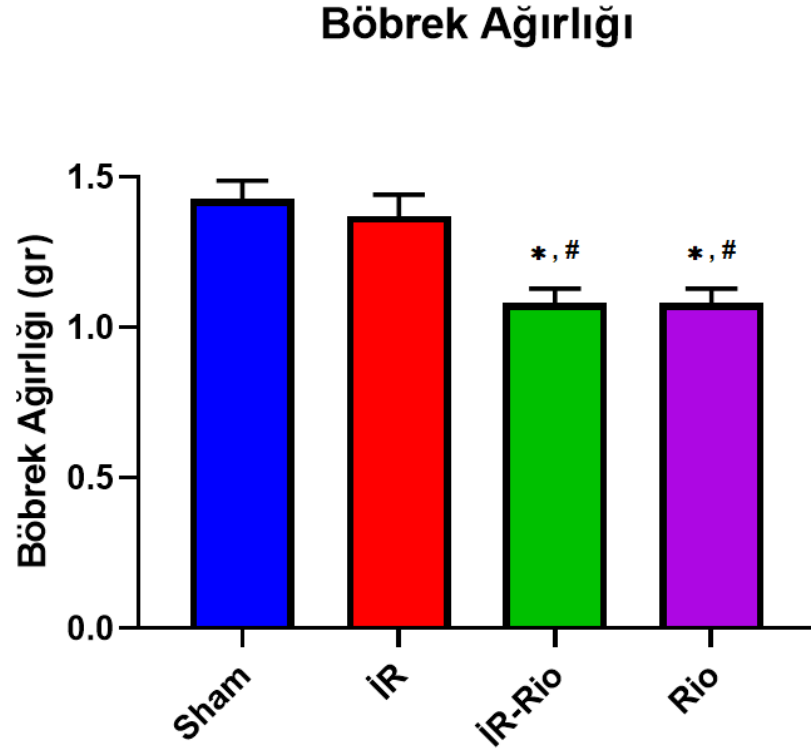


Şekil 4.11. İzole perfüze böbrek düzeneği böbrek damar yatağında sodyum nitroprusiyat (SNP) gevşeme yanıtları. $3 \times 10^{-6} \text{M}$ PE ön kasılmasının yüzdesi olarak hesaplandı. Veriler aritmetik ortalama \pm ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için çift yönlü varyans analizi; çoklu karşılaştırmalar için Dunnett post-hoc testleri kullanıldı. * Kontrolle göre anlamlılık, # İR'ye göre anlamlılık. * $p < 0,05$, # $p < 0,05$ (n=6-8).

İzole sıçan perfüze böbreğinde sürekli perfüzyonla uygulanan $3 \times 10^{-6} \text{M}$ PE içeren Krebs solüsyonu ile oluşturulan ön kasılma sonrası elde edilen SNP doza-bağımlı (0,01-100 $\mu\text{g}/0,1 \text{mL}$) gevşeme yanıtları incelendiğinde İR grubunda gevşeme yanıtlarının sham grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı ($p < 0,001$) görüldü (Şekil 4.11.). İR grubunda azalan SNP gevşeme yanıtları, riosiguat ön tedavisi uygulanan İR-Rio grubunda anlamlı olarak arttı ($p = 0,005$; Şekil 4.9.). İR grubunda azalan SNP gevşeme yanıtları ile diğer tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görüldü ($p = 0,001$). İR-Rio ve Rio grupları ile sham grubu arasında ise SNP gevşeme yanıtları açısından anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.11.). Bu sonuçlar İ-R sonrasında sıçan böbrek damar yatağında SNP gevşemelerinin akut dönemde anlamlı olarak

azaldığını, riosigat ön tedavisinin ise İ-R sonrasında azalan SNP gevşemelerini düzelterek kontrol seviyelerine getirdiğini göstermektedir.

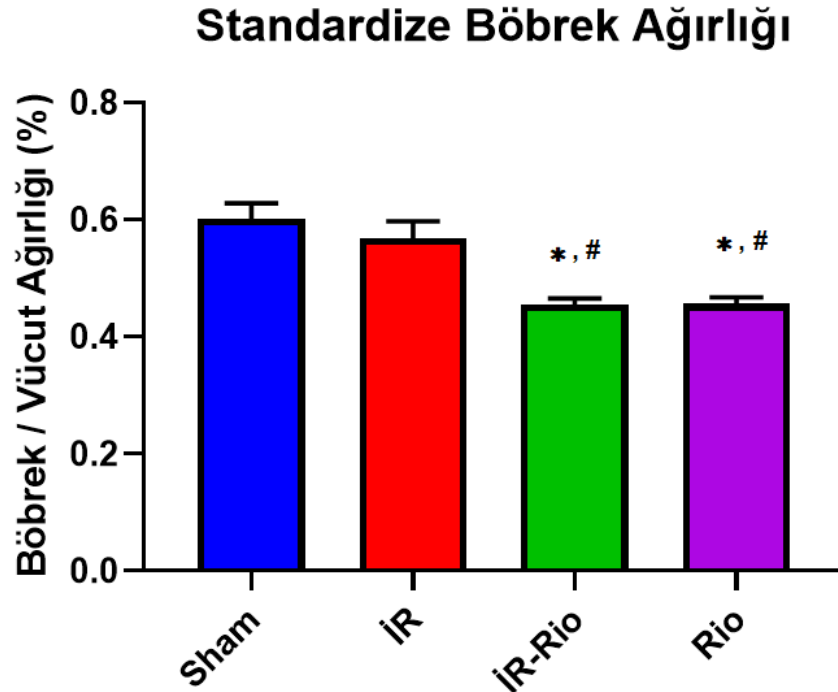
4.2.2.1.7. Böbrek ağırlığı ölçümleri



Şekil 4.12. Böbrek ağırlığı ölçümleri. Veriler aritmetik ortalama \pm ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için tek yönlü varyans analizi; çoklu karşılaştırmalar için Tukey's post-hoc testleri kullanıldı. * Kontrolle göre anlamlılık, # İR'ye göre anlamlılık. * $p < 0,05$, # $p < 0,05$, (n=6-8).

İzole sıçan perfüze böbrek düzeneğinde çalışılan böbreklerin ağırlıkları ölçüldü. Sham ($1,529 \pm 0,07$ g) ve İR ($1,46 \pm 0,07$ g) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmezken, hem İR-Rio ($1,08 \pm 0,04$ g) hem de Rio ($1,07 \pm 0,04$ g) gruplarında sham ve İR gruplarına göre böbrek ağırlıklarında anlamlı bir azalma ($p < 0,003$) görüldü (Şekil 4.12.). Bu sonuçlar riosiguat ön tedavisi verilen tüm gruplarda diğer gruplara göre böbrek ağırlıklarında anlamlı bir azalma meydana geldiğini göstermektedir.

4.2.2.1.8. Böbrek Ağırlığının Hayvan Vücut Ağırlığına Oranı

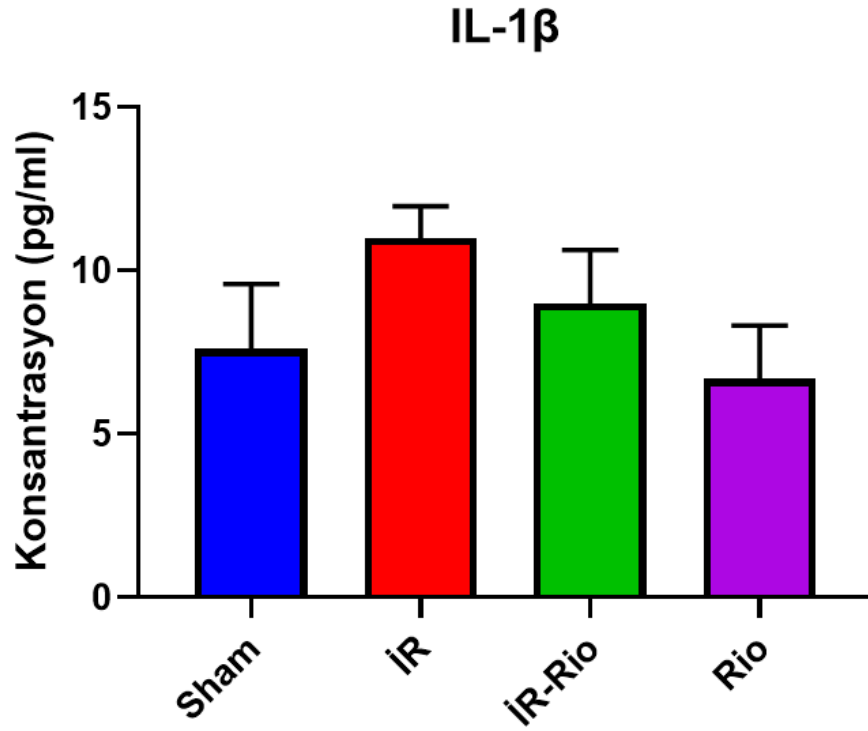


Şekil 4.13. Standardize böbrek ağırlığı. Böbrek ağırlığı hayvan vücut ağırlığına oranlanarak hesaplandı. Veriler aritmetik ortalama \pm ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için tek yönlü varyans analizi; çoklu karşılaştırmalar için Tukey's post-hoc testleri kullanıldı. * Kontrolle göre anlamlılık, # İR'ye göre anlamlılık. * $p < 0,05$, # $p < 0,05$, (n=6-8).

İzole sıçan perfüze böbrek düzeneğinde çalışılan böbreklerin ağırlıkları ölçülerek vücut ağırlığına oranlandı. Sham (% 0,6 \pm 0,02) ve İR (% 0,56 \pm 0,02) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmezken, hem İR-Rio (% 0,45 \pm 0,01) hem de Rio (% 0,45 \pm 0,01) gruplarında sham ve İR gruplarına göre böbrek ağırlığı oranlarında anlamlı bir azalma ($p < 0,006$) görüldü (Şekil 4.13.). Bu sonuçlar riosiguat ön tedavisi verilen tüm gruplarda diğer gruplara göre standardize böbrek ağırlığı oranlarında anlamlı bir azalma meydana geldiğini göstermektedir.

4.3. ELISA Sonuçları

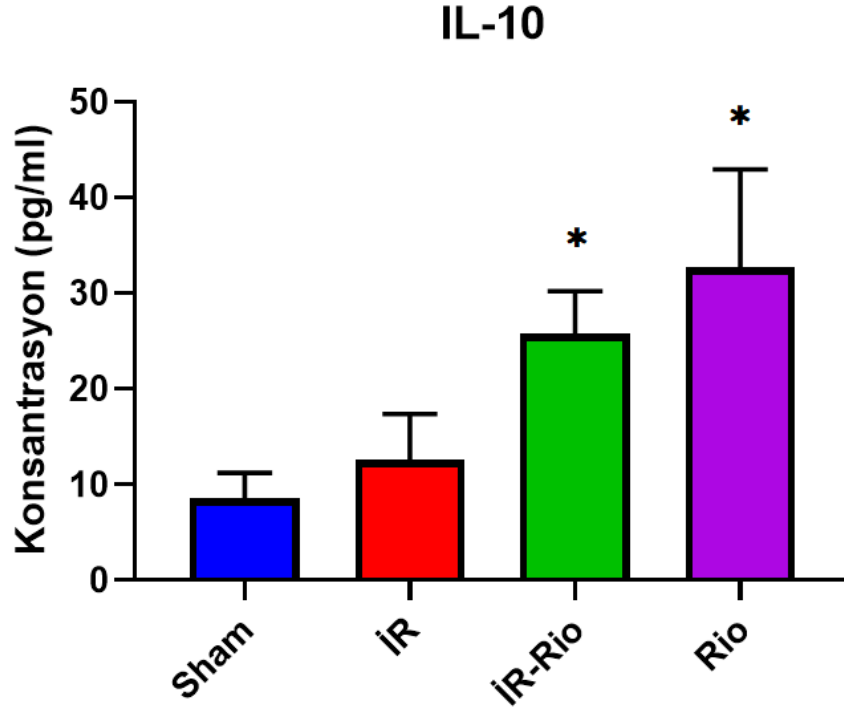
4.3.1. IL-1 β Sonuçları



Şekil 4.14. Sıçan serum örneklerinde ölçülen IL-1 β konsantrasyonu (pg). *Sonuçlar aritmetik ortalama \pm ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için tek yönlü varyans analizi; çoklu karşılaştırmalar için Tukey's testleri kullanıldı, (n=6-8).*

Sıçan serum örneklerinde ELISA metoduyla ölçülen IL-1 β konsantrasyonu İ-R hasarı varlığında değişimi ve bu değişim üzerine riosiguatin etkisi incelendiğinde, deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 4.14.). Yapılan değerlendirmeler sonucunda aritmetik ortalama \pm SEM olacak şekilde gruplardaki IL-1 β konsantrasyonlar sırasıyla; Sham: 7,6 \pm 1,97 pg/mL, İR: 10,99 \pm 0,97 pg/mL, İR-Rio: 8,98 \pm 1,64 pg/mL ve Rio: 6,68 \pm 1,63 pg/mL olarak ölçüldü.

