Renal İskemi Reperfüzyon Hasarıyla İndüklenen Ferroptozun Lipit Yolağı İle İlişkili miR497, miR3584, miR106b ve miR92a2'nin Ekspresyon Düzeylerinin Farklı İskemi Sürelerine Bağlı Olarak Araştırılması

Beyza Kibar

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Ocak 2023

Investigation of Expression Levels of MiR497, miR3584, miR106b, and miR92a2 Associated with the Lipid Pathway of Ferroptosis Induced by Renal Ischemia-Reperfusion Injury Due to Different Duration of Ischemia

Beyza Kibar

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

January 2023

Renal İskemi Reperfüzyon Hasarıyla İndüklenen Ferroptozun Lipit Yolağı İle İlişkili miR497, miR3584, miR106b ve miR92a2'nin Ekspresyon Düzeylerinin Farklı İskemi Sürelerine Bağlı Olarak Araştırılması

Beyza Kibar

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü
Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Ayşe Pınar ÖZTOPCU VATAN

Ocak 2023

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji Bilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi **Beyza KİBAR'ın** YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Renal İskemi Reperfüzyon Hasarıyla İndüklenen Ferroptozun Lipit Yolağı İle İlişkili miR497, miR3584, miR106b ve miR92a2'nin Ekspresyon Düzeylerinin Farklı İskemi Sürelerine Bağlı Olarak Araştırılması" 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 Tez Savunma Jürisi:

Üye: Prof. Dr. Ayşe Pınar ÖZTOPCU VATAN

Üye: Prof. Dr. Hakan ŞENTÜRK

Üye: Prof. Dr. Gökhan BAYRAMOĞLU

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 İskemi Reperfüzyon Hasarıyla İndüklenen Ferroptozun Lipit Yolağı İle İlişkili miR497, miR3584, miR106b ve miR92a2'nin Ekspresyon Düzeylerinin Farklı İskemi Sürelerine Bağlı Olarak Araştırılması" başlıklı Yüksek Lisans 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.

Bu çalışmanın hayvan deneyleri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK)'nun 860-2 karar numarası ile 30.12.2022 tarihli izni ile gerçekleştirilmiştir. 03/01/2023

Beyza KİBAR

ÖZET

İskemi, herhangi bir faktöre bağlı olarak, doku ve organlara olan kan akışının kısmen veya tamamen kesilmesi durumu olarak tanımlanmaktadır. Doku ve organlara tekrar kan akışı sağlanması reperfüzyon olarak ifade edilmektedir. İskemi durumunda dokular oksijenden yoksun kaldıklarından dolayı hasar durumu meydana gelmektedir, reperfüzyon sürecinde, iskemide meydana gelen hücresel hasar genişlemektedir. Bu süreçte gelişen hasar iskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarı olarak tanımlanmaktadır. İ/R hasarının indüklediği hücre ölüm çeşitlerinden birisi de ferroptozdur. Ferroptotik hücre ölümü sürecinde hücrede gelişen hasarda mikroRNA (miRNA)'ların da rol aldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. miRNA'lar bağlandıkları geni baskılayarak veya yıkıma uğratarak hücre ölümünü düzenleyebilmektedir.

Bu amaçla çalışmamızda, 48 adet Sprague Dawley cinsi erkek albino sıçanlar 6 gruba ayrıldı. İ/R gruplarında, sol böbreğe 30, 45, 60 dakika iskemi, 24 saat reperfüzyon; sham gruplarına cerrahi stres prosedürü ve 24 saat iyileşme süresi sağlandı. Bu süre sonunda anestezi altında böbrek dokusu ve kan örnekleri toplanarak analizler gerçekleştirildi. İ/R hasarı sonucu hücrelerde gelişen ROS seviyesi ELISA metodu ile ALOX15, ACSL4 mRNA, miR497, miR3584, miR106b ve miR92a2'nin ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler ise kantitatif gerçek zamanlı PCR (qPCR) yöntemi ile araştırıldı. Dokuda İ/R hasarına ve iskemi süresine bağlı olarak meydana gelen morfolojik değişiklikler TEM ile incelendi.

ROS düzeyi tayini sonucunda tüm İ/R gruplarında, sham gruplarına göre artış tespit edildi. Böbrek dokusundan TEM görüntülerinde iskemi süresine bağlı olarak değişen şiddette morfolojik değişiklikler gözlendi. ACSL4 ve ALOX15 mRNA ekspresyon düzeyleri tüm İ/R gruplarında anlamlı artış göstermiştir. miR497 ve miR92a2'nin ekspresyon düzeyi tüm zaman aralıklarında İ/R gruplarında anlamlı azalma göstermiştir. miR106b'nin 30 dakika İ/R grubunda sham grubuna göre anlamlı azalma görülmüştür. miR3584'ün ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Renal iskemi reperfüzyon, Ferroptozis, MikroRNA, Reaktif oksijen türleri

SUMMARY

Ischemia is defined as partial or complete cessation of blood flow to tissues and organs, depending on any factor. Restoring blood flow to tissues and organs is expressed as reperfusion. In the case of ischemia, damage occurs because the tissues are deprived of oxygen, during the reperfusion process, the cellular damage that occurs in ischemia expands. The damage that develops in this process is defined as ischemia/reperfusion (I/R) injury. Ferroptosis is one of the types of cell death induced by I/R damage. There are studies showing that microRNAs (miRNAs) also play a role in the damage that develops in the cell during the ferroptotic cell death process. miRNAs can regulate cell death by suppressing or destroying the gene to which they bind.

For this purpose, 48 Sprague Dawley male albino rats were divided into 6 groups in our study. In I/R groups, 30, 45, 60 minutes ischemia, 24 hours reperfusion to the left kidney; The sham groups were provided with a surgical stress procedure and a 24-hour recovery period. At the end of this period, kidney tissue and blood samples were collected and analyzed under anesthesia. The level of ROS in cells as a result of I/R damage was investigated by ELISA method, and changes in expression levels of ALOX15, ACSL4 mRNA, miR497, miR3584, miR106b and miR92a2 were investigated by quantitative real-time PCR (qPCR) method. Morphological changes in the tissue due to I/R damage and ischemia duration were examined by TEM.

As a result of the ROS level determination, an increase was detected in all I/R groups compared to the sham groups. In TEM images of kidney tissue, morphological changes of varying severity were observed depending on the ischemia duration. ACSL4 and ALOX15 mRNA expression levels were significantly increased in all I/R groups. The expression level of miR497 and miR92a2 showed a significant decrease in I/R groups at all time intervals. A significant decrease was observed in the 30-minute I/R group of miR106b compared to the sham group. No significant changes were observed in the expression levels of miR3584.

Keywords: Renal ischemia reperfusion, Ferroptosis, MicroRNA, Reactive oxygen species

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, bilimsel bakış açımın gelişmesini sağlayan, bilimsel çalışmalarımı gerçekleştirmem için her türlü imkânı sunan sevgili danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ayşe Pınar ÖZTOPCU VATAN' a, bu süreçte ki tüm emeği, sabrı, desteği ve samimiyeti için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca değerli bilgi ve deneyimleri ile bana her daim yardımcı olan sevgili hocam Sayın Prof. Dr. Hakan ŞENTÜRK' e bir teşekkürü borç bilirim.

Deneysel çalışmalarımı birlikte yürüttüğüm, zamanını, bilgisini ve deneyimini benimle paylaşarak tüm süreç boyunca bana yardımcı olan değerli arkadaşım Burak ÖZKAN' a teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca bana olan inançlarını ve maddi-manevi desteklerini bir an olsun benden esirgemeyerek her zaman en büyük destekçim olan, başta sevgili annem Gülden KİBAR' a ve sevgili babam Mehmet Ali KİBAR' a, bu süreçte bana olan inancı ve sabrıyla her daim yanımda olan sevgili nişanlım İbrahim BAYTAROĞLU' na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET ..... **vi**

SUMMARY ..... **vii**

TEŞEKKÜR ..... **viii**

İÇİNDEKİLER ..... **ix**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **xii**

ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **xiii**

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xiv**

1.GİRİŞ VE AMAÇ **1**

2.LİTERATÜR ARAŞTIRMASI **3**

2.1. İskemi Reperfüzyon Süreci 3

2.2. İskemi Reperfüzyon İçin Risk Faktörleri 3

2.3. İskemi Reperfüzyon Hasarının Biyokimyasal Mekanizması 4

2.4. İskemi Reperfüzyon Hasarında Oluşan Reaktif Oksijen Türleri 5

2.4.1. Ksantin oksidaz aracılı ROS oluşumu 6

2.4.2. Mitokondriyal elektron taşıma zinciri aracılı ROS oluşumu 7

2.4.3. Monoamin oksidaz aracılı ROS oluşumu 8

2.4.4. NADPH oksidaz 4 (NOX4) aracılı ROS oluşumu 9

2.4.5. Fagositik ve endotel hücre aracılı ROS oluşumu 9

2.5. İskemi/reperfüzyon hasarında hücresel stres çeşitleri 10

2.5.1 Oksidatif stres 10

2.5.2. Nitrozatif stres 10

2.5.3. Kalsiyum aşırı yüklemesi 11

2.6. İskemi/reperfüzyon hasarının neden olduğu hücre ölüm şekilleri 12

2.6.1. Apoptoz 12
2.6.2. Nekroz 13
2.6.3. Otofaji 14
2.6.4. Ferroptoz 15
2.6.4.1 Ferroptoz indükleyicileri 17
2.6.4.2. Ferroptoz mekanizması 18
2.7. miRNA Tarihçesi, Organizmadaki Rolü ve Mekanizması 20
2.8.Böbreğin Yapısı 23
3.MATERYAL VE YÖNTEM 24
3.1. Deney Hayvanları 24
3.1.1. Grupların oluşturulması 24
3.1.1.1. Grup I (Sham grubu, 30 dakika) 24
3.1.1.2. Grup II (Sham grubu, 45 dakika) 25
3.1.1.3. Grup III (Sham grubu, 60 dakika) 25
3.1.1.4. Grup IV (İskemi/reperfüzyon 30 dakika) 25
3.1.1.5. Grup V (İskemi/reperfüzyon 45 dakika) 25
3.1.1.6. Grup VI (İskemi/reperfüzyon 60 dakika) 26
3.2. Anestezi ve Cerrahi İşlemler 26
3.2.1 Anestezi işlemi 26
3.2.2. Cerrahi işlemler 26
3.2.2.1. Nefrektomi 26
3.2.2.2. İskemi/reperfüzyon işlemi 27
3.2.2.3. Kan ve doku örneklerinin toplanması 28
3.3. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) 29
3.4. Biyokimyasal Analizler 30
3.4.1. Dokudan ve serumdan ROS tayini 30
3.5. Moleküler Analizler 31

3.5.1. Total RNA izolasyonu ve miktar tayini 31
3.5.2. RNA'ların cDNA'ya çevrilmesi ve qPCR 32
3.5.3. miRNA izolasyonu ve miktar tayini 33
3.5.4. miRNA'ların cDNA'ya çevrilmesi ve qPCR 34
3.6. İstatistiksel Analizler 36
4.BULGULAR VE TARTIŞMA 37
4.1. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Analizleri 37
4.2. Biyokimyasal Analizler 43
4.2.1. Doku ve serumdan ROS analizi 43
4.3. Moleküler Analizler 46
4.3.1. ACSL4 ve ALOX15 Ekspresyon Düzeyleri 46
4.3.2. miR497 Ekspresyon Düzeyi 49
4.3.3. miR92a2 Ekspresyon Düzeyi 50
4.3.4. miR106b Ekspresyon Düzeyi 52
4.3.5. miR3584 Ekspresyon Düzeyi 53
5.SONUÇLAR VE ÖNERİLER 54
KAYNAKLAR DİZİNİ 55
EK AÇIKLAMA 63
Ek Açıklama-A: Etik Kurul İzni 63

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
2.1.	İskemi/Reperfüzyon hasar mekanizması ……	5
2.2.	Demir ve lipit peroksidasyon yolları ile indüklenen ferroptozis ….	14
2.3.	miRNA oluşum mekanizması ……..	22
2.4.a.	Böbrek yapısı ……	23
2.4.b.	Nefron yapısı …….....	23
3.1.a.	Sağ böbreğin çıkarılıp pens ile tutulması …….	27
3.1.b.	Böbreğin sütur ile boğumlanarak vücuttan ayrılması ……..	27
3.2.a.	Sol böbreğin renal arteri izole edilerek klemp takılması …….	27
3.2.b.	İskeminin gerçekleşmesi ……..	28
3.2.c.	Klemp çıkarılması ve reperfüzyonun gerçekleşmesi ……	28
3.2.d.	Cerrahi bölgenin kapatılması ve kas dikişi ……..	28
3.2.e.	Deri dikişi ……	28
3.3.	Kalpten kan alınması ……	29
4.1.a.	Endoplazmik retikulum yapısı …….	38
4.1.b.	Mitokondri ve krista yapıları ……	38
4.2.	Endoplazmik retikulum düzensizliği. Mitokondrilerin durumu, krista yapıları. Küçük vakoul yapıları ……..	39
4.3.a.	Mitokondri ve endoplazmik retikulum yapılarının durumu …….	39
4.3.b.	Hücre membranı mikrovillus yapıları …….....	40
4.3.c.	Çekirdek zarı ve kromatin yapısı …….....	40
4.4.a.	Endoplazmik retikulum bozulması ve ribozom yapıları. Membran Mikrovillus yapıları ……..	40
4.4.b.	Mitokondrilerin membran geçirgenliği ve krista yapıları ……...	41
4.4.c.	Sitoplazmada yoğun vakoulizasyon ……	41
4.4.d.	Çekirdek zarı ve kromatin yapısı ……	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge **Sayfa**

3.1. Deneysel grupların oluşturulması ……..... 24
3.2.a. Gen qPCR döngü ve sıcaklık koşulları …… 33
3.2.b Genler ve primer dizileri …….. 33
3.3.a. miRNA qPCR döngü ve sıcaklık koşulları ……. 35
3.3.b. miRNA ve primer dizileri ……. 36
4.1.a. Farklı iskemik sürelere maruz kalan sıçan böbrek dokusunda ki ROS düzeyi …….. 44
4.1.b. Farklı iskemik sürelere maruz kalan sıçan serum örneklerinden ROS düzeyi tayini …… 44
4.2. Farklı iskemik sürelere maruz kalan sıçan böbrek dokusundaki ACSL4 ekspresyonu ……. 46
4.3. Farklı iskemik sürelere maruz kalan sıçan böbrek dokusundaki ALOX15 ekspresyonu …….. 47
4.4. miR497 ekspresyon grafiği …….. 49
4.5. miR92a2 ekspresyon grafiği ……. 51
4.6. miR106b ekspresyon grafiği ……. 52
4.7. miR3584 ekspresyon grafiği ……. 53

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklamalar
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
mg	miligram
rpm	Rounds per minute (Dakikadaki devir sayısı)
nm	Nanometre
%	Yüzde
°C	Celcius degree (Santigrat derece)
g	Gravity (Göreceli santrifüj kuvveti)
U	Ünite
mM	Milimolar

Kısaltmalar	Açıklamalar
İ/R	İskemi/Reperfüzyon
Na^+	Sodyum
H^+	Hidrojen
ATP	Adenozin trifosfat
ADP	Adenozin difosfat
AMP	Adenozin monofosfat
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
ROS	Reaktif oksijen türleri
ER	Endoplazmik retikulum
mPTP	Mitokondriyal geçirgenlik geçiş porları
endoG	Endonükleaz G
Smac	Kaspazın ikinci mitokondri kaynaklı aktivatörü
DIABLO	Düşük pI ile apoptoz bağlayıcı proteinin doğrudan inhibitörü
Bcl2	B hücreli lenfoma 2
Bax	Bcl2 ilişkili x proteini
H_2O	Su

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

$O_2^{\cdot}$-	Süperoksit anyonu
H_2O_2	Hidrojen peroksit
OH^-	Hidroksil
CAT	Katalaz
SOD	Süperoksit dismutaz
GPX	Glutatyon peroksidaz
Ca^{+2}	Kalsiyum
DNA	Deoksiribo nükleik asit
ETZ	Elektron taşıma zinciri
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid
SDH	Süksinat dehidrogenaz
FMN	Flavin mononükleotid
RET	Ters elektron transferi
MAO	Monoamin oksidaz
SIP	Sfingosin-1-fosfat
NOX	NADPH oksidaz
SIPS	Stres aracılı erken yaşlanma hücresi
PMNL	Polimorf çekirdekli lökositler
IL	İnterlökin
IFN	İnterferon
TNF	Tümör nekroz faktör
ESR	Elektron spin rezonans
RNS	Reaktif nitrojen türleri
NO^-	Nitroksil anyonu
RNOS	Reaktif nitrik oksit türleri
-SH	Sülfidril
$ONOO^-$	Peroksinitrit
NO_2	Nitrojen dioksit
O_2NOO^-	Peroksinitrat
O^2NOOH	Peroksinitrik asit
NO^+	Nitrozonyum

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

NO_3^-	Nitrat
NO_2^-	Nitrit
Bak	Bcl2 homolog antagonist katil
PUMA	Apoptozun p53 yukarı regüle edilmiş modülatörü
HTR2	Yüksek sıcaklık gereksinim faktörü A2
APAF	Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1
FasL	Fas ligandı
TRAIL	Tümör nekroz faktör ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand
TNFR	Tümör nekroz faktör reseptörü
FADD	Fas ile ilişkili ölüm alanı
IAP	Apoptoz inhibitör protein
BID	BH3 etkileşim alanlı ölüm agonisti
RIP	Reseptör etkileşimli protein
RHIM	RIP homotipik etkileşim motifleri
IP	İnositol fosfat
MLKL	Karışık kinaz benzeri protein
PIP	Fosfotidilinositol fosfat
KFERQ	Lizin, fenilalanin, glutamik asit, arjinin ve glutamin amino asit dizisi
HSC	Isı şok proteini
Lamp-2	Lizozomla ilişkili membran proteini 2
ULK	Unc51 benzeri kinaz
Atg	Otofaji ilişkili protein
FAK	Fokal adezyon kinaz
FIP200	FAK etkileşimli protein 200
ACSL4	Asil-coA sentetaz uzun zincirli aile üyesi 4
GSH	Glutatyon
Sistem xc-	Sistin glutamat antiporter
Fe^{2+}	Ferrus iyon
p53	Tümör proteini 53
ARNTL	Aril hidrokarbon reseptörü nükleer translokatör benzeri protein1
DAMP	Hasarla ilişkili moleküler model

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Cys2	Sistein
IREB2	Demire duyarlı element bağlayıcı protein 2
ACSF2	Asil coA sentetaz ailesi üyesi 2
VDAC	Voltaja bağımlı anyon kanalı
RSL	Ras seçici öldürücü
BSO	Butiyoninsülfoksimin
Fe^{3+}	Ferrik iyon
TRF	Transferrin reseptörü
STEAP3	Altı transmembran prostat antijeni 3
DMT1	İki değerlikli metal taşıyıcı
PUFA	Çoklu doymamış yağ asitleri
ALOX15	Araşidonat lipoksioksigenaz 15
NRF2	Nükleer faktör eritroid 2
Keap1	Kelch benzeri ECH ilişkili protein 1
ARE	Antioksidan yanıt elemanı
mRNA	Haberci RNA
miRNA	Mikro RNA
RNA	Ribonükleik asit
UTR	Kodlamayan bölge
TRBP	TAR RNA bağlayıcı protein
PACT	PKR protein aktivatörü
RISC	RNA kaynaklı susturma kompleksi
TEM	Geçirimli elektron mikroskobu
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
OsO_4	Osmium tetroksit
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
qPCR	Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
cDNA	Komplementer DNA
GER	Granüllü endoplazmik retikulum
UPR	Katlanmamış protein cevabı
PE	Fosfatidiletanolamin

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

MDA	Malondialdehit
LOX	Lipoksioksigenaz
4-HNE	4-Hidroksinonenal

1.GİRİŞ VE AMAÇ

İskemi bir organa giden kan akışının çeşitli faktörler nedeniyle azalması veya kesilmesi durumu olarak tanımlanmaktadır. Reperfüzyon süreci ise organa olan kan akışının ve oksijenlenmenin tekrar sağlanması olarak ifade edilmektedir (Kar vd., 2019). İskemi sürecinde oksijenden yoksun kalan dokularda hasar ve birbirini izleyen kimyasal süreçler sonucu hücre ölümü meydana gelebilmektedir. İskemi sürecinde gelişen ve reperfüzyon sağlanması ile genişleyen bu hasar iskemi/reperfüzyon hasarı olarak belirtilmiştir. (Özcan vd., 2015).

İskemik durumda endoplazmik retikulum tarafından kalsiyum geri alımı sınırlandığından hücre içi kalsiyum artışı görülmektedir. Artan sitozolik kalsiyum ile mitokondride kalsiyum artışı gerçekleşmektedir. Buna bağlı olarak mitokondriyal şişme ve mitokondriyal geçiş gözeneklerinde (mPTP) genişleme meydana gelmektedir. mPTP'lerin genişlemesi pro-apoptotik yapıların sitoplazmaya salınmasına neden olmaktadır. Bunu yanı sıra elektrokimyasal gradientin kaybına, serbest oksijen radikallerinin salınmasına ve oksidatif strese neden olmaktadır. İskemik koşullarda antioksidan savunma sistemi doğru bir şekilde çalışamamakta ve ortamda serbest radikal seviyesi giderek yükselmektedir. İskemi koşullarında işlevi bozulan mitokondri tarafından reaktif oksijen türü (ROS) üretimi belirgin bir şekilde artmaktadır (Dorweiler vd., 2007; Gourdin ve Dubois, 2013).

Ferroptoz hücrede demir birikimine bağlı gelişen lipit peroksidasyonunun neden olduğu ROS üzerinden gerçekleşen bir hücre ölüm çeşididir (Nirmala ve Lopus, 2020). Son yıllarda İ/R hasarının neden olduğu hücre ölüm biçimlerinden biri olarak araştırmaları devam edilmektedir (Lorenzen vd., 2014). MikroRNA'lar küçük kodlama yapmayan gen düzenleyici diziler olarak 1993 yılında keşfedilmişlerdir. Yaklaşık 20 nükleotid uzunluğunda olan miRNA'lar hedef genlerine direkt olarak bağlanarak bu genlerin ifadelerini baskılayabilmekte veya genleri yıkıma uğratabilmektedir (Almeida vd., 2011). Ferroptozda görevli genlerin ekspresyonlarının miRNA'lar tarafından düzenlenmesi üzerine çalışmalar devam etmektedir. Ancak renal İ/R hasarının indüklediği ferroptozda görevli genlerin miRNA'lar tarafından düzenlenmesi üzerine çalışmalar yeterli seviyede değildir.

İ/R hasarının meydana geldiği dokuda karakteristik morfolojik değişiklikler meydana gelmektedir. Bununla birlikte hücrelerde gelişen ferroptozun da neden olduğu bazı morfolojik değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Morfolojik olarak ferroptoz, hücrelerde mitokondriyal hacmin azalması, mitokondriyal kristanın azalması veya kaybolması, hücre zarının yoğunlaşması ile ayırt edilmektedir. Ancak hücre zarı sağlam kalırken, çekirdek normal boyuttadır ve kromatin konsantrasyonu yok olmaktadır (Nirmala ve Lopus, 2020).

Çalışmamızda sıçanlarda farklı iskemi sürelerine bağlı olarak oluşturulan renal İ/R hasarının indüklediği ferroptozun neden olduğu morfolojik, biyokimyasal değişikliklerin araştırılması ve ferroptozun lipit yolağında görevli genlerden olan ACSL4 ve ALOX15 ile ilişkili miR497, miR3584, miR92a2 ve miR106b'nin ekspresyon düzeylerinin araştırılması hedeflenmiştir.

2.LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. İskemi Reperfüzyon Süreci

Organ ve dokulara ulaşan kan akışının herhangi bir sebebe bağlı olarak belirgin bir şekilde azalması veya tamamen kesilmesi durumu **'iskemi'** olarak ifade edilmektedir. İskeminin nedeni kan akışını bozan herhangi bir faktörden kaynaklanıyor olabildiği bilinmektedir. Vasküler tromboz, alıcı veya donör damarda önceden var olan bir hastalık, arteriyel hipertansiyon veya hiper pıhtılaşma gibi sistemik problemlerin sonucu olabildiği bildirilmiştir (Kerrigan ve Stotland, 1993). İskemik durumda olan doku oksijenden yoksun kalmakta ve bu sürece bağlı olarak dokuda hasar veya nekroz oluşmaktadır. Doku ve organlarda iskemi sonrası kanlanmanın tekrar sağlanması **'reperfüzyon'** olarak ifade edilmektedir ve iskeminin yol açtığı hasarın genişlemesine neden olduğu tespit edilmiştir. Bu hasar durumu genel olarak iskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarı olarak adlandırılmaktadır (Özcan vd., 2015). İskemik hasar temel olarak oksijenden yoksun hücre ölümüne bağlıyken, reperfüzyon hem lokal hasarı artıran hem de sistemik hasara yol açan geniş bir dizi inflamatuvar yanıt üretmektedir (Dorweiler vd., 2007). İ/R hasarının sebep olduğu lokal ve sistemik etkilerin miyokard enfarktüsü, iskemik inme, dolaşım durması, akut böbrek hasarı, inme, orak hücre hastalığı ve uyku apnesi gibi çeşitli hastalıkların morbidite ve mortalitesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. İ/R hasarı ayrıca organ nakli ve majör cerrahi girişimleri sırasında oldukça zorluk çıkarmaktadır (Özcan vd., 2015; Kalogeris vd., 2012; Eltzschig ve Eckle 2011).

