Renal İskemi Reperfüzyon Hasarı ile İndüklenen Hücre Ölümü ile İlişkili Seçilen miRNA'ların Düzeylerinin Zamana Bağlı Değişimlerinin Belirlenmesi

Burak Özkan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Temmuz 2023

Determination of Time-Dependent Changes in The Levels of Selected miRNAs Associated With Cell Death Induced By Renal Ischemia-Reperfusion Injury

Burak Özkan

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

July 2023

Renal İskemi Reperfüzyon Hasarı ile İndüklenen Hücre Ölümü ile İlişkili Seçilen miRNA'ların Düzeylerinin Zamana Bağlı Değişimlerinin Belirlenmesi

Burak Özkan

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

Danışman: Prof. Dr. Ayşe Pınar ÖZTOPCU VATAN

“ESOGÜ-BAP tarafından 2517 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.”

Temmuz 2023

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji Bilim Dalı Yüksek Lisans /Doktora öğrencisi Burak ÖZKAN'nın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Renal iskemi reperfüzyon hasarı ile indüklenen hücre ölümü ile ilişkili seçilen miRNA'ların düzeylerinin zamana bağlı değişimlerinin belirlenmesi" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oybirliği ile kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Ayşe Pınar Öztopcu Vatan

İkinci Danışman : -

Yüksek Lisans /Doktora Tez Savunma Jürisi:

Üye: Prof. Dr. Ayşe Pınar ÖZTOPCU VATAN

Üye: Prof. Dr. Hakan ŞENTÜRK

Üye: Doç.Dr. Gökhan KUŞ

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ……..…….. tarih ve ……..…… sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. Ayşe Pınar ÖZTOPCU VATAN danışmanlığında hazırlamış olduğum "Renal iskemi reperfüzyon hasarı ile indüklenen hücre ölümü ile ilişkili seçilen miRNA'ların düzeylerinin zamana bağlı değişimlerinin belirlenmesi" başlıklı Yüksek Lisans /Doktora tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallarına uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 03/07/2023

Burak ÖZKAN

İmza

ÖZET

İskemi/Reperfüzyon (İ/R) sürecinde dokularda oluşan ciddi hasar nedeniyle birden fazla hücre ölüm mekanizmasının çalıştığı belirlenmiştir. Bu hücre ölüm çeşitlerinden birisi de ferroptoz'dur. Günümüzde hala mekanizması üzerinde çalışılan ferroptoz sürecinin düzenlenmesinde çeşitli mikroRNA'ların rol oynadığını gösteren çalışmalar mevcuttur.

Çalışmamızda, *Sprague Dawley* cinsi erkek albino sıçan kullanılarak sol böbreğe 30, 45, 60 dakika iskemi, ardından 24 saat reperfüzyon uygulanmıştır. Sham grubuna ise sadece cerrahi stres uygulanmıştır. 24 saat sonunda anestezi altında ötenazi işlemi yapılan deney gruplarından böbrek dokusu ve kan örnekleri toplanmıştır. Serum ve dokudaki demir seviyesi, serumdaki total oksidatif ve antioksidatif türler spektrofotometrik olarak incelenmiştir. Ferroptozun gelişimde rol oynayan SLC40A1, NCOA4, SLC39A8 ve GPX4 genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri ile bu seçilen genlerle ilişkili beş farklı miRNA'nın (rno-miR-1839-5p, rno-miR-105, rno-miR-879-5p, rno-miR-6332 ve rno-miR-409b) ekspresyon düzeyleri RT-qPCR yöntemi ile araştırılmıştır.

İ/R gruplarında, sham gruplarına göre serum düzeyinde total oksidatif türlerde artış, total oksidatif ve antioksidatif türler de ise düşüş gözlemlendi. Ayrıca hem doku hem de serum örneklerinde demir düzeyinde anlamlı artış gözlenmiştir. GPX4 ve SLC40A1 mRNA ekspresyonu tüm İ/R gruplarında; SLC39A8 mRNA ekspresyonu ise 45 ve 60 dakikalık İ/R gruplarında anlamlı azalış göstermiştir. NCOA4 mRNA ekspresyon düzeyinin ise tüm gruplarda anlamlı artış olduğu gözlenmiştir. rno-miR-105, rno-miR-6332 ve rno-miR-409b'nin ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir artış gözlemlenirken, rno-miR-879-5p'nin ekspresyonunda sham grubuna göre anlamlı azalma görülmüştür. rno-miR-1839-5p'in ise sadece 45 dakikalık iskemi grubunda sham grubuna göre anlamlı bir azalış tespit edilmiştir. Bu çalışma ile renal İ/R hasarı ile indüklenen ferroptotik hücre ölümü ile ilişkili seçilen 5 miRNA'nın ekspresyon düzeylerinin zamana bağlı değişimleri ilk kez araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Renal iskemi reperfüzyon, Ferroptoz, Mikro RNA, Ferro demir, Oksitatif stres

SUMMARY

It has been determined that more than one cell death mechanism works due to the severe damage to the tissues during the ischemia/reperfusion (I/R) process. One of these types of cell death is ferroptosis. Today, studies show that various microRNAs play a role in regulating the ferroptosis process, the mechanism of which is still being studied.

In our study, using Sprague Dawley male albino rats, 30, 45, and 60 minutes of ischemia followed by 24 hours of reperfusion were applied to the left kidney. In the sham group, only surgical stress was applied. At the end of 24 hours, kidney tissue and blood samples were collected from the experimental groups who were euthanized under anesthesia. Serum and tissue iron levels, total oxidative and antioxidative species in serum were examined spectrophotometrically. The mRNA expression levels of SLC40A1, NCOA4, SLC39A8, and GPX4 genes that play a role in the development of ferroptosis and five different miRNAs (rno-miR-1839-5p, rno-miR-105, rno-miR-879-5p, rno- miRNAs) associated with these selected genes. miR-6332 and rno-miR-409b) expression levels were investigated by the RT-qPCR method.

In the I/R groups, an increase in total oxidative species and a decrease in total oxidative and antioxidative species were observed in serum levels compared to sham groups. In addition, a significant increase in iron levels was observed in both tissue and serum samples. GPX4 and SLC40A1 mRNA expression in all I/R groups; SLC39A8 mRNA expression decreased significantly in the 45 and 60-minute I/R groups. It was observed that NCOA4 mRNA expression level was significantly increased in all groups. While a significant increase was observed in the expression levels of rno-miR-105, rno-miR-6332 and rno-miR-409b, a significant decrease was observed in the expression of rno-miR-879-5p compared to the sham group. A significant decrease in rno-miR-1839-5p was detected only in the 45-minute ischemia group compared to the sham group. In this study, time-dependent changes in the expression levels of 5 selected miRNAs associated with ferroptosis cell death induced by renal I/R injury were investigated for the first time.

Keywords: Renal ischemia reperfusion, Ferroptosis, Micro RNA, Ferrous iron, Oxidative stress

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince bilgi, deneyim ve desteğini eksik etmeyen tüm hocalarım, arkadaşlarım ve aileme teşekkürü borç bilirim.

"Bu proje ESOGÜ-BAP tarafından 2517 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir." Bilimsel araştırma projeleri koordinasyon birimine proje desteği için teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET ..... **vi**
SUMMARY ..... **vii**
TEŞEKKÜR ..... **viii**
İÇİNDEKİLER ..... **ix**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **xii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **xiv**
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xv**
1. GİRİŞ VE AMAÇ **1**
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI **3**
2.1 İskemi/Reperfüzyon 3
2.2. İskemi/Reperfüzyonun Temel Özellikleri 3
2.3. İskemi/Reperfüzyon Hasarının Mekanizması 8
2.4. İskemi Reperfüzyon Hasarında Oluşan Oksidatif Stres 9
2.4.1. Oksidatif Stresin İndüklenme Mekanizmaları 10
2.4.1.1. Ksantin Oksidaz 10
2.4.1.2. NADPH Oksidaz İndüksiyonu 10
2.4.1.3. Nitrik Oksit Sentazlar (NOS) 11
2.5. İskemi Reperfüzyon Hasarı ve Hücre Ölüm Türleri 12
2.5.1. Apoptoz 12
2.5.2. Otofaji 14
2.5.3. Nekroz 14
2.5.4. Ferroptoz 15
2.5.4.1. Ferroptozun Mekanizması 16
2.5.4.2. Ferroptoz ve Akut Böbrek Hasarı (AKI) 17
2.5.4.3. Ferroptoz ve İ/R Yaralanması 18
2.6. İ/R Hasarı ve Epigenetik Modifikasyonlar 19
2.7. Kodlanmayan RNA'lar 20
2.7.1. MikroRNA'lar 20
2.7.2. mikroRNA'ların Biyogenezi 21
2.7.3. mikroRNA Kaynaklı Susturma Kompleksi (miRISC) 22

İÇİNDEKİLER

Sayfa

2.8. Böbrek Dokusu ... 23
3.MATERYAL YÖNTEM ... 25
3.1. Deney Hayvanları ... 25
3.2. Grupların Oluşturulması ... 25
3.2.1. Grup I (Sham grubu, 30 dakika): ... 25
3.2.2. Grup II (Sham grubu, 45 dakika): ... 26
3.2.3. Grup III (Sham grubu, 60 dakika): ... 26
3.2.4. Grup IV (İskemi/reperfüzyon 30 dakika): ... 26
3.2.5. Grup V (İskemi/reperfüzyon 45 dakika): ... 27
3.2.6. Grup VI (İskemi/reperfüzyon 60 dakika): ... 27
3.3. Anestezi ve Cerrahi İşlemler ... 27
3.3.1. Anestezi İşlemi: ... 27
3.3.2. Cerrahi İşlemler ... 28
3.3.2.1.Nefrektomi ... 28
3.3.2.2. İskemi Reperfüzyon İşlemi ... 29
3.3.2.3. Kan ve Doku Örneklerinin Toplanması ... 30
3.4. Biyokimyasal Analizler ... 31
3.4.1. Dokudan ve Serumdan Demir İyon Tayini ... 31
3.4.2. Serumdan Total Antioksidatif Düzey (TAS) Tayini ... 32
3.4.3. Serumdan Total Oksidatif Stres Düzeyi (TOS) Tayini ... 33
3.4.4. Dokudan Total Protein Düzeyi Tayini ... 33
3.5. Moleküler Analizler ... 33
3.5.1. Total RNA İzolasyonu ve Miktar Tayini ... 33
3.5.2. cDNA Sentezi ve RT-qPCR ... 34
3.5.3. MikroRNA İzolasyonu ve Miktar Tayini ... 36
3.5.4. miRNA cDNA sentezi ve RT-qPCR ... 37
3.6. MikroRNA'lar Ferroptozla İlişkisinin Hesaplamalı Olarak Değerlendirilmesi ... 39
3.7. İstatiksel Analizler ... 40
4.BULGULAR VE TARTIŞMA ... 41
4.1. Biyokimyasal Analizler ... 41
4.1.1. Demir Düzeyi Tayini ... 41
4.1.3. Total Antioksidatif Düzey (TAS) Tayini ... 44

İÇİNDEKİLER

Sayfa

4.2. Moleküler Analizler 45
4.2.1. SLC40A1, NCOA4, SLC39A8 ve GPX4 Ekspresyon Düzeyleri 45
4.2.2. rno-miR-105 Ekspresyon Düzeyi 49
4.2.3. rno-miR879-5p Ekspresyon Düzeyi 51
4.2.4. rno-miR-6332 Ekspresyon Düzeyi 53
4.2.5. rno-mir-1839-5p Ekspresyon Düzeyi 55
4.2.6. rno-mir-409b Ekspresyon Düzeyi 56
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 58
KAYNAKLAR DİZİNİ 60
EK AÇIKLAMALAR 75

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil **Sayfa**

2.1. İskemi sırasında gerçekleşen iyonik değişiklikler 5
2.2. Reperfüzyon sırasında gerçekleşen iyonik değişiklikler 6
2.3. Hücrede reaktif oksijen türlerinin (ROS) sentezi 12
2.4. MikroRNA biyogenezi 23
2.5. Nefron yapısı. 24
3.1. Nefrektomi uygulaması için sağ böbreğin izole edilmesi. 28
3.2. Böbreğin sütur ile boğumlanarak vücuttan ayrılması. 29
3.3.a. Cerrahi bölgenin hazırlanması ve sterilize edilmesi 30
3.2.b. Böbrek dokusunda iskeminin gerçekleşmesi 30
3.4. Kalpten letal dozda kan alımı yapılarak ötenazi işleminin yapılması 31
4.1.a. Farklı iskemik sürelere maruz kalan sıçan böbrek dokularının demir düzeyleri 41
4.1.b. Farklı iskemik sürelere maruz kalan sıçan serum örneklerinin demir düzeyleri. 42
4.2. Farklı iskemik sürelere maruz kalan sıçan serum örneklerinin TOS düzeyleri 44
4.3. Farklı iskemik sürelere maruz kalan sıçan serum örneklerinin TOS düzeyleri. 45
4.4. Farklı iskemik sürelere maruz kalan sıçan böbrek dokusundaki SLC40A1 mRNA ekspresyonu 47
4.5. Farklı iskemik sürelere maruz kalan sıçan böbrek dokusundaki SLC38A9 mRNA ekspresyonu. 48
4.6. Farklı iskemik sürelere maruz kalan sıçan böbrek dokusundaki NCOA4 mRNA ekspresyonu. 48
4.7. Farklı iskemik sürelere maruz kalan sıçan böbrek dokusundaki GPX4 mRNA ekspresyonu. 49
4.8.a. rno-miR-105 ile SCL40A1 mRNA'sının etkileşim tahmini. 51
4.8.b. Farklı iskemik sürelere maruz kalan sıçan böbrek dokusundaki rno-miR-105 ekspresyonu. 51
4.9.a. rno-miR-879-5p ile NCOA4 mRNA'sının etkileşim tahmini. 52
4.9.b. Farklı iskemik sürelere maruz kalan sıçan böbrek dokusundaki rno-miR-879-5p ekspresyonu. 53
4.10.a. rno-miR-6332 ile NCOA4 mRNA'sının etkileşim tahmini 54
4.10.b. Farklı iskemik sürelere maruz kalan sıçan böbrek dokusundaki rno-miR-6332 ekspresyonu. 55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil **Sayfa**

4.11.a. rno-miR-1839-5p ile SLC39A8 mRNA'sının etkileşim tahmini 56
4.11.b. Farklı iskemik sürelere maruz kalan sıçan böbrek dokusundaki rno-miR-1839-5p ekspresyonu 56
4.12.a. rno-miR-409b ile SLC39A8 mRNA'sının etkileşim tahmini..... 57
4.12.b. Farklı iskemik sürelere maruz kalan sıçan böbrek dokusundaki rno-miR-409b ekspresyonu.. 57

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge **Sayfa**

2.1. İskemi-reperfüzyon hasarının etkileri. 4
2.2 İskemi-reperfüzyon hasarı süre ile ilişkisi 7
2.3. İskemi reperfüzyon hasarı sırasında oluşan değişimler 9
2.4. İskemi/reperfüzyon sürecinde gerçekleşen hücre ölüm türleri 18
3.1. Deneysel grupların oluşturulması 25
3.1. cDNA sentezi için kullanılan reaktifler ve hacimleri. 34
3.2. Ters Transkriptaz Reaksiyon Koşulları. 35
3.3.a. Real Time PCR için kullanılan reaktifler ve hacimleri. 35
3.3.b. Real Time PCR için kullanılan döngü parametreleri. **35**
3.3.c. Genler ve primer dizileri. 36
3.4.a. miRNA poli A kuyruğu sentezi için bileşenler ve hacimleri. 38
3.4.b. miRNA cDNA sentezi için bileşenler ve hacimleri. 38
3.4.c. miRNA Real Time PCR reaksiyonunda kullanılan primerler. 38
3.5.a. miRNA'lar için Real Time PCR için kullanılan reaktifler ve hacimleri. 39
3.5.b. miRNA'lar için Real Time PCR için kullanılan döngü parametreleri 39

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
mg	miligram
rpm	Rounds per minute (Dakikadaki devir sayısı)
%	Yüzde
°C	Celcius degree (Santigrat derece)
g	Gravity (Göreceli santrifüj kuvveti)
cc	santimetreküp
mM	milimolar
µM	mikromolar
U	Ünite

Kısaltmalar	Açıklama
İ/R	İskemi-Reperfüzyon
ATP	Adenozin Trifosfat
ROS	Reaktif oksijen türleri
PMN	Polimorfonükleer lökosit
ICAM-1/2	Hücreler Arası Yapışma Molekülü 1/2
MMP-9	Matris Metalopeptidaz 9
Na^{+}	Sodyum
Ca^{+2}	Kalsiyum
PLA2	Fosfolipaz A2
PARP	Poli(ADP-Riboz) Polimeraz 1
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa B Alt Birim 1
LTB4	Lökotrien B4 Reseptörü
TXA2	Tromboksan A2 Reseptörü
GPX4	Glutatyon peroksidaz 4

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar	Açıklama
BAX	Bcl2 ilişkili x, apoptoz düzenleyici
IL-1β	İnterlökin 1 beta
TNF-α	Tümör nekroz faktörü
IL-8	Cxc motif kemokin ligand 8
MCP-1	Cc motif kemokin ligand 2
H^+	Hidrojen
ATPaz	Adenozin trifosfataz
dk	Dakika
NOS	Nitrik oksit sentaz
O_2	Oksijen
O_2•	Süperoksit
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NOX	Nadph oksidazlar
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotit
O_2^-	İyon oksit
H_2O_2	Hidrojen peroksit
HIF-1α	Hipoksi inhibe edici faktör-1α
NAD^+	Nikotinamid adenin dinükleotid
GSSG	Gsh disülfit
GSH	İndirgenmiş glutatyon
NO	Nitrik oksit
Bcl-2	B hücreli lenfoma 2
Bak	Bcl2 düşmanı/katil 1
Apaf-1	Apoptotik peptidaz aktive edici faktör 1
DISC	Ölüme neden olan sinyal kompleksi
Bid	Bh3 etkileşimli alan ölüm agonisti
BNIP3	Bcl2 etkileşen protein 3
Smac/DIABLO	Kaspazın ikinci mitokondri kaynaklı aktivatörü / apoptoz bağlayıcı proteinin doğrudan inhibitörü kompleksi

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar	Açıklama
CMA	Şaperon aracılı otofaji
NF-kB	Nükleer faktör-kappa b
RIPK1	Reseptör etkileşimli protein kinaz 1
MLKL	Psödokinaz gibi karışık soylu kinaz alanı
PARP-1	Poli (adp-riboz) polimeraz-1
HSP	Isı şoku proteinleri
RAS	Sıçan sarkom virüsü
RSL3	(1s,3r)-rsl3
GPX4	Glutatyon peroksidaz 4
SLC7A11	Çözünen taşıyıcı aile 7 üye 11
SLC3A2	Çözünen taşıyıcı aile 3 üye 2
p53	Tümör proteini p53
VDAC	Voltaja bağlı anyon kanalları
Fe^{+2}	Demir (+2) iyonu
Fe^{+3}	Demir (+3) iyonu
TF	Transferrin
STEAP3	Transmembran prostat epitel antijeni 3
DMT1	Divalent metal taşıyıcı 1
ZIP8/14	Çinko-demir düzenleyici protein ailesi 8/14
FPN	Ferroportin
TFR1	Transferrin reseptörü
TFRC	Transferrin reseptörü
HSPB1	Isı şok proteini beta-1
AKI	Akut böbrek hasarı
Fer-1	Ferrostatin-1
ncRNA	Kodlamayan rna
piRNA	Piwi-etkileşimli rna
miRNA	Mikrorna

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar	Açıklama
ncRNA	Uzun kodlanmayan rna
pri-miRNA	Birincil mirna
UTR	Çevrilmemiş bölge
DGCR8	Mikroişlemci kompleksi alt birimi
XPO5	Exportin 5
RanGTP	Ras onkogen ailesi üyesi/gtp komplesi
AGO	Argonaute
miRISC	Minimal mirna ile indüklenen susturma kompleksi
MRE	Metal düzenleyici transkripsiyon faktörü 1
AGO2	Argonaute rısc katalitik bileşen 2
SLC40A1	Çözünen taşıyıcı aile 40 üye 1
NCOA4	Nükleer reseptör koaktivatörü 4
SLC39A8	Çözünen taşıyıcı aile 39 üye 8
RPE	Hafif yıkama tamponu
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
MMLV	Moloney murin lösemi virüsü
cDNA	Tamamlayıcı dna
IL-6	İnterlökin 6
Puma	Bcl2 bağlama bileşeni 3
FasL	Fas ligandı

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İskemi, bir organ veya dokuya kan iletiminin kısıtlanması olarak tanımlanan patolojik bir durumdur (Eltzschig ve Eckle, 2011). İskemi sonucunda, mitokondrilerde ATP üretiminin düşmesine bağlı olarak, anaerobik solunumun indüklendiği ve sodyum-potasyum pompalarının (Na^+/K^+-ATPaz) bozulduğu belirlenmiştir. İskemi süresince metabolik asidoz geliştiği, hücre zarındaki Na^+/K^+-ATPaz enziminin ve kalsiyum pompalarının (Ca^{+2}-ATPaz) işlevini kaybettiği bilinmektedir. Oluşan bu süreçte hücredeki endoplazmik retikulumlardaki Ca^{+2}-ATPaz enzimi inaktif hale gelmekte ve bu durum da kalsiyumun geri alınımını sınırlamaktadır. Hücrelerde hidrojen, sodyum ve kalsiyum iyonlarının birikmesi sonucunda da hiperosmolarite gerçekleşmekte ve sitoplazmaya su alımı ile hücreler şişmektedir. Hücrede oluşan anaerobik metabolizmanın, hücrelerde daha az ATP ve daha fazla antioksidan üretimini tetiklediği de gösterilmiştir (Fitridge ve Thompson, 2012).

İskemik koşullar altındaki dokuları kurtarmak için kan akışının dokuya yeniden sağlanması ise reperfüzyon olarak tanımlanmaktadır. Reperfüzyon sürecinde hücrelerde daha düşük konsantrasyonda antioksidan ajan bulunduğu için reaktif oksijen türlerinin (ROS) hücredeki miktarında artış gözlemlenmektedir. Bu nedenle reperfüzyon sırasında hücreler artan oksidatif stres nedeniyle bir kez daha hasara uğramaktadır. ROS, endotel dokusunda fonksiyon kaybı, DNA hasarı ve lokal inflamatuar tepkiye neden olan oksidatif strese sebep olmaktadır. Ayrıca oluşan inflamatuar yanıt ve oksidatif stresin, sitokin fırtınasını tetikleyerek hücre ve doku ölümüne neden olabildiği de belirlenmiştir (Kalogeris vd., 2016).

İskemi durumunda hücrede gelişen metabolik düzensizliklerin yanında, dokunun iskemik hasara verdiği yanıtta rol oynayan çok sayıda genin ekspresyonunda da değişikliklerin olduğu tespit edilmiştir. Paoni vd.'nın yaptığı bir çalışmada femoral ligasyon ile iskemik hale getirilen fare soleus kasında yapılan RNA ekspresyon analizi sonucunda, 962 genin ekspresyonunun indüklendiği, 327 genin ise baskılandığı gösterilmiştir. Aktif hale gelen genler, büyük ölçüde sitokin genleri, inflamasyon ve immün hücre infiltrasyonunun aracıları olan genlerin olduğu tespit edilmiştir. Baskılanmış genlerin ise, mitokondriyal

solunum ve yağ asidi oksidasyonu gibi enerji üretiminde rol alan genlerden oluştuğu gösterilmiştir (Paoni vd., 2002).

Ferroptoz, klasik apoptoz ve nekrozdan farklı olarak yeni keşfedilen bir hücre ölümü türüdür. Ferroptoz, demir birikimi, aşırı ROS ve lipid peroksidasyon ürünlerinin oluşması ile karakterize edilen demir güdümlü bir hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır (Cao ve Dixon 2016). Ferroptoz sürecinde hücrelerde demir birikimi, lipid peroksidasyonu ve mitokondriyal disfonksiyon görülmektedir. Özellikle iskemi/reperfüzyon (İ/R) sonrası organ hasarında oluşan oksidatif stres sonucunda, ferroptozun aktive edildiği ve bu süreçle hücre ölümünün gerçekleştiği belirlenmiştir (Angeli vd., 2014).

MikroRNA'lar, hedef mRNA'ları degrede eden ya da 3 boyutlu yapılarının bozulmasına neden olan, kodlanmayan küçük düzenleyici RNA molekülleridir (Pasquinelli vd., 2000; Reinhart vd., 2000). Bugün insan genomunda 1000'den fazla miRNA'nın kodlandığı belirlenmiştir (Baek, 2008). Yapılan çalışmalarda ferroptoz sürecinde rol oynayan farklı miRNA'ların varlığı belirlenmiştir.

Çalışmamızda ilk olarak sıçanlarda farklı iskemi sürelerine bağlı olarak oluşturulan renal İ/R hasarının indüklediği ferroptozun neden olduğu biyokimyasal ve histolojik değişiklikler araştırılmıştır. Ayrıca ferroptozun demir yolağında görevli olduğu düşünülen SLC40A1, NCOA4 ve SLC39A8 genleri ile ferroptoz sürecinde düzenleyici rol oynayan GPX4 geni ve bu genlerin düzenlenmesinden sorumlu olabilecekleri düşünülen 5 farklı miRNA'nın (mir-409b, mir-6332, mir-105, mir-1839 ve mir-879) ekspresyon düzeylerindeki değişikler incelenmiştir.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1 İskemi/Reperfüzyon

İskemi, vücudun herhangi bir bölgesinde bulunan bir doku veya organa kan akışının kesilmesi sonucunda ortaya çıkan fizyolojik süreç olarak tanımlanabilir. Reperfüzyon ise, bir doku veya organa kan akışının tekrar başlamasıdır. Hem iskemi hem de reperfüzyon koşullarında doku ve hücrelerde hasar oluşmaktadır. İskemi ve reperfüzyon sonucu oluşan hücresel hasarlar karşılaşıtırıldığında, bazı durumlarda reperfüzyonun daha fazla hasara neden olabildiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Dorweiler vd., 2007).

İskemi-Reperfüzyon (İ/R), dünya genelinde başlıca ölüm sebeplerinden biri olarak kabul edilmektedir. Ayrıca kardivasküler hastalıklar olmak üzere pek çok hastalığı tetikleyen patofizyolojik olayları da içermektedir (Lopez vd., 2006). İ/R hasarı damar tıkanıklığı ile gelişen inme, miyokard enfarktüs ve akut uzuv iskemisinde gerçekleşen başlıca patolojidir. Ayrıca organ nakli, doku transferi, kardiyopulmoner baypass da kullanılan kalp cerrahisi, vasküler cerrahi ve turnike uygulanması gibi acil müdahaleler başlıca olmak üzere pek çok cerrahi uygulama sürecinde de kendiliğinden gerçekleşebilmektedir (Farber vd.,1987). İskemik şartlar altında oksijen akışı kesilen hücreler hızla ölmeye başlar. İskemik durumu tedavi etmek için dokuya kan akışının tekrar sağlanması gerekmektedir. Fakat reperfüzyonun gerçekleşmesi dokuda daha fazla hasara sebep olabilmektedir (Kalogeris vd., 2012).