4.3.2. IL-10 Sonuçları

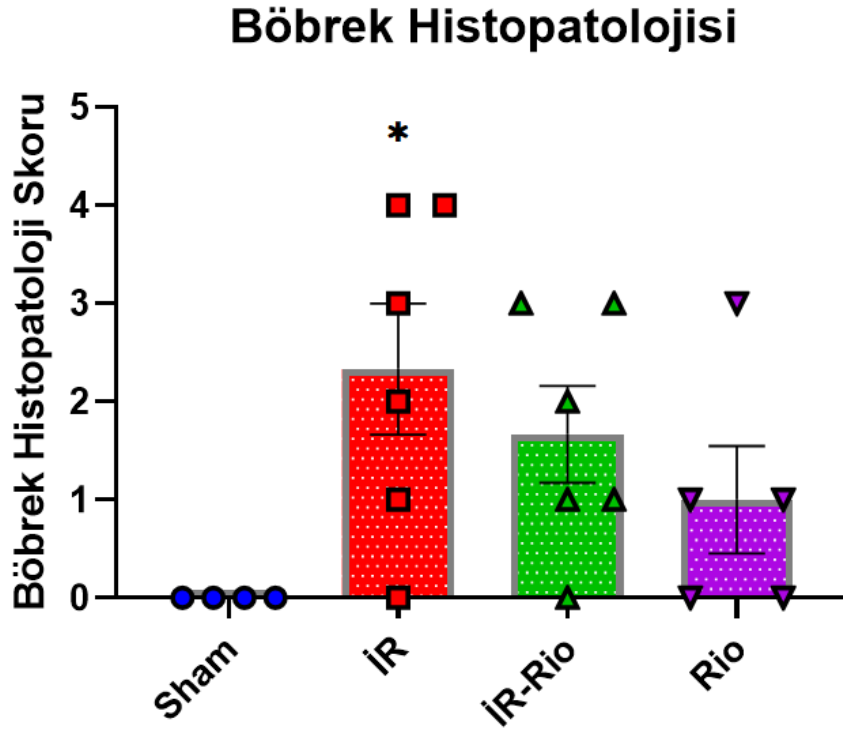


Şekil 4.15. Sıçan serum örneklerinde ölçülen IL-10 konsantrasyonu (pg/mL). *Sonuçlar aritmetik ortalama ± ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için tek yönlü varyans analizi; çoklu karşılaştırmalar için Tukey's testleri kullanıldı * Kontrole göre anlamlılık. *p<0,05 (n=5-8).*

Sıçan serum örneklerinde ELISA metoduyla ölçülen IL-10 konsantrasyonu İ-R hasarı varlığında değişimi ve bu değişim üzerine riosiguatın etkisi incelendi. Sham ($8,51 \pm 2,72$ pg/mL) ve İR ($12,55 \pm 4,85$ pg/mL) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmezken, hem İR-Rio ($25,76 \pm 4,47$ pg/mL) hem de Rio ($32,73 \pm 10,25$ pg/mL) gruplarında sham ve İR gruplarına göre IL-10 plazma konsantrasyonunda anlamlı bir azalma ($p < 0,01$) görüldü (Şekil 4.15.). Bu sonuçlar riosiguat ön tedavisi verilen tüm gruplarda diğer gruplara göre IL-10 plazma konsantrasyonunda anlamlı bir artış meydana geldiğini göstermektedir.

4.4. Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları

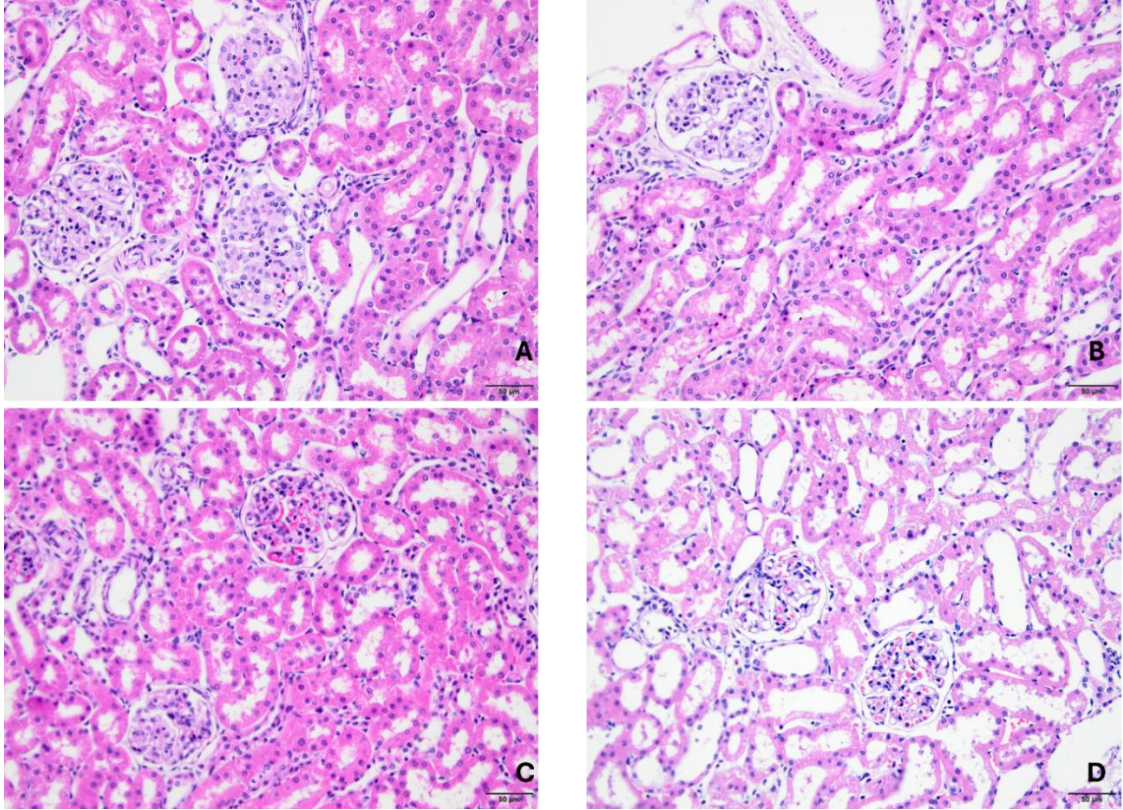
4.4.1. Böbrek Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları



Şekil 4.16. Sıçan böbrek İskemi-Reperfüzyon (İ-R) hasarı deneysel modelinde oluşan böbrek hasarına riosiguatinin etkisi. Böbrek hasarı semi-kantitatif olarak ışık mikroskopunda değerlendirildi. Gruplar arası istatistiksel inceleme için Kruskal-Wallis; çoklu karşılaştırmalar için Dunn's post-hoc testleri kullanıldı. * Kontrole göre anlamlılık. * $p < 0,05$ ($n=4-6$).

Işık mikroskopunda semi-kantitatif olarak değerlendirilen böbrek histopatolojik incelemesinde İR grubunda böbrekte hasarı gösteren histopatolojik skorun sham grubuna göre anlamlı şekilde arttığı ($p=0,023$) görüldü (Şekil 4.16.). Böbrek histopatoloji skoru açısından riosigat verilen İR-Rio ve Rio gruplarında İR grubuna göre bir azalma gözlenirken bu azalmalar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 4.16.). Ancak bununla birlikte aynı İR-Rio ve Rio grupları ile sham grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.16.). İR-Rio

grubu histopatolojik değişiklikler açısından İR grubuna göre anlamlı bir azalma göstermemekle birlikte sham grubuna göre de anlamlı bir artış göstermediğinden dolayı, bu sonuçlar riosigat ön tedavisinin İ-R sonrasında akut dönemde böbrekte bozulan histopatolojik değişiklikler üzerine olumlu etkileri olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.17. Sıçan böbrek İskemi-Reperfüzyon (İ-R) hasarı patolojik bulgularını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafları. Normal böbrek histopatolojisi (A), tübül epitelinde hafif şişme (B), glomerüllerde konjesyon ve tübül epitelinde fokal kayıp (C), glomerüllerde konjesyon ve tübül epitelinde belirgin nekroz (D).

Böbreklerin histopatolojik olarak değerlendirilmesinde tübül ve glomerüller sham grubunda normal olarak izlenmektedir (Şekil 4.17. A). Rio grubunda ise glomerüllerin genelde normal olduğu ancak tübül epitelinde hafif şişmenin görüldüğü izlendi (Şekil 4.17. B). İR grubunda genel olarak böbrek tübül epitelinde belirgin nekroze alanlar ve glomerüllerde konjesyon içeren bölgeler görüldü (Şekil 4.17. D). İR-Rio grubunda ise genel olarak glomerüllerde yer yer konjesyon odakları ve tübül epitelinde kısmi hasarın oluştuğu izlendi (Şekil 4.1.).

5.TARTIŞMA

Bu çalışmada böbrek İ-R modelinde sGC stimülatörü olan riosiguat ön tedavisinin renal ve sistemik fizyolojik fonksiyonlara etkisi incelendi. Bu çalışma, böbrek İ-R hasarı modelinde oluşan ABH'ye riosiguat ön tedavisinin, böbrek perfüzyonundaki değişim ve renal arter kan akım hızı cevapları üzerine etkilerinin karşılaştırılarak değerlendirildiği ilk çalışma olmuştur. Bu çalışmada yine güncel literatür bilgileri doğrultusunda sıçanda *in vivo* böbrek İ-R hasarı modelinde böbrek perfüzyonundaki değişim ve izole perfüze böbrek düzeneğinde böbrek vasküler yatağının temel farmakolojik ajanlara yanıtları ilk kez değerlendirilmiştir. İzole perfüze böbrek düzeneğinde riosiguat, İ-R sonrası azalan doza bağımlı ACh ve SNP gevşeme yanıtlarını düzeltti. İ-R hasarı sonrası bozulan renal arter kan akım hızı ve böbrek doku perfüzyonu riosiguat tedavisi ile kontrol düzeylerine geri geldi. Riosiguat ön tedavisi ile düzelen böbrek vasküler yatak gevşeme yanıtları, renal vasküler direnci azaltarak renal arter kan akım hızını ve böbrek doku perfüzyonunu artırdı.

