

Böbrek iskemi ve reperfüzyon hasarında kreatin monohidrat desteğinin etkileri

Effects of creatine monohydrate supplementation in renal ischemia and reperfusion injury



Öz

Amaç; Böbrek nakli ya da cerrahi girişimler sırasında gelişebilen iskemi ve reperfüzyon hasarı etkisini hücrelerdeki enerji metabolizmasının bozulması ve oksidatif stresin artmasına yol açarak gösterir. Popüler sporcu destek ürünü olan kreatin monohidrat endojen bir bileşiktir. Hücrelerin enerji metabolizmasını etkileyerek oksidatif stresi azalttığı ve antioksidan etki gösterdiği bilinmektedir. Böbrekte deneysel olarak oluşturulan iskemi reperfüzyon hasarı sonrasında artan oksidatif strese ve yapısal düzeyde izlenen hasara karşı kreatin monohidratın olası etkisinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Yöntemler: Çalışmada Sprague Dawley (270-380 gr) türü 24 adet erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar rastgele dört gruba ayrıldı: Grup 1: Kontrol grubu, Grup 2: Iskemi/ Reperfüzyon grubu, Grup 3: Iskemi/ Reperfüzyon +Kreatin monohidrat (Kreatin 2 g/kg/gün), Grup 4: Kreatin monohidrat (2 g/kg/gün) olarak düzenlendi. Grup 2 ve Grup 3'teki sıçanlara intraperitoneal anestezi sonrası 45 dakika boyunca sol renal arterin klemplenmesiyle renal iske- mi oluşturuldu ve 45. dk'nın sonunda klempl uzaklaştırıldıktan sonra sol bôbreğin parlak kırmızı renge ulaşması reperfüzyonun sağlanması olarak kabul edilerek karın ön duvarı kapatıldı. Grup 3 ve Grup 4'deki sıçanlara 3 gün süresince kreatin monohidrat (2g/kg/gün) distile su içinde çözülerek gavaj yoluyla uygulandı. Reperfüzyondan 72 saat sonra genel anestezi altında kardiyak kan, sol böbrek dokuları alındıktan sonra sakrifiye edildiler. Böbrek dokuları ışık ve elektron mikroskopta değerlendirildi. Plazma örneklerinde total oksidan ve antioksidan stres parametreleri ölçüldü.

Bulgular: Iskemi ve reperfüzyon modelinde ince yapı düzeyinde glomerüler kapillerlerdeki belirgin eritrosit stazı saptandı. Bunun yanında glomerüller endotelin ve podositlerin hücre bütünlüğünün korunamadığı izlenirken proksimal tübüllerdeki hücrelerde de şişme sonucu tübül lümenin tıkanıdığı görüldü. Kreatin uygulanan gruplarda total antioksidan seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artması yeniden yapılanma sürecinin pozitif yönde ilerlediğinin göstergesi olarak yorumlandı.

Sonuç: Sonuç olarak uygulanan yöntemden kaynaklandığı düşünülen eritrosit stazı nedeniyle dolaşımın tam olarak sağlanamadığı ve buna bağlı olarak kreatin monohidrat desteğinin yapısal düzeyde belirgin olumlu etki göstermediği düşünüldü.

Anahtar Sözcükler: Böbrek; elektron mikroskobu; iskemi-reperfüzyon hasarı

Abstract

Aim: Ischemia and reperfusion injury, can occur during kidney transplantations surgery, showing their effects by disrupting cellular energy metabolism and increasing oxidative stress. Creatine monohydrate, a popular sport supplement, is an endogenous compound. It is known that it reduces oxidative stress through effecting the energy metabolism of cells and has an antioxidant effect. It was aimed to evaluate the possible effect of creatine monohydrate against the increased oxidative stress and structural damage mediated by experimentally induced renal ischemia-reperfusion injury in this study.

Methods: Twenty-four male Sprague Dawley (270-380 gr) rats were used in the study. Rats were randomly divided into four groups: Group-1: Control group, Group-2: Ischemia/Reperfusion group, Group-3: Ischemia / Reperfusion+ Creatine monohydrate (2g/kg/day), Group-4: Creatine monohydrate (2g/kg/day). After anesthesia, a midline abdominal incision was performed in the related groups and renal ischemia was induced by clamping left renal artery during 45 min. At the end of ischemia the non-traumatic clamp was removed and kidney reperfusion was noted as return of blush color. Afterward, abdominal posterior wall was closed. Creatine monohydrate (2 g/kg/day) was dissolved in distilled water and given to the rats with oral gavage in Group-3 and Group-4 for 3 days. After 72 hours of reperfusion, cardiac blood and left kidney tissues were taken under general anesthesia and they were sacrificed. Kidney tissues were evaluated by light and electron microscopy. Total antioxidant and oxidant stress parameters were also measured in the plasma samples.

Results: In the ischemia and reperfusion model, significant erythrocyte stasis was detected in the glomerular capillaries at ultrastructural level. In addition, it was observed that the integrity of the glomerular endothelial cells and podocytes could not be preserved, while the tubule lumen was occluded as a result of the swelling of epithelial cells. The statistically significant increase in the total antioxidant level in the creatine administered groups was interpreted as an indicator of the positive progress of the remodeling process.

Conclusions: As a result, it was observed that creatine monohydrate supplementation did not show a significant beneficial effect a structural level, since the circulation could not be fully restored due to erythrocyte stasis caused by the procedure.

Keywords: Electron microscopy; ischemia-reperfusion injury; kidney

Fatma Helvacioğlu¹, Tayfun Göktaş², Hande Özge Altunkaynak Çamca³, Tuğçe Şirinoğlu⁴

¹ Başkent Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

² Lokman Hekim Üniversitesi, Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

³ Sağlık Bilimleri Fakültesi, Gülhane Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı

⁴ Medipol Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı

Geliş/Received : 17.06.2022

Kabul/Accepted: 14.10.2022

DOI: 10.21673/anadoluklin.1132144

Yazışma yazarı/Corresponding author

Fatma Helvacioğlu

Başkent Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye
E-posta: fatmahelvacioglu@gmail.com

