



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AKUT BÖBREK HASARINDA ADAY miRNA EKSPRESYON
PROFİLİNİN HÜCRE HATTI MODELLEMESİ
KULLANILARAK ARAŞTIRILMASI**

AYSUN TORAMAN

DOKTORA TEZİ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
PROF. DR. NURAY ALTINTAŞ

MANİSA-2023



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AKUT BÖBREK HASARINDA ADAY miRNA EKSPRESYON
PROFİLİNİN HÜCRE HATTI MODELLEMESİ
KULLANILARAK ARAŞTIRILMASI**

TEZ SAVUNMA SINAVI JÜRİ ÜYELERİ

PROF. DR. NURAY ALTINTAŞ	(Danışman)
PROF. DR. HALUK AKIN	(Üye)
PROF. DR. SIRRI ÇAM	(Üye)
PROF. DR. SEFA KIZILDAĞ	(ÜYE)
DOÇ. DR. ONUR TOKGÜN	(ÜYE)

MANİSA - 2023

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.



Doç. Dr. Aysun Toraman

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca her zaman yanımda olan, bana yol gösteren, bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan, akademik hayatım için bana yeni kapılar açan, bilimsel ve manevi desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen çok değerli Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Nuray ALTINTAŞ' a,

Tez çalışmalarımnda her zaman yardımcı olan, değerli bilimsel fikir ve yorumlarını, deneyimlerini benimle paylaşan, Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı' ndan Sevgili Doç. Dr. Pervin Elvan TOKGÜN'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman bana yardımcı olan, değerli bilimsel fikirlerini benimle paylaşan ve moleküler biyoloji laboratuvar çalışmalarımızı birlikte yürüttüğümüz Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim dalı Doktora Öğrencisi Sevgili Uzm. Bio. Özge SARICA YILMAZ' a ve Sevgili Uzm. Mol. Bio. Onur TONK'a,

Yaşamım boyunca maddi ve manevi desteklerini bir an olsun bile esirgemeyen, mesafe olarak onlardan uzak olsam da varlıklarını her zaman yanımda hissettiğim, hasret çekmeye katlanan ve attığım her adımda beni cesaretlendiren, bugün bulunduğum yerde olmamda sonsuz katkıları olan Canım Annem Hamide AVCU'ya, Canım Babam Ömer AVCU'ya ve Canım Kardeşim Aynur AVCU'ya, beni her zaman destekleyen yaşama sebebim Sevgili Eşim Erkan TORAMAN ve çocuklarım İrem, Azra, Alperen TORAMAN'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

“Akut Böbrek Hasarında Serum miRNA Ekspresyon Profiline Araştırılması” konulu tez çalışmamızın etik kurul onayı Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan 01.07.2020 tarihinde alınmıştır. Bu tez çalışması Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından 2021-069 no lu proje ile desteklenmiştir.

Doç. Dr. Aysun TORAMAN

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABY	Akut böbrek yetmezliği
ABH	Akut böbrek hasarı
GFH	Glomerüler filtrasyon hızı
RRT	Renal replasman tedavisi
RIFLE	Risk-Hasar-Yetmezlik-Kayıp-Son dönem böbrek hastalığı (Risk-Injury-Failure-Loss-End stage renal disease)
AKIN	Akut Böbrek Hasarı Çalışma Grubu (Akut Kidney Injury Network)
BUN	Kan üre azotu
NGAL	Nötrofil Jelatinaz İlişkili Lipokalin (Neutrophil gelatinase-associated lipocalin)
KIM-1	Böbrek Hasar Molekülü-1 (Kidney injury molecule-1)
IL-18	İnterlökin 18
MDRD	Böbrek Hastalarında Diyet Düzenlemeleri (Modification of Diet in Renal Disease)
KDIGO	Böbrek Hastalığı Küresel Sonuçların İyileştirilmesi (Kidney Disease Improving Global Outcomes)
Kİ-ABH	Kontrast ilişkili akut böbrek hasarı
MiRNA	MikroRNA
ncRNA	Kodlamayan RNA

KBH	Kronik böbrek hastalığı
CIN	Kontrast kaynaklı nefropati
KBH	Kronik böbrek hastalığı
SD	Sprague-Dawley
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
MTT	miRNA Mimik Transfeksiyon
H/R	Hipoksi/reperfüzyon

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
BEYAN.....	I
TEŞEKKÜR.....	II
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
GRAFİKLER DİZİNİ.....	VIII
RESİMLER DİZİNİ.....	IX
TABLO DİZİNİ.....	X
1.ÖZET.....	XI
2.ABSTRACT.....	XII
3. GİRİŞ.....	1
PROJENİN AMACI.....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	4
4.1. Akut Böbrek Hasarı Tanımı.....	4
4.2. Akut Böbrek Hasarı Etyoloji ve Sınıflaması.....	7
4.2.1. Prerenal akut böbrek hasarı.....	7
4.2.2. Postrenal Akut Böbrek Hasarı.....	10
4.2.3. Renal (intrensek) Akut Böbrek Hasarı.....	10
4.3. Kontrast Madde İlişkili Akut Böbrek Hasarı.....	11
4.3.1. Kontrast Madde İlişkili Akut Böbrek Hasarı Tanımı ve İnsidansı.....	11
4.3.2. Kontrast Madde Türleri ve Kİ-ABH Patofizyolojisi.....	12
4.3.3. Kİ-ABH için Yüksek Risk Faktörleri.....	14
4.3.3.1. Kontrastla İlgili Faktörler.....	14
4.3.3.2. Hastayla İlgili Faktörler.....	15
4.4. MikroRNA'lar.....	16
4.4.1. miRNA'ların Biyogenezi ve Fonksiyonları.....	17
4.4.2. Böbreklerdeki miRNA'lar.....	19
4.4.3. Akut Böbrek Hasarı ve miRNA'lar.....	20
4.4.4. Kontrasta Bağlı ABH'da miRNA'lar.....	23
5. GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	26
5.1. Materyal.....	26
5.1.1. Kimyasallar ve Kitler.....	26
5.1.2. Plastik Malzemeler.....	27
5.1.3. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	27
5.2. Yöntemler.....	27
5.2.1. Hücre Kültürü.....	27
5.2.1.1. Hücrelerin Dondurulması.....	28
5.2.1.2. Hücrelerin Çözülmesi.....	28
5.2.2. MTT Analizi.....	28
5.2.3. MikroRNA İzolasyonu.....	29
5.2.4. MikroRNA Mikrodizinleme.....	29
5.2.5. Gen-ontoloji Analizi.....	30
5.2.6. miRNA cDNA dönüşümü ve hedef genlerin ekspresyon analizi.....	30
6. BULGULAR.....	31
6.1. Hücre Kültürü.....	31

6.2.MTT Analizi.....	31
6.3. miRNA mikrodizinleme analizi ile miRNA'ların ifade değişimlerinin saptanması.....	32
6.3.1. Örnek Tanımı.....	32
6.3.2. Analiz Tasarımı.....	33
6.3.3.Deneysel Metodlar.....	33
6.3.4. Veri Kalitesi Kontrolü.....	34
6.3.4.1.Her Numune için KK (çizgi grafiği).....	34
6.3.4.2.Kutu Grafiği.....	34
6.3.4.3.Numuneler Arasında Tekrarlanabilirlik.....	35
6.3.4.4. Hiyerarşik Kümeleme.....	37
6.3.4.5.MDS (Çok Boyutlu Ölçeklendirme) grafiği.....	37
6.3.4.6.Yoğunluk grafiği ve QC matriks hattı grafiği.....	38
6.4. Veri Analizi.....	39
6.4.1.Ver Akışı.....	39
6.4.1.1.Orjinal Ham Veriler.....	39
6.4.1.2.Ver Ön İşleme ve Kalite Kontrolü: Normalleştirilmiş Yoğunluk Çıkarma → Filtreleme.....	39
6.4.1.3.İstatistiksel Test.....	40
6.4.1.4. Kümeleme Analizi.....	40
6.5.Sonuçlar.....	40
6.6.İfade değişimi saptanan miRNA'lar.....	45
7. TARTIŞMA	48
8. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	53
9. KAYNAKLAR	54
10. EKLER.....	63
EK 1. ETİK KURUL KARAR FORMU.....	63
EK 2. SBE TEZ KONUSU KARAR YAZISI.....	65
EK 3. DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU.....	67
11.ÖZGEÇMİŞ.....	68

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. ABH sınıflaması

Şekil 4.2. miRNA'ların biyosentezi ve işlevi

Şekil 4.3.Kontrast ortamının (CM) miRNA'ların ifade seviyeleri üzerindeki etkileri

Şekil 6.1. HEK293T hücrelerinin 4x büyütmedeki mikroskopik görüntüsü



GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 6.1. MTT Analizi sonucu gerçekleştirilen IC50 grafiği

Grafik 6.2. Her numune için oluşturulan çizgi grafiği

Grafik 6.3. Kutu grafikleri.

Grafik 6.4. Pearson' s Korelasyon Katsayısı

Grafik 6.5. Örneğin Korelasyon Matriksi

Grafik 6.6. Hiyerarşik Kümeleme

Grafik 6.7. MDS Grafiği

Grafik 6.8. Yoğunluk grafiği ve QC matriks hattı grafiği

Grafik 6.9. Iohexol ile muamele edilmiş hücrelerde upregüle ve downregüle prob sayısı

Grafik 6.10. Fold change ve karşılaştırılan çiftin p-değerine bağlı olarak up ve downregüle prob setlerinin sayısı

Grafik 6.11. Iohexol ile muamele edilmiş HEK293T hücreleri ile kontrol hücreleri arasında ekspresyon düzeyinin dağılımı

Grafik 6.12. Iohexol ile muamele edilmiş HEK293T hücreleri ile kontrol hücrelerinde saptanan problemler arasındaki ekspresyon seviyeleri (Kontrol olarak X eksenini ve test olarak Y eksenini, her numune grubundaki normalleştirilmiş değerlerin ortalamasıdır)

Grafik 6.13. Iohexol ile muamele edilmiş HEK293T hücreleri ile kontrol hücreleri arasında hacim grafiği

Grafik 6.14. HeatMap Analizi

Grafik 6.15. Real Time PCR Analiz Sonuçları

RESİMLER DİZİNİ

Resim 6.1. İohexsol ile muamele edilen HEK293T hücre kültürü



TABLO DİZİNİ

Tablo 4.1. Akut böbrek hasarı RIFLE sınıflandırılması

Tablo 4.2. AKIN Kriterleri

Tablo 4.3. Akut böbrek hasarı KDIGO Sınıflaması

Tablo 4.4. Akut böbrek hasarı sınıflaması

Tablo 4.5. Radyokontrast maddeler ve özellikleri

Tablo 4.6. Kİ-ABH için yüksek risk faktörleri

Tablo 4.7. CIN gelişme riskini hesaplamada kullanılan Mehran Risk Skoru

Tablo 4.8. ABH'da Böbreklerde Değişmiş İfade Gösteren miRNA'lar

Tablo 4.9. Kİ-ABH için tanısal veya terapötik biyobelirteçler olarak ümit verici mikroRNA'lar

Tablo 5.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Tablo 5.2. Çalışmada Kullanılan Araç ve Gereçler

Tablo 5.1. Analiz edilen örnek bilgileri

Tablo 5.2. Karşılaştırılan örneklerin bilgileri

Tablo 6.3. İstatistiksel Analizde Karşılaştırmalar

Tablo 6.4. Iohexol ile muamele edilen HEK293T hücrelerinde ifade değişimi saptanan miRNA'lar

Tezin Başlığı: Akut Böbrek Hasarında Aday miRNA Ekspresyon Profilinin, Hücre Hattı Modellemesi Kullanılarak Araştırılması

Öğrencinin Adı: Doç. Dr. Aysun TORAMAN

Danışmanı: Prof. Dr. Nuray ALTINTAŞ

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji

1.ÖZET

Amaç: Kontrasta bağlı akut böbrek hasarı [Kİ-ABH] klinik komplikasyon olup artmış mortalite, uzamış hastanede yatış ve artan tıbbi maliyetlerin önemli bir nedenidir. Kİ-ABH’da etkili müdahaleler almak için erken teşhis ve koruyucu önlemler kilit öneme sahiptir. Tanı yaygın olarak kullanılan fakat renal hasarın gerçek zamanının gerisinde kalan ve erken tanı ve müdahaleleri ciddi şekilde etkileyen serum kreatinin seviyelerine bağlıdır. MikroRNA’nın [miRNA] erken Kİ-ABH tanısında yararlı bir biyobelirteç olduğu bulunmuştur. Çalışmamızda Kİ-ABH’da miRNA ekspresyon profilinin oluşturulması ve biyobelirteç olabilecek yeni miRNA’ların saptanması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda insan böbrek tübüler epitelyal HEK-293T hücreleri, Kİ-ABH hücre modeli oluşturmak için ioheksol ile muamele edildi. Hücre canlılık testi uygulaması sonrasında, kültüre edilen hücrelerden RNA izolasyonu yapıldı. miRNA microarray ile ekspresyon profilendirmesi gerçekleştirildi.

Bulgular: HEK-293T hücrelerine kontrast madde olarak ioheksol verilip hücre canlılık testi uygulandığında, hücre morfolojisinde değişiklik olmadığı gözlemlendi. Hücrelerden RNA izolasyonu sonrasında, miRNA PCR array ile ekspresyon profilendirmesi değerlendirildiğinde, 20 miRNA’nın downregüle ve 6 miRNA’nın upregüle olduğu saptandı. Analiz sonucunda anlamlı değişim saptanmış 3 miRNA (miR-378a-3p, miR-182-5p, miR-23b-3p) real-time PCR yöntemi ile valide edilmiştir. Üçlü tekrar edilen örneklerden two-way ANOVA ve paired t-test yöntemleri kullanılarak istatistiksel analizler gerçekleştirilmiş olup, sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (**p< 0.01).

Sonuçlar: Literatüre bakıldığında kontrast nefropati çalışmalarında saptanmayan bu miRNA’lardan miR-182-5p, miR-221-3p, miR-151a-5p, miR-181b-5p, miR-23b-3p, miR-103a-3p, miR-23a-3p, miR-378a-3p, miR-191-5p, miR-17-5p nefrotoksinler, sepsis, I/R hasarı gibi farklı etyolojilere bağlı ABH modellerinde saptandığı görüldü.

Anahtar Kelimeler: Akut böbrek hasarı, kontrast nefropati, miRNA

Thesis title: Candidate miRNA Expression Profile in Acute Kidney Injury, Investigating Using Cell Line Modeling

Student name/surname: Assoc. Dr. Aysun TORAMAN

Advisor: Prof. Dr. Nuray ALTINTAŞ

Department: Medical Biology

2. ABSTRACT

Aim: Contrast-induced acute kidney injury [CI-AKI] is a clinical complication and is an important cause of increased mortality, prolonged hospitalization and increased medical costs. Early diagnosis and preventive measures are key for effective interventions in CI-AKI. Diagnosis is based on serum creatinine levels, which are widely used but lag behind the actual time of renal injury and seriously affect early diagnosis and intervention. MicroRNA [miRNA] has been found to be a useful biomarker in the early diagnosis of CI-AKH. In our study, it was aimed to establish the miRNA expression profile in CI-AKH and to detect new miRNAs that could be biomarkers.

Material and Methods: In our study, human renal tubular epithelial HEK-293T cells were treated with iohexol to generate a KI-ABH cell model. After the cell viability test, RNA was isolated from the cultured cells. Expression profiling was performed with miRNA PCR array.

Results: When iohexol was given to HEK-293T cells as a contrast agent and cell viability test was applied, no change in cell morphology was observed. When expression profiling by miRNA microarray was evaluated after RNA isolation from cells, 20 miRNAs were downregulated and 6 miRNAs were upregulated. Three miRNAs (miR-378a-3p, miR-182-5p, miR-23b-3p) with significant changes as a result of the analysis were validated by real-time PCR method. Statistical analyzes were performed using two-way ANOVA and paired t-test methods from the triple replicated samples, and the results were found to be statistically significant (**p < 0.01).

Conclusion: It was observed that among these miRNAs which were not found to be associated with contrast nephropathy in recent studies, miR-182-5p, miR-221-3p, miR-151a-5p, miR-181b-5p, miR-23b-3p, miR-103a-3p, miR-23a-3p, miR-378a-3p, miR-191-5p, miR-17-5p were detected in AKI models due to different etiologies such as nephrotoxins, sepsis, I/R injury.

Keywords: Acute kidney injury, contrast nephropathy, miRNA

3.GİRİŞ

Akut böbrek hasarı [ABH], böbrekte oluşan ani fonksiyon kaybına bağlı olarak gelişen mortalite ve morbiditesi yüksek bir klinik tablodur (Zuk & Bonventre, 2016). Ölüm oranı, yaşlanan nüfus artışının ardından yükselen bir eğilim göstermektedir (Civilibal & Aksu, 2015). Akut böbrek yetmezliği şiddetli ABH için kullanılmaktadır. ABH, tüm kısıtlamalara ve yeni gelişmelere rağmen artmış serum kreatinin düzeyi ve azalmış idrar miktarına göre tanımlanmaktadır. Ancak, erken tanı koyma ve klinik ağırlığını belirlemede, tek başına serum kreatinin düzeyinin kullanımı sorunlara yol açmaktadır (Zuk & Bonventre, 2016).

Böbrek hasarı sonrası böbrekten kana ve idrara salınan çeşitli biyomarkırlar, henüz serum kreatinin artışı olmadan, ABH'nı daha erken dönemde tanımlayabilir. MikroRNA'lar [miRNA'lar] bitkilerde ve hayvanlarda gen ekspresyonunu transkripsiyon sonrası düzenleyen bir kodlayıcı olmayan RNA sınıfıdır (Lee ve ark., 2005). Yaklaşık 18-23 nükleotid içeren tek iplikli RNA'lardır. Doku veya hücreye özgü bir şekilde ifade edilirler. mRNA degradasyonunu indükleyebilirler veya daha sıklıkla hedef mRNA'ların 3'-çevrilmemiş bölgesine [UTR] bağlanarak protein translasyonunun baskılanmasına neden olabilirler. Son zamanlarda, 2000'den fazla insan miRNA'sı belirlenmiştir (Kito ve ark., 2015). Biriken kanıtlar, genlerin çoğunun miRNA düzenlemesine tabi olduğunu göstermektedir. İlginç bir şekilde, bir miRNA farklı genleri düzenleyebilir ve bir gen çoklu miRNA'lar tarafından düzenlenebilir. Çeşitli fizyolojik süreçlerle ve çoğu insan protein kodlayan genlerin miRNA'lar tarafından hedef alındığı düşünülmektedir. Ana miRNA'ların dağılımları türler arasında büyük ölçüde korunmuştur (Lee ve ark., 2005).

Üriner ve plazmada miRNA'ların varlığı, miRNA'ların tanı biyobelirteçleri olarak potansiyelini göstermektedir. Proteinler gibi diğer biyobelirteçlerle karşılaştırıldığında, miRNA'lar biyolojik sıvılarda oldukça stabildir ve güvenilir bir şekilde analiz edilebilir ve ölçülebilir. Belki de en önemlisi, miRNA'ların Taqman assay, sekansa dayalı bir analiz olduğu için oldukça spesifiktir. miRNA, mRNA ifadesini hedef alarak hastalık oluşumuna ve gelişimine katılmaktadır. Akut böbrek hasarı hastalarının serumunda miRNA ekspresyonunu test etmek için miRNA

mikrodizin kullanılmaktadır (Ma ve ark., 2017). 2004 yılında, miRNA mikrodizin analizi kullanılarak, miR-192, miR-194, miR-204, miR-215 ve miR-216'nın insan böbreklerinde bolca eksprese edildiğini bildirilmiştir. Renal lezyonların patolojik özelliklerinden biri, yani organda lokalizasyonu, böbrek hastalıkları arasında farklılık göstermektedir. Ayrıca, kalıtsal böbrek hastalıklarda lezyonların lokalizasyonu mutasyona uğramış genlerin türüne bağlıdır. Bu nedenle, böbrek hasarı özellikleri böbrek hastalıkları arasında farklılık gösterdiğinden, özellikle miRNA moleküllerinin hastalık belirteçleri olarak uygulanması için, söz konusu miRNA'yı ifade eden hücrelerin tipine göre her böbrek hastalığındaki miRNA ekspresyon profilininin dikkatlice incelenmesi gerekliliği belirtilmektedir (Ichii & Horino, 2018).

Böbrekte miRNA'lar çeşitli hücrel ve fizyolojik aktivitelerde kritik rol oynar. Ortaya çıkan kanıtlar, miRNA'ların akut böbrek hasarının patogenezinde önemli rol oynadığını göstermektedir. ABH'da miRNA'ların daha fazla araştırılması, yeni tanı araçlarının ve terapötik müdahalelerin geliştirilmesinde atılımlara yol açabilir (Bhatt ve ark, 2011, Wei ve ark., 2013). Görüntüleme veya girişimsel amaçlar için yakın zamanda intravasküler kontrast madde uygulanmasını takiben böbrek fonksiyonunda bir düşüş olması kontrast kaynaklı ABH olarak tanımlanmaktadır. Hastanede yatan hastalarda akut böbrek hasarının en yaygın üçüncü nedenidir (Nash ve ark., 2002). Genellikle hafiftir ve geri dönüşümlüdür, ancak bazı hastalarda renal replasman tedavisi gerektiren geri dönüşümsüz böbrek hasarına neden olabilmektedir. Özellikle yaşlı, diyabetik, kronik böbrek hastalığı ve kalp yetmezliği hastalarında kalıcı böbrek hasarına yol açabilmektedir. Kreatininde yükselme hasar oluşuktan sonra saptandığı için erken tanı üzerinde birçok biyomarkırlar üzerinde çalışma yapılmaktadır. miR-21, miR-127, miR-146a iskemi reperfüzyon hasarında rol oynayarak akut böbrek hasarına yol açmaktadır (Gutierrez-Escolano ve ark., 2015, Sun ve ark., 2015, Kito ve ark.,2015).

Farelerde çalışılan iskemik ABH sırasında miRNA ekspresyonunun mikroarray analizi, 13 spesifik miRNA'nın arttığını, bir düzine miRNA'nın azaldığını göstermiştir. Bunların arasında, miR-687, 30 dakikalık iskemi ve 12 saatlik reperfüzyondan sonra renal kortikal dokularda 1700 kat artış göstermiştir. Renal I / R [İskemi/reperfüzyon] sırasındaki miR-687 indüksiyonu yakın zamanda Taqman real-time PCR, Northern blot ve in situ hibridizasyon ile doğrulanmış, endüksiyonu spesifik olarak proksimal tübüllerde lokalize etmiştir. İlginç bir şekilde, miR-687 indüksiyonu geçici olup 12

saat - 24 saat reperfüzyonda zirve yapıp ve 48 saat reperfüzyondan sonra bazal seviyelere düştüğü saptanmıştır (Wei ve ark., 2010).