2.2. İskemi Reperfüzyon İçin Risk Faktörleri

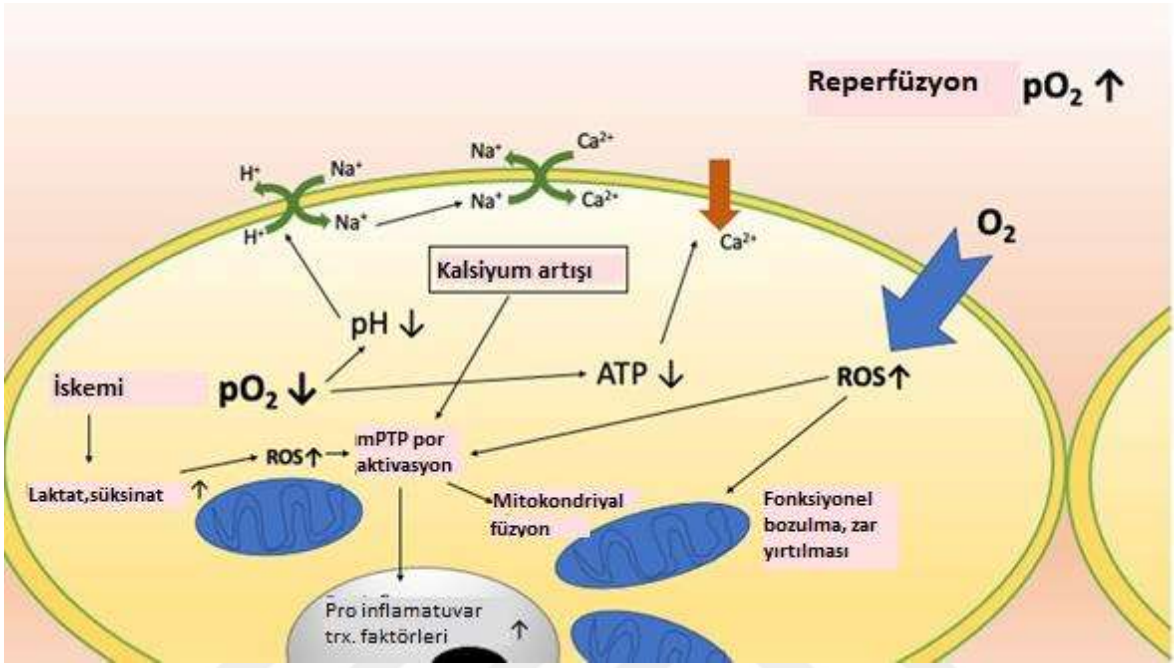
Klinikte görülen iskemik atakların büyük bir kısmı tromboembolik veya aterotrombotik kan akışını tıkayan hastalıklarla görülmektedir. Başlıca risk faktörleri; ilerleyen yaş, cinsiyet ve kalıtsal faktörler olarak gösterilmektedir. Bunların yanında; tütün ürünleri kullanımı, hiperlipidemi, hipertansiyon, fiziksel hareketsizlik, obezite, metabolik sendrom ve diabetes mellitus başlıca risk faktörleri arasında yer almaktadır ancak bunların kontrol edilebilir ve kritik durumu değiştirilebilir bir kategori olduğu bildirilmiştir. Akut

veya kronik olarak etanol alınması da, miyokard enfarktüsü dolayısıyla iskemik inme riskini arttırıcı etkiye sahip olmaktadır (Kalogeris vd., 2012).

2.3. İskemi Reperfüzyon Hasarının Biyokimyasal Mekanizması

İskemi sırasında, hücre pH'ında bir düşüşe neden olan anaerobik metabolizma hakim olmaktadır. Bu hidrojen iyonları birikimini tamponlamak için, sodyum/hidrojen (Na^+ /H^+) değiştirici, fazla hidrojen iyonları salgılamakta ve bu da büyük miktarda sodyum iyonu akışı üretmektedir (Sanada vd., 2011). İskemi sırasında, normalde adenozin trifosfat (ATP) üreten proton değiştiren ATP sentazın, bir ATPaz olduğu ve matristen membranlar arası boşluğa proton pompalamak ve mitokondriyal membran potansiyelini korumak için ATP tükettiği ortaya koyulmuştur. Mitokondri bu nedenle anaerobik glikoliz tarafından üretilen ATP tüketim bölgesi haline gelmektedir (Gourdin ve Dubois, 2012). ATP, adenozin difosfat (ADP) ve adenozin monofosfat (AMP) yoluyla adenozine ve son olarak hipoksantine indirgenmektedir. Fizyolojik koşullar altında, hipoksantin, nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) tüketimi ile ksantin dehidrojenaz enzimi tarafından ksantine dönüştürülmektedir. Bununla birlikte, iskemik koşullar altında, ksantin dehidrojenazın (D-formu), reaktif oksijen türleri (ROS) üretebilen ksantin oksidaza (O-formu) konformasyonel bir değişime uğradığı çalışmalarda gösterilmiştir (Dorweiler vd., 2007). İskemi durumu endoplazmik retikulum (ER) tarafından kalsiyumun geri alımını sınırlamaktadır, böylece hücrede aşırı kalsiyum yüklenmesine neden olmaktadır (Kalogeris vd., 2012). Hücre içi kalsiyum artışı ile ksantin oksidaza konformasyonel değişiklik desteklenmektedir (Dorweiler vd., 2007). İskemik hücrede yüksek sitozolik kalsiyum, mitokondride kalsiyum birikmesine izin vermekle birlikte mitokondriyal şişmeyi ve geçirgenlik geçiş gözeneklerinin (mPTP) genişlemesini desteklemektedir. mPTP'lerin açılması mitokondriyal membran potansiyelini ortadan kaldırmaktadır ve mitokondri içi proteinler, endonükleaz G (endoG), kaspazın ikinci mitokondri kaynaklı aktivatörü/düşük pI ile apoptoz bağlayıcı proteinin doğrudan inhibitörü (Smac/DIABLO) ve apoptozu indükleyen proapoptotik bir B hücreli lenfoma 2 (Bcl2) ailesi üyesi protein olan, Bcl2 ilişkili x proteini (Bax) sitozolden dış mitokondriyal membrana translokasyonunu başlatmaktadır. Bunun, mitokondriyal şişmeye neden olduğu ve sitokrom c'nin efektör kaspazları aktive ettiği ve apoptozu başlattığı sitozole geçirgenlik geçiş gözeneklerinin açılması yoluyla dışa akışı indüklediği çalışmalarda gösterilmiştir (Gourdin ve Dubois, 2012). Şekil 2.1'de belirtildiği gibi mPTP'lerin açılması proapoptotik yapıların

salıverilmesinin yanı sıra elektrokimyasal gradientin kaybına, serbest oksijen radikallerinin salıverilmesine de neden olmaktadır ve oksidatif stres meydana gelmektedir (Songur, 2015).



Şekil 2.1. İskemi/reperfüzyon hasar mekanizması (Patel vd., 2021)

2.4. İskemi Reperfüzyon Hasarında Oluşan Reaktif Oksijen Türleri

İ/R durumunda oksijen metabolizmasının çok iyi düzenlenmiş homeostazında değişiklikler olduğu ve ortamda oldukça reaktif oksijen türleri biriktiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Normal şartlarda mitokondride oksijenin %95'i herhangi bir serbest ara ürüne dönüşüm olmaksızın suya (H_2O) direkt olarak indirgenmektedir. Kalan %5'lik kısımda süperoksit anyon ($O_2^{\cdot-}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi serbest radikallerin üretildiği ve katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPX) yolları ile H2O'ya indirgenmektedir. İskemik koşullarda antioksidan savunma sistemi doğru bir şekilde çalışamamakta ve H_2O_2 seviyesi giderek yükselmektedir. Buna bağlı olarak hücresel membranlara ve proteinlere doğrudan zarar veren ve ayrıca erken lipit peroksidasyonunu indükleyem hidroksil (OH^-) radikalinin daha fazla üretilmesine neden olmaktadır. İskemi koşullarında işlevi bozulan mitokondri tarafından ROS üretimi belirgin bir şekilde artmaktadır (Dorweiler vd., 2007). Dokuda reperfüzyon sonrası oksijen seviyesi

normale dönse bile reaktif oksijen türlerinin artışı devam etmektedir. Proinflamatuar nötrofiller iskemik hasarı arttırmak için bu dokulara doğru hareket etmektedir (Kalogeris vd., 2012). İ/R hasarından başlıca sorumlu olan reaktif oksijen türlerinin başlıca 5 oluşum mekanizması olduğu yapılan çalışmalarda ortaya çıkarılmıştır.

2.4.1. Ksantin oksidaz aracılı ROS oluşumu

İskemi sırasında mitokondriyal ATP üretimi durur ve mevcut olan ATP de katabolize olarak sırasıyla ADP, AMP, adenozin, inozin ve son olarak hipoksantin açığa çıkarmaktadır. Mitokondrideki ATP üretiminin durması ve var olan ATP'nin de yıkılması ile oluşan enerji kaybı nedeniyle membran üzerinde bulunan enerji bağımlı iyon pompalarında işlev bozukluğu ve hücre içi anaerobik faza geçişe yönelim görülmektedir. Hücre içi pH, laktat ve hidrojen birikimi nedeniyle düşmekte ve asidoz oluşmaktadır. Hücre içinde artan hidrojen yükünü dengelemek için $NA^{+}H^{+}$ pompası aracılığıyla fazla hidrojen dışarı pompalanırken sodyum/kalsiyum ($Na^{+}Ca^{+2}$) pompası ile iç ortama kalsiyum pompalanmaktadır. Endoplazmik retikulumun da hasarlanması ile kalsiyum salınımı meydana gelmektedir ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artışına katkıda bulunmaktadır. İntraselüler kalsiyum konsantrasyonu artışından dolayı kalsiyum bağımlı sitozolik proteazlar aktive olmaktadır. Aktive olan proteazlar hipoksantin dehidrogenaz enzimini ksantin oksidaza çevirmektedirler. Reperfüzyon ile dokuya gelen oksijen, ksantin oksidaz tarafından oksidaz olarak kullanılmakta ve hipoksantini önce ksantine sonra üreik asite çevirmektedir. Ürün olarak reaktif oksijen türlerinden biri olan $O_2^{\cdot-}$ oluşmaktadır. Normal fizyolojik şartlarda süperoksit anyonu SOD aracılığıyla önce hidrojen peroksite, ardından CAT aracılığıyla suya dönüşmektedir. İ/R hasarında ksantin oksidaz aracılı oluşan süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit, antioksidan savunma sistemi sağlıklı şekilde işleyiş gösteremediği için ortamdan tam olarak temizlenememektedir. H_2O_2 daha sonrasında Fenton ve Haberweiss reaksiyonları ile en güçlü radikal olarak kabul edilen hidroksil radikalini oluşturmaktadır. Hücre içinde reaktif oksijen türlerinin bu artışı; hücre membranındaki lipit yapılarda hasar meydana getirmektedir, intraselüler proteinlerin yapı ve fonksiyonlarında bozulmaya ve deoksiribo nükleik asit (DNA) yapısında hasara yol açarak hücre zedelenmesine neden olmaktadır (Özcan vd., 2015).

2.4.2. Mitokondriyal elektron taşıma zinciri aracılı ROS oluşumu

İskemi sırasında sitokrom c oksijeninin tamamını hızlı bir şekilde tüketemediğinden iskeminin erken döneminde ortamdaki oksijen varlığından dolayı mitokondriyel ROS artabilmektedir. Dokuda devam eden anoksi sırasında ROS üretimi durmaktadır bu yüzden iskemi fazında reaktif oksijen türlerinin iskemik hasara katkısı iskeminin süresine bağlı olmaktadır. Elektron taşıma zincirinde (ETZ) kompleks I iskemi sırasında konformasyonel bir değişiklik ile deaktive formuna getirilmiştir ve aktivitesi inhibe edilmiştir. Bu durumda hem ileri elektron akışını hem de ters elektron akışını inhibe edeceği için ROS oluşumu bloke olmaktadır. Kompleks II aktivitesi iskemik bozulmalara karşı oldukça direnç gösterebilirken kompleks III ve kompleks IV aktivitelerinde azalma görülmüştür ancak bu azalmalar direkt olarak kompleks yapısındaki değişiklikten çok, kardiyolipin azalmasından kaynaklanmaktadır. İskemik durumda mitokondriden sitokrom c kaybı ve sitokrom c için bağlanma bölgeleri barındıran kardiyolipin kaybını da teşvik edebilmektedir. Böylece paralel bir biçimde sitokrom c ve kardiyolipin kaybı görülmektedir. Pro-apoptotik sinyalleşme ve mPTP'lerin açılması nedeniyle de sitokrom c kaybı meydana geldiği düşünülmektedir. Dokuda reperfüzyon sağlandığında enerji substratları ve oksijen varlığı ortamda artmaya başladığı için oksidatif metabolizma devreye girmekte ve mitokondri aktivitesi artmaktadır. ETZ de iskemi sırasında yaşanan sitokrom c kaybı, kardiyolipin azalması ve kompleks değişimleri gibi durumlar reperfüzyon sırasında daha şiddetli bir şekilde devam edebilmektedir. ETZ'ye zarar verdiğinden veya düşük ATP talebi nikotinamid adenin dinükleotidin (NADH) birikmesine neden olduğunda $\%O_2$ oluşum oranı arttığı için, ETZ komplekslerinin azaltılması, elektronların $\%O_2$ 'ini oluşturmak için ETZ' den bir şekilde iletilmeleri olasılığını arttırmaktadır ve böylece reperfüzyon sırasında sürekli olarak artan ve ETZ ile ilgili ROS üretimi hakkında bir açıklama sağlanmaktadır. Kompleks I'in reperfüzyon sürecinde reaktif oksijen türlerinin üretimi için bir merkez olduğu düşünülmektedir. Bunun nedeni kompleks I'in seçici farmakolojik engellemesi olarak öne sürülmüştür. Kompleks III'de belirli bir miktarda ROS üretimi görülmektedir. Kardiyolipin, ETZ'de Kompleks I/III/IV aktivitesini sürdürmek için gerekli olduğundan, ROS kaynaklı kardiyolipin kaybı, bozulmuş ETZ aktivitesine ve ROS oluşumuna katkıda bulunmakta ve bu nedenle ROS'un kendi üretimini güçlendirdiği bir mekanizmayı temsil edebilmektedir. Sitokrom c'nin iç mitokondri membranıyla etkileşiminin bozulması ile kompleks IV'ten önceki ETZ'de indirgenmiş ve oksitlenmiş bileşen sayısı artışına neden

olmuştur. Bu durumun reperfüzyon sırasından mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin artışına neden olduğu düşünülmektedir (Bugger ve Pfeil 2020). Yapılan başka bir araştırmaya göre süksinat dehidrogenaz (SDH) normal işleyişinin tersi bir şekilde çalışarak fumaratı süksinata dönüştürdüğü ve süksinat birikimine neden olduğu gösterilmiştir. Reperfüzyon fazında SDH'nin tekrar normal işleyişine dönmesiyle süksinatı hızlı bir şekilde fumarata okside ederek, kompleks II'de ki koenzim Q havuzunun hızlı bir şekilde azalmasına ve kompleks I'in flavin mononükleotid (FMN) bölgesine elektron transferine neden olmaktadır. FMN bölgesinde ters elektron transfer (RET) aracılı ROS üretimi artmaktadır (Chouchani vd., 2016).

2.4.3. Monoamin oksidaz aracılı ROS oluşumu

Monoamin oksidazlar (MAO) dış mitokondriyel membranda yer alan, nörotransmitterlerin ve bazı biyojenik aminlerin oksidatif deaminasyonundan sorumlu bir flavoenzim olarak tanımlanmaktadır. MAO-A ve MAO-B olmak üzere substrat özgüllüğü ve inhibitör duyarlılığı açısından farklılık gösteren iki izoformu gösterilmiştir. MAO çoğunlukla nörodejeneratif hastalıklardaki etkileri ile bilinmektedir ancak bunun yanı sıra özellikle MAO-A'nın İ/R kaynaklı miyokard hasarında önemli rol oynadığı gösterilmiştir. MAO'ya bağlı ROS üretimi için birkaç farlı yol açıklanmıştır. İn vitro olarak serotoninin neden olduğu miyosit hipertrofisi MAO bağlı ROS artışına sebep olabilmektedir. Ayrıca MAO-A, seramid birikimi ile ROS'a bağlı sfingosin kinaz inhibisyonu yoluyla hücre apoptozunu teşvik edebilmektedir. MAO-A aracılı ROS üretiminin metalloproteinaz MMP-2'nin aktivasyonu ile düz kas hücrelerinde mitojenik sinyalleşmeyi indüklediği belirtilmiştir (Di Lisa vd., 2009). MAO-A'nın kardiyomiyosit seçici aşırı ekspresyonu H_2O_2 oluşumunu arttırır ve mitokondriyal kusurlar, ATP tüketilmesi ve mitokondriyal DNA oksidasyonu ile sonuçlanmaktadır. H_2O_2 oluşumundaki artışın, kalp yetmezliği ve vasküler değişiklikler gibi yaşlanmayla ilişkili patolojilere katkıda bulunabileceği de belirtilmiştir. Başka bir çalışma, MAO-A tarafından üretilen ROS'un, sfingosin kinazın inhibisyonunu, sfingosin-1-fosfatın (S1P) degradasyonunu ve İ/R sırasında kardiyak miyositlerde seramid birikimini indüklediğini gösterilmiştir (Bugger ve Pheil, 2020).

2.4.4. NADPH oksidaz 4 (NOX4) aracılı ROS oluşumu

NADPH oksidazlar (NOX) zara bağlı enzimlerin bir ailesi olarak tanımlanmaktadır ve süperoksit üretimi için ortamda yeterli O_2 bulunduğunda alt birimlerini işlevsel bir birim ile birleştirmektedir. İnsanlarda 7 izoformu tanımlanmıştır, NOX4 mitokondri dış zarında bulunmaktadır. Bir araştırmaya göre NOX2 veya NOX4'ün knock-out edildiği farelerde İ/R sonrası miyokardiyal hasar daha az görülmüştür (Bugger ve Pheil, 2020). Bir başka çalışmada oksidatif stres veya DNA hasarına neden olan fiziksel veya kimyasal maddelerden gelen gerilime normal, ölümsüz veya dönüştürülmüş hücrelerin maruz kalmasından sonra ortaya çıkan stres aracılı erken yaşlanma (SIPS) hücrelerinde İ/R'nin NOX4'ün ekspresyonunu SIPS için arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca NOX4'ün radyasyon aracılı yaşlanan hücrelerde ROS üretimini teşvik ettiği belirlenmiştir (Sakai vd., 2018).

2.4.5. Fagositik ve endotel hücre aracılı ROS oluşumu

İskemi reperfüzyon esnasında dokuda meydana gelen inflamasyon ile endotel hücreleri, makrofaj ve mast hücreleri tarafından salınan pro-inflamatuvar mediatörler polimorf çekirdekli lökositlerin (PMNL) ilgili bölgeye migrasyon ve adhezyonuna yol açmaktadır. Yapılan çalışmalarda beyin, kalp, karaciğer, böbrek ve akciğer gibi organlarda İ/R hasarına bağlı olarak nötrofillerin artışı tespit edilmiştir. Normal fizyolojik şartlarda makrofaj, nötrofil vb. fagositik lökositler ROS'un tetiklediği inflamatuvar mediyatörler aracılığı ile aktive olmaktadırlar ve solunumsal patlama olarak adlandırılan mekanizmayla oksidan mediyatörler üretmektedirler. Fagositik hücrelerde inflamatuvar mediyatörler aracılı aktivasyonunda ROS üretiminden sorumlu başlıca enzim NOX olarak gösterilmektedir. NOX aracılığıyla üretilen süperoksitler, süperoksit dismutaz aracılığı ile iki farklı şekilde dönüştürülmektedir. İlk seçenekte önce hidrojen peroksite ve sonrasında miyeloperoksidaz etkisi ile de hipokloröz asite dönüştürülebilmektedir. İkinci seçenek olarak Fenton reaksiyonu ile hidroksil radikaline dönüştürülmekte ve ortama salınmaktadır. PMNL kaynaklı artan ROS üretimi, reperfüzyon hasarında başlıca rol oynamaktadır. PMNL'den ayrıca interlökin (IL) 1, IL-6, IL-12, interferon (IFN) γ ve tümör nekroz faktör (TNF) α gibi sitokin ve kemokinler ile elastaz ve kollejenaz gibi proteazlar salınarak bölgeye daha fazla inflamatuvar hücre adhezyonuna ve daha fazla reaktif oksijen türü üretimine yol açmaktadır (Özcan vd., 2015).

2.5. İskemi/reperfüzyon hasarında hücresel stres çeşitleri

2.5.1 Oksidatif stres

Metabolik işleyiş sırasında başlıca peroksitler (L vd.,2016) ve aşırı miktarda ROS üretimiyle antioksidan sisteminin etkinliğinde yetersizlik meydana gelmesiyle dokuda patolojik hücre hasarı meydana gelmektedir ve bu durum **'oksidatif stres'** olarak adlandırılmaktadır (Bozok vd., 2021). Oksidatif stres üretimi enzimatik veya enzimatik olmayan kaynaklardan dolayı meydana gelebilmektedir. Enzimatik kaynaklar arasında yaygın olarak NADPH oksidaz sistemi, elektron taşıma zinciri ve bağlanmamış nitrik oksit sentaz sistemleri yer almaktadır. Oksidatif stres oluşumunda enzimatik olmayan kaynakların daha azınlıkta olduğu ve bunların içerisinde özellikle ekstremite yaralanmalarında hemoglobin ve miyoglobin bu grup içerisinde olduğu aktarılmıştır (Yu Wu vd., 2018). Oksidatif stres çeşitli lokalitelerde iskemi reperfüzyon hasarı dahil birçok hastalığın patogenezinde önemli rol oynamaktadır. Hücrede aşırı üretilen ROS DNA, RNA ve lipitler başta olmak üzere tüm hücresel bileşenlere ağır hasar vermektedir (Lin L. vd., 2016). Yapılan bir çalışmada sıçanlarda çalışılan serebral iskemi reperfüzyon hasarı nedeniyle sıçan beyninde oluşan ROS elektron spin rezonans (ESR) spektroskopisi ile saptanmıştır (Yamato vd., 2003). Reperfüzyonu takiben aşırı ROS üretimi mitokondride başlar ve bu durum mitokondride oksidatif strese yol açmaktadır. Mitokondriyal ROS akut bir durum olmakla kalmaz reperfüzyon süresini takiben bir patoloji oluşturmaktadır (Chouchani vd., 2016). ROS üretimi artışını takiben bir dizi hücresel disfonksiyonlar meydana gelmekte ve hücresel yapı bütünlüğü bozulmaktadır. Normal süreçte antioksidan sistemi ROS oluşumu ve yıkımı arasında denge sağlayarak hücresel yapı ve işleyişin devam etmesini sağlamaktadır (Bozok vd., 2021). ROS artışından kaynaklanan oksidatif strese karşı birincil koruma antioksidan enzimleri olan SOD ve H_2O_2'yi su ve oksijene parçalayan CAT tarafından sağlanmaktadır (Kryl'skii vd., 2019).

2.5.2. Nitrozatif stres

Nitrozatif strese farklı bir serbest radikal türevi olan, eşlenmemiş elektron içeren ve merkez atomuna göre adlandırılan reaktif nitrojen türleri (RNS) neden olmaktadır. Nitrozatif streste oksidatif stres gibi içerisinde yaşadığımız oksijen ve nitrojen bakımından zengin ortamda metabolizmanın doğal bir yan ürünü olarak görülmektedir. RNS'ler yüksek

reaktif moleküller olduğu için nükleik asitler, aminoasitler ve lipitler yüksek riske sahip bileşenle olarak bildirilmiştir (Gielis vd., 2017). Nitroksil anyonu (NO^-) başlıca RNS olarak tanımlanmıştır. NO'dan türetilen RNS molekülleri nitrozatif stres yoluyla İ/R hasarında rol oynamaktadırlar (Kalogeris vd., 2016). ROS ve RNS molekülleri arasında meydana gelen etkileşimler sonucu prooksidan peroksinitrit gibi güçlü reaktif nitrik oksit türleri (RNOS) meydana gelmektedir. RNOS'ler İ/R hasarının boyutunu belirlemede kritik rol oynamaktadır. İ/R sürecinde RNOS'nin zararlı etkileri arasında makromoleküllerin modifikasyonu ve hasar görmesi, hasarlı doku kapsamında; endotelyal ya da parankimal hücrelerin ölümünün indüklenmesi, proinflamatuvar mediyatörler üretiminin ve ortama salınmasının indüklenmesi yer almaktadır (Kalogeris vd., 2012; Kalogeris vd., 2016). Reaktif nitrojen türleri düşük konsantrasyonlarda hücreleri pro-apoptotik etkilerden koruyabilirken, yüksek konsantrasyonlarda ise hücrelerde oksidatif stresin oluşumuna önlemek konusunda kritik role sahip sülfidril (-SH) grubu içeren tiyollerin redoks devrelerinin düzensizleşmesine sebep olmaktadır. RNS'ler hücre içi organellere rahat bir şekilde ulaşabilen ve yüksek hızda reaksiyona girebilen stabil maddeler olduklarından dolayı, hücre membranlarında, proteinlerde, mitokondride, endoplazmik retikulumda, nükleik asitlerde ve enzimlerde geri dönüşümsüz hasara (Gielis vd., 2017) ve bunun sonucunda nekroz aracılı hücre ölümüne yol açmaktadırlar. RNS'lerin oluşturduğu hücresel hasar sürecinden hücre ölümüne kadar olan olaylar zincirine nitrozatif stres denmektedir. Başlıca reaktif nitrojen türleri şu şekilde sıralanabilmektedir; peroksinitrit ($ONOO^-$), nitrojen dioksit (NO_2), peroksinitröz asit (HNO_3), dinitrojen trioksit (N_2O_3), nitroksil (HNO), peroksinitrat (O_2NOO^-), peroksinitrik asit (O_2NOOH), nitrozonyum katyon (NO^+), nitrat (NO_3^-), nitrit (NO_2^-) ve NO^- (Bozok vd., 2021).