2.2. İskemi/Reperfüzyonun Temel Özellikleri

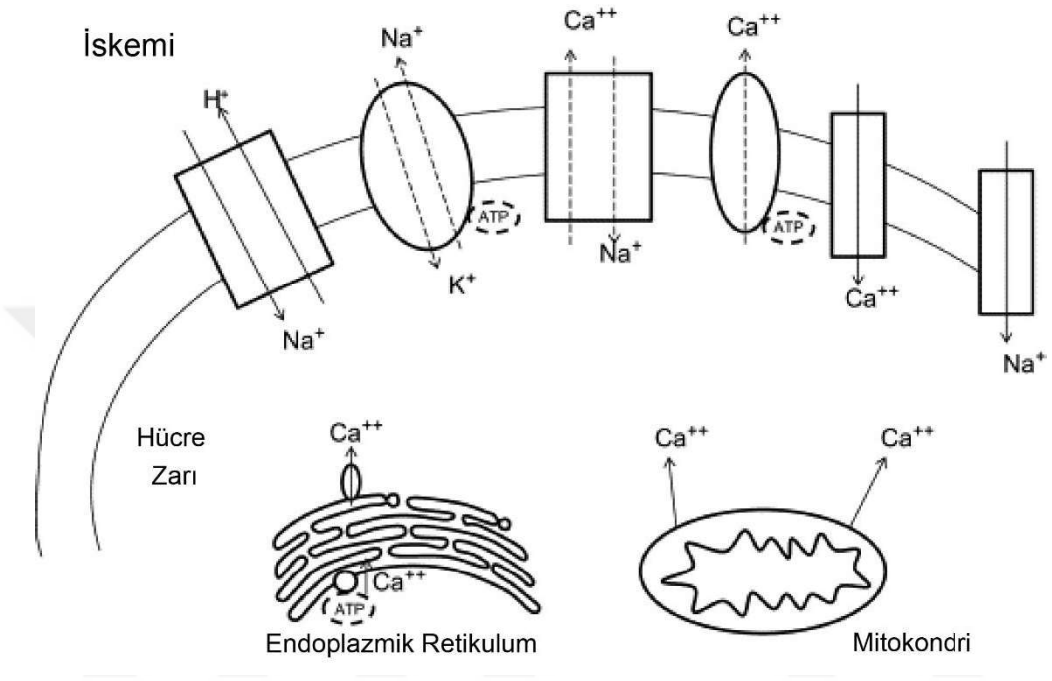
İskemik hasara uğrayan bir dokuda temel olarak hücrelerin oksijenden mahrum kalması ve bunun sonucunda da hücredeki iyon dengelerinin bozulması gözlenmektedir. Reperfüzyon sürecinde ise hem iskemi gerçekleşen dokuda hasarı arttıran hem de uzak dokulara zarar veren çeşitli yanıtlar oluşmaktadır. İskemi-reperfüzyon sürecinde oluşan hasarlar Tablo 2.1'de özetlenmiştir (Pasupathy ve Vanniasinkam, 2005).

Çizelge 2.1. İskemi-reperfüzyon hasarının etkileri (Dorweiler vd., 2007).

Moleküler etkiler	**Hücresel etkiler**
ATP tükenmesi	Endotel hücre disfonksiyonu/şişmesi
ATP sentezinin durması	Polimorfonükleer lökosit (PMN) artışı
Hipoksantin artışı	Oksidatif patlama
Ksantin oksidaz aktivasyonu	Bozulmuş vazodilatasyon (NO aracılı)
ROS üretimi	Kan damarlarının daralması
Antioksidan moleküllerin (glutatyon) tükenmesi	Endotel bariyer bozulması
Hücre içi aşırı Na^{+} ve Ca^{+2} birikimi	Adezyon moleküllerinin eksprese olması (P-/L-selektin, ICAM-1/2)
PLA2'nin aktivasyonu	Matris bozan proteazların serbest bırakılması (Elastaz, MMP-9)
PARP'ın aktivasyonu	
NF-κB'nin etkinleştirilmesi	
Toll benzeri reseptör sinyalinin aktivasyonu	
Hücre İçi Etkiler	**Mediatörler**
Mitokondriyal disfonksiyon/şişme	Araşidonik asit metabolitleri (LTB4, TXA2)
BAX translokasyonu	Sitokinler (IL-1β, IL-6, TNF-α)
Sitokrom c akışı	Kemokinler (IL-8, MCP-1)
Lipid peroksidasyonu	
DNA kırıkları oluşması	
Hücre zarı hasarı	
Artan hücre zarı geçirgenliği	
Hücre iskeletinin bozulması	

İskemi sürecinde oluşan anaerobik metabolizma sebebiyle hücre içi H^{+} iyonları artmakta ve pH düşmektedir. Hücre içi biriken iyon konsantrasyonunun dengelenebilmesi için Na^{+}/H^{+} taşıyıcı protein tarafından hücre içindeki H^{+} iyonları dışarı atılırken, Na^{+} iyonları hücre içine alınır (Sanada vd., 2011). İskemi süresince hücresel ATP tükenmekte ve bu sebeple ATPaz'lar inaktive forma geçmektedir. ATPaz'ların inaktif olması sonrasında hücre içine aktif Ca^{+2} taşınımında azalma, endoplazmik retikulumun aktif Ca^{+2} geri kazanımın da kısıtlanma ve hücre içine aşırı kalsiyum alınımı gözlemlenmektedir. Hücre içi sodyum ve kalsiyum metabolizmasının bozulması mitokondriyal geçirgenlik geçiş porlarının

açılmasına sebep olmaktadır. Porların açılması ile mitokondriyal membran potansiyelinde dağılma gözlemlenirken ATP üretiminin daha da zor hale geldiği gözlemlenir (Şekil 2.1) (Kalogeris vd., 2012).

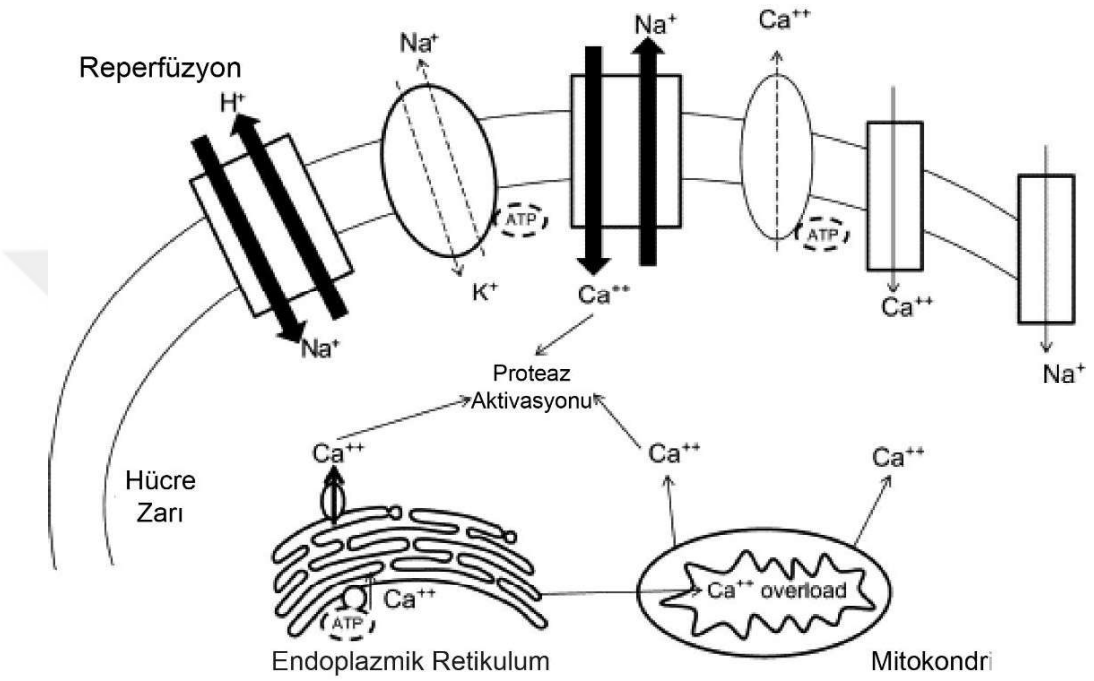


Şekil 2.1. İskemi sırasında gerçekleşen iyonik değişiklikler (Kalogeris vd., 2012).

Reperfüzyon ile hücresel fonksiyonların düzenlenmesi ve ATP üretimi için gerekli oksijen ve substratların iletimi sağlanmaktadır. Ayrıca iskemik koşullar sonucu biriken H^+ iyonları uzaklaştırılarak hücre dışı pH düzenlenir. Fakat reperfüzyon aynı zamanda hücrede karmaşık ve çok faktörlü bir hasara da sebep olmaktadır. Reperfüzyon sürecinde hasara neden olan değişiklikler şu şekilde sıralanabilir: reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu, aşırı kalsiyum birikimi, mitokondriyal geçirgenlik geçiş porlarının açılması, endotel disfonksiyon oluşumu ve inflamatuar yanıt oluşumu. Hücre içinde oluşan değişiklikler Şekil 2.2'de gösterilmiştir (Yellon ve Hausenloy, 2007).

İskemi-reperfüzyona bağlı oluşan doku hasarının şiddeti, kan akışındaki azalma miktarı ve süre ile değişkenlik göstermektedir (Bulkley, 1987). İskemi sırasında gerçekleşen bazı biyokimyasal değişiklikler tek başlarına hasara neden olmamaktadır. Fakat dokuya kan akışı tekrar sağlanması, oksijen ve kanın dokuya ulaşması ile oluşan hasarı arttıran bir kaskadı

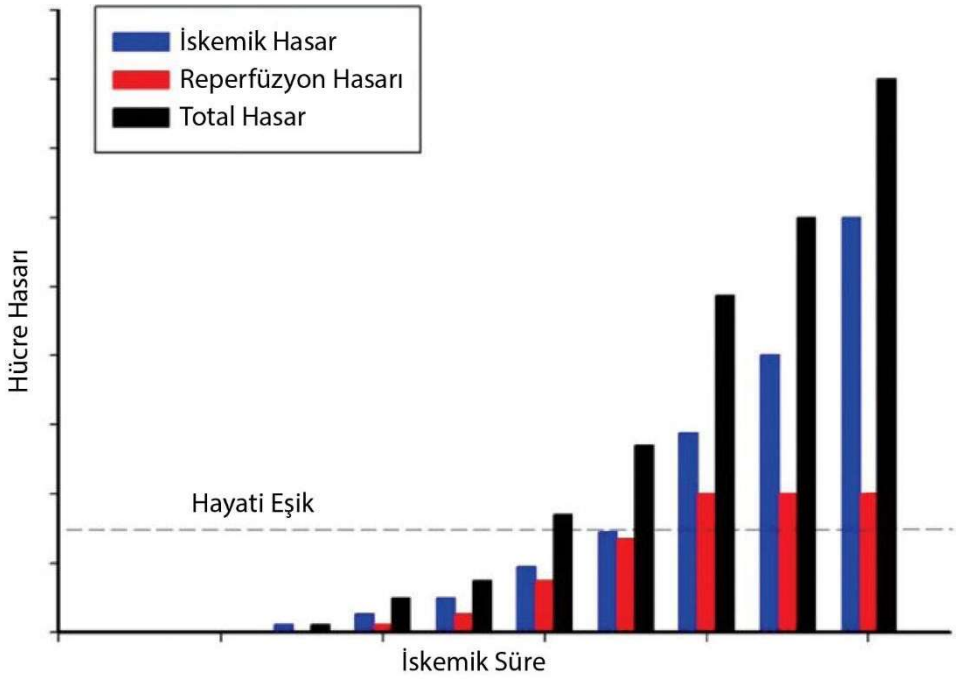
tetiklemektedir (Kalogeris vd., 2012). Tablo 2.2'de süre ile iskemi/reperfüzyon hasarı arasındaki ilişki gösterilmiştir. Literatürde bulunan çalışmalarda reperfüzyon aşamasının oldukça dinamik gerçekleştiği bildirilmektedir. Örneğin; yapılan bazı çalışmalarda reperfüzyon başlangıcı ardından hücre ölümünün 3. güne kadar devam ettiği gösterilmiştir (Zhao vd., 2000).



Şekil 2.2. Reperfüzyon sırasında gerçekleşen iyonik değişiklikler (Kalogeris vd., 2012).

Doku ve organlar kalıcı bir hasar olmaksızın belirli bir düzeye kadar iskemi ve reperfüzyon hasarına karşı direnç gösterebilmektedir. Bu direnç doku ve hücrelerin türüne ve İ/R'nun şiddetine göre değişmektedir. Fakat iskemi süresi arttıkça doku hasarı, fonksiyon bozukluğu ve hücre ölümü kaçınılmaz olmaktadır. Bu sebeple iskemik hasarı engellemenin yolu, en kısa sürede dokuya tekrar kan akışını sağlamaktır (Kalogeris vd., 2016).

Çizelge 2.2 İskemi-reperfüzyon hasarı süre ile ilişkisi (Kalogeris vd., 2016).



Organlar arasında iskemik hasara karşı en yüksek hassasiyete sahip organ beyindir (Kalogeris vd., 2016). Beyin dokusunda iskemi başlangıcından 20 dk sonra geri dönüşümsüz hasar gelişmeye başlamaktadır. Beyin hücrelerindeki hasar oluşumu etkilenen hücre tipi ve beyin bölümüne göre değişiklik gösterebilmektedir. Bu sebeple iskemi başlangıcından 90 dk ila 4,5 saat içinde tedaviye yanıt alınabilmektedir (Ordy vd., 1993; Bluhmki vd., 2009). Beyindeki iskemik hasarın hızlı gelişmesinin birden fazla nedeni vardır. İlk olarak beyin dokusu ağırlık/metabolik aktivite oranı bakımından en aktif organdır ve anaerobik solunum şartlarında çalışamamaktadır. Ayrıca beyin metabolik aktivitesine devam edebilmek için sürekli glikoza ihtiyaç duymaktadır ve karaciğer ve kas dokusunun aksine karbonhidrat deposuna sahip değildir. Diğer dokulara kıyasla beyin dokusu daha az antioksidan enzimleri ve sitokrom c oksidaz enzimini içerir ve bu durum reperfüzyon hasarının şiddetini arttırmaktadır (Lee vd., 2000).

Miyokard dokusu ise, beyin dokusuna benzer şekilde iskemik hasara karşı oldukça hassastır. Miyokard dokusunda iskemik hasara bağlı geri dönüşümsüz hasar 20 dk sonrasında ortaya çıkmaya başlamaktadır ve 2 ila 12 saat arasında etkin bir şekilde tedavi

uygulanabilmektedir. Ayrıca kalpte oluşan iskemik hasarın düzeyinin yaşa bağlı olarak da değiştiği çalışmalarda gösterilmiştir (Wittnich, 1992; Kalogeris vd., 2012).

İskemi-reperfüzyon hasarına duyarlılık bakımından kalp ve beyinden sonra üçüncü organ böbrektir. Yapılan çalışmalarda 60 dk iskemi süresinin geri dönüşümsüz hasar için sınır olduğu 75 dk'yi aşan sürelerde fonksiyon kaybının gerçekleştiği gösterilmiştir (McDougal, 1988; Humphreys vd., 2009). Kortikal hücreler, böbrek dokusunda iskemik hasara en duyarlı hücrelerdir. Kortikal hücreler böbrek dokusundaki en yüksek oksijen gereksinimi ve düzeyine sahip olan korteks bölgesinde yer almaktadır. Böbrekte oksijen seviyesi, korteks bölgesinden dış medulla ve papilla bölgesine doğru giderek azalmaktadır. İskemik şartlar altında; dış medulla ve papilla hücreleri ATP üretebilmek için, anaerobik solunum yapmakta ve bu durum iskemik hasara karşı daha az duyarlı olmalarını sağlamaktadır (Kalogeris vd., 2016).

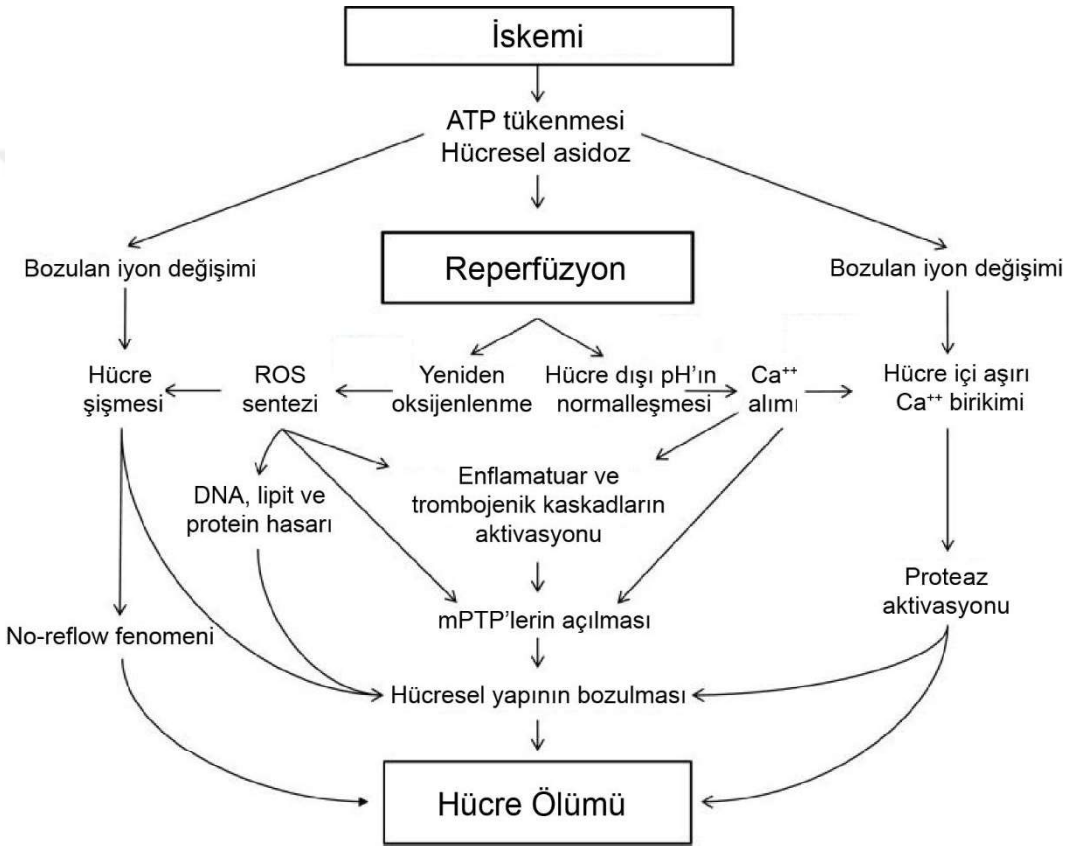
2.3. İskemi/Reperfüzyon Hasarının Mekanizması

İskemik koşullar altında kan akışının kesilmesi hipoksiye neden olmaktadır. Hipoksik koşulda mitokondrilerin elektron taşıma sistemi işlevini kaybetmektedir. Mitokondride ATP üretiminin azalması ile sodyum-potasyum taşıyıcı proteinlerin bozulması, ribozomun büyük ve küçük alt biriminin ayrılması ve anaerobik metabolizma tetiklenmektedir. Anaerobik koşullar altında hücreler daha az antioksidatif moleküller sentezlemektedir (Wu vd., 2017). Laktik asit birikimi ile hücre içi pH düşüşü gözlenmektedir. Düşen pH enzim aktivitesinin bozulmasını ve nükleer kromatin kümelenmesini tetiklenmektedir. İyon kanallarının işlevini kaybetmesi ile hücre içinde hidrojen, sodyum ve kalsiyum iyonları birikmekte ve hiperozmolarite gözlemlenmektedir (Wu vd., 2018).

Reperfüzyon ile dokuya tekrar oksijen ve kan elementlerinin ulaşması sağlanmaktadır. Fakat düşük antioksidatif molekül konsantrasyonu sebebiyle reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi artmaktadır. ROS; endotel fonksiyon bozukluklarını, DNA hasarını

ve inflamatuar yanıtı tetikleyerek oksidatif stresi tetiklemektedir. Tetiklenen inflamatuar yanıt ve oksidatif stresin etkisi süre geçtikçe artabilmekte ve sitokin fırtınasına sebep olabilmektedir (Ornellas, 2017; Wu vd., 2018) İskemi/reperfüzyon hasarının fizyolojik etkileri çizelge 2.3'te özetlenmiştir.

Çizelge 2.3 İskemi reperfüzyon hasarı sırasında oluşan değişimler (Kalogeris vd., 2016)



2.4. İskemi Reperfüzyon Hasarında Oluşan Oksidatif Stres

Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROS) doku ve hücrelerde birikmesi ve metabolizmanın bu reaktif ürünleri detoksifiye edememesi olarak tanımlanmaktadır (Ornellas ve vd., 2017). Oksidatif stres, enzimatik ve enzimatik olmayan yolaklar ile gelişebilmektedir. Enzimatik oksidatif stres kaynakları arasında mitokondriyal elektron taşıma sistemi, NADPH oksidaz metabolizması, ksantin oksidaz metabolizması ve

indüklenebilir nitrik oksit sentaz (NOS) bulunmaktadır (Granger ve Kvietys, 2015). Enzimatik olmayan oksidatif stres ise göreceli olarak daha küçük bir stres kaynağıdır ve yaralanmalara bağlı olarak hemoglobin ve miyoglobinler tarafından sağlanmaktadır (Wu vd., 2018).

2.4.1. Oksidatif Stresin İndüklenme Mekanizmaları

2.4.1.1. Ksantin Oksidaz

Ksantin oksidaz, pürin metabolizmasında görevli katalitik bir flavoproteindir. Ksantin oksidaz, hipoksantin ve ksantinin ürik aside oksidasyonunu katalize etmektedir (Lück, 1965). Ksantin oksidaz, hücre içinde proteoliz ile ksantin dehidrojenaz'dan sentezlenmektedir. Reperfüzyon sonucu doku tekrar oksijenlendiğinde, ksantin oksidaz oksijeni son elektron alıcı olarak kullanır. Ksantin oksidaz oksijen (O_2) ile reaksiyona girerek hipoksantini indükler ve ürik asit sentezler. Gerçekleşen reaksiyon sonucu süperoksit ($O_2\bullet$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) açığa çıkmaktadır (Lee vd., 2014).

2.4.1.2. NADPH Oksidaz İndüksiyonu

NADPH oksidazlar (NOX), iskemi/reperfüzyon hasarı sırasında önemli ROS üreten enzimlerden birisidir. NADPH oksidazlar, elektron donörü olarak nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) ve nikotinamid adenin dinükleotit (NADH) moleküllerini kullanmaktadır ve moleküler oksijenden iyon oksit (O_2^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) sentezlemektedir (Lambeth, 2004). NOX enzimleri kardiyomiyositler, endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve lökositler dahil olmak üzere pek çok hücre türünde sentezlenmektedir ve önemli metabolik aktivitelerde rol almaktadır (Matsushima ve Sadoshima, 2022).

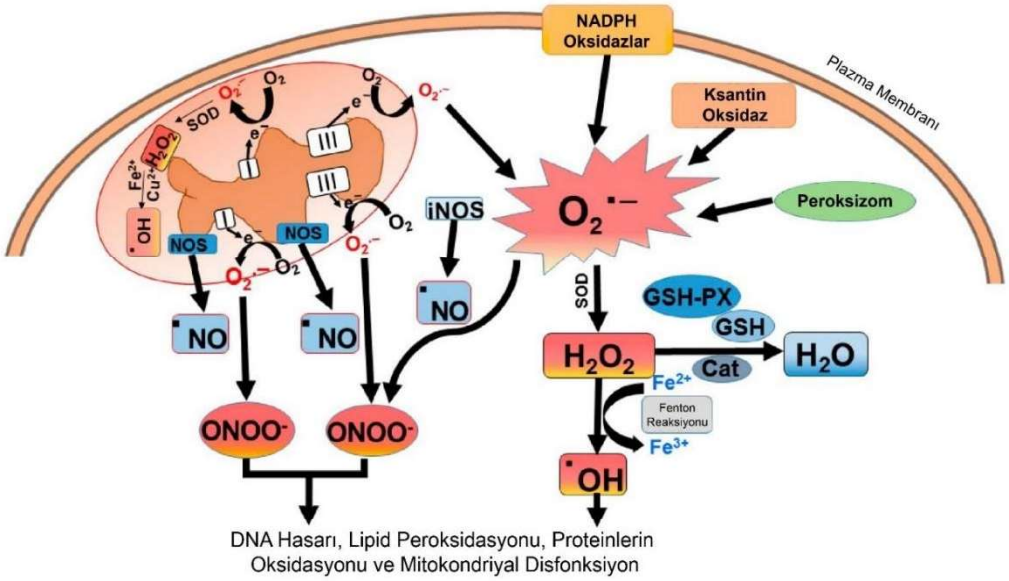
NOX enzimlerinin İ/R hasarında aşırı ekpsrese olarak ROS üretimine sebep olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Miller vd., 2006; Nakagiri vd., 2007). NOX enzimleri iskemi/reperfüzyon koşulları altında yüksek miktarda süperoksit anyonu ($O_2\bullet^-$) sentezlemektedir. Sentezlenen süperoksit anyonu hızlı bir şekilde hidrojen peroksit sentezinde kullanılmaktadır. İskemik durumda gözlemlenen hipoksik kondisyon, NADPH

oksidazların aktivasyonunu arttıran hipoksi inhibe edici faktör-1α'yı (HIF-1α) indüklemektedir. Oksidatif stres, pozitif bir geri besleme döngüsü oluşturmak için HIF-1α sentezinde arttırıcı rol oynamaktadır. Ayrıca reperfüzyon şartlarında hücrelerde NADPH oksidazları aktif hale getirmek için çeşitli mediatörlerin sekresyonu gözlenmektedir (Wu vd., 2018).

Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+)/indirgenmiş NAD^+ (NADH), fosforlanmış NAD^+ ($NADP^+$)/indirgenmiş $NADP^+$ (NADPH) ve indirgenmiş glutatyon (GSH)/GSH disülfit (GSSG) redoks molekülleri hücresel enerji metabolizması için önemli moleküllerdir. Bu moleküller hücre içi ROS konsantrasyonun kontrolü için substrat veya kofaktör görevi görerek hücresel yükseltgenme/indirgenme dengesini korumaktadır. Reperfüzyon koşullarında redoks koşullarının bozulması ile aşırı ROS sentezi bu sistemi bozarak indirgeyici strese neden olmaktadır (Matsushima ve Sadoshima, 2022).

2.4.1.3. Nitrik Oksit Sentazlar (NOS)

Nitrik oksit sentazlar (NOS), L-arginin molekülünden nitrik oksit (NO) sentezini katalizeleyen bir enzim ailesidir. Nitrik oksit, insülin salgılanması ve vasküler tonusu kontrol eden önemli bir sinyal molekülüdür (Fu, 2014). Nitrik oksit aynı zamanda antiinflamatuvar ve antioksidatif özelliklere de sahiptir. Hipoksik koşullarda NOS enzimi dönüştürülerek iskemi/reperfüzyon hasarını indükleyen ROS sentezlemektedir (Şekil 2.3) (Wu vd., 2018).



Şekil 2.3. Hücrede reaktif oksijen türlerinin (ROS) sentezi (Kaushal vd., 2019).

2.5. İskemi Reperfüzyon Hasarı ve Hücre Ölüm Türleri

İskemi-reperfüzyon hasarı, apoptoz, otofaji, nekroz ve ferroptozun da dahil olduğu çeşitli hücre ölümü tipleriyle sonuçlanabilecek çok yönlü bir süreçtir. İskemi-reperfüzyon sürecinde ve sonrasında gelişen hücre ölüm mekanizmaları Çizelge 2.4'te belirtilmiştir.

2.5.1. Apoptoz

Apoptoz, çok hücreli organizmaların gelişmesinde ve hayati fonksiyonlarını sürdürmesinde önemli role sahip programlanmış bir hücre ölümü şeklidir. Apoptoz; hücre büzülmesi, DNA degradasyonu ve sonunda hücrenin inflamatuar sistem tarafından yok edilmesini sağlayan bir dizi biyokimyasal olayla karakterize edilmektedir. Büyüme faktörü yoksunluğu, DNA hasarı ve viral enfeksiyonlar dahil olmak üzere çeşitli metabolik sinyaller ile indüklenmektedir (Kroemer vd., 2007).

Apoptoz iki ana yolağa sahiptir; içsel (mitokondriyal) ve dışsal yolak. İçsel yolak,

büyüme faktörü bozukluğu, DNA hasarı veya oksitatif stres gibi sitotoksik uyaranlar tarafından tetiklenmektedir. İçsel yolak, mitokondride bulunan Bcl-2 protein ailesi altında sınıflandırılan Bax ve Bak adlı proteinlerin aktivasyonu ile başlar. Bax ve Bak proteinlerinin aktive olması, sitokrom c proteininin mitokondriden sitozole salınmasına neden olur. Sitokrom c, sitozole salındıktan sonra Apaf-1 adlı bir protein ile etkileşime girerek birleşir. Oluşan protein kompleksi kaspaz-9 adı verilen bir proteini aktive eder. Kaspaz-9 proteinin aktive olması kaspaz-3 de dahil olduğu kaspaz proteinlerinin aktivasyon kaskatını başlatmakta ve hücre degradasyonu indüklemektedir (Broughton vd., 2009; Kroemer vd., 2007).

Dışsal yolak, hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan dış sinyal molekülleri (sitokinler, antikorlar, vb.) tarafından tetiklenmektedir. Dışsal yolak, TNF-α veya FasL gibi bir ölüm ligandının hücre yüzeyindeki reseptörüne bağlanmasıyla başlamaktadır. Ligand-reseptör kompleksi, ölüme neden olan sinyal kompleksininin (DISC) oluşumunu tetiklemektedir. DISC kompleksi kaspaz-8 proteini tarafından aktif etmektedir. Aktif kaspaz-8, kaspaz-3 dahil olmak üzere diğer kaspaz proteinlerinin aktivasyon kaskatını başlatmakta ve hücreyi ölüme götürmektedir (Broughton vd., 2009; Kroemer vd., 2007).

İskemi-reperfüzyon hasarında apoptotik hücre ölümü tetiklenmektedir. Bcl-2 ailesi proteinlerinin (Bax, Bak, Bid, BNIP3 ve Puma) iskemi/reperfüzyon koşulları altında ekspresyonunun ve mitokondriyal zarla entegrasyonunun arttığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Wei vd., 2006; Wu vd., 2007). Nakavt modellerde yapılan çalışmalarda Bcl-2 proteinlerinin susturulmasının, Ca^{+2} homeostazını etkileyerek İ/R hasarına karşı koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (Scorrano vd., 2003). İ/R sürecince mitokondriden bir dizi apoptotik faktör salgılanmaktadır. Bunlar; arketik sitokrom c ile Omi/HtrA2 ve Smac/DIABLO kompleksleridir. Bu faktörlerin farmakolojik veya genetik inhibisyonla regülasyonu, İ/R hasarını azaltıcı etki gösterdiği yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Nilakantan vd., 2010).

2.5.2. Otofaji

Otofaji, tüm ökaryotik hücrelerde gerçekleşen ve hücresel metabolizmanın sürdürülmesinden sorumlu programlanmış bir hücre ölüm çeşididir. Özellikle stres ve besin yoksunluğunda oluştuğu rapor edilmiştir. Otofaji, hücreden eliminasyon için lizozomlara aktarılan otofagozomlara paketlemeyi içeren bir işlemle, hasarlı veya eskimiş organellerin ve protein kümelerinin sindirimi için işlev görmektedir (He ve Klionsky, 2009). Otofaji üç alt mekanizmaya sahiptir: mikrootofaji, makrootofaji ve şaperon aracılı otofaji (CMA). Her birinin indüklenmesi ve gelişmesi farklı olsa da üç mekanizma da hücresel elementlerin parçalanma ve geri dönüşüm için lizozomların kullanılması ile sonuçlanmaktadır. Mikrootofaji sürecinde, hedef portein veya organelleri izole etmek için lizozomal zarın çıkıntıları kullanılmaktadır (Kalogeris vd., 2016). Şaperon aracılı otofaji (CMA), hedef molekülü izole etmek için membran yapılarının kullanılmasının aksine, bir pentapeptit motifi içeren hedef proteinlerini tanımlamak için şaperonların kullanılmasını içermektedir. Makrootofaji, sindirimi gerçekleşecek hücre bileşenlerinin etrafında genişleyen ve onları diğer hücre elementlerinden izole eden bir zar olan fagoforun oluşmasını içermektedir. Makrootofaji sürecinde oluşan fagofor, hasarlı protein, organelleri ve hücre içi yapıları izole eden, çift membranlı bir otofagozomun yapısıdır. Fagoforun lizozom ile birleşmesi, izole edilmiş hücre içi yapıların bozulması sağlamaktadır (Parzych ve Klionsky, 2014).

2.5.3. Nekroz

Nekroz, hücre zarı bütünlüğünün kaybıyla karakterize edilen, hücre içi bileşenlerin hücre dışı boşluğa salınmasıyla sonuçlanan ve bir enflamatuar yanıtı tetikleyen bir hücre ölümü şeklidir. Bu süreç genellikle akut hücresel yaralanma veya stresin bir sonucudur ve apoptoz gibi programlanmış hücre ölümü yollarıyla ilişkili kontrollü ve düzenlenmiş moleküler olayların olmaması ile karakterize edilir. Nekroz, çeşitli dokularda meydana gelebilir ve iskemi, enfeksiyon ve travma dahil olmak üzere çok sayıda patolojik durumla ilişkilidir.

Nekroz, çeşitli moleküler ve genetik yolları içeren karmaşık bir süreçtir. Hücresel hasar ve stres, sonuç olarak nekroza yol açan bir dizi olayı tetiklemektedir. Hücresel etkiler; iyon homeostazının bozulması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ve birikmesi,

mitokondriyal disfonksiyon, protein kinazların aktivasyonu ve DNA hasarı: DNA hasarı olarak sıralabilir (Morgan vd., 2008; Baines, 2009; Halestrap 2009; Vandenabeele vd., 2010).

2.5.4. Ferroptoz

Ferroptoz, 2003 yılında, Sıçan sarkom virüsü (Rat sarcoma virüs, RAS) ekspresyonu yapan kanser hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada erastin bileşiğinin öldürücü etkinliğini araştırırken keşfedilmiştir (Dolma vd., 2003). Erastin molekülü kanserli hücreleri öldürürken, diğer hücre ölümlerinde gözlenen nükleer morfoloji değişiklikleri, DNA fragmantasyonu ya da kaspaz aktivasyona neden olmamıştır. Bu nedenle araştırmacılar hangi mekanizma ile hücre ölümüne neden olduğunu araştırmaya başlamışlardır. Ferroptoz, hücrelerin demir bağımlılığıyla gerçekleşen programlanmış hücre ölümü türüdür olarak tanımlanmıştır (Li vd., 2020). Ayrıca yapılan çalışmalarda keşfedilen bu yeni hücre ölüm mekanizmasının demir şelatlayıcı moleküller tarafından inhibe edilebileceği ve RSL3 molekülü ile indüklenebileceği keşfedilmiştir (Yang ve Stockwell, 2008). Mekanizma 2012 yılında Dixon tarafından RAS mutasyonlarının kanser hücreleri üzerindeki öldürücü etkisinin incelendiği bir çalışmada isimlendirilmiştir (Dixon vd., 2012).

Ferroptoz, kanser, nörolojik hastalıklar, akut böbrek hasarı, iskemi/reperfüzyon gibi birçok hastalığın ortaya çıkmasında ve gelişmesinde önemli bir düzenleyici rol oynamaktadır (Li vd., 2020). Ferroptoz, morfolojik olarak artan membran yoğunluğu ve mitokondriyal kristanın azalması veya kaybolması ile mitokondrinin bariz büzülmesi olarak karakterizedir. Ferroptoz sürecinde hücrenin ve organellerin şişmesi ve hücre zarının bütünlüğünü kaybetmesi gibi nekrozun morfolojik özellikleri; hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, apoptotik cisimlerin oluşuması gibi apoptozunun morfojik özelliklerini görülmemektedir. Ayrıca otofajinin sürecinde oluşan iki katmanlı zar yapılarının (otofajik vakuoller) oluşumu ferroptozda gözlemlenmemektedir (Dixon vd., 2012; Yang ve Stockwell, 2008).

Ferroptoz sonucunda hücrelerde azalmış mitokondriyal hacim, artmış iki tabakalı membran yoğunluğu ve mitokondriyal krista da azalma veya kaybolma gözlenmektedir. Ferroptotik süreç sonunda hücre zarında hasar oluşmamakta, çekirdek normal boyutlarında

kalmakta ve kromatin konsantrasyonu oluşmamaktadır. Biyokimyasal olarak, hücre içi glutatyon'un (GSH) tükenmesi ve glutatyon peroksidaz 4 (GPX4) aktivitesinde azalma gözlemlenmektedir. Ferroptoz sonucunda aşırı ROS üretimi gerçekleşmektedir. Ferroptoz, birden fazla gen ve yolak tarafından düzenlenen biyolojik bir süreçtir (Friedmann vd., 2014).

2.5.4.1. Ferroptozun Mekanizması

Sistem Xc-, fosfolipid çift katmanlarında bulunan, antioksidan sistemde görevli olan bir amino asit antitransporter'dır. Sistem Xc-, heterodimer bir proteindir ve SLC7A11 ve SLC3A2 olmak üzere iki alt birimden oluşmaktadır. Sistin ve glutamat, Xc- sistemi tarafından hücre içinde ve dışında eş zamanlı olarak taşınmaktadır. Hücre içine alınan sistein, hücrelerde GSH sentezinde kullanılan sistein'e indirgenmektedir. GSH, glutatyon peroksidazların kontrolü altında ROS'u ve reaktif nitrojeni inhibe etmektedir. Xc- sisteminin inhibe edilmesi sistin emilimini inhibe ederek, GPX aktivitesinde, GSH sentezininde ve hücre antioksidan kapasitesinde azaltıcı, ROS birikimine ve oksidatif hasar ile ferroptoz oluşumuna indükleyici etki göstermektedir. Ayrıca P53'ün SLC7A11'in ekspresyonunu düşürerek sistem Xc-'yi negatif olarak düzenlediği belirtilmiştir (Jiang, Hickman vd., 2015; Le vd., 2015).

GPX4, ferroptoz oluşumunda kritik bir noktadadır ve lipid peroksitlerin oluşumunu engellemesi özelliği ile ferroptozun ana düzenleyicisidir. GPX4, GSH'yi oksitlenmiş glutatyona (GSSG) dönüşümünü katalizlemektedir ve sitotoksik lipid peroksitleri alkollere indirger. GPX4'ün inhibe edilmesi, ferroptozun bir belirteci olan lipid peroksitlerin birikmesine yol açmaktadır. Negatif düzenlenmiş GPX4 ekspresyonu, hücreleri ferroptoza karşı daha duyarlı yapmaktadır. GPX4 ekspresyonun pozitif düzenlenmesinin ise ferroptozu engellediğini gösterilmiştir (Yang ve Stockwell, 2008; Li vd., 2020).

Voltaja bağlı anyon kanalları (VDAC) iyon ve metabolit taşınmasında görevli düzenleyici transmembran kanallardır. VDAC'ların ferroptoz gelişimde rol oynadığı çalışmalarla gösterilmiştir. Erastin molekülü, VDAC'lerin işlevini bozarak mitokondriyal disfonksiyona yol açmakta ve oksitlerin hücre içine salınarak ferroptozu tetiklemektedir (Skonieczna vd., 2017).

Demir, hayati fonksiyonlar için gerekli bir eser elementtir. Vücuttaki demir dağılımın anormalleşmesi normal fizyolojik süreçleri etkileyebilmektedir. Bağırsaklardan emilim veya eritrositlerin bozunması ile oluşan Fe^{+2}, seruloplazmin proteini tarafından tarafından Fe^{+3}'e oksitlenmektedir. Fe^{+3}, hücre zarı üzerindeki transferrine (TF) bağlanarak TF-Fe^{+3} kompleksini oluşturmaktadır. TF-Fe^{+3} kompleksi endositoz için TF reseptörü 1 (TFR1) proteini aracılığıyla yeni bir kompleks oluşturmaktadır. Ardından Fe^{+3} Transmembran Prostat Epitel Antijeni 3 (STEAP3) proteini tarafından Fe^{+2}'ye indirgenir (Kwon vd., 2015). İndirgenme sonrası Fe^{+2} divalent metal taşıyıcı 1 (DMT1) veya Çinko-Demir düzenleyici protein ailesi 8/14 (ZIP8/14) tarafından substrat olarak kullanılıp ferritin olarak depolanmaktadır (Frazer ve Anderson, 2014; Bogdan vd., 2016). Hücre içindeki fazla Fe^{+2} , ferroportin (FPN) proteini tarafından tarafından Fe^{+3}'e yükseltgenmektedir. Bu yöntemle hücre içi demirin geri dönüşümü ve hücrelerdeki demir homeostazı sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. TFR1'i kodlayan gen olan TFRC'nin susturulması ferroptozu inhibe ettiği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Gao vd., 2015). Ayrıca araştırmacılar ısı şok proteini beta-1'in (HSPB1), TRF1 ekspresyonunu inhibe edilmesinin hücre içi demir konsantrasyonlarını daha da azaltabildiği ve bu nedenle aşırı eksprese edilen HSPB1'in, ferroptozu önemli ölçüde inhibe edebildiği göstermiştir (Gammella vd., 2015; Sun vd., 2015; Li vd., 2020).

2.5.4.2. Ferroptoz ve Akut Böbrek Hasarı (AKI)

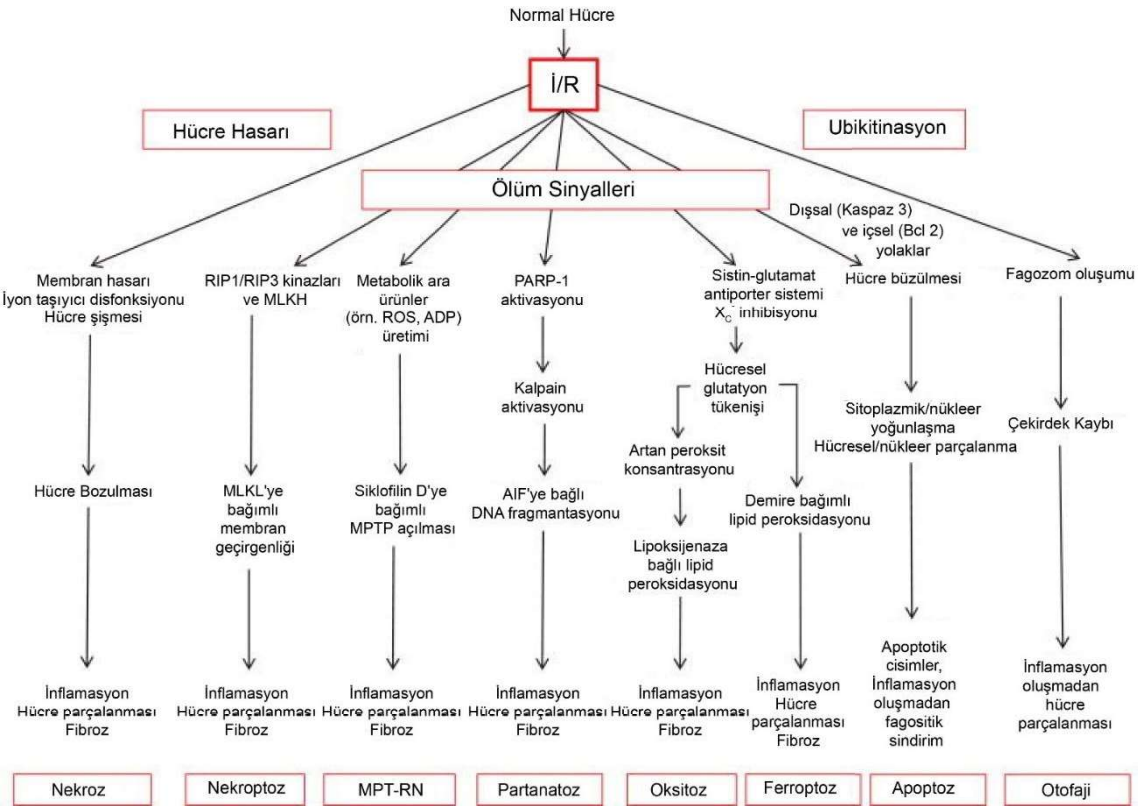
Akut böbrek hasarı (AKI) tedavisinde, ferroptoz oluşumunun engellenmesi iyileşmeyi arttırıcı etki yapmaktadır (Li vd., 2020). 2014 yılında yapılan bir çalışmada GPX4 nakavt farelerde, akut böbrek hasarı (AKI) insidansının arttığı gösterilmiştir (Angeli vd., 2014). Devamında yapılan çalışmalarda ferroptozun akut tübüler nekroz ve iskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarına sebep olduğu belirlenmiş ve bir ferroptoz inhibitörü olan ferrostatinin böbrek hasarına karşı koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (Linkermann vd., 2014). Nefrotoksik folik asitle indüklenen akut böbrek hasarı (AKI) fare modelinde, ferroptozun renal tübüler hücrelerin ana ölüm mekanizması olduğu ve ferroptoz inhibitörü olan ferrostatin-1 (Fer-1) molekülünün uygulamasının böbrek fonksiyonunu anlamlı düzeyde iyileştirebildiği kanıtlanmıştır (Adedoyin vd., 2018).

2.5.4.3. Ferroptoz ve İ/R Yaralanması

Gerçekleştirilen çalışmalarda ferroptoz inhibitörlerinin, İ/R kaynaklı hücre hasarını anlamlı düzeyde engellediği gösterilmiştir. 2015 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada, glutamin metabolizmasının inhibisyonu ile, vahşi tip farelerin kalplerinde İ/R tarafından tetiklenen ferroptoza bağlı doku hasarının engellenebileceği gösterilmiştir (Gao vd., 2015). Ayrıca kardiyomiyopatide ferroptozun inhibe edilmesi miyokardiyal İ/R hasarının şiddetini azalttığı bulunmuştur (Fang vd., 2019).

Liproxstatin-1'in lipid peroksidasyonunu tamamen bloke edebildiğini ve ferroptoz yolağını inhibe ederek İ/R'nin neden olduğu karaciğer hasarını engelleyebildiği bulmuştur (Angeli vd., 2014).

Çizelge 2.4. İskemi/reperfüzyon sürecinde gerçekleşen hücre ölüm türleri (Kalogeris vd., 2016).



2.6. İ/R Hasarı ve Epigenetik Modifikasyonlar

Epigenetik modifikasyonlar, DNA dizisinde bir değişiklik oluşturmadan, genlerin regülasyonun değişmesi ile fenotipik değişikliklere sebep olan değişikliklerdir. Epigenetik modifikasyonlar nesilden nesile aktarılabilen özelliklerdir ve 3 ana mekanizma üzerinden sınıflandırılmaktadır.

A. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu, DNA metil-transferaz enzimi tarafından bir metil grubunun enzimatik olarak gen ekspresyonunu susturan S-adenil metiyonin (SAM) molekülünün, sitozin nükleotitinin 5. Karbonuna transfer edilmesini tanımlamaktadır (Moore vd., 2013). DNA metilasyonu çift yönlü tanımlanmaktadır; metilasyon bir genin ekspresyonunu azaltabilirken, demetilasyon ise gen ekspresyonunu arttırabilir (Muthusamy vd., 2010). İskemi-reperfüzyon hasarı sonucunda DNA metilasyonunun değiştiğini gösteren ilk çalışmalardan biri 2000 yılında Endres vd. tarafından gerçekleştirilmiştir (Endres vd., 2000). Endres vd. beyin iskemisi sonrasında beyinde metillenmiş DNA içeriğinin arttığını göstermiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda ise DNA metiltransferaz enzim seviyesindeki azalmaların, serebral İ/R hasarından koruyucu etki sağladığı gösterilmiştir (Endres vd., 2005).

B. Histon Modifikasyonları

Histonlar, hücrelerde DNA'nın paketlendiği ve genlerin açılıp-kapanmasında görev alan proteinlerdir. Hücre çekirdeğinde bulunan çift iplikli DNA molekülü histon proteinlerden oluşan nükleozom adı verilen kompleks etrafında sarılmaktadır. Histon modifikasyonları, bir kimyasal grubun (asetilasyon, metilasyon, ubikuitinasyon, fosforilasyon, vb.) DNA replikasyonu sonrası histon proteinleri ile herhangi bir kovalent bağlantı olarak tanımlanmaktadır. Bir genin ifade edilebilmesi için transkripsiyonel faktörler için "erişilebilir" olması gerekmektedir. Histon modifikasyonları gen ifadesinde erişilebilirlik için önemli rol oynamaktadır. Histon modifikasyonları, ekspresyonu arttırabilmek için nükleozom yapısını gevşeten veya ekspresyonu engellemek için

DNA’ların histon proteinlerindeki paketlenmesini daha da arttıran 100’den fazla modifikasyonu içermektedir. (Kouzarides, 2007; Marin ve Seli, 2020).

1982 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada kardiyak iskemi sonrasında H3 ve H4 histonlarında belirgin düzeyde azalan histon asetilasyonu gözlemlenmiştir (Taylor ve Young, 1982). Nakavt modellerde yapılan çalışmalarda histon deasetilaz proteinin inhibe edilmesinin iskemi/reperfüzyon hasarına karşı beyin, kalp, karaciğer, akciğer ve retina dokusunda koruyucu etki yaptığı gösterilmiştir (Kim vd., 2007; Granger vd., 2008; Ren vd., 2009; Crosson vd., 2010; Sun vd., 2014; Wu vd., 2015).

2.7. Kodlanmayan RNA’lar

Kodlamayan RNA'lar (ncRNA'lar), proteinleri kodlamayan, bunun yerine hücrelerde düzenleyici roller oynayan RNA molekülü grubudur. Kodlanmayan RNA’ların hastalık patogenezi de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde önemli roller oynadıkları bilinmektedir. Kodlanmayan RNA’lar; uzun kodlanmayan RNA’lar (ncRNA), piwi-etkileşimli RNA’lar (piRNA) ve mikroRNA’ların da (miRNA) yer aldığı RNA türlerini içermektedir. ncRNA’lar genetik imprinting, piRNA’lar proteinleri, miRNA’lar ise mRNA hedefleyerek gen ifadesi regüle etmektedir. Hücreler kodlanmayan RNA’ları hücre dışına salgılayabilmektedir. Bu sayede hücre içi regülasyon görevinin yanında serbest biyobelirteç olarak da kullanımları mümkündür (Kalogeris vd., 2016).

2.7.1. MikroRNA’lar

MiRNA’lar, ortalama 18-22 nükleotit uzunluğunda olan, kodlamayan küçük RNA'lardır. DNA dizisinden birincil miRNA (pri-miRNA) olarak sentezlenmektedir ve ardıdan öncü miRNA'lar (pre-miRNA) ve olgun miRNA'lara dönüştürülmektedir. miRNA’lar genellikle hedef mRNA’nın 3’ UTR bölgesi ile etkileşime girerek gen ekspresyonunu baskılamaktadır (Ha ve Kim, 2014). Aynı zamanda hedef miRNA'ların 5' UTR, kodlama dizisi ve gen promotörleri ile de etkileşime girerek gen ekspresyonunu baskılayabilmektedir (Broughton vd., 2016). miRNA’lar organizmaların gelişimi için yüksek öneme sahiptir ve çeşitli biyolojik süreçlerde düzenleyici rol almaktadır (Fu vd., 2013). miRNA’ların ifade düzeyindeki bozukluklar birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir

(Tüfekci vd., 2014). Hücre içi süreçleri düzenleme rolünün yanında, miRNA'lar ayrıca hücre dışına salgılanmaktadırlar. Hücre dışında tespit edilen miRNA'lar, çeşitli hastalıklar için potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılma potansiyeline sahiptir. miRNA'ların hücre-hücre iletişiminde sinyal molekülü olarak görev aldığı da tespit edilmiştir (Huang, 2017).