Literatüre bakıldığında kontrast nefropatide miRNA ekspresyonu ile ilgili çalışmalar gerçekleştirilmiştir ve sıçan modellerinde miR-188-5p, miR-30a, miR-30c ve miR30e dahil olmak üzere çeşitli miRNA'ların seviyeleri, plazma ve böbreklerde yüksek olarak tanımlanmıştır (Sun ve ark., 2016, Liu ve ark., 2021).

PROJENİN AMACI

Akut böbrek hasarı erken tanı ve tedavinin önemli olduğu son dönem böbrek yetmezliğine ilerleyebilen morbidite ve mortalitesi yüksek bir klinik durumdur. Erken tanı için birçok biyobelirteç üzerinde çalışılmasına rağmen klinik pratikte kullanılan serum kreatinin değeri geç bir biyobelirteçtir. miRNA'ların plazmada taşındığı ve idrardan izole edilebildiği, potansiyelleri artırabilir biyobelirteçler olarak kullanıldığı bilinmektedir. Böbrek içindeki rollerinin hem akut hem kronik böbrek hastalığında yapılmış güncel, kapsamlı incelemeleri de bulunmaktadır (Kito ve ark., 2015, Ichii & Horino, 2018 , Wei ve ark., 2013).

miRNA'lar akut böbrek hasarının erken tanısında kullanılması özellikle morbidite ve mortalitesi yüksek hastalarda büyük yarar sağlayabilir. Böbrek içindeki rollerinin çeşitli güncel, kapsamlı incelemeleri de bulunmaktadır (sun ve ark., 2015, Wei ve ark.,2010, Sun ve ark., 2016).

Böbrek patolojisindeki rolünü anlamak, böbrek hastalıkları için yeni tedavilere yenilikçi yaklaşımlar ümidi sunmaya günümüzde de devam edildiğinden, projemizin amacı kontrast, madde kullanımına bağlı akut böbrek hasarı olan hastalarda miRNA ekspresyon profilinin ortaya konarak ve tanı ve prognostik için yeni biyobelirteçler olarak ileriki çalışmalarımızda kullanabilmeyi hedeflemektir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Akut Böbrek Hasarı Tanımı

Akut böbrek hasarı [ABH], böbrek fonksiyonlarının saatler veya günler içerisinde ani olarak bozulması sonucunda gelişen üre ve diğer azotlu atık ürünlerin birikimi ve hücre dışı hacim ve elektrolit bozukluklarıyla karakterize klinik bir tablodur. ABH terimi, günümüzde büyük ölçüde akut böbrek yetmezliğinin [ABY] yerini almıştır. Artık ABY şiddetli ABH için kullanılmaktadır. Böbrek fonksiyonunda belirgin organ yetmezliği ile sonuçlanmayan küçük bir azalmanın bile klinik önemi olduğunun ve artan morbidite ve mortalite ile ilişkili olduğunun kabul edilmesini yansıtmaktadır (Bellomo ve ark., 2012). Ölüm oranı, yaşlanan nüfus artışının ardından yükselen bir eğilim göstermektedir (Civilibal ve Aksu, 2015).

ABH konusunda farklı tanımların yapılması, aynı dilin konuşulmasını, araştırmalardaki hasta gruplarının kıyaslanabilirliğini güçleştirmiştir. ABH, tüm kısıtlamalara ve yeni gelişmelere rağmen artmış serum kreatinin düzeyi ve azalmış idrar miktarına göre tanılandırılmaktadır. Ancak, erken tanı koyma ve klinik ağırlığını belirlemede, tek başına serum kreatinin düzeyinin kullanımı sorunlara yol açmaktadır. ABH'nın evrensel olarak tanımlanmasını engelleyen durumlar arasında ABH şiddetindeki farklılıklar (örn. hastanın hastane dışı bakımının yeterli olması ya da hastaneye yatma gerekliliği ya da yoğun bakım ünitesinde olması gibi durumlar); ABH'nın insidansı ve prognozunda meydana gelen dikkat çekici farklılıklar sayılabilmektedir. Bu nedenler, ABH'nın evrensel bir tanımının konulmasını engellediği gibi aynı zamanda korunma yollarının ve tedavilerinin ortaya konulabilmesini de engellemektedir. Bu nedenle, ABH'nın tanı ve sınıflamasında standart olarak kullanılmak üzere, 2004 yılı içerisinde; Akut Diyaliz Kalite Girişimi [ADQI] araştırma grubu tarafından RIFLE kriterleri geliştirilmiştir (Tablo 4.1) (Uchino ve ark., 2006). Risk (Risk), hasar (Injury), yetmezlik (Failure), kayıp (Loss) ve son dönem böbrek yetmezliği (End stage renal disease) kelimelerinin baş harfleri RIFLE terimini oluşturmaktadır. RIFLE sınıflamasında ilk üç harf idrar çıkışı ve serum kreatinine göre ABH şiddet derecesini, son iki harf ise böbrek fonksiyonlarının son durumunu belirtmektedir. RIFLE ile ilk evre böbrek yetmezliğinden son dönem

böbrek yetmezliğine kadar bütün seviyelerdeki ABH ve sonuçlarını değerlendirmek mümkün olmaktadır (Bellomo ve ark., 2004).

Tablo 4.1. RIFLE'ye göre ABH sınıflandırılması (Uchino ve ark., 2006)

Sınıf	GFH ve Kreatinin Değeri	İdrar Miktarı
R- Risk	Kr artışı >1,5 kat ya da GFR azalması >%25	<0,5 ml/kg/saat×6 saat
I- Injury	Kr artışı >2 kat ya da GFR azalması >%50	<0,5ml/kg/saat × 12 saat
F- Failure	Kr artışı >3 kat ya da GFR azalması >%75	Anüri ×12 saat
L- Loss	Kalıcı böbrek fonksiyon kaybı (> 4 hafta)	
E- ESRD	Son dönem böbrek hastalığı (>3 hafta)	

ESRD, End Stage Renal Disease; GFH, Glomerüler Filtrasyon Hızı; Kr, Serum Kreatinin

Zaman içinde RIFLE sınıflamasının duyarlılığının artırılması hedeflenerek Acute Kidney Injury Network tarafından 48 saat içindeki farklılıkları içeren şekilde RIFLE kriterleri tekrar modifiye edilmiş ve AKIN kriterleri oluşturulmuştur (Tablo 4.2) (Mehta ve ark., 2007).

Standardizasyonun sağlanması için RIFLE ve AKIN kriterleri üzerine araştırmalar yapılarak 2012 yılında KDIGO grubu yeni bir tanı ve evreleme sistemi tanımlamıştır. KDIGO'nun avantajı, 48 saat içinde serum kreatinin düzeyindeki değişiklikleri veya 7 gün içinde glomerüler filtrasyon hızındaki [GFH] düşüşü göz önünde bulundurarak AKIN ve RIFLE'deki parametrelerin hepsini kapsamasıdır. ABH'yi diğer akut böbrek hastalıkları ve bozukluklarından ayrı olarak tanımlaması; klinik araştırmalar ve klinik uygulama kılavuzları için daha iyi bir temel sağlamaktadır KDIGO'nun amacı; ABH'yi rasyonel olarak diğer akut böbrek hastalıkları ayrı bir şekilde tanımlayıp, halk sağlığını korumaya yönelik klinik uygulama kılavuzlarına temel oluşturmaktır.

Tablo 4.2. Akut böbrek hasarı AKIN evrelemesi (Mehta ve ark., 2007)

Evre	Serum Kreatinin Kriteri	İdrar Çıkışı Kriteri
1	0,3 mg/dl ve üzerinde yükselme veya 1,5-2 kat yükselme	6 saat içinde idrar çıkışı <0,5 ml/kg/saat
2	2-3 kat yükselme	12 saat içinde idrar çıkışı <0,5 ml/kg/saat
3*	3 kattan fazla yükselme veya serum kreatinin 4 mg/dl iken 0,5 mg/dl üzerinde ani yükselme	24 saat içinde idrar çıkışı <0,3 ml/kg/saat veya 12 saat boyunca anüri

**Renal replasman tedavisi alan hastalar*

KDIGO'ya göre aşağıdakilerden bulgulardan herhangi birinin varlığı ABH olarak tanımlanır (Levey ve James, 2017) ve Tablo 4.3'te olduğu gibi evrelenir.

- Serum kreatinin değerinin 48 saatte $\geq 0,3$ mg/dl artışı,
- Son 7 gün içinde meydana geldiği bilinen veya tahmin edilen serum kreatinin düzeyinin bazal düzeyine göre $\geq 1,5$ kat artması,
- İdrar çıkışının 6 saat için 0.5 ml/kg/saat'in altında olması

Tablo 4.3. Akut böbrek hasarı KDIGO evrelemesi (Hsu ve ark., 2007)

Evre	Serum Kr Değeri	İdrar Miktarı
1	Bazal Kr değeri >1,5-1,9 kat ya da $\geq 0,3$ mg/dl	<0,5 ml/kg/saat×6-12 saat
2	Bazal Kr >2-2,9 kat	0,5 ml/kg/saat× ≥ 12 saat
3	Bazal Kr artışı 3 kat ya da bazal Kr >4 mg/dl ya da RRT ihtiyacı ya da <18 yaş hastada GFH<35 ml/dk	<0,3 ml/kg/saat ≥ 24 saat ya da Anüri ≥ 12 saat

GFH, Glomerüler Filtrasyon Hızı; Kr, Serum kreatinin; RRT, Renal replasman tedavileri

4.2. Akut Böbrek Hasarı Etiyoloji ve Sınıflaması

Akut böbrek hasarı etiyojisine baktığımızda prerenal, intrinsek (renal) ve postrenal nedenler olarak 3 grupta sınıflandırılmaktadır (Şekil 4.1). Hastanın takip ve tedavisi etiyojiye göre farklılık gösterdiği için bu aşama önemlidir.

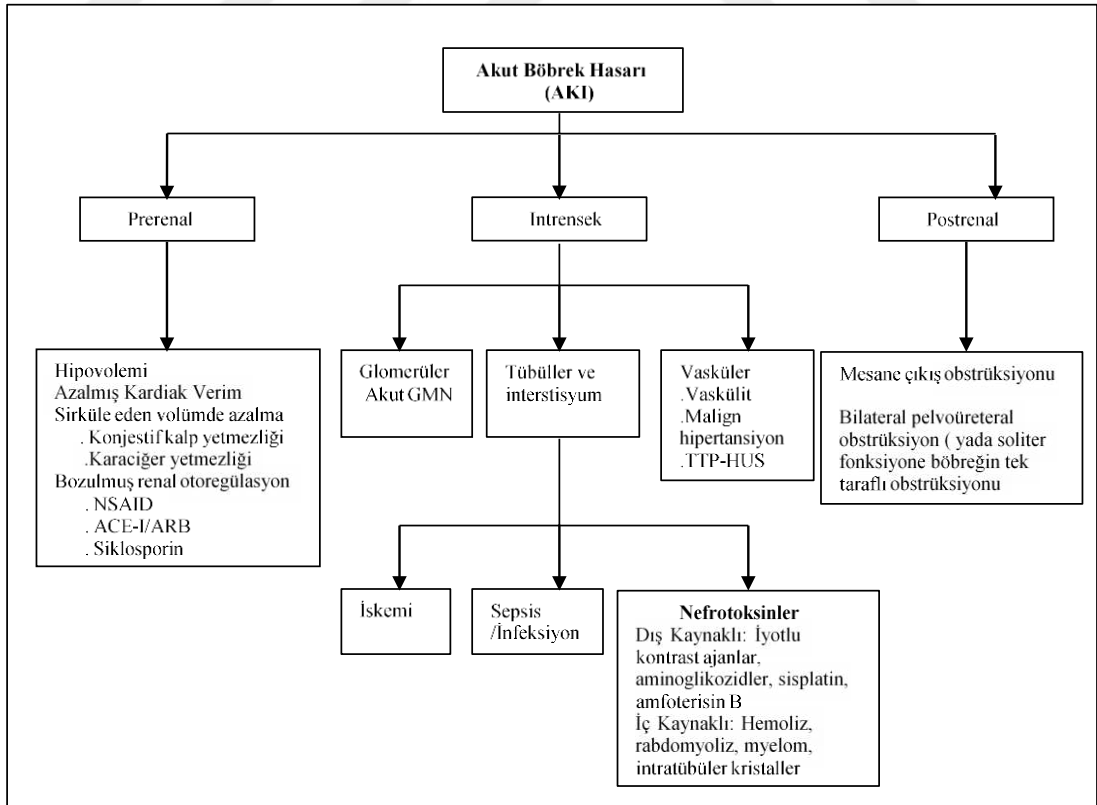
4.2.1. Prerenal akut böbrek hasarı

İntravasküler volümün ya da efektif dolaşım hacminin azalması sonucunda böbreklerin perfüzyonunun bozulmasıyla ortaya çıkan bir tablodur. ABH etiyojisine bakıldığında % 40-55 oranında en sık nedeni oluşturmaktadır. Gerçek bir böbrek hasarı olmayıp, kan volümü ve hemodinamik durumlar etkin kompensasyon mekanizmasıyla düzeltildiğinde hasar ortadan kalkabilir. Nedenler ortadan kaldırılmazsa renal ABH ile sonlanmaktadır (Bellomo ve ark., 2004).

İntravasküler volümün azalmasının en önemli sebepleri arasında kanama, dehidratasyon, renal veya adrenal hastalıklar, santral ya da nefrojenik diabetes insipidus, yanıklar, sepsis, nefrotik sendrom, travmatize dokudan kayıp ve kapiller kaçış sendromu bulunmaktadır. Etkin kan volümünün azalmasının sebepleri arasında

konjestif kalp yetmezliği, kardiyak tamponad ve hepatorenal sendrom yer almaktadır (Tablo 4.4) (Bellomo ve ark., 2012).

İntravasküler volüm azalması ile böbrek kanlanması azaldığında baroreseptör aktivasyonu ile sempatik sinir sistemi ve renin anjiyotensin sistemi aktive olmaktadır. Sonuç olarak renal vazokonstrüksiyon ve GFH'da azalma olur (Figür 4.1). Renal hipoperfüzyona cevap olarak bazı kompensasyon mekanizmaları devreye girer ve GFH normal sınırlarda tutulmaya çalışılır. Renal miyositlerin uyarılması ile gelişen myojenik refleks, intrarenal vazodilatatör prostoglandinlerin ve atrial natriüretik polipeptit salınması ile afferent arteriolde vazodilatasyon gelişir. Anjiyotensin II salınımının artması ile de afferent ve efferent arteriollerde vazokonstrüksiyon oluşur. Anjiyotensin II'nin efferent arterioldeki vazokonstrüksiyon yapıcı etkisi afferent arteriole göre daha fazladır ve glomerül içi filtrasyon basıncının normal sınırlarda tutulmasını sağlar. Renal perfüzyon bozukluğunun uzaması durumunda renal kompensasyon mekanizmaları yetersiz kalır ve intrinsek böbrek hasarı gelişir (Basu ve ark., 2011).



Şekil 4.1. ABH sınıflaması (Sushrut ve ark., 2015)

Tablo 4.4. Akut böbrek hasarı sınıflaması (Basu ve ark., 2011)

Tip:	Etyoloji:
Prerenal ABH	❖ İntravasküler volümde azalma Dehidratasyon, kanama, kusma, diüretik kullanımı, yanıklar, şok ❖ Efektif intravasküler volümde azalma Konjestif kalp yetmezliği, aritmiler, sepsis, nefrotik sendrom
Renal ABH	❖ Akut tübüler nekroz(vasomotor nefropati) ▪ Uzamış iskemi-hipoksi ▪ Nefrotoksinler İlaçlar (NSAID, ACE i.) Endojen toksinler(hemoglobin, miyoglobin) Eksojen toksinler(etilen glikol, metanol) ❖ Ürik asit nefropatisi ve tümör lisis sendromu ❖ İnterstisyel hastalıklar ▪ İnterstisyel nefrit ▪ Enfeksiyonlar ▪ İnfiltratif hastalıklar ❖ Glomerülonefritler- ▪ Hızlı ilerleyen glomerülonefrit ▪ Postinfeksiyöz glomerülonefrit ▪ Membranoproliferatif glomerülonefrit ❖ Vasküler lezyonlar ▪ Renal ven trombozu ▪ Renal arter trombozu ▪ Kortikal nekroz ▪ Hemolitik üremik sendrom ▪ Vaskülitler
Postrenal ABH	❖ Soliter böbrekte obstrüksiyon (taş, tümör, pıhtı) ❖ Bilateral üreteral obstrüksiyon (bilateral taş, bilateral üreteropelvik ya da üreterovesikal bileşke darlığı) ❖ Üretral obstrüksiyon (taş, posteroüretral valve) ❖ İdrar retansiyonuna neden olan ilaçlar ❖ Dışardan tümör basısı

4.2.2. Postrenal Akut Böbrek Hasarı

Postrenal ABH, üriner sistemde herhangi bir yerdeki idrar akımının bozulması ile oluşur. Üriner toplayıcı sistemin renal tübülden üretraya kadar herhangi bir düzeyde ortaya çıkabilir. Mesane düzeyi üzerindeki obstrüksiyonlarda anlamlı GFH değerinde düşüklük yaratabilmesi için bilateral obstrüksiyon (ya da tek böbrekli hastalarda tek taraflı obstrüksiyon) olması gerekmektedir. Prostat hastalıkları (hiperplazi ya da kanser), taşlar ve metastatik hastalıklar obstrüktif nefropatinin en sık görülen nedenlerini oluşturmaktadır (Sushrut ve ark., 2015).

4.2.3. Renal (intrensek) Akut Böbrek Hasarı

Hipoksi, uzamış iskemi ve nefrotoksinler intrinsek ABH'nın en önemli sebepleri arasında yer almaktadır (Tablo 4). Patogenezi tam olarak bilinmese de intrinsek ABH başlamasıyla tübülüs hücrelerinde intrasellüler ATP azalması birçok metabolik reaksiyonun başlamasını tetiklemektedir. Hasarın oluşmasında hücre içi kalsiyum, nitrik oksit ve reaktif oksijen bileşikler konsantrasyonlarındaki artışın etkili olduğu düşünülmektedir (Basu ve ark., 2011). Renal ABH etiyolojisine 4 gruba ayrılmaktadır:

1. Makrovasküler tutulumla giden hastalıklar,
2. Glomerüler hastalıkları
3. Akut tübüler hasar (nekroz)
4. Akut tübülointerstisyel hastalıklar

Renal ABH'nın en sık görülen nedeni akut tübüler nekrozdur. İskemik ve nefrotoksik ajanlara bağlı olarak gelişir. Antibiyotikler, antiviral ajanlar, kemoteröpatik ajanlar, antiinflamatuvar ve immünsupresif ilaçlar, radyokontrast ajanlar, makromoleküller, organik çözücüler ekzojen nefrotoksinleri oluştururken myoglobinüri, hemoglobinüri ve hiperürikozüriyle birlikte ürik asit artışı akut tübüler hasara yol açan endojen nefrotoksinlerdir (Sushrut ve ark., 2015).

4.3. Kontrast Madde İlişkili Akut Böbrek Hasarı

Son yıllarda radyodiagnoz ve anjiyografideki gelişmeler, klinik tanıda iyileşmeye ve güvenli hasta yönetimine yol açmıştır. Modern radyolojik tekniklerin çoğu, doğru teşhis ve kesin müdahaleler için vasküler yapıları ve içi boş organları belirlemek için iyotlu radyokontrast malzemenin uygulanmasını içermektedir. Bu iyotlu intravasküler kontrastın başlıca olumsuz etkilerinden biri, daha önce kontrast kaynaklı nefropati [CIN] olarak bilinen kontrast kaynaklı akut böbrek hasarısı [Kİ-ABH]. Kontrastın neden olduğu akut böbrek hasarı, hastanede yatan hastalarda akut böbrek hasarının en yaygın üçüncü nedenidir (Nash ve ark., 2002). Genellikle hafiftir ve geri dönüşümlüdür, ancak bazı hastalarda renal replasman tedavisi gerektiren geri dönüşümsüz böbrek hasarına neden olabilmektedir (Nash ve ark., 2002).

4.3.1. Kontrast Madde İlişkili Akut Böbrek Hasarı Tanımı ve İnsidansı

Görüntüleme veya girişimsel amaçlar için yakın zamanda intravasküler kontrast madde uygulanmasını takiben böbrek fonksiyonunda bir düşüş olduğunda, kontrast kaynaklı akut böbrek hasarından şüphelenilmektedir. Kİ-ABH için evrensel olarak kabul edilmiş bir tanım yoktur. 2012'de yayınlanan KDIGO klavuzunda Kİ-ABH için ABH tanımının kullanılması tavsiye edilmiştir.

- İntravasküler kontrast madde uygulamasından sonraki 48 saat içinde kreatinin değerinde $\geq 0,3$ mg/dL'lik mutlak artış veya
- İntravasküler kontrast madde uygulamasından sonraki 7 gün içinde kreatinin düzeyinde bazal değerinin en az %50 üzerinde artış veya
- Maruziyetten sonra en az 6 saat devam eden, 0,5 mL/kg vücut ağırlığı/saat'ten az idrar hacmi olması

Kİ-ABH tanısı ancak ABH'nin diğer potansiyel nedenleri (hemodinamik şok, rabdomiyoliz, nefrotoksik ilaç kullanımı ve üriner sistem obstrüksiyonu) dışlandıktan sonra yapılmalıdır.