Riosiguat oral biyoyararlanımının % 94 olduğu ve uygulandıktan yaklaşık 90 dakika sonra doruk plazma konsantrasyonuna ulaştığı bilinmektedir (138). Çalışmamızda deney protokolü süresi ve ilacın anestezi öncesi uygulanma süresi, ilacın farmakokinetik profili ile uyumlu olup uyguladığımız ilaç dozu yapılan bazı literatür çalışmaları ile benzerdir (143, 144). Vücut ağırlığında meydana gelen değişimler özellikle kronik veya uzun süreçli patolojik ve fizyolojik durumlarda görülmektedir. Bu çalışmadaki böbrek İ-R modeli akut bir patolojiyi yansıtmakta olup hayvan vücut ağırlıklarında anlamlı değişim görülmemesi beklenen bir sonuçtur. Ayrıca çalışmamızda hayvan ağırlıklarında anlamlı fark olmaması deneylerde kullanılan hayvanların vücut ağırlığı açısından standardize olduğunun göstergesi olarak yorumlanabilir.

Güncel literatürde yapılan çalışmalarda, böbrek İ-R hasarı modellerinde böbrek ağırlığında azalma genellikle 24 saat ve üzeri reperfüzyon hasarı uygulanan modellerde görülmüştür (147). Sham ve İR grupları arasında böbrek ağırlıklarında anlamlı fark bulunmamasının temel nedeni deney protokolünde uyguladığımız renal

İ-R hasarı modelinin (30 dakika iskemiye takip eden 45 dakika reperfüzyon) kısa süreli olmasından kaynaklanabilir. Ancak çalışmamızda bununla birlikte riosiguat verilen her iki grupta da böbrek ağırlıklarında bir azalma görülmüş olması bu durumun riosiguatın bir etkisi olduğunu düşündürmektedir. Sıçan böbreğinde tek taraflı üreter obstrüksiyonu modeliyle yapılan bir çalışmada, farklı riosiguat dozu uygulamaları denenmiş ve sonucunda uzun dönemde üreter obstrüksiyonu sonrasında azalan böbrek ağırlığı ve böbrek ağırlığının vücut ağırlığına bölünmesi ile elde edilen standardize böbrek ağırlığı değerleri üzerine riosiguatın bazı dozlarının etki göstermediği bazı dozlarının ise olumlu etki gösterdiği belirtilmiştir (9). Çalışmamızda ise İR-Rio ve Rio gruplarında görülen böbrek ağırlığındaki ve standardize böbrek ağırlığındaki azalma akut dönemde meydana gelen bir bulgudur ve riosiguatın akut dönemde böbrek ağırlığı üzerine farklı bir etkisinin olabileceğini düşündürmüştür. Medüller dolaşım üzerinde lokal etki ile tonik bir vazodilatör yanıt oluşturarak medüller hemodinamiyi ve renal intersitisyel hidrostatik basıncı etkileyen NO'nun tübüler taşınma üzerine doğrudan bir etkiyle sodyum ve suyun tübüler geri emilimini azalttığı gösterilmiştir (148). Bu bilgiler sonucu, çalışmamızda riosiguat uygulanan gruplarda akut dönemde görülen böbrek ağırlığındaki azalmanın temel nedeninin NO veya sGC uyarısı ile sodyum ve su geri emilimindeki azalma olabileceği düşünülmüştür.

Böbrek dokusu izole perfüze böbrek düzeneğine yerleştirildikten sonra 30 dakika süresince sabit bir hızda perfüze edilerek dokunun stabil hale gelmesi için beklenir. Literatürde yapılan çalışmalarda ve laboratuvarımızda yapmış olduğumuz önceki çalışmalarda, sıçanlarda sabit hızda perfüze olan böbreklerde istirahat süresi sonunda optimum bazal böbrek perfüzyon basıncı 100 ± 20 mmHg arasındaki değerlerde gösterilmiştir (149, 150). Bu çalışmada sabit bir hızda böbreği perfüze ettiğimizde elde edilen sonuçlar sham grubuyla literatür sonuçlarının benzer olduğunu göstermektedir. Yapılan bir kronik sıçan böbrek İ-R hasarı modelinde, 40 dakika iskemiye takiben 35 gün reperfüzyon süresi sonunda, böbrek bazal perfüzyon basıncının İ-R uygulanan grupta (İR) sham grubuna göre anlamlı ölçüde azaldığı gösterilmiştir (151). Sonuçlarımızda gruplar arasında anlamlı fark bulunmamasının

nedeni ise uyguladığımız böbrek İ-R hasarı modelinin kısa süreli olmasından ve/veya bu süreçte böbrekteki kompensatuar mekanizmaların olaya dahil olmasından kaynaklanabilir.

İ-R sonrası vasküler yapılarda görülen kasılma yanıtları hasarın süresine ve damarın lokalizasyonuna göre değişiklik göstermektedir. Yapılan mezenter İ-R hasarı modelinde, mezenter vasküler yatağın PE'ye karşı kasılma cevaplarında azalma gösterilmiştir (152). Yapılan farklı bir çalışmada ise sıçanlarda superior mezenter arterde 45 dakika iskemi / 2 saat reperfüzyon ile oluşturulan İ-R hasarı modelinin pulmoner arter disfonksiyonu üzerine etkileri incelenmiş, pulmoner arter preparatlarının kasılma cevapları organ banyosu düzeneğinde kaydedilmiştir. İ-R grubunda kontrol grubuna göre kümülatif konsantrasyonlarda uygulanan PE kasılma yanıtlarında anlamlı azalma bulunmuştur. Sonuç olarak İ-R'nin, α -adrenoseptör agonisti olan PE'ye karşı hipokontraktiliteye neden olduğu gösterilmiştir (153). Yapılan korpus kavernozum 1 saat iskemi-1 reperfüzyon ile oluşturulan İ-R modelinde, korpus kavernozum preparatları ile yapılan organ banyosu deneylerinde kümülatif uygulanan PE kasılma yanıtlarının kontrol grubuna göre İ-R grubunda önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (154). Ancak literatürde yapılan diğer çalışmalarda, uzun süreli bağırsak İ-R hasarını (60 dakika iskemi / 240 dakika reperfüzyon ve 90 dakika iskemi / 24 saat reperfüzyon) takiben mezenter arterde PE kasılma yanıtlarında artış gösterilmiştir (155, 156). Literatür bilgileri doğrultusunda özellikle kısa süreli İ-R hasarı modellerinde PE kasılma yanıtları azalırken uzun süreli İ-R modellerinde PE kasılma yanıtlarında artış gösterilmiştir. Çalışmamızda, sham grubu ile karşılaştırıldığında İR grubunda böbrek damar yatağı PE kasılma yanıtlarında azalma eğilimi görülmekle beraber istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunmaması İ-R'nin kısa süreli ve önceki çalışmalardan farklı dokularda olmasından kaynaklanabilir. Oksidan maddelerin dokunun çeşitli ajanlara karşı kasılma yanıtlarını değiştirdiği bilinmektedir. Örnek olarak ROS endotel disfonksiyonuna neden olarak vasküler reaktivitenin değişmesine yol açar (157, 158). İ-R sonrası ROS üretimindeki artışın vasküler dokuların kasıcı maddelere daha düşük yanıt vermesine neden olduğu söylenebilir (154). Ayrıca, böbrek damar yatağı PE kasılma cevaplarında gruplar

arasında anlamlı bir farklılık görülmemesinin bir diğer nedeni böbrek dokusunun iyi kanlanmasıyla kaynaklanabilir. Yapılan bir çalışmada NOS inhibitörü olan L-NAME varlığında mezenter damar yatağındaki PE kasılma yanıtlarında saptanan artış (152) ile etkisini NO / sGC / cGMP yolağı üzerinden gösteren riosiguat (11) verilen gruplardaki PE kasılma yanıtlarındaki azalma eğiliminin birbiriyle uyumlu olduğu düşünülebilir.

Vasküler kasılma yanıtlarında bozulma özellikle uzun süreli İ-R hasarı çalışmalarında gösterilmiştir (155). Çalışmamızda İ-R sonrasında böbrek damar yatağındaki NE kasılma cevaplarında bir değişiklik olmaması, uyguladığımız renal İ-R hasarı modelinin kısa süreli olmasına bağlı olarak İR sonrasında vasküler kasılma yanıtlarında oluşabilecek değişikliklerin ortaya çıkmasını sağlayacak böbrek içi mekanizmaların devreye girememiş olması veya kasılmayı uyaran reseptörlerde yukarı yönde regülasyonun başlayamaması gibi mekanizmalar için yeterli sürenin olmaması ile açıklanabilir. İlginç olarak bu çalışmada, riosiguat verilen her iki grupta da özellikle yüksek dozlarda olmak üzere kısa dönemde böbrek damar yatağı NE kasılma yanıtlarında diğer gruplara göre anlamlı bir artış görülmüştür. Riosiguatın neden olduğu anlaşılan NE kasılmalarındaki bu artış ile ilgili olarak literatürde benzer bir bilgiye rastlanmamıştır. Bu çalışma riosiguat uygulaması sonrasında akut dönemde böbrek damar yatağı kasılma yanıtlarında bir artış olduğunu gösteren ilk çalışmadır. Bu durum NO / sGC / cGMP yolağı üzerinden etki gösteren riosiguatın kısa dönemde hücre içi mekanizmalar üzerine yaptığı değişiklikler ile ilgili böbrekte hücre içi kompensatuar mekanizmaların gelişmiş olmasından kaynaklanıyor olabilir. Riosiguatın neden olduğu anlaşılan akut dönemdeki böbrek damar yatağındaki NE kasılma yanıtlarındaki bu artışın, daha uzun bir süre sonrasında kronik olarak da devam edip etmediği ile riosiguat uygulamasını takiben gerek akut gerekse kronik dönemde böbrek damar yatağındaki moleküler mekanizmalarda meydana gelebilecek olası değişiklikler ileri çalışmalarda incelenebilecek ilginç bir araştırma konusu olabilir. Literatürde tavşanlarda yapılan böbrek İ-R modelinde, renal arter kasılma cevapları artan konsantrasyonlarda uygulanan AT-II ile organ banyosunda değerlendirilmiş ve anlamlı fark bulunmamıştır (159). Çalışmamızda, izole perfüze

böbrek düzeneğinde böbrek vasküler yatağının tek doz AT-II infüzyonuna verdiği kasılma cevaplarında literatür ile uyumlu olarak gruplar arası anlamlı fark bulunmadı. Laboratuvarımızda gerçekleştirilen önceki izole perfüze böbrek çalışmalarında AT-II'nin artan dozlarla izole perfüze böbrek düzeneğinde oluşturduğu böbrek damar yatağı kasılma yanıtlarının geri döndürülemediği anlaşılmış, bu nedenle tek doz AT-II uygulanmıştır. Literatürde yapılan bir sıçan böbrek İ-R çalışmasında (60 dakika iskemi / 120 saat reperfüzyon), böbrek dokusunda ölçülen AT-II seviyelerinde 24.saatten sonra artış görülmeye başlamıştır. Aynı çalışmada, 60 dakikalık renal iskemiden hemen sonra proksimal tübüler anjiyotensin-1 (AT-1) reseptörlerinin mRNA ekspresyonunda bir azalma saptanmış ve sham-kontrol grubuna göre reperfüzyondan 1, 3 ve 24 saat sonra AT-1 reseptörü mRNA ekspresyonunun önemli ölçüde azalmaya devam ettiği gösterilmiştir (160). Bizim çalışmamızda İ-R grubunda AT-II ile böbrek damar yatağında kasılma yanıtlarında bir artış olmamasının nedeni olarak AT-1 reseptör ekspresyonlarındaki azalma gösterilebilir. Ayrıca, riosigat verilen İR-Rio ve Rio gruplarında, böbrek damar yatağındaki AT-II kasılma yanıtlarında anlamlı fark görülmemesi böbrek damar yatağındaki düzeltici nöronal veya diğer mekanizmalara bağlı olabilir.