ORCID

Fatma Helvacioğlu: 0000-0002-6026-0045

Tayfun Göktaş: 0000-0002-6727-3084

Hande Ö. A. Çamca: 0000-0002-4547-7756

Tuğçe Şirinoğlu: 0000-0003-0364-0401

GİRİŞ

İskemi, dokunun bir bölümünün ya da tamamının kanla beslenmesinin kesilmesine ya da önemli ölçüde azalmasına bağlı olarak dokunun perfüzyonundaki yetersizlik sonucu dokuların ve organların oksijenden yoksun kalması olarak tanımlanır. İskemi ve reperfüzyon (IR) hasarı klinikte sıklıkla aort klemplenmesi, renovasküler cerrahi, travma gibi durumlarda karşılaşıldığı gibi böbrek transplantasyonları sırasında tehlike yaratan koşullardan biridir (1). Hasarın etkisi süresi ile ilişkilidir ve iskemik sürenin artışı böbreğin yeniden yapılanma yetisini azaltır (2). İskemik evrede dokuda kan akımının kesilmesi oksijenin ve besinin azalması oksidatif stresin artmasına, inflamasyonun başlamasına neden olur (2,3). Oksijen desteğinin kesilmesi aynı zamanda hücrelerdeki adenozin trifosfatın (ATP) azalmasına da yol açar (4). Normal koşullar altında hücrelerde glikoliz, oksidatif fosforilasyon ve fosfokreatin enerji sistemi ile sürekli ATP desteği sağlanır. Fosfokreatin, adenozin difosfata (ADP) oksijenden bağımsız olarak fosforil grubu ekler ve hızlı bir şekilde ATP sentezini sağlar. Kreatin ve fosforlanmış formu (fosfokreatin) hücrelerde anaerobik olarak ATP üretiminde önemli rol oynar (5). Hücre içindeki fosfokreatin ve ATP hücredeki enerji miktarını gösterir. Vücuttaki günlük kreatin, gereksinimin bir bölümü karaciğer, böbrek, pankreas ve beyinde arjinin, glisin ve metionin amino asitlerinden sentezlenirken geri kalanı diyetteki et ürünlerinden sağlanır (5–7). En çok iskelet kasında olmak üzere kalp kası, retina, beyin, karaciğer, böbrekler ve testislerde doğal olarak bulunur. Kreatin, hücre ATP düzeyini oksijenden bağımsız olarak dengeleyebilen endojen bir bileşik olmasının yanı sıra yasal olarak kullanılan sporcu destek ürünüdür. Sporcularda ve deneysel çalışmalarda yaygın olarak kullanılan formu kreatin monohidrattır (7,8). Yayınlanan in vivo ve in vitro araştırmalarda kreatin monohidrat desteğinin sporcularda egzersiz performansı ile birlikte kas kitlesini artırdığı vurgulanmaktadır (9–12). Bunun yanı sıra antioksidan özelliği olan kreatinin etkisini hücre içi enerji metabolizması üzerinden gerçekleştirmesi nedeniyle *nörodejeneratif hastalıklarda ve miyopatilerde de potansiyel terapötik* etkileri olduğu bildirilmiştir (5–7,12–15). Bu araştırmada iskemi reperfüzyon modelinde oksidatif strese bağlı oluşan yapısal hasara karşı kreatin monohidrat uygulamasının olası iyileştirici etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından 12.03.2018 tarihli DA18/11 karar numarası ile onaylandı ve Başkent Üniversitesi Araştırma fonunca desteklendi. Çalışmada Sprague dawley türü 270-380 gr ağırlığında 24 adet erkek sıçan kullanıldı. Gündüz 12 saat ve gece 12 saat döngüsünde ve $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'lik denetimli sıcaklıkta tutularak tüm deneklerin su ve besine serbest erişimi sağlandı. Sıçanlar rastgele seçilerek 4 gruba ayrıldı. Deney grupları; Grup 1: Kontrol grubu (K, n=5), Grup 2: İskemi/ Reperfüzyon grubu (IR, n=7), Grup 3: İskemi/ Reperfüzyon+Kreatin monohidrat (IRCM, n=7, kreatin 2 g/kg/gün-normal günlük tüketim dozu) ve Grup 4: Kreatin monohidrat (CM, n=5, kreatin 2 g/kg/gün-normal günlük tüketim dozu) olarak düzenlendi.

IR ve IRCM grubunda bulunan deneklerde 60 ml/kg ketamin ve 10 ml/kg ksilamin ile yapılan genel anestezi altında pedal refleks kontrolünden sonra karın ön duvarları açıldı. Aorta abdominalis yakınından sol renal arter nontravmatik klemp aracılığıyla 45 dakika süresince kompresyon yapılarak böbrekte iskemi hasarı oluşturuldu. Süre sonunda klemp uzaklaştırılarak sol böbreğin reperfüzyonu sağlandı (16,17). Böbrek normal rengini kazandıktan sonra karın ön duvarı 3.0 vikkil ve 2.0 ipek iplik ile dikildi. Önlem amaçlı antibiyotik olarak Baytril K (%5) ve operasyon yerinde cildin daha hızlı iyileşmesi ve korunması için Neocaf sprey (oksitetrasiklin HCl, 5 g) kullanıldı. Kreatin monohidrat desteği uygulanacak Grup 3 ve Grup 4'e kreatin monohidrat ılık distile su içinde çözülerek gavaj yoluyla günde 2 g/kg dozunda deneklere uygulandı (13). Reperfüzyondan 72 saat sonra aynı anestezi yöntemleri uygulanarak tüm gruplardan kardiyak kan örnekleri ve sol böbrek dokuları alındı.

Elektron mikroskopik yöntem

Böbreklerden alınan 1mm³lük parçalar 0.1M fosfat tamponlu %2.5'lik gluteraldehitte (pH 7.4) 2 saat tespit edildi. Tespit süresi sonrasında tampon ile yıkanan dokular 1 saat %1'lik osmium tetroksit ile ikincil tespitleri yapıldı. Doku örnekleri tamponla yıkandıktan sonra artan alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Sonrasında propilen oksitten geçirilen dokular Araldit CY212 kit ile hazırlanan gömme materyaline

gömülerek bloklar hazırlandı. Etüvde (56° C) 48 saat süreyle polimerize edilen bloklardan yarı ince kesitler alınarak toluidin blue ile boyandı. Yarı ince kesitler Leica DM 5000 (Almanya) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde değerlendirildi. İnce kesitler (0.5 mm) uranil asetat-kurşun sitrat ile boyanarak Carl Zeiss Leo 906 E (Almanya) geçirimli elektron mikroskopta (TEM) değerlendirildi (18).

Histomorfometrik değerlendirme

Toluidin mavisiyle boyanan yarı ince kesitlerde morfometrik inceleme yapıldı. Kesitlerde rastgele seçilen 10 alandan X 400 büyütmede LAS programında (Leica DM 5000, Almanya) fotoğraflanarak tübül lümeninde genişleme, fırçamsı kenar kaybı, çekirdek kaybı (çekirdeğin lümenine atılması), epitel dökülmesi, fokal epitel nekrozu, tübül epitelinin tamamının kaybı açısından yüzdeleri değerlendirildi (19). Tübüllerde görülen değişiklikler: 0-normal; 1-%25'ten daha az; 2-%25-50 arasında; 3-% 51-75 arasında; 4-%75 daha fazla, 5-dokunun tamamında nekroz ve böbrek hasarı görülmesine göre skorlandı (20).