Kİ-ABH insidansı hasta faktörlerine, gerçekleştirilen prosedürün türüne, uygulanan kontrast yoluna ve uygulanan tanıma bağlıdır. Koroner ve renal anjiyografi ve anjiyoplastinin daha fazla kontrast madde kullanıldığı için Kİ-ABH'ye neden olma olasılığı, %3 ile %13 arasında olup tahmin edilen diğer kontrast çalışmalarına göre daha yüksektir. Böbrek fonksiyonu normal olan hastalarda, Kİ-ABH insidansının %1 ile %2 arasında olduğu tahmin edilmektedir (Berns, 1989). İleri yaş, diyabet, konjestif kalp yetmezliği ve diğer nefrotoksik ilaçların uygulanması gibi diğer risk faktörleri olsun ya da olmasın önceden var olan böbrek fonksiyon bozukluğunda insidansı %25'e kadar çıkabilmektedir. Hastanede yatan hastaların %11'ini etkilemekte ve hastanede yatan hastalarda ABH'nin üçüncü en yaygın nedenidir (Nash ve ark., 2002). Birkaç küçük çalışma, Kİ-ABH ile mortalite arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. Bu çalışmaların çoğu koroner girişim geçiren hastaları içermekte olup, bu bulguların diğer hasta gruplarına genellenmesini imkansız kılmaktadır. Ayrıca, kronik böbrek hastalığı [KBH] olan hastaların, radyokontrast madde verilmesini içeren prosedürlere veya görüntülemeye maruz kalma olasılığı giderek azalmaktadır. Bu nedenle kontrastın gerçekten ABH'ye neden olup olmadığını bilmek imkansızdır. Kontrasta bağlı akut böbrek hasarının hastanede kalış süresini uzatması muhtemeldir, ancak atfedilebilir ölüm oranı hala büyük ölçüde bilinmemektedir (Mehran ve ark., 2019).

4.3.2. Kontrast Madde Türleri ve Kİ-ABH Patofizyolojisi

Seruma göre osmolalitelere bağlı olarak, iyotlu kontrast maddeler yüksek, düşük ve izo-osmolal maddeler olarak sınıflandırılmaktadır (Tablo 4.5). Birinci nesil maddeler veya iyonik kontrast olarak da adlandırılan yüksek ozmolal maddeler, tipik olarak vücut sıvılarının (1400-2200 mOsm/kg su) 5-8 katı ozmolaliteye sahiplerdir. Ozmotik etkiye ikincil advers reaksiyonların yüksek insidansı, yüksek ozmolal ajanların gözden düşmesine yol açmıştır. Günümüzde klinik pratikte nadiren kullanılmaktadırlar (Do, 2017). Ozmolalitesi 600 ila 800 mOsm/kg su arasında olan düşük ozmolal ajanlar (ikinci nesil ajanlar veya iyonik olmayan kontrast) daha az advers reaksiyona neden olur ve iyi tolere edilirler. Bununla birlikte, hala hipertontiktirler ve ABH'ye neden olma potansiyeline sahiptirler. Daha ucuzdurlar ve klinik pratikte en sık kullanılan kontrast maddelerdir (Do, 2017). İzo-osmolal kontrast

maddeler veya üçüncü nesil kontrast maddeler, serumunkine benzer ozmolaliteye sahiptir. İyi tolere edilirler ancak yüksek viskoziteye sahiptirler ve çok pahalıdırlar. Yüksek maliyetleri ve düşük ozmolal ajanlara kıyasla marjinal olarak azalan Kİ-ABH riski göz önünde bulundurulduğunda, izo-osmolal ajanların kullanımı Kİ-ABH geliştirme riski yüksek olan hastalarla sınırlıdır (Do, 2017).

Kİ-ABH'nın patogenezi tam olarak anlaşılamamıştır. Bununla birlikte, birkaç olası mekanizma öne sürülmüştür; (1) azalmış renal kan akışına [RBF] neden olan böbrek hemodinamik değişiklikleri; (2) iyot ile doğrudan tübüler hasarlanma; (3) bozulmuş mikro sirkülasyon ile medüller hipoksi; (4) hücre ölümünü içeren hücre içi sinyal yolları; ve (5) inflamasyon. Buna göre kontrast maddeler doğrudan veya dolaylı mekanizmalarla böbrek hasarına neden olmaktadır (McCullough, 2008).

Dolaylı Mekanizmalar

Kontrast maddeler hem bölgesel hem de global olarak böbrek kan akışında dalgalanmalara neden olmaktadır. Kontrast madde ile kan akışında azalma olduğu zaman fizyolojik olarak düşük oksijen saturasyonu ve yüksek metabolik aktivite ile dış medulla, hasarlanmaya karşı savunmasız hale gelmektedir (Mehran ve ark., 2019, Do, 2017). Kan akışının lokal olarak azalmasına endotelin, renin-anjiyotensin gibi vazoaktif maddelerin artması ve azalmış prostaglandin ve nitrik oksit aracılık etmektedir. Yaklaşık 2 saatlik yarılanma ömrü ile kontrast madde kademeli olarak böbrekler yoluyla 24 saat sonrasında tamamen vücuttan atılmaktadır. Atılım sırasında, tübüllerden geçerek sodyum ve su atılımını artıran artan bir ozmotik kuvvete neden olmaktadır. Bu da intratübüler basıncı artırarak glomerüler filtrasyon hızını [GFH] azaltmaktadır. Kontrast maddeler ayrıca kan viskozitesini artırır, mikrosirkülasyonu azaltır, eritrositlerin plastisitesini etkiler ve mikrovasküler tromboza neden olurlar (Do, 2017).

Doğrudan Mekanizmalar

İyotlu kontrast madde, tübüllerin epitel hücreleri için nekroz ve apoptoza neden olarak toksik etki gösterir. Bazolateral Na⁺/K⁺ ATPaz'ın lümen yüzeyine yeniden dağılımı vardır ve bu da distal tübüllere artan Na iletimine neden olur. Hasarlı epitel hücreleri ayrılarak tübüler lümeni tıkayarak intratübüler basıncı artırır ve böylece GFH'yi daha da azaltır (McCullough, 2008).

Tablo 4.5. Radyokontrast maddeler ve özellikleri (Do, 2017)

Etken madde adı	Piyasa adı	Ozmolarite tipi	Ozmolarite(mOsm/kg H ₂ O)*
Iodixanol	Visipaque	İzo-ozmolar	290
Iohexol	Omnipaque	Düşük ozmolar	322-844
Iopromide	Ultravist	Düşük ozmolar	328-774
Ioversol	Optiray	Düşük ozmolar	355-792
Iopamidol	Isovue	Düşük ozmolar	413-796
Ioxaglate	Hexabrix	Düşük ozmolar	580
Ioxilan	Oxilan	Düşük ozmolar	585-695
Iobitridol	Xenetix	Düşük ozmolar	585-915

* Kabul edilen aralıktaki en yüksek ve en düşük değerleri gösterir

4.3.3.Kİ-ABH için Yüksek Risk Faktörleri

Kontrast ilişkili risk faktörleri iki grupta toplanmaktadır (Tablo 2.6) (Mehran ve ark., 2019).

- Kontrastla ilgili faktörler
- Hastayla ilgili faktörler

4.3.3.1. Kontrastla İlgili Faktörler

Osmolalite, viskozite, hacim ve uygulanan kontrast yolu, akut böbrek hasarının ana belirleyicileridir (Mehran ve ark., 2019, Do, 2017). Açıkçası, Kİ-ABH geliştirme riski, birinci nesil yüksek ozmolal ajanlarla çok daha yüksektir. Yüksek ozmolalitenin ABH ile ilişkili olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir, ancak sıvıların reolojik özelliklerini değiştirdiği için viskozitenin ozmolaliteden (Do, 2017) daha önemli olduğuna dair bazı görüşler vardır. Düşük osmolali karşılaştıran çalışmalar ve izo-osmolal ajanlar, viskozite teorisini destekleyerek ABH geliştirme riskinde hiçbir fark göstermemektedir (Do, 2017).

Diğer önemli faktörler uygulanan kontrast hacmi, uygulama yolu ve gerçekleştirilen prosedürün tipidir. Daha yüksek hacimler daha fazla ozmotik etkiye neden olur, GFH'nı azaltır, tübüllerde daha uzun süre kalır ve tübüler hücrelerde doğrudan yaralanmaya neden olur (McCullough, 2008).

Kİ-ABH insidansı intraarteriyel kontrast uygulamasından sonra intravenöz uygulamaya göre daha fazladır. Anjiyografi (arteriyel veya venöz), kontrastlı bilgisayarlı tomografiye kıyasla kesinlikle çok daha yüksek risk taşır (McCullough, 2008).

4.3.3.2. Hastayla İlgili Faktörler

Kİ-ABH insidansı yaş, önceden var olan böbrek hastalığı, diyabetik nefropati, nefrotoksik ilaçların eşzamanlı kullanımı, dehidratasyon, hemodinamik instabilite, anemi ve azalmış renal perfüzyonun diğer nedenleri ile artar (Mehran ve ark., 2019, Rihal ve ark., 2002, Nikolsky ve ark., 2005, Lang, 1995). Bu faktörler düşük böbrek rezervi, kontrast uygulaması ABH gelişme riskini artırır. Kİ-ABH geliştirme riski taşıyan hastaları belirlemek için çeşitli tahmin modelleri önerilmiştir (Mehran ve ark., 2019). Bu modeller, riski tahmin etmek için nihai bir skora ulaşmak üzere çeşitli hasta, prosedür ve kontrastla ilgili faktörleri bir araya getirmiştir (Mehran ve ark., 2019). Büyük kohortlar kullanılarak oluşturulmuştur. Koroner girişim geçiren hastaların Mehran ve ark. tarafından önerilen bu modellerden biri Tablo 4.7'de verilmiştir

(Mehran ve ark., 2005). Yaygın olarak kullanılmamakla birlikte, koroner girişim uygulanan hastalarda ABH'yi öngörmede oldukça faydalıdır (Mehran ve ark., 2005).

Tablo 4.6. Kİ-ABH için yüksek risk faktörleri (Mehran ve ark., 2019)

Hastayla ilişkili faktörler
• Önceden var olan böbrek fonksiyon yetmezliği • Diyabetik nefropati • İleri yaş (> 70 yaşında) • Hipertansiyon • Konjestif kalp yetmezliği • Anemi • Periprosedürel hipoperfüzyon
Tıbbi prosedürle ilişkili faktörler
• İyot maddesinin yüksek osmolalitesi • Aşırı iyot maddesi kullanımı • 72 saat içinde tekrar tekrar kontrast maddeye maruz kalma • Görüntüleme teknikleri • Nefrotoksik ilaç (NSAID'ler, aminoglikozitler, ACEI, vb.)

Tablo 4.7. CIN gelişme riskini hesaplamada kullanılan Mehran Risk Skoru (Mehran ve ark., 2005)

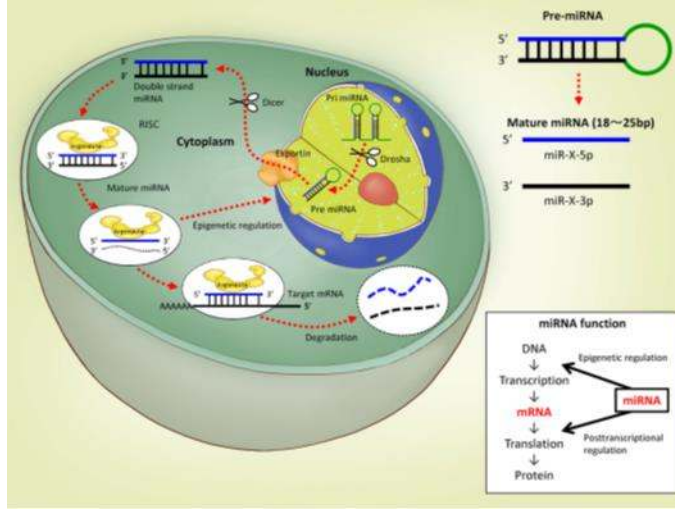
Periprosedürel CIN İçin Mehran Risk Faktörleri					Skor
Hipotansiyon (Sistolik kan basıncı < 80 mmHg yada >1 saat inotrop desteği)					5
İntraarteriyel balon pompa tedavisi					5
Kronik kalp yetmezliği (Newyork kalp yetmezliği derneği evre 3veya 4 yada yeni pulmoner ödem)					5
Yaş > 75					4
Diabetes mellitus					3
Anemi (Erkek için Htc < 0,39, kadın için Htc < 0,36)					3
GFR < 20 mL/ dk					6
GFR =20-40 mL/dk					4
GFR = 40-60 mL/dk					2
Kontrast madde volümü					Her cc için 100
Skor	< 5	6-10	11-16	> 16	ml
CIN riski	Düşük % 7,5	Orta % 14	Yüksek % 26,1	Çok yüksek %	
Diyaliz riski	% 0,04	% 0, 12	% 1,09	% 12,6	

4.4. MikroRNA'lar

MikroRNA'lar [miRNA'lar], çok çeşitli organizmalarda ve fizyolojik süreçlerde gen ekspresyonunu düzenleyen, 19~23 nükleotidlik endojen, tek sarmallı, kodlamayan bir RNA grubudur (Liu ve ark., 2016, Fan ve ark., 2016). İlk olarak 1993 yılında Ambros'un grubu tarafından *Caenorhabditis elegans*'ta keşfedilmiş ve türler arasında şaşırtıcı derecede yüksek koruma göstermektedirler. Son yirmi yılda biriken kanıtlar, miRNA'ların proliferasyon, farklılaşma, metabolizma ve apoptoz dahil olmak üzere hemen hemen tüm biyolojik hücre fonksiyonlarının transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde kritik bir rol oynadığını göstermektedir. Dokuya özgü bir şekilde eksprese edilen miRNA'lar, normal gelişim ve fizyoloji için temeldir ve birçok hastalık modelinin patolojik yollarında yer alır (Fan ve ark., 2016).

4.4.1. miRNA'ların Biyogenezi ve Fonksiyonları

Kodlamayan RNA'lar [ncRNA'lar], genomun "gen çölü" olarak kabul edilen kodlanmayan bölgesinden kopyalanır ve kodlama bölgesindeki genlerin ekspresyonunu düzenleyebilirler. miRNA'lar bir tür ncRNA'dır; olgun formları, 18 ila 25 baz uzunluğunda tek sarmallı bir RNA molekülüdür ve dizileri, hayvan türleri arasında yüksek oranda korunur. Başlangıçta, bir miRNA molekülü, RNA polimeraz II tarafından bir kök halka yapısına sahip bir primer miRNA [pri-miRNA] olarak kopyalanır ve daha sonra bu pri-miRNA RNase III enzimi, Drosha tarafından yaklaşık 70 bazlık bir öncü miRNA'ya [pre-miRNA] bölünür (Şekil 4.2) (Ichii ve Horino, 2018).



Şekil 4.2. miRNA'ların biyosentezi ve işlevi (Ichii ve Horino, 2018)

Pre-miRNA, nükleer taşıma proteini Exportin 5 yoluyla sitoplazmaya taşınır ve esas olarak başka bir RNase III enzimi olan Dicer tarafından çift sarmallı miRNA'ya bölünür. Çift sarmallı miRNA, Argonaute proteinleri içeren RNA kaynaklı susturma kompleksine [RISC] dahil edilir ve dupleksin bir sarmalı (yolcu sarmalı, miR-X* olarak adlandırılır) bozulur. Dupleksin diğer zinciri (kılavuz iplik veya miR-X olarak adlandırılır) böylece hedef mRNA'nın 3' çevrilmemiş bölgesini [UTR] bağlamakta serbesttir. Çoğu durumda, kılavuz şerit miR-X, yolcu şerit miR-X* ile karşılaştırıldığında daha fazladır. Olgun miRNA'ları pre-miRNA'nın koluna göre adlandırılmaktadır; 5' kolundakiler miR-X-5p, 3' kolundakiler miR-X-3p olarak adlandırılır. Hedef mRNA'ya bağlanmak için miRNA'nın 5' bölgesinin 2 ila 8 bazı önemlidir. Böylece miRNA'lar, hedef mRNA'larının ifadesini transkripsiyon sonrası seviyede düzenler. Bağlandıktan sonra miRNA'lar, translasyonun başlamasını veya uzamasını bloke ederek veya mRNA transkriptlerini de-adenilatlayarak baskıyı indükler. miRNA'lar, gen ekspresyonunu baskılamak için tam bir tamamlayıcılık gerektirmediğinden, belirli bir miRNA, çoklu mRNA transkriptlerini düzenleyebilir ve belirli bir mRNA transkripti, çoklu miRNA'lar tarafından baskılanabilir. miRNA'ların insandaki protein kodlayan genlerin yarısından fazlasını düzenlediği tahmin edilmektedir. Liu ve ark.,(2013) tarafından yakın zamanda yapılan bir incelemede, miRNA genleri epigenetik olarak DNA metilasyonu ve/veya histon modifikasyonu ile düzenlenebildiğinden, epigenetik modülasyon ve miRNA'lar arasında var olan düzenleyici devrenin önemine dikkat çekilmiştir. miRNA'ların "epi-

miRNA'lar" adlı bir alt sınıfı vardır. DNA metiltransferazlar, HDAC'ler veya polipek baskılayıcı komplekslerin bileşenleri gibi epigenetik düzenleyicileri doğrudan hedeflediği kabul edilmektedir (Ichii ve Horino, 2018).

Ayrıca miRNA'lar, polikistik böbrek hastalığı, renal hücreli karsinom, diyabetik nefropati, lupus nefriti ve renal allogreft reddi gibi böbrek hastalıkları dahil olmak üzere çeşitli insan hastalıklarında rol oynamaktadır. Son birkaç yılda, araştırmacılar miRNA'ların ABH' a olan yüksekliğini ele almaya başlamışlardır (Fan ve ark., 2016).

4.4.2. Böbreklerdeki miRNA'lar

Olgun miRNA'lar, mRNA'ları bağlayarak transkripsiyon sonrası düzenleyiciler olarak işlev görmektedir. Son araştırmalar, yüksek verimli tarama teknikleri kullanılarak insanlarda ve deney hayvanlarında akut ve kronik böbrek hastalığının ilerlemesi sırasında böbreklerdeki miRNA ekspresyonunun değiştiğini ortaya koymaktadır. Memeli böbreklerinin karmaşık morfofonksiyonel organizasyonu nedeniyle, hem esasen in situ hibridizasyon yöntemleri kullanılarak ele alınan miRNA'ları eksprese eden böbrek hücrelerinin tam lokalizasyonunu belirlemek, hem de çoğunlukla in vitro analiz yoluyla incelenen bu miRNA'lar tarafından hangi mRNA'ların bağlandığını ve bozunduğunu tam olarak belirlemek önemlidir. Yeni biyobelirteç adaylarını keşfetmek için idrar süpernatanı ve ekzozomal fraksiyondaki miRNA seviyeleri, farklı böbrek hastalığı tiplerinde kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır (Ichii ve Horino, 2018).

2004 yılında miRNA mikroarray analizi kullanılarak Sun ve ark. miR-192, miR-194, miR-204, miR-215 ve miR-216'nın insan böbreklerinde bol miktarda eksprese edildiğini bildirmiştir (Sun ve ark., 2004). Daha sonraki bir çalışmada, Tian ve ark. miR 192 ve miR-194'ün ekspresyon seviyelerinin kortekste sıçan böbreklerinin medullasından daha yüksek olduğunu, miR-27b'nin ise medullada yüksek oranda eksprese edildiğini göstermiştir (Tian ve ark., 2008). Renal patolojik olaylar temel olarak glomerüler ve tubulointerstisyel lezyonlar olmak üzere iki tipe ayrılabilir. Böbrek hasarı mekanizmaları böbrek hastalıkları arasında farklılık gösterdiğinden, özellikle miRNA moleküllerinin hastalık belirteçleri olarak uygulanması için, her

böbrek hastalığındaki miRNA ifade profilini, söz konusu miRNA'yı ifade eden hücre tipiyle ilişkili olarak dikkatlice incelemek gerekmektedir (Ichii ve Horino, 2018).

4.4.3.Akut Böbrek Hasarı ve miRNA'lar

Akut böbrek hasarı erken tanı ve tedavinin önemli olduğu son dönem böbrek yetmezliğine ilerleyebilen morbidite ve mortalitesi yüksek bir klinik durumdur. Erken tanı için birçok biyobelirteç üzerinde çalışılmasına rağmen klinik pratikte kullanılan serum kreatinin değeri geç bir biyobelirteçtir. Bu nedenle, nc RNA'lar, ABH'da potansiyel belirteçler ve terapötik hedefler olarak son on yılda araştırmanın odağına girmiştir. Bu bağlamda en iyi araştırılan ncRNA sınıfı, miRNA'lardır (Brandenburger ve Lorenzen , 2020).

Hücrel fenotiplerin önemli belirleyicileri olan mikroRNA'lar, hastalık durumlarının biyobelirteçleri olarak ve heterojen klinik koşulların altında yatan mekanizmaları ayırt etmenin yolları olarak bir dizi klinik ve deneysel ortamda kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Hücre farklılaşmasına ve hücre döngüsünün düzenlenmesine dahil olmalarından dolayı, en yaygın olarak malignitede ve bir dizi kronik hastalıkta incelenmiştir. Çeşitli etiyolojisi, karmaşık patogenezi ve belirsiz sonuçları ile ABH, miRNA profillerinin altta yatan mekanizma hakkında değerli bilgiler sağlayabileceği akut bir hastalık sürecini temsil eder. ABH patogenezinde bir düzenleyici sınıfı olarak miRNA'ların önemi ilk olarak, miRNA'ları üretmek için gerekli olan bir enzimin (Dicer) renal proksimal tübülere özgü, genomik delesyonuna sahip bir transgenik fare modelinde gösterilmiştir. Bu model, renal kortekste miRNA'ların küresel bir down regülasyonu sergiledi ve proksimal tübüler Dicer nakavt fareler, iskemi-reperfüzyondan sonra ABH'ye direnç göstermiş; vahşi farelere göre önemli ölçüde daha iyi böbrek fonksiyonu, daha az doku hasarı, daha az tübüler apoptoz ve daha iyi hayatta kalma yetenekleri olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla bu bulgular, iskemik ABH' de miRNA ekspresyonu için net bir patojenik rol olduğunu düşündürmektedir (Wei ve ark., 2010). Genel olarak, 50'den fazla bireysel miRNA'nın ABH'de diferansiyel ifadeye sahip olduğu tanımlanmıştır (Fan ve ark., 2016). Deneysel ve klinik ABH bağlamında, bu miRNA'ların çoğu enflamasyonu, apoptozu ve fibrozu destekleyen moleküler mekanizmalarla ilişkilendirilmiştir; tersine, ABH ile

ilişkili diğer miRNA'lar, anti-enflamatuar, anti-apoptotik, anti-fibrotik ve pro-anjiyojenik etkiler uygulayarak koruyucu şekilde hareket edebilir. Bu nedenle, ABH'de miRNA modellerini yorumlarken birkaç önemli husus vardır. İlk olarak, bireysel miRNA'lar için, yanıtın yaralanmaya karşı koruyucu bir fizyolojik tepki mi, hastalık sürecine seyirci mi yoksa patofizyolojinin bir aracısı mı olduğu bilinmeyebilir. İkinci olarak, miRNA'nın türetildiği örneğin türü çok önemlidir, klinik çalışmalarda en çok plazma veya idrar çalışılmıştır; ancak bunların, şu anda yalnızca hayvan modellerinde veya böbrek biyopsilerinde incelenebilen böbrekteki doku ekspresyonu için uygun adaylar olup olmadığı açık değildir. Son olarak, miRNA düzenlemesinin karmaşıklığı göz önüne alındığında, bir dizi miRNA'nın ifadesi, herhangi tek bir miRNA' dan daha önemli olabilmektedir (Jones ve ark., 2018).