2.5.3. Kalsiyum aşırı yüklemesi

Mitokondri fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerde birçok önemli role sahip bir organel olarak tanımlanmaktadır. İ/R hasarında ise ROS üretiminin yanı sıra apoptoz ve nekroz gibi hücre ölüm süreçlerine de aracılık etmektedir. İskemi süreci sonucu reperfüzyon mitokondri iç zarında spesifik olmayan mPTP'lerin açılması ve hücre içine Ca^{+2} akışı mitokondrinin şişmesine, membran bütünlüğünün bozulmasına ve ardından hücre nekrozuna ilerleyen bir sürece neden olmaktadır (L vd., 2016). Hücre içi kalsiyum aşırı yüklenmesi ile kalpain aktive olmaktadır ve Na/K ATP-hidrolazın sitoplazmaya transloke

olmasına neden olmaktadır. Mitokondri membran bütünlüğünün korunabilmesi için Ca^{+2} matrixte tutulması gerekmektedir. Kalsiyum aşırı yüklenmesi ile mitokondride Kompleks I'in (NADH-koenzim Q) erken inhibisyonuna neden olan a33 oksidasyonu meydana gelmektedir. Uzayan iskemi reperfüzyon durumunda Kompleks III ve Kompleks IV de kalsiyum aşırı yüklenmesinden olumsuz etkilenmektedir (Kosieradzki ve Rowinski, 2008).

2.6. İskemi/reperfüzyon hasarının neden olduğu hücre ölüm şekilleri

2.6.1. Apoptoz

Hücre membranında kabarcıklanma, nükleusun parçalanması, hücrenin büzülmesi ve kromatinin yoğunlaşması gibi morfolojik özellikler ile karakterize olan apoptoz kaspazların aktivasyonu yönünden iki farklı yol ile meydana gelebilmektedir (Kalogeris vd., 2016). İntrinsik ve ekstrinsik sinyal kaskatları apoptozun meydana gelme şekilleri olarak gösterilmiştir. İntrinsik yol genellikle hücre içi homeostazın bozulması sonucu meydana gelirken, ekstrinsik yol, ölüm reseptörleri aracılığıyla hücre dışı yollar ile meydana gelmektedir (Sauler vd., 2019). İntrinsik yol mitokondriyal dış zar bütünlüğünün bozulması sonucu sitozole sitokrom c'nin salınması ile karakterize edilmektedir. Zar bütünlüğü bozulması ve sitokrom c salınması ile apoptozom oluşumu aktivasyonu tetiklenmekte, bu noktadan sonra apoptoza geri dönülemez bir şekilde girildiği kabul edilmektedir. Sitokrom c'lerin sitozole salınması Bcl2 ailesinin proapoptotik proteinleri (Bax, Bcl2 homolog antagonisti (Bak), apoptozun p53 yukarı regüle edilmiş modülatörü (PUMA)) tarafından desteklenmektedir. Aktivatör proteinlerin doğrudan apoptoz efektör proteinlerine (Bax, Bak) bağlanması ile oligomerize olan bu efektörler mitokondriyal membranda gözenekler oluşturarak membran bütünlüğünü bozmaktadır (Bertheloot vd., 2021). Membran bütünlüğü bozulmasıyla sitokrom c, Smac/DIABLO, yüksek sıcaklık gereksinim faktörü A2 (HtrA2) ve endoG dahil olmak üzere proapoptotik faktörlerin sitozole salınması meydana gelmektedir. Sitokrom c, apoptotik proteaz aktive edici faktör 1'i (APAF1) bağlamakta ve meydana gelen apoptozom kompleksi kaspaz-9 ve kaspaz-3'ü aktive etmektedir (Kalogeris vd., 2016; Bertheloot vd., 2021; Elmore, 2007). Ekstrinsik apoptoz, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ile indüklenmektedir. En iyi karakterize edilen ölüm reseptörü, zara bağlı Fas ligandı (FasL) tarafından aktive edilebilen Fas hücre yüzeyi ölüm reseptörü olarak belirtilmiştir. Diğer ölüm reseptörleri, sırasıyla Tümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) ve TNF-a tarafından aktive edilen

TNF reseptörü süper ailesi 10 (TRAILR1-4) ve TNF reseptörü 1'i (TNFR1) içermektedir. Fas veya TRAILR'nin ligand aktivasyonu ile, reseptörün sitozolik kuyruğunda konformasyonel bir değişiklik meydana gelmekte, böylece Fas ile ilişkili ölüm alanı (FADD) ve prokaspaz-8'in aktivasyonuna yol açmaktadır. Kaspaz 8'e verilen tepki hücrelere göre değişiklik göstermektedir. Olgun lenfositler gibi bazı hücrelerde, kaspaz 8'in aktivasyonu doğrudan cellat kaspazların proteolitik aktivasyonuna ve mitokondriden bağımsız bir şekilde hücre ölümüne yol açarken diğer hücre tiplerinde, apoptoz inhibitör proteinlerin (IAP) varlığı, apoptozun doğrudan aktivasyonunu sağlamaktadır. Bu durumlarda kaspaz 8, BH3 etkileşim alanlı ölüm agnostini (BID) kesmektedir ve kesik BID dış mitokondriyal zara göç etmektedir (Sauler vd., 2019). Apoptotik hücre ölümü İ/R tarafından indüklenmektedir ancak bu hücre ölüm çeşidi nekrozdan daha az gözlenmektedir. Bcl2 proteinleri daha fazla eksprese edilirken, bu proteinlerin translokasyonu ve mitokondriyal zara entegre olmaları iskemik hücrelerle karakterize edilmektedir. Bcl2 proteinlerinin aktivasyonu sadece iskemi ile sağlanmamakla birlikte reperfüzyon ile indüklenen oksidatif strese de ihtiyaç duymaktadır (Kalogeris vd., 2016).

2.6.2. Nekroz

Nekroz, genler tarafından kontrol edilemeyen, kontrolsüz gelişen bir hücre ölüm çeşidi olarak tanımlanmaktadır. Gerçekleşme sebepleri arasında yaygın olarak hipoksi görülmektedir. Nekroz sırasında mitokondriyal ROS üretimi artmıştır, Ca^{+2} kanalları açıktır, ATP üretimi azalmıştır ve nonapoptotik proteazlar aktive olmuştur (Coşkun ve Özgür, 2011). Nekroz hücre zarının yırtılması ile karakterize edilmiş olan bir enflamatuvar hücre ölüm şekli olarak karakterize edilmiştir. Yüksek radyasyon, toksik ajanlar, enfeksiyon, yüksek basınç ve boğulma gibi etken durumlar nekroza neden olabilmektedir. Hücre zarı bütünlüğü bozulması ile sitoplazmik bileşenler hücre dışına sızmaktadır. Apoptozda olduğu gibi sıralı bir sinyalizasyon yolu olmadığı ifade edilmiştir. ROS vb. durumların neden olduğu DNA zincir kırılması sonucu, DNA tamir enzimi olan DNA polimeraz 1 enziminin aşırı aktivasyonu ve dolayısıyla ATP tüketiminin artışı (Nirmala ve Lopus, 2019) ile tetiklenen ATP noksanlığı iyon pompası yetersizliğine yol açmaktadır. Böylece hücre sıvı alır, organeller şişer ve osmotik basınç nedeniyle hücre patlar, nihayetinde nekroz gelişmektedir. Hücre içeriğinin hücreler arası boşluğa yayılması ile enflamasyon gelişmektedir, makrofajlar ile nötrofiller bu bölgeye göç etmekte ve dokuyu

fagosite etmektedirler (Coşkun ve Özgür, 2011). Hücre içi Ca+2 seviyelerindeki artış da ATP seviyesinde azalmaya neden olacağı için hücrede nekroz meydana gelebilmektedir (Nirmala ve Lopus, 2019). Reseptör etkileşimli protein (RIP) kinaz bağımlı nekroz 'nekroptoz' olarak isimlendirilmiştir. Ölüm reseptör TNFR1'in ligasyon sonucu aktivasyonu ile birlikte RIP3, RIP1 ile RIP homotipik etkileşim motifleri (RHIM'ler) aracılığıyla konformasyonel değişikliğe uğramakta ve aktive olmaktadır (Green ve Llambi, 2015). RIP1 ve RIP3'ün arasındaki etkileşim ile karışık kinaz benzeri protein (MLKL) fosforile olmaktadır. Yüksek oranda fosforlanmış inositol fosfat (IP) 6 varlığında, fosforlanmış MLKL oligomerize olmaktadır ve böylece nekrozomu oluşturmaktadır. MLKL oligomerleri, plazma zarında fosfatidilinositol fosfat (PIP) açısından zengin bölgelerle yer değiştirerek büyük gözenekleri oluşturmaktadır. Sonuç olarak, MLKL gözenekleri, iyon akışına, hücre şişmesine, membran lizizine ve ardından kontrolsüz hücre içi materyal salınımına izin vererek nekroptotik hücre ölümüne yol açmaktadır (Bertheloot vd., 2021).

2.6.3. Otofaji

Otofaji genel olarak bir hücresel hayatta kalma süreci olarak bilinmektedir. Otofajik hücre ölümü genellikle hücre içi stresin kontrolünün sağlanamaması ve bu sürecin bozulması ile gelişmektedir. Bu yüzden otofajik hücre ölümü, otofajinin eşlik ettiği kaspaz bağımsız hücre ölümü olarak da anılmaktadır (Green ve Llambi, 2015). Otofaji, yanlış katlanmış proteinleri, hasar görmüş veya yaşlanmış organelleri ve mutasyona uğramış proteinleri, enerji homeostazını korumak adına otofagozom adı verilen çift zarlı veziküllerde tecrit eden ve sonuçta lizozomlarla birleşerek tecrit edilmiş bileşenlerin bozulmasına yol açan sıkı bir şekilde yönetilen bir süreçtir ancak otofajinin hiperaktivasyonu hücre ölümüne yol açabilmektedir (Onorati vd., 2018). Üç otofaji sınıfı belirtilmiştir: makrootofaji, mikrootofaji ve şaperon aracılı otofaji. Mikrootofaji lizozomal zarın kendiliğinden içe doğru çökme hareketi ile sitoplazmik bileşenleri içine aldığı ve yıkım sürecini başlattığı yol olarak ifade edilmektedir. Şaperon aracılı otofaji de lizin, fenilalanin, glutamik asit, arjinin ve glutamin (KFERQ) benzeri bir pentapeptit dizisi içeren substrat proteinleri ilk olarak sitozolik ısı şoku proteini (Hsc) 70 ve kokaperonlar tarafından tanınmaktadır. Daha sonra lizozomla ilişkili membran proteini 2 (Lamp-2)'nin bir izoformu olan transmembran proteini Lamp-2A, lizozom üzerinde bir reseptör görevi

görmektedir ve katlanmamış proteinler, multimerik bir translokasyon kompleksi yoluyla lizozomal lümene iletilerek, yıkım sürecine girilmektedir. Makrootofaji diğer yollardan farklı olarak otofagozom ara organelini kullanmaktadır. Bir izolasyon zarı (fogafor), otofagozomu oluşturmak için çözünür malzemeler ve organeller dahil olmak üzere sitoplazmanın küçük bir bölümünü ayırmaktadır. Otofagozom, lizozomla birleşip bir otolizozom haline gelerek içindeki malzemeleri bozmaktadır (Mizushima ve Komatsu, 2011). Literatürde ki mevcut çalışmalar baz alındığında, otofaji terimi genel olarak makrootofaji yolunu ifade ederken kullanılmaktadır (Li vd., 2017). Otofaji süreci 4 basamakta gerçekleşmektedir, bunlar; başlatma, çekirdeklenme, olgunlaşma ve bozulma olarak sıralanabilmektedir. Başlatma aşamasında; Unc-51 benzeri otofaji aktive edici kinaz 1 (ULK1), otofaji ilişkili protein (Atg) 13 ve fokal adezyon kinaz (FAK) ailesi kinaz etkileşimli protein 200 (FIP200) içeren serin/treoninprotein kinaz ULK1 kompleksi fogafor oluşturmaktadır. Fagoforların oluşumuyla otofaji başlamaktadır. Çekirdeklenme aşamasında; çift zarlı otofagozomlar Atg12 konjugasyon sisteminin kontrolü altında toplanmaktadır. Bu sistemde, E1 benzeri enzim Atg7 ve E2 benzeri enzim Atg10, kovalent olarak konjuge olan Atg12-Atg5 kompleksinin oluşumunu ortaklaşa katalize etmektedir. Sonunda, Atg12–Atg5 Atg16 (L1) kompleksi oluşarak doğrudan zarları bağlayarak otofagozomları oluşturmaktadır. Olgunlaşma ve bozulma aşaması birlikte gerçekleşmektedir. Otofagozom, bir otolizozom oluşturmak için bir lizozomla kenetlenip kaynaşarak bozulmaktadır. Otofagozomal membran, LC3-PE ile konjuge edilmektedir. Lizozomla füzyon sırasında, dış zar Atg4 tarafından bölünmekte ve geri dönüştürülürken, iç zarla ilişkili LC3-PE, otofagozom sitoplazmik yükü ile birlikte lizozomal proteazlar tarafından parçalanmaktadır, böylece amino asitler, yağ asitleri ve nükleotidler geri dönüştürülmektedir (Li vd., 2017; Shimizu vd., 2014).

2.6.4. Ferroptoz

Ferroptoz 2012 yılında erastin bileşiğinin neden olduğu benzersiz bir hücre ölüm şekli olarak keşfedilmiştir (Dixon vd., 2012). Bu hücre ölümü şekli, hücrelerde demirin birikmesiyle başlamakta ve bu da hidroksil radikallerinin oluşmasına neden olmaktadır. Böylece plazma zar sistemi xc – (sistin-glutamat antiporter) işlevsiz hale gelmektedir. Sonuç olarak, hücreler antioksidan savunma mekanizmalarını kaybetmektedirler (Nirmala ve Lopus, 2019). Ferroptoz, lipit ROS'un ölümcül seviyelere kadar demire bağımlı

birikmesi ile karakterize edilmiştir (Tang vd., 2020). Morfolojik olarak ferroptoz, esas olarak hücrelerde mitokondriyal hacmin azalması, mitokondriyal kristanın azalması veya kaybolması, hücre zarının yoğunlaşması ile ayırt edilmektedir. Ancak hücre zarı sağlam kalırken, çekirdek normal boyuttadır ve kromatin konsantrasyonu yok olmuştur (Sun vd., 2020; Li vd.,2020). Ferroptoz esas olarak demir homeostazı ve lipid peroksidasyon metabolizmasındaki genetik değişiklikleri içermektedir. Ferroptoza duyarlılık birçok temel molekül tarafından belirlenebilir;

1. Asil-CoA sentetaz uzun zincirli aile üyesi 4 (ACSL4), hücresel lipid bileşimini şekillendirerek ferroptoz duyarlılığını belirlemektedir.
2. Antioksidan glutatyon (GSH) varlığında, GPX 4, lipid peroksidasyonunu baskılayarak hücreleri ferroptozdan korumak için benzersiz bir yeteneği olduğu ifade edilmiştir. Hücre içi GSH tükenmesi nedeniyle ortamdaki ROS varlığının artışı görülmektedir ve azalmış GPX4 nedeniyle lipid peroksitler GPX4 katalizli indirgeme reaksiyonu ile metabolize edilememektedir. Bu nedenle, düşük bir GPX4 ekspresyon seviyesi, ferroptoza karşı artan bir hassasiyetle ilişkili olabilmektedir.
3. Sistem Xc- aktivitesi, ferroptoz uygulaması için önemli olarak ifade edilmiştir. Erastin gibi küçük bileşikler, yalnızca sistem Xc-'yi bağlamaktadır. Böylece glutatyon sentezini daha da engelleyen ve ferroptoza duyarlılığı artıran sistinin hücresel akışını engellemektedir.
4. Ferrus iyon ($Fe2^{+}$), lipitleri Fenton benzeri bir şekilde oksitleyerek büyük miktarda ROS meydana getirerek ferroptozu teşvik etmektedir (Tang vd., 2020; Li vd., 2020; Sun vd., 2020).

Ferroptoz çoğunlukla diğer hücre ölüm çeşitlerinden farklı genetik, metabolik ve protein düzenleyicileri, tetikleyicileri ve yürütme mekanizmalarını içermektedir (Hirschhorn ve Stockwell 2019). Ferroptoz birçok tümör baskılayıcı genler tarafından da indüklenebilmektedir. Birinci olarak, tümör proteini 53 (p53) kanser hücresi ferroptozunda çift yönlü bir rol oynamaktadır. İkinci olarak, otofajiye bağımlı bir yıkım yolunun aktive olması ferroptozu indükleyebilmektedir. Otofajiye bağlı ferroptoz, aril hidrokarbon reseptörü nükleer translokatör benzeri protein 1 (ARNTL), GPX4 ve lizozoma bağlı lipid damlacıkları gibi anti-ferroptoz düzenleyicilerin bozulması ile de yürütülebilmektedir. Üçüncü olarak ferroptoz, plazma zarı hasarı ve hasarla ilişkili moleküler modellerin

(DAMP) salınması ile ilişkilendirilen düzenli gelişen bir nekroz olarak da görülmektedir. Dördünce ve son olarak, mitokondri ferroptoz düzenlenmesinde önemli bir yol oynamaktadır. Örneğin; Kompleks I, II, III ve IV sistemlerinde lipit ROS üretimi azalması ferroptozu inhibe edebilmektedir. Ferroptoz, plazma membranı, mitokondri, endoplazmik retikulum, golgi ve lizozom gibi farklı organellerde üretilen bir dizi sinyal gerektiren; demir birikimi, lipid peroksidasyonu ve membran onarımı gibi oldukça karmaşık ve çok iyi koordine edilmiş bir süreç olarak tanımlanmaktadır (Dai vd., 2020). Ferroptozda demir ihtiyacı şu örneklerle açıklanmıştır; membran geçirgen (örn. CPX) ve membran geçirimsiz (örn. DFO) demir şelatörleri bulunduğunda, erastin veya yüksek konsantrasyonda hücre dışı Glu gibi fizyolojik bir uyaran ile indüklense bile hücre ferroptoza sürüklenmemektedir. Ayrıca erastin veya sistein (Cys2) yoksunluğu ile indüklenen ferroptoz, transferrin-demir komplekslerinin hücre içine alınması için gerekli olan transferrin reseptörünü kodlayan TFRC geninin genetik olarak susturulmasıyla önlenmektedir. Bu sebeplere dayandırılmak üzere ferroptozun gerçekleşmesi için demir varlığının gereksinim olduğu gösterilmiştir. (Cao ve Dixon, 2016).

2.6.4.1 Ferroptoz indükleyicileri

Demir veya mitokondriyal yağ asidi metabolizmasını düzenleyen altı gen, özellikle erastin kaynaklı ferroptoz için gerekli olmaktadır. Bu genler arasında; ribozomal protein L8, demire duyarlı element bağlayıcı protein 2 (IREB2), ATP sentaz F0 kompleksi alt birim C3, sitrat sentaz, tetratrikopeptit tekrar alanı 35 ve andaçil-CoA sentetaz aile üyesi 2 (ACSF2) bulunmaktadır. Erastinin doğrudan moleküler hedeflerinden biri mitokondriyal voltaja bağımlı anyon kanalı (VDAC) olarak gösterilmiştir. Ayrıca erastinin, ER stres yanıtının aktivasyonu ile sistin/glutamat antiporter sistemi Xc− aktivitesini, doğrudan inhibe ederek GSH seviyesini düşürme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu süreç, ferroptoz sırasında ROS birikimini hızlandırabilmektedir. Ras seçici öldürücü (RSL3), GPX4'ün doğrudan bir inhibitör olarak gösterilmiştir. GPX4'e bağlandıktan sonra RSL3, lipid peroksidasyonundan kaynaklanan ROS üretimini indüklemek için GPX4'ü etkisiz hale getirmektedir. Erastin ve RSL5 gibi Tip I RSL'ler, ferroptozu indüklemek için yukarı akış regülatörlerini (örn. VDAC ve sistem Xc-) hedefleyebilmektedir. RSL3 gibi Tip II RSL'ler, aşağı akış regülatörlerini (örn. GPX4) inhibe ederek ferroptozu tetikleyebilmektedir. Butiyoninsülfoksimin (BSO), azalmış GPX aktivitesi ve artan ROS

seviyeleri ile GSH sentezini inhibe ederek, Ras mutasyonuna uğramış hücrelerde ferroptoza neden olmaktadır. Asetaminofen, GSH tükenmesine neden olan ve karaciğer hasarını artıran bir bileşik olarak tanımlanmaktadır. Nekroz ve apoptoza ek olarak, asetaminofen, birincil fare hepatositlerinde ferroptozu indüklediği ifade edilmiştir. Sülfasalazin sistem Xc-'yi inhibe ederek ferroptozu indüklemektedir. Ferroptozda sorafenibin etkisi sistem Xc- inhibisyonu ve ER stresi ile ilişkilendirilmiştir (Xie vd., 2016).

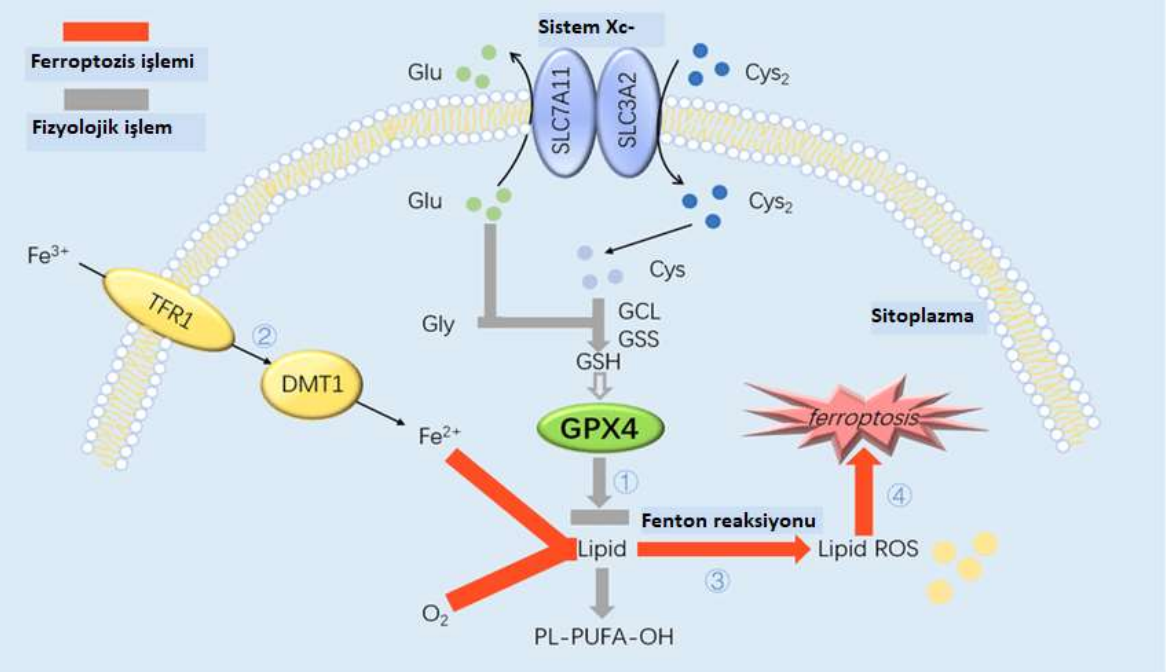
2.6.4.2. Ferroptoz mekanizması

Sistem Xc-, SLC7A11 (hafif zincir) ve SLC3A2 (ağır zincir) alt birimlerinden oluşan heterodimer yapıda, disülfit bağlı olan bir Na^{+2} bağımlı sistein-glutamat taşıyıcısı olarak tanımlanmıştır. Hücre içinde bulunan bir glutamat bu taşıyıcı sayesinden hücre dışına taşınırken hücre dışından bir sistin hücre içine taşınmaktadır ve glutatyon sentezi için sistein haline dönüşmektedir (Çelenk, 2021). Şekil 2.2'de belirtildiği üzere GSH, hücrelerde düşük moleküler ağırlığa sahip olan güçlü bir antioksidan moleküldür ve lipit peroksitleri lipit alkollere ingirgeyen GPX4 tarafından kullanılmaktadır (Chen vd., 2020). GSH, GPX'lerin etkisi altında ROS'u ve reaktif nitrojeni azaltmaktadır. Xc- sisteminin aktivitesinin inhibe edilmesi, GPX aktivitesinde azalmaya, hücre antioksidan kapasitesinde azalmaya, lipid ROS birikimine ve sonuç olarak oksidatif hasara ve ferroptoz oluşumuna yol açan sistin emilimini inhibe ederek GSH sentezini etkilemektedir (Li vd., 2020).