Total Antioksidan Seviye (TAS) ve Total Oksidan Seviye (TOS) yöntemi

TAS; ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)) molekülü, asidik ortamda (asetat tamponu 30 mmol/l pH 3,6) hidrojen peroksit kullanılarak ABTS+ haline okside edilir. Asetat tamponu içerisinde konsantr (koyu yeşil) ABTS+ molekülü daha stabildir. Daha konsantr ve yüksek pH'a sahip asetat tamponu içinde (0.4 mol/l pH 5.8) dilüe edilme esnasında spontan şekilde koyu yeşil renk yavaşça kaybolur. Örnekte bulunan antioksidan konsantrasyonu oranında bu renk kaybı hızlanır. Bu reaksiyon spektrofotometrik olarak takip edilebilir ve ağarma hızı örnekteki TAS ile ters orantılıdır. Bu reaksiyon suda çözünen vitamin E analogu olan Trolox (6-hidroksi-2.5.7.8-tetrametilchroman-2-karboksilik asit) ile kalibre edilir. Ölçüm sonuçları mmol Trolox equivalent/L olarak ifade edilir (21).

TOS; Örnekte bulunan oksidanlar ferro iyon (Fe^{+2})-o-dianisidine kompleksini ferrik iyon (Fe^{+3}) haline getirir. Oksidasyon reaksiyonu, reaksiyon ortamında bolca bulunan gliserol molekülleri ile güçlendirilir. Ferrik iyon xylenol orange ile asidik ortamda renkli bileşik oluşturur. Renk yoğunluğu örnekte bu-

lunan oksidan moleküllerinin miktarı ile ilişkilidir. Ölçüm hidrojen peroksit (H_2O_2) ile kalibre edilir. Sonuçlar litre başına mikromolar hidrojen peroksit ekuivalan olarak ifade edilir ($\mu mol H_2O_2$ Equiv./L) (22).

İstatistiksel analiz

Çalışmada tanımlayıcı istatistik olarak normal dağılım varsayımı sağlanıyorsa ortalama \pm standart sapma; sağlanmıyorsa medyan (minimum-maksimum) verilmiştir. Normallik kontrolü Shapiro-Wilk normallik testi ile yapılmıştır. Gruplar arasında incelenen değişkenler açısından farklılık olup olmadığı parametrik test varsayımları sağlanıyorsa Tek Yönlü Varyans Analizi ve farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığının belirlenmesinde Tukey çoklu karşılaştırma testi; varsayımlar sağlanmıyorsa Kruskal-Wallis testi ve Dunn-Bonferroni çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Tüm testlerde I. Tip hata olasılığı 0,05 olarak alınmıştır. Verilerin analizi için SPSS (Statistical Package for the Social Sciences package program version 25.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) paket programı kullanıldı.

BULGULAR

TAS ve TOS düzeyleri

İşkemi ve reperfüzyon hasarı oluşturulan deney modelinde kontrol grubuna göre oksidan stresin en fazla IR grubunda arttığı görüldü ($p<0,001$). IR grubuna göre IRCM grubunda total oksidan seviye azalmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p=0.603$). Yalnız CM uygulanan grupta ise oksidan seviyenin kontrol grubunun da altına düştüğü görüldü ($p<0,001$). Total antioksidan seviye açısından gruplar değerlendirildiğinde TAS değerinin istatistiksel olarak anlamlı oranda en az IR grubunda olduğu görüldü ($p<0,001$). IR grubuna göre IRCM grubunda antioksidan seviyenin anlamlı olarak arttığı izlendi ($p<0,001$). Yalnızca CM uygulanan grupta antioksidan seviyenin kontrol grubunun üzerine çıktığı görüldü ($p<0,001$) (Tablo 1).

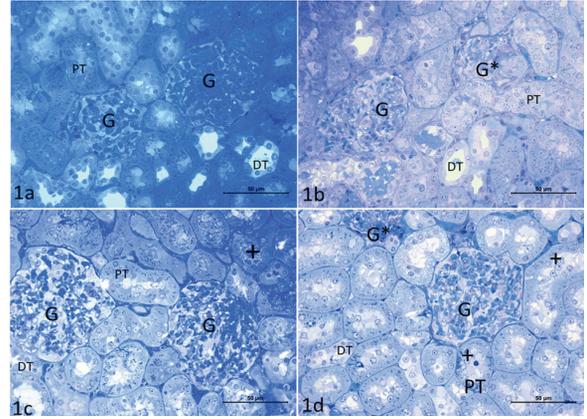
Morfometrik bulgular

Tübüllerdeki yapısal değişiklikler; fırçamsı kenar kaybı, çekirdek kaybı, epitel dökülmesi, fokal epitel nekrozu, tübül epitelinin tamamının kaybı açısından değeren-

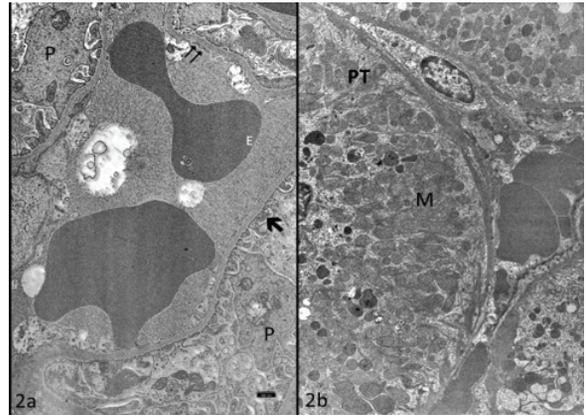
dirildi. Proksimal tübüllerde fırçamsı kenar kaybının kontrol grubuna göre IR grubunda daha fazla olduğu saptandı ($p<0,001$) (Resim 1a-1b). IR grubunda fırçamsı kenar kaybının IRCM grubuna göre anlamlı derecede daha fazla olduğu belirlendi. ($p=0,031$) (Resim 1b-1c). Hücrelerdeki çekirdek kaybı ve tübüllerdeki epitel kaybı dikkate alındığında IR grubunda bu dejeneratif değişiklikler yoğun olarak izlenirken IRCM grubunda bu etkilerin anlamlı olarak azaldığı belirlendi ($p=0,021$; $p=0,014$). IR grubunda bazı alanlarda tübül epitelinin tamamının yitirildiği izlenmesine karşın gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık izlenmedi ($p=0,831$) (Resim 1a-d) (Tablo 2).

