



Sıçanlarda Renal İskemi/Reperfüzyon Hasarı Üzerine PDE 5 İnhibitörü-Avanafilin Etkisi

Effect of PDE 5 Inhibitor-Avanafil on Renal Ischemia/Reperfusion Injury in Rats

İb Tuğba Nurcan YÜKSEL¹, İb Zekai HALICI², İb Cihangir KAYA³, İb Ayşe BOZKURT⁴, İb Taha TAVACI⁵, İb Maide Sena CİVELEK⁶, İb Bengül ÖZDEMİR⁷

¹Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Tekirdağ, Türkiye

²Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı-Klinik Araştırma, Geliştirme ve Tasarım Uygulama ve Araştırma Merkezi, Erzurum, Türkiye

³İstanbul Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, Teşhis Departmanı, İstanbul, Türkiye

⁴Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Van, Türkiye

⁵Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Sakarya, Türkiye

⁶Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

⁷Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Kars, Türkiye

ÖZ

Amaç: Renal iskemi-reperfüzyon hasarı (RI/RI) başta böbrek olmak üzere birçok organa zarar verir. Fosfodiesteraz (PDE) 5 inhibitörleri, antioksidan ve anti-enflamatuvar etkilere sahiptir. Avanafil (AVA), daha yüksek PDE izoform seçiciliğine sahip ikinci nesil bir PDE 5 inhibitörüdür. Bu çalışmanın amacı sıçanlarda RI/RI üzerine AVA'nın etkilerini incelemektir.

Gereç ve Yöntem: Kırk sıçan rastgele beş gruba (n=8) ayrıldı: Kontrol; AVA 10 mg/kg; RI/RI; RI/RI + 5 mg/kg AVA ve RI/RI + 10 mg/kg AVA. RI/RI sıçan modeli, renal arter klemplenerek oluşturuldu. Renal arter klempleme ile 45 dakika renal iskemi indüksiyonu ve ardından 24 saat reperfüzyon için akut bir cerrahi deney yapıldı. AVA, iskemiden 6 ve 1 saat önce oral olarak sonda ile uygulandı. Yirmi dört saatlik reperfüzyondan sonra moleküler ve biyokimyasal inceleme için böbrek dokuları çıkarıldı. Böbrek dokuları biyokimyasal [ELISA ile malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH)], moleküler [qRT-PCR ile IL-1 β , nükleer faktör-kappa B (NF- κ B), and tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) mRNA gen ekspresyonları] ve histopatolojik (Harris hematoksilen ve eosin Y ile boyama) olarak incelendi.

Bulgular: AVA uygulaması, RI/RI'nin sebep olduğu MDA ve GSH düzeylerindeki değişiklikleri iyileştirdi. AVA tedavisi iskemi/reperfüzyon hasarından kaynaklanan böbrek dokularındaki IL-1 β , NF- κ B ve TNF- α mRNA gen ekspresyonlarındaki artışı düzeltti. AVA uygulaması renal iskemi reperfüzyonun neden olduğu böbrek dokularındaki histopatolojik hasarı iyileştirdi. Ayrıca kontrol grubuna en yakın değerler RI/RI'li sıçanlara 10 mg/kg AVA uygulanması ile elde edildi.

Sonuç: AVA uygulaması, iskemi/reperfüzyon hasarında önemli olabilecek oksidatif stresi ve enflamatuvar kaskadları hafifleterek RI/RI kaynaklı doku hasarını iyileştirmiştir. Bu bulgular, RI/RI'yi tedavi etmek için AVA kullanımına ilişkin mekanik bir temel sağlayabilir.

Anahtar Kelimeler: Anti-enflamatuvar, antioksidan, avanafil, fosfodiesteraz 5 inhibitörü, renal iskemi/reperfüzyon hasarı

ABSTRACT

Aim: Renal ischemia-reperfusion injury (RI/RI) damages many organs, especially the kidney. Phosphodiesterase (PDE) 5 inhibitors has antioxidant and anti-inflammatory effects. Avanafil (AVA) is a second-generation PDE 5 inhibitor with greater PDE isoform selectivity. The aim of this study is to investigate the effects of AVA on RI/RI in rats.

Materials and Methods: Forty rats were randomly divided into five groups (n=8): Sham; AVA 10; RI/RI; RI/RI + 5 mg/kg AVA, and RI/RI + 10 mg/kg AVA. RI/RI in rats was established by clamping renal artery. An acute surgical experiment was performed for the induction of renal ischemia

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Tuğba Nurcan YÜKSEL, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Tekirdağ, Türkiye

Tel.: +90 546 573 81 41 **E-posta:** tnyuksel@nku.edu.tr **ORCID ID:** orcid.org/0000-0001-5092-1674

Geliş tarihi/Received: 04.06.2023 **Kabul tarihi/Accepted:** 05.07.2023

©Telif Hakkı 2023 Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi / Namık Kemal Tıp Dergisi, Galenos Yayinevi tarafından yayınlanmıştır.
©Copyright 2023 by Tekirdağ Namık Kemal University / Namık Kemal Medical Journal is published by Galenos Publishing House.
Creative Commons Atıf-GayriTicari-Türetilemez 4.0 (CC BY-NC-ND) Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.



for 45 min by renal artery clamping followed by reperfusion for 24 h. Kidney tissues were investigated biochemically [malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) with ELISA], molecularly [relative quantification of IL-1 β , nuclear factor-kappa B (NF- κ B), and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) mRNA gene expression with qRT-PCR], and histopathologically (staining with Harris hematoxylin and eosin Y).

Results: AVA administration ameliorated disturbances in MDA and GSH levels caused by RI/RI. AVA treatment improved the increase in the mRNA expressions of IL-1 β , NF- κ B, and TNF- α in kidney tissues induced ischemia/reperfusion injury. AVA administration ameliorated histopathologic injury in kidney tissues caused by renal ischemia reperfusion. Moreover, the values closest to those of the sham group were obtained by administering 10 mg/kg AVA to rats with RI/RI.

Conclusion: AVA administration improved renal ischemia/reperfusion-induced tissue injury by alleviating oxidative stress and inflammatory cascades that could be important in ischemia-reperfusion injury. These findings may provide a mechanistic basis for using AVA to treat RI/RI.

Keywords: Anti-inflammatory, antioxidant, avanafil, phosphodiesterase 5 inhibitor, renal ischemia/reperfusion injury

GİRİŞ

Böbrekler vücutta en çok kan alışverişi olan organlardan biridir ve bu da onları kan perfüzyonundaki değişikliklere karşı son derece savunmasız hale getirmektedir¹. Fizyolojik işlevlerde önemli bir rol oynarlar². İskemi/reperfüzyon durumunda, hem moleküler hem de hücresele olaylar, reaktif oksijen türlerini (ROS) serbest bırakarak, sitokinlerin etkilerini güçlendirip lökositleri toplayarak dokuların normal fonksiyonunu bozan bir enflamatuvar kaskadı başlatır. Reperfüzyon, iskemik dokuya adenoazin trifosfat sentezi için substrat ve oksijen sağlayan kritik bir süreçtir. Bununla birlikte ilave ROS üreterek doku hasarını şiddetlendirir³. Aşırı ROS üretimi, ROS'un tetiklemesiyle anormal sinyal yolları ile renal iskemide reperfüzyon hasarına (RI/RI), enflamatuvar infiltrasyona, hücresele bozukluğa ve renal hücre ölümüne neden olur⁴. Ayrıca, giderek artan kanıtlara göre, reperfüzyon süresi ve yeniden oksijenlenme aşaması böbrek üzerindeki olumsuz etkilerin temel nedenleridir⁵. RI/RI bir enfarktüs, sepsis veya organ nakli sonrasında ortaya çıkabilir ve ROS, kemokinler, proenflamatuvar sitokinler ve lökositleri içeren bir enflamatuvar kaskadı aktive ederek doku hasarını büyütür⁶. Üretilen ROS, lipid peroksidasyonunu tetikler [son ürün olarak üretilen malondialdehit (MDA) ile]⁷. Lipid oksidasyonu ile artan MDA seviyeleri hücre zarı fonksiyonlarına ve hücresele bütünlüğe zarar verir^{8,9}. Glutatyon (GSH) gibi enzimatik olmayan bileşiklerin konsantrasyonlarının artırılması, oksidatif hasara karşı hücresele savunma sistemini uyarır¹⁰. Ayrıca I/R kaynaklı ROS üretimi NF- κ B'nin¹¹ aktivasyonuna neden olur. Nükleer faktör-kappa B (NF- κ B) aktivasyonu, tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) dahil olmak üzere proenflamatuvar sitokinlerin transkripsiyonunu artırır¹². TNF- α , IL-1 β ve diğer enflamatuvar belirteçlerin üretimini teşvik ederek doku ve organlara verilen zararı şiddetlendirebilir¹³. Böylece RI/RI'da birçok farklı enflamatuvar mediatör rol alır. Sonuç olarak, anti-oksidatif ve anti-enflamatuvar dahil olmak üzere çok sayıda etkiye sahip olan ve tübüler nekroz özelliklerini inhibe eden farmakolojik ajanlar, böbrek dokusu hasarını önlemek için umut verici bir yaklaşım olabilir.