Hastalık geliştirme mekanizmaları karmaşıktır ve genellikle çoklu proteinlerde, kodlama genlerinde ve sinyal yollarında değişiklikler içerir. Bu nedenle, tek bir molekülü düzenleyerek bir hastalığın prognozunu iyileştirmek zordur. miRNA, gen transkripsiyonu ve protein translasyonunda önemli bir düzenleyici moleküldür ve inflamasyon, apoptoz, proliferasyon ve anjiyogenez süreçlerinde bir merkez görevi görür. Yani bir miRNA, yüzlerce veya binlerce hedef aracılığıyla birden fazla proteinin ekspresyonunu kontrol edebilir, böylece sinyal yolları birden fazla proteini etkileyebilir. Örneğin, çok sayıda çalışma, miR-21'in ABH' nin ilerlemesinde yer alan önemli bir molekül olduğunu göstermiştir (Zou ve Zhang, 2018).

ABH gelişimi ile ilişkili miRNA'lar, cerrahi operasyonlardan sonra iskemik durum gösteren fare, sıçan ve insanlarda rapor edilmiştir (Tablo 4.8) (Ichii ve Horino, 2018).

Tablo 4.8. ABH'da Böbreklerde Değişmiş İfade Gösteren miRNA'lar (Ichii ve Horino, 2018)

	Species	miRNA	Expres- sion	Status/organs or cells	Putative target or downstream molecules
AKI	Mouse, rat, human	miR-21	Up	Ischemia/kidney	MKK3, PDCD4
	Mouse, human	miR-24	Up	Ischemia, allograft/kidney	H2AFX, HO1
	Rat	miR-30a, c, e	Up	Contrast-induced nephropathy/kidney	-
	Mouse	miR-34a	Up	Ischemia, toxic injury/kidney	SIRT1, ATG4B
	Mouse, rat	miR-125b	Up	Ischemia/kidney	AHRR
	Rat	miR-127	Up	Ischemia/proximal tubular cell	KIF3B
	Mouse, human	miR-146a	Up	Ischemia, allograft/proximal tubular cell	IRAK, CXCL8/CXCL1
	Mouse	miR-150	Up	Ischemia, myocardial infarction-induced AKI/kidney	IGF1R
	Rat	miR-155	Up	Ischemia, toxic injury/kidney	-
	Mouse	miR-489	Up	Ischemia/kidney	PARP1
	Mouse	miR-494	Up	Ischemia/kidney	ATF3
	Mouse	miR-687	Up	Ischemia/kidney	PTEN

Son kanıtlar, cisplatin-/siklosporin kaynaklı ABH'ye ek olarak miRNA'ların iskemi-reperfüzyon hasarına [IRI] dahil olduğunu göstermiştir (Du ve ark., 2013, Shapiro ve ark., 2011). Spesifik olarak, miR-21'in renal hücre apoptozu ve fibrozisini düzenlediği gözlemlendi (Li ve ark., 2013) ancak bu bulgular tartışmalı olsa da, bazı araştırmalar miR-21 upregülasyonunu gösterirken (Godwin ve ark., 2010, Kaucsár ve ark., 2013) diğerleri doku veya hastalık modeline bağlı olarak ekspresyon seviyelerinde bir downregülasyon olduğunu veya hiç değişiklik olmadığını bildirmektedir (Saikumar ve ark., 2012, Kanki ve ark., 2014).

Araştırmalarda miR-21 ekspresyonunun fare IR böbreklerinde arttığı bulunmuştur. miR-21'in interlekin-6 [IL-6] ve tümör nekroz faktörü α [TNF- α] 'ya karşı inhibe edici etkisini açıklayan MKK3 dahil olmak üzere çeşitli faktörleri hedef olarak patolojik bir önem göstermektedir (Xu ve ark., 2012). Xu ve ark. PDCD4'ü miR-21'in hedefi olarak bildirerek miR-21'in apoptoza karşı gözlemlenen koruyucu etkisini göstermiştir (Xu ve ark., 2012). Benzer şekilde, IR'den sonra, miR-146a eksikliği olan farelerin, vahşi tip farelere göre daha şiddetli tubulointerstisyel lezyonlar sergilediği ve miR-146a'nın aşırı ekspresyonu, hasarlı tübüler hücrelerde hem IRAK1 hem de CXCL8/CXCL1 ekspresyonunu azalttığı görüldü [Amrouche ve ark., 2017]. İn vivo olarak, daha şiddetli renal iskemi-reperfüzyon hasarının (IRH), hem insan böbrek nakli alıcıları hem de allogreftlerin idrarında artan miR-146a ekspresyonu ile ilişkili olduğu da bulunmuştur (Amrouche ve ark., 2017). miR-24, fare IR böbreklerinde ve insan iskemik böbreklerinde, özellikle de renal endotel ve tübüler epitel hücrelerinde H2A.X

ve HO1'i hedefleyerek upregüle olarak pro-apoptotik etki göstermiştir (Lorenzen ve ark., 2014). Sisplatin kaynaklı ABH farelerinde, miR-34a'nın P53 yoluyla indüklendiği ve SIRT1 ekspresyonunu kontrol ettiği saptanmıştır (Bhatt ve ark., 2010, Lee ve ark., 2022). Kontrast madde aynı zamanda ABH' nı indükler ve artmış kardiyovasküler olay riski ile ilişkilidir. Gutierrez-Escolan ve ark. kontrast kaynaklı nefropati gösteren sıçan böbreğinde artan miR-30 ailesi üyeleri [miR-30a, c, e] seviyelerini ortaya çıkarmıştır (Gutierrez-Escolano ve ark., 2015).

4.4.4. Kontrasta Bağlı ABH'da miRNA'lar

Bugüne kadar, Kİ-ABH' deki miRNA ekspresyonundaki değişiklikler üzerine ve bu spesifik miRNA'ların Kİ-ABH'nin erken teşhisi ve klinik terapötik hedefler için biyobelirteçler olarak kullanılıp kullanılamayacağına dair çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda kullanılan kontrast maddeler arasında iopromid, iyodiksanol, ioheksol, Omnipaque ve diatrizoat sodyum yer almaktadır. Bu çalışmalar, HK-2 hücrelerine veya Sprague-Dawley [SD] sıçanlarına kontrast madde maruziyeti kullanan hücre veya hayvan modellerini ve kontrast madde ile ABH klinik çalışmalarını içermektedir (Tablo 4.9). Kontrast madde maruziyetinin neden olduğu ekspresyon değişikliklerine sahip miRNA'lar, Şekil 3'te gösterilmiştir (Liu ve ark., 2022).

SD sıçanlarda ve HK-2 hücrelerinde yeni izotonik kontrast ajanı iyodiksanol kullanılarak CI-AKI indüksiyonu üzerine yapılan model çalışmasında, miR-188 ekspresyonunun sıçan hücrelerinde ve serumunda önemli ölçüde arttığı bulundu. SRSF7 geninin ekspresyonunu inhibe ederek hücrelerin apoptozunu geciktirmiş ve Kİ-ABH'ye yol açmıştır (Liu ve ark., 2019).

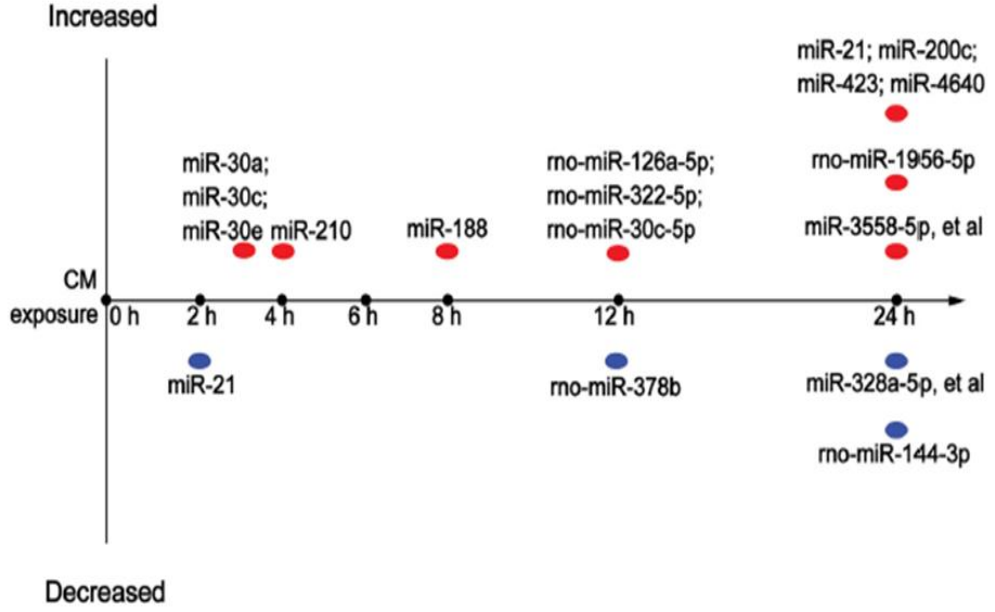
Kİ-ABH sıçanların böbrek dokularında, miR-328a-5p, miR-31a-5p ve miR-377 dahil olmak üzere 22 tip önemli ölçüde azalmış ifade ve miR-3558-5p, miR-34c-3p ve miR-384-5p dahil 19 tip önemli ölçüde upregüle edilmiş ifade olduğu belirlendi. Bunlar ayrıca miR-1949 ve miR-3558 gibi diferansiyel ifadelere sahip yeni miRNA'ları da içeriyordu. Bu miRNA'lar, metabolik anormallikler, apoptoz, endoplazmik retikulum stresi ve inflamasyon dahil olmak üzere ilgili sinyal yollarında yer alan düzenlenmiş genleri hedeflemektedir (Liu ve ark., 2019).

Bir hayvan çalışmasında, bir Kİ-ABH modeli oluşturmak için omnipaque [iohexol] SD sıçanlara intramüsküler olarak enjekte edildi. Sıçan serumu ve böbrek dokularındaki miRNA'ların ekspresyon profilleri, miRNA mikroarray analizi ile belirlendi. Omnipaque sıçanlara maruz bırakıldıktan 8 saat sonra miR-188, miR-30a ve miR-30e'yi içeren miRNA'ların serum ve böbrek dokularında önemli ölçüde arttığı bulundu. Real-time kantitatif PCR sonuçları, bu aday miRNA'ların konsantrasyonunun, göreceli böbrek dokusu özgüllüğü ile kontrast madde maruziyetinden yaklaşık 4 saat sonra zirveye ulaştığını göstermiştir (Liu ve ark., 2016).

miR-30e ailesi üyeleri, hücre farklılaşması, hücre yaşlanma ve apoptoz ile ilişkili, tümörlerin ve diğer bozuklukların patogeneğinde rol oynayan beş alt tip içerir. Çalışmalar, plazma miR-30e ailesi üyelerinin önemli ölçüde arttığını ve Kİ-ABH'nın erken teşhisinde böbrek hasarının geleneksel serum belirteçlerinden daha iyi bir değere sahip olabileceğini bulmuştur (Gutierrez-Escolano ve ark., 2015, Liu ve ark., 2016).

Tablo 4.9. Kİ-ABH için tanısal veya terapötik biyobelirteçler olarak ümit verici mikroRNA'lar (Liu ve ark., 2022)

MicroRNA	Reagent	Related gene	Detection (Serum and/or tissue)	Measurement results	Detection time	Functions and Limitations
miR-21	Iopromide (Ultravist)	PDCD4	HK-2 cell model	Decreased	2 h	miR-21 protected renal cells against CM-induced apoptosis by regulating PDCD4 expression, might serve as target therapy for CI-AKI.
miR-328a-5p, et al. miR-3558-5p, et al. miR-1949 miR-3558, et al.	Iopromide (Ultravist)	Targeted genes involving metabolic dysfunction, apoptosis, inflammation and ERS	SD rat model, kidney tissues	Decreased (22 kinds); Increased (19 kinds) New miRNA	24 h	Potential serve as novel biological markers and new molecular targets for CI-AKI.
mo-miR-126a-5p; rno-miR-322-5p; rno-miR-30c-5p; rno-miR-378b	Iopromide	Gstm1, Gpmb, Ephx1, Arnt, Cstb, Cndp1, Ppp1r1b, Ppp1r1a, Gng7, Irf2bp1	SD rat model plasma	Increased Decreased	12 h	miRNA-mRNA regulatory network
miR-188	Iodixanol	SRSF7	SD rat model serum; HK-2 cell model	Increased	24 h	miR-188 aggravated contrast-induced apoptosis by regulating SRSF7
mo-miR-144-3p rno-miR-1956-5p	Iohexol	novel_circ_0094153Gpmb, NAGLU, LNC_0 0343, KCP	SD rat model, serum;	Decreased Increased	24 h	non-coding RNA-associated ceRNA networks may profoundly affect the diagnosis and therapy of CI-AKI.
miR-30a; miR-30c; miR-30e	Iohexol		SD rat model, plasma and kidney tissues; Patients, plasma	Increased	3 to 48 h	Might serve as early biomarkers and (α) target candidates for CNI.
miR-188; miR-30a; miR-30e	Iohexol (Omnipaque)		SD rat model, serum and kidney tissues; Patients, plasma	Increased	8 h 4 to 6 h	Potential biomarkers for early detection of CI-AKI
miR-21; miR-200c; miR-423; miR-4640	Sodium diatrizoate		Patients, urine	Increased	24 h	These extracellular miRNAs as sensitive indicators of kidney damage
miR-210	Contrast medium		Patients, plasma	Increased	4-6 h	Potential biomarker to early detect CI-AKI.



Şekil 2.3. Kontrast ortamının [CM] miRNA'ların ifade seviyeleri üzerindeki etkilerine ilişkin mevcut çalışmaları özeti. Kontrast maddenin maruz kalma süresi değiştikçe, bazı spesifik miRNA'ların ifadesi farklı zaman noktalarında yukarı veya aşağı doğru düzenlenmiştir (Liu ve ark., 2022)

5. GEREÇ VE YÖNTEMLER

5.1.MATERYAL

“Akut Böbrek Hasarında Serum miRNA Ekspresyon Profiline Araştırılması” konulu tez çalışmamızın etik kurul onayı Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan 01.07.2020 tarihinde alınmıştır. Bu tez çalışması Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri [BAP] Birimi tarafından 2021-069 no lu proje ile desteklenmiştir. Tez çalışmasının moleküler çalışmaları Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kanseri Moleküler Biyolojisi laboratuvarında ve Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

5.1.1. Kimyasallar ve Kitler

Tablo 5.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Kimyasallar	Markaları
Penicillin/Streptomycin (100X)	Capricorn
2X qPCR SYBR-Green MM, w/o ROX	A.B.T.
Hybrid-R miRNA mini kit	Geneall
MTT Cell Proliferation Assay Kit	ABP Bio
Trypsin-EDTA(0.25%) in HBSS(1x) w/Phenol Red	Capricorn
DMEM High Glucose (4.5 g/l), with L-Glutamine	Capricorn
Dimethyl sulfoxide 99.5%	SIGMA
cDNA Synthesis Kit with Rnase inh.	A.B.T.
Fetal Bovine Serum	Capricorn
Custom Design Array	Macrogen

5.1.2. Plastik Malzemeler

- Serolojik pipet 25 ml
- Serolojik pipet 10 ml
- Cryotüp 2 ml
- T25 flask
- Falkon tüp (15 ml ve 50 ml]
- 20µl' lik disposable filtreli pipet ucu
- 200 µl' lik disposable filtreli pipet uçları
- 96-well PCR plate

5.1.3.Kullanılan Araç ve Gereçler

Tablo 5.2. Çalışmamızda Kullanılan Araç ve Gereçler

Cihaz	Model/Marka
-80°C Derin Dondurucu	Nüve
İnkübatör	Nuaire
Inverted Mikroskop	Nikon TS100
Nanodrop 2000	Thermo

5.2.Yöntem

5.2.1 Hücre Kültürü

HEK293T insan embriyonik böbrek hücreleri ısı ile inaktive edilmiş %10 Fetal Bovine Serum (FBS, Capricorn], %1 penisilin/streptomisin [10000U/ml penisilin, 10

mg/ml streptomisin, Capricorn] ve %1 L-glutamin içeren Dulbecco's modified Eagle's medium [DMEM-low glucose, Capricorn] besiyeri içinde 37°C sıcaklık, %95 nem ve %5 CO₂ koşullarını sağlayan inkübatörde kültüre edildi.

5.2.1.1. Hücrelerin Dondurulması

HEK-293 hücreleri için %10 dimetilsülfoksit [DMSO, Sigma] içeren DMEM besiyeri hazırlandı. Hücreler dondurma işlemi için 15 ml'lik falkona alındı ve ardından 125xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra falkon içerisine %10 DMSO içeren DMEM besiyeri eklendi. Yavaşça pipetaj yapılarak homojenize edilip cryo tüplere aktarıldı. Dondurulan hücreler -80°C'de muhafaza edildi.

5.2.1.2. Hücrelerin Çözülmesi

-80°C'den alınan cryo tüpler çözüldü. Çözünen hücreler sonra 15 ml'lik falkona alınarak üzerine 5 ml besiyeri eklendi. Sonrasında 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı ve kalan pellet üzerine besiyeri eklenip hücreler homojenize hale getirildi. Hücreler T25 flasklara alınarak kültüre edildi.

5.2.2. MTT Analizi

Uygulanacak olan kontrast maddenin [ioheksol (OPAXOL; 350 mg/mL)] HEK293T üzerine hücre canlılığı, proliferasyonu ve sitotoksitesinin değerlendirilmesi için ABP Bio marka ticari kit kullanıldı. Bu amaçla; kültüre edilen hücreler tripan blue ile boyanarak TOMA lamında sayım yapıldı. Bir kuyucukta 5000 hücre olacak şekilde 96 well plate'e ekim yapıldı. Ekimden 24 saat sonra hücrelere 3 tekrarlı olacak şekilde 0 mg/mL, 10 mg/mL, 25mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml ve 200 mg/ml dozlarında opak madde uygulandı. Madde verdikten sonra 2 saat, 24 saat, 48 saat ve 72 saat olacak şekilde doz uygulanması planlandı. Doz uygulanacak süreler takip edilerek aşağıdaki MTT protokolü uygulandı

İki saat, 24 saat, 48 saat ve 72 saat süreyle doza (0,10, 25, 50, 100, 200 mg/mL) maruz bırakıldıktan sonra hücrelere 10 ul MTT Reagent (Component A) ekledi.

37°C’de 4 saat inkübasyona bırakıldı. Sonrasında 100 mikrolitre Detergent Reagent (Component B) eklenerek karanlıkta overnight bekletildi ve ertesi gün 570 nm de absorbans ölçümü gerçekleştirildi.

5.2.3.MikroRNA izolasyonu

Hücreler 6 well plate’lere ekim yapıldı. Opak madde verilmeyen kontrol HEK293T hücreleri ve IC50 dozu verilen HEK293T hücreleri %0,25 Tripsin EDTA ile toplandı, santrifüj edildi ve Trizol ile muamele edilerek RNA izolasyonu öncesi -80 derecede saklandı. Hücrelerden RNA izolasyonu GeneAll Hybrid-R miRNA izolasyon kiti kullanılarak gerçekleştirildi. İzole edilen mikroRNA’ların saflığı ve konsantrasyonu nanodrop cihazında ölçülüp, A260/230 ve A260/280 oranlarına bakılarak değerlendirildi ve RNA örnekleri -20°C’de saklandı.

5.2.4. MikroRNA MikroDizinleme

Hücrelerden miRNA mikrodizinleme aşaması MACROGEN firmasında gerçekleştirildi. Bu çalışmada mikrodizin analizi, OPAXOL ile muamele edilmiş HEK293T hücrelerinden izole edilen total RNA örneklerinden Affymetrix GeneChip miRNA dizisi teknolojisi sürüm 4.0 (Thermo Fisher Scientific, Santa Clara, CA, ABD) platformu kullanılarak gerçekleştirildi. Microarray chipleri, 2578 olgun insan miRNA, 2025 pre-miRNA için prob setleri içermektedir. miRNA’ları içeren total RNA (1 mikrogram) örnekleri, FlashTag™ Biotin HSR RNA Etiketleme kiti (Affymetrix, Genisphere, Hatfield, PA, ABD) kullanılarak biyotin ile işaretlendi ve daha sonra GeneChip Hybridization Oven 640 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) kullanılarak 48 °C’de gece boyunca hibridizasyon işlemine tabi tutuldu. Bir seri yıkama işleminden sonra chipler GeneChip Fluidics Station 450’de (Affymetrix, Santa Clara, CA, ABD) boyandı. Sonrasında, GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix, Santa Clara, CA, ABD) programı kullanılarak chipler tarandı ve sinyaller, Affymetrix® GeneChip Command Console® Yazılımı (Affymetrix by Thermo Fisher Scientific) kullanılarak değerlendirildi. Her hibridizasyonun yoğunluk değerleri (varlık/yokluk değerleri) ve

sinyal histogramları kalite kontrolünden geçirildi. OPAXOL ile muamele edilen hücreler ve kontrol örnekleri arasında diferansiyel olarak ifade edilen miRNA'ları belirlemek için, elde edilen veriler Affymetrix Power Tools ve R 3.3.3 programları kullanılarak analiz edildi. Ekspresyon farklılıkları istatistiksel olarak anlamlı olan miRNA'lar, potansiyel miRNA adayları olarak belirlendi.

5.2.5. Gen-Ontoloji Analizi

DIANA tools veritabanı kullanılarak ifade değişimi saptanan miRNA'lara ilişkin gen ontoloji analizleri gerçekleştirildi.