Dolaşımda transferrine bağlı ve ferrik (Fe^{+3}) formunda bulunan demir, transferrin reseptörü 1 (TRF1) aracılığıyla hücre içine alınarak endozomlara yerleşmektedir. Endozoma yerleşik demir, altı-transmembran prostat antijeni 3 (STEAP3) ferriredüktaz aktivitesi ile Fe^{+2} formuna indirgenerek iki değerlikli metal taşıyıcı 1 (DMT1) aracılığıyla sitoplazmaya aktarılmaktadır. Sitoplazmadaki Fe^{+2}'ler kararsız bir demir havuzu oluşturmaktadır. Meydana gelen yüksek demir seviyeleri, ROS tarafından Fenton reaksiyonu meydana getirerek hücreyi ferroptozise sürüklemektedir (Çelenk, 2021). Lipit peroksidasyonu çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) oksidasyonu ile sonuçlanmaktadır. Antioksidan sistemin bozulması lipit peroksidasyonunu indükleyebilmekte ya da inhibe edebilmektedir. ACSL4 araşidonik asidin sentezini katalize eden ve hücre membranlarını PUFA ile zenginleştiren bir pro-ferroptotik düzenleyici olarak tanımlanmıştır. Lipoksijenazlar PUFA'nın oksijenlenmesini direkt olarak katalize

ederek lipit peroksidazları meydana getirerek ferroptozu tetiklemektedir (Chen vd., 2020). Araşidonat lipoksijenaz 15 (ALOX15) lipit oksidasyon enzim sınıflarında yer alır ve ferroptozda önemli rolü olduğu bildirilmiştir. PUFA-fosfolipidlerde iskemi hasarına duyarlılığı artıran spesifik redoks reaksiyonlarını başlattığı gösterilmiştir. İ/R hasarıyla ALOX15'in ekspresyonu indüklenmektedir ve buna bağlı olarak gelişen reaksiyonlarla ortamda lipit peroksitlerin birikimi ile ferroptoz tetiklenmektedir (Feng ve Stockwell, 2018).

Şekil 2.2. Demir ve lipit peroksidasyon yolları ile indüklenen ferroptosis (Zuo vd., 2020).



Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (NRF2), tüm dokularda düşük seviyelerde ifade edildiği gösterilen önemli bir transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmıştır (Fan vd., 2017). Stressiz koşullarda NRF2'nin Kelch benzeri ECH ilişkili protein 1 (Keap1) ile bağlandığı ve proteazomda ubikitinasyon ve bozunma yoluyla inaktive durumda kaldığı belirtilmiştir (Sun vd., 2016). NRF2 yüksek oksidatif stres koşulları altında, çekirdekteki antioksidan yanıt elemanı (ARE) ile birleşerek hücresel korumayı destekleyen hedef gen transkripsiyonunu, antioksidan ve anti inflamatuvar protein translasyonunu destekleyebilmektedir (Dong vd., 2020). NRF2'nin proteostaz, ksenobiyotik/ilaç metabolizması, demir/heme metabolizması, karbonhidrat ve lipid metabolizması dahil olmak üzere diğer önemli metabolik yollara aracılık etmede kritik bir rol oynadığı

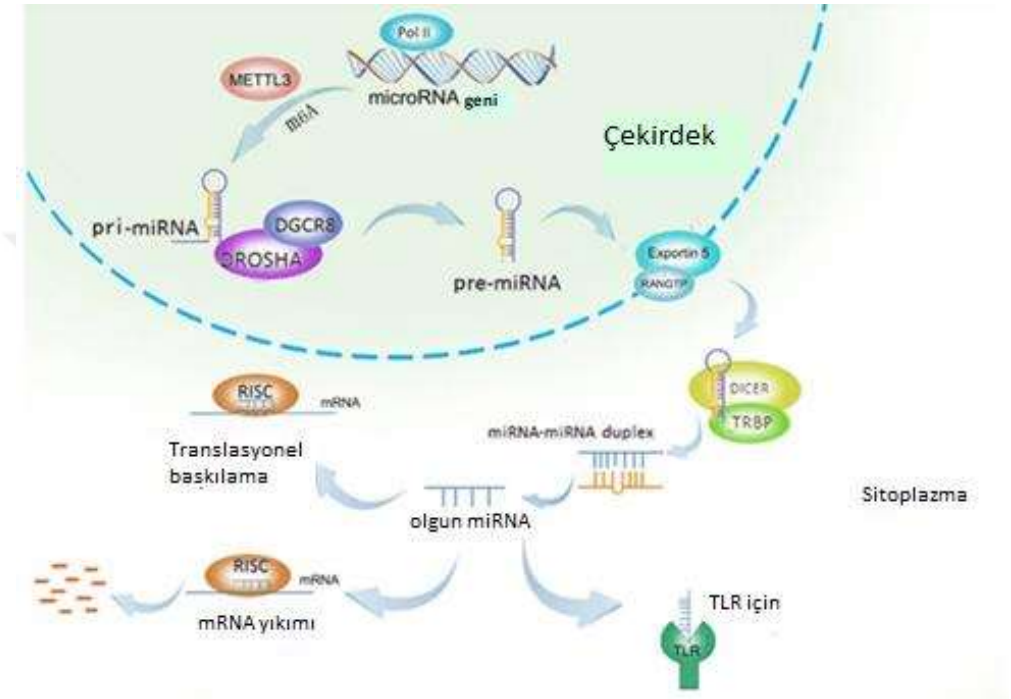
gösterilmiştir. Bu nedenle, NRF2 aktifliği, özellikle artan oksidatif veya metabolik stres sırasında hücrenin hayatta kalması için kritik öneme sahip olmaktadır (Dodson vd., 2019). NRF2, GPX4 protein içeriğini, hücre içi serbest demir içeriğini, mitokondriyal fonksiyonu, NAPDH rejenerasyonunu vb. doğrudan veya dolaylı olarak düzenleyebilmektedir, böylece ferroptoz sürecini düzenlediği ifade edilmiştir (Song ve Long, 2020). Yapılan bir çalışmada lipit peroksidasyonu ve oksidatif stresin NRF2'nin ekspresyonunu direkt olarak indüklediği belirtilmiştir. Aynı çalışmada erastin, sorafenib gibi indükleyiciler ile gelişen ferroptozda, NRF2'nin ekspresyon durumunun tespiti için HCC hücrelerinde NRF2 proteini ve haberci RNA (mRNA) seviyelerine bakılmıştır. Sonuç olarak NRF2'nin ekspresyonu indüklenirken mRNA'nın ekspresyonunda değişiklik gözlenmemiştir. Böylece ferroptozda NRF2 ekspresyonunun indüklenmesinin transkripsiyondan bağımsız bir şekilde meydana geldiği gösterilmiştir (Sun vd., 2016). İnhibisyonu ferroptozu başlatan en kritik hedeflerden ikisi olan xCT ve GPX4'ün NRF2 tarafından düzenlendiği yapılan çalışmalar ile ortaya çıkarılmıştır (Dodson vd., 2019). NRF2 ayrıca mitokondriyal fonksiyonu modüle etmede önemli roller üstlenmektedir. NF2'nin fiziksel olarak mitokondriye bağlanabildiği ve böylece mitokondriyal fonksiyondaki değişiklikleri izleyerek bunlara yanıt verebildiği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda NRF2 nakavt farelerdeki mitokondri, fonksiyon bozukluğuna sahipken; NRF2'nin aktive olduğu farelerde, mitokondriyal fonksiyonun ve stres faktörlerine karşı direncin arttığı belirtilmiştir (Abdalkader vd., 2018).

2.7. miRNA Tarihçesi, Organizmadaki Rolü ve Mekanizması

MikroRNA'lar (miRNA) yaklaşık 20 nükleotid uzunluğunda, hedef haberci ribonükleik asit (RNA) (mRNA)'ların 3' kodlamayan bölgesine (UTR), kodlama bölgesine veya 5'UTR bölgesine bağlanarak transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunu düzenleyen, translasyonu inhibe edebilen ve mRNA bozulmasına yol açabilen, küçük kodlama yapmayan RNA'lar olarak ifade edilmektedir (Almeida vd., 2011). İlk küçük RNA olarak belirtilen lin-4, 1993'te nematodlarda çalışılan bir genetik tarama sırasında keşfedilmiştir. Aynı yıl içerisinde lin-14'ün, lin-4 tarafından düzenlendiği gözlemlenmiş ve daha küçük olan lin-4'e miRNA ismi verilmiştir böylece küçük düzenleyici RNA'ların sınıfı oluşmuştur (Wahid vd., 2010). Genomda çok fazla miRNA geni dağılmış olarak görülebilir ancak kümelemiş olarak görülen genler polisistronik birimler olarak birlikte eksprese

edilmiştir, bunlar fonksiyonel ilişkilere sahip olabilmektedir. miRNA'lar diğer fonksiyonel mRNA sınıflarından farklı bazı özellikler taşımaktadır. Birincisi, keşfedilmiş miRNA'ların çoğunluğu polisistronik transkriptler olarak kodlanmıştır. İkincisi, önemli bir miktar miRNA'nın farklı organizmalar arasında yüksek oranda korunmuş dizilere sahip olmasıdır. Türler arası bu korunmuşluk miRNA'ların 5' terminal bölgesinde olduğu belirtilen özel tohum dizisinden kaynaklanmaktadır. Üçüncüsü, miRNA'lar bir mRNA substratını hedeflemek yerine bir mRNA'yı hedefleyip düzenlemek eğilimindedirler. Dördüncüsü, miRNA yolunun, tek hücreli ve çok hücreli organizma ayrışmasından çok daha önce evrimleştiği fikri doğrultusundaki deneysel kanıtlar bu hipotezi desteklemektedir. Son olarak, daha yüksek mutasyon oranları ve daha hızlı evrim süreçleri nedeniyle, viral miRNA'ların çoğu homoloji olarak diğer türlerden ayrılmaktadır (Cai vd., 2009). miRNA aracılı gen ekspresyon kontrolü, açlık, hipoksi, oksidatif stres ve DNA hasarı gibi çevresel streslere karşı hücresel yanıt için kritiktir ve dolayısıyla kanser gibi insan hastalıklarında rol oynadığı ifade edilmektedir. Çok sayıda miRNA, onkogenler veya tümör baskılayıcılar olarak işlev görebilmektedir ve miRNA ekspresyonunun düzensizliği, kanserin başlaması, ilerlemesi ve metastaz ile yakından ilişkili olarak gösterilmiştir (Syeda vd., 2020). Şekil 2.3'de belirtildiği gibi miRNA'lar genomda, 5' kep ve 3'poliadenil kuyruk ile birlikte pri-miRNA şeklinde kodlanmaktadır. Pri-miRNA'lar DGCR8/Pasha etkileşimli DROSHA enziminin RNaz II ve endonükleaz III aktivitesi ile pre-miRNA olarak adlandırılan 60-110 nükleotit yapıya işlenmektedir. Pre-miRNA'lar Exportin 5' e bağımlı bir mekanizma ile çekirdekten sitoplazmaya aktarılarak burada TAR RNA bağlayıcı protein (TRBP)/ PKR Protein Aktivatörü (PACT) proteinleri ile etkileşimli Dicer1 enziminin RNaz III aktivitesi ile kesilerek, kusurlu bir dubleks miRNA haline dönüştürülmektedir. Bu dubleks miRNA helikaz enzimi ile yaklaşık 20 nükleotitlik olgun miRNA haline getirilmektedir. Olgun miRNa, RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC) dahil olarak, mRNA baskılama ve degrede etme görevlerini yerine getirmektedir (Almeida vd., 2011). RISC'deki olgun miRNA tek iplikli olduğundan, tamamlayıcı bir dizi ile başka bir RNA molekülüne bağlanma yeteneğine sahip olmaktadır. Bu özelliğinden dolayı miRNA'lar, miRNA'ya bağlanabilen bir dizi içeren mRNA transkriptlerinde ki spesifik hedef bölgelere bağlanabilmektedir. Bu spesifik dizilere miRNA hedef bölgeleri denir ve hayvanlarda genellikle 3'UTR'de bulunurken bitki mRNA'larının kodlanan bölgesindedir. miRNA'lar, mRNA'lar üzerindeki hedef bölgeleri bağladığından, RISC'yi bu transkriptlere yönlendirerek bağlanma işlemini gerçekleştirerek ekspresyonun baskılanmasına yol

açmaktadır. miRNA'lar mRNA degredasyonunu 5'-3' yönünde gerçekleştirdikleri bozunma yolu ile katalize etmektedirler. Bu süreçte mRNA'larda ilk olarak CAF1 CCR4-NOT deadenilaz kompleksi ile deadenilasyon işlemi sağlanmaktadır. Daha sonra DCP2 enzimi aracılığıyla 5' kep yapısı uzaklaştırılmaktadır. Bu yapının kaybolması ile sitoplazmik ekzonükleaz olan XRN1 mRNA'ları parçalayabilmektedir (Peng ve Croche, 2016; Dalmay, 2013).

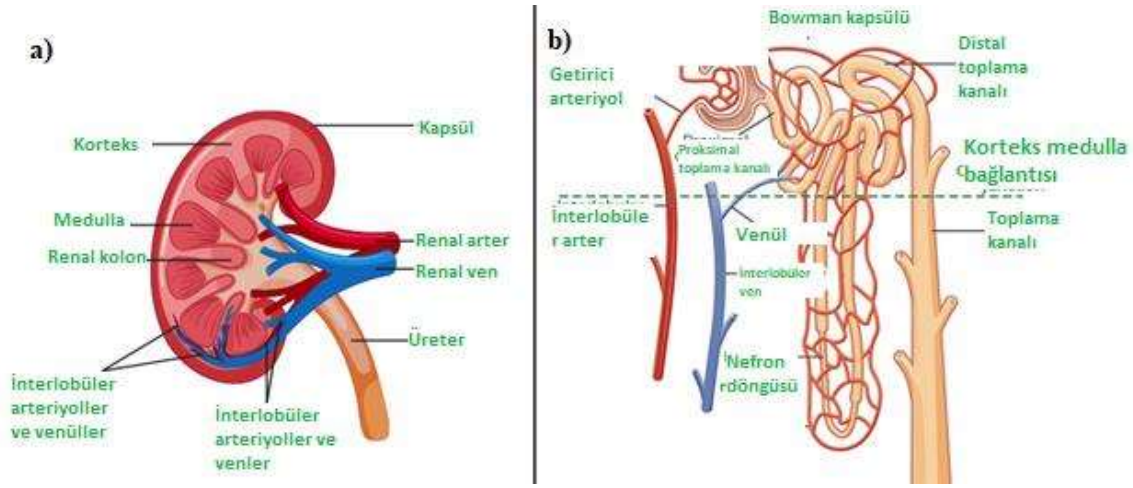


Şekil 2.3. miRNA oluşum mekanizması (Peng ve Croce, 2016).

Farelerde yapılan bir çalışmada miR-24'ün fare renal I/R hasarında ve insan böbrek nakli ile ilişkili renal I/R hasarında endotelyal ve tübüler epitel hücre apoptozunu etkilediğini bulunmuştur. miR-24'ü aşırı eksprese eden genlerin ve miR24'ün susturulması ile birçok fonksiyonel parametrenin iyileşmesi ve böbreğin sağ kalım oranının arttığı gösterilmiştir (Lorenzen vd., 2014).

2.8.Böbreğin Yapısı

Renal sistem 2 böbrek, 2 üreter, mesane ve üretradan oluşmaktadır. Böbrekler, retroperitonda yer alan ve karnın arka kısmında vertebral kolonun her iki tarafında yer alan çift, fasulye şeklinde boşaltım organları olarak tanımlanmaktadır. Sağ böbrek sol böbrekten daha aşağıda konumlanmıştır (Radi, 2019; Sampaio, 2000). Her böbrek pürüzsüz bir fibröz kapsül ile çevrilidir. Şekil 2.4.a.'da gösterildiği gibi böbrek 4 ana anatomik bölgeye sahiptir; böbrek korpuslarını içeren yüzeysel korteks, konik medüller piramitleri olan derin medulla, renal papilla ve renal pelvis olarak bu bölgeler tanımlanmaktadır. Medulla ayrıca dış medulla ve iç medulla olarak alt bölümlere ayrılmaktadır. Dış medulla, dış medullanın dış şeridi ve dış medullanın iç şeridi olarak ikiye ayrılmıştır. Dış şerit, proksimal tübülün kısımlarını, distal tübülün düz kısımlarını ve toplama kanallarını içerirken; iç şerit, inen ince uzuvları, çıkan kalın uzuvları ve toplama kanallarını içermektedir. Üreterler idrarı böbreklerden mesaneye taşımakla görevli kanallardır. İdrar kesesi, üretra idrarı vücuttan dışarı taşımadan önce idrar için geçici bir depolama rezervuarı görevi görmektedir. Korteks ve medullada bulunan, böbreğin idrar üreten işlevsel ve yapısal birimleri nefron olarak ifade edilmektedir. Nefronlar, tuzun ve suyun geri emiliminden sorumlu birimler olarak bilinmektedir. Bu sistem vücuttaki su, tuz, glikoz, üre ve diğer minerallerin miktarını düzenlemektedir. Şekil 2.4.b'de görüldüğü gibi bir nefron temel olarak küçük tübüllere ve küçük kan damarlarına sahip bir yapıda görülmektedir. Kapiller filtrasyonla oluşan sıvı tübüllere girerek bir takım taşınma süreçlerinden sonra idrar olarak tübüllerden ayrılmaktadır (Radi, 2019).



Şekil 2.4. a) Börek yapısı b) Nefron yapısı (Anonim, 2022)

3.MATERYAL VE YÖNTEM

Deneysel çalışmamız Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi (TICAM), Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Hücresel Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Çalışma, ESOGÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulun (HADYEK)'da 860-2/2022 kararı ile yürütüldü ve etik kurul raporu Ek Açıklama' da sunulmuştur.

3.1. Deney Hayvanları

250-300 gram ağırlıkta 10-12 haftalık 48 adet *Sprague Dawley* cinsi albino erkek sıçanlar kullanıldı. Deney hayvanları deney süresince; 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ışıklandırması olan, ısı (22±2°C) ve nemi (% 45-50) otomatik olarak ayarlanmış odalarda yaşatıldılar. Deney sürecinde tüm sıçanlar polikarbon şeffaf kafeslerde standart pellet sıçan yemi ile beslendi ve çeşme suyu verildi.

3.1.1. Grupların oluşturulması

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

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

Çizelge 3.1. Deneysel grupların oluşturulması

3.1.1.1. Grup I (Sham grubu, 30 dakika): Bu grup deney hayvanlarına nefrektomi işlemi uygulanarak 15 gün iyileşmeleri beklendi. İyileşmenin ardından anestezi altında median laporotomi sonrasında renal arter izole edildi, antitravmatik vasküler klemp takılmadan ameliyat stresi sağlanarak 30 dakika beklendi. Süre bitiminde deney hayvanları 24 saat reperfüzyon için tek bireylik polikarbon kafeslere alındı. Deney hayvanları 24 saat

reperfüzyon süresinin bitiminde anestezi altında sakrifiye edilerek diseksiyonları gerçekleştirildi.

3.1.1.2. Grup II (Sham grubu, 45 dakika): Bu grup deney hayvanlarına nefrektomi işlemi uygulanarak 15 gün iyileşmeleri beklendi. İyileşmenin ardından anestezi altında median laporotomi sonrasında renal arter izole edildi, antitravmatik vasküler klemp takılmadan ameliyat stresi sağlanarak 45 dakika beklendi. Süre bitiminde deney hayvanları 24 saat reperfüzyon için tek bireylik polikarbon kafeslere alındı. Deney hayvanları 24 saat reperfüzyon süresinin bitiminde anestezi altında sakrifiye edilerek diseksiyonları gerçekleştirildi.

3.1.1.3. Grup III (Sham grubu, 60 dakika): Bu grup deney hayvanlarına nefrektomi işlemi uygulanarak 15 gün iyileşmeleri beklendi. İyileşmenin ardından anestezi altında median laporotomi sonrasında renal arter izole edildi, antitravmatik vasküler klemp takılmadan ameliyat stresi sağlanarak 60 dakika beklendi. Süre bitiminde deney hayvanları 24 saat reperfüzyon için tek bireylik polikarbon kafeslere alındı. Deney hayvanları 24 saat reperfüzyon süresinin bitiminde anestezi altında sakrifiye edilerek diseksiyonları gerçekleştirildi.

3.1.1.4. Grup IV (İskemi/reperfüzyon 30 dakika): Bu grup deney hayvanlarına nefrektomi işlemi uygulanarak 15 gün iyileşmeleri beklendi. İyileşmenin ardından anestezi altında median laparotomi sonrasında renal arter izole edilerek klemp takıldı ve 30 dakika iskemi sonrasında klemp çıkarılarak 24 saat reperfüzyon uygulandı. Reperfüzyon süresi bitiminde deney hayvanları yine anestezi altında sakrifiye edilerek diseksiyonları gerçekleştirildi.

3.1.1.5. Grup V (İskemi/reperfüzyon 45 dakika): Bu grup deney hayvanlarına nefrektomi işlemi uygulanarak 15 gün iyileşmeleri beklendi. İyileşmenin ardından anestezi altında median laparotomi sonrasında renal arter izole edilerek klemp takıldı ve 45 dakika iskemi sonrasında klemp çıkarılarak 24 saat reperfüzyon uygulandı. Reperfüzyon süresi bitiminde deney hayvanları yine anestezi altında sakrifiye edilerek diseksiyonları gerçekleştirildi.

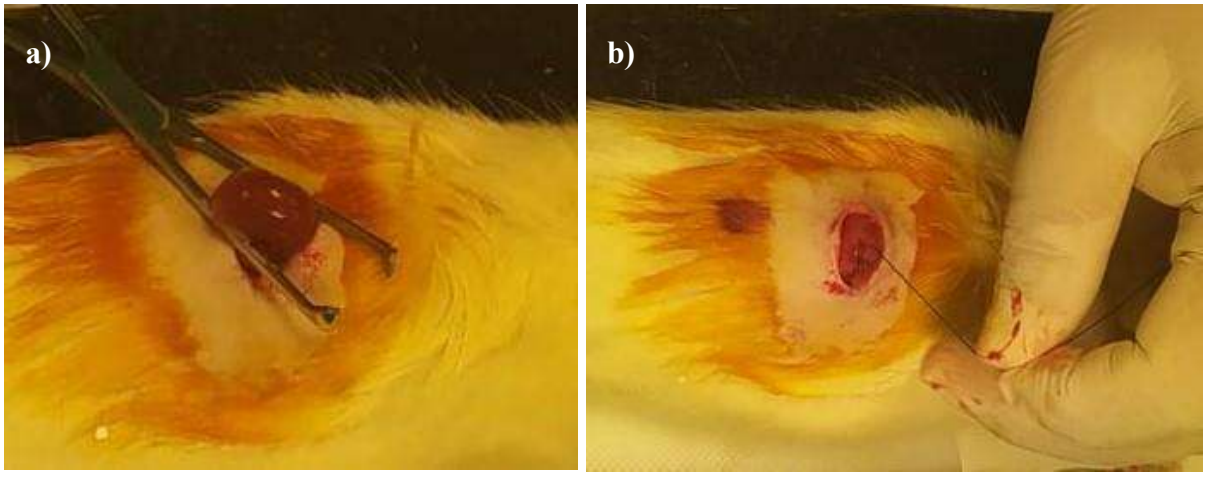
3.1.1.6. Grup VI (İskemi/reperfüzyon 60 dakika): Bu grup deney hayvanlarına nefrektomi işlemi uygulanarak 15 gün iyileşmeleri beklendi. İyileşmenin ardından anestezi altında median laparotomi sonrasında renal arter izole edilerek klemp takıldı ve 60 dakika iskemi sonrasında klemp çıkarılarak 24 saat reperfüzyon uygulandı. Reperfüzyon süresi bitiminde deney hayvanları yine anestezi altında sakrifiye edilerek diseksiyonları gerçekleştirildi.

3.2. Anestezi ve Cerrahi İşlemler

3.2.1 Anestezi işlemi: Tüm cerrahi işlemler steril ortamda ve steril cerrahi aletler kullanılarak gerçekleştirildi. Deney hayvanlarına intramusküler olarak 0.1cc/100g ketamin (Keta-Control, Doğa İlaç) ve 0.05cc/100g ksilazin (Rompun %2, Bayer) anestezisi uygulandı. Gerektiğinde sıçanların anestezi derinliğini sabit tutmak için ketamin/ksilazin (yarı dozda), refleks yanıtlara (pedal refleks, palpebral refleks ve korneal refleks) bakılarak tekrarlandı.