2.7.2. mikroRNA'ların Biyogenezi

miRNA'ların sentezinde ilk olarak, pri-miRNA'lar kodlayıcı DNA dizisinden kopyalanmakta ve RNA bağlayıcı protein olan mikroişlemci Kompleksi Alt Birimi (DGCR8) ve bir ribonükleaz III enzimi olan Drosha'dan oluşan mikroişlemci kompleksi tarafından pre-miRNA'lara dönüştürülmektedir (Denli vd., 2004). DGCR8, N6-metiladenilat ile işaretlenmiş GGAC dizisini ve pri-miRNA içindeki diğer farklı motifleri tanırken, Drosha, pri-miRNA'nın kendi içinde katlanması ile oluşan saç tokası yapısı ile ana diziyi birbirinden ayırmaktadır. Pre-miRNA'lar DGCR8/Drosha kompleksi tarafından üretildikten sonra, exportin 5 (XPO5)/RanGTP kompleksi tarafından nükleustan sitoplazmaya taşınırlar. Pre-miRNA'lar sitoplazmada bir RNaz III endonükleaz olan Dicer tarafından çift iplikli RNA yapısından tek iplikli iki farklı RNA dizisine dönüştürülürler. Bu işlem sonucu ortaya çıkan miRNA'nın yönü, olgun miRNA'nın adını belirlemektedir. Olgun tek iplikli miRNA dizisi, ATP'ye bağımlı bir şekilde Argonaute (AGO) protein ailesi üyeleri ile kompleks oluşturmaktadır (Yoda vd., 2010). Hangi dizinin (5p veya 3p) protein ile kompleks oluşturması, 5' uçlarındaki termodinamik stabiliteye bağlıdır. Genel olarak daha düşük 5' stabiliteye veya 5' urasile sahip dizi AGO ile kompleks oluşturmakta ve kılavuz iplik olarak kabul edilmektedir. Komplekse katılmayan dizi, tamamlayıcılık derecesine bağlı olarak çeşitli mekanizmalara katılabilmektedir (Khvorova vd., 2003).

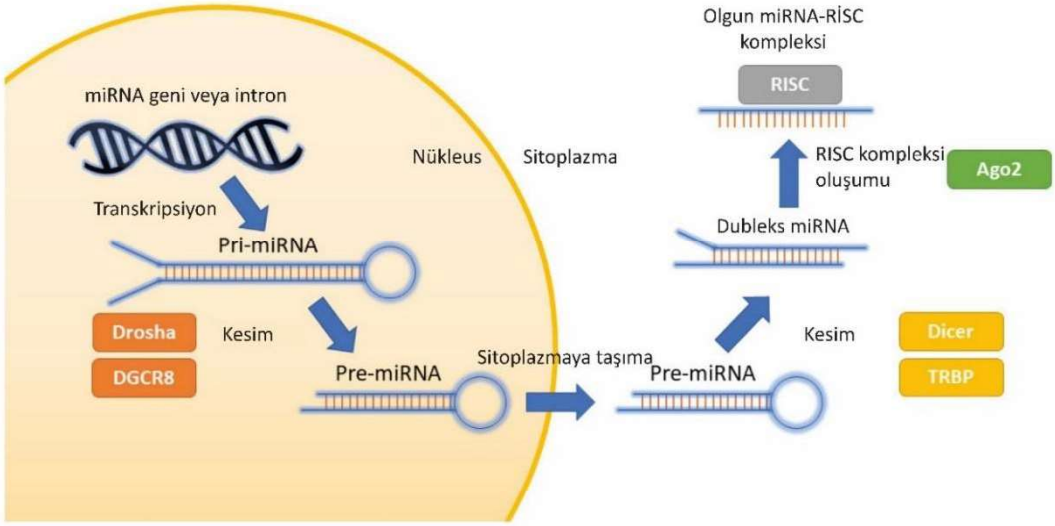
Mevcut çalışmalarda, miRNA'ların mRNA'larının 3' UTR'sinde spesifik dizilere bağlanarak transkripsiyonu baskıladığı gösterilmiştir (Huntzinger ve Izaurralde, 2011). Temel olarak miRNA'lar, mRNA deadenilasyonu ve decapping'ini indükleyerek etki göstermektedir. 5' UTR ve ekzon bölgeleri de dahil olmak üzere diğer mRNA bölgeleri de miRNA'lar için bağlanma bölgesi olabilmektedir (Xu vd., 2014). miRNA'ların 5' UTR ve ekzona bağlanması, gen ekspresyonu üzerinde azaltıcı etkiler gösterirken, promotör bölgesi ile miRNA etkileşiminin transkripsiyonu arttırdığı bildirilmiştir (Zhang vd., 2018; Dharap

vd., 2013).

2.7.3. mikroRNA Kaynaklı Susturma Kompleksi (miRISC)

Minimal miRNA ile indüklenen susturma kompleksi (miRISC), kılavuz miRNA dizisi ve AGO'dan oluşmaktadır (Kawamata ve Tomari 2010). miRISC'nin hedef özgüllüğü, miRNA yanıt elemanları (MRE'ler) olarak sınıflandırılan hedef mRNA üzerindeki spesifik dizilerle miRISC kompleksinin etkileşimine dayanmaktadır. MRE'nin miRNA dizisini tamamlama gücü, hedef mRNA'nın AGO2'ye bağlı kesilmesi veya miRISC aracılı translasyonel inhibisyon ve hedef mRNA bozunmasını sağlamaktadır (Jo vd., 2015).

Hayvan hücrelerinde miRNA-MRE etkileşimlerinin çoğu tam olarak tamamlayıcı değildir. Çoğu MRE'lerin bölgesi, AGO2 endonükleaz aktivitesini engelleyen, genellikle kılavuz miRNA'ların orta bölgesi ile uyumsuz diziler içermektedir. Bu durumda hayvan miRNA'ları hedef bölgeleri ile kısmi bir dubleks oluşturarak, translasyonel baskı ve mRNA destabilizasyonu yoluyla hedef ekspresyonu düzenlemektedir. Bu bağlanma dizisi tohum bölgesi olarak isimlendirilmektedir ve 2-7 nükleotidden oluşmaktadır (Chipman ve Pasquinelli 2019; O'Brien vd., 2018).



Şekil 2.4.MikroRNA biyogenezi (Ciebiera vd., 2020).

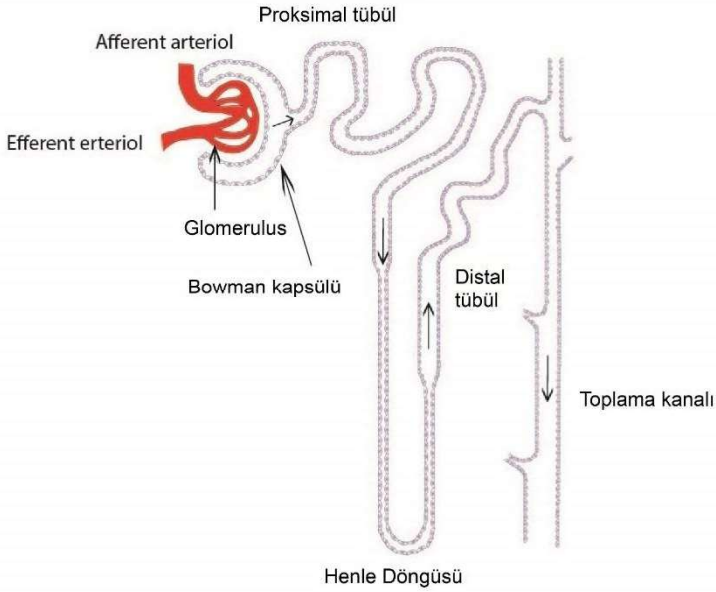
2.8. Böbrek Dokusu

Böbrekler, karnın arka kısmında vertebral kolonun her iki tarafında yer alan çift, fasulye şeklindeki boşaltım organıdır. Sağ böbreğin konumu sol böbrekten daha aşağıda lokalizdedir (Radi, 2019). İki böbreğin ağırlığının vücut ağırlığına oranı %0,51 ila %1,08'idir. Kan akışı ve oksijen tüketimindeki yüksek ihtiyaç, böbrekleri fiziksel ve kimyasal hasara karşı hassas hale getirmektedir (Haschek vd., 2013).

Böbrek, pürüzsüz fibröz bir kapsülle çevrilidir. Renal kapsülü çevreleyen kalın bir perinefrik yağ tabakası böbreği hasara karşı korumaktadır. Böbrek dokusu 4 ana anatomik bölgeye sahiptir: yüzeysel korteks, konik medüller piramitleri olan derin medulla, renal papilla verenal. Medulla dokusu dış medulla ve iç medulla olarak iki alt bölüme ayrılmaktadır. Dış medulla, dış medullanın dış şeridi ve dış medullanın iç şeridi olarak ikiye ayrılmıştır. Dış şerit, proksimal tübülü, distal tübülün düz kısımlarını ve toplama kanallarını içermektedir. İç şerit ise, inen ince uzuvları, çıkan kalın uzuvları ve toplama kanallarını içermektedir. İdrar, böbrekten idrar kesesine üreterler tarafından taşınmaktadır. İdrar kesesi idrarın vücuttan dışarı taşımadan önce idrar için geçici bir depolama bölgesidir.

Nefron; böbreğin hem korteks hem de medulla bölgelerinde bulunan, idrar üreteminde görev alan birimi olarak tanımlanabilir. Nefronlar, tuzun ve suyun geri

emiliminden sorumludurlar. Boşaltım sisteminin regülasyonu metabolizmadaki su, tuz, glikoz, üre ve diğer minerallerin miktarına göre gelişmektedir. Bir insan böbreği yaklaşık 1 milyon nefron içermektedir. Her bir nefron, glomerulus, Bowman kapsülü, proksimal tübül, Henle halkası, distal tübül ve toplayıcı tübüllerden oluşmaktadır. Kapiller filtrasyonla oluşan sıvı, tübüllere girmektedir (Şekil 2.5). Bu sıvı daha sonra böbrek içinde taşınarak idrar olarak tübüllerden ayrılmaktadır (Radi, 2019).



Şekil 2.5. Nefron yapısı (1. Functional Morphology of the Kidneys &Bull; Functions of Cells and Human Body, n.d.).

3. MATERYAL YÖNTEM

Çalışmanın deneysel kısımları Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp ve Cerrahi Araştırma Merkezi (TİCAM) ve Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Hücresel Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışma ESOGÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK) tarafından 860-2/2022 karar numarası ile onaylanmış ve etik kurul raporu Ek Açıklama'da yer almıştır.

3.1.Deney Hayvanları

Deneylerde 3-4 aylık, 250-300 gram ağırlığında, 48 adet erkek albino *Sprauge Dawley* cinsi sıçan kullanıldı. Sıçanlar otomatik ayarlanmış 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık, sabit sıcaklık (22±2°C) ve neme (%45-50) sahip odalarda yaşatıldı. Sıçanlar, deney boyunca şeffaf polikarbonat kafeslerde, standart pelet sıçan yemi ve çeşme suyu ile beslendi.

3.2. Grupların Oluşturulması

Sıçanlar rastgele 6 gruba ayrıldı (n=8). Gruplar ve yapılan uygulamalar Çizelge 3.1.'de belirtilen şekilde gerçekleştirildi.

Çizelge 3.1. Deneysel grupların oluşturulması

Deney grupları	Gruptaki hayvan sayısı
Grup I (Sham grubu, 30 dakika)	8
Grup II (Sham grubu, 45 dakika)	8
Grup III (Sham grubu, 60 dakika)	8
Grup IV (İ/R 30 dakika)	8
Grup V (İ/R 45 dakika)	8
Grup VI (İ/R 60 dakika)	8

3.2.1. Grup I (Sham grubu, 30 dakika)

Bu grup deney hayvanlarına anestezi altında nefrektomi işlemi uygulandı ve 15 gün

boyunca iyileşmeleri beklendi. İyileşme sonrası anestezi altında median laporotomi yapıldı ve renal arter izole edildi. Antitravmatik vasküler klemp takılmadan 30 dakika beklenilerek ameliyat stresi sağlandı. İşlem bitince, tek bireylik polikarbon kafeslere alınarak 24 saat reperfüzyon uygulandı. 24 saat sonunda anestezi altında sakrifiye edilerek diseksiyonlar tamamlandı.

3.2.2. Grup II (Sham grubu, 45 dakika)

Bu grup deney hayvanlarına anestezi altında nefrektomi işlemi uygulandı ve 15 gün boyunca iyileşmeleri beklendi. İyileşme sonrası anestezi altında median laporotomi yapıldı ve renal arter izole edildi. Antitravmatik vasküler klemp takılmadan 45 dakika beklenilerek ameliyat stresi sağlandı. İşlem bitince, tek bireylik polikarbon kafeslere alınarak 24 saat reperfüzyon uygulandı. 24 saat sonunda anestezi altında sakrifiye edilerek diseksiyonlar tamamlandı.

3.2.3. Grup III (Sham grubu, 60 dakika)

Bu grup deney hayvanlarına anestezi altında nefrektomi işlemi uygulandı ve 15 gün boyunca iyileşmeleri beklendi. İyileşme sonrası anestezi altında median laporotomi yapıldı ve renal arter izole edildi. Antitravmatik vasküler klemp takılmadan 60 dakika beklenilerek ameliyat stresi sağlandı. İşlem bitince, tek bireylik polikarbon kafeslere alınarak 24 saat reperfüzyon uygulandı. 24 saat sonunda anestezi altında sakrifiye edilerek diseksiyonlar tamamlandı.

3.2.4. Grup IV (İskemi/reperfüzyon 30 dakika)

Bu grup deney hayvanlarına anestezi altında nefrektomi işlemi uygulandı ve 15 gün boyunca iyileşmeleri beklendi. İyileşme sonrası anestezi altında median laporotomi yapıldı ve renal arter izole edildi. Antitravmatik vasküler klemp takıldı ve 30 dakika beklenilerek ameliyat stresi sağlandı. İşlem bitince, tek bireylik polikarbon kafeslere alınarak 24 saat reperfüzyon uygulandı. 24 saat sonunda anestezi altında sakrifiye edilerek diseksiyonlar tamamlandı

3.2.5. Grup V (İskemi/reperfüzyon 45 dakika)

Bu grup deney hayvanlarına anestezi altında nefrektomi işlemi uygulandı ve 15 gün boyunca iyileşmeleri beklendi. İyileşme sonrası anestezi altında median laporotomi yapıldı ve renal arter izole edildi. Antitravmatik vasküler klemp takıldı ve 45 dakika beklenilerek ameliyat stresi sağlandı. İşlem bitince, tek bireylik polikarbon kafeslere alınarak 24 saat reperfüzyon uygulandı. 24 saat sonunda anestezi altında sakrifiye edilerek diseksiyonlar tamamlandı.

3.2.6. Grup VI (İskemi/reperfüzyon 60 dakika)

Bu grup deney hayvanlarına anestezi altında nefrektomi işlemi uygulandı ve 15 gün boyunca iyileşmeleri beklendi. İyileşme sonrası anestezi altında median laporotomi yapıldı ve renal arter izole edildi. Antitravmatik vasküler klemp takıldı ve 30 dakika beklenilerek ameliyat stresi sağlandı. İşlem bitince, tek bireylik polikarbon kafeslere alınarak 24 saat reperfüzyon uygulandı. 24 saat sonunda anestezi altında sakrifiye edilerek diseksiyonlar tamamlandı.

3.3.Anestezi ve Cerrahi İşlemler

3.3.1. Anestezi İşlemi:

Tüm cerrahi müdahaleler, steril ortamlarda ve steril cerrahi aletler kullanarak gerçekleştirildi. Deney hayvanlarına, intramüsküler olarak, 100 g başına 0.1 cc ketamin (Keta-Control, Doğa İlaç) ve 100 g başına 0.05 cc ksilazin (Rompun %2, Bayer) anestezisi uygulandı. Eğer gerekliyse, sıçanların anestezi seviyesini sabit tutmak için, ketamin/ksilazin (yarı doz) uygulaması tekrarlandı. Ek anestezi dozu uygulanmasında pedal refleks, palpebral refleks ve korneal refleks yanıtları değerlendirildi.

3.3.2. Cerrahi İşlemler

3.3.2.1. Nefrektomi

Deney hayvanlarına, intramüsküler yol ile anestezi uygulandı ve hayvanların sağ böbreğine işlem yapmak için diseksiyon tablasına postürlerine göre sabitlendiler. Cerrahi bölge, %70 etil alkol ile temizlendi ve traşlandı. Küçük bir kesi yapılarak deri ve kaslar açıldı ve böbrek bulundu (Şekil 3.1.). Nefrektomi yapılmak üzere böbrek askıya alındı (Şekil 3.2.). Nefrektomi sonrasında, sıvı kaybını engellemek için karın boşluğuna steril serum fizyolojik verildi ve kas ve deri 2/0 ipek süturla dikilerek kapatıldı. Operasyon tamamlandıktan sonra, hayvanlar steril polikarbon kafeslere konularak post-operatif bakım odasına alındı ve 15 gün iyileşmeleri beklendi (Kar vd., 2019).



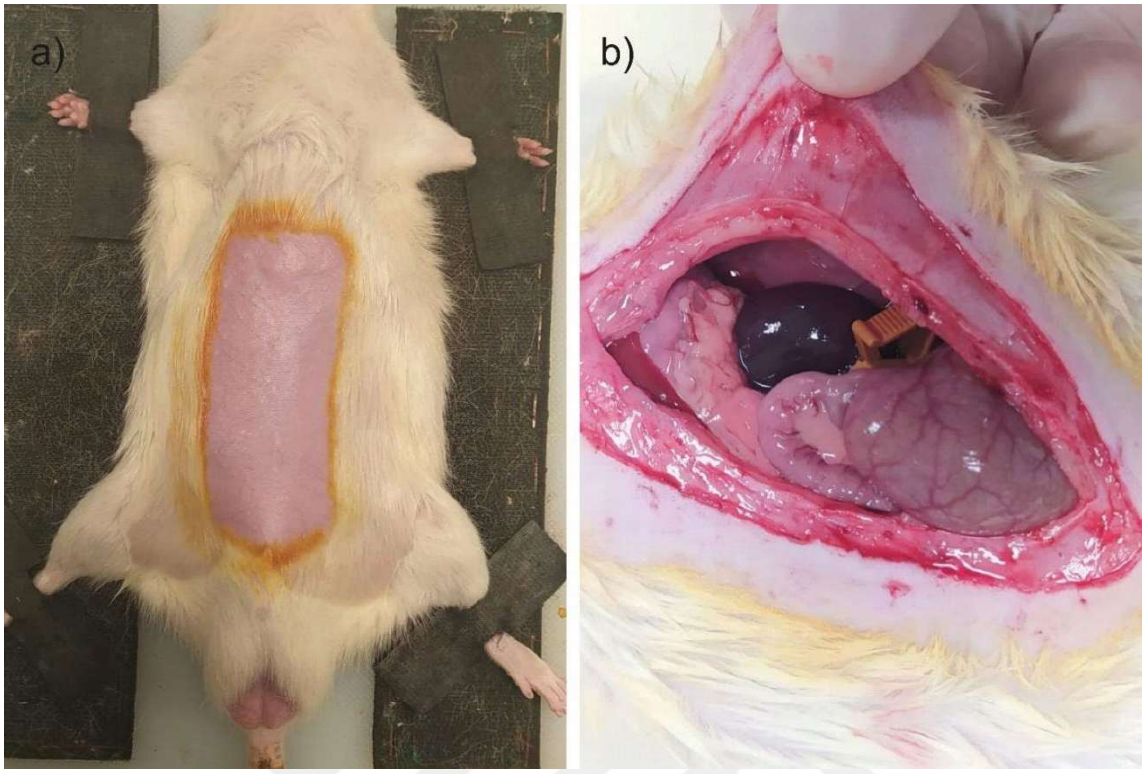
Şekil 3.1. Nefrektomi uygulaması için sağ böbreğin izole edilmesi.



Şekil 3.2. Böbreğin sütur ile boğumlanarak vücuttan ayrılması.

3.3.2.2.İskemi Reperfüzyon İşlemi

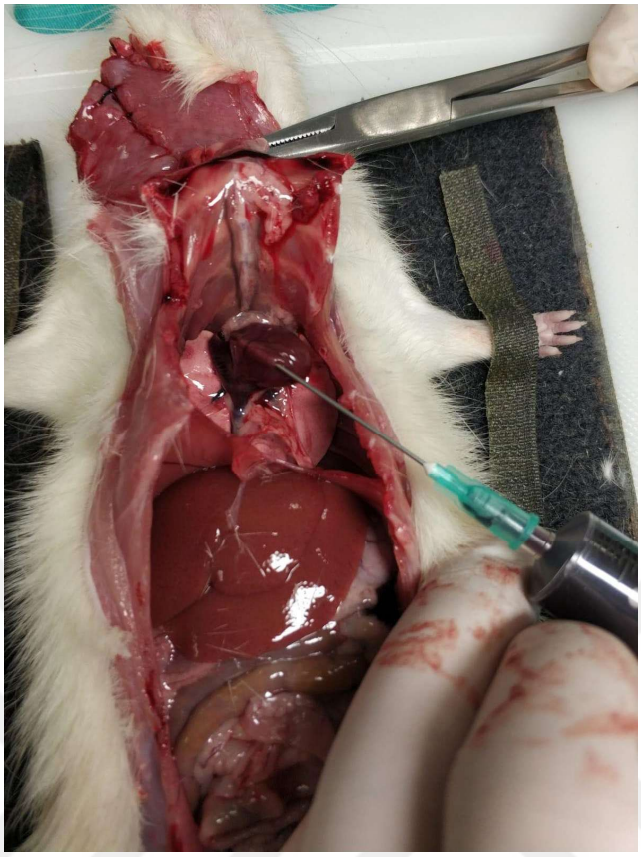
İyileşme sonrası sıçanlara intramüsküler enjeksiyonla anestezi uygulandı ve diseksiyon masasına sırtüstü yerleştirildi. Ameliyat bölgesi %70 etanol ile temizlendi ve traş edildi. Sol renal artere ulaşmak için median laparotomi yapıldı ve Şekil 3.3.'te gösterildiği gibi antitravma vasküler klemp uygulandı. Farklı deney grupları için iskemi süresi 30, 45 ve 60 dakika olarak ayarlandı. İskemi süresi biter bitmez kan akışına izin vermek için klemp çıkarıldı. İskemi sırasında sıvı kaybının neden olduğu hipovolemik etkiyi ortadan kaldırmak için karın boşluğuna steril fizyolojik serum verildi. Kas ve cilt kesi yerini kapatmak için kesi bölgesi 2/0 ipek iplik kullanılarak dikildi. Reperfüzyondan 24 saat sonra hayvanlar anestezi ile sakrifiye edilerek ve diseksiyonları gerçekleştirildi.



Şekil 3.3. a) Cerrahi bölgenin hazırlanması ve sterilize edilmesi. b) Böbrek dokusunda iskeminin gerçekleşmesi.

3.3.2.3. Kan ve Doku Örneklerinin Toplanması

Doku ve kan örnekleri, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezinde, etik kurallar dahilinde, deney hayvanlarından cerrahi operasyon sırasında kalpten letal dozda kan alımı yapılarak ötenazi işlemi (eksanguinasyon) yapılarak elde edildi (şekil 3.4.). Elde edilen serum, plazma ve doku örnekleri analiz yapılana kadar -80°C'de saklandı.



Şekil 3.4. Kalpten letal dozda kan alımı yapılarak ötenazi işleminin yapılması

3.4.Biyokimyasal Analizler

3.4.1. Dokudan ve Serumdan Demir İyon Tayini

Renal İ/R modeli uyguladığımız sıçanların böbrek dokularında gerçekleşen demir iyon konsantrasyon değişimini analiz edebilmek amacıyla demir iyon seviyeleri ölçüldü. Anestezi altında ötenazi işlemi yapılarak alınan kan örnekleri jelli tüpe alınarak 3000 rpm'de, 10 dakika santrifüj (MSE MISTRAL 2000) edilerek serum elde edildi. Çalışmada alınan böbrek dokularının eşit miktarda ve aynı bölgeden almasına dikkat ederek eppendorf tüplere konularak -80°C'lık dondurucuya kaldırıldı. Doku örneklerinin homojenat haline getirilmesi için 2 ayrı tüpe 30-40 mg böbrek dokusu hassas terazide (Sartorius CP224S) tartılarak eppendorf tüplere aktarıldı. Demir tayini yapılacak örneklerin bulunduğu tüpe 1 mL distile su eklenerek homojenizatörde tamamen parçalandı. Tüpler, 10.000 g'de 10 dakika santrifüj (Eppendrof Centrifuge 5810 R) edildi, süpernatant yeni bir tüpe aktarılarak

kullanıma hazır hale getirildi.

Demir iyonu tayini yapmak için ticari kit Elabscience, Ferrous Ion Colorimetric Assay kiti, Katalog no: E-BC-K304-S) kullanıldı. Bu kit, asidik koşullar altında ferrik iyonların taşıyıcı proteinlerden ayrılmasını sağlamakta ve ferro demir iyonlarına dönüştürmektedir. Ardından bipiridin molekülü demir iyonları ile bağlanarak pembe renkli bir kompleks oluşturmaktadır. Örnekler 96 kuyucuklu kültür kabına konularak 520 nm'de spektrofotometrik olarak okundu. Kromojenik solüsyonunun hazırlanması için 1 tüp reaktif 2, 50 mL reaktif 3 içinde çözdürülerek kullanılana kadar +4°C derecede saklandı. 100 mg/L standart çalışma solüsyonun hazırlanması için 1 tüp reaktif 1, 20 mL deiyonize suda çözdürüldü. 2 mg/L stok çözelti için öncesinde hazırlanan standart çalışma solüsyonu, deiyonize su ile 1:49 oranında dilüe edilerek kullanılana kadar +4°C derecede saklandı.

2 mL'lik tüp içerisine 500 µL standart ve örnekler konuldu. Blank (kör) için 500 µL deiyonize su konuldu. Standart, blank ve örneklerin üzerine 1,5 mL kromojenik solüsyon eklendi. Örneklerin bulunduğu tüpler 100°C'taki su banyosunda 5 dakika inkübe edildi. Blank ve standart tüpleri için inkübasyon işlemi uygulanmadı. İnkübasyon sonrası tüpler akan su altında soğutuldu ve 2.300 g'de 10 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası tüpte oluşan süpernatantlar 96 kuyucuklu kültür kabına aktarıldı. Blank ve standartlar da eklendikten sonra spektrofotometrik elisa okuyucuda (BioTek Powerwave XS) 520 nm'de ölçüm yapıldı.

3.4.2. Serumdan Total Antioksidatif Düzey (TAS) Tayini

Serbest radikaller, vücudumuzdaki besinlerin oksijen kullanılarak enerjiye dönüştürülmesi sırasında oluşan metabolik yan ürünlerdir. Serbest radikaller (reaktif oksijen türleri) kararsız haldedir ve kararlı hale gelmek için hücrelere saldırıp zarar verirler. Antioksidanlar, hücreleri hasardan korumak için serbest radikalleri nötralize eder. Serbest radikaller ve antioksidanlar dengede olmalıdır, bu nedenle antioksidanlar serbest radikalleri nötralize eder. Antioksidan düzeyine karşılık serbest radikal düzeyi artarsa oksidatif hasar meydana gelir ve bu duruma oksidatif stres denir.