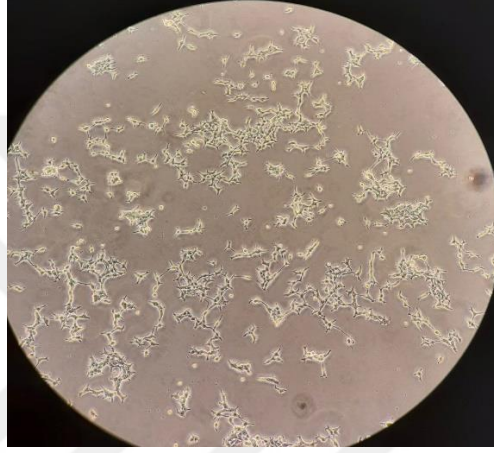
5.2.6. miRNA cDNA dönüşümü ve hedef genlerin ekspresyon analizi

Total RNA örnekleri A.B.T miRNA cDNA sentez kiti kullanılarak cDNA'ya çevrildi. cDNA'ya dönüştürülen örnekler SYBR green master miksi kullanılarak BioRAD CFX-96 cihazında analiz edildi. Başlangıçta cDNA örnekleri 1/5 oranında dilüe edildi, ardından 2 ul cDNA örneği 10 ul SYBR green master mix, miRNA primeri ve universal reverse primer kullanılarak toplamda 20 ul hacimde reaksiyon kuruldu. SNORD snRNA internal kontrol olarak kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık açısından reaksiyonlar her örnek için 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

6. BULGULAR

6.1. Hücre Kültürü

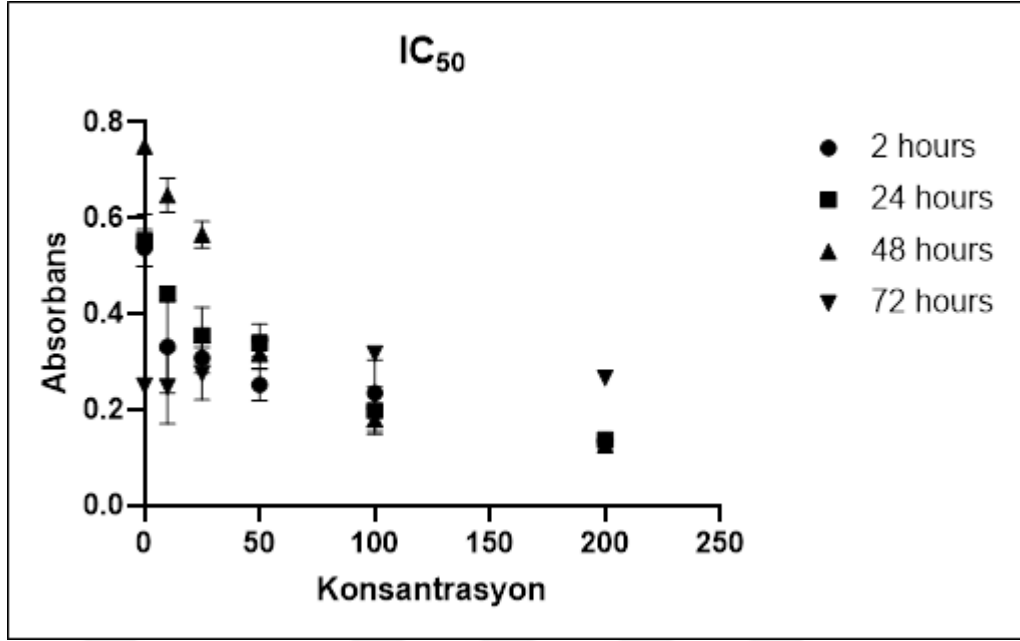
Çalışmamızda kullanılan HEK-293T hücrelerinin kültüre edilmesi sonucunda 4x büyütmedeki mikroskobik görüntüsü Resim 4.1’de verilmiştir.



Resim 6.1. HEK293T hücrelerinin 4x büyütmedeki mikroskobik görüntüsü

6.2.MTT Analizi

ABP Bio marka ticari kit protokolüne göre gerçekleştirilen MTT analizi sonucunda 570 nm de ölçülen absorbans değerleri kullanılarak Graphpad prism programında IC50 hesaplamaları gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlara göre 24 saat için IC50 değeri 58,5 mg/mL olarak hesaplandı (Grafik 6.1)



Grafik 6.1. MTT Analizi sonucu gerçekleştirilen IC₅₀ grafiği.

6.3. miRNA mikrodizinleme analizi ile miRNA'ların ifade değişimlerinin saptanması

Affymetrix miRNA4.0 verileri kullanılarak 4 örnek arasında 5 karşılaştırma ile ifade profillerinin karşılaştırılması gerçekleştirildi.

6.3.1. Örnek Tanımı

Toplam 4 örnek analiz edildi (Tablo 6.1). Tablodaki T1 ve T2 ioheksol ile muamele edilmiş HEK293T hücrelerini, C1 ve C2 ise kontrol hücrelerini ifade etmektedir.

Tablo 6.1. Analiz edilen örnek bilgileri

	Sample ID	Sample Group	Cel Files
1	HEK293T_C1	C1	221202_01_HEK293T_C1_(miRNA-4_0).CEL
2	HEK293T_C2	C2	221202_02_HEK293T_C2_(miRNA-4_0).CEL
3	HEK293T_T1	T1	221202_03_HEK293T_T1_(miRNA-4_0).CEL
4	HEK293T_T3	T2	221202_04_HEK293T_T3_(miRNA-4_0).CEL

6.3.2. Analiz Tasarımı

Hücrelere ait veriler 5 şekilde karşılaştırılarak miRNA ifade değişimleri belirlendi (Tablo 6.2)

Tablo 6.2. Karşılaştırılan örneklerin bilgileri

	Test vs. Control	Statistical Method
1	T1 vs. C1	Fold Change
2	T2 vs. C2	Fold Change
3	T1 vs. C2	Fold Change
4	T2 vs. C1	Fold Change
5	T1_T2 vs. C1_C2	Fold Change, Independent T-test

6.3.3. Deneysel Metodlar

Mikrodizininleme çalışmasında uygulanan çalışma planı Şekil 6.1.'de özetlenmektedir.



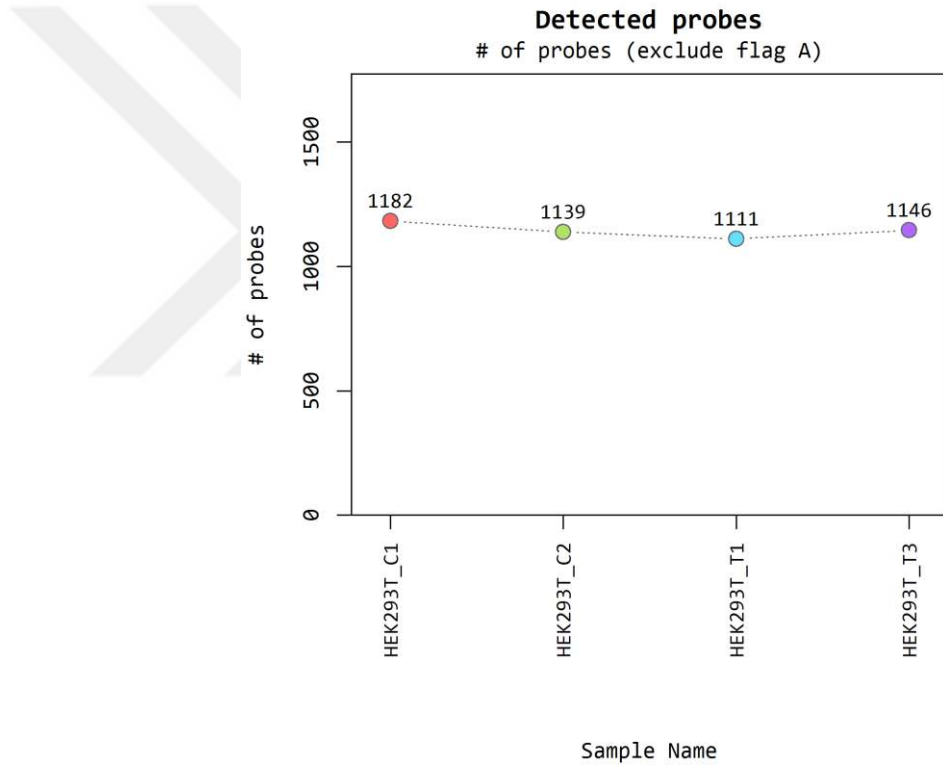
Şekil 6.1. Analizde uygulanan çalışma planı

6.3.4. Veri Kalitesi Kontrolü

Mikrodizinleme analizinde ilk olarak dizinlemesi gerçekleştirilen örneklerle ait kalite kontrol analizleri gerçekleştirilmiştir.

6.3.4.1. Her Numune için Kalite Kontrol

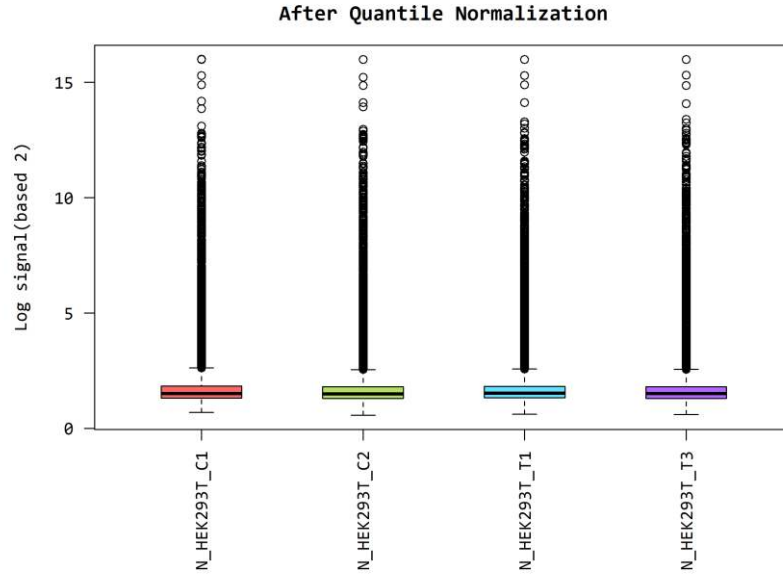
Grafik 6.2’de her örnekte belirlenen miRNA prob sayısı çizgi grafiği ile gösterilmiştir.



Grafik 6.2. Her numune için oluşturulan çizgi grafiği

6.3.4.2. Kutu Grafiği

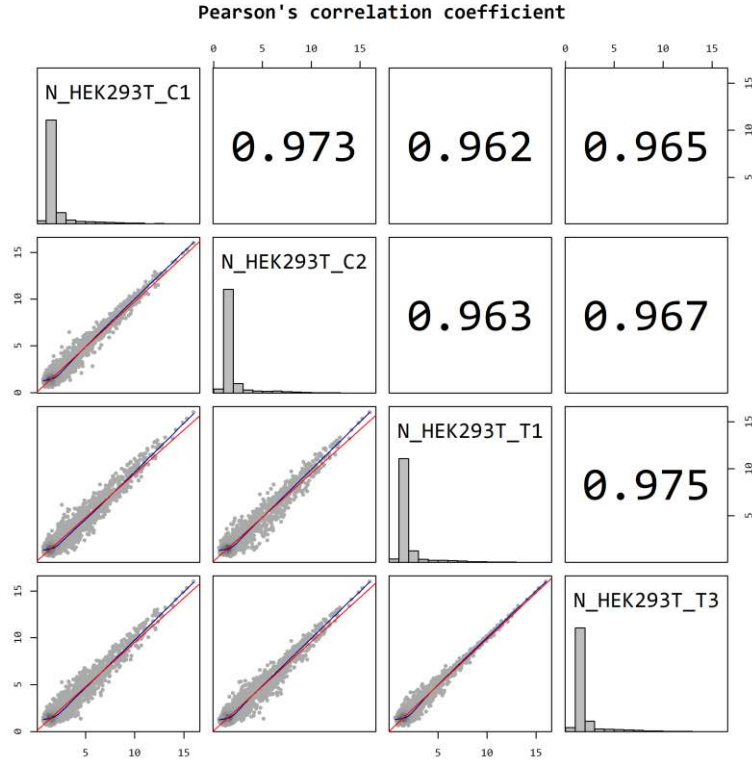
Grafik 6.3’teki kutu grafikleri, normalleştirilmiş sinyalin yüzdelik dilimine (medyan, yüzde 50, yüzde 75, maksimum ve minimum) dayalı olarak örnek ifadenin dağılımını göstermektedir.



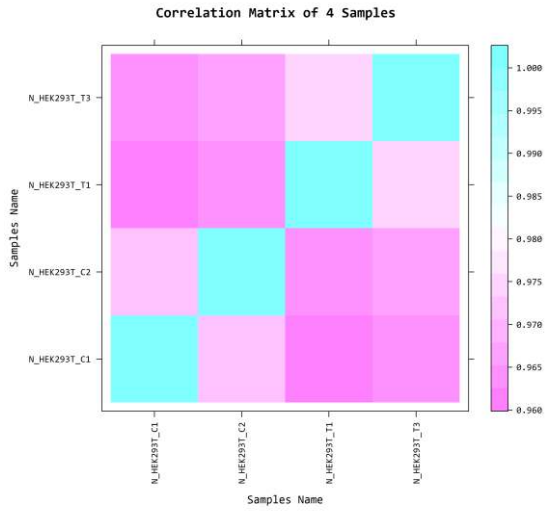
Grafik 6.3. Kutu grafikleri

6.3.4.3. Numuneler Arasında Tekrarlanabilirlik

Örnekler arasındaki benzerlik, Pearson katsayısı kullanılarak saptanmıştır (Grafik 6.4.). $-1 \leq r \leq 1$ aralığında, değer 1'e ne kadar yakınsa, örnekler o kadar benzer kabul edilir.



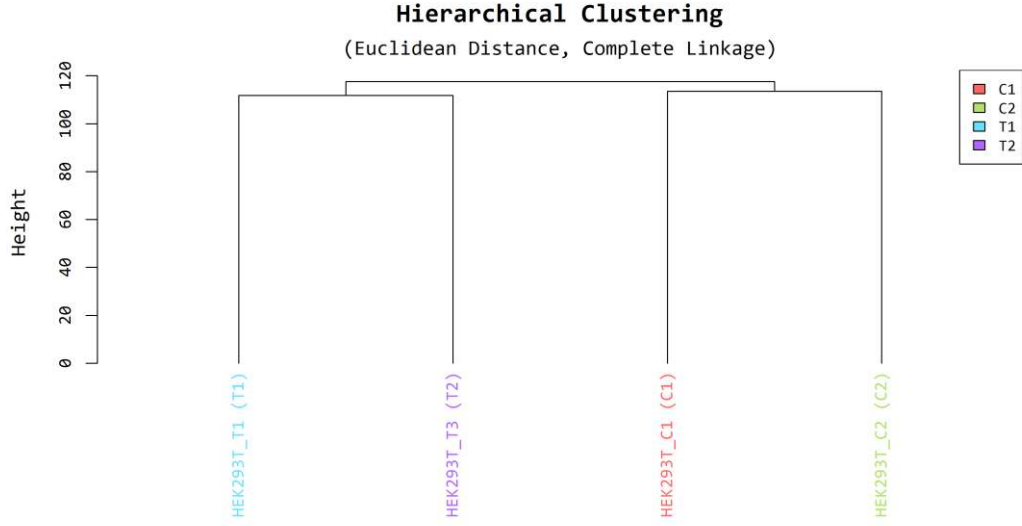
Grafik 6.4. Pearson' s Korelasyon Katsayısı



Grafik 6.5. Örneğin Korelasyon Matriksi

6.3.4.4. Hiyerarşik Kümeleme

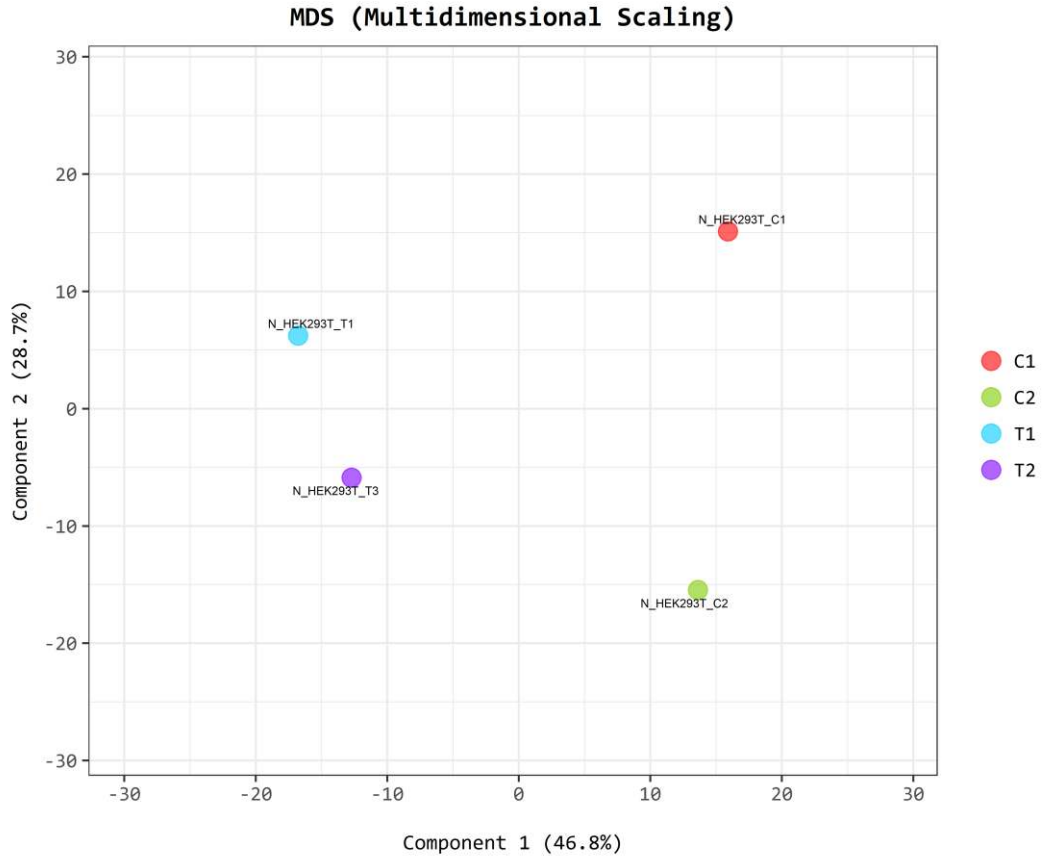
Hiyerarşik kümeleme, normalize edilmiş değerin z-skorunu kullanan yüksek ifade benzerliklerine sahip birkaç grupta örnekleri kümelemektedir [Mesafe metriği = Öklid Mesafesi, Bağlantı yöntemi = Tam Bağlantı] (Grafik 6.6.).



Grafik 6.6. Hiyerarşik Kümeleme

6.3.4.5.Çok Boyutlu Ölçeklendirme [MDS] grafiği

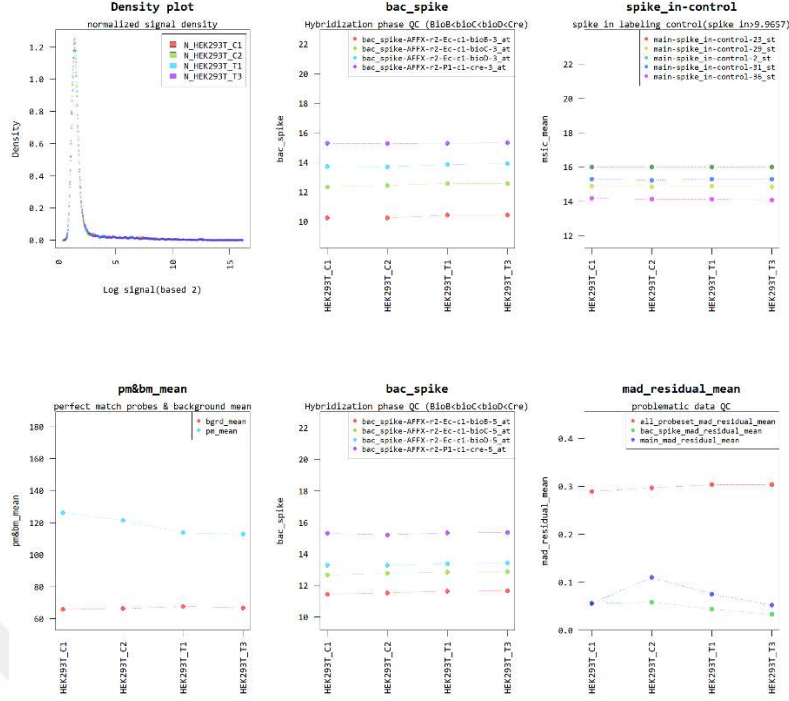
Her numunenin normalize edilmiş değerinden işlenen numuneler arasındaki benzerlik, toplam verilerin değişkenliğini gösteren 2 boyutlu bir grafikte gösterilmektedir (Grafik 6.7). Bu, herhangi bir aykırı örneğin veya örnek grupları arasındaki benzer ifade modellerinin tanımlanmasına izin verir.



Grafik 6.7. MDS Grafiği

6.3.4.6. Yoğunluk grafiği ve kalite kontrol matriks hattı grafiği

Grafik 6.8' deki yoğunluk grafiği, normalize edilmiş değerden yapılan karşılık gelen örnek ifadenin dağılımını göstermektedir. Kontrol problemlerinin çizgi grafikleri, mikrodizin deneylerinde problem olup olmadığını göstermektedir. (örn. deneysel sapmalar veya Numune Kalitesinden kaynaklanan hatalar).



Grafik 6.8. Yoğunluk grafiği ve QC matrisi hattı grafiği

6.4. Veri Analizi

6.4.1. Veri Akışı

6.4.1.1. Orjinal Ham Veriler

CEL dosyası: Yoğunluk [CEL] Veri dosyaları, Affymetrix® GeneChip Command Console® Yazılımı [AGCC] tarafından oluşturulmuştur. CEL dosyası, yoğunluk hesaplamalarının sonuçlarını DAT dosyasının piksel değerleri üzerinde saklar. Bu veriler, ilgilenilen gerçek verileri çıkarmak için Affymetrix PowerTools yazılımı tarafından kullanılır.

6.4.1.2. Veri Ön İşleme ve Kalite Kontrolü: Normalleştirilmiş Yoğunluk Çıkarma → Filtreleme

- Normalleşme; Normalize edilmiş değer, Affymetrix® Elektrikli El Aletlerinde [APT] RMA+DABG (Tüm Organizmalar) algoritması tarafından çıkarılır. Prob Analizi [CHP] Verileri: 4 CHP dosyası. Prob

analizi verilerini içeren bu dosyalar, Affymetrix® Elektrikli El Aletleri [APT] tarafından oluşturulan ikili formattaki dosyalardır. Normalleştirilmiş Veri (./data1-raw.data.xlsx) : 36.249 araştırma, 4 örnekten oluşmaktadır.