Elektron mikroskop bulguları

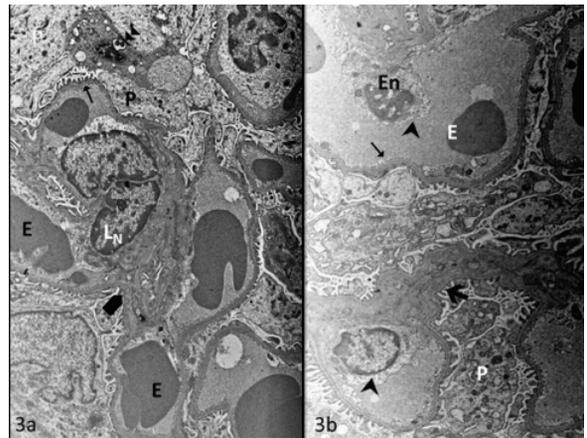
Elektron mikroskopta özellikle glomerüller bileşenler dikkate alındı. Yapılan değerlendirmede kontrol grubunda glomerüller bazal membran, podosit hücreleri pedisellerin düzenleniminin normal olduğu saptandı (Resim 2a). Tübül epitel hücrelerinde yapısal bütünlüğün korunduğu ve mitokondriyonların elektron yoğun matrisli oldukları görüldü (Resim 2b). En belirgin hasar IR grubunda izlendi. Glomerüller kapillerlerin çoğu alanda eritrosit ve lökositler ile dolu olduğu saptandı. Endotel sitoplazmasının bazı bölgelerde trombotik mikroangiopatiji düşündüren şekilde şiştiği ve granüler materyalle dolu olduğu görüldü. Kapiller bazal membranında ondülasyonlar izlendi (Resim3a- 3b). Pedisellerin düzenleniminin doku genelinde korunmasına karşın hücre gövdesinde belirgin şişme ve mitokondriyon kristallerindeki silinme belirgindi. Bu grupta Bowman zarının parietal yaprağını oluşturan hücrelerde vakuollerin varlığı ve glomerüller bazal membranda laminasyon ayırt edildi (Resim 3c). IR grubunda tübül epitel hücreleri değerlendirildiğinde mitokondriyon yapısının daha iyi korunduğu ancak bazı bölgelerde tübül epitel hücrelerde şişme sonucu lümenlerin kapandığı görüldü (Resim 3d). İskemi- reperfüzyon hasarı sonrasında kreatin uygulanan grupta IR grubunda olduğu gibi kapillerlerde eritrosit ve lökositlerin lümeni tıkayacak şekilde kümelenedikleri izlendi. Endotel hücrelerinin sitoplazmalarının IR grubuna benzer olarak şişmiş ve granüler görümlü elektron yoğun materyalle dolu olduğu izlendi. Glomerüller kapiller lümeninde lökositler ayırt edildi. Podositlerdeki şişme bu grupta da belirgindi.



Resim 1a-d: Yarı ince kesit. a: Kontrol grubu, b: IR grubu, c: IRCM grubu, d: CM grubu. G; Glomerül, G*;Sklerotik glomerül, PT; proksimal tübül, DT; Distal tübül,+; lümeneye atılan çekirdekler (Toluidin Mavisi X400). CM; Kreatin Monohidrat, IR: İskemi Reperfüzyon, IRCM: İskemi Reperfüzyon ve Kreatin Monohidrat.



Resim 2a-2b: Kontrol grubu. P; Podosit, E; Eritrosit, →; Pedisel, ⇌; Endotel, PT; proksimal tübül, M; mitokondriyon (Uranil asetat& Kurşun sitrat ax7750- bX2784).



Resim 3a-3b: İskemi / Reperfüzyon grubu. P; Podosit, E; Eritrosit, →; Pedisel, ⇌; Endotel, ⇨ L_N; Lökosit çekirdeği, ⇨⇨; Podosit sitoplazması, M; mitokondriyon, ⇨; Endotelde şişme (Uranil asetat& Kurşun sitrat ax7750-bX7750).

Tablo 1. Gruplardaki TAS ve TOS değerleri

	Kontrol (n:5)	IR (n:7)	IRCM (n:7)	CM (n:5)	p değeri
TAS	1,73±0,148	1,29±0,123*	1,78±0,132 [†]	2,05±0,081 [†]	<0,001 ^a
TOS	14,9(13,9–16,8)	32,5(31,4–35,1)*	18,6(16,9–19,9)	11,2(10,5–16,5)*	<0,001 ^b

CM: Kreatin Monohidrat, IR: İskemi Reperfüzyon, IRCM: İskemi Reperfüzyon ve Kreatin Monohidrat., n: Denek sayısı, TAS: Total Antioksidan Seviye, TOS: Total Oksidan Seviye: Varyans Analizi; Ortalama±Standart Sapma. ^b Kruskal-Wallis Test; Medyan (Minimum-Maksimum).
* Kontrol grubuna göre farklılığı göstermektedir. [†] IR grubuna göre farklılığı göstermektedir.

Tablo 2. Böbrek tübüllerindeki hasar skorlaması.

	Kontrol (n:5)	IR (n:7)	IRCM (n:7)	CM (n:5)	p değeri
Fırçamsı kenar kaybı	1(1–1)	4(4–5) ^a	2(1–3) ^b	2(1–2)	0,001
Lümeninde çekirdek atılımı	1(1–2)	2(2–5)	1(0–2) ^b	2(1–3)	0,021
Epitel kaybı	1(1–1)	4(3–5)	1(0–3) ^b	2(1–2)	0,001
Tübül epitel kaybı	0(0–0)	0(0–3)	0(0–0)	0(0–0)	0,167
Fokal epitel kaybı	0(0–1)	0(0–5)	0(0–2)	0(0–2)	0,831

CM: Kreatin Monohidrat, IR: İskemi Reperfüzyon, IRCM: İskemi Reperfüzyon ve Kreatin Monohidrat., n: Denek sayısı. ^a Kontrol grubuna göre farklılığı göstermektedir. ^b IR grubuna göre farklılığı göstermektedir. Medyan (Minimum-Maksimum) değerler kullanılmıştır.