Serumda oluşan total antioksisan düzeyi Total Antioxidant Status (TAS) ölçümü Rel

Assay Diagnostics marka TAS ölçüm kiti (Katalog no: AK21123A) kullanılarak belirlendi. Absorbans okuması BioTek Powerwave XS marka spektrofotometrik elisa okuyucu cihazında 630 nm'de ölçüdü. Elde edilen veriler, kitin önerdiği formülasyon ile hesaplandı. Sonuçlar mmol/L olarak elde edildi.

3.4.3. Serumdan Total Oksidatif Stres Düzeyi (TOS) Tayini

Serumda Total Oxidant Status (TOS) ölçümü Rel Assay Diagnostics marka TOS ölçüm kiti (Katalog no: AK211360) ile yapıldı. Absorbans okuması BioTek Powerwave XS marka spektrofotometrik elisa okuyucu cihazında 530 nm'de ölçüdü. Elde edilen veriler, kitin önerdiği formülasyon ile hesaplandı. Sonuçlar µmol/L olarak elde edildi.

3.4.4. Dokudan Total Protein Düzeyi Tayini

Dokudan Total Protein düzeylerinin ölçümü Thermo Scientific marka Pierce Coomassie Plus Kiti (Thermo Scientific, Katolog No: 23236) ile yapıldı. Ölçümde dokudan demir tayini için kullanılan doku homojenatları kullanıldı. Absorbans okuması BioTek Powerwave XS marka spektrofotometrik elisa okuyucu cihazında 660 nm'de yapıldı. Veriler 4 parametreli lojistik regresyon kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar µg/mL olarak elde edildi.

3.5. Moleküler Analizler

3.5.1. Total RNA İzolasyonu ve Miktar Tayini

RNA izolasyonu için (A.B.T. RNA İzolasyon Kiti, Katalog no: 102-01-05) ticari kiti kullanıldı. Anestezi altında ötenazi işleminden sonra deney hayvanlarından alınan böbrek dokuları 30-40 mg tartılarak eppendorf tüplere alındı. Örneklerin üzerine 500 µL ekstraksiyon tamponu ve 10 µL 2-merkaptoetanol eklendi ve homojenizatörde tamamen homojenize edildi. Örnekler 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve ardından üzerine 60 µL Buffer P eklendi. Tüplerin üzerine 520 µL fenol eklendi, pipeteaj ile karıştırıldı ve 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından tüplere 150 µL kloroform eklendi ve iyice karıştırıldı. Tüpler +4°C 12.000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant temiz ependorflara alınarak üzerine 900 µL etanol eklendi, pipetaj yapılarak iyice karıştırıldı ve

spin kolonlara aktarıldı. 12.000 g'de 30 saniye santrifüj edildi. Spin kolondaki kirlilikleri uzaklaştırmak amacıyla 700 µL Wash 1 solüsyonu spin kolona eklendi ve 12.000 g'de 30 saniye santrifüj edildi. Ardından 500 µL Wash 2 solüsyonu eklenerek 12.000 g'de 30 saniye santrifüj edildi ve bu basamak iki kez tekrarlandı. Spin kolonlar boş bir şekilde 12.000 g'de 30 saniye santrifüj edildi. Kolonlar santrifüj tüplerine aktarılarak 100 µL elüsyon tamponu eklenerek 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 12.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. İzole edilen RNA'ların miktarı nanodrop (Thermo Scientific NanoDrop 2000, Katalog no: ND2000CLAPTOP) kullanılarak tayin edildi ve komplementer DNA (cDNA) sentezi yapılana dek derin dondurucuda -80°C'de saklandı.

3.5.2. cDNA Sentezi ve RT-qPCR

cDNA sentezi için ticari kit (A.B.T. cDNA Sentez Kiti, Katalog no: C03-01-05) kullanıldı. Her bir örnek için PCR tüplerine Çizelge 3.1.'de belirtilen hacimlerde solüsyonlar eklendi. Her bir örnek için izole edilen RNA'lar 1000 ng/tüp olacak şekilde solüsyonların üzerine eklendi ve total hacim RNase free su ile 20 µL'ye tamamlandı. Tüm örnekler çizelge 3.2.'de belirtilen şekilde inkübasyona tabii tutuldu. cDNA'lar -20°C'de RT-qPCR aşamasına geçene dek saklanıldı.

Çizelge 3.1. cDNA sentezi için kullanılan reaktifler ve hacimleri.

20 µl Ters Transkriptaz Reaksiyonu için	**Hacim**
10X Reaction Buffer	2µL
dNTP mix (2.5 mM each)	1µL
RNase Inhibitor (40 U/µl)	2µL
20X dNTP mix (2.5 mM each)	1µL
Random hexamer (50 µM)	0,5µL
RNase free water	3,5µL

Çizelge 3.2. Ters Transkriptaz Reaksiyon Koşulları.

RT Adımları	**Sıcaklık(°C)**	**Süre**	**Döngü**
Adım 1	25	10dk	1
Adım 2	37	120dk	1
Adım 3	85	5dk	1
Adım 4	4	∞	1

Ferroptozun demir yolağında görev alan NCOA4, SLC39A8 ve SLC40A1 genleri ile ferroptozda düzenleyici rol oynayan GPX4 geninin, renal İ/R hasarı sonrası ekspresyon durumlarını ortaya koymak amacı ile RT-qPCR çalışması yapıldı. Bu çalışma için ticari Real-Time PCR kit, (A.B.T. 2X RT-qPCR SYBR-Green Master Mix, Katalog no: Q03-02-01) kullanıldı. Hedef seçilen genlerin analizleri için referans gen olarak Beta aktin kullanıldı. 96 kuyulu PCR plakasına her bir örnek ve gen için Çizelge 3.3.a da belirtilen hacimlerde bileşenler konuldu. PCR cihazına (Thermo Scientific, Applied Biosystems, StepOne Plus Real-Time PCR, Katalog no: 4376600) plaka yerleştirilerek döngü sıcaklıkları Çizelge 3.3.b'ye göre ayarlandı. Kullanılan genlerin primer dizileri Çizelge 3.3.c'de verilmiştir.

Çizelge 3.3.a) Real Time PCR için kullanılan reaktifler ve hacimleri. b) Real Time PCR için kullanılan döngü parametreleri. c) Genler ve primer dizileri.

a)

RT-qPCR Reaksiyonu	**Hacim**
2X Sybr Green Master Mix	10µL
İleri Primer	0,7µL
Komplement Primer	0,7µL
Rnaz Free Su	6,6µL
cDNA	2µL
Total Hacim	20µL

b)

PCR Basamağı	**Sıcaklık (°C)**	**Süre**	**Döngü**
İlk Denatürasyon	95	5dk	1
Dentürasyon	95	15s	40
Uzama	60	60s	
Melt Curve	65-95	2-5 s/adım	1

c)

NCOA4	F	TTCACGCAGCAGTTTTCGTC
	R	TCCTTGCATCACTGCACCTC
SLC39A8	F	GCTACGTTGGGCTTGCTTTC
	R	AAGGAACATGCCTCCAGCAA
SLC40A1	F	CAGGAAGGATGCTGTGGATCT
	R	CAAGAGGAGGCTGTTTCCGT
GPX4	F	TGAACCTGGACGCCAAAGTC
	R	GGGTTGAAAGGCTCGGGAAT
BETA AKTİN	F	AGCAAGAGAGGCATCCTCACC
	R	ACAGGGATAGCACAGCCTGGA

3.5.3. MikroRNA İzolasyonu ve Miktar Tayini

Anestezi altında ötenazi işleminden sonra deney hayvanlarımızdan aldığımız böbrek doku örneklerindeki seçtiğimiz spesifik miRNA'ların ekspresyon düzeylerini tespit edebilmek için miRNA izolasyon kiti (BioBasic Inc., SanPrep Kolon MicroRNA Kit, Katalog no: SK8811) kullanıldı. Tüm örneklerden 25-50 mg böbrek dokusu tartıldı ve eppendorf tüplere alındı. 1000 µL miRNA ekstraksiyon solüsyonu ve 10 µL 2-merkaptoetanol eklenerek homojenizatörde homojenize edildi. Ardından santrifüj tüplere 25 µL kloroform eklenerek iyice karışması sağlandı. +4°C'de, 12.000 g'de, 10 dakika santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası 700 µL üst faz temiz santrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine 230 µL %100 etanol eklendi ve pipetaj yapıldıktan sonra örnekler Spin kolon TR'lere aktarıldı ve 12.000 g'de 2 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpüne inen 870 µL solüsyon temiz santrifüj tüpüne aktarıldı ve üzerine 600 µL %100 etanol eklenerek pipetaj yapıldı. Ardından Spin kolon MR'lere aktarıldı. Spin kolonlar 12.000 g'de 2 dakika santrifüj edildi. Altta kalan kısım uzaklaştırıldı. Kolonlara 500 µL RPE solüsyonu eklendi ve 12.000 g'de 30 saniye santrifüj edildi, altta kalan kısım uzaklaştırıldı ve bu adım bir kez daha tekrar edildi. Boş kolon 12.000 g'de 30 saniye santrifüj edildi. Spin kolonlar yeni santrifüj tüplerine alınarak üzerlerine 40 µL RNaz free su eklendi ve 12.000 g'de 1 dakika daha santrifüj edildi. İzole edilen miRNA'lar miktar tayini yapılana dek derin dondurucuda -80°C' de saklandı.

İzole edilen miRNA'ların miktar tayini için flurometrik olarak çalışan ve

miRNA'lara spesifik Qubit microRNA Assay Kiti (Katalog no: Q32880) kullanıldı. Ölçüm cihazı olarak Qubit 3 Florometre (İnvitrogen, Katalog no: Q33216) kullanıldı. Standart ve örnekler için ince duvarlı 0,5 mL PCR tüpleri kullanıldı. Qubit microRNA reaktifi, Qubit microRNA tamponunda 1:200 oranında seyreltilerek Qubit çalışma solüsyonu hazırlandı. Standartlar için 190 µL çalışma solüsyonu, 10 µL Qubit standardı eklendi. Örnekler için 198 µL çalışma solüsyonu, 2 µL miRNA eklendi. Tüpler 3-5 saniye vortekslendi ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edilerek Qubit 3 florometre ile ölçümleri yapıldı.

3.5.4. miRNA cDNA sentezi ve RT-qPCR

miRNA'lar 18-24 nükleotitlik yapıları sebebiyle PCR uygulamaları için uygun bir yapıda değildir. Bu sorunu çözmek için spesifik kitler kullanılarak kısa miRNA'lara oligonükleotit kuyrukları eklenilmesi gerekmektedir. Bu amaçla miRNA'lara spesifik bir cDNA sentez kiti (Origene, Katalog no: HP100042) kullanıldı. Bu kitin çalışma prensibi, miRNA'ların 3' ucuna poliA polimeraz ile kuyruk sentezlenmesi, ardından çapa görevi görüp oligo A kuyruğuna bağlanacak ve devamında komplement primer için özel bir dizi içeren bir oligo dT bağlanıp ters transkriptaz enzimi ile cDNA sentezi sağlanmasına dayanmaktadır.

Bu amaçla çizelge 3.4.a'da belirtilen hacimlerde bileşenler PCR tüplerine dağıtıldı. Tüm tüpler 37°C'de 2 saat inkübe edildi. Ardıdan tüm tüplere 1µL "anchor of the oligo dT" bileşeni eklendi ve 70°C'de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüpler buz üstünde 2 dakika inkübe edildi ve tüp içerisindeki solüsyonların üzerine çizelge 3.4.b'de belirtilen bileşenler eklendi. Tüm tüpler 42°C'de 1 saat, ardından 95°C'de 5 dakika inkübe edilerek miRNA'dan cDNA sentez aşaması tamamlandı. Real Time PCR basamağına geçilene kadar tüm cDNA örnekleri -20°C'de saklandı. miRNA Real Time PCR reaksiyonunda kullanılan primerler Çizelge 3.4.c'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. a) miRNA poli A kuyruğu sentezi için bileşenler ve hacimleri. b) miRNA cDNA sentezi için bileşenler ve hacimleri. c) miRNA Real Time PCR reaksiyonunda kullanılan primerler.

a)

Bileşen	**Hacim**
Total RNA	1 ila 2µg
10X poly A tailing Buffer	1 µl
10 mM ATP	1 µl
5 µ/µl Poly (A) polymerase	1 µl
H2O	10µl'ye tamamlanır

b)

Bileşen	**Hacim**
MMLV buffer	4 µl
H2O	5 µl
MMLV	1 µl

c)

rno-miR-106b-5p	F	TAAAGTGCTGACAGTGCAG
rno-miR-105	F	CAAGTGCTCAGATGTCTGTG
rno-miR-879-5p	F	AGAGGCTTATAGCTCTAAGC
rno-miR-6332	F	CGCAGGGACTGCAAGGAGC
rno-miR-1839-5p	F	AAGGTAGATAGAACAGGTCT
rno-miR-409b	F	AGGGGTTCACCGAGCAACA
5'S rRNA	F	TCTGATCTCGGAAGCTAAGC
miRNA Reverse Primer	R	GAACATGTCTGCGTATCTC

Renal İ/R hasarı ile indüklendiğini düşündüğümüz ferroptoz demir yolağı ile ilişkili seçilen miRNA'ların ekspresyon profili için RT-qPCR kullanıldı. Referans olarak 5'S rRNA kullanıldı. Real Time PCR reaksiyonun gerçekleştirilebilmesi için ticari BlasTaq 2X MasterMix (Applied Biological Materials Inc., BlasTaq 2X MasterMix, Katalog no: G891) kullanıldı. 96 kuyucuklu PCR plakasına çizelge 3.5.a'da belirtilen hacimlerde bileşenler dağıtıldı ve çizelge 3.5.b'de belirtilen PCR kondisyonlarında real time PCR reaksiyonu gerçekleştirildi.

Çizelge 3.5. a) miRNA'lar için Real Time PCR için kullanılan reaktifler ve hacimleri. b) miRNA'lar için Real Time PCR için kullanılan döngü parametreleri

a)

RT-qPCR Reaksiyonu	**Hacim**
2X BlasTaq 2X MasterMix	10µL
İleri Primer	0,7µL
Komplement Primer	0,7µL
Rnaz Free Su	6,6µL
miRNA cDNA	2µL
Total Hacim	20µL

b)

PCR Basamağı	**Sıcaklık (°C)**	**Süre**	**Döngü**
İlk Denatürasyon	95	5dk	1
Dentürasyon	95	15s	40
Uzama	60	60s	
Melt Curve	65-95	2-5 s/adım	1

3.6. MikroRNA'lar Ferroptozla İlişkisinin Hesaplamalı Olarak Değerlendirilmesi

TargetScan, miRNA'nın tohum bölgesiyle eşleşen korunmuş 8mer, 7mer ve 6mer bölgelerinin varlığını arayarak miRNA'ların biyolojik hedeflerini tahmin etmektedir. TargetScan ile tahminler evrişimli bir sinir ağı kullanılarak tüm miRNA dizilerine uzatılan miRNA aracılı baskının biyokimyasal modeli kullanılarak hesaplanan hedeflemenin tahmin edilen etkinliğine göre sıralanmaktadır (McGeary vd., 2019). Ferroptozun demir yolağında aktif olan genlerin mRNA'larını hedefleyen miRNA'lar, TargetScan ile belirlendi. Seçilen miRNA'ların ediciler termodinamik, evrimsel, olasılıksal veya diziye dayalı mRNA hedeflemeleri miRmap yazılımı kullanılarak 0 ila 100 arasında skorlandı (Vejnar ve Zdobnov, 2012). 85 ve üstü puan alan miRNA'lar literatür taraması için aday belirlendi. Seçilen miRNA'ların literatürde ilişkilendirildiği hastalıklar, hedef mRNA'ları ilgili yayınları sınıflandıran RNADisease 4.0 veri tabanında özgüllükleri bakımından değerlendirildi (Chen vd., 2023). Aday miRNA'lar arasından renal iskemi reperfüzyon modelinde gösterilmemiş fakat iskemi reperfüzyon modellerinde veya ferroptozla ilişkilendirilmiş miRNA'lar çalışma için seçildi.

3.7.İstatiksel Analizler

Elde edilen veriler GraphPad Prism 8.0 programı kullanılarak analiz edilmiştir. Demir tayini için grafikler 30 sham grubuna göre kat artışı şeklinde sunulmuştur. mRNA ve miRNA ekspresyon düzeyleri için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri hesaplanmıştır. Tüm verilerin normalliği Shapiro-Wilk testi uygulanarak kontrol edilmiştir. Veriler One-Way ANOVA yöntemleriyle istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Post-Hoc analiz için Tukey testi kullanılmıştır. Tüm istatistik uygulamalar sonucunda sayısal olarak ortaya çıkan değerler karşılaştırılarak gruplar arasındaki farklar *$p < 0,05$; **$p<0,01$; ***$p<0,001$ düzeylerinde anlamlı olarak kabul edilmiştir.

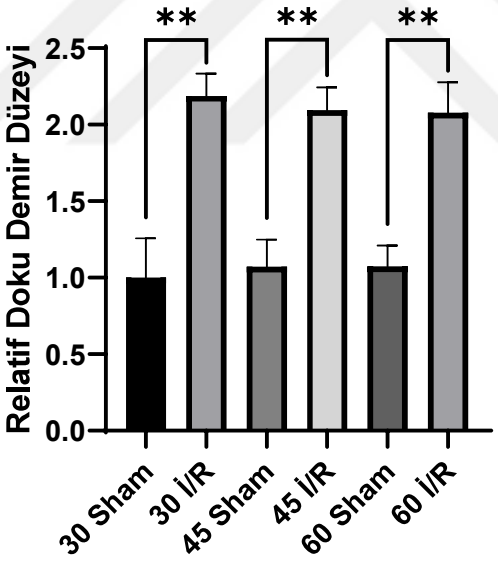
4.BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Biyokimyasal Analizler

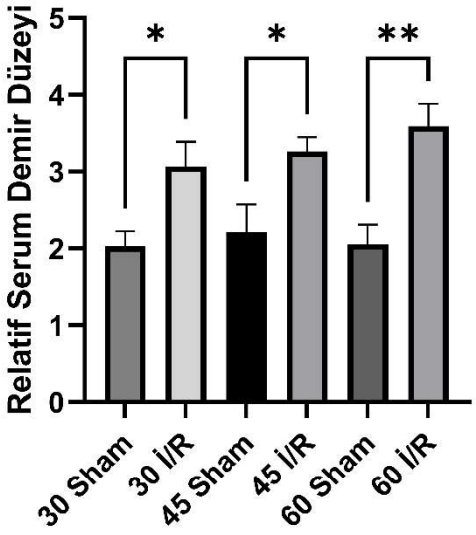
4.1.1. Demir Düzeyi Tayini

Çalışmamızda üç farklı iskemi süresine bağlı olarak gelişen, İ/R hasarı ile değişen demir konsantrasyonu, doku ve serum düzeyinde araştırılmıştır. Veriler total protein miktarı ile normalize edilmiştir. Veriler ortalama ± standart hata (SEM) olarak sunulmuştur. Her bir deney grubu için 7 deney hayvanından elde edilen veriler kullanılmıştır.

a)



b)



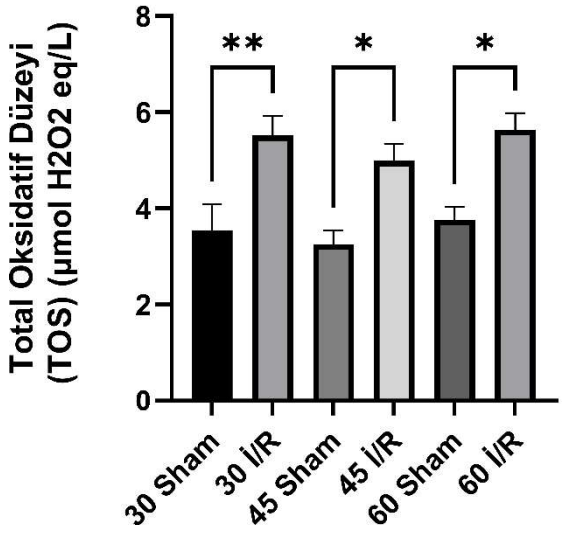
Şekil 4.1.a) Farklı iskemik sürelere maruz kalan sıçan böbrek dokularının demir düzeyleri. b) Farklı iskemik sürelere maruz kalan sıçan serum örneklerinin demir düzeyleri (*p<0,05; **p <0,01).

Demir seviyelerindeki değişiklik özellikle ferroptoz gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Çalışmamızda ilk defa 3 farklı zaman dilimi içeren renal İ/R modelinde hem serum hem de renal doku düzeyindeki demir miktarındaki değişim incelenmiştir. Çalışmamızda İ/R grupları ile sham grupları karşılaştırıldığında böbrek dokusu ve serumlarından yaptığımız demir tayini analizi sonucunda demir seviyelerinde anlamlı düzeyde bir artış görülmüştür (*p<0,05; **p<0,01). İskemi grupları zamansal olarak karşılaştırıldığında istatiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlemlenmedi (p>0,05) (Şekil 4.1). Elde edilen bulgular, demirin İ/R hasarındaki rolünü araştıran çalışmaların bulguları ile tutarlıdır. Önceden yapılan bir çalışmada, yüksek demir yükü olan farelerin İ/R hasarı sonrası sham grubuna göre daha fazla böbrek hasarına sahip olduğunu bulmuştur (Chen vd., 2016). Başka bir çalışma, demir şelasyon tedavisinin sıçanlarda İ/R hasarına karşı koruma sağlayabileceğini gösterilmiştir (Li vd., 2017). Bu bulgular aşırı demir yükünün iskemi-reperfüzyon hasarının önlenmesi ve tedavisi için bir hedef olabileceğini göstermektedir. Ayrıca reperfüzyon süresinin değişmesinin serum ve doku düzeyinde demir miktarını

değiştirildiği gösterilmiştir (Tao vd., 2022). Daha önce yapılan renal iskemi reperfüzyon çalışmalarında da bulgularımızla benzer şekilde böbrek dokusu ve serum düzeyinde sham gruplarına göre anlamlı artış görülmüştür. Fakat daha önceki çalışmalarda farklı iskemik sürelerdeki, doku ve serum düzeyindeki değişiklikler araştırılmamıştır. Bu nedenle çalışmamız farklı iskemik sürelerdeki demir düzeyindeki değişiklikleri göstermektedir.

4.1.2. Total Oksidatif Düzey (TOS) Tayini

Çalışmamızda üç farklı iskemi süresine bağlı olarak gelişen, renal İ/R hasarı ile serumda değişen total oksidatif düzeyinin tespiti araştırılmıştır. Yapılan analiz sonuçlarına göre serum total oksidatif düzeyinin, İ/R gruplarında sham gruplarına göre anlamlı bir artış gösterdiği gözlenmiştir (Çizelge 4.2) (*$p<0,05$; **$p<0,01$). Bununla birlikte İ/R grupları birbiri ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$). İ/R gruplarında toplam oksidatif düzey seviyedeki artışın, İ/R sırasında artan reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminden kaynaklandığı düşünülmektedir (Nie vd., 2021). ROS, hücrelere ve dokulara zarar verebilen oldukça reaktif moleküllerdir. Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından üretilirler, ancak İ/R sürecinde hücre ve dokular tarafından üretimi artmaktadır. Bu artış, iskemi sırasında oksijen eksikliği; reperfüzyon sırasında inflamatuar mediatörlerin salınması ve nötrofillerin aktivasyonu dahil olmak üzere birçok etken tarafından tetiklenmektedir. TOS ve TAS, bir dokudaki toplam ROS miktarının bir ölçüsüdür. Daha önce yapılan çalışmalarda serum düzeyindeki artan TOS miktarının ferroptotik hücre ölümü ile bağlantılı olduğu belirtilmiştir (Kar vd., 2023). Özellikle artan TOS ve düşen TAS düzeyinin mitokondriye zarar verdiği için ROS hasarını arttırdığı ve bu yolla başta ferroptoz olmak üzere hücre ölüm mekanizmalarını tetiklediği gösterilmiştir (Huang vd., 2022).

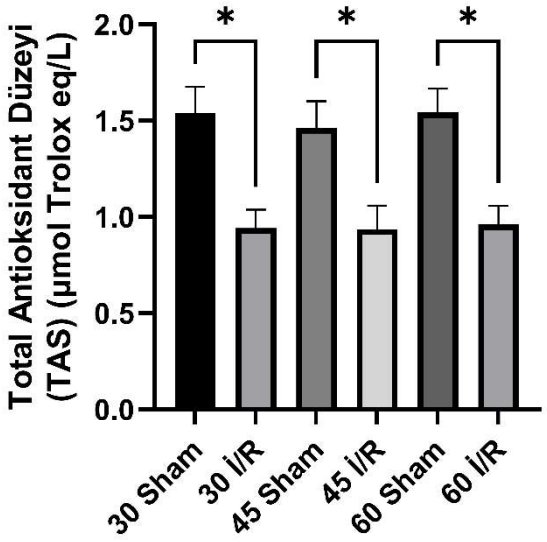


Şekil 4.2. Farklı iskemik sürelere maruz kalan sıçan serum örneklerinin TOS düzeyleri (*p<0,05; **p<0,01).

4.1.3. Total Antioksidatif Düzey (TAS) Tayini

Çalışmamızda üç farklı iskemi süresine bağlı olarak gelişen, renal İ/R hasarı ile değişen total antioksidatif düzeyinin analizi yapılmıştır. Serumdan yaptığımız analiz sonucunda, çizelge 4.3'te serum antioksidatif düzey seviyesinde, İ/R gruplarında sham gruplarına oranla istatiksel olarak anlamlı bir azalış tespit edilmiştir (*p<0,05). Fakat İ/R grupları kendi içinde kıyaslandığında anlamlı bir farklılık oluşmadığını gözlenmiştir (p>0,05). İ/R sırasında artan ROS düzeyi, vücudun antioksidan savunmasını baskılayarak oksidatif strese yol açmaktadır. Oksidatif stres, hücrelere ve dokulara zarar verebilmektedir ve bu durum kalp hastalığı, felç ve kanser dahil olmak üzere bir dizi hastalıkla ilişkilendirilmiştir. İ/R gruplarında TAS düzeyindeki azalma önceki çalışmalarda bildirilen veriler ile benzerlik göstermektedir (Huang vd., 2022). Kalpte İ/R yaralanması olan sıçanlarda yapılan bir çalışmada, TAS düzeyinin reperfüzyondan 24 saat sonra önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur (Lucchesi, 2000). Sıçanlarda yapılan başka bir çalışmada ise, beyinde İ/R koşullarında TAS düzeyinin reperfüzyondan 72 saat sonra önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir (Pillai vd., 2009). Bu nedenle dokuda oksidatif hasar oluştuğu ve modelin başarı ile uygulandığı düşünülmektedir. Çalışmamızdan elde edilen bulgular ile

daha önceki çalışmaların bulguları ile birbirini desteklemektedir.