Fosfodiesteraz (PDE) 5 inhibitörleri, erektil disfonksiyonun yanı sıra prostat hiperplazisi, hipertansiyon ve koroner kalp hastalığı

gibi diğer birçok hastalığın yaygın olarak kullanılan birincil tedavisidir¹⁴. Klinik öncesi çalışmalar, PDE 5 inhibisyonunun böbreklerdeki oksidatif ve enflamatuvar hasarı azaltabildiğini, bunun sonucunda albüminüri, glomerüler hiperfiltrasyon ve hipertrofinin azalmasına ve genel olarak glomerüloskleroza azalmasına neden olabileceğini göstermiştir¹⁵. Böbrek dokusu hasarındaki bu renoprotektif etkiler ve artışlar, hem hemodinamik hem de intrarenal antioksidan, anti-enflamatuvar ve anti-proliferatif mekanizmalar yoluyla PDE 5 inhibitör aktivitesine atfedilebilir¹⁶. Avanafil (AVA) ikinci nesil bir PDE 5 inhibitörüdür. Gıda ve İlaç Dairesi ve Avrupa İlaç Ajansı, AVA'yı 2013 yılında PDE 5 inhibitör bileşikler olarak tanıtmıştır¹⁷. AVA, PDE izoformuna daha seçicidir ve birinci nesil PDE 5 inhibitörlerinden farklı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahiptir¹⁸. Deneysele çalışmalarda, çeşitli PDE 5 inhibitörlerinin iskemide reperfüzyon kaynaklı doku hasarı üzerindeki savunma etkileri, miyokard¹⁹, omurilik²⁰, beyin²¹, yumurtalık²², ve hatta böbrek¹⁴ dahil çeşitli dokularda kanıtlanmıştır. AVA'nın nefropati gibi çeşitli renal durumlardaki etkileri de ayrıca araştırılmıştır^{23,24}. Ancak AVA'nın iskemide reperfüzyona bağlı renal doku hasarı üzerindeki etkisi bilinmemektedir. Bu bilgiler ışığında AVA'nın sıçanlarda RI/RI üzerindeki olası koruyucu etkilerini araştırmayı tasarladık. Ayrıca altta yatan mekanizmalar moleküler, biyokimyasal ve histopatolojik olarak araştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hayvanlar

Bu çalışmada Ankara Üniversitesi Tıbbi Deneysele Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden 4-5 aylık (ağırlık: 250-290 gr) 40 adet Wistar sıçan satın alındı. Tüm hayvanlar standart koşullar altında (sıcaklık: 22 $\pm$ 1 °C, nispi nem: %40-80, 12 saat aydınlık-karanlık döngüsü) standart plastik kafeslerde tutuldu. Deney boyunca hayvanlar, olağan sıçan suyuna ve yiyeceğine (ad libitum) sınırsız erişime sahipti. Tüm deneysele prosedürler, laboratuvar hayvanlarının kullanımı ve bakımına ilişkin ulusal yönergelerle uygun olarak gerçekleştirildi.

Bu hayvan çalışması ve tüm protokolleri Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysele Uygulama ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu

tarafından 04-04-2022 tarihinde E-75296309-050.01.04-2200103613 belge numarasıyla onaylandı.

Kimyasallar

PDE 5 inhibitörü AVA (miktar: 1 g), BLDpharm Company'den (Cat. No: BD289977, MW: 483.95) satın alındı. Ksilazin (%2 basilazin) BioTek, Türkiye'den ve ketamin (ketalar 500 mg/10 mL) Pfizer, Türkiye'den temin edildi. Laboratuvar deneylerinde tamamı Sigma ve Merck'ten (Almanya) satın alınan ilave kimyasallar gerekti.

DeneySEL Strateji

Kırk sıçan rastgele 5 gruba ayrıldı (grup başına n=8, Tablo 1). AVA'nın yarı ömrü 6 saat olduğundan, ilgili gruplara operasyondan 6 ve 1 saat önce AVA (5 ve 10 mg/kg) oral olarak gavaj yoluyla uygulandı^{25,26}.

Renal İskemi/Reperfüzyon Hasarına Neden Olan Cerrahi Prosedür

Tüm hayvanlara 80 mg/kg ketamin + 8 mg/kg ksilazin enjeksiyonu ile anestezi uygulandı. Dorsal duvar dezenfekte edildikten sonra arka dorsal orta hat alanı boyunca 2,5 cm'lik uzunlamasına bir kesi yapıldı ve sağ nefrektomi uygulandı. RI/RI elde etmek için damarlara 45 dakika boyunca böbrekteki renal arteri tıkayan bir klemp uygulandı. Organın kendisi ekstra bir özenle zarar görmekten korundu. Böbreğin tamamındaki renk değişiklikleri, oklüzyonun etkinliğine dair kanıt sağladı. Daha sonra, klemp çıkarıldıktan sonra böbreklere kan akışını sağlamak için sıçanlara 24 saat boyunca dikkatli bir şekilde reperfüzyon uygulandı (Tablo 1)^{27,28}. Ameliyattan sonra tüm hayvanlar hipotermiden korunmak için sıcak tutuldu. 24 saatlik reperfüzyon fazının tamamlanmasının ardından tüm sıçanlara yüksek doz ketamin-ksilazin ile anestezi uygulandı. Tüm böbrek dokuları toplanıp biyokimyasal ve moleküler incelemeler için -80 °C'de, histopatolojik incelemeler için ise %10'luk formalin solüsyonunda saklandı.

Biyokimyasal İncelemeler

Biyokimyasal incelemeler için ayrılan tüm numunelerin 100 mg'ı 1 mL PBS ile işlendi, bir Tissue Lyser II (Qiagen) ile sıvı nitrojen içerisinde öğütüldü ve santrifüjlendi. Santrifüj ile elde

edilen süpernatantlar numune olarak kullanıldı. MDA seviyeleri²⁹ ve GSH³⁰ seviyeleri, ELISA okuyucusu kullanılarak belirlendi³¹. Böbrek dokularının MDA ve GSH düzeyleri sırasıyla nmol/mg protein olarak ifade edildi. Her bir veri seti için ortalama ve standart sapma, her bir mg protein birimi için gösterildi.

Protein Determinasyonu

Ticari protein standartları [Sigma Aldrich, total protein kit-TP0300-1KT-(ABD)] kullanılarak, protein konsantrasyonlarını hesaplamak için Lowry tekniği uygulandı³².

Moleküler İnceleme

Gen Ekspresyonları Analizi

İnterlökin-1 beta (IL-1β), NF-κB ve TNF-α mRNA ekspresyon seviyelerini değerlendirmek için bir qRT-PCR dizayn edildi. Bunun için böbrek dokuları homojenize edildi, RNA izole edildi, cDNA oluşturuldu ve çeşitli mRNA'ların ekspresyon seviyeleri kantitatif olarak değerlendirildi.