3.2.2. Cerrahi işlemler

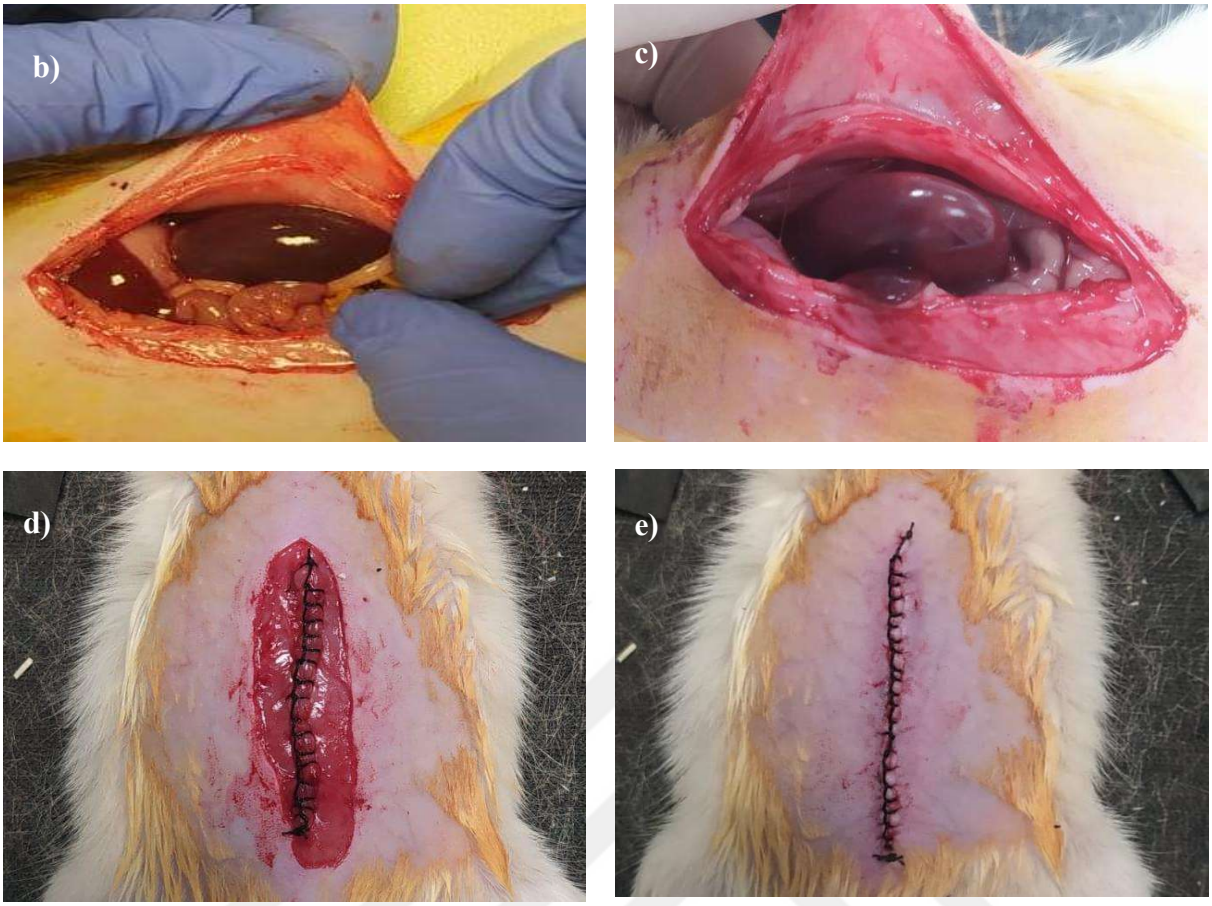
3.2.2.1. Nefrektomi: İntramusküler yol ile anestezi uygulanan deney hayvanları postürüne göre sağ böbreğine işlem yapılacak şekilde diseksiyon tablasına sabitlendi. Cerrahi bölge % 70'lik etil alkol ile temizlenip tıraşlandı. Böbreğin yeri tespit edildikten sonra küçük bir kesi atılarak deri ve kas açıldı. Böbrek ortaya çıkarıldıktan sonra askıya alınarak alt tarafından ip ile Şekil 3.1.a'da görüldüğü gibi izole edildi ve Şekil 3.1.b'de gösterildiği gibi nefrektomisi gerçekleştirildi. Her sıçana yapılan nefrektomi sonrası kaybolan sıvının hipovolemik etkilerine engel olmak için karın boşluğuna steril serum fizyolojik verildi. Kas ve deri ayrı ayrı fakat devamlı olarak 2/0 ipek süturla dikilerek kesi kapatıldı. Cerrahi operasyonu tamamlanan deney hayvanları steril tek bireylik polikarbon kafeslere koyularak post operatif bakım odasına alındı ve 15 gün iyileşmeleri beklendi (Kar vd., 2019).



Şekil 3.1. a) Sağ böbreğin çıkarılıp pens ile tutulması. b) Böbreğin sütur ile boğumlanarak vücuttan ayrılması.

3.2.2.2. İskemi/reperfüzyon işlemi: Nefrektomi işlemi sonrasında 15 gün iyileşmiş olan sıçanlar intramusküler anestezi yapılarak diseksiyon tablasına sırt üstü sabitlendi. % 70'lik etil alkol ile temizlenen cerrahi bölge tıraş edildi. Median laparotomi yapılarak sol renal arter izole edilip Şekil 3.2.a' gösterildiği gibi antitravmatik vasküler klemp takılarak deney gruplarına göre 30, 45 ve 60 dakika süre ile Şekil 3.2.b'de görüldüğü gibi iskemi sağlandı. Belirlenen süre iskeminin hemen ardından klemp çıkarılarak Şekil 3.2.c'de görüldüğü gibi reperfüzyon sağlandı. İskemi süresinde kaybedilen sıvının hipovolemik etkilerine engel olmak için karın boşluğuna steril serum fizyolojik verildi. Şekil 3.2.d. ve Şekil 3.2.e' de görüldüğü gibi kas ve deri ayrı ayrı fakat devamlı olarak 2/0 ipek sütur ile dikilerek kesi bölgesi kapatıldı. 24 saat reperfüzyon sonrasında deney hayvanları anestezi altında sakrifiye edilerek diseksiyonları gerçekleştirildi (Kar vd., 2019).





Şekil 3.2. a) Sol böbreğin renal arteri izole edilerek klemp takılması. b) İskeminin gerçekleşmesi. c) Klemp çıkarılması ve reperfüzyonun gerçekleşmesi. d) Cerrahi bölgenin kapatılması ve kas dikişi. e) Deri dikişi.

3.2.2.3. Kan ve doku örneklerinin toplanması: Doku ve kan örnekleri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezinde, etik kurallar çerçevesinde deney hayvanlarından cerrahi operasyon sırasında Şekil 3.3.'de görüldüğü gibi kalpten letal doz kan alımı ile (eksanguinasyon) ötenazi işlemi yapılarak elde edildi. Analiz yapılıncaya kadar kan (serum ve plazma) ve doku örnekleri -80°C'de bekletildi.



Şekil 3.3. Kalpten kan alınması.

3.3. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM)

Geçirimli elektron mikroskobu, yüksek enerjili bir elektron demetini çok ince bir numuneden geçirerek, kullanılan numunenin en ince detaylarını ortaya çıkarabilen bir mikroskop türüdür. TEM ışık mikroskobu ile aynı temel ilkeler üzerinde çalışır ancak ışık yerine elektron kullanılmaktadır. Elektronların dalga boyları ışığın dalga boyundan daha küçük olduğundan çözünürlük çok daha iyidir ve iç yapının en ince detaylarını gösterebilmektedir (Leadley, 2010).

Toplanan böbrek dokuları 1 mm^3'lük çok küçük parçalara ayrılarak % 2,5'lik gluteraldehit tamponu bulunan eppendorf tüplere koyularak +4°C'de 24 saat bekletilerek fiksasyon işlemi sağlandı. Fiksasyon işlemi sonrası dokulardaki gluteraldehiti uzaklaştırmak için fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkama işlemi yapıldı. Fiksatif pastör pipet ile çekilerek uzaklaştırıldı, yerine PBS koyularak +4°C'de 15 dakika bekletildi. Bu aşama 3 kez tekrarlandı. Yıkanan dokulara % 1'lik osmium tetroksit (OsO_4) eklenerek 2 saat rotatorda döndürüldü ve ikinci fiksasyon işlemi tamamlandı. Dokulardaki suyu çekmek amacıyla dehidrasyon işlemi uygulandı. Bu aşamada dokular % 30, % 70, % 90, % 96 ve % 100'lük etil alkol serilerinden geçirildi. Dehidrasyon işleminden sonra propilen oksit (1,2-propylen oxyde, Merck, Katalog no: 75-56-9) ile şeffaflaştırma işlemi

uygulandı. Araldit (Araldite CY212, Agar Scientific, Katalog no: AGR1030) ve propilen oksit karışımı ile muamele edildikten sonra 1 gece rotatorda saf araldit ile inkübe edildi. Son olarak epona gömme işlemi yapılarak mikrotom ile kesit alındı.

3.4. Biyokimyasal Analizler

3.4.1. Dokudan ve serumdan ROS tayini

Renal İ/R modeli uyguladığımız sıçanların böbrek dokularında gelişen oksidatif stresi, deney gruplarına göre analiz edebilmek amacıyla ROS seviyeleri ölçüldü. Anestezi altında ötenazi işlemi yaparak aldığımız kan örneklerini jelli tüpe alarak 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj (MSE MISTRAL 2000) ederek serum elde edildi. Çalışmada alınan böbrek dokularının eşit miktarda ve aynı bölgeden almasına dikkat ederek eppendorf tüplere konularak -80°C'de saklandı. Doku örneklerinin homojenat haline getirilmesi için 30-40 mg böbrek dokusunu hassas terazide (Sartorius CP224S) tartılarak eppendorf tüplere aktarıldı. Üzerine zirkonyum boncuklar ve 700 µL PBS eklenerek homojenizatörde tamamen parçalandı. Tüpler, 3000 rpm de 20 dakika santrifüj (Eppendrof Centrifuge 5810 R) ederek kullanıma hazır hale getirildi.

ROS tayini yapmak için ticari kit (BT LAB, Rat Reaktif Oksijen Türü ELISA kiti, Katalog no: E0304Ra) kullanıldı. Bu kitin çalışma prensibine yönelik olarak, 96 kuyucuklu plaka önceden sıçan ROS antikoru ile kaplanmıştır ve örneklerdeki ROS, kuyularda bu antikorlara bağlanmaktadır. Biyotinlenmiş sıçan ROS antikoru eklenerek örneklerdeki ROS'a bağlanması sağlanır. Streptavidin-HRP eklenerek biyotinlenmiş ROS antikoruna bağlanması sağlandıktan sonra substrat çözeltisi ile sıçan ROS miktarı ile doğru orantılı olarak gelişen renk değişikliği gözlenmektedir ve reaksiyon asidik stop solüsyonu eklenerek sonlandırılarak 450 nm'de spektrofotometre ile ölçümü sağlanmaktadır. Bütün örneklerin ve kitin deneyden 30 dakika önce oda sıcaklığına alınması gerekmektedir çünkü kit oda sıcaklığında çalışmaktadır. 1600 U/mL standart solüsyonu, standart dilüent ile seri dilüasyon yapılarak 50 U/mL'ye dilüe edildi. Yıkama solüsyonu 1X'e dilüe edildi. Standart kuyusuna 50 µL standart eklendi. Örnek (serum ve doku) kuyularına 40 µL ekleme yapıldı. Örnek kuyuları ile blank kontrol kuyusuna 10 µL anti-ROS antikoru eklendi. Standart ve örnek kuyularına 50 µL Streptavidin-HRP eklendi, karıştırıldıktan sonra plaka üzeri şeffaf koruyucu kaplanarak 37°C' de 1 saat inkübe edildi. Koruyucu

çıkarılarak her kuyuya 350 µL yıkama solüsyonu eklenerek 30 saniye beklendi ve kuyular boşaltıldı. Bu yıkama işlemi 5 kez tekrarlanarak plaka havlu kağıt üzerinde kurutuldu. Her kuyuya 50 µL solüsyon A ve 50 µL solüsyon B eklenerek 37°C' de 10 dakika karanlıkta inkübe edildi ve şeffaf renkten, mavi renge değişim gözlendi. İnkübasyon sonunda her kuyuya stop solüsyonu eklenerek reaksiyon sonlandırıldı, mavi rengin anında sarıya değişmesi gözlendi. Spektrofotometrede (BioTek Powerwave XS) 450 nm'de ölçüm yapıldı. İstatistiksel analizler için veriler toplandı.

3.5. Moleküler Analizler

3.5.1. Total RNA izolasyonu ve miktar tayini

RNA, DNA'ya kıyasla daha az stabildir ve kısa ömürlüdür çünkü her türlü koşul ve ortamda bulunan RNaz enzimleri RNA'ların bozulmasına neden olmaktadır. RNA izolasyonu yapılan ortamda RNaz faktörü mümkün olduğunca elimine edilmelidir. Total RNA, bir hücrede bulunan tüm RNA moleküllerini kapsamaktadır. RNA izolasyonu için ticari kit (A.B.T. RNA İzolasyon Kiti, Katalog no: 102-01-05) kullanıldı. Anestezi altında ötenazi işleminden sonra deney hayvanlarından alınan böbrek dokularından 30-40 mg tartılarak eppendorf tüplere alındı. Üzerine zirkonyum boncuklar eklendi. 500 µL ekstraksiyon tamponu, Buffer L eklendi ve homojenizatörde tamamen homojenize edildi. Buffer P 60 µL eklendi. 520 µL fenol eklenerek tüpler vortekslendi ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. 150 µL kloroform eklendi ve vortekslenerek ortamdaki fenolün uzaklaşması sağlandı. +4°C 12.000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant temiz ependorflara alınarak 900 µL etanol eklendi ve pipetaj yapılarak spin kolonlara aktarıldı. +4°C 12.000 g'de 30 saniye santrifüj edildi. Ortamdaki kirliliği arındırmak için 700 µL Wash 1 solüsyonu eklenerek +4°C 12.000 g'de 30 saniye santrifüj edildi. Altta kalan kısım dökülerek 500 µL Wash 2 solüsyonu eklenerek +4°C 12.000 g'de 30 saniye santrifüj edildi ve bu basamak iki kez tekrarlandı. Son santrifüjden sonra altta kalan kısım atıldı ve kolon içinde izole ettiğimiz RNA kaldı. Kolonlar yeni eppendorflara alınarak 90 µL elüsyon tamponu eklenerek 3-4 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra +4°C 12.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolon atıldı ve eppendorfa önceden belirlediğimiz miktarda 30-40 µL RNaz free su koyularak RNA dilüe edildi. İzole edilen RNA'ların miktarı nanodrop (Thermo Scientific NanoDrop 2000, Katalog no: ND2000CLAPTOP)

kullanılarak tayin edildi ve komplementer DNA (cDNA) sentezi yapılana dek -80°C'de saklandı.

3.5.2. RNA'ların cDNA'ya çevrilmesi ve qPCR

İzole ettiğimiz RNA'ları gerçek zamanlı (kantitif) polimeraz zincir reaksiyonu (Real-Time PCR, qPCR) aşamasında anahtar enzim olan Taq polimerazın tanıyıp bağlanabilmesi için komplementer DNA (cDNA)'ya çevrilmesi gerekmektedir. cDNA sentezi için ticari kit (A.B.T. cDNA Sentez Kiti, Katalog no: C03-01-05) kullanıldı. Her bir örnek için PCR tüplerinde, 2 µL 10X reaksiyon tamponu, 1 µL dNTP karışımı, 2 µL random hexamer, 1 µL ters transkriptaz, 3.5 µL RNaz free su ve son olarak 10 µL RNA ekleyerek reaksiyonu hazırlandı. 25° C'de 10 dakika 1 döngü, 37°C' de 120 dakika 1 döngü ve 85°C' de 5 dakika 1 döngü olacak şekilde cDNA sentezi tamamlanarak -20°C'de qPCR aşamasına geçene dek saklanıldı.

Moleküler biyoloji alanında genom ve genler üzerindeki çalışmaların hız kazanmasında PCR önemli bir keşif olmuştur. PCR ile herhangi bir organizmadan herhangi bir geni spesifik olarak çoğaltılabilmektedir. Gelişen teknoloji ile birlikte hedefe yönelik pek çok PCR çeşiti ve tekniği ortaya çıkmıştır. qPCR, reaksiyon tüpünde üretilen ürünün miktarının, DNA zincirine bağlanıp ışıma verebilen florasan boyalar, problar ve etiketler aracılığıyla gerçek zamanlı ölçülebilmesi prensibine dayalı bir tekniktir.

Ferroptozun lipit yolağında görev alan ACSL4 ve ALOX15 genlerinin, renal İ/R hasarı sonrası ekspresyon durumlarını ortaya koymak amacı ile bu genleri hedefleyen qPCR çalışması yapıldı. Bu çalışma için ticari Real-Time PCR kit, (A.B.T. 2X qPCR SYBR-Green Master Mix, Katalog no: Q03-02-01) kullanıldı. SYBR-Green boya pek çok qPCR çalışması için uygundur. Hedef seçilen ACSL4 ve ALOX15 genleri ve bu genlerin ekspresyon durumlarını yorumlayabilmek için kontrol Beta aktin geni için primer tasarlanmıştır. 96 kuyulu PCR plakasına her bir örnek ve gen için; 10 µL 2X master mix, Çizelge 3.2.b'de gösterilen primerlerden 0,6 µL forward primer, 0,6 µL reverse primer, 3,8 µL RNaz free distile su ve 4 µL cDNA kalıbı koyuldu. PCR plakasının üzeri şeffaf koruyucu kaplanarak 3000 rpm'de 10 saniye santrifüj (Biosan CVP-2 Santrifüj, Katalog no: BS-010219-A02) edildi. Real-Time PCR cihazına (Thermo Scientific, Applied

Biosystems, StepOne Plus Real-Time PCR, Katalog no: 4376600) plaka yerleştirilerek döngü sıcaklıkları Çizelge 3.2.a'ya göre ayarlandı. İstatistiksel analizler için veriler toplandı.

a)

95°C (Başlangıç denatürasyonu)	4 dakika	1 döngü
95°C (Denatürasyon)	15 saniye	40 döngü
60°C (Bağlanma)	1 dakika	
60°C-95°C (Melt Curve)	2-5saniye/adım	1 döngü

Çizelge 3.2. a) Gen PCR döngü sıcaklık koşulları

b)

ACSL4	F5' AGAATCATGCGGTGCTGGAA 3' R5' CCTTCCTGCCAGTCCTTCAG 3'
ALOX15	F5' ACAGCACTCTTCCGTCCATC 3' R5' CATGGTGCAGGGTGCATTAG 3'
Beta-Aktin	F5' AGCAAGAGAGGCATCCTCACC 3' R5' ACAGGGATAGCACAGCCTGGA 3'

Çizelge 3.2. b) Genler ve primer dizileri

3.5.3. miRNA izolasyonu 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. Zirkonyum boncuklar eklendi ve 1300 µL miRNA ekstraksiyon solüsyonu eklenerek homojenizatörde homojenize edildi. Dokuların tamamen lizis olduğundan emin olabilmek için oda sıcaklığında 3-5 dakika miRNA ekstraksiyon solüsyonu ile birlikte inkübe edildi. Eppendorflara 225 µL kloroform eklenerek 30 saniye vorteks yapıldı. +4°C 12.000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda örnekler 3 faza ayrıldı. Üstte kalan renksiz ve sıvı kısım RNA içerirken ortadaki beyaz renkli kısım

DNA ve protein içermektedir. Üst faz DNA kontaminasyonundan kaçınarak temiz eppendorflara 700 µL aktarıldı. Üzerine 230 µL % 100 etanol eklendi ve pipetaj yapıldıktan sonra örnekler Spin kolon TR'lere aktarıldı. +4°C 12.000 g'de 2 dakika santrifüj edildi. Altta kalan kısım 870 µL hacimde temiz eppendorflara alındı ve 600 µL % 100 etanol eklenerek pipetaj yapıldıktan sonra örnekler Spin kolon MR'lere aktarıldı. +4°C 12.000 g'de 2 dakika santrifüj edildi. Altta kalan kısım uzaklaştırıldı. Kolona 500 µL RPE solüsyonu eklendi ve +4°C 12.000 g'de 30 saniye santrifüj edilerek altta kalan kısım uzaklaştırıldıktan sonra bu adım bir kez daha tekrar edildi. Boş kolon +4°C 12.000 g'de 30 saniye santrifüj edildikten sonra kolon yeni eppendorflara alınarak 30-40 µL RNaz free su eklendi ve +4°C 12.000 g'de 30 saniye santrifüj edildi. İzole edilen miRNA'lar miktar tayini yapılana dek -80°C' de saklandı.

İzole edilen miRNA'ların miktar tayini için oldukça seçici ve kesin sonuç elde edebilmek amacıyla tahlil kiti (Qubit MicroRNA Assay Kit, Katalog no: Q32880) kullanıldı. Bu kit miRNA'lar için oldukça seçicidir ve tuzlar, solventler veya deterjanlar gibi kontaminantları tolere edebilmektedir. 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 kuvvetli bir şekilde vortekslendi ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edilerek Qubit 3 florometre ile ölçümleri yapıldı.

3.5.4. miRNA'ların cDNA'ya çevrilmesi ve qPCR

Tek zincirli miRNA'lar cDNA sentezi ile bir sonraki aşama olan PCR için hazır hale getirildi. miRNA için cDNA sentez kiti (Origene, Katalog no: HP100042) kullanıldı. Bu kitin çalışma prensibi, miRNA'ların 3' ucunda poliA kuyruk bulunmamasını kullanarak, 3' ucuna poliA polimeraz ile kuyruk takılıp ardından çapa oligo dT bağlanıp ters transkriptaz enzimi ile zincir sentezi sağlanmasına dayanmaktadır. PCR tüplerine 1 µL poliA 10X, 1 µL 10 mM ATP ve 1 µL poliA polimeraz eklendi. Ölçülen miRNA miktarları standardize edilerek H_2O ile birlikte son hacmi 7 µL (tüplerin toplam son hacmi 10 µL) olacak şekilde hesaplandı ve PCR tüplerine H_2O ve miRNA eklendi. 37°C' de 2

saat inkübasyon ile poliadenilasyon sağlandı. Tüpleri 1 µL çapa oligo dT karışımı eklenerek karıştırıldı ve hızlı spin (Biosan, MSC 3000, Katalog no: BS-010205-AAN) yapılarak 70°C' de 5 dakika inkübe edildi. Tüpler buz üzerine alınarak 2 dakika inkübasyon sağlandı. 4 µL 5X MMLV buffer, 5 µL H_2O ve 1 µL MMLV ters transkriptaz enzimi eklendi. 42°C' de 1 saat, 95°C' de 5 dakika inkübe edilerek buz üzerine alındı. Reaksiyon karışımı ependorflara alınarak 200 µL H_2O eklendi ve miRNA cDNA'lar qPCR için hazır hale getirildi.

Renal İ/R hasarı ile indüklendiğini tahmin ettiğimiz ferroptoz lipit yolağı ile ilişkili seçilen miRNA'ların ekspresyon profili için qPCR kullanıldı. miRmap web sitesi ile gen ilişkili hedef miRNA'lar tespit edilerek TargetScan web sitesi ile çalışma skorlarının % 75 ve üzeri olmasına dikkat edilerek seçim yapıldı. Bu miRNA'lar içerisinden RNADisease web sitesi ile hangi çalışma alanlarında kullanıldıkları taranarak spesifik seçime olanak sağlandı. miRNA'ların renal İ/R hasarı çalışmalarında kullanılmadığına dikkat edilerek sonuçta 4 miRNA seçildi ve bunların forward primerleri temin edildi. Referans olarak U6 RNA geni kullanıldı. Reverse primer olarak daha önce cDNA sentezi için kullanılan kitin sağladığı reverse primer kullanıldı. miRNA'ları, miRNA cDNA kalıbı kullanarak sentezlemek için ticari kit (Applied Biological Materials Inc., BlasTaq 2X MasterMix, Katalog no: G891) kullanıldı. 96 kuyucuklu PCR plakasında her örnek ve miRNa için 10 µL BasTaq 2X MasterMix, Çizelge 3.3.b'de gösterilen primerlerden 0,5 µL forward primer, 0,5 µL reverse primer, 5 µL nükleaz free su ve 4 µL miRNA cDNA kalıbı koyularak nazikçe karıştırıldı. Plaka üzeri şeffaf koruyucu ile kaplanarak 3000 rpm'de 10 saniye santrifüj edildi. Real-Time PCR cihazına plaka yerleştirilerek döngü sıcaklıkları Çizelge 3.3.a'ya göre ayarlandı. İstatistiksel analizler için veriler toplandı.

95°C (Enzim aktivasyonu)	3 dakika	1 döngü
95°C (Denatürasyon)	15 saniye	40 döngü
60°C (Bağlanma)	1 dakika	
60°C-95°C (Melt Curve)	2-5saniye/adım	1 döngü

Çizelge 3.3. a) miRNA PCR döngü sıcaklık koşulları

rno-miR-497-5p	F5’GCAGCACACTGTGGTTT3’ R5’GAACATGTCTGCGTATCTC3’ (CAT#: HP300388)
rno-miR-106b-5p	F5’TAAAGTGCTGACAGTGCAG3’ R5’GAACATGTCTGCGTATCTC3’ **(**CAT#: RP300013**)**
rno-miR-3584-5p	F5’GGGAGGAGTCCAGGAG3’ R5’GAACATGTCTGCGTATCTC3’ (CAT#: RP300253)
rno-miR-92a-2-5p	F5’AGGTGGGGATTAGTGCCATT3’ R5’GAACATGTCTGCGTATCTC3’ (CAT#: RP300416)
U6	F5’ATTGGAACGATACAGAGAAGATT 3’ R3’ GAACATGTCTGCGTATCTC 5’

Çizelge 3.3. b) miRNA ve primer dizileri

3.6. İstatistiksel Analizler

Elde edilen veriler GraphPad Prism 8.0 programı kullanılarak analiz edilmiştir. ROS 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 Student’s t-test ve One-Way ANOVA yöntemleriyle istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Tüm istatistik uygulamalar sonucunda sayısal olarak ortaya çıkan değerler karşılaştırılarak gruplar arasındaki farklar $*p < 0,05$; $**p<0,01$; $***p<0,001$ olduğunda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4.BULGULAR VE TARTIŞMA

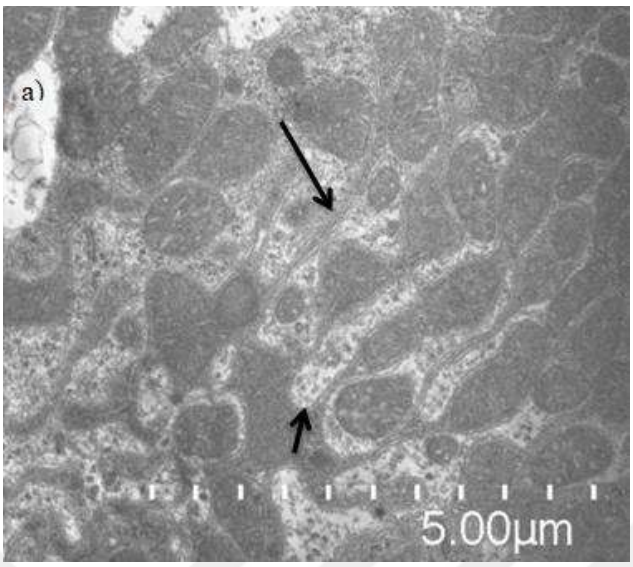
4.1. TEM Analizleri

Çalışmamızda ilk defa iki farklı süre ile uygulanan renal İ/R modelinde ferroptotik hücre ölümünde oluşan hücresel değişiklikler incelendi. 30 dakika sham gruplarının elektron mikroskobu görüntüleri incelendiğinde morfolojik olarak hücre ve organel düzeyinde herhangi bir değişime rastlanmamıştır. Şekil 4.2.a.'da granüllü endoplazmik retikulum'un (GER) düzenli yapıda olduğu görülmektedir. Şekil 4.1.b.'de görüldüğü gibi mitokondriler normal şekil ve boyuttadır.