- Prob seti kalite kontrolü: Bir prob setinin ifade edilmiş olarak kabul edilip edilmediğini tanımlayan p değeri, Affymetrix® PowerTools (APT) DABG (Detected Above BackGround) yöntemiyle hesaplanır.
- Filtreleme : Organizma Homo sapiens olarak seçilerek filtrelenir. İşlenen veri (./data2.xlsx) : 6.609 prob, 4 örnek şeklindedir.

6.4.1.3. İstatistiksel Test

İohexol ile muamele edilmiş hücrelerin kontrol hücrelerine kıyaslanmasında Fold Change ve Bağımsız T-testi uygulandı. Tablo 6.3’ de her bir gruba ait karşılaştırmada anlamlılık saptanan prob sayıları verilmiştir.

Tablo 6.3. İstatistiksel Analizde Karşılaştırmalar

	Result File	# of Significant probes
1	data3.xlsx	337
2	data3_T1_T2_vs_C1_C2.xlsx	29
3	data3_T1_vs_C1.xlsx	190
4	data3_T1_vs_C2.xlsx	165
5	data3_T2_vs_C1.xlsx	174
6	data3_T2_vs_C2.xlsx	140

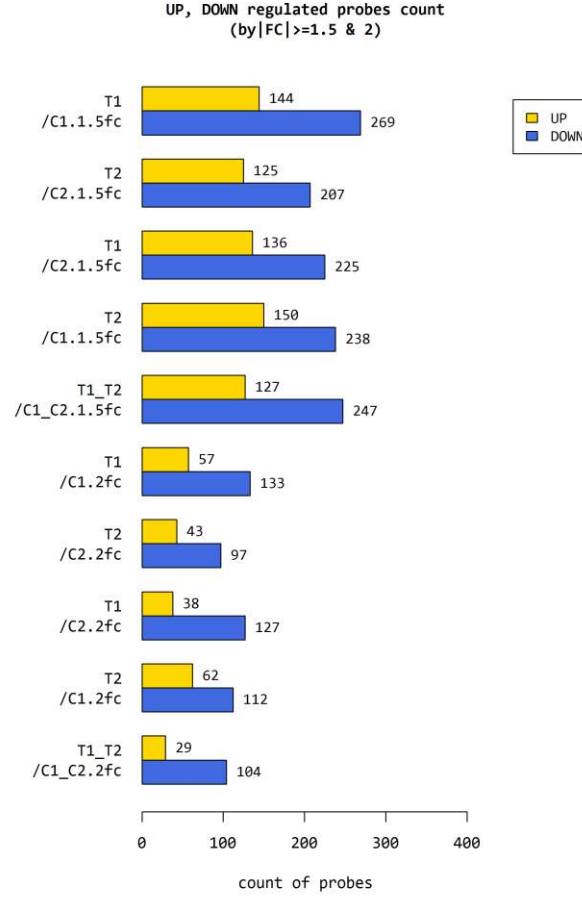
6.4.1.4. Kümeleme Analizi

Tam bağlantı ve Öklid mesafesi kullanılarak Hiyerarşik küme analizi yapıldı.

6.5.Sonuçlar

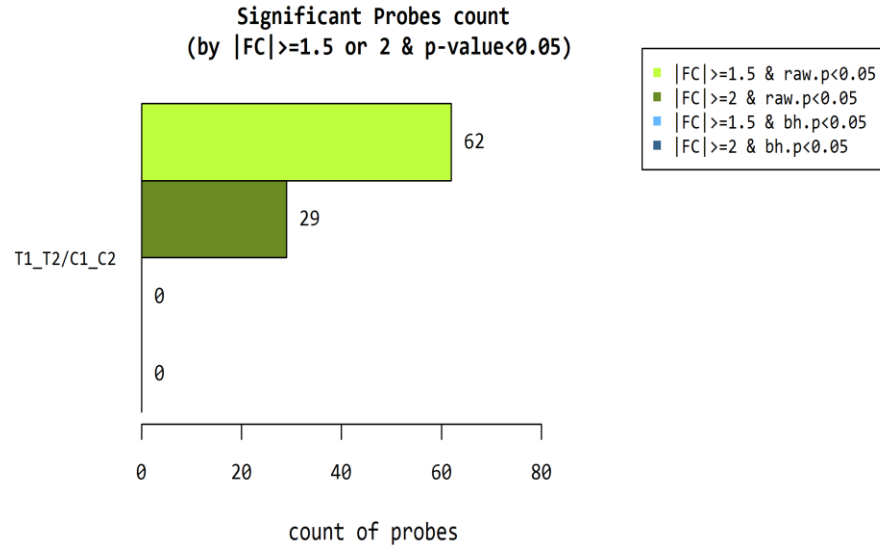
- İohexol ile muamele eden hücrelerdeki miRNA ekspresyon değişimlerinin analizi

Mikrodizin analizi sonucunda kontrol örneklerine kıyasla en az 1,5 kat ve üzeri değişim saptanan iohexol ile muamele edilmiş HEK293T hücrelerinde upregüle ve downregüle miRNA prob seti sayısı Grafik 6.9.' da gösterilmektedir.



Grafik 6.9. İohexol ile muamele edilmiş hücrelerde upregüle ve downregüle prob sayısı

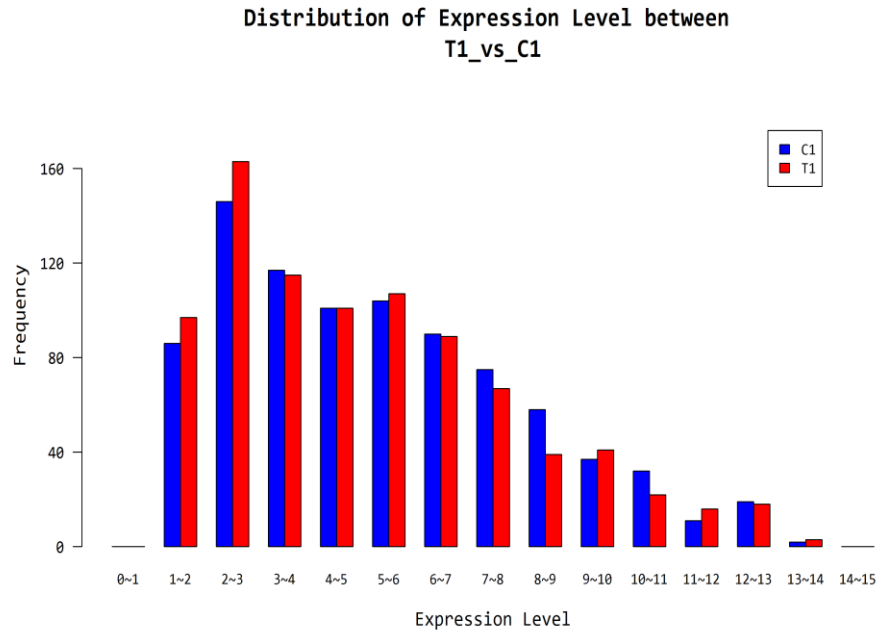
Grafik 6.10.'da istatistiksel olarak anlamlı kabul edilen ($p < 0.05$) prob sayıları verilmiştir.



Grafik 6.10. Fold change ve karşılaştırılan çiftin p-değerine bağlı olarak up ve downregüle prob setlerinin sayısı

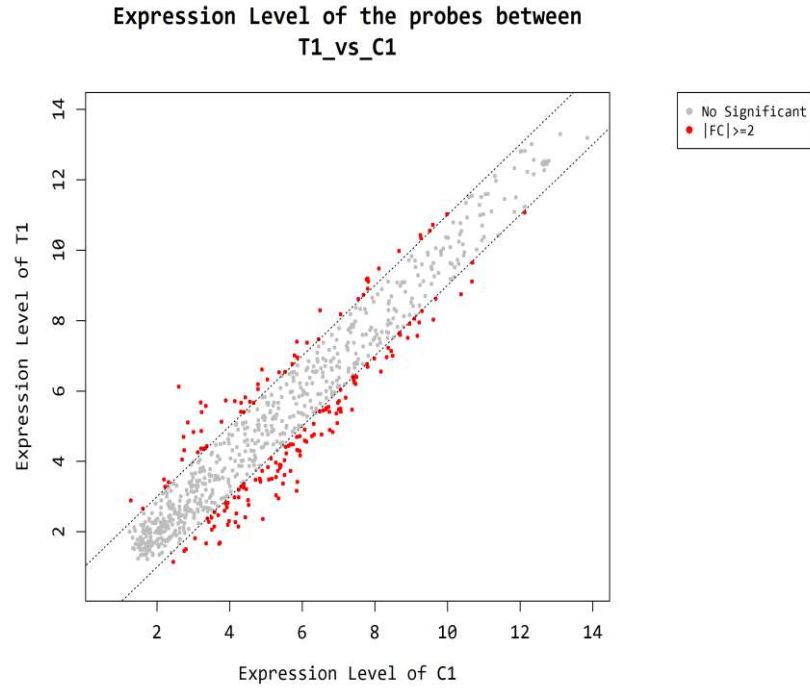
- **Ekspresyon grafiği;**

Iohexol ile muamele edilen HEK293T hücrelerinin kontrol hücreleri ile karşılaştırılmasına ilişkin dağılım grafi Grafik 6.11’de verilmiştir.



Grafik 6.11. Iohexol ile muamele edilmiş HEK293T hücreleri ile kontrol hücreleri arasında ekspresyon düzeyinin dağılımı

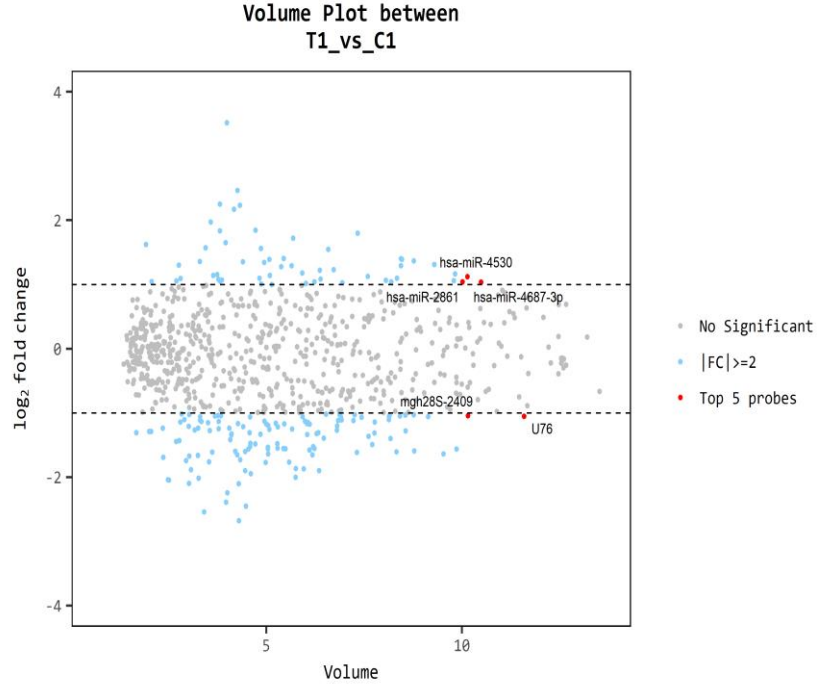
Iohecol ile muamele edilen HEK293T hücrelerinin kontrol hücreleri ile karşılaştırılması sonucu problemlerin ekspresyon grafiği Grafik 6.12’de verilmiştir.



Grafik 6.12. Iohecol ile muamele edilmiş HEK293T hücreleri ile kontrol hücrelerinde saptanan problemler arasındaki ekspresyon seviyeleri. (Kontrol olarak X eksenini ve test olarak Y eksenini, her numune grubundaki normalleştirilmiş değerin ortalamasıdır)

- **Hacim grafiği;**

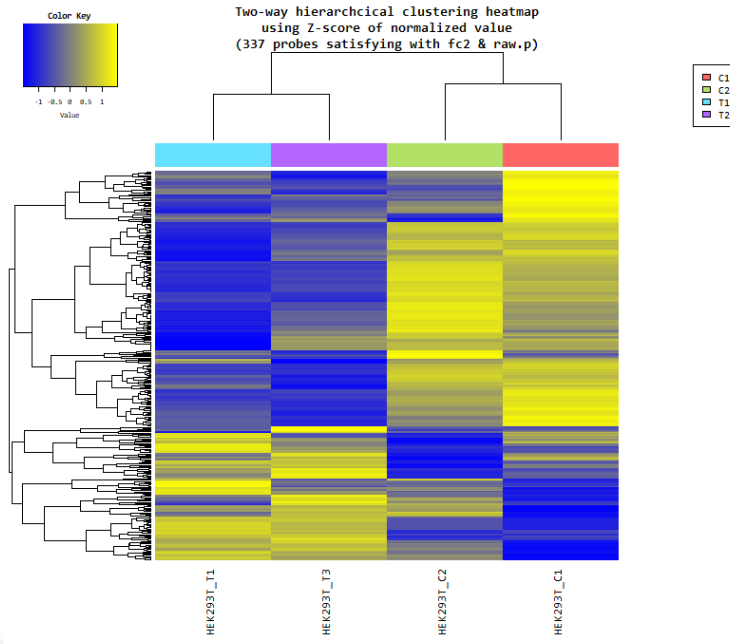
İfade hacmi, iki grubun ifade seviyesinin geometrik ortalaması olarak tanımlanmaktadır. (hacim = $\sqrt{\text{Kontrol Normalleştirilmiş değeri} * \text{Test Normalleştirilmiş değeri}}$). Kontrole kıyasla daha yüksek ekspresyon farkı gösteren prob setlerini doğrulamak için hacim grafiği çizildi. (X eksenini: Hacim, Y eksenini: log2 Kat Değişimi) (Grafik 6.13).



Grafik 6.13. Iohexol ile muamele edilmiş HEK293T hücreleri ile kontrol hücreleri arasında hacim grafiği

- **Küme Analizi : Hiyerarşik Kümeleme için HeatMap Analizi;**

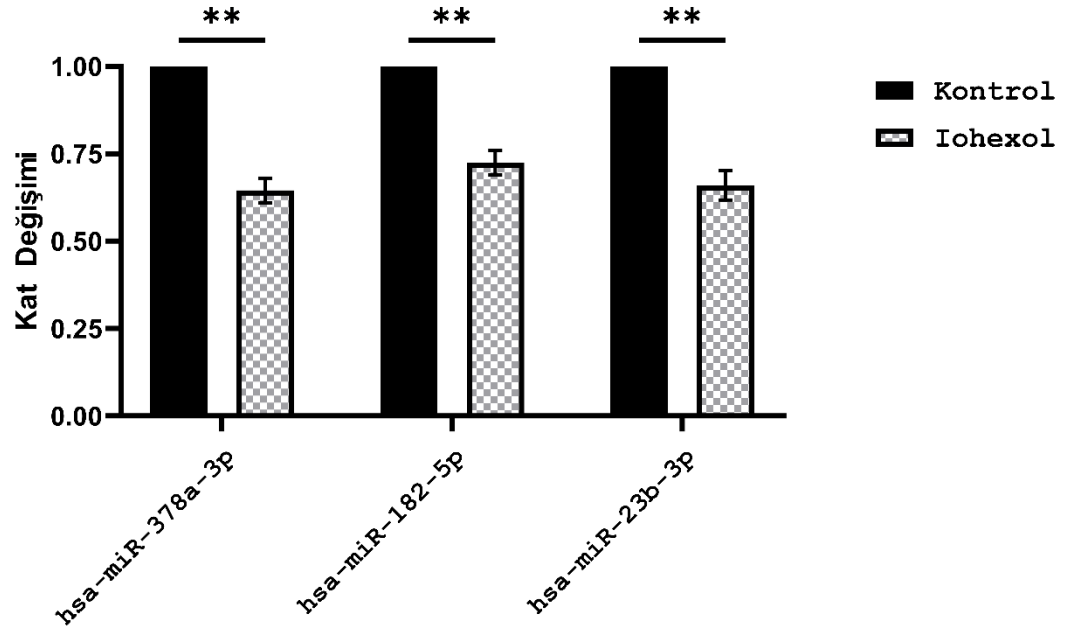
Prob setlerinin benzerliği ve örneklerin ekspresyon düzeylerini kümeleyen hiyerarşik kümeleme analizi Grafik 6.14’de gösterilmiştir.



Grafik 6.14. HeatMap Analizi

6.6.İfade değişimi saptanan miRNA'lar

Çalışmamızda mikrodizaynleme analizi sonucunda ifade değişimi saptanan miRNA' lar Tablo 6.5' de gösterilmektedir. Analiz sonucunda anlamlı değişim saptanmış 3 miRNA real-time PCR yöntemi ile valide edilmiştir (Grafik 6.15). Üçlü tekrar edilen örneklerden two-way ANOVA ve paired t-test yöntemleri kullanılarak istatistiksel analizler gerçekleştirilmiş olup, sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (** $p < 0.01$).



Grafik 6.15. Real Time PCR Analiz Sonuçları

Tablo 6.5. Iohexol ile muamele edilen HEK293T hücrelerinde ifade değişimi saptanan miRNA'lar

Downregüle olan miRNA'lar	Değişim katsayısı	Upregüle olan miRNA'lar	Değişim katsayısı
hsa-miR-424-3p	4,038697	hsa-miR-6847-5p	3,322202
hsa-miR-182-5p	3,754745	hsa-miR-6068	2,909719
hsa-miR-221-3p	3,662935	hsa-miR-1202	2,473545
hsa-miR-4521	3,322364	hsa-miR-6723-5p	2,269296
hsa-miR-505-5p	3,133652	hsa-miR-3147	2,198318
hsa-miR-330-3p	3,111219	hsa-mir-6800	2,140830
hsa-miR-3180	2,838994		
hsa-miR-151a-5p	2,812231		
hsa-miR-181b-5p	2,808033		
hsa-miR-107	2,790483		
hsa-miR-378i	2,747549		
hsa-miR-23b-3p	2,589727		
hsa-miR-103a-3p	2,475998		
hsa-miR-625-5p	2,256130		
hsa-miR-23a-3p	2,163849		
hsa-miR-378c	2,151041		
hsa-miR-378a-3p	2,092982		
hsa-miR-425-5p	2,051587		
hsa-miR-191-5p	2,038644		
hsa-miR-17-5p	2,033028		

7.TARTIŞMA

Kontrast maddeye bağlı nefrotoksisite, radyografik kontrast maddenin intravasküler uygulanmasından sonra gelişen en önemli komplikasyonlardan biri olup hastane kaynaklı ABH'nın en yaygın nedenlerinden biridir. Kİ-ABH insidansı yaş, önceden var olan böbrek hastalığı, diyabetik nefropati, nefrotoksik ilaçların eşzamanlı kullanımı, dehidratasyon, hemodinamik instabilite, anemi ve azalmış renal perfüzyonun diğer nedenleri ile artar (Mehran ve ark., 2019, Rihal ve ark., 2002, Lang, 1995). CIN'in patofizyolojisi henüz tam olarak aydınlatılmamıştır; ancak medüller iskemi, reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve doğrudan tübüler hücre toksisitesi patolojide kritik bir rol oynayabilir (Geenen ve ark., 2013). Bu, iskemi-reperfüzyon mekanizmasını hedefleyen ve serbest radikal oluşumlarını baskılayan müdahalelerin CIN insidansını azalttığına gösterilmesiyle daha da güçlenmektedir (Pranata ve ark., 2020, Pranata ve ark., 2020). Olgun miRNA'lar, mRNA'ları bağlayarak ve onları parçalayarak transkripsiyon sonrası düzenleyiciler olarak işlev gören tek sarmallı RNA'lardır. miRNA'lar hem akut hem de kronik böbrek hasarlanmalarında yukarı veya aşağı doğru düzenlenebilir (Ichii & Horino, 2018). Sun ve ark. miRNA'daki değişikliğin, kontrast madde maruziyetinden 4-6 saat sonra, serum kreatinin veya sistatin C'deki değişiklikten daha önce ortaya çıktığını ve CIN için erken biyobelirteç olarak hizmet edebileceğini gösteren bir çalışma yapmıştır (Sun ve ark., 2016).

miRNA-182-5p; miR-96, miR-182 ve miR-183'ü içeren miR-183 ailesinin bir üyesidir. Bu miRNA'lar, insan kromozomu 7q32.2'de bulunan tek bir genetik lokustan koordineli olarak eksprese edilir. miR-182-5p, çeşitli hastalıkların gelişimi ile yakından ilişkilidir (Yao ve ark., 2016). miR-182'nin böbrek hastalıklarında aktif olarak yer aldığı bildirilmiştir. Önceki araştırmalar, bir *invivo* ortamda, TCF7L2/Wnt/ β -katenin yolunu düzenleyerek miR-182 inhibitörünün iskemi/reperfüzyon kaynaklı böbrek hasarı ve apoptoz üzerindeki etkisini bulmuştur (Li ve ark., 2018).

miR-182-5p'nin doğrulanmış hedef genleri, böbreğin rejenerasyon süreçlerinin yanı sıra hücre ölümü ve onarımının dengelenmesi için apoptoz, hücre döngüsü, T hücresi farklılaşması, çoğalması ve göç yollarında yer almaktadır (Oberbauer ve ark., 1999, Schwarz ve ar., 2001). miR-182-5p, IL2 ve STAT5 tarafından aktive edilebilir

ve FOXO1 ifadesini inhibe eder (Stittrich ve ark., 2010). FOXO1, hücre sağkalımı, apoptoz, proliferasyon ve metabolizma dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlerin ana hücresel düzenleyicisi olarak görev yapar ve ayrıca T hücreleri, B hücreleri ve nötrofiller dahil olmak üzere bağışıklık sistemi hücrelerinin homeostazında kritik bir rol oynar (Peng, 2008). Ayrıca, FOXO1'in yokluğunun FOXP3+ düzenleyici T-hücrelerinin (Treg'ler) gelişimini ciddi şekilde azalttığı gösterilmiştir. Yine de gelişen bu Treg'lerin in vivo olarak işlevsel olmadığı ve FOXO1'in T-hücrelerinde down regülasyonunun lenfosit infiltrasyonu ile sonuçlandığı bulundu (Kerdiles ve ark., 2010). Ayrıca, BCL2, miR-182-5p'nin doğrudan bir hedefidir ve miR-182-5p'nin inhibisyonu, BCL2'nin daha yüksek bir protein ekspresyonu ile sonuçlanarak güçlü anti apoptotik etkilere işaret etmektedir (Peng ve ark., 2013, Yan ve ark., 2012).