Böbrek Dokularından RNA Ekstraksiyonu

Böbrek dokusu örnekleri 20 mg'da ayrı ayrı ölçüldü. Numuneler RNeasy Lysate RNA stabilizasyon reaktifi (Qiagen) içerisinde stabilize edildi ve Tissue Lyser II (Qiagen) ile homojenleştirildi. RNeasy Mini Kit Qiagen kullanılarak ve üreticinin QiaCube'deki (Qiagen, Hilden, Almanya) talimatları takip edilerek toplam RNA saflaştırıldı. Toplam mRNA miktarı, 260 nm'den nanodrop spektrofotometri (All Sheng) kullanılarak belirlendi³³.

Revers-Transkriptaz Reaksiyonu ve cDNA Sentezi

Toplam RNA'dan cDNA üretimi, Yüksek Kapasiteli cDNA Revers Transkripsiyon Kiti (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Her reaksiyon için 10 µL RNA kullanıldı. Sıcaklık ölçümlerine göre T100 Thermal Cycler (BIO-RAD) ile cDNA sentezi sağlandı. Nanodrop spektrofotometri (All Sheng) kullanılarak cDNA miktarı belirlendi ve elde edilen cDNA -20 °C'de tutuldu. cDNA sentez reaksiyonu için şu bileşenler kullanıldı: toplam RNA (10 µL), 25X dNTP mix (0,8 uL), 10X RT random primerler (2 uL), revers transkripsiyon 10X tampon (2 uL), dietilpirokarbonat H₂O (4,2 uL) ve MultiScribe revers transkriptaz (1 uL). cDNA konsantrasyonları, Epoch

Tablo 1. Böbrek dokusundaki AVA'nın RI/RI üzerindeki etkilerini araştırmaya yönelik deney grupları ve tasarımlar

Gruplar	Operasyon öncesi 6. ve 1. saat	İskemi kaynaklı 0. saat	İskemi sonrası 45. dakika	Reperfüzyon kaynaklı 24. saat
1 Sham		Sham operasyonu		Sakrifikasyon
2 AVA 10 mg/kg	AVA	Sham operasyonu		Sakrifikasyon
3 RI/RI		İskemi	Reperfüzyon	Sakrifikasyon
4 RI/RI + AVA 5 mg/kg	AVA	İskemi	Reperfüzyon	Sakrifikasyon
5 RI/RI + AVA 10 mg/kg	AVA	İskemi	Reperfüzyon	Sakrifikasyon

AVA: Avanaflin, AVA 5: 5 mg/kg AVA, AVA 10: 10 mg/kg AVA, RI/RI: Renal iskemi/reperfüzyon hasarı

Spektrofotometre Sistemi ve Take3 Plate (Biotek) kullanılarak değerlendirildi ve ölçüldü^{34,35}.

IL-1 β , NF- κ B ve TNF- α mRNA Gen Ekspresyonunun qRT-PCR ile Kantitatif Determinasyonu

StepOnePlus qRT-PCR Sistemi teknolojisi (Applied Biosystems, ABD) ve sıçanların RNA'sından üretilen cDNA kullanılarak, rölatif analizler ve IL-1 β , NF- κ B ve TNF- α ekspresyon analizleri daha önce açıklandığı şekilde yapıldı³⁶. TaqMan Gen Ekspresyonu Analizleri: qRT-PCR için sıçan IL-1 β (Rn00580432_m1), sıçan NFK β (Rn01399583_m1) ve sıçan TNF- α (Rn00562055_m1) primerleri kullanıldı. Her dokudaki β -aktin (housekeeping gen) (Rn00667869_m1) ekspresyon sonuçları referans gen olarak kullanıldı. 100 ng cDNA için aşağıdaki TaqMan® gen ekspresyonu assayleri, 100 ng cDNA, 10 μ L TaqMan master mix ve 1 μ L assay ile 40 döngü boyunca pipetlendi ve RNaz içermeyen H₂O ile 20 μ L'ye tamamlandı. Döngü eşiği (Ct), qRT-PCR deneylerinde gözlenen floresan sinyal miktarının en düşük değeri aştığı döngü sayısıdır. Ct değerleri otomatik olarak delta delta Ct'ye ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)³⁷ dönüştürüldü ve bulgular istatistiksel olarak analiz edildi.

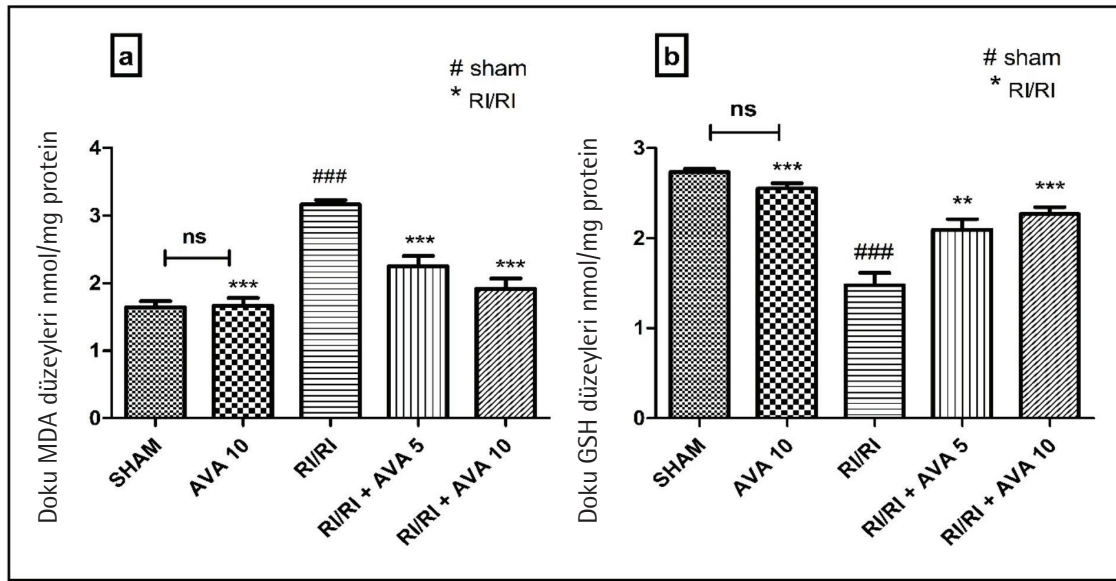
Histopatolojik Analiz

Solüsyonların hazırlanması aşaması, doku örneklerinin dehidrasyonu ve temizlenmesi, kesit planlaması ve Harris

hematoksilen ve eosin Y ile boyama işlemlerinin tümü histopatolojik değerlendirme için daha önceki çalışmalarda yapılmıştır³⁸. Histopatolojik analiz için sıçanlardan elde edilen böbrek dokusu kesitleri, 48 saat süreyle %3,7 formaldehit (%10 formalin) solüsyonunda hızlı bir şekilde sabitlendi. %50, %70, %80, %96 ve %99 oranlarında artan alkol konsantrasyonlarının her serisi için, tüm dokular dehidrasyonu test etmek üzere 1 saat süreyle muhafaza edildi. Dokular bir ksilen solüsyonunda üç ila on beş dakika süre arasında temizlendi. İnfiltrasyon için erimiş sıvı parafin içinde muhafaza edildi. Dokular işlendikten sonra titizlikle parafinde bloke edildi. Bloklamanın ardından histopatolojik analiz için her bir parafin doku bloğu 5 mikrometre kalınlığa kadar kesildi. Yapışkanla kaplanan slayt üzerinde parafin kesitler kesildi. Daha sonra tüm kesitler Harris hematoksilen ve eosin Y kullanılarak boyandı. Histopatolojik incelemeler için böbrek dokularındaki tübüler nekroz, enflamasyon ve kanama alanları ışık mikroskopunda değerlendirildi.