ACh'nin sıçan izole perfüze böbreğindeki vazodilatör etkisi NO oluşumuna bağlıdır (6). ACh, endotelde NO üretimini artırarak vasküler düz kas gevşemesine aracılık eder. İ-R hasarında ise bu mekanizma bozulur (161). İ-R sonrası endotel disfonksiyonu gelişiminde temel neden NO üretimi ve biyoyararlanımında görülen azalmadır. Bu azalma eNOS enziminde görülen kenetsizleşme ve mevcut NO'nun süperoksit radikali ile birleşerek peroksinitrit oluşturma eğiliminden kaynaklanmaktadır (162). Tavşanlarda yapılan böbrek İ-R modelinde, renal arter gevşeme cevapları organ banyosunda metoksamin ön kasılması sonrasında artan konsantrasyonlarda uygulanan ACh ile değerlendirilmiş ve ACh gevşeme yanıtlarının kontrol grubuna göre İ-R grubunda anlamlı ölçüde azaldığı gösterilmiştir (159). Sıçanlarda yapılan pulmoner İ-R çalışmasında, kontrol grubuna göre İ-R grubunda pulmoner arter preparatlarında konsantrasyona-bağımlı ACh gevşeme yanıtlarında anlamlı bir azalma olduğu gösterilmiştir (163). İ-R hasarının pulmoner arter fonksiyon bozukluğu ile

sonuçlanması üzerine endotel ve NO'nun bu fonksiyon bozukluğundaki rolünün değerlendirilebilmesi için pulmoner arterden endotel tabakası mekanik olarak çıkartılarak, kontrol ve İ-R gruplarında ACh gevşeme yanıtlarının azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada, pulmoner arter preparatlarının L-NAME ile inkübasyonu sonrası, her iki grupta da ACh aracılı gevşeme yanıtlarının kaybolduğu gösterilmiştir (153). Çalışmamızda, sham grubu ile kıyaslandığında İR grubunda ACh gevşeme yanıtlarının azalması beklenildiği şekilde literatür sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Bir sıçan korpus kavernozum İ-R çalışmasında, korpus kavernozum preparatları ile yapılan organ banyosu deneylerinde kümülatif uygulanan ACh'nin oluşturduğu vasküler gevşeme yanıtlarının, kontrol grubuna kıyasla İ-R grubunda anlamlı ölçüde azaldığı gösterilmiştir (154). Başka bir çalışmada sıçanlarda kronik hipoksiyle oluşturulan pulmoner hipertansiyon modelinde, sham-opere gruba göre riosiguat tedavisi uygulanan grupta pulmoner arterde konsantrasyona-bağımlı ACh gevşeme yanıtlarında artış olduğu gösterilmiştir (164) Literatürde yapılan bir sıçan pulmoner hipertansiyon modelinde, riosiguat tedavisi uygulanan sıçanlarda akciğer dokusunda Western blot analiziyle cGMP ve sGC enzim düzeyinde artış gösterilmiştir (144). İzole perfüze böbrek düzeneğinde izole tek bir arterin değil bütün vasküler yatağın fonksiyonel yanıtlarının değerlendirilmesi renal fonksiyonel yanıtlar açısından önemli olmakla birlikte, riosiguat verilen İR-Rio ve Rio gruplarında görülen ACh gevşeme yanıtlarındaki artış literatürdeki bu sonuçlar ile benzerlik göstermektedir. Bu bilgilerle göre riosiguat tedavisi uygulanan gruplarda, riosiguatın sGC enzimini doğrudan stimüle etmesi ayrıca hem mevcut NO'yu enzime karşı duyarlı hale getirmesi hem de NO üretiminde artışa yol açtığı düşünülürse, riosiguatın renal vasküler yatakta hem endotele bağımlı hem de endotelden bağımsız vasküler gevşeme yanıtlarını artırdığı söylenebilir.

İ-R sonrası böbrek vasküler yatağı, sempatik sinir sistemi ve renin-anjiyotensin sisteminin (RAS) aktivasyonundan etkilenebilir ve bunların sonucunda vasküler dirençte artış görülebilir (160). Endojen üretilen NO, vasküler düz kas hücrelerine girerek sGC / cGMP / protein kinaz G (PKG) yoluyla gevşemeyi başlatır. İ-R sonrası bu yolda bozulma meydana gelerek vasküler gevşeme yanıtlarında azalmaya neden

olabilir (165). Sıçan izole interlober arterlerinde yapılan bir hipoksi/reoksijenasyon çalışmasında, izole edilen interlober arterlere 60 dakika hipoksi ve 10 dakika reoksijenasyon uygulanmıştır. Hipoksi/reoksijenasyon sonrasında ACh aracılı gevşeme yanıtlarında azalma olduğu ve L-NAME varlığında bu azalan gevşeme yanıtlarının değişmediği gösterilmiştir. Ayrıca, endotel bağımlı gevşeme yanıtlarını değerlendirmek için kullanılan antagonist ve inhibitör ajanların ACh gevşeme yanıtları üzerinde bir farklılık yaratmadığı izlenmiştir. Sonuç olarak hipoksi/reoksijenasyonun interlober arter gevşeme yanıtlarında oluşturduğu azaltıcı etkinin endotel bağımlı vazodilatasyon mekanizmalarından kaynaklanmadığı gösterildikten sonra endotelden bağımsız gevşeme mekanizmalarındaki bozulmanın bir rolünün olup olmadığı NO donörü olan SNP uygulaması ve cGMP / sGC / PKG yolağının inhibisyonuyla araştırılmıştır. 1H- [1,2,4] Oksadiazolo[4,3-a] kuinokalin-1 (ODQ) kullanılarak sGC enzim inhibisyonu ile H/R'nin oluşturduğu bozulan gevşeme yanıtlarının tersine çevrildiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada cGMP konsantrasyonlarının anlamlı olarak azaldığı saptanmış ve sonuç olarak, hipoksi/reoksijenasyonun neden olduğu sGC fonksiyon bozukluğunun cGMP konsantrasyonlarında azalmaya neden olarak interlober arterlerde gevşeme yanıtlarında azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (166). Yapılan bu çalışmada uygulanan hipoksi/reoksijenasyon modeli, çalışmamızda uygulanan İ-R hasarı modelinin izole damar üzerinde *in vitro* olarak uygulanmasıdır. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar bu çalışma ile uyumlu bulunmuştur. Çalışmamızda her ne kadar tek bir vasküler yapı kullanılsa da böbrek vasküler yatağı bir bütün olarak değerlendirilmiş olup elde edilen sonuçlarda, İR grubunda doza bağımlı SNP gevşeme yanıtlarının sham grubuna göre anlamlı olarak azaldığı, riosigat ön tedavisi verilen İR-Rio grubunda ise azalan SNP gevşeme yanıtlarının literatür bilgileri ile uyumlu bir şekilde anlamlı olarak arttığı gösterildi. SNP, güçlü bir NO donörü ajandır (167). Riosigat verilen gruplarda doza bağımlı SNP gevşeme yanıtlarındaki artış özellikle doğrudan sGC enziminin uyarılmasına ve sGC enziminin NO'ya duyarlılığını artırmasından kaynaklandığı düşünülebilir.

ABH gelişiminin en önemli nedeni olan böbrek İ-R hasarı, otoregülasyon kaybı, renal vasküler direnç (RVR) artışı ve renal kan akımındaki azalma ile ilişkilidir (168).

Renal arter kan akımı, böbrek fonksiyonunun önemli bir parametresidir (169). Böbrekte İ-R sonrası endotel hücre hasarı ve fonksiyon bozukluğu sonucu olarak renal arter kan akımı azalır (170). RVR, OAB'nin renal arter kan akım hızına bölünmesi ile elde edilir (171). Renal İ-R sonrası RVR'deki yükselişin temel sebebi AT-II ve endotelin-I gibi vazokonstriktör ajanların üretimindeki aşırı artıştır (172). ROS üretiminde artış sonucu, vazokonstriktör ve vazodilatör maddelerin etkilerinde meydana gelen değişim RVR'de artışa neden olabilir (173). Yapılan bir sıçan böbrek İ-R modelinde, renal arter kan akım hızının azaldığı, OAB değerlerinin değişmediği ve RVR değerlerinin arttığı gösterilmiştir (6). Benzer şekilde çalışmamızda elde edilen İ-R sonrası akut dönemdeki renal arter kan akımı değerlerindeki azalma literatür sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. İR grubunda renal arter kan akımındaki azalmanın endotel hücre hasarı sonucu bozulan vazodilatör yanıtların böbrek vasküler yatakta RVR'yi arttırmamasından kaynaklandığı söylenebilir. İ-R sonrasında gelişen endotel disfonksiyonu ve vazodilatör kapasitedeki değişikliklerin merkezinde NO-sGC-cGMP sinyal yolu yer alır. Reperfüzyonu takiben bazal ve agonist aracılı NO üretimi azalır (174). Dolayısıyla fizyolojik koşullarda NO'nun bazal seviyesi böbrek kan akımının düzenlenmesi için önemlidir (175). Yapılan bir sıçan kardiyak transplantasyon modelinde, cerrahi işlemden 2 saat önce oral gavaj yoluyla verilen riosiguatın sham-kontrol grubuna göre OAB'yi anlamlı ölçüde azalttığı gösterilmiştir (143). Bu bilgiler doğrultusunda elde ettiğimiz sonuçlar göstermektedir ki, riosiguat tedavisi sonucunda İ-R sonrasında azalan renal arter kan akımının normal seviyelere gelmesi, özellikle böbrek damar yatağında bozulan gevşeme yanıtlarındaki düzelmeye bağlı olarak RVR'de meydana gelen azalmayı işaret etmektedir. Riosiguatın renal kan akım hızındaki oluşturduğu bu düzeltici etkinin sGC enzimini doğrudan uyarması ve bu enzimin NO'ya duyarlılığını artırması sonucu vazodilatör mekanizmayı aktive etmesinden kaynaklandığı söylenebilir. Tüm gruplarda görülen başlangıçta artan renal arter kan akım hızının belirli bir süreden sonra belirli bir seviyede sabitlenerek kararlı duruma gelmesi durumu, cerrahi işlem sırasında görülen ısı kaybından ve hayvanların belirli bir süre cerrahi işleme maruz kalmasından kaynaklandığı düşünülebilir.

Böbrek doku perfüzyonu, renal arter kan akım hızı ve RVR ile bağlantılı mekanizmalar içerir. İ-R gibi RVR'yi artıran durumlar böbrek doku perfüzyonunu bozmaktadır. Çalışmamızda elde edilen İ-R sonrasındaki böbrek doku perfüzyonundaki azalma literatürde yapılan bir çalışma ile uyumlu bulunmuştur (145). Yapılan başka bir çalışmada, NOS inhibitörünün renal artere infüzyonu sonucu renal kortikal ve papiller kan akımının azaldığı gösterilmiştir (176). Yapılan sıçan renal İ-R hasarı modelinde, korteks ve medullada azalan böbrek doku perfüzyonunun nitrat tedavisi ile düzeldiği gösterilmiştir. Çalışmamızda böbrek doku perfüzyonu ölçümünde elde edilen sonuçlar başlangıç değerine göre yüzdesel değişimi ifade etmektedir. Çalışmamızda riosiguat ön tedavisinin, İ-R sonrasında akut dönemde azalan böbrek doku perfüzyonunu anlamlı olarak arttırdığı gösterildi. Bununla birlikte böbrek doku perfüzyonundaki değişim oranlarının renal kan akımı değerlerindeki değişim süreci ile korele bir şekilde seyrettiği izlenmiştir. Literatür bilgileri doğrultusunda, İ-R sonrası bozulan NO üretimi ve duyarlılığının, riosiguat ön tedavisi ile düzeldiği ve bu etkinin böbrek doku perfüzyonunu iyileştirdiği söylenebilir. Riosiguat ön tedavisi sonrasında böbrek doku perfüzyonundaki artış oranının, renal arter kan akım hızındaki artış oranından daha fazla olduğu görülmektedir. Bu durum böbrek vasküler damar yatağında riosiguat sonrasında artan gevşeme yanıtlarının İ-R sonrasında düzelen renal arter kan akımına ilave olarak doku perfüzyonun daha iyi sağlanmasına olan katkısı ile açıklanabilir.