Şekil 4.3. Farklı iskemik sürelere maruz kalan sıçan serum örneklerinin TOS düzeyleri. Veriler ortalama ± standart hata (SEM) olarak sunulmuştur (*p<0,05; **p <0,01).

4.2.Moleküler Analizler

4.2.1. SLC40A1, NCOA4, SLC39A8 ve GPX4 Ekspresyon Düzeyleri

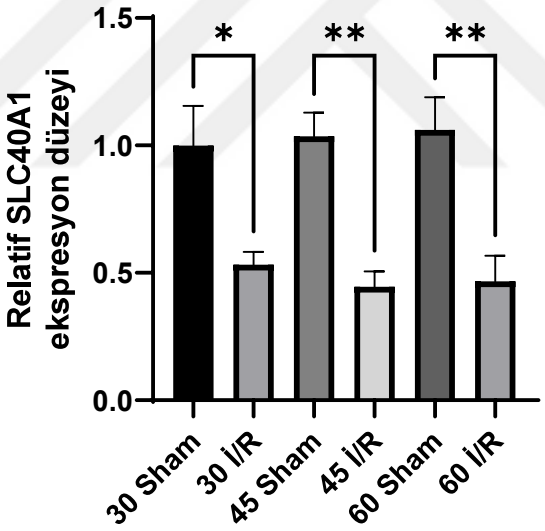
SLC40A1, SLC39A8 ve NCOA4 genleri ferroptoz demir yolağında bulunan ve gelişiminde rol oynayan genlerdir. SLC40A1 geni ferroptozda rol oynayan bir membran proteinidir (Tang vd., 2020). Bu protein birincil olarak proksimal tübülde ve medüller renal tübülünde kısmen yer almaktadır. SLC40A1, demirin hücrelere taşınması için önemli bir proteindir. Demir gerekli bir besindir, ancak yüksek seviyelerde toksik de olabilir. SLC40A1 ekspresyonu azaldığında hücre içindeki demir dışarıya taşınamaz (Donovan vd., 2005). Bunun nedeni, azalan SLC40A1 proteini miktarı ile hücre dışına daha az demir taşınmasıdır. Hücrenin içinde biriken fazla demir hücrelere zarar verebilecek ve hücre ölümüne yol açabilecek serbest radikaller oluşturmak için oksijenle reaksiyona girebilme kapasitesine sahiptir. Bu nedenle SLC40A1 ekspresyonu azaldığında, hücreler ferroptoza daha duyarlı hale gelmektedir (Hao vd., 2021).

Bundan önce yapılan çalışmalarda farklı İ/R modellerinde SLC40A1 ekspresyonun azaldığı bildirilmektedir. Önceden yapılan bir çalışmada kalp İ/R modelinde NRF2/FPN1 yolağı incelenmiş ve SLC40A1 geninin ekspresyonun düştüğü belirtilmiştir (Tian vd., 2021). Başka bir çalışmada renal İ/R modelinde demir metabolizması incelenmiş ve SLC40A1 geninin ekspresyon seviyesinin azaldığı gözlenmiştir (Xie vd., 2017) Çalışmamızda SLC40A1 geninin ekspresyonunun anlamlı düzeyde azaldığını ve bu durumun önceki çalışmalarla benzer olduğunu gözlemlenmiştir. Çalışmamızda 30, 45 ve 60 dk'lık iskemik gruplar arasında SLC40A1 ekspresyon düzeyinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.4.). 2016 yılında yayınlanan bir çalışmada araştırmacılar, İ/R hasarına maruz kalan sıçanların, sham grubundaki sıçanlara kıyasla böbreklerinde SLC40A1 ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığını gösterilmiştir. Araştırmacılar ayrıca, azalmış SLC40A1 ekspresyonu olan farelerin daha ciddi böbrek hasarına sahip olduğunu bulmuşlardır (Chen vd., 2016).

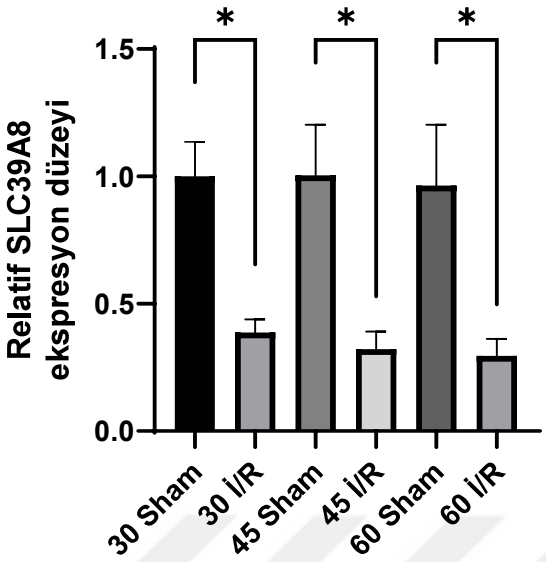
SLC39A8; gelişim, doku homeostazı ve bağışıklık sistemi için önemli; iki değerlilikli metal katyonlar olan çinko, manganez ve demirin hücreden uzaklaştırılmasını sağlayan plazma zarı proteinidir. Bu iyonlar hücreler için gerekli elementlerdir, ancak hücre içinde yüksek seviyelerde birikmeleri toksik etkilere neden olmaktadır. SLC39A8 geninin ifadesi azaldığında, hücrelerde daha fazla katyonlar biriktirebilir ve hücrelere zarar verebilecek ve hücre ölümüne yol açabilecek serbest radikaller oluşturmak için oksijenle reaksiyona girebilir. Önceki çalışmalarda oluşturulan iskemi reperfüzyon modellerinde SLC39A8 geni ile ilişkili az miktarda çalışma olmakla birlikte, mevcut çalışmalarda SLC39A8 İ/R hasarında geninin ekspresyonun azaldığı bildirilmiştir (Dvoriantchikova vd., 2022). Çalışmamızda 30, 45 ve 60 dk'lık İ/R gruplarında sham gruplarına göre anlamlı düzeyde azalış gözlemlenmiştir ($*p<0,05$) (Şekil 4.5.). Fakat iskemi grupları birbiri ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde bir değişiklik gözlemlenmemiştir.

NCOA4, demir metabolizması ve ferroptoz ile ilgili olanlar da dahil olmak üzere çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenleyen bir transkripsiyonel koaktivatördür. NCOA4 ekspresyonu arttığında, demir metabolizmasını ve ferroptozu tetikleyen genlerin ekspresyonunda artışa neden olmaktadır. Bu durum, hücreleri iskemi-reperfüzyon hasarına yol açabilen ROS hasarına karşı daha duyarlı hale getirmektedir (Chen vd., 2020). 2020'de yayınlanan bir çalışmada, renal İ/R hasarına maruz kalan sıçanların, sham grubuna kıyasla

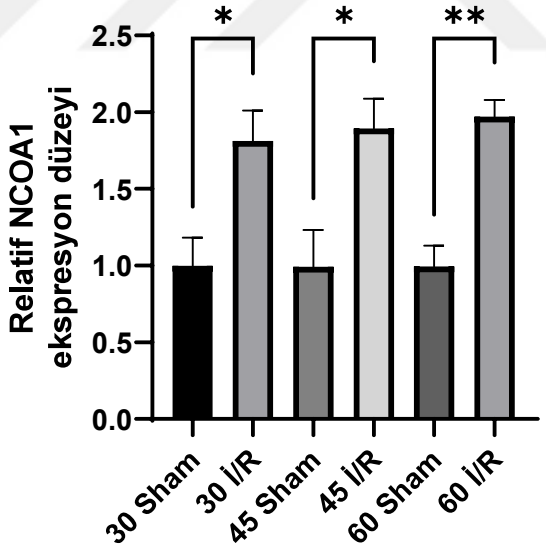
NCOA4 ekspresyonunu önemli ölçüde artırdığını gözlenmiştir. Aynı çalışmada, artan NCOA4 ekspresyonu olan sıçanlarda ciddi böbrek hasarına sahip olduğunu gösterilmiştir (Chen vd., 2020). 2021'de yayınlanan başka bir çalışmada ise, NCOA4 ekspresyonunun arttırılmasının hücrelerin ferroptoza daha yatkın hale getirdiği keşfedilmiştir. Araştırmacıların H9c2 hücre hattında gerçekleştirdiği in-vitro çalışmada, siRNA ile NCOA4 ifadesi susturulan hücrelerin demir ve ROS seviyelerinin azaldığını ve hücre ölüm oranın düştüğünü gözlemlemiştir (Li vd., 2021). Fare serebral İ/R modelinin incelendiği bir çalışmada NCOA4 ifadesinin arttığı gözlenmiştir. Ayrıca artan NCOA4 ifadesinin hücre ölümünü şiddetlendirdiği gösterilmiştir (Li vd., 2023). Çalışmamızda iskemi reperfüzyon modelinde NCOA4 geninin ekspresyonun istatiksel olarak arttığı gözlenmiştir (*p<0,05; **p<0,01). Bununla beraber iskemi süresindeki değişikliklerin ekspresyon düzeyinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığını gözlemledik (p>0,05) (Şekil 4.6.).



Şekil 4.4. Farklı iskemik sürelere maruz kalan sıçan böbrek dokusundaki SLC40A1 mRNA ekspresyonu. Veriler ortalama ± standart hata (SEM) olarak sunulmuştur. (*p<0,05; **p<0,01)

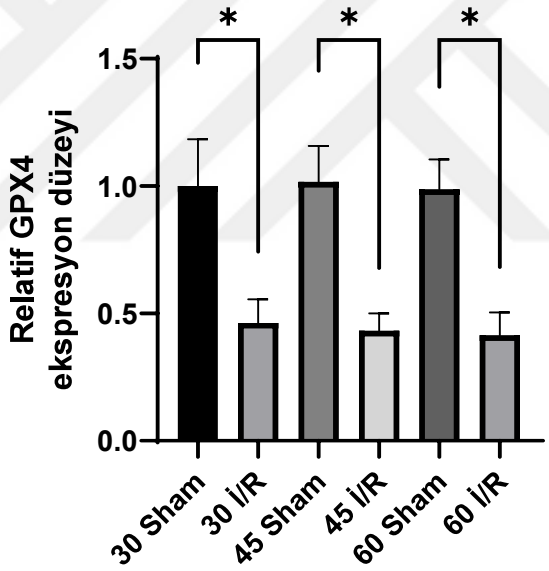


Şekil 4.5. Farklı iskemik sürelere maruz kalan sıçan böbrek dokusundaki SLC38A9 mRNA ekspresyonu. Veriler ortalama ± standart hata (SEM) olarak sunulmuştur. (*p<0.05)



Şekil 4.6. Farklı iskemik sürelere maruz kalan sıçan böbrek dokusundaki NCOA4 mRNA ekspresyonu. Veriler ortalama ± standart hata (SEM) olarak sunulmuştur. (*p<0,05; **p<0,01)

GPX4, lipid hidroperoksitleri toksik olmayan lipid alkollere dönüştürerek hücrelerin ferroptozdan korunmasında rol oynamaktadır. Şekil 4.7.'de GPX4 ekspresyonu 30, 45 ve 60 dakikalık İ/R gruplarında sham gruplarına göre anlamlı düzeyde azalış göstermiştir (*p<0.05). GPX4 ekspresyon seviyesindeki azalış İ/R hasarının incelendiği önceki çalışmalar ile benzerlik göstermektedir. Önceki çalışmalarda renal İ/R modelinde GPX4 ekspresyon düzeyinin düştüğü belirtilmektedir (Jiang vd., 2020; Ding vd., 2020). Yapılan bir çalışmada 2-mercaptoethanol'ün GPX4 ekspresyon düzeyini arttırarak hücreleri reperfüzyon hasarından koruduğu gösterilmiştir (Moon vd., 2022). GPX4 geninin ifadesinde gözlenen azalış, renal dokuda ferroptoz baskılayıcı mekanizmanın inhibe olduğunu göstermektedir (Ding vd., 2020).



Şekil 4.7. Farklı iskemik sürelere maruz kalan sıçan böbrek dokusundaki GPX4 mRNA ekspresyonu. Veriler ortalama ± standart hata (SEM) olarak sunulmuştur. (*p<0,05)

4.2.2. rno-miR-105 Ekspresyon Düzeyi

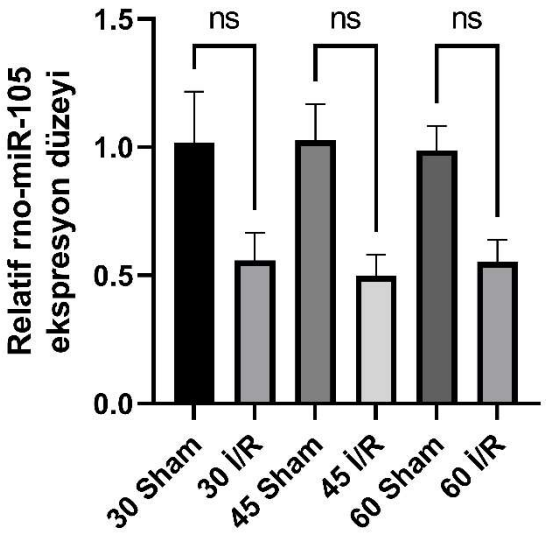
Çalışmamızda ilk defa renal İ/R hasarıyla değişen SLC40A1 ile ilişkili rno-miR-105'in ekspresyon değişimi farklı iskemi sürelerine bağlı olarak araştırılmıştır. Şekil 4.8.a'da SLC40A1 ile rno-miR-105'in etkileşimi gösterilmektedir. Tüm iskemi gruplarında gözle görülür düzeyde rno-miR-105 ekspresyonunda azalış görülmekle birlikte, bu azalışın istatiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığını gözlemledik. Literatürde mir-105 kardiyak

iskemi reperfüzyon hasarı ile ilişkilendirilmiş ve kardiyak İ/R modelinde anlamlı düzeyde mir-105 ekspresyonun azaldığı bildirilmiştir. H9c2 hücre hattının kullanıldığı in-vitro modelde, artan mir-105 ekspresyonun ise, hücreleri İ/R hasarına karşı koruduğu gözlenmiştir (Shin vd., 2019). Fakat çalışmamızda renal doku için iskemi reperfüzyon modelinde mir-105'in ekspresyonun azaldığını görmekle birlikte, bu azalışın istatiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlenmiştir. Çalışmamamızda farklı iskemik sürelerde, böbrek dokusunda rno-miR-105 ekspresyon düzeyinde anlamlı bir değişiklik gözlemlenmiştir ($p>0,05$). Deney sonuçlarımızda gözlemlediğimizrno-miR-105 ekspresyon düzeyindeki azalmanın SLC40A1 geninin transkripsiyon düzeyinde anlamlı bir değişikliğe sebep olamayacak düzeyde olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.8).

a)

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)
Position 1107-1113 of SLC40A1 3' UTR	5' ...CCAUGCGUUGCUAGGAGCACUUU...
rno-miR-105	3' UGGUGUCUGUAGACUCGUGAAC

b)



Şekil 4.8. a) rno-miR-105 ile SCL40A1 mRNA'sının etkileşim tahmini. Tahmin yazılımı olarak TargetScan kullanılmıştır (McGeary vd., 2019). b) Farklı iskemik sürelere maruz kalan sıçan böbrek dokusundaki rno-miR-105 ekspresyonu. Veriler ortalama ± standart hata (SEM) olarak sunulmuştur.

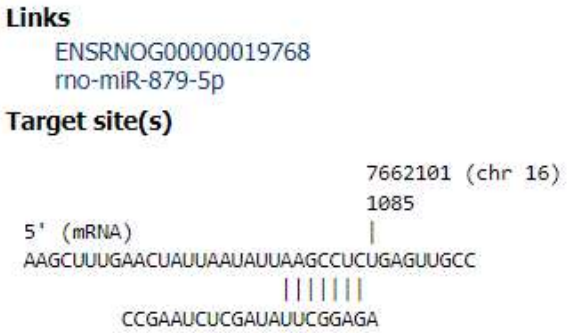
4.2.3. rno-miR879-5p Ekspresyon Düzeyi

Çalışmamızda renal İ/R hasarıyla değişen NCOA4 ile ilişkili rno-miR-879-5p'nin ekspresyon değişimi farklı iskemi sürelerine bağlı olarak araştırılmıştır. Çizelge 4.9'da rno-miR-879-5p'nin ekspresyon düzeyinin, tüm İ/R gruplarında sham gruplarına göre anlamlı düzeyde azaldığı göstermiştir (*p<0,05).

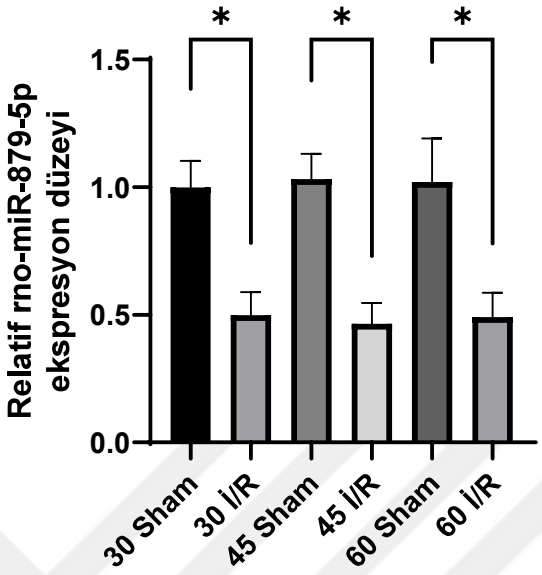
RNADisease 4.0 ile yapılan literatür taramasında diyabet, epilepsi ve serebral arter enfarktüsünün araştırıldığı çalışmalarda rno-miR879-5p'in ekspresyonunun değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Chen vd., 2023). İnsanlarda diyabetik nefropati'nin incelendiği bir çalışmada, renal dokuda miR879-5p'in ekspresyon düzeyinin azaldığı gösterilmiştir (Zhao

vd., 2021). 2022 yılında gerçekleştirilen ve sıçanlarda epilepsi modelinin incelendiği bir çalışmada miR879-5p'in ekspresyon düzeyinin beyin dokusunda arttığı belirlenmiştir (Li vd., 2022) Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada beyin iskemi modelinde miR879-5p ekspresyonunun azaldığı belirlenmiştir. Bu amaçla farelere anestezi altında 90 dk boyunca nitrojen-oksijen gazı karışımı (%8 O_2 + %92 N_2) uygulanmıştır (Cui ve Yang, 2013). 2021 yılında yapılan bir çalışmada, diyabet modelinde rno-miR-879-5p'in ekspresyonun böbrek dokusunda azaldığı bildirilmiştir (Zhao vd., 2021). Deney sonuçlarımız rno-miR-879-5p ekspresyon düzeyinin İ/R hasarında değiştiğini göstermektedir (Şekil 4.9.). miRNA-mRNA etkileşimi in-slico olarak incelendiğinde rno-miR-879-5p NCOA4 mRNA'sı ile yüksek etkileşim göstermektedir. Çalışmamızda renal İ/R modelinde rno-miR-879-5p ekspresyonundaki anlamlı azalışın, NCOA4 mRNA'nı üzerindeki ekspresyon baskılayıcı miRNA mekanizmanın etkisini azaldığını düşünmekteyiz. Çalışmamızdan elde edilen veriler doğrultusunda NCOA4 ekspresyon düzeyindeki atışın, rno-miR-879-5p düzeyindeki azalış ile translasyonel düzeyde NCOA4 miktarını arttırdığını düşünmekteyiz. Özellikle artan NCOA4 ekspresyonunun, rno-miR-879-5p düzeyindeki azalış ile birlikte İ/R modelinde hücresel düzeye hücre ölümünü ve özellikle ferroptotik hasası indüklediğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda elde ettiğimiz bu sonuçlar, renal iskemi reperfüzyon modelinde rno-miR-879-5p ekspresyon düzeyinde ilk niteliği taşımaktadır.

a)



b)



Şekil 4.9. a) rno-miR-879-5p ile NCOA4 mRNA'sının etkileşim tahmini. Tahmin yazılımı olarak miRmap kullanılmıştır (Vejnar ve Zdobnov, 2012). b) Farklı iskemik sürelere maruz kalan sıçan böbrek dokusundaki rno-miR-879-5p ekspresyonu. Veriler ortalama ± standart hata (SEM) olarak sunulmuştur. (*p<0,05)

4.2.4. rno-miR-6332 Ekspresyon Düzeyi

Çalışmamızda renal İ/R hasarıyla değişen NCOA4 gen ekspresyonu ile ilişkili olduğu öngörülen rno-miR-6332 ekspresyonundaki olası değişimler farklı iskemi sürelerde araştırılmıştır. Çizelge 4.10.a'da rno-miR-6332'nin NCOA4 ile etkileşim bölgesi gösterilmektedir. Tüm iskemi gruplarında gözle görülür düzeyde rno-miR-6332 ekspresyonunda azalış gözlenmekle birlikte, bu azalışın istatiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı görülmüştür (p>0,05).

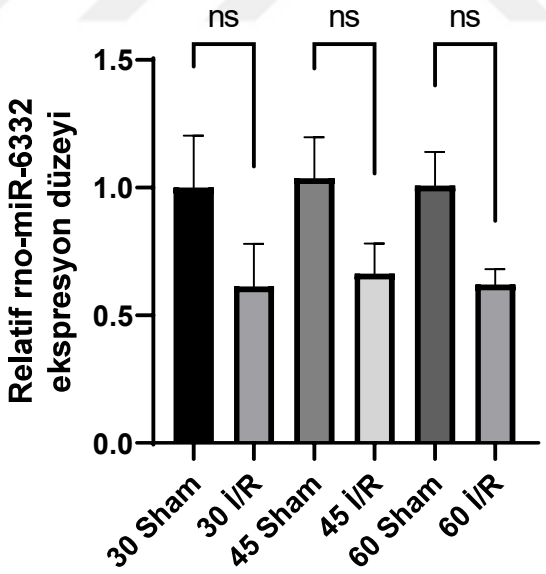
Literatürde rno-mir-6332'yi kapsayan nefrotoksisite ve kardiyak hipertrofi modelleri olmakla birlikte renal iskemi reperfüzyon modelini içeren bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda rno-mir-6332 ilk defa renal iskemi reperfüzyon modelinde ekspresyon düzeyinde incelenmiş ve farklı iskemi sürelerinin rno-miR-6332 ekspresyon düzeyinde değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca rno-mir-6332'in NCOA4 mRNA'sına yüksek afinite göstermesine rağmen renal İ/R modelinde NCOA4 ekspresyon düzeyinde

anlamlı bir etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir (p>0,05) (Şekil 4.10.). Farklı çalışmalarda ise sıçan kardiyak hipertrofi modelinde rno-mir-6332 ekspresyon düzeyinin azaldığı bildirilmiştir (Pala, 2016). Yine sıçanlar üzerinde yapılan farklı bir çalışmada ise kadmiyum ile tetiklenen böbrek hasarında mir-6332'nin ekspresyon seviyesinin istatiksel olarak anlamlı düzeyde düştüğü gösterilmiştir (Fay vd., 2018). Çalışmamızda renal İ/R modelinde önceki çalışmalara benzer şekilde rno-mir-6332 ekspresyonunda azalış görülmekle birlikte, bu azalışın istatiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir.

a)

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)
Position 34-41 of NCOA4 3' UTR	5' ...UAGAGUGGAGCAUCUUCCCUGCA...
rno-miR-6332	3' ACGCCGAGGAACGUCAGGGACGC

b)



Şekil 4.10. a) rno-miR-6332 ile NCOA4 mRNA'sının etkileşim tahmini. Tahmin yazılımı olarak TargetScan kullanılmıştır (McGeary vd., 2019). b) Farklı iskemik sürelere maruz kalan sıçan böbrek dokusundaki rno-miR-6332 ekspresyonu. Veriler ortalama ± standart hata (SEM) olarak sunulmuştur.

4.2.5. rno-mir-1839-5p Ekspresyon Düzeyi

Çalışmamızda ilk defa renal İ/R hasarıyla değişen, SLC39A8 ile ilişkili rno-mir-1839-5p'in ekpsresyon değişimi farklı iskemi sürelerine bağlı olarak incelenmiştir. Çizelge 4.11.a)'da SLC39A8 ile ilişkili rno-mir-1839-5p'in etkileşim bölgesi gösterilmiştir. Çalışmamızda renal İ/R hasarına bağlı rno-mir-1839-5p'in ekspresyon analizinde 45 İ/R grubunun 45 sham grubuna göre istatiksel olarak anlamlı düzeyde azalış gösterdiği belirlenmiştir (*p<0,05). 30 ve 60 İ/R gruplarında ise Sham gruplarına göre gözle görülür bir düzeyde ekspresyon azalması oluştuğunu gözlemlemekle birlikte, bu azalmanın istatiksel olarak anlamlı olmadığını gözlemlenmiştir (p>0,05). 45 İ/R grubu ile 30 ve 60 İ/R grupları arasında oluşan farkın tek yönlü ANOVA testinde istatiksel olarak anlamlı olmadığını görülmüştür (p>0,05) (Şekil 4.11.). Bu durumun iskemi süresinin hücre hasarını farklı düzeylerde etkilemesinden ve bazı miRNA'ların hücre hasarında farklı zamanlarda etkinleştiğinden dolayı geliştiği böyle bir durumun ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bu nedenle elde ettiğimiz bulgular literatürde ilk niteliği taşımaktadır.

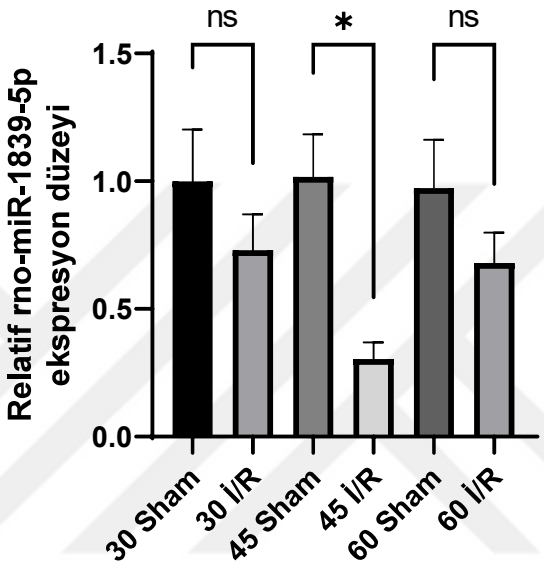
2020 yılında yapılan bir çalışmada rno-miR-1839-5p ekspresyonun omurilik İ/R modelinde anlamlı düzeyde azaldığı gösterilmiştir. Fakat çalışmada iskemi süresi 90 dk, reperfüzyon süresi ise 48 saat olarak belirlenmiş olup hem iskemi reperfüzyon süreleri hem de modelde seçilen doku çalışmamızda kullandığımız deney protokollerinden farklıdır (Yang vd., 2020).