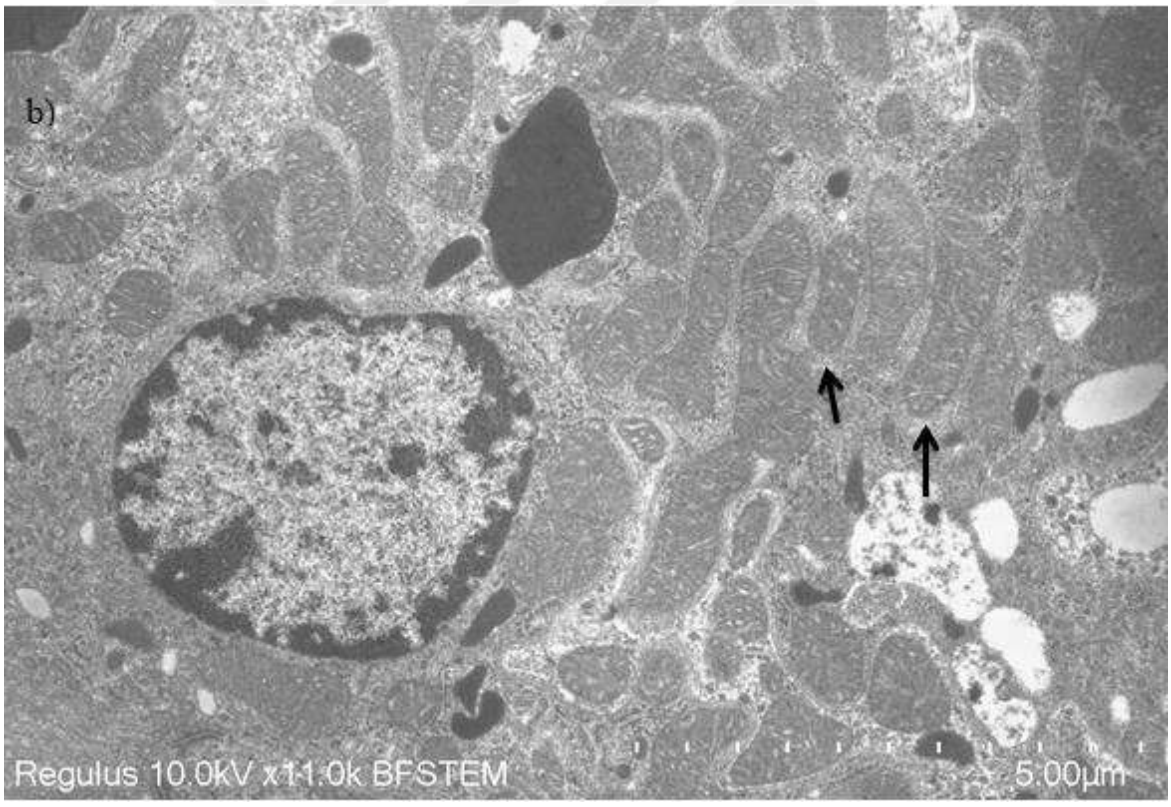
30 dakika iskemi grubu elektron mikroskobu görüntüleri incelendiğinde organel düzeyinde belirgin morfolojik farklılıklar gözlemlenmiştir. Şekil 4.2.'de GER düzeninde morfolojik değişikliklerin başladığı, mitokondrilerin volümünün azaldığı, membran geçirgenliklerin arttığı ve kristalarında düzensizliğin başladığı görülmüştür. Ayrıca küçük vakoullerin varlığı ile vakoulizasyonun başladığı tespit edilmiştir.

60 dakika sham grubu elektron mikroskobu görüntüleri incelendiğinde hücre ve organellerin morfolojik olarak değişikliğe uğramadığı gözlenmiştir. Şekil 4.3.a.'da görüldüğü gibi mitokondri ve GER normal yapıdadır. Şekil 4.3.b.'de membran mikrovillusları yoğunlukla görülmektedir ve Şekil 4.3.c.'de çekirdek zarı bir bütündür ve kromatin yapısı normal yoğunluktadır.

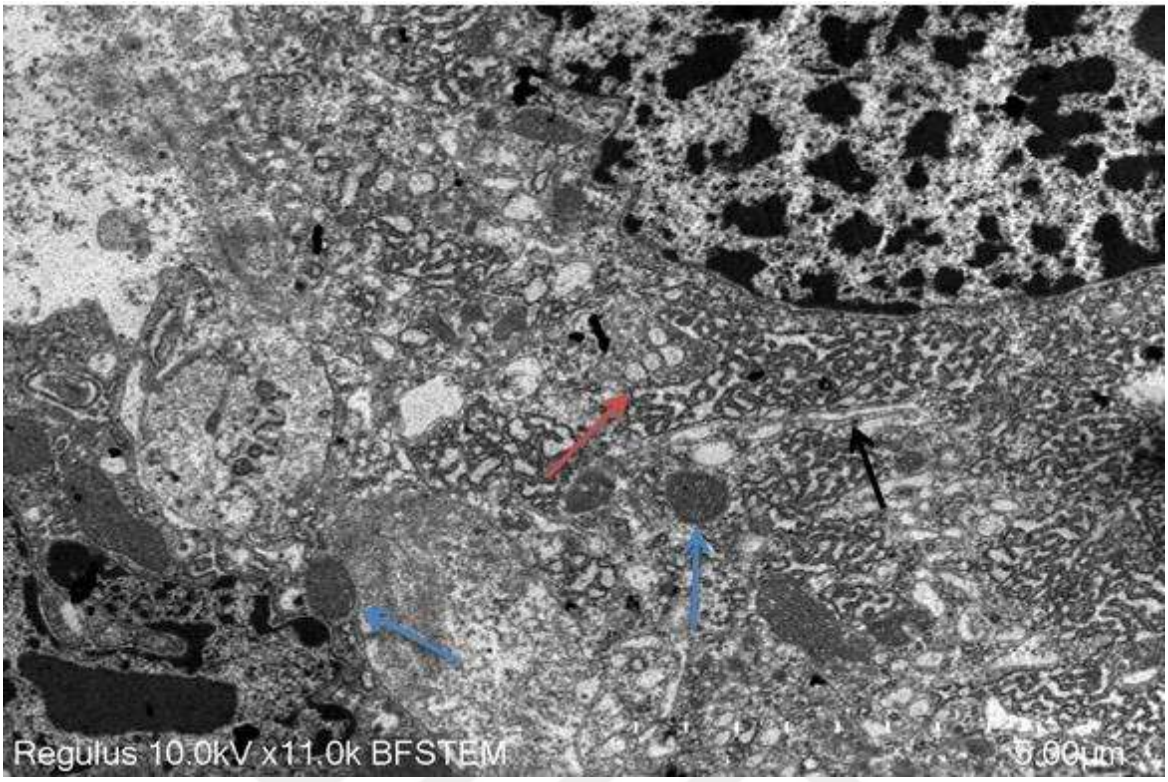
60 dakika iskemi grubu kesitleri incelendiğinde ise 30 dakika iskemi grubuna kıyasla hücresel hasarın şiddetinin arttığı tespit edilmiştir. Şekil 4.4.a'da görüldüğü gibi GER yapısının bozulduğu ve ribozomların GER üzerinde ayrıldığı gözlenmiştir. Membran mikrovillus yapılarında azalma görülmüştür. Şekil 4.4.b'de mitokondrilerin volümleri azalmış, membran geçirgenliği artmış ve krista yapıları dağılıp neredeyse silindiği tespit edilmiştir. Şekil 4.4.c.'ye bakıldığında ise hücre içinde yoğun vakoulizasyon görülmüştür. Şekil 4.4.d.'de ise çekirdek zarının sağlam kaldığı ancak kromatin yapısının yoğunlaştığı tespit edilmiştir.



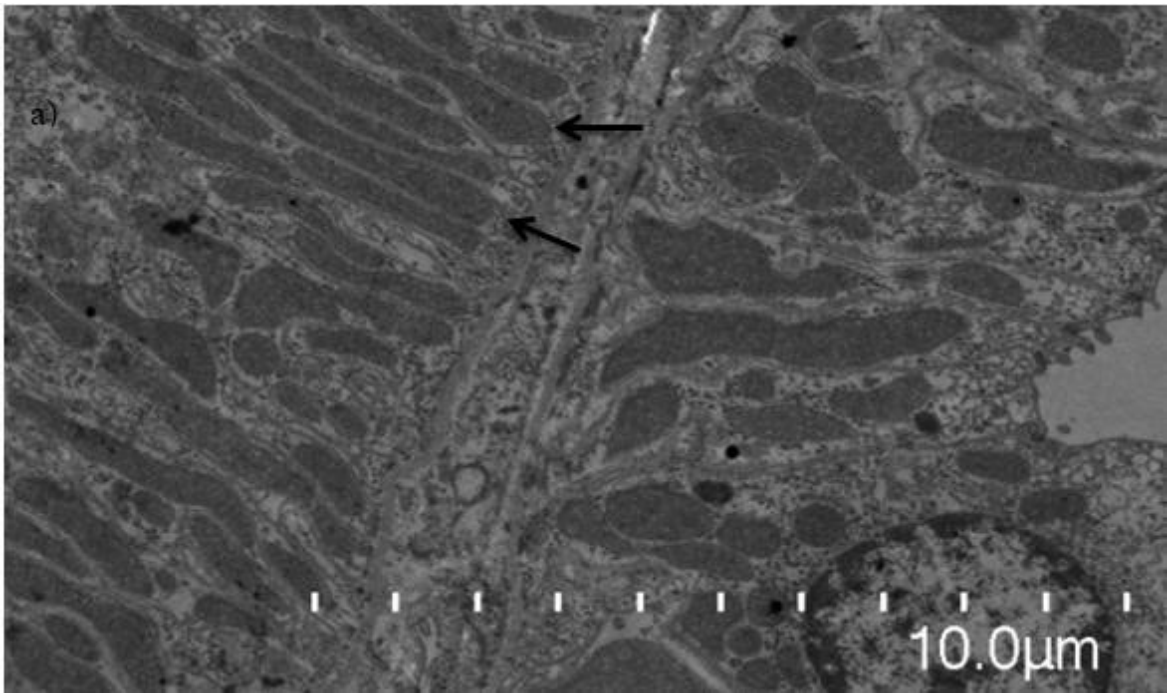
Şekil 4.1.a. Endoplazmik retikulum yapısı (siyah ok ile gösterilmektedir).



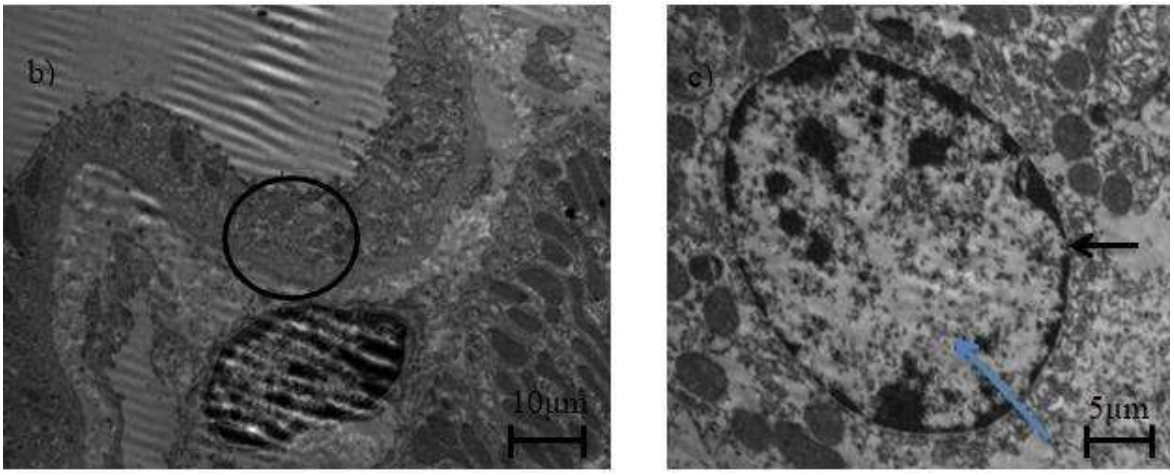
Şekil 4.1.b. Mitokondri ve krista yapıları (siyah ok ile gösterilmektedir).



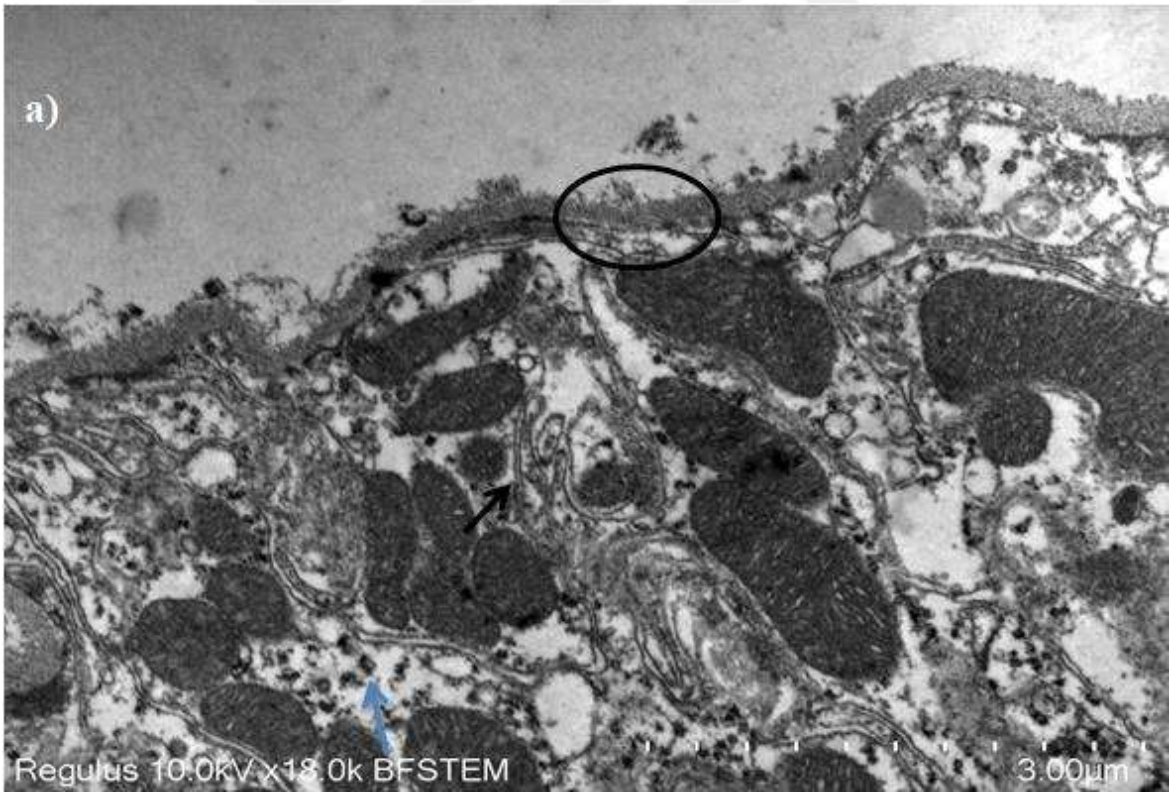
Şekil 4.2. Endoplazmik retikulum düzensizliği (siyah ok ile gösterilmektedir). Mitokondrilerin durumu, krista yapıları (mavi ok ile gösterilmektedir). Küçük vakoul yapıları (kırmızı ok ile gösterilmektedir).



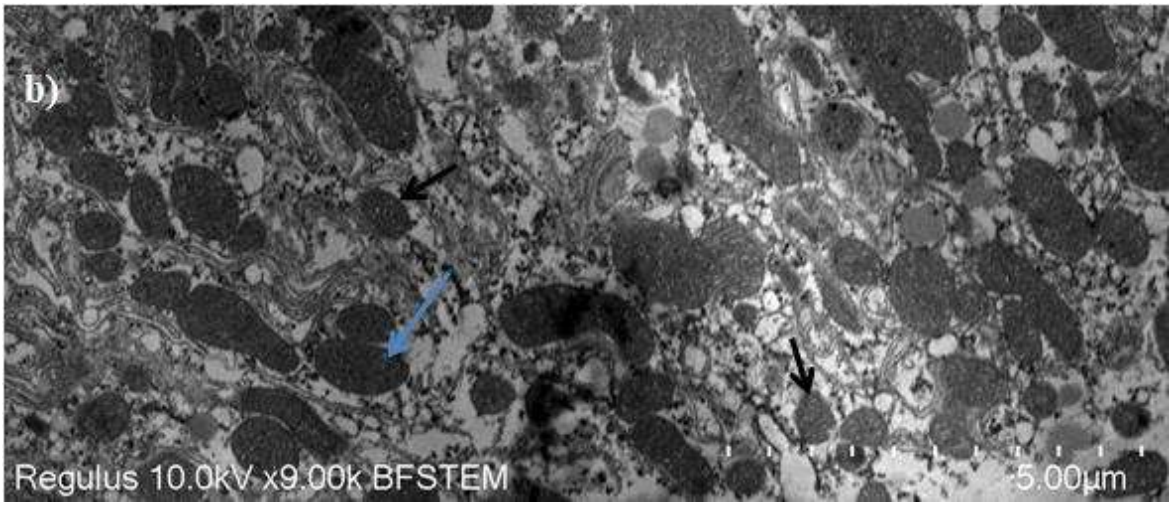
Şekil 4.3.a. Mitokondri ve endoplazmik retikulum yapılarının durumu (siyah ok ile gösterilmektedir).



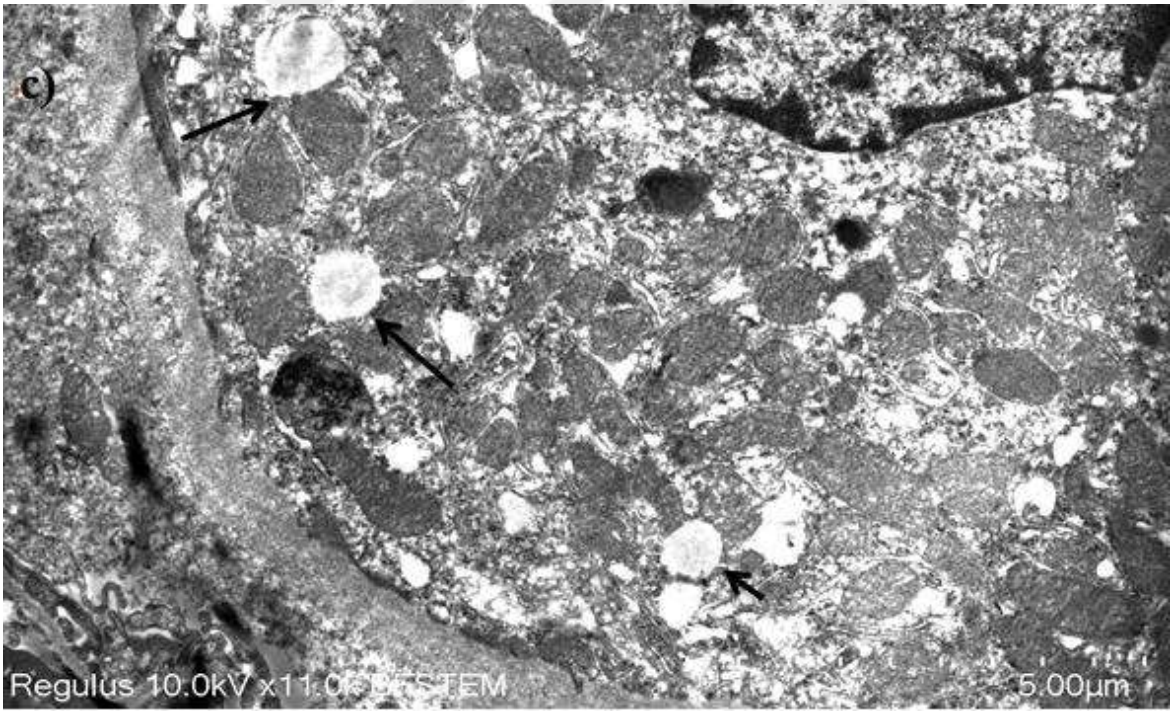
Şekil 4.3.b. Hücre membranı mikrovillus yapıları (siyah yuvarlak ile gösterilmektedir).
Şekil 4.3.c. Çekirdek zarı (siyah ok ile gösterilmektedir) ve kromatin yapısı (mavi ok ile gösterilmektedir).



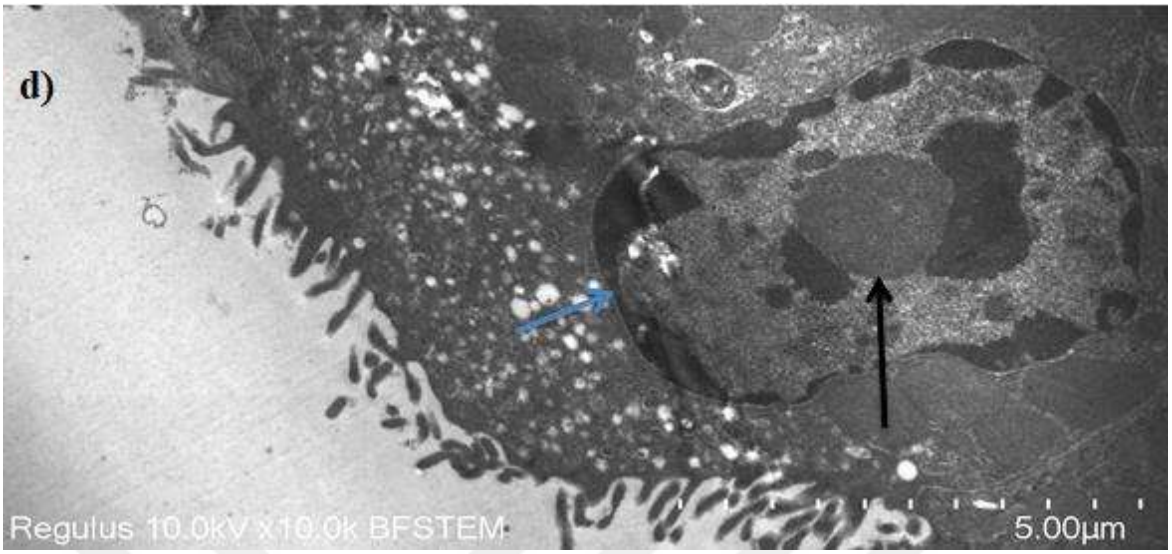
Şekil 4.4.a. Endoplazmik retikulum bozulması (siyah ok ile gösterilmektedir) ve ribozom (mavi ok ile gösterilmektedir) yapıları. Membran mikrovillus yapıları (siyah yuvarlak ile gösterilmektedir).



Şekil 4.4.b. Mitokondrilerin membran geçirgenliği, volümleri (siyah ok ile gösterilmektedir) ve krista yapıları (mavi ok ile gösterilmektedir).



Şekil 4.4.c. Sitoplazmada yoğun vakoulizasyon (siyah ok ile gösterilmektedir).



Şekil 4.4.d. Çekirdek zarı (mavi ok ile gösterilmektedir) ve kromatin yapısı (siyah ok ile gösterilmektedir).