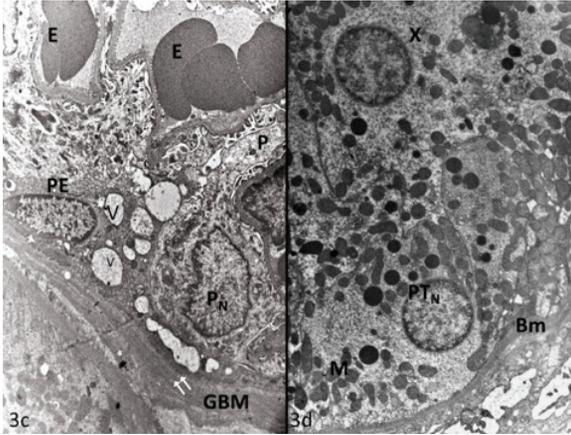
Bazal membranın kalınlığının düzensizleştiği görüldü (Resim 4a). Epitel hücrelerinin şişmesi sonucu tübül lümenlerinin tıkanığı izlendi (Resim 4b). IR ve IRCM örneklerinin karşılaştırmalı değerlendirmesinde ince yapı düzeyinde benzer bulgular izlendi. Buna karşın morfolometrik incelemelerde tübüllerde görülen hasarın IRCM grubunda, IR grubuna göre istatistiksel olarak azaldığı saptandı. Kreatin monohidratın IRCM grubunda total oksidan seviyeyi baskılamakta antioksidan seviyesini artırdığı izlendi. Yalnızca kreatin verilen deney grubunda büyük ve küçük büyültmeli resimlerde podosit sitoplazmalarında belirgin şişme, pedisellerin düzenleniminin bozulduğu ve bazal laminanın kalınlaştığı izlendi. Doku genelinde bazı alanlarda farklı düzeylerde nekrotik değişiklikler izlendi (Resim 5a). Elektron mikroskobu değerlendirmelerinde de epitel hücrelerin şişmesi sonucu tübül lümenlerinin tıkanığı görüldü (Resim 5b).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızda böbrekte iske mi ve reperfüzyon modelinin glomerüllerde özellikle endotel hücrelerinde ve podositlerde şişmeye neden olduğu saptandı. Glomerüller kapiller lümenlerinin eritrosit birikimi ile tıkanığı izlendi. Benzer şekilde ince yapı düzeyinde tübüllerin epitel hücrelerindeki şişmeye bağlı olarak tübül

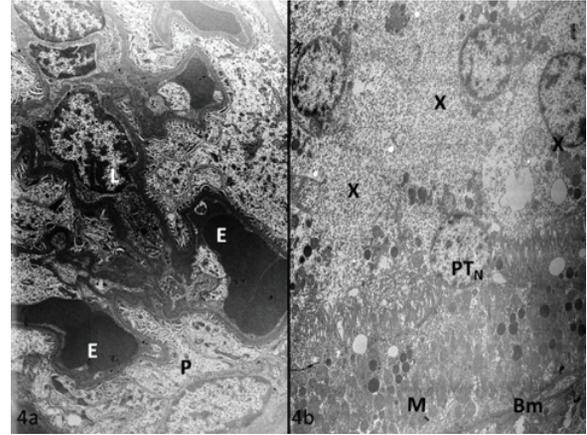
lümenlerinde daralma izlendi. Benzer bulgular kreatin uygulanan gruplarda da görüldü. Total antioksidan seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artmış olması yeniden yapılanma sürecinin pozitif yönde ilerlediğinin göstergesi olarak kabul edildi. İnce yapı düzeyindeki yapısal bulguların bu durumu tam destekler nitelikte olmamasının nedeninin kapiller stazla kendini gösteren dolaşım yetmezliği olarak değerlendirildi.

Böbreklerdeki iske mi-reperfüzyon hasarı akut böbrek hasarının en sık nedenlerinden biridir (2,4,23–26). İnsan böbreğinde bir saatten az süren sıcak iske mi, geçici işlev kaybından neden olurken, üç saat ve daha fazla süren sıcak iske mi ise geri dönüşsüz hasara neden olmaktadır. İskeminin etkisi süresi ile doğrudan ilişkilidir (2). Böbreğin kan damarlarından zengin olması iskemiden çok daha fazla hasar görmesine neden olur. IR hasarının geriye dönebilmesi, glomerülde ve böbrek tübüllerinde hücrelerin yenilenme yeteneğine bağlıdır (9,17,23). Çalışmamızda uygulanan iske mi modeli kısa süreli (45 dk) olmasına karşın iske mi uygulanan gruplarda yapılan elektron mikroskobik incelemelerde yeniden yapılanma sürecinin henüz başlamadığı görüldü. Kapillerlerde görülen eritrosit stazlarının dolaşımı engellemesi nedeniyle hücrelerin yenilenme yeteneğini olumsuz etkilediği görüldü. Deneysel araştırmalar sağlıklı hayvanlarda oluşturulan akut böbrek hasarının kronik böbrek hasarına yatkınlığı

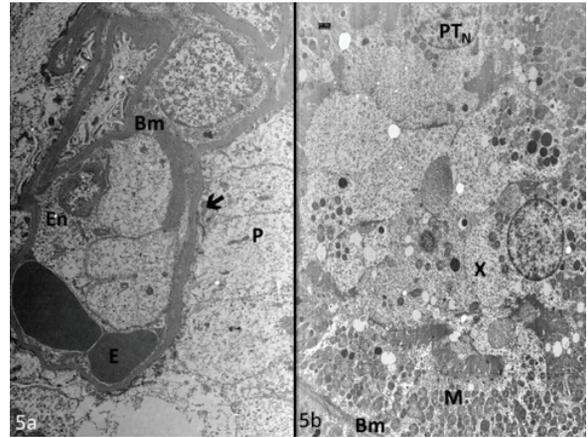


Resim 3c-3d: İskemi / Reperfüzyon grubu. PE; Bowman kapsülünün pariyetal epiteli, P_N; Podosit hücre çekirdeği, V: Vakuol, GBM: Glomerüler bazal membran, Proksimal tübül- BM; Bazal membran; PT_N Proksimal tübül hücre çekirdeği M: mitokondriyon, X: sitoplazmada şişme (Uranil asetat& Kurşun sitrat aX6000-bX3597).

artırabildiğini vurgularken, klinik verilerde de IR kaynaklı meydana gelen akut böbrek hasarının böbreğin kronik böbrek hasarına yatkınlığı artırdığını doğrulamaktadır (26–30). İskemiden sonra gelişen akut böbrek hasarı glomerüler filtrasyon hızında azalma, tübül nekroz ve böbrek damarlarında direnç artışıyla da kendini gösterir (23,31–33). İskemi ve reperfüzyon hasarı hücrelerdeki enerji havuzunu etkiler. İskemi sırasında hücre içinde enerjiden zengin fosfatlar (ATP) azalır ve hücre zarındaki membran iyon transportunun yavaşlamasına yol açar (4,31). Hücre içindeki iyonun artışına bağlı olarak hücre içi sıvı miktarı artar ve hücre şişmeye başlar. Bu durum özellikle endotel hücrelerinde belirgin olarak izlenir (4,33). Hasar gören damarlardaki düz kaslar etkili vazokonstriktörler salgılar. Vazokonstriksiyon, hücre şişmesi, ekstrasellüler ödem ve sonrasında lökosit ve trombositlerin endotele yapışmasıyla doku perfüzyonu daha da bozulur (31). Bu açıdan bakıldığında IR hasarının dokudaki ilk hedefi mikrodolaşımdır. İskemik dokuda hem hücre sel rejenerasyonun hem de dokudaki toksik metabolitlerin temizlenmesi için kan akımının tekrar sağlanması gerekmektedir. Ancak endotel hücrelerinin şişmesiyle mikrohematokrit değerinin artması reperfüzyon sağlandığında bile kan akımının gerçekleşmesine de engel olur. Hücre içi sıvının artması aynı zamanda kanın viskozitesini de artırır. Dokuda gelişen asidoza bağlı olarak kan hücreleri esnekliğini yitirir (4). Reperfüzyon sağlandıktan sonra kapillerlerdeki akımın tam olarak