İstatistiksel ve Semi-Kantitatif Analiz

Moleküler sonuçların (IL-1 β , NF- κ B ve TNF- α) ve biyokimyasal sonuçların (MDA ve GSH) istatistiksel analizi için GraphPad Prism, versiyon 5.0 kullanıldı ve sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunuldu. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar One-Way ANOVA ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testleri kullanılarak



Şekil 1. AVA'nın böbrek dokusundaki RI/RI üzerindeki etkilerinin biyokimyasal sonuçları. A) MDA düzeyleri (nmol/mg protein). B. GSH düzeyleri (nmol/mg protein). AVA 5: 5 mg/kg AVA; AVA 10: 10 mg/kg AVA. MDA ve GSH düzeyleri modifiye yöntemlere göre ELISA okuyucusu ile ölçüldü. İstatistiksel analiz için GraphPad Prism, versiyon 5.0 kullanıldı ve sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunuldu. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar One-Way ANOVA ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testleri kullanılarak yapıldı; p değerinin 0,05'ten küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Sham grubuyla (#p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001) ve RI/RI grubuyla karşılaştırıldığında (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001) tüm gruplar arasında anlamlı farklılıklar tespit edildi

AVA: Avanafil, RI/RI: Renal iskemi-reperfüzyon hasarı, MDA: Malondialdehit, GSH: Glutatyon

yapıldı, anlamlılık $p<0,05$ olarak kabul edildi. P değerinin 0,05'ten küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Sham grubuyla ($\#p<0,05$, $\#\#p<0,01$, $\#\#\#p<0,001$) ve RI/RI grubuyla karşılaştırıldığında ($*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$) tüm gruplar arasında anlamlı farklılıklar tespit edildi.

Tüm gruplar arasında histopatolojik verilerin karşılaştırılması ve doku hasarının boyutunun daha iyi gösterilmesi amacıyla tübüler nekroz, enflamasyon ve kanama bulgularının varlığı semikantitatif olarak, yok: 0, az: 1, orta: 2 ve şiddetli: 3 olarak skorlandı. Her doku slaytı için x100 büyütmede en az beş alan değerlendirildi ve medyan boyama konsantrasyon puanı dikkate alındı. Grupları karşılaştırmak için One-Way ANOVA ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testleri kullanıldı ($*p<0,0$)³⁹.

AVA'nın Renal Dokuda Oksidan ve Antioksidan Parametreler Üzerindeki Etkileri

AVA'nın antioksidan etkisini araştırmak için MDA (Şekil 1A) ve GSH (Şekil 1B) seviyeleri araştırıldı. Oksidan durumun bir göstergesi olan MDA düzeyleri, RI/RI grubunda arttı ($p<0,001$). AVA uygulaması, RI/RI grubuna kıyasla MDA seviyelerini doza bağlı bir şekilde azalttı. Antioksidan durumun bir işareti olan GSH seviyeleri, sham gruba kıyasla RI/RI grubunda önemli ölçüde düşüktü ($p<0,001$). Doza bağlı bir şekilde AVA tedavisi,

iskemi/reperfüzyonun neden olduğu GSH seviyelerindeki düşüşü azalttı.

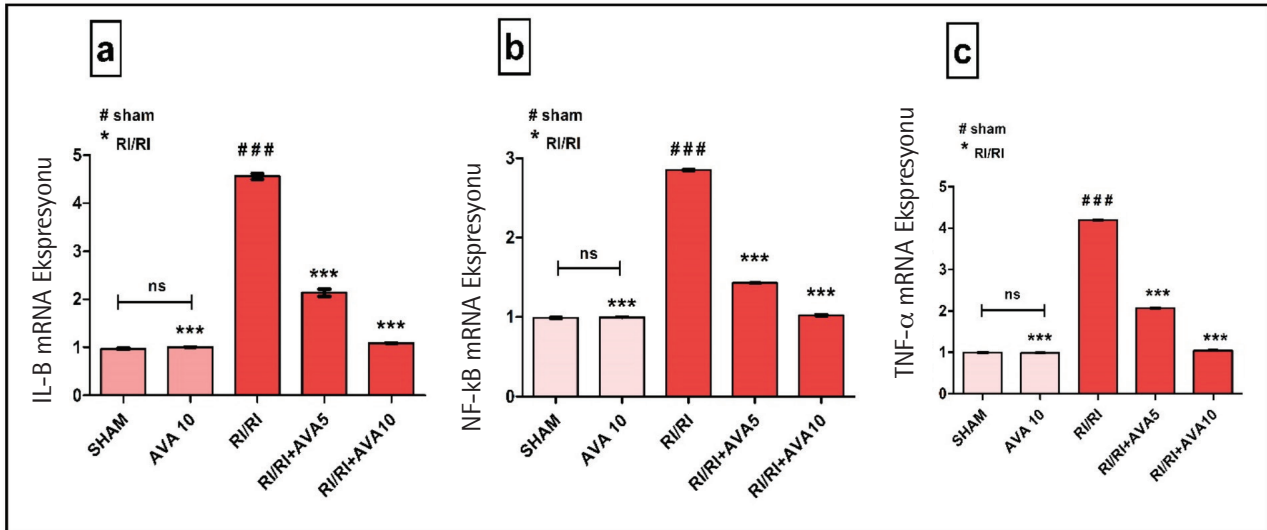
Renal Dokuda AVA'nın Anti-Enflamatuvar Parametreler Üzerindeki Etkileri

AVA'nın anti-enflamatuvar etkisini araştırmak için, sıçanların böbrek dokusundaki IL-1 β (Şekil 2A), NF-kB (Şekil 2B) ve TNF- α (Şekil 2C) mRNA ekspresyon seviyeleri analiz edildi. Anti-enflamatuvar durumun göstergeleri olan IL-1 β , NF-kB ve TNF- α mRNA ekspresyonu, sham gruba kıyasla RI/RI grubunda anlamlı derecede arttı ($p<0,001$). AVA tedavisi, iskemi/reperfüzyonun neden olduğu IL-1 β , NF-kB ve TNF- α mRNA ekspresyonundaki artışı doza bağlı bir şekilde geliştirdi ($p<0,001$).

AVA'nın Böbrek Dokusundaki Histopatolojik Değişiklikler Üzerindeki Etkileri

Işık Mikroskobu Sonuçları

AVA'nın RI/RI'deki histopatolojik etkisini araştırmak için böbrek dokusu örnekleri Harris hematoksilin ve eosin Y boyama ile boyandı ve ışık mikroskobu ile değerlendirildi (Şekil 3A-E). Ayrıca histopatolojik bulguların semi-kantitatif skorlaması Şekil 3F'de gösterilmiştir.



Şekil 2. AVA'nın böbrek dokusundaki RI/RI üzerindeki etkilerinin moleküler sonuçları. A) IL-1 β mRNA ekspresyon seviyeleri. B) NF- κ B ekspresyon seviyeleri. C) TNF- α mRNA ekspresyon düzeyi. AVA 5: 5 mg/kg AVA; AVA 10: 10 mg/kg AVA. mRNA'ların ekspresyonu, qRT-PCR analizi kullanılarak tespit edildi. Referans gen olarak β -aktin kullanıldı. İstatistiksel analiz için GraphPad Prism, versiyon 5.0 kullanıldı ve sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunuldu. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar One-Way ANOVA ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testleri kullanılarak yapıldı; p değerinin 0,05'ten küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Sham grubuyla ($\#p<0,05$, $\#\#p<0,01$, $\#\#\#p<0,001$) ve RI/RI grubuyla karşılaştırıldığında ($*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$) tüm gruplar arasında anlamlı farklılıklar tespit edildi.

AVA: Avanaflin, RI/RI: Renal iskemi-reperfüzyon hasarı, MDA: Malondialdehit, GSH: Glutatyon, NF- κ B: Nükleer faktör-kappa B, TNF- α : Tümör nekroz faktörü-alfa

Işık mikroskobu altında sham grubun böbrek dokularında normal görünümli glomerüler yapılar ile distal ve proksimal tübül yapıları gözlemlendi (Şekil 3A). AVA10 grubunun böbrek dokularında herhangi bir patolojik hasar gözlenmedi. Bu grubun glomerüler, distal ve proksimal tübül yapılarının histopatolojik görünümünün ışık mikroskopik bulguları sham grubunkine benzerdi (Şekil 3B).