Sonuçlarımıza göre, riosiguat tedavisi hem NO bağımlı gevşeme yanıtlarını düzelterek hem de NO'dan bağımsız olarak doğrudan sGC enzimini stimüle ederek böbrek damar yatağında azalan endotel-bağımlı ve endotelden bağımsız gevşeme yanıtlarını düzeltip azalan renal arter kan akım hızını ve böbrek doku perfüzyonunu artırarak normal seviyelere getirmektedir. Buna bağlı olarak İ-R sonrasında azalan kan akımı ve doku perfüzyonunun devamında gelişebilecek ABH ve ABY ile mortalite artışı üzerine de koruyucu etkileri olabileceği düşünülebilir.

IL-1, birçok akut inflamatuvar sürecin temel bileşenidir. Özellikle İ-R hasarı sonrası dokuda hücresel ve patolojik değişimlerin başlamasından sorumlu tutulmaktadır. Çalışmamızda İR grubunda IL-1 β düzeyleri sham grubu değerlerine

göre artış eğilimi göstermesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış, bu sonuçlar literatür de yapılan uzun süreli bir İ-R hasarı çalışması ile uyumlu görülmemiştir (177). Bu durumun temel sebeplerinden biri uygulanan İ-R modeli ve modelin süresi olarak düşünülebilir. Proinflamatuvar sitokin saliverilmesi daha çok kronik İ-R hasarı durumlarında görülmektedir (178). İR grubuyla karşılaştırılınca, İR-Rio ve Rio gruplarında IL-1 β seviyelerinde azalma eğilimi saptanmış ancak istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir. Yapılan bazı çalışmalar riosiguatın İ-R hasarı sonrası proinflamatuvar sitokin düzeylerini azalttığını göstermektedir (14). Bununla birlikte uzun süreli renal İ-R hasarı sonrasında antiinflamatuvar bir sitokin olan IL-10 seviyelerinin arttığı bilinmektedir. Yapılan uzun süreli bir böbrek İ-R hasarı modelinde (45 dakika iskemi / 7 gün reperfüzyon), reperfüzyondan sonraki 1. günden 7. güne kadar IL-10 protein ekspresyonunun belirgin şekilde arttığı ve 3. günde en yüksek düzeye ulaştığı gösterilmiştir (179). İR ve sham grupları arasında IL-10 düzeyinde anlamlı fark görülmemesi, IL-10 düzeylerinde artışın en erken İ-R hasarından 1 gün sonra başlamasıyla ve uyguladığımız İ-R hasarı modelinin kısa süreli olmasından kaynaklanabilir.

Çalışmamızda riosiguat verilen her iki grupta da artan IL-10 seviyeleri değerlendirildiğinde riosiguatın antiinflamatuvar süreci başlattığı anlaşılmaktadır. Yapılan bir çalışmada IL-10'un, IL-1, TNF-a, IL-6 ve IL-18 gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir (180). Sonuçlarımıza göre riosiguatın IL-10 düzeylerini artırarak antiinflamatuvar süreci aktive edip IL-1 β gibi proinflamatuvar yolak ürünlerindeki artışı azalttığı düşünülebilir. Yapılan bir sıçan böbrek İ-R hasarı çalışmasında, IL-10 enjeksiyonunun ABH'den koruyabileceği gösterilmiştir (181). Ayrıca, sıçanlarda nefrotoksik bir ilaç olan sisplatin uygulaması sonrası oluşan ABH'ye karşı renal dendritik hücrelerde üretilen IL-10'un koruyucu bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (182). Lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen monosit çalışmasında, sGC aktivatörü olan YC-1 ön tedavisi LPS grubuna uygulandığında, YC-1 uygulanan LPS grubunda dendritik hücrelerde IL-10 düzeylerinde LPS grubuna göre anlamlı bir artış olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, sGC enzim inhibitörü olan ODQ ve PKG inhibitörü olan KT5823'ün, YC-1 uygulanan grupta IL-10 düzeylerinde meydana gelen artışı geri

çevirmediği gösterilmiştir (183). Bu sonuçlara göre, sGC stimülatörleri ve aktivatörlerinin cGMP'den bağımsız farklı bir yolak ya da mekanizma üzerinden IL-10 düzeylerinde artış yaptığı söylenebilir. Farklı bir çalışmada, LPS enjeksiyonundan sonra IL-10^{-/-} farelerin karotis arterinde ACh gevşeme yanıtlarının bozulması, fakat IL-10^{+/+} farelerde ise gevşeme yanıtlarında bir değişim görülmemesi, IL-10'un akut inflamasyon sırasında endotel-bağımlı gevşeme yanıtlarını koruduğunu göstermiştir. Ayrıca, IL-10^{-/-} farelerin karotis arterlerinde bozulan ACh gevşeme yanıtlarının, 45 dakikalık polietilen glikol süperoksit dismutaz (PEG-SOD) inkübasyonu sonrası normale döndüğü gösterilmiştir. Sonuçta, LPS tedavisinden sonra IL-10^{-/-} farelerde ACh gevşeme yanıtlarındaki bozulmaya süperoksit radikalinin aracılık ettiği gösterilmiştir (184). Sonuçlarımıza göre riosigat uygulanan gruplarda artan IL-10 düzeylerinin, antiinflamatuvar etkiye ek olarak izole perfüze böbrek düzeneği ile ölçülen renal vasküler yatakta bozulan NO bağımlı (endotel bağımlı) gevşeme yanıtlarını iyileştirmesinde de katkısı olabilir.

Böbrekte İ-R hasarı sonrası çeşitli patolojik değişimler beklenen bir sonuç olup sebebi doku hipoperfüzyonu, azalan kan akımı ve vasküler hasar olabileceği gibi kontrolsüz inflamasyon, apoptoz ve koagülasyon süreçlerindeki bozulmalarda etiolojide rol oynayabilir (9). Çalışmamızda oluşturulan böbrek İ-R modelinde ABH, histopatolojik olarak böbrek doku incelemelerinde gösterilmiş olup sonuçlar literatürde yapılan benzer çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur (185, 186). Farklı bir doku olarak yapılan bir testiküler İ-R çalışmasında, riosigat tedavisinin histopatolojik hasarı düzelttiği gösterilmiştir (14). Farelerde yapılan bir MI modelinde ise, iskemi sonrası kalpte oluşan enfarkt alanının riosigat tedavisi ile anlamlı ölçüde azaldığı MRG ile gösterilmiştir (187). Literatürde sıçanda tek taraflı üreter ligasyonu yöntemiyle oluşturulan uzun süreli renal hasar modeli histopatolojisinde, riosigatın kolajen-1, TGF- β , CTGF, α -SMA ve vimentinin protein sentezlerini azaltarak antifibrotik etki gösterdiği, sonucunda da tübülointerstisyel fibrozisi ve kolajen birikimini azaltarak böbrek hasarı üzerine düzeltici etkisi olduğu gösterilmiştir (9). Çalışmamızda ise uyguladığımız renal İ-R modelinde riosigat ön tedavisinin böbrekte düzelmeye eğilimi gösterdiği ancak bununla birlikte istatistiksel olarak hem sham grubu ile hem de İR

grubu ile aralarında anlamlı bir fark bulunmadığı görülmüştür. Riosiguat verilen gruplar ile sham grubu arasında böbrek histopatoloji sonuçları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemesi, riosiguatın böbrek histopatolojisinde ek bir bozulmaya ve hasara yol açmadığının göstergesi olabilir. Bu durum riosiguat ön tedavisinin İ-R sonrasında akut dönemde gelişen histopatolojik hasar üzerine olumlu etkileri olduğunu şeklinde yorumlanabilir. Histopatolojik bulgularımızın belirtilen literatür sonuçları ile tam uyumlu olmaması, başta İ-R süresi ve model farklılığı gibi değişkenler ile birlikte riosiguatın veriliş miktarı, veriliş yolu gibi farklılıklardan da kaynaklanıyor olabilir. İlginç olarak bu çalışmada sadece riosiguat verilen hayvanların böbreklerinde glomerüllerin genelde normal olduğu ancak sham grubundan farklı olarak tübül epitelinde hafif şişmenin görüldüğü izlendi. Riosiguatın bu etkisiyle ilgili olarak benzer bir duruma daha önce literatürde rastlanmamış olup, bu durumun riosiguatın erken dönemde böbrekte farklı kompensatuar mekanizmalar üzerine etkili olduğu şeklinde speküle edilebilir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada sGC stimülatörü olan riosiguatın sıçan böbrek İ-R hasarı modelinde renal ve fizyolojik fonksiyonlara etkisi incelenmiştir. Sıçan böbrek İ-R hasarı modelinde riosiguat ön tedavisinin, ABH ile birlikte böbrek damar yatağı, renal arter kan akım hızı ve böbrek doku perfüzyonundaki değişim gibi fonksiyonel cevapları ve IL-1 β ve IL-10 ELISA deneyleri gibi biyokimyasal sonuçları üzerine etkileri karşılaştırılarak değerlendirilmiştir, elde edilen sonuçlar ve öneriler şunlardır:

1. Sıçan böbrek İ-R hasarında akut dönemde azalan renal arter kan akım hızı üzerine riosiguat ön tedavisinin düzeltici etkileri vardır.
2. Sıçan böbrek İ-R hasarında akut dönemde azalan böbrek doku perfüzyonu üzerine riosiguat ön tedavisinin düzeltici etkileri vardır.
3. Sıçan böbrek İ-R hasarında böbrek damar yatağında riosiguat ön tedavisinin azalan ACh gevşeme yanıtları üzerine düzeltici etkileri vardır.
4. Sıçan böbrek İ-R hasarında böbrek damar yatağında riosiguat ön tedavisinin azalan SNP gevşeme yanıtları üzerine düzeltici etkileri vardır.
5. Riosiguat akut dönemde IL-10 düzeylerini artırır.

ABH, sıklıkla çoklu organ yetmezliği ve kronik böbrek hastalığına doğru ilerleyen mortalitede 2 ila 15 kat artışa neden olan, hastanede yatan hastalarda sıklıkla görülen bir komplikasyondur.

Yoğun bakım ünitesinde yatan hastalarda ve organ nakli alıcılarında görülebilen ve yüksek morbidite ve mortaliteye neden olan renal İ-R hasarı, ABH'nin önemli bir nedenidir ve uzun süreli böbrek fonksiyon bozukluğunun önemli bir belirleyicisidir. Özellikle renal İ-R sonrası akut dönemde azalan böbrek kan akımı ilerleyen süreçlerde de devam edip İ-R hasarına yol açarak ABH gelişmesine neden olur. ABH ise tedavi edilmediği takdirde mortalitesi yüksek olan kronik böbrek yetmezliğine yol açabilir.

Bu çalışmada halen günümüzde ruhsatlı bir ilaç olarak kullanılmakta olan riosiguat n tedavisinin renal İ-R modelinde akut dönemde bozulan böbrek damar yatağı gevşeme yanıtlarını artırarak azalan renal kan akımı ve doku perfüzyonunu düzelttiği gösterildi.