Resim 4a-4b: İskemi /reperfüzyon+Kreatin grubu. P; Podosit, E, Eritrosit, L; Lökosit çekirdeği, Proksimal tübül -BM; Bazal membran, PT_N; Proksimal tübül hücre çekirdeği, M: mitokondriyon, X: sitoplazmada şişme (Uranil asetat& Kurşun sitrat aX6000- b X2784).



Resim 5a-5b: Kreatin grubu. P; Podosit, E, Eritrosit, →; Pedisel, BM; Bazal membran, PT_N Proksimal tübül hücre çekirdeği, M: mitokondriyon, X: sitoplazmada şişme (Uranil asetat& Kurşun sitrat aX6000-bx3597)

sağlanmamış olması dokudaki hasarın nedenlerinden biridir. Çalışmamızda ışık mikroskobu düzeyinde endotelde görülen hasar net olarak izlenmemesine karşın elektron mikroskopta yaptığımız değerlendirmelerde özellikle IR grubunda endotel hücrelerdeki şişme ve eritrosit stazı çok belirgindi. IRCM grubunda da endotel hasarının geri dönmediği ve eritrosit stazının devam ettiği görüldü. Bu grupta plazmada artan TAS değerleri saptanmış olmasına karşın kapillerlerdeki akımın tam olarak sağlanmamış olduğunun belirlenmesi yeniden yapılanma sürecinde kreatin monohidratın ince yapı düzeyinde beklenen destekleyici etkisini göstermekte yetersiz kalmış olabileceği sonucuna

varıldı. Deneysel IR modellerinde böbrekte yapısal düzeyde enflamasyon, glomerüller dejenerasyon, interstisiyel alanda ödem, tübül epitel hücrelerinde vakuolizasyon, nekroz ve apoptozis izlendiği belirtilmiştir. Böbrek kanlanması azalmasına bağlı olarak kan, iskemiye metabolik olarak daha hassas olan medulla yönlenir. Bunun sonucunda, değişik oranlarda tübüllerde hasar ve glomerüler filtrasyonda azalma meydana gelir (2,23,34,35). Çalışmamızda yapılan morfometrik değerlendirmede görüldüğü üzere IR grubunda özellikle proksimal tübüllerdeki hasar belirgindi. İnce yapı düzeyinde çoğu alanda mikrovilluslarda kayıp izlendi. Bazı alanlarda tübüldeki epitel hücrelerin şiştiği ve lümenin tıkanmasına yol açtığı görüldü. İskemi ve reperfüzyon olgularında görülen bu yapısal ve işlevsel hasarları geri döndürmek için çeşitli yöntemler ve ilaçlar denenmiştir. Koruyucu ya da tedavi edici etkisi tartışılan anti-inflamatuvar, antioksidan ilaçlar (N-Asetilsistein, Carvacrol, Tadalafil, Luteolin), eritropoietin ve apelin gibi hormonların denendiği araştırmalar bulunmaktadır (1,16,23,36-38). Bu çalışmalarda ortak sonuç kullanılan etken maddelerin ya da yöntemlerin iskemi reperfüzyonla oluşan hasarı ve hücre düzeyindeki dejeneratif etkileri azalttığını ancak tam iyileşmenin gerçekleştirilemediği yönündedir. IR ile tetiklenen böbrek hasarında önemli rol oynayan patolojik süreçler arasında tübül epitel hücrelerin işlevini yitirmesi, fibrozis, mikrodolaşım bozuklukları, güçlü inflamatuvar reaksiyon, endotel bütünlüğün kaybı, nötrofillerin aktivasyonu ile birlikte reaktif oksijen türlerinin (ROT) salınması olarak belirtilmiştir (4,16,34). ROT'nin ortaya çıkmasını içeren bir dizi hücre olayları zinciri IR hasarının oluşturduğu bir diğer sonuçtur (17). İskemi sırasında hücrelerde aşırı miktarda ROT üretilmesi mitokondriyal membran potansiyelini, Fosfokreatin/Kreatin (PCr/Cr) oranını ve ATP tüketimini değiştirir. Hücrede yeterli miktarda kreatin varlığı oksidatif solunumun devam etmesine, az miktarda ROT üretimine neden olurken ve ATP miktarının korunmasına neden olur (38,39). Hücre içinde ATP'nin azalması sonucu sitoplazmada artan Ca^{+2} , fosfolipaz A2, endonükleaz ve proteazları aktive ederek apoptozu başlatır. İskemi sonrasında hücrede Ca^{+2} miktarı ve ROT artmıştır. Bu etkiler reperfüzyonda da artarak devam eder. İskemi reperfüzyon sırasında serbest radikalle-