Renal İ/R hasarının belirlenmesi için yapılan farklı çalışmalarda da TEM görüntüleme yöntemi kullanılmıştır. Bu çalışmalarda da bizim çalışmamıza benzer şekilde böbrek hücrelerinde ve organel yapılarında morfolojik değişiklikler gözlendiği rapor edilmiştir. Farelerde yapılan bir çalışmada renal İ/R ile indüklenen akut böbrek hasarını tespit edebilmek için TEM görüntüleme yöntemi kullanılmıştır. Bu çalışmada iskemi grupları ile sham gruplarını karşılaştırdıklarında, tübül hücrelerinde azalmış mikrovillus yapıları, podosit pediküllerin silinmesi ve mitokondri volüm azalması gözlemlemişlerdir (Chihanga vd., 2017). Bizim çalışmamızda özellikle 60 dakika iskemi gruplarında, mitokondrilerde volüm azalması ve işlev kayıpları gözlemlenmiştir. Renal İ/R hasarının sıçanlarda oluşturduğu morfolojik değişiklikler ve oksidatif stresi inceleyen farklı bir çalışmada ise yine TEM görüntüleme yöntemi kullanılmıştır. Bu görüntülerde ratların sham gruplarında yoğun membran mikrovillus yapısı ve yoğun düzenli mitokondriler görülürken, ratların İ/R grubunda mitokondriyal volüm azalması, mikrovillus yapılarında bozulma ve azalma görülmüştür (Kusaka vd., 2010). Bizim çalışmamızda da 30 ve 60 dakikalık İ/R gruplarında mitokondriyal volüm azalması ve özellikle 60 dakika İ/R gruplarında membran mikrovillus yapılarında bozulma ve azalma tespit edilmiştir. Bizim bulgularımızı destekler şekilde yapılan diğer bir çalışmada ise renal İ/R hasarı gören sıçanların böbrek dokularındaki değişiklikler morfolojik olarak TEM'de incelenmiştir. 30

dakika İ/R'den sonra mitokondrilerde volüm azalması ve kristaların yapısal bozukluğu görülmüştür (Morales vd., 2019).

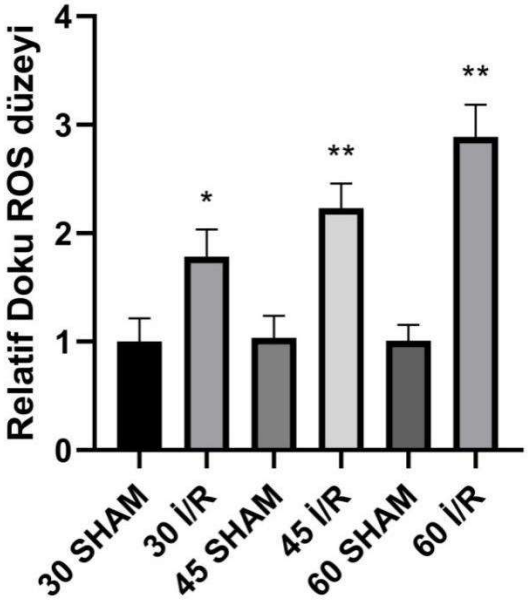
Çalışmamızda 30 ve 60 dakika renal İ/R uygulanan sıçanların böbrek TEM görüntüleri incelendiğinde ferroptotik hücre ölümünde görülen hücre morfolojisi ve organel yapı değişiklikleri gözlenmiştir. Örneğin 60 dakikalık İ/R uygulanan grupların TEM görüntülerinde GER'lerin düzenli yapılarının bozulduğu, sitoplazmanın içerisinde dağıldığı ve hatta üzerlerinde bulunduğu ribozomların koparak sitoplazmanın içinde biriktiği gözlendi. Yapılan farklı çalışmalarda da ferroptotik hücre ölümünde GER'lerin strese girdiği rapor edilmiştir. Yapılan bu çalışmalarda ER stresinin, memeli türlerinde katlanmamış protein tepkisi (UPR) ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Kalsiyum seviyelerindeki değişikliklerin engellediği bir dizi kimyasal reaksiyonlar sonucu ER lümeninde katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine neden olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca Sistem Xc^-, hücre içi glutamat için hücre dışı sistin değişimine tipik olarak aracılık eden bir amino asit antiportörü olarak tanımlanmaktadır. Ferroptotik ajanlar tarafından sistin-glutamat değişiminin inhibisyonunun da, bir ER stres yanıtının aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Tang, 2019). Yapılan bu çalışmalar bulgularımızı destekler niteliktedir. Çalışmamızda TEM görüntülerinde ayrıca mitokondrilerin volümünün azalması, krista yapılarının bozulması, hücre zarında bozulma olmaması ve kromatin yapısının yoğunlaşması tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda ferroptotik hücre ölümünün hücrelerde meydana getirdiği morfolojik değişiklikler, mitokondriyal volüm azalması, kristaların yapılarının bozulması, mitokondriyal dış zar yırtılması, kromatin yoğunlaşması ve hücre zarı sağlam kalması olarak tanımlanmaktadır (Nirmala ve Lopus, 2019; Çelenk, 2021). Bu çalışmalar bizim bulgularımızı destekler nitelikte olan belirteçler içermektedir.

4.2. Biyokimyasal Analizler

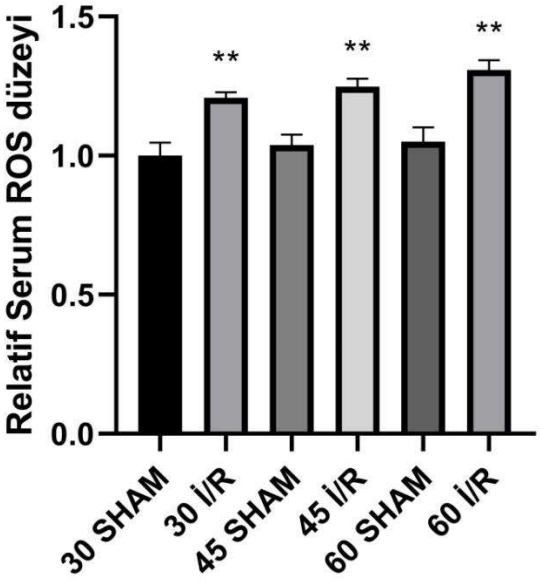
4.2.1. Doku ve serumdan ROS analizi

Çalışmamızda ilk defa üç farklı iskemi süresine bağlı olarak gelişen, İ/R hasarı ile indüklenen ROS üretiminin, hem doku düzeyinde hem de serum düzeyinde tespiti

yapılmıştır. Renal İ/R hasarı modeli oluşturduğumuz sıçanların böbrek dokusu ve serumundan yaptığımız ROS tayini sonucunda Çizelge 4.1.a'ya göre doku ROS seviyesinde Çizelge 4.1.b'ye göre serum ROS seviyesinde İ/R gruplarında sham gruplarına oranla anlamlı bir artış tespit ettik (*p<0,05; **p<0,01).



Çizelge 4.1.a. Farklı iskemik sürelere maruz kalan sıçan böbrek dokusunda ki ROS düzeyi tayini



Çizelge 4.1.b. Farklı iskemik sürelere maruz kalan sıçan serum örneklerinden ROS düzeyi tayini

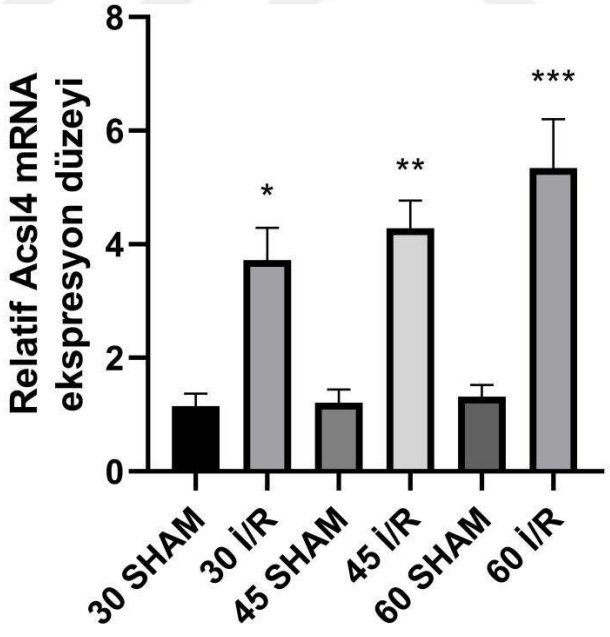
Çalışmamızda İ/R grupları sham grupları ile karşılaştırıldığında ROS seviyesinde belirgin bir artış tespit edilmiştir. Yapılan farklı bir çalışmada iskemik koşullar altında, ksantin dehidrojenazın ROS üretebilen ksantin oksidaz formuna konformasyonel bir değişikliğe uğradığı belirtilmiştir. Normal şartlarda mitokondride oksijenin %95'i herhangi bir serbest ara ürüne dönüşüm olmaksızın H_2O'ya direkt olarak indirgenmektedir. Kalan %5'lik kısımda $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 gibi serbest radikallerin üretildiği ve bu radikallerin CAT, SOD ve GPX enzimleri aracılığı ile H_2O'ya indirgendiği bilinmektedir. İskemik koşullarda ise antioksidan savunma sistemi doğru bir şekilde çalışamamakta ve H_2O_2 seviyesi giderek yükselmektedir. Buna bağlı olarak son derece aktif OH^- radikalinin daha fazla üretilmesine neden olmaktadır. İskemi koşullarında işlevi bozulan mitokondri tarafından ROS üretimi belirgin bir şekilde artmaktadır ve dokulara oksijenin sağlandığı reperfüzyon durumunda bu üretim artarak devam ettiği rapor edilmiştir (Dorweiler vd., 2007). Çalışmamızda ki ROS düzeyinin belirgin artışının bu çalışmada belirtilen süreçler yoluyla arttığı düşünülmektedir. Farklı bir çalışmada ise mitokondrilerin, endojen ROS üretiminin ana kaynağı olduğu ve lipid peroksidasyonuna karışı duyarlı olduğu rapor edilmiştir. Mitokondri yüksek seviyelerde indirgenmiş glutatyon içerdiği için, GPX4 aktivitesinin inhibitörlerinin veya glutatyonu tüketen koşulların da mitokondride lipid peroksidasyonunu indükleyebildiği belirtilmiştir. Mitokondri ayrıca yüksek düzeyde fosfatidiletanolamin (PE) içermektedir ve PE sentezinin ana kaynağı olarak gösterilmektedir. Oksitlenmiş PE'lerin ferroptozda birikmesi iyi bilinmektedir. PE'ler lipit peroksit üretim reaksiyonuna katılmaktadırlar. Mitokondriden kaynaklanan ROS, mitokondride veya diğer bölmelerde lipid peroksidasyonunu güçlendirebilmektedir (Tang, 2019). Bu bilgiler çalışmamızda ferroptotik hücre ölümünün artan ROS birikiminden kaynaklanan lipit peroksidasyonu yolu ile tetiklendiğini desteklemektedir. Bizim bulgularımızı destekler nitelikte olan farklı çalışmalar bulunmaktadır. Asetillenmiş histonları tanıyarak bağlanan ve transkripsiyon düzenlemesinde önemli bir rol oynayan Brd4'ün inhibisyonu ile farelerde oluşturulan renal İ/R (30 dakika iskemi) modelinin neden olduğu hasarları azaltmayı hedefleyen bir çalışmada sham grupları ile karşılaştırıldığında İ/R gruplarında daha yüksek ROS seviyesi görüldüğü bildirilmişlerdir (Liu vd., 2019). Ginsenosid Rb1'in, mitokondriyal kompleks I'den ROS üretimini inhibe ederek kardiyak İ/R hasarını azaltıp azaltmadığını araştırmayı hedefleyerek yaptığı bir çalışmada farelerde oluşturulan kardiyak İ/R (30 dakika iskemi) modelinde, renal İ/R modeli kullandığımız çalışmamıza benzer şekilde, iskemi gruplarında yüksek ROS düzeyi gözlendiği bildirilmiştir (Jiang vd., 2021). PRMT5 metiltransferaz

enziminin farelerde oluşturulan renal İ/R (30 dakika iskemi) modelinde oksidatif stres oluşturma üzerine rolünün araştırıldığı bir çalışmada, bizim bulgularımıza benzer şekilde, sham grupları ile karşılaştırıldığında İ/R gruplarında daha yüksek ROS seviyesi görüldüğü bildirilmiştir (Diao vd., 2019).

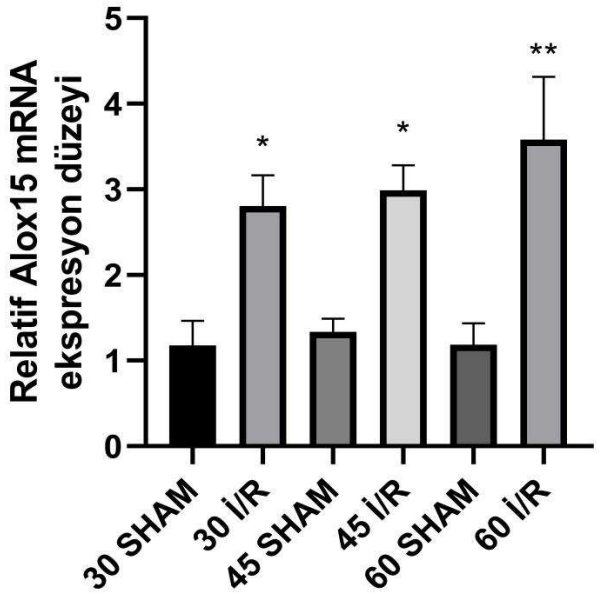
4.3. Moleküler Analizler

4.3.1. ACSL4 ve ALOX15 Ekspresyon Düzeyleri

Çalışmamızda ilk defa renal İ/R modelinde, ferroptoz lipit yolağında görevli ACSL4 ve ALOX15 genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri üç farklı iskemi aralığına bağlı olarak araştırılmıştır. Çizelge 4.2.' ye bakıldığında ACSL4 ekspresyonu 30, 45 ve 60 dakikalık İ/R gruplarında sham gruplarına göre anlamlı artış göstermiştir. Ayrıca bu ekspresyon seviyesindeki artış, iskemi süresinin uzunluğuna göre yükselen bir ekspresyon profili göstermiştir. Çizelge 4.3.'e bakıldığında ise ALOX15 ekspresyonu benzer şekilde tüm İ/R gruplarında sham gruplarına göre anlamlı artış göstermiştir ve iskemi süresinin uzunluğuna göre gen ekspresyonunda artış gözlenmiştir.



Çizelge 4.2. Farklı iskemik sürelere maruz kalan sıçan böbrek dokusunda ki ACSL4 mRNA ekspresyonu (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).



Çizelge 4.3. Farklı iskemik sürelere maruz kalan sıçan böbrek dokusunda ki ALOX15 mRNA ekspresyonu (*p<0,05; **p<0,01).

Çalışmamızda İ/R gruplarında ACSL4 ekspresyon düzeyi belirgin artış göstermiştir. Literatürde ACSL4'ün lipit peroksidasyonunu arttırarak ferroptoza katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada yağ asidi metabolizmasının bir dizi enzim tarafından anabolik ve katabolik yollar tarafından sağlandığı rapor edilmiştir. ER ve mitokondri dış zarında ifade edilen ACSL ailesi açil-coA'lar oluşturmak için yağ asitlerini katalize etmektedirler. ACSL4 ekspresyonu erastin kaynaklı ferroptoza karşı hassasiyetle ilişkilendirilmiştir. ACSL4 ifadesi baskılandığında ferroptoz direnci artarken ACSL4'ün gen aktarımı yolu ile sağlanan aşırı ekspresyonu kanser hücrelerinde ferroptoz duyarlılığına neden olmuştur. 4 farklı hücre hattında 24 saat erastin müdahalesinden sonra 2 hücre hattı ferroptoz dirençli diğer iki hücre hattı ferroptoz duyarlı olarak ortaya çıkmıştır. Ferroptoz duyarlı hücreler nispeten yüksek ACSL4 ifadesine sahipken dirençli hücreler çok düşük seviyede ya da hiç ACSL4 ifade etmemiştir. Böylece ACSL4'ün erastin kaynaklı ferroptozun düzenlenmesinde belirleyici bir rolü olduğu gösterilmiştir. ACSL4'ün baskılanması ile ferroptoz büyük ölçüde azalmıştır. ACSL4 ekspresyonun inhibe edilmesi ile yalnızca malondialdehit (MDA) üretimi azalmıştır, demir birikiminde farklılık görülmemiştir. ACSL4'ün ekspresyonunun indüklenmesi ile MDA seviyesi

yükselmiştir demir birikimi bu parametre ile de değişmemiştir. Bu bulgular ACSL4'ün lipit peroksidasyonunu arttırarak ferroptoza katkıda bulunduğunu göstermiştir (Yuan vd., 2016). Bizim çalışmamızda ACSL4'ün ekspresyon artışı lipit peroksidasyonu tetikleyerek ferroptozun indüklenmesi olgusunu desteklemektedir. Bizim bulgularımızı destekler nitelikte yapılan farklı çalışmalar bulunmaktadır. Farelerde oluşturulan renal İ/R hasarı modelinde, ağrı kesici bir ilaç olan Deksmedetomidin'in ferroptozu baskılayarak böbrekleri renal İ/R hasarına karşı koruyup korumadığını araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada, İ/R hasarından sonra ACSL4 ekspresyonunun böbrek dokularında arttığı bildirilmiştir (Tao vd., 2022). Ferroptozun mekanizmasını anlamak amacıyla yapılan bir çalışmanın RNA dizi analizinde, renal İ/R ile oluşturulan akut böbrek hasarı olan farelerin ACSL4 ekspresyonu normal farelerin ACSL4 ekspresyonuna oranla artış gösterdiği bildirilmiştir (Wang vd., 2022).

Bağırsak İ/R hasarında yapılan bir çalışmada ACSL4'ün iskemik koşullar altında yukarı regüle edildiği ve reperfüzyon öncesi inhibe edildiği takdirde ferroptozun ve hücresel hasarın engellendiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada ACSL4'ün nakavt edildiği hücrelerde lipit peroksidasyonuna ve ferroptoza direnç meydana geldiği bildirilmiştir (Li vd., 2019). Çizelge 4.3.' de görüldüğü gibi, ACSL4'ün 30 dakikadan sonra daha yüksek anlamlılık göstermesi ile ferroptozun 30 dakika İ/R'dan sonra daha belirgin şekilde meydana geldiği söylenebilmektedir. Ayrıca bu durumu 60 dakika iskemi grubu TEM görüntülerimiz de desteklemektedir.

Çalışmamızda ALOX15 ekspresyon düzeyinde anlamlı artış gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada lipoksijenazlar (LOX) PUFA'ların dioksijenasyonunu katalize eden hem grubu içermeyen, demir içeren enzimlerin bir ailesi olarak tanımlanmaktadır. ALOX15 lipit oksidasyon enzim sınıflarında yer alır ve ferroptozda önemli rolü olduğu bildirilmiştir. PUFA-fosfolipidlerde iskemi hasarına duyarlılığı artıran spesifik redoks reaksiyonlarını başlattığı gösterilmiştir. İ/R hasarıyla ALOX15'in ekspresyonu indüklenmektedir ve buna bağlı olarak gelişen reaksiyonlarla ortamda lipit peroksitlerin birikimi ile ferroptoz tetiklenmektedir (Feng ve Stockwell, 2018). Farklı bir alanda yapılan çalışmada HT1080, Calu1 ve Panc1 hücre hatlarında ALOX15 ifadesi inhibe edilerek ferroptozun önüne geçildiği bildirilmiştir (Shintoku vd., 2017). Mide kanseri hasta doku ve serum örneklerinde yapılan çalışmada ALOX15 geninin keskin bir düşüş yaşadığı ve buna bağlı

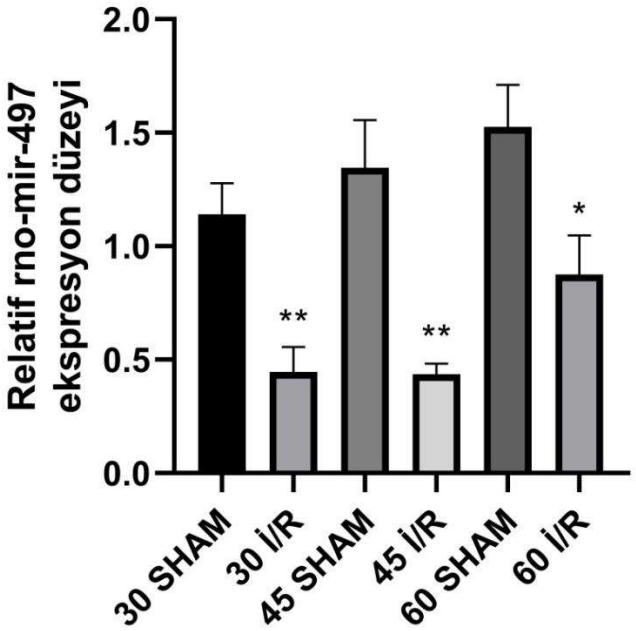
olarak lipid ROS seviyelerinin düştüğü gösterilmiştir. miR522 bu hastaların serum ve doku hücrelerinde yüksek ekspresyon seviyesi göstermiştir ve lusiferaz raportör gen metodu ile miR522'nin ALOX15'e bağlanarak bu genin ekspresyonunu baskıladığı ve lipid ROS seviyesini düşürerek ferroptozu kısıtladığı kanıtlanmıştır (Zhang vd., 2020). Bu çalışmadan yola çıkarak, çalışmamızda ALOX15 ekspresyon artışının lipit peroksidasyonunu tetikleyerek ferroptoza neden olduğu düşünülmektedir. Bulgularımızı destekler nitelikte olan farklı çalışmalar bulunmaktadır. Sıçanlarda miyokardiyal İ/R modeli oluşturarak ve in vitro modeller kullanılarak yapılan bir çalışmada PUFA-fosfolipitlerin katıldığı reaksiyonlar ile hücrede oluşan hasara katkısı araştırılmıştır ve ALOX15 ekspresyonunun indüklenerek lipit peroksit birikimi yoluyla ferroptozu desteklediği gösterilmiştir (Ma vd., 2022). Farelerde serebral İ/R modeli oluşturularak yapılan bir çalışmada İ/R hasarı ile indüklenen ferroptozun ALOX15 ekspresyonunun artması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Zhao vd., 2022). Yapılan bu çalışmalar artan ALOX15 ekspresyon düzeyinin ferroptotik hücre ölümü ile ilişkili olduğunu göstermiştir ve bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulgularda ALOX15 ekspresyonunun farklı iskemik sürelerde böbrek dokusunda artışının ferroptotik hücre ölümünün gerçekleştiğini destekler niteliktedir.

4.3.2. miR497 Ekspresyon Düzeyi

Çalışmamızda ilk defa renal İ/R hasarıyla değişen ACSL4 ile ilişkili miR497'nin ekspresyon değişimi farklı iskemi sürelerine bağlı olarak araştırılmıştır. Çizelge 4.4'e bakıldığında miR497'nin ekspresyon düzeyinde, tüm İ/R gruplarında sham gruplarına oranla anlamlı bir azalma tespit edilmiştir.

Farelerde oluşturulan miyokardiyal İ/R hasarı modellerinde yapılan farklı çalışmalarda miR497'nin ekspresyonunun artış gösterdiği bildirilmiştir (Li vd., 2015; Qin vd., 2018; Jin vd., 2019). Çalışmamızda böbrek dokusundan izole edilen miR497 ekspresyonunun farklı iskemi sürelerine bağlı olarak düştüğü belirlenmiştir. Yukarıda bahsedilen çalışmalar miyokard İ/R hasarı üzerinde yapılmış olup bizim çalışmamızda ise renal İ/R hasarında miR497 ekspresyonuna bakılmıştır. Farklı dokularda farklı miRNA ekspresyon düzeyleri gerçekleşebilir. Sonuçlarımızdan yola çıkarak böbrek dokusunda tespit edilen azalan miR497 ekspresyonlarının, ACSL4 ekspresyon seviyesinin artışına neden olacağı ve ferroptotik hücre ölümünü indükleyebileceği düşünülmektedir. Kanser

alanında yapılan farklı bir çalışmada üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde miR497'nin ekspresyonu ve CCNE1 mRNA ekspresyonu birlikte araştırılmıştır ve miR497'nin ekspresyonunun önemli ölçüde azalırken CCNE1'in ekspresyonunun önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir. Ayrıca miR497'nin üçlü negatif meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu ve metastazını inhibe etmek, hücre döngüsünü bloke etmek gibi tümör inhibisyonu görevlerinde rol aldığı bildirilmiştir. Bu çalışma miRNA ekspresyon düzeylerinin farklı alanlarda farklı görevler üstlendiğini göstermektedir (Liu vd., 2021).