Elde edilen sonuçlar, İ-R sonucu ABH gelişme riski bulunan hastalarda ileride yapılacak klinik çalışmalar için bir temel oluşturmaktadır. Yapılacak klinik çalışmalarda olumlu sonuçlar elde edilmesi durumunda İ-R hasarına bağlı ABH gelişme riski olan hastalarda riosiguat koruyucu bir tedavi yöntemi olarak kullanılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Eltzhig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med.* 2011;17(11):1391-401.
2. Levy EM, Viscoli CM, Horwitz RI. The effect of acute renal failure on mortality. A cohort analysis. *JAMA.* 1996;275(19):1489-94.
3. Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(8):2199-210.
4. Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(6):1503-20.
5. Sutton TA, Fisher CJ, Molitoris BA. Microvascular endothelial injury and dysfunction during ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* 2002;62(5):1539-49.
6. Cristol JP, Thiernemann C, Mitchell JA, Walder C, Vane JR. Support of renal blood flow after ischaemic-reperfusion injury by endogenous formation of nitric oxide and of cyclo-oxygenase vasodilator metabolites. *Br J Pharmacol.* 1993;109(1):188-94.
7. Ramaswamy D, Corrigan G, Polhemus C, Boothroyd D, Scandling J, Sommer FG, et al. Maintenance and recovery stages of postischemic acute renal failure in humans. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002;282(2):F271-80.
8. Sandner P, Follmann M, Becker-Pelster E, Hahn MG, Meier C, Freitas C, et al. Soluble GC stimulators and activators: Past, present and future. *Br J Pharmacol.* 2021.
9. Sravani S, Saifi MA, Godugu C. Riociguat ameliorates kidney injury and fibrosis in an animal model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;530(4):706-12.
10. Schermuly RT, Ghofrani HA, Wilkins MR, Grimminger F. Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol.* 2011;8(8):443-55.
11. Ghofrani HA, Grimminger F. Soluble guanylate cyclase stimulation: an emerging option in pulmonary hypertension therapy. *Eur Respir Rev.* 2009;18(111):35-41.
12. Wiest R, Groszmann RJ. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough. *Hepatology.* 2002;35(2):478-91.
13. Joshi CN, Martin DN, Fox JC, Mendeleev NN, Brown TA, Tulis DA. The soluble guanylate cyclase stimulator BAY 41-2272 inhibits vascular smooth muscle growth through the cAMP-dependent protein kinase and cGMP-dependent protein kinase pathways. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;339(2):394-402.
14. Seker U, Kavak DE, Guzel BC, Baygeldi SB, Yuksel M, Unay Demirel O, et al. Targeting soluble guanylate cyclase with Riociguat has potency to alleviate testicular ischaemia reperfusion injury via regulating various cellular pathways. *Andrologia.* 2022;54(11):e14616.
15. Zoccali C. Endothelial dysfunction and the kidney: emerging risk factors for renal insufficiency and cardiovascular outcomes in essential hypertension. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(4 Suppl 2):S61-3.
16. Sandner P, Stasch JP. Anti-fibrotic effects of soluble guanylate cyclase stimulators and activators: A review of the preclinical evidence. *Respir Med.* 2017;122 Suppl 1:S1-S9.
17. Liu R, Kang Y, Chen L. Activation mechanism of human soluble guanylate cyclase by stimulators and activators. *Nat Commun.* 2021;12(1):5492.
18. [Available from:
https://en.wikipedia.org/wiki/Kidney#/media/File:Blausen_0592_KidneyAnatomy_01.png.
19. Radi ZA. Kidney Pathophysiology, Toxicology, and Drug-Induced Injury in Drug Development. *Int J Toxicol.* 2019;38(3):215-27.

20. Loutzenhiser R, Griffin K, Williamson G, Bidani A. Renal autoregulation: new perspectives regarding the protective and regulatory roles of the underlying mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006;290(5):R1153-67.
21. Bhaskar A, Oommen V. A simple model for demonstrating the factors affecting glomerular filtration rate. *Adv Physiol Educ*. 2018;42(2):380-2.
22. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 2007;357(11):1121-35.
23. Baines CP. The molecular composition of the mitochondrial permeability transition pore. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;46(6):850-7.
24. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*. 2000;190(3):255-66.
25. Soares ROS, Losada DM, Jordani MC, Evora P, Castro ESO. Ischemia/Reperfusion Injury Revisited: An Overview of the Latest Pharmacological Strategies. *Int J Mol Sci*. 2019;20(20).
26. Ovechkin AV, Lominadze D, Sedoris KC, Robinson TW, Tyagi SC, Roberts AM. Lung ischemia-reperfusion injury: implications of oxidative stress and platelet-arteriolar wall interactions. *Arch Physiol Biochem*. 2007;113(1):1-12.
27. Contreras L, Drago I, Zampese E, Pozzan T. Mitochondria: the calcium connection. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1797(6-7):607-18.
28. Croall DE, Ersfeld K. The calpains: modular designs and functional diversity. *Genome Biol*. 2007;8(6):218.
29. Wu HH, Huang CC, Chang CP, Lin MT, Niu KC, Tian YF. Heat Shock Protein 70 (HSP70) Reduces Hepatic Inflammatory and Oxidative Damage in a Rat Model of Liver Ischemia/Reperfusion Injury with Hyperbaric Oxygen Preconditioning. *Med Sci Monit*. 2018;24:8096-104.
30. Nastos C, Kalimeris K, Papoutsidakis N, Tasoulis MK, Lykoudis PM, Theodoraki K, et al. Global consequences of liver ischemia/reperfusion injury. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:906965.
31. Kalogeris T, Bao Y, Korthuis RJ. Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biol*. 2014;2:702-14.
32. Granger DN, Korthuis RJ. Physiologic mechanisms of postischemic tissue injury. *Annu Rev Physiol*. 1995;57:311-32.
33. Boros M. Microcirculatory dysfunction during intestinal ischemia-reperfusion. *Acta Physiol Hung*. 2003;90(4):263-79.
34. Rosario HS, Waldo SW, Becker SA, Schmid-Schonbein GW. Pancreatic trypsin increases matrix metalloproteinase-9 accumulation and activation during acute intestinal ischemia-reperfusion in the rat. *Am J Pathol*. 2004;164(5):1707-16.
35. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Ischemia/Reperfusion. *Compr Physiol*. 2016;7(1):113-70.
36. Granger DN. Ischemia-reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. *Microcirculation*. 1999;6(3):167-78.
37. Furchgott RF, Carvalho MH, Khan MT, Matsunaga K. Evidence for endothelium-dependent vasodilation of resistance vessels by acetylcholine. *Blood Vessels*. 1987;24(3):145-9.
38. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(2):168-75.
39. Hein TW, Zhang C, Wang W, Chang CI, Thengchaisri N, Kuo L. Ischemia-reperfusion selectively impairs nitric oxide-mediated dilation in coronary arterioles: counteracting role of arginase. *Faseb J*. 2003;17(15):2328-30.

40. Kuo L, Hein TW. Vasomotor regulation of coronary microcirculation by oxidative stress: role of arginase. *Front Immunol.* 2013;4:237.
41. Wang DZ, Jones AW, Wang WZ, Wang M, Korthuis RJ. Soluble guanylate cyclase activation during ischemic injury in mice protects against postischemic inflammation at the mitochondrial level. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2016;310(9):G747-56.
42. Yang S, Chou WP, Pei L. Effects of propofol on renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Exp Ther Med.* 2013;6(5):1177-83.
43. Ullrich V, Brune B, Hecker G, Schmidt KU, Mulsch A, Busse R. Physiological targets of superoxide anion and hydrogen peroxide in reperfusion injury. *Free Radic Res Commun.* 1989;7(3-6):265-74.
44. Brune B, Schmidt KU, Ullrich V. Activation of soluble guanylate cyclase by carbon monoxide and inhibition by superoxide anion. *Eur J Biochem.* 1990;192(3):683-8.
45. Weber M, Lauer N, Mulsch A, Kojda G. The effect of peroxynitrite on the catalytic activity of soluble guanylyl cyclase. *Free Radic Biol Med.* 2001;31(11):1360-7.
46. Kokura S, Wolf RE, Yoshikawa T, Granger DN, Aw TY. Molecular mechanisms of neutrophil-endothelial cell adhesion induced by redox imbalance. *Circ Res.* 1999;84(5):516-24.
47. Linfert D, Chowdhry T, Rabb H. Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury. *Transplant Rev (Orlando).* 2009;23(1):1-10.
48. Singh I, Gulati S, Orak JK, Singh AK. Expression of antioxidant enzymes in rat kidney during ischemia-reperfusion injury. *Mol Cell Biochem.* 1993;125(2):97-104.
49. Lou T, Jiang W, Xu D, Chen T, Fu Y. Inhibitory Effects of Polydatin on Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Cells. *Inflammation.* 2015;38(3):1213-20.
50. Collino M, Rogazzo M, Pini A, Benetti E, Rosa AC, Chiazza F, et al. Acute treatment with relaxin protects the kidney against ischaemia/reperfusion injury. *J Cell Mol Med.* 2013;17(11):1494-505.
51. Manukyan MC, Alvernaz CH, Poynter JA, Wang Y, Brewster BD, Weil BR, et al. Interleukin-10 protects the ischemic heart from reperfusion injury via the STAT3 pathway. *Surgery.* 2011;150(2):231-9.
52. Hamacher-Brady A, Brady NR, Gottlieb RA. The interplay between pro-death and pro-survival signaling pathways in myocardial ischemia/reperfusion injury: apoptosis meets autophagy. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2006;20(6):445-62.
53. Wang M, Weng X, Chen H, Chen Z, Liu X. Resveratrol inhibits TNF-alpha-induced inflammation to protect against renal ischemia/reperfusion injury in diabetic rats. *Acta Cir Bras.* 2020;35(5):e202000506.
54. Lakhani SA, Masud A, Kuida K, Porter GA, Jr., Booth CJ, Mehal WZ, et al. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science.* 2006;311(5762):847-51.
55. D'Amelio M, Cavallucci V, Cecconi F. Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death Differ.* 2010;17(7):1104-14.
56. Cantara S, Donnini S, Giachetti A, Thorpe PE, Ziche M. Exogenous BH4/Bcl-2 peptide reverts coronary endothelial cell apoptosis induced by oxidative stress. *J Vasc Res.* 2004;41(2):202-7.
57. Mace EH, Kimlinger MJ, Billings FTt, Lopez MG. Targeting Soluble Guanylyl Cyclase during Ischemia and Reperfusion. *Cells.* 2023;12(14).
58. Pomerantz BJ, Reznikov LL, Harken AH, Dinarello CA. Inhibition of caspase 1 reduces human myocardial ischemic dysfunction via inhibition of IL-18 and IL-1beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(5):2871-6.

59. Yassin MM, Harkin DW, Barros D'Sa AA, Halliday MI, Rowlands BJ. Lower limb ischemia-reperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction. *World J Surg.* 2002;26(1):115-21.
60. Heusch G. Myocardial ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection in perspective. *Nat Rev Cardiol.* 2020;17(12):773-89.
61. L L, X W, Z Y. Ischemia-reperfusion Injury in the Brain: Mechanisms and Potential Therapeutic Strategies. *Biochem Pharmacol (Los Angel).* 2016;5(4).
62. Latour LL, Kang DW, Ezzeddine MA, Chalela JA, Warach S. Early blood-brain barrier disruption in human focal brain ischemia. *Ann Neurol.* 2004;56(4):468-77.
63. Rampes S, Ma D. Hepatic ischemia-reperfusion injury in liver transplant setting: mechanisms and protective strategies. *J Biomed Res.* 2019;33(4):221-34.
64. Ibrahim SG, El-Emam SZ, Mohamed EA, Abd Ellah MF. Dimethyl fumarate and curcumin attenuate hepatic ischemia/reperfusion injury via Nrf2/HO-1 activation and anti-inflammatory properties. *Int Immunopharmacol.* 2020;80:106131.
65. Shiva N, Sharma N, Kulkarni YA, Mulay SR, Gaikwad AB. Renal ischemia/reperfusion injury: An insight on in vitro and in vivo models. *Life Sci.* 2020;256:117860.
66. Kellum JA, Romagnani P, Ashuntantang G, Ronco C, Zarbock A, Anders HJ. Acute kidney injury. *Nat Rev Dis Primers.* 2021;7(1):52.
67. Sancaktutar AA, Bodakci MN, Hatipoglu NK, Soylemez H, Basarili K, Turkcu G. The protective effects of pomegranate extracts against renal ischemia-reperfusion injury in male rats. *Urol Ann.* 2014;6(1):46-50.
68. Malek M, Nematbakhsh M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. *J Renal Inj Prev.* 2015;4(2):20-7.
69. Paller MS, Hoidal JR, Ferris TF. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *J Clin Invest.* 1984;74(4):1156-64.
70. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol.* 1993;23(1):21-48.
71. Versteilen AM, Korstjens IJ, Musters RJ, Groeneveld AB, Sipkema P. Rho kinase regulates renal blood flow by modulating eNOS activity in ischemia-reperfusion of the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006;291(3):F606-11.
72. Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest.* 2004;114(1):5-14.
73. Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest.* 2011;121(11):4210-21.
74. Blantz RC, Deng A, Miracle CM, Thomson SC. Regulation of kidney function and metabolism: a question of supply and demand. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2007;118:23-43.
75. Koo DD, Welsh KI, West NE, Channon KM, Penington AJ, Roake JA, et al. Endothelial cell protection against ischemia/reperfusion injury by lecithinized superoxide dismutase. *Kidney Int.* 2001;60(2):786-96.
76. Gui Y, Loutzenhiser R, Hollenberg MD. Bidirectional regulation of renal hemodynamics by activation of PAR1 and PAR2 in isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003;285(1):F95-104.
77. Ortiz A, Sanchez-Nino MD, Izquierdo MC, Martin-Cleary C, Garcia-Bermejo L, Moreno JA, et al. Translational value of animal models of kidney failure. *Eur J Pharmacol.* 2015;759:205-20.
78. Faller DV. Endothelial cell responses to hypoxic stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1999;26(1):74-84.
79. Legrand M, Mik EG, Johannes T, Payen D, Ince C. Renal hypoxia and dysoxia after reperfusion of the ischemic kidney. *Mol Med.* 2008;14(7-8):502-16.