Lee ve arkadaşları, iskemiye karşı doğal bir tolerans modelinde, miR-182-5p'nin derinden baskılandığını ve böylece oksijen/glikoz yoksunluğunun indüklediği hücre ölümüne karşı koruyucu etkilerle sonuçlandığını göstermiştir (Lee ve ark., 2012). Ayrıca, miR-182-5p, anti-apoptotik proteinler Bcl II'nin ve p21 gibi hücre döngüsü düzenleyici sikline bağımlı kinaz inhibitörlerinin ekspresyonunu azaltmakta ve böylece hücre rejenerasyonunu inhibe etmektedir (Peng ve ark., 2013). miR-182-5p'nin ektopik aşırı ekspresyonu, epitel hücrelerinde apoptozu ve hücre- döngü durdurucuyu indüklemektedir (Rihani ve ark., 2015) ve DNA onarımında bir gen ağını hedeflemektedir (Kabacık ve ark., 2015, Krishnan ve ark., 2013). Bu veriler in vivo miR-182-5p'nin in vivo olarak böbrek parankima sağkalımını düzenlediğini ve miR-182-5p ekspresyonunun insanlarda ve hayvan modellerinde reverse böbrek fonksiyonu ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Kontrast madde maruziyeti sonrası ABH mekanizmalarından biriside iskemi olduğundan çalışmamızda miR-182-5p down regüle olarak saptandı.

Böbrekte hipoksi/reperfüzyon (H/R) kaynaklı hasarlanma ve ferroptozu düzenleyen miRNA'ların taranmasıyla oluşturulan miRNA profilinde miR-182-5p ve miR-378a-3p'nin H/R kaynaklı ve erastin kaynaklı hücrelerde anormal şekilde eksprese edildiği saptanmıştır (Ding ve ark., 2020). İn vivo çalışmalar, miR-182-5p ve miR-378a-3p'nin I/R grubundaki böbrek dokularının çekirdek bölgesinde arttığını gösterdi, bu da I/R hasarlanmasında ferroptoz sürecinde gen ekspresyonunu düzenleyebileceklerini göstermiştir. MiR 378a-3p, I/R kaynaklı böbrek hasarı olan hastaların idrarında (Zou ve ark., 2017) ve sıçanların böbreğinde önemli ölçüde

artmıştır (Ding ve ark., 2020). Bununla birlikte, miR-182-5p'nin inhibisyonu sıçanlarda iskemik kaynaklı akut böbrek hasarını iyileştirdiği (Wilflingseder ve ark., 2017) ve lupus nefritinin zayıflamasına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Wang ve ark., 2018). Çalışmamızda miR-182-5p yanında miR-378a-3p düzeylerinin de kontrast madde maruziyeti sonrasında anlamlı downregüle olduğu saptandı.

İlaça bağlı akut böbrek hasarı hem klinik pratikte hem de ilaç gelişiminde önemli bir sorundur. Nefrotoksik ilaçların etki ettikleri nefron segmentlerine göre eksprese olan miRNA'lar değişmektedir. Chorley ve ark. ilaca bağlı böbrek hasarı ve nefron içindeki spesifik etkilerini inceleyen bir çalışmada sıçanlardan alınan idrarda miRNA 221-3p ve -222-3p'nin henlenin çıkan kalın koluna etki eden toksik ilaçlarla proksimal tübül toksik maddelere göre daha fazla arttığını bulmuştur (Chorley ve ark., 2021) Bu sonuçlar aynı zamanda miRs-221-3p, 222-3p ve -210-3p'nin önceki bir sıçan miRNA vücut atlası çalışmasında kortekse kıyasla böbrek medullasında daha bol olduğu gözlemiyle de uyumludur (Smith ve ark., 2016) Kontrast madde kullanımına bağlı ABH patogenezinde böbrek medullasında meydana gelen iskemik değişiklikler ön plandadır. Çalışmamızda bunu destekler tarzda miRs-221-3p ekspresyonunda değişiklik saptandı.

Berillo ve ark. KBH'li hipertansif hastalarda let-7g-5p ve miR-191-5p'nin dolaşımda down regüle olduğunu saptamıştır. let-7g-5p ve büyük damar sertleşmesi; miR-191-5p ve MetS; ve dolaşımdaki her iki miRNA'nın GFH ve enflamatuar belirteçler ile arasında ilişkiler gösterilmiştir. Stepwise çoklu lineer regresyon modellemesi, dolaşımdaki let-7g-5p ve miR-191-5p ve albüminürinin GFH'nın bağımsız belirleyicileri olduğunu ve dolayısıyla hipertansif hastalarda KBH'nin potansiyel biyobelirteçleri olduğunu ve patofizyolojik ve terapötik öneme sahip olabileceğini göstermiştir (Berillo ve ark., 2020). miR-191-5p ve GFH'nın ilişkisi böbrek hasarlanmasında aktif rol aldığının göstergesidir. Çalışmamızda miR-191-5p kontrast nefropati gelişen HEK293 hücrelerinde downregüle olarak saptandı.

Ge ve ark. sepsise bağlı ABH hastalarda hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-4456, hsa-miR-142-5p ve hsa-miR-22-3p ifade düzeylerinin sağlıklı gönüllülerle karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşük olduğunu saptamıştır (Ge ve ark., 2017). Qin ve ark. miR-191-5p'nin işlevlerini septik fare modellerinde araştırmış ve miR-191-5p mimik enjeksiyonunun böbrek hasarı skorlarını gözlemlenebilir şekilde

önleyebileceğini bulmuştur. Bu arada, enflamatuvar sitokinlerin ve apoptotik proteinlerin seviyelerinin her ikisi de, miR-191-5p mimik etkisi altında önemli ölçüde down regülasyon göstermiştir. Bu veriler, septik farelerin böbreklerinde miR-191-5p'nin koruyucu bir rolü olduğunu öne sürmektedir (Qin ve ark., 2019). Kontrast nefropatide bir diğer mekanizma inflamasyon olarak kabul edilmekte ve çalışmamızda bunu destekler tarda miR-23a-3p ve miR-191-5p ekspresyonunun downregle olduğu saptandı.

Araştırmalar, miR-17-5p ekspresyonunun hipoksi ile tedavi edilmiş vasküler düz kas hücrelerinde (Hao ve ark., 2017), pulmoner arteriyel hipertansiyonu olan hastalardan alınan akciğer dokularında (Lu ve ark., 2016), I/R ile yaralanmış kalplerde (Du ve ark., 2014) ve böbreklerde (Kaucsár ve ark., 2013, Hao ve ark., 2017) önemli ölçüde upregüle olarak düzenlendiğini göstermiştir. Ma ve ark. miR 17-5p agomir tarafından miR-17-5p'nin aşırı ekspresyonu böbrek fonksiyonunu iyileştirip ve HK-2 hücrelerinin hayatta kalmasını artırırken, miR-17-5p antagomir tarafından miR-17-5p'nin inhibisyonu yaralanmayı şiddetlendirdiğini göstermiştir. Bu sonuçlar, miR-17-5p'nin reno-koruyucu etkisini doğrulamaktadır. Ek olarak, otofaji ve apoptozun, böbrek I/R hasarında ve hipoksi uygulanan kültürlenmiş HK-2 hücrelerinde önemli ölçüde indüklendiğini ve miR-17-5p'nin aşırı ekspresyonunun, otofaji ve apoptozu baskılayarak koruyucu bir rol oynadığını bulmuşlar. Ayrıca bu çalışma, miR-17-5p'nin doğrudan PTEN ve BIM'i hedeflediğini ve PTEN ve BIM'in inhibisyonunun Akt/Beclin1 sinyalinin daha da etkinleştirdiğini ve bunun da otofaji seviyesini düşürdüğünü ve böbrek I/R hasarını azalttığını göstermektedir (Ma ve ark., 2021). Önceki çalışmalardan farklı olarak çalışmamızda miR-17-5p downregüle olarak saptandı.

miRNA, düzenleme gen ekspresyonu, hücre farklılaşması, proliferasyon, metabolizma ve apoptoz dahil olmak üzere farklı hücrelerin biyolojik fonksiyonlarının transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Gen fonksiyonunun incelenmesi için büyük önem taşıyabilir. miRNA ekspresyonundaki değişiklikler böbrek hücrelerinin proliferasyonunu, yaralanmasını ve onarımını etkiler ve ABH'nın oluşumu ve gelişimi ile önemli ölçüde ilişkilidir. Ayrıca, Kİ-ABH'da doku onarımı sırasında miRNA hayati önem taşır. miRNA, böbrek hastalıklarının erken teşhisinde bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Ek olarak, özellikle bir miRNA molekülünü hedef alan gen terapisi ABH için terapötik bir hedef olabilir. ABH gelişme riski taşıyan

hastaları tespit edebildiği ve önleme stratejilerinde uygulanabildiği için bu, klinik uygulamada önemli bir etkiye sahip olabilir. Şimdiye kadar, başka hiçbir biyobelirteç böyle bir avantaja sahip değildi. miRNA'ların işlevi, belirli antagonistler veya mimikler tarafından düzenlenebilir, bu da onları ABH dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisi için umut verici araçlar haline getirir. ABH' de çok sayıda miRNA molekülünün doku ve zaman özgüllüğü hakkında çeşitli çalışmalar rapor edilmiştir. Bu spesifik miRNA'lar sadece ABH için yeni etkili teşhis biyobelirteçleri haline gelmemiş, aynı zamanda potansiyel terapötik hedefler haline gelmiştir. Ancak, bu çalışmalarda tartışılan CI-ABH' nin yalnızca birkaç miRNA'sı bulunmakta, bu nedenle daha kapsamlı ve derinlemesine çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Literatüre bakıldığında kontrast maddenin maruziyet süresi ve miRNA ekspresyonları izlendiğinde spesifik miRNA'ların ifadeleri farklı zaman noktalarında yukarı veya aşağı doğru düzenlendiği görülmektedir. Çalışmamızda saptadığımız miRNA'lerden miR-182-5p, miR-221-3p, miR-151a-5p, miR-181b-5p, miR-23b-3p, miR-103a-3p, miR-23a-3p, miR-378a-3p, miR-191-5p, miR-17-5p Kİ-ABH için erken teşhis ve klinik müdahale için yeni seçenekler ve geliştirme yönleri sağlayabilir.

8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda Kİ-ABH'da miRNA ekspresyon profilinin oluşturulması için invitro hücre kültüründe HEK-293T hücrelerine kontrast madde verildi. 20 miRNA'nın downregüle ve 6 miRNA'nın upregüle olduğu saptandı. Literatüre bakıldığında kontrast nefropati çalışmalarında daha önce saptanmayan bu miRNA'lardan miR-182-5p, miR-221-3p, miR-151a-5p, miR-181b-5p, miR-23b-3p, miR-103a-3p, miR-23a-3p, miR-378a-3p, miR-191-5p, miR-17-5p nefrotoksinler, sepsis, I/R hasarı gibi farklı etyolojilere bağlı ABH modellerinde saptandığı görüldü. Bu miRNA'ları içeren prelinik ve klinik yeni çalışmalar yapılması birer erken biyobelirteç olmaları için önem arz etmektedir.

Özellikle riskli hastalarda tedavinin başarılı olması için Kİ-ABH'nın erken teşhisi çok önemlidir; ne yazık ki, tanı ve takipte yaygın olarak kullanılan serum kreatinin düzeyi hasarlanmanın geç evresinde yükselir. Dolaşımdaki miRNA'lar, yararlı olabilecek kararlı biyobelirteçlerdir; ayrıca hastalığa özgü moleküler yolları düzenleyip yansıtarak patolojinin daha kesin bir şekilde ayırt edilmesini sağlarlar. miRNA'nın hücre fonksiyonlarının ve hastalığa özgü moleküler yolların düzenlenmesindeki kritik rolü, daha kesin bir moleküler ilaç hedeflemesine izin vermektedir. Literatüre bakıldığında kontrast maddenin maruziyet süresi ve miRNA ekspresyonları izlendiğinde spesifik miRNA'ların ifadeleri farklı zaman noktalarında yukarı veya aşağı doğru düzenlendiği görülmektedir. Çalışmamızda saptadığımız miRNA'ların sonraki çalışmalar için erken tanıda biyobelirteç ve tedavide birer hedef olabileceğini düşünülmektedir.

9. KAYNAKLAR

Amrouche L, Desbuissons G, Rabant M, Sauvaget V, Nguyen C, Benon A, Barre P, Rabaté C, Lebreton X, Gallazzini M, Legendre C, Terzi F, and Anglicheau D. (2017). MicroRNA 146a in Human and Experimental Ischemic AKI: CXCL8-Dependent Mechanism of Action. *J Am Soc Nephrol.* 28: 479–493.

Basu RK, Devarajan P, Wong H, Wheeler DS. (2011). An update and review of acute kidney injury in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med.* 12: 339-347.

Bellomo R, Kellum JA, Ronco C. (2012). Acute kidney injury. *Lancet.* 380:756–66.

Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P. (2004). Acute renal failure– definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Critical care.* 8(4):R204.

Berillo O, Huo KG, Fraulob-Aquino JC, Richer C, Briet M, Boutouyrie P, Lipman ML, Sinnett D, Paradis P, Schiffrin EL. (2020). Circulating let-7g-5p and miR-191-5p Are Independent Predictors of Chronic Kidney Disease in Hypertensive Patients. *Am J Hypertens.* 33(6):505-513. doi: 10.1093/ajh/hpaa031.

Berns A. Nephrotoxicity of contrast media. (1989). *Kidney Int.* 36(4):730–740. DOI: 10.1038/ki.1989.254.

Bhatt K, Mi QS, Dong Z.(2011) microRNAs in kidneys: biogenesis, regulation, and pathophysiological roles. *Am J Physiol Renal Physiol.* 300:F602–610.

Bhatt K, Zhou L, Mi QS, Huang S, She JX, and Dong Z. (2010). MicroRNA-34a is induced via p53 during cisplatin nephrotoxicity and contributes to cell survival. *Mol Med.* 16: 409–416.

Brandenburger T, Lorenzen JM. (2020). Diagnostic and Therapeutic Potential of microRNAs in Acute Kidney Injury. *Front Pharmacol.* 11:657.

Chorley BN, Ellinger-Ziegelbauer H, Tackett M, Simutis FJ, Harrill AH, McDuffie J, Atabakhsh E, Nassirpour R, Whiteley LO, Léonard JF, Carswell GK, Harpur E, Chen CL, Gautier JC. (2021). Urinary miRNA Biomarkers of Drug-Induced

Kidney Injury and Their Site Specificity Within the Nephron. *Toxicol Sci.* 180(1):1-16.

Ding C, Ding X, Zheng J, Wang B, Li Y, Xiang H, Dou M, Qiao Y, Tian P, Xue W. (2020). miR-182-5p and miR-378a-3p regulate ferroptosis in I/R-induced renal injury. *Cell Death Dis.* 11(10):929.

Do C. (2017). Intravenous contrast: friend or foe? a review on contrast-induced nephropathy. *Adv Chronic Kidney Dis.* 24(3):147–149. DOI:10.1053/j.ackd.2017.03.003.

Du J, Cao X, Zou L, Chen Y, Guo J, Chen Z, Hu S and Zheng Z. (2013). MicroRNA-21 and risk of severe acute kidney injury and poor outcomes after adult cardiac surgery. *PLoS One* 8: e63390.

Du W, Pan Z, Chen X, et al. (2014). By targeting Stat3 microRNA-17-5p promotes cardiomyocyte apoptosis in response to ischemia followed by reperfusion. *Cell Physiol Biochem.* 34:955-65.

Fan PC, Chen CC, Chen YC, Chang YS, Chu PH. (2016). MicroRNAs in acute kidney injury. *Hum Genomics.* 10(1):29.

Ge QM, Huang CM, Zhu XY, Bian F, Pan SM. (2017). Differentially expressed miRNAs in sepsis-induced acute kidney injury target oxidative stress and mitochondrial dysfunction pathways. *PLoS One.* 12(3):e0173292.

Geenen WF, Kingma HJ, van der Molen AJ. (2013). Contrast-induced nephropathy: pharmacology, pathophysiology and prevention. *Insights into Imaging.* 4 (6):811– 820.

Godwin JG, Ge X, Stephan K, Jurisch A, Tullius SG and Iacomini J. (2010). Identification of a microRNA signature of renal ischemia reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci.* 107: 14339-14344.

Gutierrez-Escolano A, Santacruz-Vazquez E, Gomez-Perez F. (2015). Dysregulated microRNAs involved in contrast-induced acute kidney injury in rat and human. *Ren Fail.* 37(9):1498–1506.

Hao MX, Wang X, Jiao KL. (2017). MicroRNA-17-5p mediates hypoxia-induced autophagy and inhibits apoptosis by targeting signal transducer and activator of transcription 3 in vascular smooth muscle cells. *Exp Ther Med.* 13:935-41.

Hsu CY, McCulloch CE, Fan D, Ordoñez JD, Chertow GM, Go AS. (2007). Community-based incidence of acute renal failure. *Kidney Int.* 72(2):208-12.

Jones TF, Bekele S, O'Dwyer MJ, Prowle JR. (2018). MicroRNAs in Acute Kidney Injury. *Nephron.* 140(2):124-128.

Kabacik S, Manning G, Raffy C, Bouffler S, Badie C. (2015) Time, dose and ataxia telangiectasia mutated (ATM) status dependency of coding and noncoding RNA expression after ionizing radiation exposure. *Radiat Res.* 183:325e337

Kanki M, Moriguchi A, Sasaki D, Mitori H, Yamada A, Unami A and Miyamae Y. (2014). Identification of urinary miRNA biomarkers for detecting cisplatin-induced proximal tubular injury in rats. *Toxicology* 324: 158-168.

Kaucsár T, Révész C, Godó M, Krenács T, Albert M, Szalay CI, Rosivall L, Benyó Z, Bátkai S, Thum T, et al. (2013). Activation of the miR-17 Family and miR-21 During murine kidney ischemia-reperfusion injury. *Nucleic Acid Ther.* 23: 344-354.

Kerdiles YM, Stone EL, Beisner DR, McGargill MA, Ch'en IL, et al. (2010). Foxo transcription factors control regulatory T cell development and function. *Immunity.* 33: 890–904

Kito N, Endo K, Ikesue M, Weng H, Iwai N. (2015). miRNA profiles of tubular cells: diagnosis of kidney injury. *Biomed Res Int.* 2015:465-479.

Krishnan K, Steptoe AL, Martin HC, Wani S, Nones K, Waddell N, Mariasegaram M, Simpson PT, Lakhani SR, Gabrielli B, Vlassov A, Cloonan N, Grimmond SM. (2013). MicroRNA-182-5p targets a network of genes involved in DNA repair. *RNA.* 19:230e242.

Lang D. Radiocontrast nephropathy: a paradigm for the synergism between toxic and hypoxic insults in the kidney. (1995). *Radiology.* 195(1):82–82. DOI: 10.1148/radiology.195.1.82.

Lee CG, Kim JG, Kim HJ, Kwon HK, Cho IJ, Choi DW, Lee WH, Kim WD, Hwang SJ, Choi S, and Kim SG. (2014). Discovery of an integrative network of microRNAs and transcriptomics changes for acute kidney injury. *Kidney Int.* 86: 943–953.

Lee P. Lim, Nelson C. Lau, Philip Garrett-Engele, Andrew Grimson, Janell M. Schelter, John Castle, David P. Bartel, Peter S. Linsley & Jason M. Johnson. (2005)

Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. NATURE|Vol 433|www. nature.com/nature 770.

Lee YJ, Johnson KR, Hallenbeck JM. (2012). Global protein conjugation by ubiquitin-like-modifiers during ischemic stress is regulated by microRNAs and confers robust tolerance to ischemia. PLoS One. 7: e47787

Levey AS, James MT. Acute Kidney Injury. (2017). Ann Intern Med.167(9).

Li H, Ma Y, Chen B, Shi J. (2018). miR-182 enhances acute kidney injury by promoting apoptosis involving the targeting and regulation of TCF7L2/Wnt/ β -catenins pathway. Eur J Pharmacol. 831:20–7.

Li YF, Jing Y, Hao J, Frankfort NC, Zhou X, Shen B, Liu X, Wang L and Li R. (2013). MicroRNA-21 in the pathogenesis of acute kidney injury. Protein Cell. 4: 813-819.

Liu B, Chai Y, Guo W, Lin K, Chen S, Liu J, Sun G, Chen G, Song F, He Y, Liang Y, Guo Z, Lei L, He L, Liu L, Tan N, Liu Y, Zhong S, Chen J. (2019). MicroRNA-188 aggravates contrast-induced apoptosis by targeting SRSF7 in novel isotonic contrast-induced acute kidney injury rat models and renal tubular epithelial cells. Ann Transl Med. 7(16):378.

Liu X, Chen X, Yu X, Tao Y, Bode AM, Dong Z, and Cao Y. (2013). Regulation of microRNAs by epigenetics and their interplay involved in cancer. J Exp Clin Cancer Res. 32: 96.

Liu X, Li Q, Sun L, Chen L, Li Y, Huang B, Liu Y, Jiang C. (2021). miR-30e-5p Regulates Autophagy and Apoptosis by Targeting Beclin1 Involved in Contrast-induced Acute Kidney Injury. Curr Med Chem. 28(38):7974-7984.

Liu X, Li Y, Zhu X, Jiang C. (2022)MicroRNA as an early diagnostic biomarker for contrast-induced acute kidney injury. Drug Chem Toxicol. 45(4):1552-1557.

Liu Y,Liu B, Liu Y, Chen S, Yang J, Liu J, Sun G, Bei WJ, Wang K, Chen Z, Tan N, Chen J. (2019). MicroRNA expression profile by next-generation sequencing in a novel rat model of contrast-induced acute kidney injury. Ann Transl Med.7(8):178.

Li Z, Deng X, Kang Z, Wang Y, Xia T, Ding N, and Yin Y. (2016). Elevation of miR-21, through targeting MKK3, may be involved in ischemia pretreatment protection from ischemia-reperfusion induced kidney injury. J Nephrol. 29: 27–36.

Liu Z, Wang, S, Mi QS, Dong, Z. (2016). MicroRNAs in pathogenesis of acute kidney injury. *Nephron*. 134:149–153.