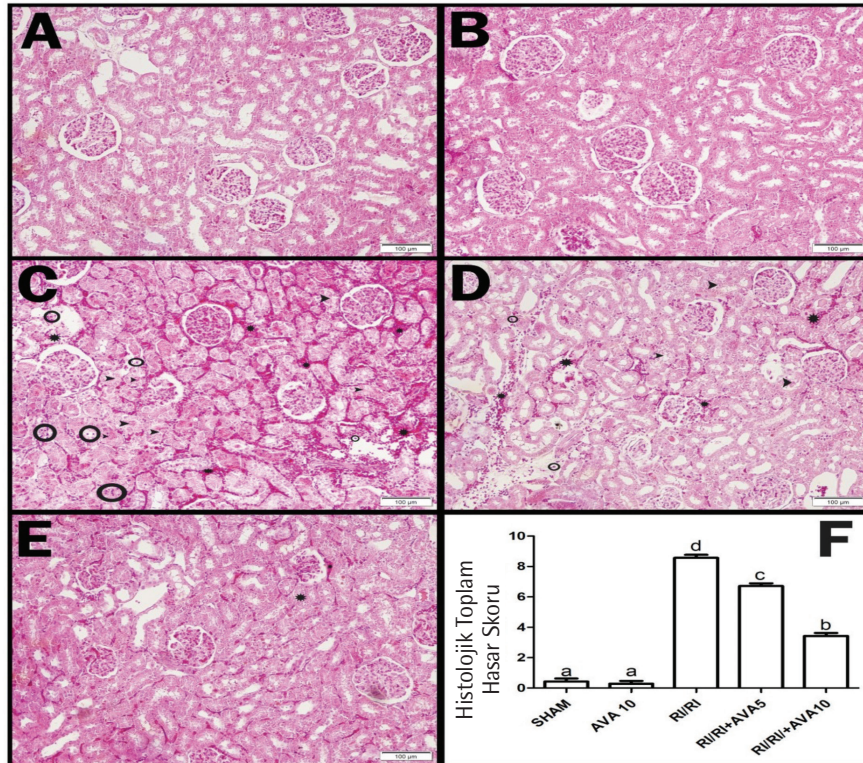
RI/RI grubunun böbrek dokusu örneklerinde iskemi/reperfüzyonun neden olduğu ciddi doku hasarı belirtileri gözlemlendi. Bu grubun böbrek dokularında glomerulus, distal ve proksimal tübüller (yıldız) çevresinde eritrosit hücrelerinin yığınlar oluşturduğu kanama alanları gözlemlendi. Bazı bölgelerde (halka) enflamatuvar hücrelere rastlandı. Glomerüler yapılarda dilatasyonla birlikte proksimal ve distal tübüllerde nekrotik hücre ölümüne bağlı bozulmalar gözlemlendi (Şekil 3C).

İskemi/reperfüzyondan kaynaklanan histopatolojik hasar, AVA uygulanan gruplarda doza bağlı olarak iyileşti (Şekil 3D, 3E). Ayrıca 10 mg/kg AVA uygulanan grubun histopatolojik görünümü sham gruba benzerdi (Şekil 3E).

TARTIŞMA

RI/RI, düşük kan akışına neden olarak iskemik dokularda ek organ hasarına ve ardından kan akışının restorasyonuna neden olan patolojik bir durumdur⁴⁰. RI/RI başta böbrek olmak üzere birçok organa zarar vererek mortalite oranını artırmaktadır. RI/RI, son dönem böbrek yetmezliğinin ve kronik böbrek yetmezliğinin önemli bir nedeni olarak kabul edilmektedir. Böbrek nakli, emboli travması, damar ve kalp cerrahisi, ateroskleroz ve kronik renal arter stenozu, böbrekleri RI/RI'ye maruz bırakabilecek durumlardan birkaçıdır⁴¹. Ayrıca RI/RI hastaların %60'ından fazlasında akut böbrek hasarının nedenidir⁴². İskemik böbreğin reperfüzyonu nekroza veya apoptoza yol açar, bu da enflamatuvar ve oksidatif durumu şiddetlendirir ve hücresel bütünlüğe zarar verir. Bu durumun birincil patofizyolojik mekanizmaları ROS salınımını ve proenflamatuvar medyatörlerin oluşumunu kapsamaktadır⁴³. Bu bilgiyi akılda tutarak, bu çalışmada bir PDE 5 inhibitörü olan AVA'nın sıçanlarda RI/RI üzerindeki etkilerini biyokimyasal, moleküler ve histopatolojik analizlerle belirlemeyi amaçladık.

ROS ve oksidatif stres böbrek dokusu hasarının gelişiminde önemli faktörlerdir⁴⁴. RI/RI boyunca aşırı ROS üretimi endotel



Şekil 3. Patolojik değişiklikler: AVA'nın renal dokudaki RI/RI üzerindeki etkilerinin hematoksilin-eozin boyama bulguları ve histolojik total doku hasarı skorlama sonuçları. A) Sham grubu, B) AVA-10 grubu, C) RI/RI grubu, D) RI/RI + AVA 5 grubu, E) RI/RI + AVA 10 grubu, F) Histopatoloji skorlama grafiği (yıldız: Kanama; halka: Enflamatuvar hücreler, ok başı: Tübüler nekroz) (*p<0,0)

AVA: Avanafilein, RI/RI: Renal iskemi-reperfüzyon hasarı

disfonksiyonu, tübüler hasar ve interstisyel enflamasyonla sonuçlanabilir. Bu nedenle RI/RI gelişiminde oksidatif stres önemlidir^{45,46}. MDA düzeyi, lipid peroksidasyonunun, serbest oksijen radikal içeriğinin ve bu radikallerin neden olduğu böbrek dokusu hasarının boyutunun bir göstergesidir^{47,48}. GSH, oksijensiz radikallere karşı endojen korumada esastır⁴⁹. RI/RI, GSH ve lipid peroksidasyon ürünü MDA ile ilişkili oksidatif stres faktörlerini araştırdık. Önceki çalışmalar RI/RI sonrası MDA düzeyinin arttığını, GSH düzeyinin ise azaldığını göstermişlerdir^{50,51}. Ayrıca Prem ve Kurian⁵² RI/RI sıçan modelinde oksidatif stres belirteçlerinin önemli ölçüde arttığını ortaya koymuşlardır. Araştırmamız böbrek dokusunda GSH ve MDA düzeylerini tespit etti ve sham grupla karşılaştırıldığında, RI/RI grubundaki sıçanların böbrek dokusundaki MDA düzeyinin önemli ölçüde arttığını, GSH düzeylerinin ise anlamlı düzeyde azaldığını bulduk. Bu da RI/RI sonrası, böbrek dokularındaki oksidatif stres reaksiyonunun şiddetlendiğini gösterdi. Tersine, RI/RI + AVA gruplarında, AVA dozlarına bağlı olarak GSH seviyeleri önemli ölçüde arttı ve MDA seviyeleri önemli ölçüde azaldı. AVA'nın bu etkileri, oksidatif stresin ve daha az ölçüde enflamatuvar yanıtların inhibisyonu ile ilişkili görünmektedir. Bu bulgular AVA'nın oksidatif durumu iyileştirdiğini gösterdi. Sonuç olarak oksidatif stresi azalttı ve RI/RI'yi hafifletti. Chowdari Gurram ve ark.⁵³ AVA'nın bir fare modelinde oksidatif stres belirteçlerini anlamlı ölçüde azalttığını bildirmişlerdir. Ayrıca bazı araştırmacılar AVA'nın oksidatif parametreleri önemli ölçüde iyileştirdiğini de bildirmişlerdir⁵⁴. Benzer şekilde PDE 5 inhibitörlerinin böbrek dokusunda oksidatif stresi düzenleyerek koruyucu bir etkiye sahip olduğu daha önce tespit edilmişti^{55,56}. Literatürde bildirilen diğer bulgularla tutarlı olarak, bizim sonucumuz AVA tedavisinin oksidan parametre oluşumunu azaltırken antioksidan parametre oluşumunu arttırdığını göstermektedir.