80. Eardley KS, Kubal C, Zehnder D, Quinkler M, Lepenies J, Savage CO, et al. The role of capillary density, macrophage infiltration and interstitial scarring in the pathogenesis of human chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2008;74(4):495-504.
81. Evans RG, Ince C, Joles JA, Smith DW, May CN, O'Connor PM, et al. Haemodynamic influences on kidney oxygenation: clinical implications of integrative physiology. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2013;40(2):106-22.
82. Vetterlein F, Petho A, Schmidt G. Distribution of capillary blood flow in rat kidney during postischemic renal failure. *Am J Physiol.* 1986;251(3 Pt 2):H510-9.
83. Conesa EL, Valero F, Nadal JC, Fenoy FJ, Lopez B, Arregui B, et al. N-acetyl-L-cysteine improves renal medullary hypoperfusion in acute renal failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001;281(3):R730-7.
84. Regner KR, Zuk A, Van Why SK, Shames BD, Ryan RP, Falck JR, et al. Protective effect of 20-HETE analogues in experimental renal ischemia reperfusion injury. *Kidney Int.* 2009;75(5):511-7.
85. Olof P, Hellberg A, Kallskog O, Wolgast M. Red cell trapping and postischemic renal blood flow. Differences between the cortex, outer and inner medulla. *Kidney Int.* 1991;40(4):625-31.
86. Siragusa M, Fleming I. The eNOS signalosome and its link to endothelial dysfunction. *Pflugers Arch.* 2016;468(7):1125-37.
87. Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation.* 2006;113(13):1708-14.
88. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 2012;33(7):829-37, 37a-37d.
89. Follmann M, Ackerstaff J, Redlich G, Wunder F, Lang D, Kern A, et al. Discovery of the Soluble Guanylate Cyclase Stimulator Vericiguat (BAY 1021189) for the Treatment of Chronic Heart Failure. *J Med Chem.* 2017;60(12):5146-61.
90. Lee MR, Li L, Kitazawa T. Cyclic GMP causes Ca²⁺ desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. *J Biol Chem.* 1997;272(8):5063-8.
91. Papapetropoulos A, Hobbs AJ, Topouzis S. Extending the translational potential of targeting NO/cGMP-regulated pathways in the CVS. *Br J Pharmacol.* 2015;172(6):1397-414.
92. Zhou L, Zhu DY. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide.* 2009;20(4):223-30.
93. Togashi H, Sakuma I, Yoshioka M, Kobayashi T, Yasuda H, Kitabatake A, et al. A central nervous system action of nitric oxide in blood pressure regulation. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992;262(1):343-7.
94. Steinert JR, Chernova T, Forsythe ID. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. *Neuroscientist.* 2010;16(4):435-52.
95. Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, et al. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension.* 1994;23(6 Pt 2):1121-31.
96. Lange M, Enkhbaatar P, Nakano Y, Traber DL. Role of nitric oxide in shock: the large animal perspective. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2009;14(5):1979-89.
97. Searles CD. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;291(5):C803-16.
98. Wilson JR, Kapoor SC. Contribution of prostaglandins to exercise-induced vasodilation in humans. *Am J Physiol.* 1993;265(1 Pt 2):H171-5.
99. Ignarro LJ, Harbison RG, Wood KS, Kadowitz PJ. Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *J Pharmacol Exp Ther.* 1986;237(3):893-900.

100. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol*. 1987;92(3):639-46.
101. Schafer A, Flierl U, Kobsar A, Eigenthaler M, Ertl G, Bauersachs J. Soluble guanylyl cyclase activation with HMR1766 attenuates platelet activation in diabetic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(12):2813-8.
102. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*. 1989;83(5):1774-7.
103. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology*. 2001;94(6):1133-8.
104. Park SW, Kim M, Brown KM, D'Agati VD, Lee HT. Paneth cell-derived interleukin-17A causes multiorgan dysfunction after hepatic ischemia and reperfusion injury. *Hepatology*. 2011;53(5):1662-75.
105. Cowley AW, Jr., Mori T, Mattson D, Zou AP. Role of renal NO production in the regulation of medullary blood flow. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;284(6):R1355-69.
106. O'Connor PM, Cowley AW, Jr. Modulation of pressure-natriuresis by renal medullary reactive oxygen species and nitric oxide. *Curr Hypertens Rep*. 2010;12(2):86-92.
107. Pallone TL, Mattson DL. Role of nitric oxide in regulation of the renal medulla in normal and hypertensive kidneys. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2002;11(1):93-8.
108. Forstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch*. 2010;459(6):923-39.
109. Radi R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(23):5839-48.
110. Landmesser U, Cai H, Dikalov S, McCann L, Hwang J, Jo H, et al. Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension*. 2002;40(4):511-5.
111. Patschan D, Patschan S, Muller GA. Inflammation and microvasculopathy in renal ischemia reperfusion injury. *J Transplant*. 2012;2012:764154.
112. Bellomo R, Kellum JA, Ronco C. Acute kidney injury. *Lancet*. 2012;380(9843):756-66.
113. Ito K, Chen J, Seshan SV, Khodadadian JJ, Gallagher R, El Chaar M, et al. Dietary arginine supplementation attenuates renal damage after relief of unilateral ureteral obstruction in rats. *Kidney Int*. 2005;68(2):515-28.
114. Dautzenberg M, Kahnert A, Stasch JP, Just A. Role of soluble guanylate cyclase in renal hemodynamics and autoregulation in the rat. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014;307(9):F1003-12.
115. Stasch JP, Schmidt PM, Nedvetsky PI, Nedvetskaya TY, H SA, Meurer S, et al. Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *J Clin Invest*. 2006;116(9):2552-61.
116. Nossaman B, Pankey E, Kadowitz P. Stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: review and potential therapeutic indications. *Crit Care Res Pract*. 2012;2012:290805.
117. Chen Z, Zhang J, Stamler JS. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(12):8306-11.
118. Evgenov OV, Pacher P, Schmidt PM, Hasko G, Schmidt HH, Stasch JP. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(9):755-68.

119. Geschka S, Kretschmer A, Sharkovska Y, Evgenov OV, Lawrenz B, Hucke A, et al. Soluble guanylate cyclase stimulation prevents fibrotic tissue remodeling and improves survival in salt-sensitive Dahl rats. *PLoS One*. 2011;6(7):e21853.
120. Modlinger PS, Wilcox CS, Aslam S. Nitric oxide, oxidative stress, and progression of chronic renal failure. *Semin Nephrol*. 2004;24(4):354-65.
121. Kone BC. Nitric oxide in renal health and disease. *Am J Kidney Dis*. 1997;30(3):311-33.
122. Noris M, Remuzzi G. Physiology and pathophysiology of nitric oxide in chronic renal disease. *Proc Assoc Am Physicians*. 1999;111(6):602-10.
123. Wang-Rosenke Y, Mika A, Khadzhynov D, Loof T, Neumayer HH, Peters H. Impact of biological gender and soluble guanylate cyclase stimulation on renal recovery after relief of unilateral ureteral obstruction. *J Urol*. 2012;188(1):316-23.
124. Bonderman D, Ghio S, Felix SB, Ghofrani HA, Michelakis E, Mitrovic V, et al. Riociguat for patients with pulmonary hypertension caused by systolic left ventricular dysfunction: a phase IIb double-blind, randomized, placebo-controlled, dose-ranging hemodynamic study. *Circulation*. 2013;128(5):502-11.
125. Bonderman D, Pretsch I, Steringer-Mascherbauer R, Jansa P, Rosenkranz S, Tufaro C, et al. Acute hemodynamic effects of riociguat in patients with pulmonary hypertension associated with diastolic heart failure (DILATE-1): a randomized, double-blind, placebo-controlled, single-dose study. *Chest*. 2014;146(5):1274-85.
126. Erdmann E, Semigran MJ, Nieminen MS, Gheorghide M, Agrawal R, Mitrovic V, et al. Cinaciguat, a soluble guanylate cyclase activator, unloads the heart but also causes hypotension in acute decompensated heart failure. *Eur Heart J*. 2013;34(1):57-67.
127. Ghofrani HA, Staehler G, Grunig E, Halank M, Mitrovic V, Unger S, et al. Acute effects of riociguat in borderline or manifest pulmonary hypertension associated with chronic obstructive pulmonary disease. *Pulm Circ*. 2015;5(2):296-304.
128. Hohenstein B, Daniel C, Wagner A, Stasch JP, Hugo C. Stimulation of soluble guanylyl cyclase inhibits mesangial cell proliferation and matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;288(4):F685-93.
129. Wang Y, Kramer S, Loof T, Martini S, Kron S, Kawachi H, et al. Stimulation of soluble guanylate cyclase slows progression in anti-thy1-induced chronic glomerulosclerosis. *Kidney Int*. 2005;68(1):47-61.
130. Costell MH, Ancellin N, Bernard RE, Zhao S, Upson JJ, Morgan LA, et al. Comparison of soluble guanylate cyclase stimulators and activators in models of cardiovascular disease associated with oxidative stress. *Front Pharmacol*. 2012;3:128.
131. Armstrong PW, Pieske B, Anstrom KJ, Ezekowitz J, Hernandez AF, Butler J, et al. Vericiguat in Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. *N Engl J Med*. 2020;382(20):1883-93.
132. Armstrong PW, Lam CSP, Anstrom KJ, Ezekowitz J, Hernandez AF, O'Connor CM, et al. Effect of Vericiguat vs Placebo on Quality of Life in Patients With Heart Failure and Preserved Ejection Fraction: The VITALITY-HFpEF Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2020;324(15):1512-21.
133. Kalk P, Godes M, Relle K, Rothkegel C, Hucke A, Stasch JP, et al. NO-independent activation of soluble guanylate cyclase prevents disease progression in rats with 5/6 nephrectomy. *Br J Pharmacol*. 2006;148(6):853-9.
134. Kenny M, Clarke MM, Pogue KT. Overview of Riociguat and Its Role in the Treatment of Pulmonary Hypertension. *J Pharm Pract*. 2022;35(3):437-44.
135. Stasch JP, Evgenov OV. Soluble guanylate cyclase stimulators in pulmonary hypertension. *Handb Exp Pharmacol*. 2013;218:279-313.