Ayrıca literatür taramasında beyin hasarı, fibrozis ve felç üzerine yapılan çalışmalarda da miR-1839-5p ekspresyonu incelenmiştir. Farelerde oluşturulan epilepsi modelinde, beyin dokusunda miR-1839-5p'nin ekspresyon düzeyinin arttığı belirlenmiştir (Kretschmann vd., 2015). Kronik beyin hasarının incelendiği bir çalışmada ise fare modelinde miR-1839-5p'nin ekspresyon seviyesinin düştüğü gösterilmiştir (Meissner vd., 2016). Sıçan serebral İ/R modelinin incelendiği bir çalışmada miR-1839-5p'nin ekspresyon seviyesinin azaldığı gözlenmiştir (Wang vd., 2020). Fakat literatürde renal İ/R modelinde miR-1839-5p'in ekspresyon değişikliğini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızdaki bu bulgunun iskemik süre ile değişiklik gösterdiğini düşünmekteyiz.

a)

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)
Position 1117-1123 of SLC39A8 3' UTR	5' ...UACUGUGCUUAUUUUUCUACCUU...
rno-miR-1839-5p	3' GUUCUGGACAAGAUAGAUGGAA

b)



Şekil 4.11. a) rno-miR-1839-5p ile SLC39A8 mRNA'sının etkileşim tahmini. Tahmin yazılımı olarak TargetScan kullanılmıştır (McGeary vd., 2019). b) Farklı iskemik sürelere maruz kalan sıçan böbrek dokusundaki rno-miR-1839-5p ekspresyonu. Veriler ortalama ± standart hata (SEM) olarak sunulmuştur. (*p<0,05)

4.2.6. rno-mir-409b Ekspresyon Düzeyi

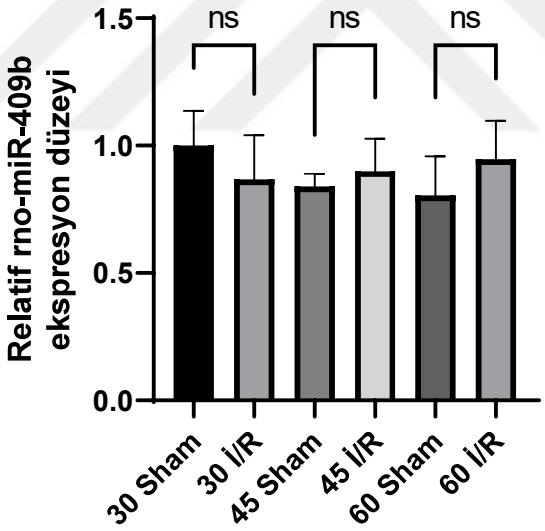
Çalışmamızda ilk defa renal İ/R hasarıyla değişen, SLC39A8 ile ilişkili rno-miR-409b'in ekspresyon değişimi farklı iskemi sürelerine bağlı olarak incelenmiştir. Çizelge 4.12.a)'da SLC39A8 ile ilişkili rno-miR-409b'in etkileşim bölgesi gösterilmiştir. Çalışmamızda renal İ/R hasarına bağlı rno-miR-409b'in ekspresyon analizinde tüm gruplar arasında istatiksel düzeyde bir anlamlılık olmadığını tespit edilmiştir (p>0,05) (Şekil 4.12.). Bu bulgular ışığında rno-miR-409b'in renal İ/R hasarında rol almadığı görülmektedir.

Daha önceden yapılan çalışmalarda miR-409b ekspresyon düzeyi nadir olarak araştırılmıştır. 2020 yılında kronik sinir ağrısı üzerine yapılan bir çalışmada miR-409b ekspresyon düzeyinin azaldığı belirlenmiştir (Sosanya vd., 2020). Çalışmamız ile rno-miR-409b'in renal İ/R modelinde ekspresyon düzeyinin değişmediği çalışmamızla ilk defa gösterilmiştir.

a)

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)
Position 551-558 of SLC39A8 3' UTR	5' ...UUCCAGUGCCUUAAUGAACCCCA...
rno-miR-409b	3' GCUUACAACGAGCCA-CUUGGGGA

b)



Şekil 4.12. a) rno-miR-409b ile SLC39A8 mRNA'sının etkileşim tahmini. Tahmin yazılımı olarak TargetScan kullanılmıştır (McGeary vd., 2019). b) Farklı iskemik sürelere maruz kalan sıçan böbrek dokusundaki rno-miR-409b ekspresyonu. Veriler ortalama ± standart hata (SEM) olarak sunulmuştur.

5.SONUÇ VE ÖNERİLER

İskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarı, bir organ veya dokuya kan akışının kesilmesi ve ardından eski haline gelmesiyle oluşan bir hasar türüdür. İ/R hasarı; kalp krizi, felç ve benzeri koşullarda doğal olarak oluşabilir. İskemi sırasında, etkilenen organ veya dokudaki hücreler, oksijen ve besin eksikliği nedeniyle ölmeye başlar. Kan akışı geri geldiğinde, hücreler aniden tekrar oksijene ve besinlere maruz kalır. Maalesef bu durum hücrelerde daha fazla hasara ve hücre ölümüne yol açan bir dizi olayı tetiklemektedir.

İ/R sürecinde, beyin ve böbrekler dahil olmak üzere bir farklı organda ferroptozun rol oynadığı gösterilmiştir. Ferroptoz, demire bağımlı lipid peroksidasyon ürünlerinin hızlı birikimi ile karakterize edilen bir hücre ölümü şeklidir. Kalp krizinden sonra kalp yetmezliği gelişimi, beyinde inme gelişimi, böbreklerde akut böbrek hasarı gelişimi ile ilişkilendirilmiştir.

Biyokimyasal analizler sonucunda artan demir miktarı ile hücrelerde ferroptotik sürecin geliştiğini düşünmekteyiz. Ayrıca TAS ve TOS analizleri sonucunda renal İ/R modelinde artan oksidatif stres belirlenmiştir. Çalışmamızda renal İ/R modelinde, ferroptoz demir yolağında görevli SLC40A1, NCOA4 ve SLC39A8 genleri ile ferroptoz sürecinde düzenleyici rol oynayan GPX4 geninin mRNA düzeyinde ekspresyon düzeyleri üç farklı iskemi aralığına bağlı olarak araştırılmıştır. Hücre dışına demir taşımından sorumlu SLC40A1 ve hücre zarında çift yönlü demir taşınımından sorumlu SLC39A8 genlerinin ekspresyon düzeylerinin düşmesi; hücre içinde ferritin ile kompleks oluşturarak fenton reaksiyonun başlatan NCOA1'in ekspresyonun artması ferroptoz gelişimine sebep olduğu görülmüştür.

MikroRNA'lar (miRNA'lar), genlerin ekspresyonunu düzenleyen küçük, kodlayıcı olmayan RNA molekülleridir. miRNA'ların hücre ölümü de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde rol oynadığı gösterilmiştir. Çalışmamız sonucunda miRNA'ların farklı düzeylerde ekspresyon profilleri oluşturmaları ana araştırma konumuzu oluşturmuştur. NCOA4'ün hedefleyen rno-miR-879-5p'in ekspresyon düzeyinin azalmasının renal İ/R modelinde hücre hasarını ve ferroptozu arttırıcı etki gösterdiğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda demir düzeyi biyokimyasal olarak araştırılmıştır. Çalışmayı destekleyecek nitelikte renal dokudaki demir lokalizasyonu ayrıca prusya mavisi boyama metodu aracılığıyla da incelenebilir. Bu sayede değişen demir miktarı histolojik olarak gösterilebilir. Ayrıca hemotoksilen eozin boyama metodu ile dokuda oluşan iskemik hasar incelebilir. Hedef genlerin proteinlerini hedefleyen antikorlar ile yapılacak western blot metodu ile hedef genlerin translasyon düzeyinde kantitatif olarak analiz edilebilir. Ayrıca bu antikorlar ile yapılabilecek immünohistokimya metodu ile hedef proteinlerin böbrek dokusundaki lokalizasyonu ve miktarı tayin edilebilir.

Çalışmamızda miRNA'lar ile mRNA'lar arasındaki ilişkiyi tahmin modelleri ile kurmakla birlikte ilerleyen çalışmalarda in vitro modellerde miRNA-mRNA etkileşimlerine yönelik daha güçlü kanıtlar elde edinilebilir. Bu amaçla seçilen miRNA'ların susturulduğu ve aşırı eksprese edildiği modeller oluşturularak hedef mRNA ve proteinin düzeyleri ile fonksiyonlarındaki değişiklikler analiz edilebilir. Ayrıca RNA immünopresipitasyon (RIP) metodu kullanılarak miRNA-mRNA etkileşimi ile ilgili güçlü kanıtlar elde edilebilir.

Çalışmamızda ilk defa farklı iskemi sürelerine bağlı olarak oluşturulan renal İ/R modelinde ferroptozun demir yolağı ile ilişkili SLC40A1, SLC39A8 ve NCOA4 mRNA'larını hedefleyen rno-miR-105, rno-miR-879-5p, rno-miR-6332, rno-miR-1839-5p ve rno-miR-409b'ün ekspresyonları incelenmiştir. Çalışmamız bu yönü ile örnek bir model oluşturmuştur.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Adedoyin, Oreoluwa; Boddu, Ravindra; Traylor, Amie; Lever, Jeremie M.; Bolisetty, Subhashini; George, James F.; Agarwal, Anupam (2018): Heme oxygenase-1 mitigates ferroptosis in renal proximal tubule cells. In *American journal of physiology. Renal physiology* 314 (5), F702-F714. DOI: 10.1152/ajprenal.00044.2017.

Baines, Christopher P. (2009): The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury. In *Basic research in cardiology* 104 (2), pp. 181–188. DOI: 10.1007/s00395-009-0004-8.

Baliga, R., Ueda, N., & Shah, S. V. (1993). Increase in bleomycin-detectable iron in ischaemia/reperfusion injury to rat kidneys. *Biochemical Journal*, *291*(3), 901–905. https://doi.org/10.1042/bj2910901

Bergmeyer, Hans-Ulrich (Ed.) (1965-1974): Methods of enzymatic analysis. 2. pr., rev: Elsevier.

Bluhmki, Erich; Chamorro, Angel; Dávalos, Antoni; Machnig, Thomas; Sauce, Christophe; Wahlgren, Nils et al. (2009): Stroke treatment with alteplase given 3.0-4.5 h after onset of acute ischaemic stroke (ECASS III): additional outcomes and subgroup analysis of a randomised controlled trial. In *The Lancet. Neurology* 8 (12), pp. 1095–1102. DOI: 10.1016/S1474-4422(09)70264-9.

Bogdan, Alexander R.; Miyazawa, Masaki; Hashimoto, Kazunori; Tsuji, Yoshiaki (2016): Regulators of Iron Homeostasis: New Players in Metabolism, Cell Death, and Disease. In *Trends in biochemical sciences* 41 (3), pp. 274–286. DOI: 10.1016/j.tibs.2015.11.012.

Boujrad, Hanan; Gubkina, Olena; Robert, Nadine; Krantic, Slavica; Susin, Santos A. (2007): AIF-mediated programmed necrosis: a highly regulated way to die. In *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 6 (21), pp. 2612–2619. DOI: 10.4161/cc.6.21.4842.

Broughton, James P.; Lovci, Michael T.; Huang, Jessica L.; Yeo, Gene W.; Pasquinelli, Amy E. (2016): Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity. In *Molecular cell* 64 (2), pp. 320–333. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.09.004.

Broughton, Brad R. S.; Reutens, David C.; Sobey, Christopher G. (2009): Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. In *Stroke* 40 (5), e331-9. DOI: 10.1161/STROKEAHA.108.531632.

Cardinal, Jon; Pan, Pinhua; Tsung, Allan (2009): Protective role of cisplatin in ischemic liver injury through induction of autophagy. In *Autophagy* 5 (8), pp. 1211–1212. DOI: 10.4161/auto.5.8.9972.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Chen, Jia; Lin, Jiahao; Hu, Yongfei; Ye, Meijun; Yao, Linhui; Le Wu et al. (2023): RNADisease v4.0: an updated resource of RNA-associated diseases, providing RNA-disease analysis, enrichment and prediction. In *Nucleic acids research* 51 (D1), D1397-D1404. DOI: 10.1093/nar/gkac814.

Chen, Y., Wang, J., Zhang, J., et al. (2016). Iron overload exacerbates ischemia-reperfusion injury in rat kidneys. Redox Biology, 10, 107-114.

Chen, Y., Zhang, Z., Wang, Y., Zhang, X., Zhang, J., & Wang, X. (2016). Ischemic preconditioning protects against renal ischemia-reperfusion injury by upregulating SLC40A1 expression. American Journal of Physiology. Renal Physiology, 311(3), F682-F690.

Chen, Y., Zhang, Z., Wang, Y., Zhang, X., Zhang, J., & Wang, X. (2020). Ischemic preconditioning protects against renal ischemia-reperfusion injury by upregulating NCOA4 expression. American Journal of Physiology. Renal Physiology, 319(3), F566-F576.

Chipman, Laura B.; Pasquinelli, Amy E. (2019): miRNA Targeting: Growing beyond the Seed. In *Trends in genetics : TIG* 35 (3), pp. 215–222. DOI: 10.1016/j.tig.2018.12.005.

Ciebiera, Michał; Włodarczyk, Marta; Zgliczyński, Stanisław; Łoziński, Tomasz; Walczak, Klaudia; Czekierdowski, Artur (2020): The Role of miRNA and Related Pathways in Pathophysiology of Uterine Fibroids-From Bench to Bedside. In *International journal of molecular sciences* 21 (8). DOI: 10.3390/ijms21083016.

Crosson, Craig E.; Mani, Santhosh K.; Husain, Shahid; Alsarraf, Oday; Menick, Donald R. (2010): Inhibition of histone deacetylase protects the retina from ischemic injury. In *Investigative ophthalmology & visual science* 51 (7), pp. 3639–3645. DOI: 10.1167/iovs.09-4538.

Cui H, Yang L. Analysis of microRNA expression detected by microarray of the cerebral cortex after hypoxic-ischemic brain injury. J Craniofac Surg. 2013 Nov;24(6):2147-52. doi: 10.1097/SCS.0b013e3182a243f3. Erratum in: J Craniofac Surg. 2014 May;25(3):1032. PMID: 24220425.

Deng, F., Zhao, B.-C., Yang, X., Lin, Z.-B., Sun, Q.-S., Wang, Y.-F., Yan, Z.-Z., Liu, W.-F., Li, C., Hu, J.-J., & Liu, K.-X. (2021). The gut microbiota metabolite capsiate promotes Gpx4 expression by activating TRPV1 to inhibit intestinal ischemia reperfusion-induced ferroptosis. *Gut Microbes*, *13*(1). https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1902719

Denli, Ahmet M.; Tops, Bastiaan B. J.; Plasterk, Ronald H. A.; Ketting, René F.; Hannon, Gregory J. (2004): Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. In *Nature* 432 (7014), pp. 231–235. DOI: 10.1038/nature03049.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Dharap, Ashutosh; Pokrzywa, Courtney; Murali, Shruthi; Pandi, Gopal; Vemuganti, Raghu (2013): MicroRNA miR-324-3p induces promoter-mediated expression of RelA gene. In *PloS one* 8 (11), e79467. DOI: 10.1371/journal.pone.0079467.

Ding, C., Ding, X., Zheng, J., Wang, B., Li, Y., Xiang, H., Dou, M., Qiao, Y., Tian, P., & Xue, W. (2020). Mir-182-5p and Mir-378A-3p regulate ferroptosis in I/R-induced renal injury. *Cell Death & Disease*, *11*(10). https://doi.org/10.1038/s41419-020-03135-z

Dixon, Scott J.; Lemberg, Kathryn M.; Lamprecht, Michael R.; Skouta, Rachid; Zaitsev, Eleina M.; Gleason, Caroline E. et al. (2012): Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. In *Cell* 149 (5), pp. 1060–1072. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.042.

Dolma, Sonam; Lessnick, Stephen L.; Hahn, William C.; Stockwell, Brent R. (2003): Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. In *Cancer cell* 3 (3), pp. 285–296. DOI: 10.1016/s1535-6108(03)00050-3.

Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, Pinkus GS, Zon LI, Robine S, Andrews NC. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. Cell Metab. 2005 Mar;1(3):191-200. doi: 10.1016/j.cmet.2005.01.003. PMID: 16054062.

Dorweiler, Bernhard; Pruefer, Diethard; Andrasi, Terezia B.; Maksan, Sasa M.; Schmiedt, Walther; Neufang, Achim; Vahl, Christian F. (2007): Ischemia-Reperfusion Injury : Pathophysiology and Clinical Implications. In *European journal of trauma and emergency surgery : official publication of the European Trauma Society* 33 (6), pp. 600–612. DOI: 10.1007/s00068-007-7152-z.

Dubitzky, Werner; Wolkenhauer, Olaf; Cho, Kwang-Hyun; Yokota, Hiroki (Eds.) (2013): Encyclopedia of Systems Biology. 1st ed. 2013. New York, NY: Springer New York (SpringerLink Bücher).

Dvoriantchikova, G., Lypka, K.R., Adis, E.V. *et al.* Multiple types of programmed necrosis such as necroptosis, pyroptosis, oxytosis/ferroptosis, and parthanatos contribute simultaneously to retinal damage after ischemia–reperfusion. *Sci Rep* **12**, 17152 (2022).

Eltzschig, Holger K.; Eckle, Tobias (2011): Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. In *Nature medicine* 17 (11), pp. 1391–1401. DOI: 10.1038/nm.2507.

Endres, Matthias; Ahmadi, Michael; Kruman, Inna; Biniszkiewicz, Detlev; Meisel, Andreas; Gertz, Karen (2005): Folate deficiency increases postischemic brain injury. In *Stroke* 36 (2), pp. 321–325. DOI: 10.1161/01.STR.0000153008.60517.ab.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Endres, M.; Meisel, A.; Biniszkiewicz, D.; Namura, S.; Prass, K.; Ruscher, K. et al. (2000): DNA methyltransferase contributes to delayed ischemic brain injury. In *The Journal of Neuroscience* 20 (9), pp. 3175–3181. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.20-09-03175.2000.

Fang, Xuexian; Wang, Hao; Han, Dan; Xie, Enjun; Yang, Xiang; Wei, Jiayu et al. (2019): Ferroptosis as a target for protection against cardiomyopathy. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (7), pp. 2672–2680. DOI: 10.1073/pnas.1821022116.

Fay, M., Alt, L., Ryba, D., Salamah, R., Peach, R., Papaeliou, A., Zawadzka, S., Weiss, A., Patel, N., Rahman, A., Stubbs-Russell, Z., Lamar, P., Edwards, J., & Prozialeck, W. (2018). Cadmium nephrotoxicity is associated with altered microrna expression in the rat renal cortex. *Toxics*, *6*(1), 16. https://doi.org/10.3390/toxics6010016

Fitridge, Robert; Thompson, Matthew (2012): Mechanisms of Vascular Disease. A Reference Book for Vascular Specialists. Edited by Robert Fitridge, Matthew Thompson. Cambridge: Cambridge University Press.

Frazer, David M.; Anderson, Gregory J. (2014): The regulation of iron transport. In *BioFactors (Oxford, England)* 40 (2), pp. 206–214. DOI: 10.1002/biof.1148.

Friedmann Angeli, Jose Pedro; Schneider, Manuela; Proneth, Bettina; Tyurina, Yulia Y.; Tyurin, Vladimir A.; Hammond, Victoria J. et al. (2014): Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. In *Nature cell biology* 16 (12), pp. 1180–1191. DOI: 10.1038/ncb3064.

Farber NE, Pieper GM, Gross GJ. (1987): Regional differences in postischemic recovery in the stunned canine myocardium. Am Heart J (114), Article 95, p. 1086.

Functional Morphology of the Kidneys • Functions of Cells and Human Body. (n.d.). 1. Functional Morphology of the Kidneys &Bull; Functions of Cells and Human Body. http://fblt.cz/en/skripta/vii-vylucovaci-soustava-a-acidobazicka-rovnovaha/1-funkcni-morfologie-ledvin/

Fu, Yuchang (2014): Adiponectin signaling and metabolic syndrome. In *Progress in molecular biology and translational science* 121, pp. 293–319. DOI: 10.1016/B978-0-12-800101-1.00009-0.

Fu, Guodong; Brkić, Jelena; Hayder, Heyam; Peng, Chun (2013): MicroRNAs in Human Placental Development and Pregnancy Complications. In *International journal of molecular sciences* 14 (3), pp. 5519–5544. DOI: 10.3390/ijms14035519.

G.B. Bulkley (1987): Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review. In *Br. J. Cancer Suppl.* 8, pp. 66–73.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Gammella, Elena; Recalcati, Stefania; Rybinska, Ilona; Buratti, Paolo; Cairo, Gaetano (2015): Iron-induced damage in cardiomyopathy: oxidative-dependent and independent mechanisms. In *Oxidative medicine and cellular longevity* 2015, p. 230182. DOI: 10.1155/2015/230182.

Gao, Minghui; Monian, Prashant; Quadri, Nosirudeen; Ramasamy, Ravichandran; Jiang, Xuejun (2015): Glutaminolysis and Transferrin Regulate Ferroptosis. In *Molecular cell* 59 (2), pp. 298–308. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.06.011.

García-Velasco, Juan A.; Seli, Emre (Eds.) (2020): Human reproductive genetics. Emerging technologies and clinical applications. London: Academic Press.

Gottlieb, Roberta A.; Gustafsson, Asa B. (2011): Mitochondrial turnover in the heart. In *Biochimica et biophysica acta* 1813 (7), pp. 1295–1301. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2010.11.017.

Granger, Anne; Abdullah, Ibrahim; Huebner, Faith; Stout, Andrea; Wang, Tao; Huebner, Thomas et al. (2008): Histone deacetylase inhibition reduces myocardial ischemia-reperfusion injury in mice. In *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22 (10), pp. 3549–3560. DOI: 10.1096/fj.08-108548.

Granger, D. Neil; Kvietys, Peter R. (2015): Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. In *Redox biology* 6, pp. 524–551. DOI: 10.1016/j.redox.2015.08.020.

Ha, Minju; Kim, V. Narry (2014): Regulation of microRNA biogenesis. In *Nature reviews. Molecular cell biology* 15 (8), pp. 509–524. DOI: 10.1038/nrm3838.

Halestrap, Andrew P. (2009): What is the mitochondrial permeability transition pore? In *Journal of molecular and cellular cardiology* 46 (6), pp. 821–831. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2009.02.021.

Haschek, Wanda M.; Rousseaux, Colin George; Wallig, Matthew A. (2013): Haschek and Rousseaux's handbook of toxicologic pathology. With assistance of Colin G. Rousseaux, Matthew A. Wallig, Brad Bolon, Ricardo Ochoa. Third edition. Amsterdam: Academic Press. Available online at https://ebookcentral.proquest.com/lib/kxp/detail.action?docID=1319047.

Hao L, Mi J, Song L, Guo Y, Li Y, Yin Y, Zhang C. SLC40A1 Mediates Ferroptosis and Cognitive Dysfunction in Type 1 Diabetes. Neuroscience. 2021 May 21;463:216-226. doi: 10.1016/j.neuroscience.2021.03.009. Epub 2021 Mar 13. PMID: 33727075.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Tian H, Xiong Y, Zhang Y, Leng Y, Tao J, Li L, Qiu Z, Xia Z. Activation of NRF2/FPN1 pathway attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in diabetic rats by regulating iron homeostasis and ferroptosis. Cell Stress Chaperones. 2021 Mar;27(2):149-164. doi: 10.1007/s12192-022-01257-1. Epub 2022 Feb 5. PMID: 35124772; PMCID: PMC8943074.

He, Congcong; Klionsky, Daniel J. (2009): Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. In *Annual review of genetics* 43, pp. 67–93. DOI: 10.1146/annurev-genet-102808-114910.

He, Bin; Xiao, Jian; Ren, An-Jing; Zhang, Yu-Feng; Zhang, Hao; Chen, Min et al. (2011): Role of miR-1 and miR-133a in myocardial ischemic postconditioning. In *Journal of biomedical science* 18 (1), p. 22. DOI: 10.1186/1423-0127-18-22.

Huang, Weili (2017): MicroRNAs: Biomarkers, Diagnostics, and Therapeutics. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1617, pp. 57–67. DOI: 10.1007/978-1-4939-7046-9_4.

Hu, J.-M., He, L.-J., Wang, P.-B., Yu, Y., Ye, Y.-P., & Liang, L. (2021). Antagonist targeting mir-106b-5p attenuates acute renal injury by regulating renal function, apoptosis and autophagy via the upregulation of TCF4. *International Journal of Molecular Medicine*, *48*(3). https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.5002

Huang Y, Wu H, Hu Y, Zhou C, Wu J, Wu Y, Wang H, Lenahan C, Huang L, Nie S, Gao X, Sun J. Puerarin Attenuates Oxidative Stress and Ferroptosis via AMPK/PGC1α/Nrf2 Pathway after Subarachnoid Hemorrhage in Rats. Antioxidants (Basel). 2022 Jun 27;11(7):1259. doi: 10.3390/antiox11071259. PMID: 35883750; PMCID: PMC9312059.

Humphreys, Mitchell R.; Castle, Erik P.; Lohse, Christine M.; Sebo, Thomas J.; Leslie, Kevin O.; Andrews, Paul E. (2009): Renal ischemia time in laparoscopic surgery: an experimental study in a porcine model. In *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association* 16 (1), pp. 105–109. DOI: 10.1111/j.1442-2042.2008.02173.x.

Huntzinger, Eric; Izaurralde, Elisa (2011): Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. In *Nature reviews. Genetics* 12 (2), pp. 99–110. DOI: 10.1038/nrg2936.

Jiang, G.-P., Liao, Y.-J., Huang, L.-L., Zeng, X.-J., & Liao, X.-H. (2020). Effects and molecular mechanism of pachymic acid on ferroptosis in renal ischemia reperfusion injury. *Molecular Medicine Reports*, *23*(1). https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11704

Jiang, Man; Liu, Kebin; Luo, Jia; Dong, Zheng (2010): Autophagy is a renoprotective mechanism during in vitro hypoxia and in vivo ischemia-reperfusion injury. In *The American Journal of Pathology* 176 (3), pp. 1181–1192. DOI: 10.2353/ajpath.2010.090594.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Jo, Myung Hyun; Shin, Soochul; Jung, Seung-Ryoung; Kim, Eunji; Song, Ji-Joon; Hohng, Sungchul (2015): Human Argonaute 2 Has Diverse Reaction Pathways on Target RNAs. In *Molecular cell* 59 (1), pp. 117–124. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.04.027.