Hasara yanıt olan doku onarımında enflamasyon önemlidir⁵⁷. ROS enflamatuvar yanıt, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, ER ve oksidatif stresi de içeren çeşitli yollarla doku hasarını indükler⁵⁸. Sonuç olarak, ROS oluşumunun engellenmesi RI/RI koruması için etkili bir yöntemdir. RI/RI, NF-κB ailesinin çok önemli olduğu önemli bir patolojik durum ve enflamatuvar reaksiyondur. ROS üretimi NF-κB'yi active ederek, daha sonra ICAM-1 ekspresyonunu tetikler. Bununla birlikte, ROS ve enflamatuvar reaksiyonlar, NF-κB ve ICAM-1 progresyonu ile iske mi/reperfüzyon hasarının gelişiminde önemli rol oynar⁵⁹. Bağışıklık hücreleri, immün, enflamatuvar ve hematopoietik yanıtların bir spektrumunu kontrol eden TNF-α'yı salgılayarak, enflamatuvar süreçte çok önemli bir rol oynarlar⁶⁰. TNF-α, IL-1β dahil olmak üzere diğer enflamatuvar belirteçlerin üretimini uyarabilir ve doku ve organların hasarını ağırlaştırabilir¹³. Ayrıca RI/RI'de IL-1'in aktivasyonuna yol açan enflamatuvar yanıtın önemi, etkisini modüle ederek IL-1'i RI/RI'de değerli bir hedef haline getirir. Bu nedenle RI/RI tedavisi için IL-1β,

NF-κB ve TNF-α dahil olmak üzere proenflamatuvar sitokinleri azaltmak çok önemlidir⁶¹. Bu bilgiler ışığında, bu çalışmada RI/RI ve AVA tedavisi sonrası böbrek dokularında IL-1β, NF-κβ ve TNF-α mRNA ekspresyonu incelenerek AVA'nın RI/RI'deki olası tıbbi önemi değerlendirildi. Sham grupla karşılaştırıldığında RI/RI grubundaki IL-1β, NF-κβ ve TNF-α mRNA ekspresyon seviyelerinin önemli ölçüde arttığını bulduk; bu da RI/RI sonrasında böbrek dokularında enflamatuvar reaksiyonun ağırlaştığını ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, sitokin düzeylerinde RI/RI kaynaklı artışlar bulan önceki araştırmalarla tutarlıdır^{62,63}. Embaby ve ark.⁶⁴ sıçanlarda akut RI/RI'da renal TNF-α ve NF-κB mRNA ekspresyonlarının arttığını göstermişlerdir. Çakır ve ark.⁶⁵ RI/RI'li sıçanlarda IL-1β, NF-κβ ve TNF-α mRNA ekspresyonlarının seviyelerinin arttığını tespit etmişlerdir. Ek olarak, yakın zamanda yapılan birkaç çalışma, IL-1β, NF-κβ ve TNF-α dahil olmak üzere anti-enflamatuvar sitokinlerin düzeylerinin RI/RI sonrasında arttığını göstermiştir^{66,67}. Mevcut bulgular, anti-enflamatuvar parametrelerde AVA'nın sabit modifikasyonlarının RI/RI'den kaynaklandığını göstermiştir; bu da AVA'nın güçlü anti-enflamatuvar özelliğine işaret etmektedir. Bu bulgular, AVA'nın sitokin seviyelerinde RI/R kaynaklı artışları önleyerek doku hasarını azalttığını göstermiştir. Sonuç olarak AVA'nın anti-enflamatuvar etkisinin oksidatif hasarın azaltılmasıyla ilişkili olduğu görülmektedir. AVA'nın, pro-enflamatuvar sitokinlerin baskılanması da dahil olmak üzere anti-enflamatuvar etkileri daha önce çeşitli hayvan modellerinde gösterilmiştir. Aydın ve ark.⁶⁸ AVA'nın sıçanlarda LPS kaynaklı akut akciğer hasarı modelinde NF-κB ve IL-1 β seviyelerini modüle ettiğini göstermişlerdir. Chowdari Gurram ve ark.⁵³ AVA'nın farelerde LPS kaynaklı nöroenflamasyonda Tnf R1 ve NF-κB gibi nöroenflamatuvar sitokinleri iyileştirdiğini bulmuşlardır. Benzer şekilde, PDE 5 inhibitörlerinin prostat iskemisi⁶⁹ ve akut böbrek toksisitesi⁷⁰ modellerinde IL-1, NF-κB ve TNF-α'nın inhibisyonu yoluyla koruyucu bir role sahip olduğu daha önce tespit edilmiştir. Önceki araştırmalarla tutarlı olarak bulgularımız, AVA'nın iske mi/reperfüzyon nedeniyle IL-1β, NF-κB ve TNF-α seviyelerindeki artışı önleyerek doku hasarını azalttığını göstermektedir.

Mevcut araştırmadaki histopatolojik skorlara bakıldığında, histolojik toplam doku hasarı skoru RI/RI grubunda oldukça yüksek iken, 5 ve 10 mg/kg AVA ile tedavi edilen gruplarda bu skor azaldı. RI/RI grubunda böbrek dokuları da ciddi patolojik değişiklikler gösterdi. RI/RI grubunda kanama, yaygın enflamatuvar hücre infiltrasyonu ve nekroz görüldü. Ancak 5 ve 10 mg/kg AVA alan gruplarda böbrek dokularının histolojik görünümü neredeyse normaldi. Biyokimyasal ve moleküler bulgularımız histoloji bulgularımız ile desteklendi.

Çalışmanın Kısıtlılıkları

Bu çalışmanın sınırlılıkları arasında SOD verileri gibi biyokimyasal belirteçlerin ve BUN gibi böbrek fonksiyon belirteçlerinin

araştırılamaması yer almaktadır. Bu çalışmada ortaya çıkan etki mekanizmasının daha net anlaşılabilmesi için daha detaylı çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünüyoruz. Ancak bu çalışma, AVA'nın RI/RI üzerindeki etkisini ortaya koyan ilk çalışma olması nedeniyle özellikle değerli ve orijinaldir. Çalışmanın daha sonraki çalışmalara yol göstermesini umuyoruz.

SONUÇ

Biyokimyasal, moleküler ve histopatolojik bulgulara dayanarak AVA'nın iskemi/reperfüzyona bağlı böbrek hasarını önemli ölçüde iyileştirdiğini gösterdik. AVA, RI/RI'de gerekli olabilecek hem anti-enflamatuvar hem de antioksidan süreçlere müdahale edebilir. AVA'nın RI/RI üzerindeki etkileri, (1) IL-1 β , NF- κ B ve TNF- α dahil enflamatuvar sitokinlerin immünopozitifliğini azaltan, (2) MDA ve GSH dahil oksidatif stresle ilişkili bileşenlerdeki olumsuz değişiklikleri hafifleten ve (3) ciddi histopatolojik modifikasyonları azaltan tedaviyle ilişkili olabilir. AVA, RI/RI'nin klinik tedavisinde cerrahiye ek olarak potansiyel bir terapötik ajan olarak düşünülmelidir. Bu bulgular, iskemi/reperfüzyonun neden olduğu böbrek hasarını tedavi etmek için AVA'nın kullanılmasına yönelik mekanik bir temel oluşturabilir.

Etik

Etik Kurul Onayı: Bu hayvan çalışması ve tüm protokolleri Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu tarafından 04-04-2022 tarihinde E-75296309-050.01.04-2200103613 belge numarasıyla onaylandı.

Hasta Onayı: Hayvanlar üzerinde yapılmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

Yazarlık Katkıları

Cerrahi ve Medikal Uygulama: T.N.Y., Z.H., C.K., A.B., T.T., M.S.C., B.Ö., Konsept: T.N.Y., Z.H., C.K., A.B., T.T., M.S.C., B.Ö., Dizayn: T.N.Y., Z.H., C.K., A.B., T.T., M.S.C., B.Ö., Veri Toplama veya İşleme: T.N.Y., Z.H., C.K., A.B., T.T., M.S.C., B.Ö., Analiz veya Yorumlama: T.N.Y., Z.H., C.K., A.B., T.T., M.S.C., B.Ö., Literatür Arama: T.N.Y., Z.H., C.K., Yazan: T.N.Y., Z.H., C.K., A.B., T.T., M.S.C., B.Ö.

Çıkar Çatışması: Yazarlar bu makale ile ilgili olarak herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

Finansal Destek: Çalışmamız için hiçbir kurum ya da kişiden finansal destek alınmamıştır.

KAYNAKLAR

1. Ray SC, Mason J, O'Connor PM. Ischemic Renal Injury: Can Renal Anatomy and Associated Vascular Congestion Explain Why the Medulla and Not the Cortex Is Where the Trouble Starts? *Semin Nephrol.* 2019;39:520-9.