rin oluşumu, membran lipitlerinin peroksidasyonu ve proteinlerin oksidatif hasarları üzerinden böbrek ciddi yapısal hasara yol açar. Bu nedenle iskemi ve reperfüzyonda oluşan hasarı tedavi etmek / geri döndürmek adına mitokondriyonların bütünlüğünün ve işlevselliğinin de korunması önemlidir (38-41). Barbieri ve ark. 2016 yılında yayınladıklarında araştırmalarında H_2O_2 uyguladıkları fare miyoblastlarına karşı kreatin monohidrat desteği ile mitokondriyal membran bütünlüğünü korunduğunu bildirmişlerdir (42). Çalışmamızda kullandığımız kreatin monohidrat hücrelerdeki enerji havuzunu desteklemesi özelliğine bağlı olarak seçilmiştir. Kreatinin antioksidan etkiye sahip olduğu birçok araştırmada vurgulanmıştır. Sporcu desteği olarak da kullanılan bu ürünle ilgili olarak hem insanlar hem de deney hayvanları ile yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Kas kütlelerini, gücünü ve dayanıklılığını artırdığı bilinen kreatin monohidratın yan etkileri konusunda tartışmalar devam etmektedir (5,10,45-47,11,12,14,15,39,42-44). Pritchard ve Kalra fokal segmental glomerülosklerozlu böbrek hastalığı olan sporcuda kreatin kullanımının böbrekteki hasarı artırdığı, böbrek fonksiyonlarındaki bozulmaya neden olduğu ve kullanımına son verildikten sonra böbrek fonksiyonlarının normale döndüğü bildirmişlerdir (48). Ferreia ve ark.'ın yayınında ise yalnızca kreatin monohidrat desteğinin böbrek fonksiyonlarında bozulmaya neden olduğu vurgulanmıştır (9). Uzun süreli kullanımın böbrek ve karaciğer işlevleri üzerindeki etkilerini değerlendiren bir diğer deneysel araştırmada aspartat transaminaz, gamma-glutamil transpeptidaz, böbrekte üre ve kreatin seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak artırdığını izlenmiştir (6). Buna karşın deneysel araştırmalarda artan doza bağlı olarak kreatin monohidratın karaciğer ve böbrekte toksik bir etkisinin bulunmadığı belirten araştırmalar da bulunmaktadır (47). Poortmans ve Francaux'un sporcular üzerinde yaptığı araştırmada kısa (10 ay) ve uzun süreli (5 yıl) oral kreatin kullanımının etkisi değerlendirilmiştir. Araştırmacılar kontrol grubu ile kreatinin tüketici grubu arasında plazma içeriği ve kreatinin, üre, albümin için idrar atılımı oranları arasında istatistiksel bir fark bulunmadığını ve her iki grupta glomerüler filtrasyon hızı, tübül reabsorpsiyon ve glomerüler membran permeabilitesinin normal olduğunu bildirmişlerdir.

Sonuç olarak kısa, orta ve de uzun süreli oral kreatin desteğinin sağlıklı bireylerin böbreği üzerinde zararlı etkiler yaratmadığını öne sürmüşlerdir (45). Buna karşın 2005 yılında 20 sporcunun katılımıyla yaptıkları yayında yüksek doz ve kısa süreli (21 gr/14g) kullanımında idrarda sitotoksik etkiye sahip bileşiklerin (metilamin ve formaldehit) atılımının arttığını belirtmişlerdir. Bu metabolitlerin böbrek fonksiyonlarında olumsuz bir etki olmadığı belirtilmiştir. Kreatin metabolize olurken önce metilamine sonra da formaldehite dönüşür. Bu iki metabolit sitotoksik etkiye sahiptir (49,50). Nasseri, kreatin monohidratın desteğinin direnç egzersizi ile birlikte daha az toksik etki gösterdiğini bildirmiştir (51). Bizim çalışmamızda bu verilerin aksine yalnızca kreatin verilen gruplarda da yapısal hasar görüldü. Elektron mikroskopla yapılan incelemelerde kreatin uygulanan gruplarda özellikle endotelde, podositlerde şişme ve tübül hücrelerindeki dejenerasyon belirgin olarak ayırt edildi. Dokuda izlenen yapısal hasarın nedenlerinden biri de kreatin monohidratın metabolitlerinin sitotoksik etkisi olabilir. İskemi ve reperfüzyon hasarının böbrek üzerinde farklı yollardan hasar oluşturuıcı etkisi bilinmektedir. Bizim çalışmamızda IR etkisini glomerüler kapillerlerde eritrosit stazı sonucu mikrodolaşımın zayıflatarak, endotel ve podositlerde hücresel bütünlüğün korunamamasına ve benzer şekilde proksimal tübüllerdeki hücrelerin de şişmesine neden olduğu görülmüştür. Bu araştırmada böbrekte antioksidan ve iyileştirici etkilerini tartıştığımız kreatin monohidrat desteğinin, plazma da total anitoksidan seviyeyi artırdığı izlenirken ince yapı düzeyinde glomerüllerde ve tübüllerde görülen yapısal hasarlara karşı kısa sürede henüz olumlu etki göstermediği saptanmıştır.

Teşekkür

Dilasude Demirçinli, Özge Çelik, Yüsrü Elif İnce, Cansu Adıgüzel, Elifnaz Ünal, Zeynep Ünal, Elnur Hasanov'a deney aşamasındaki katkılarında dolayı teşekkür ederiz.

Çıkar çatışması ve finansman bildirimini

Yazarlar bildirecek bir çıkar çatışmaları olmadığını beyan eder. Bu çalışma Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Hong X, Zhao X, Wang G, Zhang Z, Pei H, Liu Z. Luteolin treatment protects against renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:9783893.
- Nishida T, Hayashi T, Inamoto T, et al. Dual Gas Treatment With Hydrogen and Carbon Monoxide Attenuates Oxidative Stress and Protects From Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *Transplant Proc.* 2018;50(1):250-8.
- Wang P, Isaak CK, Siow YL, O K. Downregulation of cystathionine β -synthase and cystathionine γ -lyase expression stimulates inflammation in kidney ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rep.* 2014;2(12):e12251.
- Massberg S, Messmer K. The nature of ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc.* 1998;30(8):4217-23.
- Nomura A, Zhang M, Sakamoto T, et al. Anti-inflammatory activity of creatine supplementation in endothelial cells in vitro. *Br J Pharmacol.* 2003;139(4):715-20.
- Souza WM, Heck TG, Wronski EC, Ulbrich AZ, Boff E. Effects of creatine supplementation on biomarkers of hepatic and renal function in young trained rats. *Toxicol Mech Methods.* 2013;23(9):697-701.
- Juhn MS, Tarnopolsky M. Potential side effects of oral creatine supplementation: a critical review. *Clin J Sport Med.* 1998;8(4):298-304.
- Jäger R, Purpura M, Shao A, Inoue T, Kreider RB. Analysis of the efficacy, safety, and regulatory status of novel forms of creatine. *Amino Acids.* 2011;40(5):1369-83.
- Ferreira LG, De Toledo Bergamaschi C, Lazaretti-Castro M, Heilberg IP. Effects of creatine supplementation on body composition and renal function in rats. *Med Sci Sports Exerc.* 2005;37(9):1525-9.
- Lawler JM, Barnes WS, Wu G, Song W, Demaree S. Direct antioxidant properties of creatine. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;290(1):47-52.
- Olsen S, Aagaard P, Kadi F, et al. Creatine supplementation augments the increase in satellite cell and myonuclei number in human skeletal muscle induced by strength training. *J Physiol.* 2006;573(Pt 2):525-534.
- Tarnopolsky MA. Creatine as a therapeutic strategy for myopathies. *Amino Acids.* 2011;40(5):1397-407.
- Ipsiroglu OS, Stromberger C, Ilas J, Höger H, Mühl A, Stöckler-Ipsiroglu S. Changes of tissue creatine concentrations upon oral supplementation of creatine-monohydrate in various animal species. *Life Sci.* 2001;69(15):1805-15.
- Helvacioğlu F, Kandemir E, Karabacak B, et al. Effect of Creatine on Rat Sciatic Nerve Injury: A Comparative Ultrastructural Study. *Turk Neurosurg.* 2018;28(1):128-36.