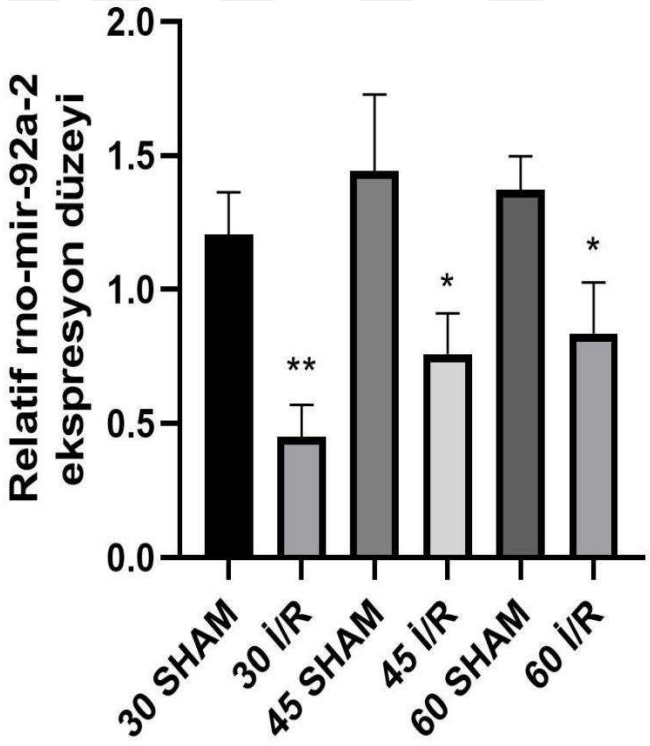
Çizelge 4.4. miR497 ekspresyon grafiği (*p<0,05; **p<0,01)

4.3.3. miR92a2 Ekspresyon Düzeyi

Çalışmamızda ilk defa renal İ/R hasarıyla değişen ALOX15 ile ilişkili miR92a2'nin ekspresyon değişimi farklı iskemi sürelerine bağlı olarak araştırılmıştır. Çizelge 4.5'e bakıldığında miR92a2'nin ekspresyon düzeyi, tüm İ/R gruplarında sham gruplarına göre anlamlı azalma göstermiştir.

miR92a2 ile ilgili yapılan çalışmaların önemli bir kısmı kanser hücreleriyle yapılmıştır. Örneğin miR92a2'nin küçük hücreli akciğer kanserinin tümör dokularında yapılan farklı çalışmalarda miR92a2'nin aşırı eksprese olduğu ve apoptotik hücre ölümüyle ilişkili olduğu rapor edilmiştir. (Li vd., 2014; Yu vd., 2017) Özellikle tümör

proliferasyonunu teşvik ederek apoptozu inhibe ettiği belirtilmiştir. miR92a ailesinin (miR25, miR92a1, miR92a2 ve miR363) üyelerinin birçok tümör doku tipinde aşırı eksprese olduğu ve bu üyelerin tümör evresi veya boyutu, tümör metastazı ve prognozu ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca tümör biyobelirteci olarak kullanılabilecekleri öne sürülmüştür (Li vd., 2014). Küçük hücreli akciğer kanseri üzerine yapılan farklı bir çalışmada yine miR92a2 ekspresyon seviyesinin yüksek olduğu ancak bir önceki çalışmada bahsedilen tümör biyobelirteci olarak kullanılma özelliklerine sahip olmadığı belirtilmiştir (Yu vd., 2017). Çalışmamızda renal İ/R hasarına bağlı miR92a2'nin ekspresyonu ilk defa çalışılmıştır bu nedenle bu alanda herhangi bir literatür bilgisine rastlanmamıştır. Bulgularımızdan yola çıkarak, miR92a2'nin düşük ekspresyonu ALOX15'in yüksek eksprese edilmesine neden olduğu ve lipit peroksidasyonunu indükleyerek ferroptotik hücre ölümüne katkıda bulunduğu düşünülmektedir.

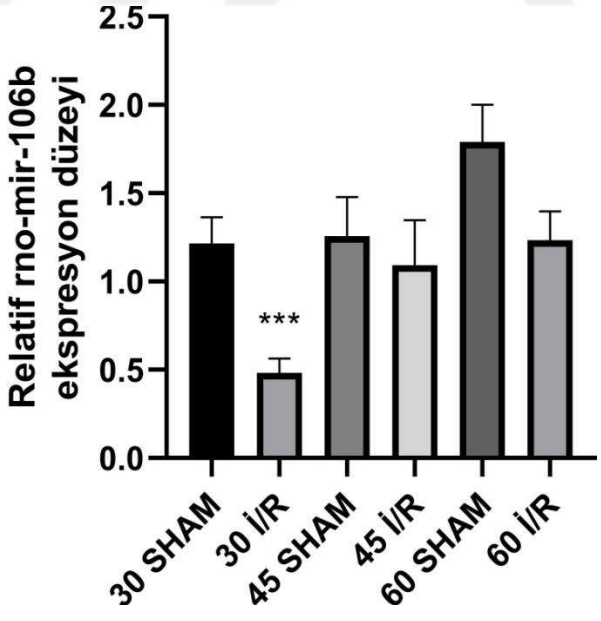


Çizelge 4.5. miR92a2 ekspresyon grafiği (*p<0,05; **p<0,01)

4.3.4. miR106b Ekspresyon Düzeyi

Çalışmamızda ilk defa renal İ/R hasarıyla değişen ACSL4 ile ilişkili miR106b'nin ekspresyon değişimi farklı iskemi sürelerine bağlı olarak araştırılmıştır. Çizelge 4.6.'ye bakıldığında miR106b'nin sadece 30 dakika İ/R grubunda sham grubuna göre anlamlı azaldığını tespit ettik. 45 ve 60 dakika İ/R gruplarındaki ekspresyon azalma seviyesi anlamlı olarak saptanmadı.

miR106b ile ilgili yapılan çalışmaların önemli bir kısmı kanser hücreleriyle yapılmıştır. Örneğin bir çalışmada miR106b'nin tümörijenez, çoğalma ve metastazda yer alan genleri doğrudan hedef aldığı bildirilmiştir (Sagar vd., 2022). Farklı bir çalışmada miR106b'nin insan katı malignitelerinde aşırı ekspresyon gösterdiği rapor edilmiştir (Yang vd., 2020). Yine başka bir çalışmada kanserle ilişkili endotel hücrelerinde miR106b'nin ekspresyonunun normal endotel hücrelerine göre yüksek seviyede olduğu gösterilmiştir (Mangala vd., 2016). Çalışmamızda renal İ/R hasarına bağlı miR106b'nin ekspresyonu ilk defa çalışılmıştır bu nedenle bu alanda herhangi bir literatür bilgisine rastlanmamıştır.

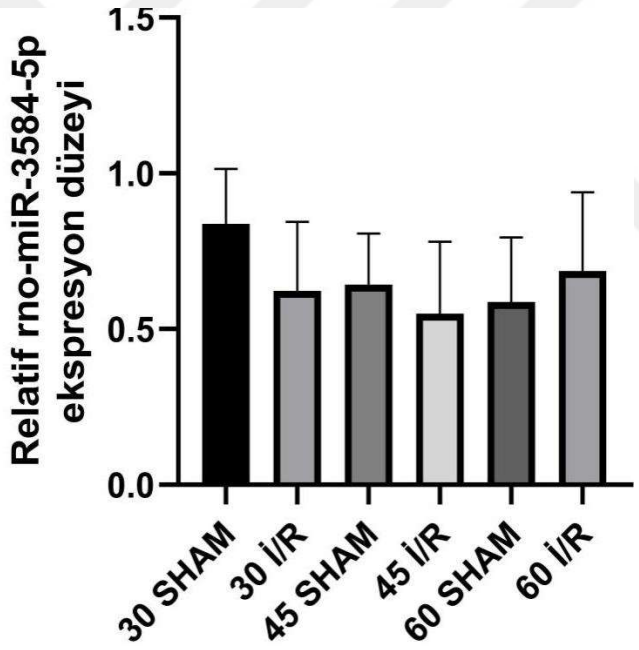


Çizelge 4.6. miR106b ekspresyon grafiği (***p<0,001)

4.3.5. miR3584 Ekspresyon Düzeyi

Çalışmamızda ilk defa renal İ/R hasarıyla değişen, ALOX15 ile ilişkili miR3584'ün ekspresyon değişimi farklı iskemi sürelerine bağlı olarak araştırılmıştır. Çizelge 4.72ye göre miR3584'ün ekspresyon seviyelerinde değişen iskemi sürelerine bağlı olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir.

Çalışmamızda renal İ/R hasarına bağlı miR3584'ün ekspresyonu ilk defa çalışılmıştır bu nedenle herhangi bir literatür bilgisine rastlanmamıştır. Ancak sıçanlarda CFA enjekte edilerek ağrı modeli oluşturulan bir çalışmada sıçan omuriliğinde miR3584 ekspresyonu ağrının 5. Gününde kontrol grubuna göre azalma göstermiştir ve enflamatuvar ağrının erken evresinin önemli bir biyobelirteci olduğu belirtilmiştir (Liu vd., 2017).



Çizelge 4.7. miR3584 ekspresyon grafiği

5.SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Elde ettiğimiz TEM görüntüleri incelendiğinde, renal İ/R hasarının ve bununla indüklenen ferroptotik hücre ölümünün şiddetinin, farklı iskemi sürelerine bağlı olarak değiştiğini tespit ettik. Biyokimyasal analizler sonucunda artan ROS miktarı ile lipit peroksidasyonunun gerçekleştiği ve bu sayede hücrelerde ferroptotik sürecin geliştiğini düşünmekteyiz. Ayrıca ferroptozun lipit yolağında görevli ACSL4 ve ALOX15 genlerinin ekspresyonlarındaki artışın böbrek hücrelerinde ferroptotik sürecin başlamasına katkıda bulunduğunu gözlemledik. Genlere direkt bağlanarak ekspresyon düzeylerini baskılamakla görevli olan miRNA'ların çalışmamız sonucunda ekspresyon düzeylerinde anlamlı azalış göstermesiyle, ACSL4 ve ALOX15'in aşırı ekspresyonu aracılı ferroptozun gerçekleştiği söylenebilir.

Çalışmamızda ROS düzeyi ile belirlenen lipit peroksidasyonu, ayrıca 4-HNE boyama metodu aracılığıyla da tespit edilebilir. Lipit peroksidasyonunun oldukça toksik bir aldehit ürünü olan 4-HNE oksidatif hasarın ve lipid peroksidasyonunun hassas bir belirtecidir ve monoklonal antikoru kullanılarak immünohistokimyasal boyama ile değerlendirilebilir.

Bundan sonra yapılacak çalışmalarda ferroptotik hücre ölümüyle bağlantılı olarak miRNA'lara lusiferaz raportör gen ekleme yöntemi ile, ALOX15 ve ACSL4 hedef genlerle olan ilişkileri daha açık bir şekilde ortaya konabilir. Transfeksiyon yöntemi ile miRNA aşırı ekspresyonu deneysel olarak sağlanarak, ACSL4, ALOX15 ekspresyon düzeylerinde ve ferroptotik hücre ölümünde herhangi bir değişikliğin varlığı araştırılabilir. Ayrıca ACSL4 ve ALOX15 genleri nakavt edilerek ferroptozun gerçekleşme durumu incelenebilir.

Çalışmamızda ilk defa farklı iskemi sürelerine bağlı olarak oluşturulan renal İ/R modelinde ferroptozun lipit yolağı ile ilişkili ACSL4 ve ALOX15 mRNA'ları ve miR497, miR92a2, miR106b ve miR3584'ün ekspresyonları birlikte incelenmiştir. Çalışmamız bu yönü ile örnek bir model oluşturmuştur.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Abdalkader, M., Lampinen, R., Kanninen, K.M., Malm, T.M., Liddell, J.R. (2018). Targeting nrf2 to suppress ferroptosis and mitochondrial dysfunction in neurodegeneration. Front Neurosci. 12:466.

Ali Syeda, Z., Langden, S.S.S., Munkhzul, C., Lee, M., Song, S.J. (2020). Regulatory mechanism of microrna expression in cancer. IJMS. 21(5):1723.

Almeida, M.I., Reis, R.M., Calin, G.A. (2011). MicroRNA history: Discovery, recent applications, and next frontiers. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 717(1-2):1-8.

Anonim, 2022, What is nephron?, https://www.geeksforgeeks.org/nephron/?ref=gcse, 10.12.2022.

Bertheloot, D., Latz, E., Franklin, B.S. (2021). Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. Cell Mol Immunol. 18(5):1106-1121.

Bozok, Ü.G., Küçük, A., Arslan, M. (2021). İskemi reperfüzyon hasarinda stres ve hücre ölümü. Hitit Med J.

Bugger, H., Pfeil, K. (2020) Mitochondrial ROS in myocardial ischemia reperfusion and remodeling. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.1866(7):165768.

Cai, Y., Yu, X., Hu, S., Yu, J. (2009). A brief review on the mechanisms of mirna regulation. Genomics, Proteomics & Bioinformatics. 7(4):147-154.

Cao, J.Y., Dixon, S.J. (2016). Mechanisms of ferroptosis. Cell Mol Life Sci. 73(11-12):2195-2209.

Chen, X., Yu, C., Kang, R., Tang, D. (2020). Iron metabolism in ferroptosis. Front Cell Dev Biol. 8:590226.

Chihanga ,T., Ma, Q., Nicholson, J.D. (2018). NMR spectroscopy and electron microscopy identification of metabolic and ultrastructural changes to the kidney following ischemia-reperfusion injury. American Journal of Physiology-Renal Physiology. 314(2):F154-F166.

Chouchani, ET., Pell, VR., James, AM., (2016). A unifying mechanism for mitochondrial superoxide production during ischemia-reperfusion injury. Cell Metabolism. 23(2):254-263.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Coşkun, G., Özgür, H. (2011). Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. 20(3):145 -158.

Çelenk, A. (2021). Yeni bir hücre ölüm şekli olarak ferroptozis. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi.

Dai, C., Chen, X., Li, J., Comish, P., Kang, R., Tang, D. (2020) Transcription factors in ferroptotic cell death. Cancer Gene Ther. 27(9):645-656.

Dalmay, T. (2013). Mechanism of miRNA-mediated repression of mRNA translation. Lindsay MA, Griffiths-Jones S, eds. Essays in Biochemistry. 54:29-38.

Di Lisa, F., Kaludercic, N., Carpi, A., Menabò, R., Giorgio, M. (2009) Mitochondrial pathways for ROS formation and myocardial injury: the relevance of p66Shc and monoamine oxidase. Basic Res Cardiol. 104(2):131-139.

Diao, C., Chen, Z., Qiu, T. (2019). Inhibition of prmt5 attenuates oxidative stress-induced pyroptosis via activation of the nrf2/ho-1 signal pathway in a mouse model of renal ischemia-reperfusion injury. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2019:1-18.

Dixon, S.J., Lemberg, K.M., Lamprecht, M.R. (2012). Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. Cell. 149(5):1060-1072.

Dodson, M., Castro-Portuguez, R., Zhang, D.D. (2019). NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis. Redox Biology. 23:101107.

Dong, H., Qiang, Z., Chai, D. (2020). Nrf2 inhibits ferroptosis and protects against acute lung injury due to intestinal ischemia reperfusion via regulating SLC7A11 and HO-1. Aging. 12(13):12943-12959.

Dorweiler, B., Pruefer, D., Andrasi, TB. (2007) Ischemia-reperfusion injury: pathophysiology and clinical implications. Eur J Trauma Emerg Surg. 33(6):600-612.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 35(4):495-516.

Eltzschig, HK., Eckle, T. (2011) Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. Nat Med. 17(11):1391-1401.

Fan, Z., Wirth, A.K., Chen, D. (2017). Nrf2-Keap1 pathway promotes cell proliferation and diminishes ferroptosis. Oncogenesis. 6(8):e371-e371.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Feng, H., Stockwell, BR. (2018). Unsolved mysteries: How does lipid peroxidation cause ferroptosis? PLoS Biol. 16(5):e2006203.

Gielis, J.F., Beckers, P.A.J., Briedé, J.J., Cos, P., Van Schil, P.E. (2017). Oxidative and nitrosative stress during pulmonary ischemia-reperfusion injury: from the lab to the OR. Ann Transl Med. 5(6):131-131.

Gourdin, M., Dubois, P. (2013) Impact of ischemia on cellular metabolism. Aronow WS, ed. Artery Bypass. InTech.

Green, D.R., Llambi, F. (2015). Cell death signaling. Cold Spring Harb Perspect Biol. 7(12):a006080.

Hirschhorn, T., Stockwell, B.R. (2019). The development of the concept of ferroptosis. Free Radical Biology and Medicine. 133:130-143.

Jiang, L., Yin, X., Chen, Y.H. (2021). Proteomic analysis reveals ginsenoside Rb1 attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through inhibiting ROS production from mitochondrial complex I. Theranostics. 11(4):1703-1720.

Jin, K., Wang, B., Ruan, Z.B., Chen, G.C., Ren, Y. (2019). Effect of miR-497 on myocardial cell apoptosis in rats with myocardial ischemia/reperfusion through the MAPK/ERK signaling pathway. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 23(19):8580-8587.

Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. (2016). Ischemia/reperfusion. Compr Physiol. 7(1):113-170.

Kalogeris, T., Baines, CP., Krenz, M., Korthuis, RJ. (2012). Cell biology of ischemia/reperfusion injury. In: International Review of Cell and Molecular Biology. Vol 298. Elsevier; 229-317.

Kar, F., Hacioglu, C., Senturk, H., Donmez, D.B., Kanbak, G. (2020). The role of oxidative stress, renal inflammation, and apoptosis in post ischemic reperfusion injury of kidney tissue: the protective effect of dose-dependent boric acid administration. Biol Trace Elem Res. 195(1):150-158.

Kerrigan CL, Stotland MA. (1993). Ischemia reperfusion injury: a review. Microsurgery. 14(3):165-175.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Kosieradzki, M., Rowiński, W. (2008). Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. Transplantation Proceedings. 40(10):3279-3288.

Kryl'skii, E.D., Popova, T.N., Safonova, O.A., Stolyarova, A.O., Razuvaev, G.A. (2019). Transcriptional regulation of antioxidant enzymes activity and modulation of oxidative stress by melatonin in rats under cerebral ischemia / reperfusion conditions. Neuroscience. 406:653-666.

Kusaka, J., Koga, H., Hagiwara, S., Hasegawa, A., Kudo, K., Noguchi, T. (2012). Age-dependent responses to renal ischemia-reperfusion injury. Journal of Surgical Research. 172(1):153-158.

L, L., X, W., Z, Y. (2016). Ischemia-reperfusion injury in the brain: mechanisms and potential therapeutic strategies. Biochem Pharmacol (Los Angel). 5(4):213.

Leadley, D., 2010, Transmission Electron Microscopy (TEM), https://warwick.ac.uk/fac/sci/physics/current/postgraduate/regs/mpagswarwick/ex5/techniques/structural/tem/, 24.12.2022.

Li, J., Cao, F., Yin, H. (2020). Ferroptosis: past, present and future. Cell Death Dis. 11(2):88.

Li, M., Guan, X., Sun, Y, (2014). Mir-92a family and their target genes in tumorigenesis and metastasis. Experimental Cell Research. 323(1):1-6.

Li, X., Zeng, Z., Li, Q. (2015). Inhibition of microRNA-497 ameliorates anoxia/reoxygenation injury in cardiomyocytes by suppressing cell apoptosis and enhancing autophagy. Oncotarget. 6(22):18829-18844.

Li, Y., Feng, D., Wang, Z. (2019). Ischemia-induced ACSL4 activation contributes to ferroptosis-mediated tissue injury in intestinal ischemia/reperfusion. Cell Death Differ.26(11):2284-2299.

Li, Y.J., Lei, Y.H., Ya, N. (2017). Autophagy and multidrug resistance in cancer. Chin J Cancer. 36(1):52.

Liu CC, Cheng JT, Li TY, Tan PH. Integrated analysis of microRNA and mRNA expression profiles in the rat spinal cord under inflammatory pain conditions. Eur J Neurosci. 2017;46(11):2713-2728.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Liu WW, Li WD, Zhang YJ, Zhang ML. Regulatory effect of mir497-5p–ccne1 axis in triple-negative breast cancer cells and its predictive value for early diagnosis. CMAR. 2021;Volume 13:439-447.

Liu, H., Wang, L., Weng, X. (2019). Inhibition of Brd4 alleviates renal ischemia/reperfusion injury-induced apoptosis and endoplasmic reticulum stress by blocking FoxO4-mediated oxidative stress. Redox Biology. 24:101195.

Lorenzen, J.M., Kaucsar, T., Schauerte, C. (2014). Microrna-24 antagonism prevents renal ischemia reperfusion injury. JASN. 25(12):2717-2729.

Ma, X.H., Liu, J.H.Z., Liu, C.Y. (2022). ALOX15-launched PUFA-phospholipids peroxidation increases the susceptibility of ferroptosis in ischemia-induced myocardial damage. Sig Transduct Target Ther. 7(1):288.

Mangala, L.S., Wang, H., Jiang, D. (2016). Improving vascular maturation using noncoding RNAs increases antitumor effect of chemotherapy. JCI Insight. 1(17).

Mizushima, N., Komatsu, M. (2011). Autophagy: renovation of cells and tissues. Cell. 147(4):728-741.

Nirmala, J.G., Lopus, M. (2020). Cell death mechanisms in eukaryotes. Cell Biol Toxicol. 36(2):145-164.

Onorati, A.V., Dyczynski, M., Ojha, R., Amaravadi, R.K. (2018). Targeting autophagy in cancer. Cancer. 124(16):3307-3318.

Özcan, O., Erdal, H., Yönden, Z. (2015). İskemi-reperfüzyon hasarı ve oksidatif stress ilişkisine biyokimyasal bakış. Mustafa Kemal Üniv Tıp Dergisi, 6(23).

Patel, P.M., Connolly, M.R., Coe, T.M. (2021). Minimizing ischemia reperfusion injury in xenotransplantation. Front Immunol. 12:681504.

Peng, Y., Croce, C.M. (2016). The role of MicroRNAs in human cancer. Sig Transduct Target Ther. 1(1):15004.

Qin, L., Yang, W., Wang, Y.X. (2018). MicroRNA-497 promotes proliferation and inhibits apoptosis of cardiomyocytes through the downregulation of Mfn2 in a mouse model of myocardial ischemia-reperfusion injury. Biomedicine & Pharmacotherapy. 105:103-114.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Radi, Z.A. (2019). Kidney pathophysiology, toxicology, and drug-induced injury in drug development. Int J Toxicol. 38(3):215-227.

Rojas-Morales, P., León-Contreras, J.C., Aparicio-Trejo, O.E., (2019). Fasting reduces oxidative stress, mitochondrial dysfunction and fibrosis induced by renal ischemia-reperfusion injury. Free Radical Biology and Medicine. 135:60-67.

Sagar, S.K. (2022). Mir-106b as an emerging therapeutic target in cancer. Genes & Diseases. 9(4):889-899.

Sakai, Y., Yamamori, T., Yoshikawa, Y. (2018). NADPH oxidase 4 mediates ROS production in radiation-induced senescent cells and promotes migration of inflammatory cells. Free Radical Research. 52(1):92-102.

Sampaio, F.J.B. (2000). Renal anatomy. Urologic Clinics of North America. 27(4):585-607.

Sanada, S., Komuro, I., Kitakaze, M. (2011) Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 301(5):H1723-H1741.

Sauler, M., Bazan, I.S., Lee, P.J. (2019). Cell death in the lung: the apoptosis–necroptosis axis. Annu Rev Physiol. 81(1):375-402.

Shimizu, S., Yoshida, T., Tsujioka, M., Arakawa, S. (2014). Autophagic cell death and cancer. IJMS. 15(2):3145-3153.

Shintoku, R., Takigawa, Y., Yamada, K. (2017). Lipoxygenase-mediated generation of lipid peroxides enhances ferroptosis induced by erastin and RSL3. Cancer Sci. 108(11):2187-2194.

Song, X., Long, D. (2020). Nrf2 and ferroptosis: a new research direction for neurodegenerative diseases. Front Neurosci. 14:267.

Songur ÇM. Ischemia-reperfusion injury. (2015). Koşuyolu Heart Journal. 18(2):89-93.

Sun, X., Ou, Z., Chen, R. (2016). Activation of the p62-Keap1-NRF2 pathway protects against ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells: Hepatobiliary Malignancies. Hepatology. 63(1):173-184.

Sun, Y., Chen, P., Zhai, B. (2020). The emerging role of ferroptosis in inflammation. Biomedicine & Pharmacotherapy. 127:110108.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Tang, D. (2019) Ferroptosis in Health and Disease. Springer International.

Tang, R., Xu, J., Zhang, B. (2020). Ferroptosis, necroptosis, and pyroptosis in anticancer immunity. J Hematol Oncol. 13(1):110.

Tao, W hui., Shan, X sheng., Zhang, J xin. (2022). Dexmedetomidine attenuates ferroptosis-mediated renal ischemia/reperfusion injury and inflammation by inhibiting acsl4 via α2-ar. Front Pharmacol. 13:782466.

Wahid, F., Shehzad, A., Khan, T., Kim, Y.Y. (2010). MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. 1803(11):1231-1243.

Wang, Y., Zhang, M., Bi, R. (2022). ACSL4 deficiency confers protection against ferroptosis-mediated acute kidney injury. Redox Biology. 51:102262.

Wu, M.Y., Yiang, G.T., Liao, W.T. (2018). Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury. Cell Physiol Biochem. 46(4):1650-1667.

Xie, Y., Hou, W., Song, X. (2016). Ferroptosis: process and function. Cell Death Differ. 23(3):369-379.

Yamato, M., Egashira, T., Utsumi, H. (2003). Application of in vivo ESR spectroscopy to measurement of cerebrovascular ROS generation in stroke. Free Radical Biology and Medicine. 35(12):1619-1631.

Yang, C., Dou, R., Yin, T., Ding, J. (2020). MiRNA-106b-5p in human cancers: diverse functions and promising biomarker. Biomedicine & Pharmacotherapy. 127:110211.

Yu, Y., Zuo, J., Tan, Q. (2017). Plasma miR-92a-2 as a biomarker for small cell lung cancer. CBM. 18(3):319-327.

Yuan, H., Li, X., Zhang, X., Kang, R., Tang, D. (2016). Identification of ACSL4 as a biomarker and contributor of ferroptosis. Biochemical and Biophysical Research Communications. 478(3):1338-1343.

Zhang, H., Deng, T., Liu, R. (2020). CAF secreted miR-522 suppresses ferroptosis and promotes acquired chemo-resistance in gastric cancer. Mol Cancer. 19(1):43.

Zhao, J., Wu, Y., Liang, S., Piao, X. (2022). Activation of ssat1/alox15 axis aggravates cerebral ischemia/reperfusion injury via triggering neuronal ferroptosis. Neuroscience. 485:78-90.

Zuo, S., Yu, J., Pan, H., Lu, L. (2020). Novel insights on targeting ferroptosis in cancer therapy. Biomark Res. 8(1):50.

EK AÇIKLAMA

Ek Açıklama-A: Etik Kurul İzni

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 / Moleküler 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.