2. Quadri SS, Culver S, Siragy HM. Prorenin receptor mediates inflammation in renal ischemia. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2018;45:133-9.
3. Wu MY, Yang GT, Liao WT, Tsai AP, Cheng YL, Cheng PW, et al. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cell Physiol Biochem.* 2018;46:1650-67.
4. Inhibition of Brd4 alleviates renal ischemia/reperfusion injury-induced apoptosis and endoplasmic reticulum stress by blocking FoxO4-mediated oxidative stress. *Redox Biol.* 2019;24:101195.
5. Martin JL, Gruszczak AV, Beach TE, Murphy MP, Saeb-Parsy K. Mitochondrial mechanisms and therapeutics in ischaemia reperfusion injury. *Pediatr Nephrol.* 2019;34:1167-74.
6. Malek M, Nematbakhsh M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. *J Renal Inj Prev.* 2015;4:20-7.
7. Akhigbe R, Ajayi A. The impact of reactive oxygen species in the development of cardiometabolic disorders: a review. *Lipids Health Dis.* 2021;20:23.
8. Sengul O, Ferah I, Polat B, Halici Z, Bayir Y, Yilmaz M, Kilic N, Keles ON. Blockade of endothelin receptors with bosentan limits ischaemia/reperfusion-induced injury in rat ovaries. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013;170:458-63.
9. Aslan M, Erkanli Senturk G, Akkaya H, Sahin S, Yilmaz B. The effect of oxytocin and Kisspeptin-10 in ovary and uterus of ischemia-reperfusion injured rats. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2017;56:456-62.
10. Nayki C, Nayki U, Keskin Cimen F, Kulhan M, Yapca OE, Kurt N, et al. The effect of rutin on ovarian ischemia-reperfusion injury in a rat model. *Gynecol Endocrinol.* 2018;34:809-14.
11. Hashmi SF, Rathore HA, Sattar MA, Johns EJ, Gan CY, Chia TY, et al. Hydrogen Sulphide Treatment Prevents Renal Ischemia-Reperfusion Injury by Inhibiting the Expression of ICAM-1 and NF- κ B Concentration in Normotensive and Hypertensive Rats. *Biomolecules.* 2021;11:1549.
12. Prince PD, Rodriguez Lanzi C, Fraga CG, Galleano M. Dietary (-)-epicatechin affects NF- κ B activation and NADPH oxidases in the kidney cortex of high-fructose-fed rats. *Food Funct.* 2019;10:26-32.
13. Zhang X, Jin C, Li Y, Guan S, Han F, Zhang S. Catalpol improves cholinergic function and reduces inflammatory cytokines in the senescent mice induced by D-galactose. *Food Chem Toxicol.* 2013;58:50-5.
14. Kucuk A, Yucel M, Erkasap N, Tosun M, Koken T, Ozkurt M, et al. The effects of PDE5 inhibitory drugs on renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Mol Biol Rep.* 2012;39:9775-82.
15. Swiecicka A. The efficacy of PDE5 inhibitors in diabetic patients. *Andrology.* 2023;11:245-56.
16. Brown KE, Dhaun N, Goddard J, Webb DJ. Potential therapeutic role of phosphodiesterase type 5 inhibition in hypertension and chronic kidney disease. *Hypertension.* 2014;63:5-11.
17. Zucchi A, Costantini E, Scropo FI, Silvani M, Kopa Z, Illiano E, et al. The first-generation phosphodiesterase 5 inhibitors and their pharmacokinetic issue. *Andrology.* 2019;7:804-17.
18. Ahmed WS, Geethakumari AM, Biswas KH. Phosphodiesterase 5 (PDE5): Structure-function regulation and therapeutic applications of inhibitors. *Biomed Pharmacother.* 2021;134:111128.
19. Ockaili R, Salloum F, Hawkins J, Kukreja RC. Sildenafil (Viagra) induces powerful cardioprotective effect via opening of mitochondrial K(ATP) channels in rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283:H1263-9.
20. Serarslan Y, Yonden Z, Ozgiray E, Oktar S, Guven EO, Sogut S, et al. Protective effects of tadalafil on experimental spinal cord injury in rats. *J Clin Neurosci.* 2010;17:349-52.
21. Ko IG, Shin MS, Kim BK, Kim SE, Sung YH, Kim TS, et al. Tadalafil improves short-term memory by suppressing ischemia-induced apoptosis of hippocampal neuronal cells in gerbils. *Pharmacol Biochem Behav.* 2009;91:629-35.