15. Sestili P, Martinelli C, Colombo E, et al. Creatine as an antioxidant. *Amino Acids*. 2011;40(5):1385-96.
16. Wietzikoski EGG, Foiatto JC, Czczko NG, et al. Tadalafil protector effect during ischemia-reperfusion in rats. *Acta Cir Bras*. 2017;32(11):973-83.
17. Zhou W, Farrar CA, Abe K, et al. Predominant role for C5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest*. 2000;105(10):1363-71.
18. Fidan PA, Helvacioğlu F, Dagdeviren A. Intussusceptive growth of vascular bed in human placenta. *Gazi Med J*. 2019;30(3):246-51.
19. Wang L, Wei J, Jiang S, et al. Effects of different storage solutions on renal ischemia tolerance after kidney transplantation in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2018;314(3):F381-7.
20. Giraud S, Thuillier R, Codas R, et al. The Optimal PEG for Kidney Preservation: A Preclinical Porcine Study. *Int J Mol Sci*. 2018;19(2):454.
21. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem*. 2004;37(4):277-85.
22. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*. 2005;38(12):1103-11.
23. Aydogdu N., Kaymak K. Yalçın Ö. Sıçanlarda Böbrek İskemisi/ Reperfüzyon Hasarında N- Asetilsisteinin Etkileri. *Fırat Tıp Dergisi*. 2005;10(4):151-5.
24. Wang HJ, Varner A, Aboushwareb T, Atala A, Yoo JJ. Ischemia/reperfusion-induced renal failure in rats as a model for evaluating cell therapies. *Ren Fail*. 2012;34(10):1324-32.
25. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med*. 2011;17(11):1391-401.
26. Philipponnet C, Aniot J, Garrouste C, Kemeny JL, Heng AE. Ischemia reperfusion injury in kidney transplantation: A case report. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(52):e13650.
27. Ishani A, Xue JL, Himmelfarb J, et al. Acute kidney injury increases risk of ESRD among elderly. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(1):223-8.
28. Lo LJ, Go AS, Chertow GM, et al. Dialysis-requiring acute renal failure increases the risk of progressive chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2009;76(8):893-9.
29. Zager RA, Johnson AC, Becker K. Acute unilateral ischemic renal injury induces progressive renal inflammation, lipid accumulation, histone modification, and "end-stage" kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011;301(6):F1334-45.
30. de Bragança AC, Volpini RA, Mehrotra P, Andrade L, Basile DP. Vitamin D deficiency contributes to vascular damage in sustained ischemic acute kidney injury. *Physiol Rep*. 2016;4(13):e12829.
31. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull*. 2004;70:71-86.
32. Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(6):1503-20.
33. Basile DP, Yoder MC. Renal endothelial dysfunction in acute kidney ischemia reperfusion injury. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2014;14(1):3-14.
34. Woolfson RG, Millar CGM, Neild GH. Ischaemia and reperfusion injury in the kidney: Current status and future direction. *Nephrol Dial Transplant*. 1994;9(11):1529-31.
35. Gong DJ, Wang L, Yang YY, Zhang JJ, Liu XH. Diabetes aggravates renal ischemia and reperfusion injury in rats by exacerbating oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *Ren Fail*. 2019;41(1):750-61.
36. Ozturk H, Cetinkaya A, Duzcu SE, Tekce BK, Ozturk H. Carvacrol attenuates histopathologic and functional impairments induced by bilateral renal ischemia/reperfusion in rats. *Biomed Pharmacother*. 2018;98:656-61.
37. Bircan B, Çakır M, Kırbağ S, Gül HF. Effect of apelin hormone on renal ischemia/reperfusion induced oxidative damage in rats. *Ren Fail*. 2016;38(7):1122-8.
38. Zhang J, Zou YR, Zhong X, et al. Erythropoietin pretreatment ameliorates renal ischaemia-reperfusion injury by activating PI3K/Akt signalling. *Nephrology (Carlton)*. 2015;20(4):266-72.
39. Meyer LE, Machado LB, Santiago AP, et al. Mitochondrial creatine kinase activity prevents reactive oxygen species generation: antioxidant role of mitochondrial kinase-dependent ADP re-cycling activity. *J Biol Chem*. 2006;281(49):37361-71.
40. Clarke H, Hickner RC, Ormsbee MJ. The Potential Role of Creatine in Vascular Health. *Nutrients*. 2021;13(3):857.
41. Malek M, Nematbakhsh M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. *J Renal Inj Prev*. 2015;4(2):20-7.
42. Persky AM, Brazeau GA. Clinical pharmacology of the dietary supplement creatine monohydrate. *Pharmacol Rev*. 2001;53(2):161-76.
43. Barbieri E, Guescini M, Calcabrini C, et al. Creatine Prevents the Structural and Functional Damage to Mitochondria in Myogenic, Oxidatively Stressed C2C12 Cells and Restores Their Differentiation Capacity. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:5152029.
44. Rahimi R. Creatine supplementation decreases oxidant

- tive DNA damage and lipid peroxidation induced by a single bout of resistance exercise. *J Strength Cond Res.* 2011;25(12):3448-3455.
45. Poortmans JR, Francaux M. Long-term oral creatine supplementation does not impair renal function in healthy athletes. *Med Sci Sports Exerc.* 1999;31(8):1108-10.
46. Metz J, Small E, Levine SR, Gershel JC. Creatine use among young athletes. *Pediatrics.* 2001;108(2):421-5.
47. Baracho NC, Castro LP, Borges Nda C, Laira PB. Study of renal and hepatic toxicity in rats supplemented with creatine. *Acta Cir Bras.* 2015;30(5):313-8.
48. Pritchard NR, Kalra PA. Renal dysfunction accompanying oral creatine supplements *Lancet.*1998;351:1252-3.
49. Taes YE, Delanghe JR, Wuyts B, van de Voorde J, Lameire NH. Creatine supplementation does not affect kidney function in an animal model with pre-existing renal failure. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18(2):258-64.
50. Poortmans JR, Kumps A, Duez P, Fofonka A, Carpentier A, Francaux M. Effect of oral creatine supplementation on urinary methylamine, formaldehyde, and formate. *Med Sci Sports Exerc.* 2005;37(10):1717-20.
51. Nasser A, Jafari A. Effects of creatine supplementation along with resistance training on urinary formaldehyde and serum enzymes in wrestlers. *J Sports Med Phys Fitness.* 2016;56(4):458-64.