Kalogeris, Theodore; Baines, Christopher P.; Krenz, Maike; Korthuis, Ronald J. (2012): Cell biology of ischemia/reperfusion injury. In *International review of cell and molecular biology* 298, pp. 229–317. DOI: 10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7.

Kalogeris, Theodore; Baines, Christopher P.; Krenz, Maike; Korthuis, Ronald J. (2016): Ischemia/Reperfusion. In *Comprehensive Physiology* 7 (1), pp. 113–170. DOI: 10.1002/cphy.c160006.

Kaushal, Gur P.; Chandrashekar, Kiran; Juncos, Luis A. (2019): Molecular Interactions Between Reactive Oxygen Species and Autophagy in Kidney Disease. In *International journal of molecular sciences* 20 (15). DOI: 10.3390/ijms20153791.

Kar F, Yıldız F, Hacioglu C, Kar E, Donmez DB, Senturk H, Kanbak G. LoxBlock-1 or Curcumin attenuates liver, pancreas and cardiac ferroptosis, oxidative stress and injury in Ischemia/reperfusion-damaged rats by facilitating ACSL/GPx4 signaling. Tissue Cell. 2023 May 18;82:102114. doi: 10.1016/j.tice.2023.102114. Epub ahead of print. PMID: 37210761.

Kawamata, Tomoko; Tomari, Yukihide (2010): Making RISC. In *Trends in biochemical sciences* 35 (7), pp. 368–376. DOI: 10.1016/j.tibs.2010.03.009.

Khan, N.; Hard, G.; Radi, Z. (2012): Renal toxicity. In *New Horizons in Predictive Toxicology: Current Status and Application*, pp. 499–541.

Khvorova, Anastasia; Reynolds, Angela; Jayasena, Sumedha D. (2003): Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. In *Cell* 115 (2), pp. 209–216. DOI: 10.1016/s0092-8674(03)00801-8.

Kim, Hyeon Ju; Rowe, Michael; Ren, Ming; Hong, Jau-Shyong; Chen, Po-See; Chuang, De-Maw (2007): Histone deacetylase inhibitors exhibit anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat permanent ischemic model of stroke: multiple mechanisms of action. In *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 321 (3), pp. 892–901. DOI: 10.1124/jpet.107.120188.

Kouzarides, Tony (2007): Chromatin modifications and their function. In *Cell* 128 (4), pp. 693–705. DOI: 10.1016/j.cell.2007.02.005.

Kretschmann, A., Danis, B., Andonovic, L., Abnaof, K., van Rikxoort, M., Siegel, F., Mazzuferi, M., Godard, P., Hanon, E., Fröhlich, H., Kaminski, R. M., Foerch, P., & Pfeifer, A. (2014). Different microrna profiles in chronic epilepsy versus acute seizure mouse models. *Journal of Molecular Neuroscience*, *55*(2), 466–479. https://doi.org/10.1007/s12031-014-0368-6

KAYNAKLAR DİZİNİ

Kroemer, Guido; Galluzzi, Lorenzo; Brenner, Catherine (2007): Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. In *Physiological reviews* 87 (1), pp. 99–163. DOI: 10.1152/physrev.00013.2006.

Kwon, Min-Young; Park, Eunhee; Lee, Seon-Jin; Chung, Su Wol (2015): Heme oxygenase-1 accelerates erastin-induced ferroptotic cell death. In *Oncotarget* 6 (27), pp. 24393–24403. DOI: 10.18632/oncotarget.5162.

Lambeth, J. David (2004): NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. In *Nature reviews. Immunology* 4 (3), pp. 181–189. DOI: 10.1038/nri1312.

Le Jiang; Hickman, Justin H.; Wang, Shang-Jui; Gu, Wei (2015): Dynamic roles of p53-mediated metabolic activities in ROS-induced stress responses. In *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 14 (18), pp. 2881–2885. DOI: 10.1080/15384101.2015.1068479.

Le Jiang; Kon, Ning; Li, Tongyuan; Wang, Shang-Jui; Su, Tao; Hibshoosh, Hanina et al. (2015): Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. In *Nature* 520 (7545), pp. 57–62. DOI: 10.1038/nature14344.

Lee, J. M.; Grabb, M. C.; Zipfel, G. J.; Choi, D. W. (2000): Brain tissue responses to ischemia. In *The Journal of clinical investigation* 106 (6), pp. 723–731. DOI: 10.1172/JCI11003.

Lee, Masaichi-Chang-Il; Velayutham, Murugesan; Komatsu, Tomoko; Hille, Russ; Zweier, Jay L. (2014): Measurement and characterization of superoxide generation from xanthine dehydrogenase: a redox-regulated pathway of radical generation in ischemic tissues. In *Biochemistry* 53 (41), pp. 6615–6623. DOI: 10.1021/bi500582r.

Levine, Beth; Kroemer, Guido (2008): Autophagy in the pathogenesis of disease. In *Cell* 132 (1), pp. 27–42. DOI: 10.1016/j.cell.2007.12.018.

Li, B., Wang, W., Li, Y., Wang, S., Liu, H., Xia, Z., Gao, W., & Zhao, B. (2023). CGAS-sting pathway aggravates early cerebral ischemia-reperfusion injury in mice by activating NCOA4-mediated ferritinophagy. *Experimental Neurology*, *359*, 114269. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2022.114269

Li, Jie; Cao, Feng; Yin, He-Liang; Huang, Zi-Jian; Lin, Zhi-Tao; Mao, Ning et al. (2020): Ferroptosis: past, present and future. In *Cell death & disease* 11 (2), p. 88. DOI: 10.1038/s41419-020-2298-2.

Li MM, Jiang T, Sun Z, Zhang Q, Tan CC, Yu JT, Tan L. Genome-wide microRNA expression profiles in hippocampus of rats with chronic temporal lobe epilepsy. Sci Rep. 2014 Apr 22;4:4734. doi: 10.1038/srep04734. PMID: 24751812; PMCID: PMC3994440.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Li, W., Li, W., Wang, Y. *et al.* Inhibition of DNMT-1 alleviates ferroptosis through NCOA4 mediated ferritinophagy during diabetes myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cell Death Discov.* **7**, 267 (2021). https://doi.org/10.1038/s41420-021-00656-0

Li, X., Wang, J., Liu, Y., et al. (2017). Iron chelation protects against ischemia-reperfusion injury in rat kidneys. Redox Biology, 12, 164-172.

Linkermann, Andreas; Skouta, Rachid; Himmerkus, Nina; Mulay, Shrikant R.; Dewitz, Christin; Zen, Federica de et al. (2014): Synchronized renal tubular cell death involves ferroptosis. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (47), pp. 16836–16841. DOI: 10.1073/pnas.1415518111.

Lopez, Alan D.; Mathers, Colin D.; Ezzati, Majid; Jamison, Dean T.; Murray, Christopher J. L. (2006): Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. In *Lancet (London, England)* 367 (9524), pp. 1747–1757. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)68770-9.

Lück, Hans (1965-1974): Xanthine Oxidase. In Hans-Ulrich Bergmeyer (Ed.): Methods of enzymatic analysis. 2. pr., rev: Elsevier, pp. 917–919.

Lucchesi, M. A. (2000). Antioxidants for the prevention and treatment of ischemia-reperfusion injury. Journal of the American College of Cardiology, 36(2), 329-341. doi:10.1016/S0735-1097(00)00797-2

Marin, Diego; Seli, Emre (2020): Epigenetics and imprinting in assisted reproduction. In Juan A. García-Velasco, Emre Seli (Eds.): Human reproductive genetics. Emerging technologies and clinical applications. London: Academic Press, pp. 69–87.

Matsushima, Shouji; Sadoshima, Junichi (2022): Yin and Yang of NADPH Oxidases in Myocardial Ischemia-Reperfusion. In *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 11 (6). DOI: 10.3390/antiox11061069.

McDougal, W. S. (1988): Renal perfusion/reperfusion injuries. In *The Journal of urology* 140 (6), pp. 1325–1330. DOI: 10.1016/s0022-5347(17)42037-4.

McGeary, Sean E.; Lin, Kathy S.; Shi, Charlie Y.; Pham, Thy M.; Bisaria, Namita; Kelley, Gina M.; Bartel, David P. (2019): The biochemical basis of microRNA targeting efficacy. In *Science (New York, N.Y.)* 366 (6472). DOI: 10.1126/science.aav1741.

Meissner, L., Gallozzi, M., Balbi, M., Schwarzmaier, S., Tiedt, S., Terpolilli, N. A., & Plesnila, N. (2016). Temporal profile of MicroRNA expression in contused cortex after traumatic brain injury in mice. *Journal of Neurotrauma*, *33*(8), 713–720. https://doi.org/10.1089/neu.2015.4077

KAYNAKLAR DİZİNİ

Miller, Alyson A.; Dusting, Gregory J.; Roulston, Carli L.; Sobey, Christopher G. (2006): NADPH-oxidase activity is elevated in penumbral and non-ischemic cerebral arteries following stroke. In *Brain research* 1111 (1), pp. 111–116. DOI: 10.1016/j.brainres.2006.06.082.

Moon, D., Padanilam, B. J., Jang, H.-S., & Kim, J. (2022). 2-MERCAPTOETHANOL protects against DNA double-strand breaks after kidney ischemia and reperfusion injury through GPX4 upregulation. *Pharmacological Reports*, *74*(5), 1041–1053. https://doi.org/10.1007/s43440-022-00403-x

Moore, Lisa D.; Le, Thuc; Fan, Guoping (2013): DNA methylation and its basic function. In *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 38 (1), pp. 23–38. DOI: 10.1038/npp.2012.112.

Moquin, David; Chan, Francis Ka-Ming (2010): The molecular regulation of programmed necrotic cell injury. In *Trends in biochemical sciences* 35 (8), pp. 434–441. DOI: 10.1016/j.tibs.2010.03.001.

Morgan, Michael J.; Kim, You-Sun; Liu, Zheng-gang (2008): TNFalpha and reactive oxygen species in necrotic cell death. In *Cell research* 18 (3), pp. 343–349. DOI: 10.1038/cr.2008.31.

Muthusamy, Viswanathan; Bosenberg, Marcus; Wajapeyee, Narendra (2010): Redefining regulation of DNA methylation by RNA interference. In *Genomics* 96 (4), pp. 191–198. DOI: 10.1016/j.ygeno.2010.07.001.

Nakagiri, A.; Sunamoto, M.; Murakami, M. (2007): NADPH oxidase is involved in ischaemia/reperfusion-induced damage in rat gastric mucosa via ROS production--role of NADPH oxidase in rat stomachs. In *Inflammopharmacology* 15 (6), pp. 278–281. DOI: 10.1007/s10787-007-1587-z.

Nie C, Ding X, A R, Zheng M, Li Z, Pan S, Yang W. Hydrogen gas inhalation alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury by the inhibition of oxidative stress and NLRP3-mediated pyroptosis in rats. Life Sci. 2021 May 1;272:119248. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119248. Epub 2021 Feb 20. PMID: 33621592.

Nilakantan, Vani; Liang, Huan Ling; Rajesh, Seenivasan; Mortensen, Jordan; Chandran, Karunakaran (2010): Time-dependant protective effects of mangenese(III) tetrakis (1-methyl-4-pyridyl) porphyrin on mitochondrial function following renal ischemia-reperfusion injury. In *Free radical research* 44 (7), pp. 773–782. DOI: 10.3109/10715761003786164.

O'Brien, Jacob; Hayder, Heyam; Zayed, Yara; Peng, Chun (2018): Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. In *Frontiers in endocrinology* 9, p. 402. DOI: 10.3389/fendo.2018.00402.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Ordy, J. M.; Wengenack, T. M.; Bialobok, P.; Coleman, P. D.; Rodier, P.; Baggs, R. B. et al. (1993): Selective vulnerability and early progression of hippocampal CA1 pyramidal cell degeneration and GFAP-positive astrocyte reactivity in the rat four-vessel occlusion model of transient global ischemia. In *Experimental neurology* 119 (1), pp. 128–139. DOI: 10.1006/exnr.1993.1014.

Ornellas, Felipe Mateus; Ornellas, Débora Santos; Martini, Sabrina Vargas; Castiglione, Raquel Carvalho; Ventura, Grasiella Maria; Rocco, Patrícia R. et al. (2017): Bone Marrow-Derived Mononuclear Cell Therapy Accelerates Renal Ischemia-Reperfusion Injury Recovery by Modulating Inflammatory, Antioxidant and Apoptotic Related Molecules. In *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 41 (5), pp. 1736–1752. DOI: 10.1159/000471866.

Pala, M. (2016). *Düzenli aerobik egzersiz ile oluşturulan kardiyak hipertrofinin mikroRNA ile ilişkisi* (doktora tezi).

Paoni, Nicholas F.; Peale, Franklin; Wang, Fay; Errett-Baroncini, Carol; Steinmetz, Hope; Toy, Karen et al. (2002): Time course of skeletal muscle repair and gene expression following acute hind limb ischemia in mice. In *Physiological genomics* 11 (3), pp. 263–272. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00110.2002.

Parzych, Katherine R.; Klionsky, Daniel J. (2014): An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. In *Antioxidants & Redox Signaling* 20 (3), pp. 460–473. DOI: 10.1089/ars.2013.5371.

Pasupathy, S.; Homer-Vanniasinkam, S. (2005): Ischaemic preconditioning protects against ischaemia/reperfusion injury: emerging concepts. In *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 29 (2), pp. 106–115. DOI: 10.1016/j.ejvs.2004.11.005.

Pillai DR, Dittmar MS, Baldaranov D, et al. Cerebral Ischemia–Reperfusion Injury in Rats—A 3 T MRI Study on Biphasic Blood–Brain Barrier Opening and the Dynamics of Edema Formation. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2009;29(11):1846-1855.

Radi, Zaher A. (2019): Kidney Pathophysiology, Toxicology, and Drug-Induced Injury in Drug Development. In *International journal of toxicology* 38 (3), pp. 215–227. DOI: 10.1177/1091581819831701.

Ren, Xiao-Ping; Wu, Jinghai; Wang, Xiaohong; Sartor, Maureen A.; Jones, Keith; Qian, Jiang et al. (2009): MicroRNA-320 is involved in the regulation of cardiac ischemia/reperfusion injury by targeting heat-shock protein 20. In *Circulation* 119 (17), pp. 2357–2366. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.814145.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Sanada, Shoji; Komuro, Issei; Kitakaze, Masafumi (2011): Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. In *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 301 (5), H1723-41. DOI: 10.1152/ajpheart.00553.2011.

Scindia, Y., Dey, P., Thirunagari, A., Liping, H., Rosin, D. L., Floris, M., Okusa, M. D., & Swaminathan, S. (2015). Hepcidin mitigates renal ischemia-reperfusion injury by modulating systemic iron homeostasis. *Journal of the American Society of Nephrology*, *26*(11), 2800–2814. https://doi.org/10.1681/asn.2014101037

Scorrano, Luca; Oakes, Scott A.; Opferman, Joseph T.; Cheng, Emily H.; Sorcinelli, Mia D.; Pozzan, Tullio; Korsmeyer, Stanley J. (2003): BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca2+: a control point for apoptosis. In *Science (New York, N.Y.)* 300 (5616), pp. 135–139. DOI: 10.1126/science.1081208.

Shin, S., Choi, J.-W., Moon, H., Lee, C. Y., Park, J.-H., Lee, J., Seo, H.-H., Han, G., Lim, S., Lee, S., Kim, S. W., & Hwang, K.-C. (2019). Simultaneous suppression of multiple programmed cell death pathways by MIRNA-105 in cardiac ischemic injury. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, *14*, 438–449. https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.12.015

Skonieczna, Magdalena; Cieslar-Pobuda, Artur; Saenko, Yuriy; Foksinski, Marek; Olinski, Ryszard; Rzeszowska-Wolny, Joanna; Wiechec, Emilia (2017): The Impact of DIDS-Induced Inhibition of Voltage-Dependent Anion Channels (VDAC) on Cellular Response of Lymphoblastoid Cells to Ionizing Radiation. In *Medicinal chemistry (Shariqah (United Arab Emirates))* 13 (5), pp. 477–483. DOI: 10.2174/1573406413666170421102353.

Smith, Christopher C. T.; Yellon, Derek M. (2011): Necroptosis, necrostatins and tissue injury. In *Journal of cellular and molecular medicine* 15 (9), pp. 1797–1806. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2011.01341.x.

Sosanya, N. M., Kumar, R., Clifford, J. L., Chavez, R., Dimitrov, G., Srinivasan, S., Gautam, A., Trevino, A. V., Williams, M., Hammamieh, R., Cheppudira, B. P., Christy, R. J., & Crimmins, S. L. (2020). Identifying plasma derived extracellular vesicle (EV) contained biomarkers in the development of chronic neuropathic pain. *The Journal of Pain*, *21*(1-2), 82–96. https://doi.org/10.1016/j.jpain.2019.05.015

Sun, X.; Ou, Z.; Xie, M.; Kang, R.; Fan, Y.; Niu, X. et al. (2015): HSPB1 as a novel regulator of ferroptotic cancer cell death. In *Oncogene* 34 (45), pp. 5617–5625. DOI: 10.1038/onc.2015.32.

Sun, Jie; Wu, Qiujv; Sun, Huiling; Qiao, Yingli (2014): Inhibition of histone deacetylase by butyrate protects rat liver from ischemic reperfusion injury. In *International journal of molecular sciences* 15 (11), pp. 21069–21079. DOI: 10.3390/ijms151121069.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Tang, D., Chen, X., Kang, R., & Kroemer, G. (2020). Ferroptosis: Molecular Mechanisms and Health Implications. *Cell Research*, *31*(2), 107–125. https://doi.org/10.1038/s41422-020-00441-1

Tao, W., Liu, F., Zhang, J., Fu, S., Zhan, H., & Qian, K. (2022). Mir-3587 inhibitor attenuates ferroptosis following renal ischemia-reperfusion through HO-1. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *8*. https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.789927

Taylor, P. B.; Young, B. G. (1982): Effect of myocardial ischemia on uridine incorporation and histone acetylation. In *Canadian journal of physiology and pharmacology* 60 (3), pp. 313–318. DOI: 10.1139/y82-043.

Tüfekci, Kemal Uğur; Oner, Meryem Gülfem; Meuwissen, Ralph Leo Johan; Genç, Sermin (2014): The role of microRNAs in human diseases. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1107, pp. 33–50. DOI: 10.1007/978-1-62703-748-8_3.

Vandenabeele, Peter; Declercq, Wim; van Herreweghe, Franky; Vanden Berghe, Tom (2010): The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis. In *Science signaling* 3 (115), re4. DOI: 10.1126/scisignal.3115re4.

Vejnar, Charles E.; Zdobnov, Evgeny M. (2012): MiRmap: comprehensive prediction of microRNA target repression strength. In *Nucleic acids research* 40 (22), pp. 11673–11683. DOI: 10.1093/nar/gks901.

Wang, C., Cao, H., Gu, S., Shi, C., Chen, X., & Han, X. (2020). Expression analysis of micrornas and mrnas in myofibroblast differentiation of lung resident mesenchymal stem cells. *Differentiation*, *112*, 10–16. https://doi.org/10.1016/j.diff.2019.11.002

Wang, Yingfei; Dawson, Valina L.; Dawson, Ted M. (2009): Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos. In *Experimental neurology* 218 (2), pp. 193–202. DOI: 10.1016/j.expneurol.2009.03.020.

Wei, Qingqing; Yin, Xiao-Ming; Wang, Mong-Heng; Dong, Zheng (2006): Bid deficiency ameliorates ischemic renal failure and delays animal death in C57BL/6 mice. In *American journal of physiology. Renal physiology* 290 (1), F35-42. DOI: 10.1152/ajprenal.00184.2005.

Wittnich, C. (1992): Age-related differences in myocardial metabolism affects response to ischemia. Age in heart tolerance to ischemia. In *The American journal of cardiovascular pathology* 4 (2), pp. 175–180.

Wu, Meng-Yu; Li, Chia-Jung; Hou, Ming-Feng; Chu, Pei-Yi (2017): New Insights into the Role of Inflammation in the Pathogenesis of Atherosclerosis. In *International journal of molecular sciences* 18 (10). DOI: 10.3390/ijms18102034.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Wu, Bin; Qiu, Wei; Wang, Peng; Yu, Hui; Cheng, Tao; Zambetti, Gerard P. et al. (2007): p53 independent induction of PUMA mediates intestinal apoptosis in response to ischaemia-reperfusion. In *Gut* 56 (5), pp. 645–654. DOI: 10.1136/gut.2006.101683.

Wu, Shu-Yu; Tang, Shih-En; Ko, Fu-Chang; Wu, Geng-Chin; Huang, Kun-Lun; Chu, Shi-Jye (2015): Valproic acid attenuates acute lung injury induced by ischemia-reperfusion in rats. In *Anesthesiology* 122 (6), pp. 1327–1337. DOI: 10.1097/ALN.0000000000000618.

Wu, Meng-Yu; Yiang, Giou-Teng; Liao, Wan-Ting; Tsai, Andy Po-Yi; Cheng, Yeung-Leung; Cheng, Pei-Wen et al. (2018): Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. In *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 46 (4), pp. 1650–1667. DOI: 10.1159/000489241.

Xie, G.-liang, Zhu, L., Zhang, Y.-min, Zhang, Q.-nan, & Yu, Q. (2017). Change in iron metabolism in rats after renal ischemia/reperfusion injury. *PLOS ONE*, *12*(4). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175945

Xie, Y.; Hou, W.; Song, X.; Yu, Y.; Huang, J.; Sun, X. et al. (2016): Ferroptosis: process and function. In *Cell death and differentiation* 23 (3), pp. 369–379. DOI: 10.1038/cdd.2015.158.

Xu, Wenlong; San Lucas, Anthony; Wang, Zixing; Liu, Yin (2014): Identifying microRNA targets in different gene regions. In *BMC bioinformatics* 15 Suppl 7 (Suppl 7), S4. DOI: 10.1186/1471-2105-15-S7-S4.

Yang, Wan Seok; SriRamaratnam, Rohitha; Welsch, Matthew E.; Shimada, Kenichi; Skouta, Rachid; Viswanathan, Vasanthi S. et al. (2014): Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. In *Cell* 156 (1-2), pp. 317–331. DOI: 10.1016/j.cell.2013.12.010.

Yang, Wan Seok; Stockwell, Brent R. (2008): Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells. In *Chemistry & biology* 15 (3), pp. 234–245. DOI: 10.1016/j.chembiol.2008.02.010.

Yang, X.-Y., Liu, Z.-G., Li, Y., Jiao, J.-H., Long, H., & Xin, Z.-Y. (2020). MicroRNA regulatory pattern in spinal cord ischemia-reperfusion injury. *Neural Regeneration Research*, *15*(11), 2123. https://doi.org/10.4103/1673-5374.280323

Yellon Derek M.; Hausenloy Derek J. (2007): Myocardial Reperfusion Injury. In *N Engl J Med* 70 (357), pp. 1121–1135. DOI: 10.1046/j.0013-0427.2003.00027.x.

Yoda, Mayuko; Kawamata, Tomoko; Paroo, Zain; Ye, Xuecheng; Iwasaki, Shintaro; Liu, Qinghua; Tomari, Yukihide (2010): ATP-dependent human RISC assembly pathways. In *Nature structural & molecular biology* 17 (1), pp. 17–23. DOI: 10.1038/nsmb.1733.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Zhao L, Chen H, Zeng Y, Yang K, Zhang R, Li Z, Yang T, Ruan H. Circular RNA circ_0000712 regulates high glucose-induced apoptosis, inflammation, oxidative stress, and fibrosis in (DN) by targeting the miR-879-5p/SOX6 axis. Endocr J. 2021 Oct 28;68(10):1155-1164. doi: 10.1507/endocrj.EJ20-0739. Epub 2021 May 11. PMID: 33980772.

Zhang, Jiantao; Zhou, Wenli; Liu, Yanyan; Liu, Tao; Li, Chenyao; Wang, Lei (2018): Oncogenic role of microRNA-532-5p in human colorectal cancer via targeting of the 5'UTR of RUNX3. In *Oncology letters* 15 (5), pp. 7215–7220. DOI: 10.3892/ol.2018.8217.

Zhao, L., Chen, H., Zeng, Y., Yang, K., Zhang, R., Li, Z., Yang, T., & Ruan, H. (2021). Circular RNA circ_0000712 regulates high glucose-induced apoptosis, inflammation, oxidative stress, and fibrosis in (DN) by targeting the mir-879-5p/sox6 axis. *Endocrine Journal*, *68*(10), 1155–1164. https://doi.org/10.1507/endocrj.ej20-0739

Zhao, Z. Q.; Nakamura, M.; Wang, N. P.; Velez, D. A.; Hewan-Lowe, K. O.; Guyton, R. A.; Vinten-Johansen, J. (2000): Dynamic progression of contractile and endothelial dysfunction and infarct extension in the late phase of reperfusion. In *The Journal of surgical research* 94 (2), pp. 133–144. DOI: 10.1006/jsre.2000.6029.

Zhao, Z. Q.; Nakamura, M.; Wang, N. P.; Wilcox, J. N.; Shearer, S.; Ronson, R. S. et al. (2000): Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. In *Cardiovascular research* 45 (3), pp. 651–660. DOI: 10.1016/s0008-6363(99)00354-5.

EK AÇIKLAMALAR

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ	**:30.12. 2022**
TOPLANTI SAYISI	**: 170**
DOSYA KAYIT NUMARASI	**: 860-2**
KARAR NUMARASI	**: 860-2**
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	**: Prof. Dr. Ayşe Pınar ÖZTOPCU VATAN**
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	**: Yüksek Lisans Öğrencisi Burak ÖZKAN**
	Prof. Dr. Hakan ŞENTÜRK
	Prof. Dr. Selda KABADERE
	Yüksek Lisans Öğrencisi Beyza KİBAR
HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	**: Spraque Dawley (48 adet erkek)**

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü / Molekküler Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi **Prof. Dr. Ayşe Pınar ÖZTOPCU VATAN'**ın araştırma yürütücüsü olduğu 860-2/2022 kayıt numaralı ve **"Renal iskemi reperfüzyon hasarı ile indüklenen hücre ölümü sırasında ilişkili seçilen miRNA'ların düzeylerinin zamana bağlı değişimlerinin belirlenmesi"** konulu çalışma; Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre değerlendirilmiş ve gerekçede belirtildiği şekilde yapılması uygun bulunmuştur.