22. Celik M, Aksoy AN, Aksoy H, Aksoy Y, Halici Z. Sildenafil reduces ischemia-reperfusion injury in rat ovary: biochemical and histopathological evaluation. *Gynecol Obstet Invest.* 2014;78:162-7.
23. Zisis IE, Georgiadis G, Docea AO, Calina D, Cercelaru L, Renoprotective Effect of Vardenafil and Avanafil in Contrast-Induced Nephropathy: Emerging Evidence from an Animal Model. *J Pers Med.* 2022;12:670.
24. Huyut Z, Bakan N, Yildirim S, Akbay HI, Huyut MT, Ahlatci A, et al. Can zaprinast and avanafil induce the levels of angiogenesis, bone morphogenic protein 2, 4 and 7 in kidney of ovariectomised rats? *Arch Physiol Biochem.* 2022;128:945-50.
25. Huyut Z, Bakan N, Yildirim S, Alp HH. Effects of the Phosphodiesterase-5 (PDE-5) Inhibitors, Avanafil and Zaprinast, on Bone Remodeling and Oxidative Damage in a Rat Model of Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. *Med Sci Monit Basic Res.* 2018;24:47-58.
26. Huyut Z, Bakan N, Akbay Hİ, Yildirim S, Şekeroğlu MR. Zaprinast and avanafil increase the vascular endothelial growth factor, vitamin D3, bone morphogenic proteins 4 and 7 levels in the kidney tissue of male rats applied the glucocorticoid. *Arch Physiol Biochem.* 2022;128:1290-6.
27. Ziypak T, Halici Z, Alkan E, Akpinar E, Polat B, Adanur S, et al. Renoprotective effect of aliskiren on renal ischemia/reperfusion injury in rats: electron microscopy and molecular study. *Ren Fail.* 2015;37:343-54.
28. Nezamoleslami S, Sheibani M, Jahanshahi F, Mumtaz F, Abbasi A, Dehpour AR. Protective effect of dapsone against renal ischemia-reperfusion injury in rat. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2020;42:272-9.
29. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95:351-8.
30. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 1968;25:192-205.
31. Bayir Y, Un H, Cadirci E, Akpinar E, Diyarbakir B, Calik I, et al. Effects of Aliskiren, an RAAS inhibitor, on a carrageenan-induced pleurisy model of rats. *An Acad Bras Cienc.* 2019;91:e20180106.
32. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-75.
33. Kose D, Kose A, Halici Z, Cadirci E, Tavaci T, Gurbuz MA, et al. Bosentan, a drug used in the treatment of pulmonary hypertension, can prevent development of osteoporosis. *Iran J Basic Med Sci.* 2021;24:922-7.
34. Cadirci E, Ugan RA, Dincer B, Gundogdu B, Cinar I, Akpinar E, et al. Urotensin receptors as a new target for CLP induced septic lung injury in mice. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2019;392:135-45.
35. Sipahi H, Orak D, Reis R, Yalman K, Senol O, Palabiyik-Yucelik SS, et al. A comprehensive study to evaluate the wound healing potential of okra (*Abelmoschus esculentus*) fruit. *J Ethnopharmacol.* 2022;287:114843.
36. Köse D, Yüksel TN, Halici Z, Çadırcı E, Gürbüz MA. The Effects of Agomelatine Treatment on Lipopolysaccharide-Induced Septic Lung Injuries in Rats. *Eurasian J Med.* 2021;53:127-31.
37. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25:402-8.
38. Yüksel TN, Yayla M, Duygu K, Uğan RA, Toktay E, Kılıç PA, et al. Investigation of the Protective Effects of Pomegranate (*Punica Granatum L.*) Peel Extract on Lipopolysaccharide-induced Uveitis in Rats. *Trakya University Journal of Natural Sciences.* 2023;24:11-20.
39. Toktay E, Taştan TB, Gurbuz MA, Erbas E, Demir O, Ugan RA, et al. Potential protective effect of astaxanthin on ovary ischemia-reperfusion injury. *Iran J Basic Med Sci.* 2022;25:173-8.
40. Pefanis A, Ierino FL, Murphy JM, Cowan PJ. Regulated necrosis in kidney ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int.* 2019;96:291-301.
41. Abbas W, Altemimi M, Qassam H, Hameed AA, Zigam Q, Abbas L, et al. Fimasartan ameliorates renal ischemia reperfusion injury via modulation of oxidative stress, inflammatory and apoptotic cascades in a rat model. *J Med Life.* 2022;15:241-51.
42. Park M, Kwon CH, Ha HK, Han M, Song SH. RNA-Seq identifies condition-specific biological signatures of ischemia-reperfusion injury in the human kidney. *BMC Nephrol.* 2020;21:398.
43. Shan Y, Chen D, Hu B, Xu G, Li W, Jin Y, et al. Allicin ameliorates renal ischemia/reperfusion injury via inhibition of oxidative stress and inflammation in rats. *Biomed Pharmacother.* 2021;142:112077.
44. Tian Y, Shu J, Huang R, Chu X, Mei X. Protective effect of renal ischemic postconditioning in renal ischemic-reperfusion injury. *Transl Androl Urol.* 2020;9:1356-65.
45. Zhao M, Wang Y, Li L, Liu S, Wang C, Yuan Y, et al. Mitochondrial ROS promote mitochondrial dysfunction and inflammation in ischemic acute kidney injury by disrupting TFAM-mediated mtDNA maintenance. *Theranostics.* 2021;11:1845-63.
46. Li F, Bahnson EM, Wilder J, Siletsky R, Hagaman J, Nickeleit V, et al. Oral high dose vitamin B12 decreases renal superoxide and post-ischemia/reperfusion injury in mice. *Redox Biol.* 2020;32:101504.
47. Zhu MM, Wang L, Yang D, Li C, Pang ST, Li XH, et al. Wedelolactone alleviates doxorubicin-induced inflammation and oxidative stress damage of podocytes by IκB/NF-κB pathway. *Biomed Pharmacother.* 2019;117:109088.
48. Hu B, Tang J, Zhang Y, Ma ZY, Shan YG, Liu J, et al. Glycogen Synthase Kinase-3β Inhibitor Attenuates Renal Damage Through Regulating Antioxidant and Anti-inflammation in Rat Kidney Transplant With Cold Ischemia Reperfusion. *Transplant Proc.* 2019;51:2066-70.
49. Aboutaleb N, Jamali H, Abolhasani M, Pazoki Toroudi H. Lavender oil (*Lavandula angustifolia*) attenuates renal ischemia/reperfusion injury in rats through suppression of inflammation, oxidative stress and apoptosis. *Biomed Pharmacother.* 2019;110:9-19.
50. Bayir Y, Cadirci E, Polat B, Baygutalp NK, Albayrak A, Karakus E, et al. Aliskiren - a promising strategy for ovarian ischemia/reperfusion injury protection in rats via RAAS. *Gynecol Endocrinol.* 2016;32:675-83.
51. Huang D, Chen D, Hu T, Liang H. GATA2 promotes oxidative stress to aggravate renal ischemia-reperfusion injury by up-regulating Redd1. *Mol Immunol.* 2023;153:75-84.
52. Prem PN, Kurian GA. Fisetin attenuates renal ischemia/reperfusion injury by improving mitochondrial quality, reducing apoptosis and oxidative stress. *N-S Arch Pharmacol.* 2022;395:547-61.
53. Chowdari Gurram P, Satarker S, Kumar G, Begum F, Mehta C, Nayak U, et al. Avanafil mediated dual inhibition of IKKβ and TNFR1 in an experimental paradigm of Alzheimer's disease: in silico and in vivo approach. *J Biomol Struct Dyn.* 2022:1-19.
54. Kurakula M, Naveen N R, Patel B, Manne R, Patel DB. Preparation, Optimization and Evaluation of Chitosan-Based Avanafil Nanocomplex Utilizing Antioxidants for Enhanced Neuroprotective Effect on PC12 Cells. *Gels.* 2021;7:96.
55. Jorge ARC, Marinho AD, Silveira JAM, Nogueira Junior FA, de Aquino PEA, Alves APNN, et al. Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil attenuates kidney injury induced by Bothrops alternatus snake venom. *Toxicon.* 2021;202:46-52.
56. Mehanna OM, El Askary A, Al-Shehri S, El-Esawy B. Effect of phosphodiesterase inhibitors on renal functions and oxidant/antioxidant parameters in streptozocin-induced diabetic rats. *Arch Physiol Biochem.* 2018;124:424-9.
57. Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2012;28:137-61.
58. Malek M, Nematbakhsh M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. *J Renal Inj Prev.* 2015;4:20-7.
59. Hashmi SF, Rathore HA, Sattar MA, Johns EJ, Gan CY, Chia TY, et al. Correction: Hashmi et al. Hydrogen Sulphide Treatment Prevents Renal

- Ischemia-Reperfusion Injury by Inhibiting the Expression of ICAM-1 and NF- κ B Concentration in Normotensive and Hypertensive Rats. *Biomolecules* 2021, 11, 1549. *Biomolecules*. 2022;12:593.
60. Kong DH, Kim YK, Kim MR, Jang JH, Lee S. Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. *Int J Mol Sci*. 2018;19:1057.
61. Vannay A, Fekete A, Langer R, Toth T, Sziksz E, Vasarhelyi B, et al. Dehydroepiandrosterone pretreatment alters the ischaemia/reperfusion-induced VEGF, IL-1 and IL-6 gene expression in acute renal failure. *Kidney Blood Press Res*. 2009;32:175–84.
62. Li Y, Xu B, Yang J, Wang L, Tan X, Hu X, et al. Liraglutide protects against lethal renal ischemia-reperfusion injury by inhibiting high-mobility group box 1 nuclear-cytoplasmic translocation and release. *Pharmacol Res*. 2021;173:105867.
63. Bai T, Wang X, Qin C, Yang K, Duan Z, Cao Z, et al. Deficiency of mindin reduces renal injury after ischemia reperfusion. *Mol Med*. 2022;28:152.
64. Embaby EM, Saleh RM, Marghani BH, Barakat N, Awadin W, Elshal MF, et al. The combined effect of zinc oxide nanoparticles and milrinone on acute renal ischemia/reperfusion injury in rats: Potential underlying mechanisms. *Life Sci*. 2023;323:121435.
65. Çakır M, Aydın A, Tekin S. Protective effect of fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 and monoacylglycerol lipase inhibitor KML29 on renal ischemia-reperfusion injury via toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B pathway. *Int Immunopharmacol*. 2023;114:109586.
66. Younis NS. Myrrh Essential Oil Mitigates Renal Ischemia/Reperfusion-Induced Injury. *Curr Issues Mol Biol*. 2023;45:1183–96.
67. Abdel-Razek HA, Rizk MS, Amer GS, Kora MA, Afifi AM, Donia SS. Impact of combined ischemic preconditioning and melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Iran J Basic Med Sci*. 2023;26:235–40.
68. Aydın P, Magden ZBA, Uzuncakmak SK, Halici H, Akgun N, Mendil AS, et al. Avanafil as a Novel Therapeutic Agent Against LPS-Induced Acute Lung Injury via Increasing CGMP to Downregulate the TLR4-NF- κ B-NLRP3 Inflammasome Signaling Pathway. *Lung*. 2022;200:561–72.
69. Kobayashi H, Zha X, Nagase K, Inamura S, Taga M, Aoki Y, et al. Phosphodiesterase 5 inhibitor suppresses prostate weight increase in type 2 diabetic rats. *Life Sci*. 2022;298:120504.
70. Wadie W, Abdel-Razek NS, Salem HA. Phosphodiesterase (1, 3 & 5) inhibitors attenuate diclofenac-induced acute kidney toxicity in rats. *Life Sci*. 2021;277:119506.