Lu Z, Li S, Zhao S, et al. (2016). Upregulated miR-17 Regulates Hypoxia-Mediated Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Proliferation and Apoptosis by Targeting Mitofusin 2. *Med Sci Monit*. 22:3301-8.

Lorenzen JM, Kaucsar T, Schauerte C, Schmitt R, Rong S, Hübner A, Scherf K, Fiedler J, Martino F, Kumarswamy R, Kölling M, Sörensen I, Hinz H, Heineke J, van Rooij E, Haller H, and Thum T. (2014). MicroRNA-24 antagonism prevents renal ischemia reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol*. 25: 2717–2729.

Ma M, Fu L, Jia Z, Zhong Q, Huang Z, Wang X, Fan Y, Lin T, Turun Song T. (2021). miR-17-5p attenuates kidney ischemia-reperfusion injury by inhibiting the PTEN and BIM pathways. *Ann Transl Med*.9(20):1545.

Mahmut Çivilibal, Bağdagül Yavaş Aksu. (2015) Güncel Kılavuzlar Eşliğinde Akut Böbrek Hasarı Acute Kidney Injury and the Current Guidelines. DOI: 10.4274/haseki.2579.

McCullough P. (2008). Contrast-induced acute kidney injury. *J Am Coll Cardiol*. 51(15):1419–1428. DOI: 10.1016/j.jacc.2007.12.035.

Mehran R, Aymong E, Nikolsky E. (2005). A simple risk score for prediction of contrast-induced nephropathy after percutaneous coronary intervention. *ACC Curr J Rev*. 14(3):41. DOI: 10.1016/ j.accreview.2005.02.034.

Mehran R, Dangas G, Weisbord S. (2019). Contrast-associated acute kidney injury. *New England J Med*. 380(22):2146–2155. DOI: 10.1056/NEJMra1805256.

Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, et al. (2007). Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Critical care*. 11(2):R31.

Nash K, Hafeez A, Hou S. (2002). Hospital-acquired renal insufficiency. *Am J Kidney Dis*. 39(5):930–936. DOI: 10.1053/ajkd.2002.32766

Naoko Kito, Kosuke Endo, Masahiro Ikesue, Huachun Weng, and Naoharu Iwaimi.(2015) RNA Profiles of Tubular Cells: Diagnosis of Kidney Injury. *BioMed Research International*. Article ID 465479, 9 pages <http://dx.doi.org/10.1155/465479>.

Nikolsky E, Mehran R, Lasic Z, Mintz G, Lansky A, Na Y, et al. (2005). Low hematocrit predicts contrast-induced nephropathy after percutaneous coronary interventions. *Kidney Int* 67(2):706–713. DOI: 10.1111/j.1523-1755.2005.67131.x.

Oberbauer R, Rohrmoser M, Regele H, Muhlbacher F, Mayer G. (1999). Apoptosis of tubular epithelial cells in donor kidney biopsies predicts early renal allograft function. *J Am Soc Nephrol*. 10:2006e2013

Osamu Ichii, and Taro Horino. (2018). MicroRNAs associated with the development of kidney diseases in humans and animals. *J Toxicol Pathol*. 31: 23–34.

Peng SL. (2008). Foxo in the immune system. *Oncogene*. 27: 2337–2344.

Peng X, Li W, Yuan L, Mehta RG, Kopelovich L, et al. (2013). Inhibition of proliferation and induction of autophagy by atorvastatin in PC3 prostate cancer cells correlate with downregulation of Bcl2 and upregulation of miR-182 and p21. *PLoS One*. 8: e70442.

Pranata R, Tondas AE, Vania R, Toruan MPL, Lukito AA, Siswanto BB.(2020). Remote ischemic preconditioning reduces the incidence of contrast-induced nephropathy in patients undergoing coronary angiography/intervention: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Catheter Cardiovasc Interv*. 96(6):1200-1212.

Pranata R, Vania R, Alkatiri AA, Firman D, Lukito AA.(2020). Nicorandil reduces the incidence of contrast-induced nephropathy in patients undergoing coronary angiography/intervention – systematic review and meta- analysis of randomized controlled trials including GRADE qualification. *Cardiovasc Revasc Med*. 21(9):1121-1127.

Qin Y, Wang G, Zhiyong Peng Z. (2019). MicroRNA-191-5p diminished sepsis-induced acute kidney injury through targeting oxidative stress responsive 1 in rat models. *Biosci Rep*. 39(8):BSR20190548.

Rihal C, Textor S, Grill D, Berger P, Ting H, Best P, et al. (2002). Incidence and prognostic importance of acute renal failure after percutaneous coronary intervention. *Circulation*. 105(19):2259–2264. DOI: 10.1161/01.cir.0000016043.87291.33.

Rihani A, Van Goethem A, Ongenaert M, De Brouwer S, Volders PJ, Agarwal S, De Preter K, Mestdagh P, Shohet J, Speleman F, Vandesompele J, Van Maerken T.

(2015). Genome wide expression profiling of p53 regulated miRNAs in neuroblastoma. *Sci Rep.* 5:9027.

Saikumar J, Hoffmann D, Kim TM, Gonzalez VR, Zhang Q, Goering PL, Brown RP, Bijol V, Park PJ, Waikar SS and Vaidya VS. (2012). Expression, circulation, and excretion profile of MicroRNA-21, -155 and -18a following acute kidney injury. *Toxicol Sci* 2012;129: 256-267

Schwarz C, Regele H, Steininger R, Hansmann C, Mayer G, Oberbauer R. (2001). The contribution of adhesion molecule expression in donor kidney biopsies to early allograft dysfunction. *Transplantation*.71:1666e1670.

Shapiro MD, Bagley J, Latz J, Godwin JG, Ge X, Tullius SG and Iacomini J: MicroRNA expression data reveals a signature of kidney damage following ischemia reperfusion injury. *PLoS One* 6: e23011, 2011.

Smith A, Calley J, Mathur S, Qian HR, Wu H, Farmen M, Caiment F, Bushel PR, Li J, Fisher C, et al. The Rat microRNA body atlas; Evaluation of the microRNA content of rat organs through deep sequencing and characterization of pancreas enriched miRNAs as biomarkers of pancreatic toxicity in the rat and dog. *BMC Genomics* 2016;17, 694.

Stittrich AB, Haftmann C, Sgouroudis E, Kuhl AA, Hegazy AN, et al. The microRNA miR-182 is induced by IL-2 and promotes clonal expansion of activated helper T lymphocytes. *Nat Immunol* 2010;11: 1057–1062.

Sun S, Zhang T, Cai Z, et al. (2015). Circulating miRNA-30a,-30e,-188 as Early Biomarkers for CI-AKI diagnosis. *Circulation.* 132(Suppl 3):A12855.

Sun SQ, Zhang T, Ding D, Zhang WF, Wang XL, Sun Z, et al. (2016). Circulating MicroRNA-188, -30a, and -30e as Early Biomarkers for Contrast-Induced Acute Kidney Injury. *Journal of the American Heart Association.* 5 (8):e004138. <https://doi.org/10.1161/JAHA.116.004138> PMID: 27528406

Sun Y, Koo S, White N, Peralta E, Esau C, Dean NM, and Perera RJ. Development of a micro-array to detect human and mouse microRNAs and characterization of expression in human organs. *Nucleic Acids Res.* 32: e188. 2004.

Sushrut S. Waikar, Joseph V Bonventre. (2015) Acute Kidney Injury. In: Dennis L. Kasper, Stephen L. Hauser, J. Larry Jameson (Eds). Harrison's Principles of Internal Medicine, 19th Edition, New York: McGraw-Hill Education; 1799- 811.

Tian Z, Greene AS, Pietrusz JL, Matus IR, and Liang M. MicroRNA-target pairs in the rat kidney identified by microRNA microarray, proteomic, and bioinformatic analysis. *Genome Res.* 18: 404–411. 2008.

Uchino S, Bellomo R, Goldsmith D, Bates S, Ronco C. (2006). An assessment of the RIFLE criteria for acute renal failure in hospitalized patients. *Critical care medicine.* 34(7):1913-7.

Wang, X.; Wang, G.; Zhang, X.; Dou, Y.; Dong, Y.; Liu, D.; Xiao, J.; Zhao, Z. Inhibition of microRNA-182-5p contributes to attenuation of lupus nephritis via Foxo1 signaling. *Exp. Cell Res.* 2018, 373, 91–98.

Wei Q, Bhatt K, He HZ, Mi QS, Haase VH, Dong Z. (2010). Targeted deletion of Dicer from proximal tubules protects against renal ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol.* 21:756–761.

Wei Q, Mi QS, Dong Z. (2013). The regulation and function of microRNAs in kidney diseases. *IUBMB Life.* 65:602–614.

Wilflingseder J, Jelencsics K, Bergmeister H, Sunzenauer J, Regele H, Eskandary F, Reindl-Schwaighofer R, Kainz A, Oberbauer R. miR-182-5p inhibition ameliorates ischemic acute kidney injury. *Am. J. Pathol.* 2017;187:70–79.

Xu X, Kriegel AJ, Liu Y, Usa K, Mladinov D, Liu H, Fang Y, Ding X, and Liang M. Delayed ischemic preconditioning contributes to renal protection by upregulation of miR-21. *Kidney Int.* 2012;82: 1167–1175.

Yan D, Dong XD, Chen X, Yao S, Wang L, et al. Role of microRNA 182 in posterior uveal melanoma: regulation of tumor development through MITF, BCL2 and cyclin D2. *PLoS One* 2012;7: e40967.

Yao J, Xu C, Fang Z, Li Y, Liu H, Wang Y, et al. Androgen receptor regulated microRNA miR-182-5p promotes prostate cancer progression by targeting the ARDC3/ITGB4 pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;474(1):213–9.

Yinfeng Ma, Jun Fu, Le Qian, Tingting Tao. (2017) Serum miRNA expression and correlation with clinical characteristics in acute kidney injury. *Int J Clin Exp Pathol*.10(8):8721-8726.

Zou YF, Wen D, Zhao Q, Shen PY, Shi H, Zhao Q, Chen YX, Zhang W. Urinary MicroRNA-30c-5p and MicroRNA-192-5p as potential biomarkers of ischemia-reperfusion-induced kidney injury. *Exp. Biol. Med.* 2017;242: 657–667.

Zou YF, Zhang W. Role of microRNA in the detection, progression, and intervention of acute kidney injury. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2018 Jan;243(2):129-136.

Zuk A, Bonventre JV. (2016) Acute Kidney Injury. *Annu Rev.* 67:293-307.



T.C.
Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Etik Kurulu
Karar Formu

KARAR TARİH / NO	01/ 07 / 2020/ 20.478.486 /428						
ARAŞTIRMANIN ADI	Akut Böbrek Hasarında Serum miRNA Ekspresyon Profiline Araştırılması						
SORUMLU ARAŞTIRMACI	Doç.Dr.Nuray ALTINTAŞ - Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı						
ARAŞTIRMA EKİBİ	Dr.Öğretim Görevlisi Aysun TORAMAN						
ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	UZMANLIK TEZİ ☐		YÜKSEK LİSANS--DOKTORA TEZİ ☒		AKADEMİK AMAÇLI ☐		
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	10/ 06 / 2020 / Tarih ve 18019Sayılı; araştırma dosyası						
KARAR BİLGİLERİ	Araştırma dosyası incelenmiş, bilimsel ve etik açıdan UYGUN olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.						
Unvanı/Adı/Soyadı		Araştırma ile ilişkisi Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye	Unvanı /Adı /Soyadı		Araştırma ile ilişkisi Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye
Prof. Dr. Murat DEMET Psikiyatri AD			☐	Doç. Dr. Selhan ÖZBEY Spor Bilimleri Fakültesi		☐	☒
Prof. Dr. Özge YILMAZ Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD			☐	Dr. Öğr. Üyesi Selim ALTAN Tıp Tarihi ve Etik AD		☐	☐
Prof. Dr. Beyhan Cengiz ÖZYURT Halk Sağlığı AD			☐	Doç. Dr. Nurgül Güngör TAVŞANLI Sağlık Bilimleri Fakültesi Ebelik Bölümü		☐	☐
Prof. Dr. Pınar ÇELİK Göğüs Hastalıkları A.D.			☐	Mukadder YILMAZER Avukat		☐	☐
Prof. Dr. Ömer TETİK Kalp Damar Cerrahisi A.D.			☒	Sivil Üye Hüseyin TUNÇAY		☐	☐
Doç. Dr. Tuğba ÇAVUŞOĞLU Farmakoloji AD			☐	-----		☐	☐
Etik Kurulumuzun kararı yukarda belirtilmiştir. <u>Araştırmanız Her Hangi Bir Aşamada Etik Kurulumuzun “İzleme – Denetleme” Görevi Gereği Lüzumu Halinde Haberli / Habersiz Olarak Denetlenebilir.</u> Araştırma Başvuru Formunun Taahhütname – Bölüm E kısmında belirtilmiş olan hususların dikkate alınarak istenilen bilgilerin Etik Kurulumuza zamanında iletilmesi konusunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.							

Prof .Dr. Murat DEMET
BAŞKAN

T.C.
Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Etik Kurulu
Karar Formu

KARAR TARİH / NO	16/ 06 / 2021 / 20.478.486						
ARAŞTIRMANIN ADI	Akut Böbrek Hasarında aday miRNA Ekspresyon Profiline, Hücre Hattı Modellemesi Kullanılarak Araştırılması						
SORUMLU ARAŞTIRMACI	Doç.Dr.Nuray ALTINTAŞ - Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı						
ARAŞTIRMA EKİBİ	Dr.Öğretim Görevlisi Aysun TORAMAN						
ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	UZMANLIK TEZİ ☐		YÜKSEK LİSANS - DOKTORA TEZİ ☒		AKADEMİK AMAÇLI ☐		
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	09 / 06 / 2021 / Tarih ve 83137 Sayılı; dilekçe						
KARAR BİLGİLERİ	Çalışma başlığının değiştirilmesi ile ilgili dilekçeniz incelenmiş, bilimsel ve etik açıdan UYGUN olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.						
Unvanı/Adı/Soyadı		Araştırma İle İlişkisi Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye	Unvanı /Adı /Soyadı		Araştırma İle İlişkisi Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye
Prof. Dr. Murat DEMET Psikiyatri AD		☐	☐	Prof. Dr. Selhan ÖZBEY Spor Bilimleri Fakültesi		☐	☐
Prof. Dr. Özge YILMAZ Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD		☐	☐	Doç.Dr. Cemal GÜVERCİN Tıp Tarihi ve Etik AD		☐	☐
Prof. Dr. Beyhan Cengiz ÖZYURT Halk Sağlığı AD		☐	☒	Doç. Dr. Nurgül Güngör TAVŞANLI Sağlık Bilimleri Fakültesi Ebelik Bölümü		☐	☐
Prof. Dr. Pınar ÇELİK Göğüs Hastalıkları A.D.		☐	☐	Mukadder YILMAZER Avukat		☐	☐
Prof. Dr. Tuğba ÇAVUŞOĞLU Farmakoloji AD		☐	☐	Sivil Üye Hüseyin TUNÇAY		☐	☒
Prof. Dr. Serkan ERKAN Ortopedi AD.		☐	☒			☐	☐

Etik Kurulumuzun kararı yukarda belirtilmiştir. Araştırmanız Herhangi Bir Aşamada Etik Kurulumuzun "İzleme – Denetleme" Görevi Gereği Lüzumu Halinde Haberli / Habersiz Olarak Denetlenebilir. Araştırma Başvuru Formunun Taahhütname – Bölüm E kısmında belirtilmiş olan hususların dikkate alınarak istenilen bilgilerin Etik Kurulumuza zamanında iletilmesi konusunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof.Dr. Murat DEMET
BAŞKAN



T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



Sayı : 28233352-302.14.01-
Konu : Aysun TORAMAN Tez Konusu.

SBE TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

Enstitümüzün 22.11.2019 tarih ve 38/1 sayılı Yönetim Kurulu Toplantısında, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı 161369001 numaralı öğrencisi Aysun TORAMAN'ın tez konusunun, etik kurul onayı alınması kaydı ile "**Akut Böbrek Hasarında Serum miRNA Ekspresyon Profiline Araştırılması**" olarak belirlenmesine **OY BİRLİĞİ** ile karar verildi. Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Ömer TETİK
Enstitü Müdürü





T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

04.08.2023

Sayı : E-74547675-302.14.06-591921
Konu : Aysun TORAMAN'ın Tez Konusu
Değişikliği Hk.

SBE TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

Enstitümüz 03.08.2023 tarih ve 21/16 sayılı yönetim kurulu toplantısında, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Aysun TORAMAN'ın 22.11.2019 tarih ve 38/1 sayılı yönetim kurulu kararında belirlenen "Akut Böbrek Hasarında Serum miRNA Ekspresyon Profiline Araştırılması" tez başlığının değiştirilerek "Akut Böbrek Hasarında Aday miRNA Ekspresyon Profiline Hücre Hattı Modellemesi Kullanılarak Araştırılması" olarak belirlenmesine OY BİRLİĞİ ile karar verildi.

Gereğini ve bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Ömer TETİK
Enstitü Müdürü

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Doğrulama Kodu :BSFC3AD2V8 Pin Kodu :77352

Belge Takip Adresi : <https://turkiye.gov.tr/ebd?eK=4049&eD=BSFC3AD2V8&eS=591921>

Adres: Tıp Fakültesi Dekanlığı Zemin Kat Uncubozköy Kampüsü Manisa
Telefon: (0 236) 2360989 Faks: (0 236) 2382158
e-Posta: saglik.evrak@cbu.edu.tr Elektronik Ağ: saglikbe.cbu.edu.tr
Kep Adresi: celalbayaruniversitesi@hs01.kep.tr

Bilgi için: Çisem Tutan
Unvanı: Sürekli İşçi



T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu

Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Başkanlığı'na

Tez Adı: "Akut Böbrek Hasarında Aday miRNA Ekspresyon Profiline Hücresel Hattı Modellemesi Kullanılarak Araştırılması".

Tezime ilişkin 05/07/2023 tarihinde yapılan Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 22' dir.

Belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

05.07.2023

Adı Soyadı : Aysun TORAMAN
Öğrenci No : 161369001
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Programı : Doktora

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR.
(Prof.Dr.Nuray ALTINTAŞ)

Açıklamalar

1-Tez Çalışması Orijinallik Raporu (TÇOR), TURNITIN İntihal Tespit Programı kullanımı için kişisel hesap alma hakkı bulunan tez danışmanları, Enstitülerde görevlendirilen personeller, Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı'nda görevlendirilen kütüphaneciler tarafından alınır.

2-Sayfa sayısı 400'den az olan tezler için tez savunmasından önce ve başarılı olması durumunda düzeltmelerden sonra olmak üzere 2 kez TÇOR alınır.(400 sayfadan fazla olan tezler 400 ve katları şeklinde bölünerek Turnitin veri tabanına yüklenmesi gerekmektedir. Bu gibi durumlarda benzerlik oranının hesaplanmasına ilişkin detaylı forma, kütüphane web sayfasında bulunan Turnitin kullanım kılavuzlarının altından erişilebilir.)

3-TÇOR, tezin yalnızca Kapak Sayfası, Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan kısmının tek bir dosya olarak intihal tespit programına yüklenmesi ile alınır.

Programa yükleme yapılırken Dosya Başlığı (document title) olarak tez başlığının tamamı, Yazar Adı (author's first name) olarak öğrencinin adı, Yazar Soyadı (author's last name) olarak öğrencinin soyadı bilgisi yazılır.

4- TURNITIN İntihal tespit programına yüklenen dosyanın süreçlenmesinde, ilgili programdaki filtreleme seçenekleri aşağıdaki şekilde ayarlanır: - Kaynakça hariç, - Alıntılar hariç, - 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 5 words)

5-**İsteğe bağlı ayarlar kısmından; "Ödevleri şuraya gönder?" seçeneği mutlaka DEPO YOK şeklinde işaretlenmesi gerekmektedir;** aksi durumda aynı tezin ikinci kez yüklenmesi durumunda benzerlik %100 çıkacaktır ve depodan tezi silmek çok uzun süreç gerektirecektir.

6- Raporlama işlemi tamamlandıktan sonra, kaydedilmiş olan ekranın görüntüsünü sağ üst köşesinde yüzdelik sayı olarak belirtilen "benzerlik oranı," raporlamaya tabi tutulmuş olan dosyanın "toplam sayfa sayısı" ve raporlama işleminin yapıldığı "tarih" bilgisi, "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu" formuna işlenir.

7- **Benzerlik oranında tüm sorumluluk öğrenciye aittir.**

8-Tez savunma sınavı sonrasında başarılı bulunan öğrenci, tez savunma sınavı tarihi sonrasında tezde yapılmış muhtemel değişiklikleri içeren dosya kullanılarak alınmış ikinci bir intihal raporundaki bilgiler kullanılarak hazırlanmış ve tez danışmanı tarafından onaylanarak imzalanmış ikinci bir "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu"nu Enstitüye teslim etmekle yükümlüdür.

9-Turnitin Hakkında Bilgiler: <http://kutuphane.cbu.edu.tr/turnitin.9370.tr.html>

ÖZGEÇMİŞ

1. KİŞİSEL BİLGİLER

ADI, SOYADI: Aysun Toraman
AKADEMİK ÜNVANI: Doç. Dr. UZMANLIK ALANI: İç Hastalıkları / Nefroloji

2. EĞİTİM (Mezun olduğu üniversite ve sonrası)

YILI	DERECESİ	ÜNİVERSİTE	ÖĞRENİM ALANI
1998	Tıp Doktoru	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi	Tıp
2008	İç Hastalıkları Uzmanı	Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi	İç Hastalıkları
2012	Nefroloji uzmanı	Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi	Nefroloji
2023	Doktora	Manisa Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Tıbbi Biyoloji

3. GÖREVLER

GÖREV DÖNEMİ	ÜNVAN	GÖREV YERİ
1998-2002	Pratisyen hekim	Antalya 1 Nolu Sağlık Ocağı
2002-2008	Araştırma görevlisi	Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları ABD
2008-2012	Uzman Doktor	Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Nefroloji BD
2012-2014	Uzman Doktor	Hakkari Devlet Hastanesi
2014-2021	Dr. Öğr. Üyesi	Celal Bayar Üniversitesi Hafsa Sultan Hastanesi
2021-	Doç.Dr.	Celal Bayar Üniversitesi Hafsa Sultan Hastanesi

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	İyi	İyi

Yabancı Dil Sınav Notu		
YDS	ÜDS	YÖKDİL
63	75	93