136. Khaybullina D, Patel A, Zerilli T. Riociguat (adempas): a novel agent for the treatment of pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *P T*. 2014;39(11):749-58.
137. Grimminger F, Weimann G, Frey R, Voswinckel R, Thamm M, Bolkow D, et al. First acute haemodynamic study of soluble guanylate cyclase stimulator riociguat in pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2009;33(4):785-92.
138. Frey R, Becker C, Saleh S, Unger S, van der Mey D, Muck W. Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Profile of Riociguat. *Clin Pharmacokinet*. 2018;57(6):647-61.
139. Stasch JP, Pacher P, Evgenov OV. Soluble guanylate cyclase as an emerging therapeutic target in cardiopulmonary disease. *Circulation*. 2011;123(20):2263-73.
140. Ghofrani HA, Galie N, Grimminger F, Grunig E, Humbert M, Jing ZC, et al. Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 2013;369(4):330-40.
141. Mittendorf J, Weigand S, Alonso-Alija C, Bischoff E, Feurer A, Gerisch M, et al. Discovery of riociguat (BAY 63-2521): a potent, oral stimulator of soluble guanylate cyclase for the treatment of pulmonary hypertension. *ChemMedChem*. 2009;4(5):853-65.
142. Conole D, Scott LJ. Riociguat: first global approval. *Drugs*. 2013;73(17):1967-75.
143. Benke K, Nemeth BT, Sayour AA, Stark KA, Olah A, Ruppert M, et al. Stimulation of soluble guanylate cyclase improves donor organ function in rat heart transplantation. *Sci Rep*. 2020;10(1):5358.
144. Lang M, Kojonazarov B, Tian X, Kalymbetov A, Weissmann N, Grimminger F, et al. The soluble guanylate cyclase stimulator riociguat ameliorates pulmonary hypertension induced by hypoxia and SU5416 in rats. *PLoS One*. 2012;7(8):e43433.
145. Kim M, Ham A, Kim JY, Brown KM, D'Agati VD, Lee HT. The volatile anesthetic isoflurane induces ecto-5'-nucleotidase (CD73) to protect against renal ischemia and reperfusion injury. *Kidney Int*. 2013;84(1):90-103.
146. Fischer K, Meral FC, Zhang Y, Vangel MG, Jolesz FA, Ichimura T, et al. High-resolution renal perfusion mapping using contrast-enhanced ultrasonography in ischemia-reperfusion injury monitors changes in renal microperfusion. *Kidney Int*. 2016;89(6):1388-98.
147. Azarkish F, Armin F, Parvar AAA, Dehghani A. The influence of renal ischemia-reperfusion injury on remote organs: The histological brain changes in male and female rats. *Brain Circ*. 2021;7(3):194-200.
148. Majid DS, Williams A, Navar LG. Inhibition of nitric oxide synthesis attenuates pressure-induced natriuretic responses in anesthetized dogs. *Am J Physiol*. 1993;264(1 Pt 2):F79-87.
149. Willgoss DA, Zhang B, Gobe GC, Kadkhodae M, Endre ZH. Repetitive brief ischemia: intermittent reperfusion during ischemia ameliorates the extent of injury in the perfused kidney. *Ren Fail*. 2003;25(3):379-95.
150. Songur HS, Kaya SA, Altinisik YC, Abanoz R, Ozcelebi E, Ozmen F, et al. Alamandine treatment prevents LPS-induced acute renal and systemic dysfunction with multi-organ injury in rats via inhibiting iNOS expression. *Eur J Pharmacol*. 2023;960:176160.
151. Pechman KR, De Miguel C, Lund H, Leonard EC, Basile DP, Mattson DL. Recovery from renal ischemia-reperfusion injury is associated with altered renal hemodynamics, blunted pressure natriuresis, and sodium-sensitive hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;297(5):R1358-63.
152. Chen CF, Leu FJ, Chen HI, Wang D, Chou SJ. Ischemia/reperfusion-induced low reactivity of the rat superior mesenteric vascular bed is associated with expression of nitric oxide synthases. *Transplant Proc*. 2006;38(7):2216-20.

153. Peres EC, Victorio JA, Nunes-Souza V, Breithaupt-Faloppa AC, Rabelo LA, Tavares-de-Lima W, et al. Simvastatin protects against intestinal ischemia/reperfusion-induced pulmonary artery dysfunction. *Life Sci.* 2022;306:120851.
154. Sener G, Paskaloglu K, Sehirli AO, Dulger GA, Alican I. The effects of melatonin on ischemia-reperfusion induced changes in rat corpus cavernosum. *J Urol.* 2002;167(6):2624-7.
155. Koksoy C, Uydes-Dogan BS, Kuzu MA, Aydemir-Koksoy A, Demirpence E, Kesenci M. Effects of intestinal ischemia-reperfusion on major conduit arteries. *J Invest Surg.* 2000;13(1):35-43.
156. Ozis SE, Akhayeva T, Guner S, Kilicoglu SS, Pampal A. Etanercept restores vasocontractile sensitivity affected by mesenteric ischemia reperfusion. *J Surg Res.* 2018;226:8-14.
157. Lefer AM, Tsao PS, Lefer DJ, Ma XL. Role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of reperfusion injury after myocardial ischemia. *Faseb J.* 1991;5(7):2029-34.
158. Lefer DJ, Nakanishi K, Vinten-Johansen J, Ma XL, Lefer AM. Cardiac venous endothelial dysfunction after myocardial ischemia and reperfusion in dogs. *Am J Physiol.* 1992;263(3 Pt 2):H850-6.
159. Pruneau D, Belichard P. Endothelium-dependent control of vascular tone in the rabbit kidney after ischemia and reperfusion. *Eur J Pharmacol.* 1993;231(2):215-21.
160. Kontogiannis J, Burns KD. Role of AT1 angiotensin II receptors in renal ischemic injury. *Am J Physiol.* 1998;274(1):F79-90.
161. Harper SJ, Hosgood SA, Waller HL, Yang B, Kay MD, Goncalves I, et al. The effect of warm ischemic time on renal function and injury in the isolated hemoperfused kidney. *Transplantation.* 2008;86(3):445-51.
162. Yang Q, He GW, Underwood MJ, Yu CM. Cellular and molecular mechanisms of endothelial ischemia/reperfusion injury: perspectives and implications for postischemic myocardial protection. *Am J Transl Res.* 2016;8(2):765-77.
163. Koksoy C, Kuzu MA, Ergun H, Demirpence E, Zulfikaroglu B. Intestinal ischemia and reperfusion impairs vasomotor functions of pulmonary vascular bed. *Ann Surg.* 2000;231(1):105-11.
164. Morales-Cano D, Izquierdo-Garcia JL, Barreira B, Esquivel-Ruiz S, Callejo M, Pandolfi R, et al. Impact of a TAK-1 inhibitor as a single or as an add-on therapy to riociguat on the metabolic reprogramming and pulmonary hypertension in the SUGEN5416/hypoxia rat model. *Front Pharmacol.* 2023;14:1021535.
165. Dautzenberg M, Just A. Temporal characteristics of nitric oxide-, prostaglandin-, and EDHF-mediated components of endothelium-dependent vasodilation in the kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2013;305(9):R987-98.
166. Braun D, Zollbrecht C, Dietze S, Schubert R, Golz S, Summer H, et al. Hypoxia/Reoxygenation of Rat Renal Arteries Impairs Vasorelaxation via Modulation of Endothelium-Independent sGC/cGMP/PKG Signaling. *Front Physiol.* 2018;9:480.
167. Miller MR, Megson IL. Recent developments in nitric oxide donor drugs. *Br J Pharmacol.* 2007;151(3):305-21.
168. Basile DP, Anderson MD, Sutton TA. Pathophysiology of acute kidney injury. *Compr Physiol.* 2012;2(2):1303-53.
169. Schoenberg SO, Knopp MV, Bock M, Kallinowski F, Just A, Essig M, et al. Renal artery stenosis: grading of hemodynamic changes with cine phase-contrast MR blood flow measurements. *Radiology.* 1997;203(1):45-53.
170. Ward BJ, McCarthy A. Endothelial cell "swelling" in ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 1995;27(6):1293-300.

171. Bittard H, Benoit G, Moukarzel M, Charpentier B, Ecoffey C, Fries D, et al. Decrease in renal vascular resistance in University of Wisconsin solution preserved kidney transplants. *J Urol*. 1991;146(1):1-4.
172. Kon V, Badr KF. Biological actions and pathophysiologic significance of endothelin in the kidney. *Kidney Int*. 1991;40(1):1-12.
173. Zou AP, Li N, Cowley AW, Jr. Production and actions of superoxide in the renal medulla. *Hypertension*. 2001;37(2 Pt 2):547-53.
174. Tsao PS, Lefer AM. Time course and mechanism of endothelial dysfunction in isolated ischemic- and hypoxic-perfused rat hearts. *Am J Physiol*. 1990;259(6 Pt 2):H1660-6.
175. Brezis M, Heyman SN, Dinour D, Epstein FH, Rosen S. Role of nitric oxide in renal medullary oxygenation. Studies in isolated and intact rat kidneys. *J Clin Invest*. 1991;88(2):390-5.
176. Mattson DL, Roman RJ, Cowley AW, Jr. Role of nitric oxide in renal papillary blood flow and sodium excretion. *Hypertension*. 1992;19(6 Pt 2):766-9.
177. Yang B, Jain S, Pawluczyk IZ, Imtiaz S, Bowley L, Ashra SY, et al. Inflammation and caspase activation in long-term renal ischemia/reperfusion injury and immunosuppression in rats. *Kidney Int*. 2005;68(5):2050-67.
178. Wang Q, Ju F, Li J, Liu T, Zuo Y, Abbott GW, et al. Empagliflozin protects against renal ischemia/reperfusion injury in mice. *Sci Rep*. 2022;12(1):19323.
179. Wan X, Huang WJ, Chen W, Xie HG, Wei P, Chen X, et al. IL-10 deficiency increases renal ischemia-reperfusion injury. *Nephron Exp Nephrol*. 2014;128(1-2):37-45.
180. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*. 1991;174(5):1209-20.
181. Deng J, Kohda Y, Chiao H, Wang Y, Hu X, Hewitt SM, et al. Interleukin-10 inhibits ischemic and cisplatin-induced acute renal injury. *Kidney Int*. 2001;60(6):2118-28.
182. Tadagavadi RK, Reeves WB. Endogenous IL-10 attenuates cisplatin nephrotoxicity: role of dendritic cells. *J Immunol*. 2010;185(8):4904-11.
183. Tsai IF, Lin CY, Huang CT, Lin YC, Yang CM, Lin YC, et al. Modulation of human monocyte-derived dendritic cells maturation by a soluble guanylate cyclase activator, YC-1, in a cyclic nucleotide independent manner. *Int Immunopharmacol*. 2007;7(10):1299-310.
184. Gunnett CA, Heistad DD, Berg DJ, Faraci FM. IL-10 deficiency increases superoxide and endothelial dysfunction during inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279(4):H1555-62.
185. Li Z, Ludwig N, Thomas K, Mersmann S, Lehmann M, Vestweber D, et al. The Pathogenesis of Ischemia-Reperfusion Induced Acute Kidney Injury Depends on Renal Neutrophil Recruitment Whereas Sepsis-Induced AKI Does Not. *Front Immunol*. 2022;13:843782.
186. Korkmaz A, Kolankaya D. The protective effects of ascorbic acid against renal ischemia-reperfusion injury in male rats. *Ren Fail*. 2009;31(1):36-43.
187. Methner C, Buonincontri G, Hu CH, Vujic A, Kretschmer A, Sawiak S, et al. Riociguat reduces infarct size and post-infarct heart failure in mouse hearts: insights from MRI/PET imaging. *PLoS One*. 2013;8(12):e83910.