

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇAN RENAL İSKEMİ REPERFÜZYON MODELİNDE
HUMANİNİN ETKİSİ

Leyla ABUEİD

DOKTORA TEZİ

2024-ANTALYA

2024-ANTALYA

DOKTORA TEZİ

LEYLA ABUEİD

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇAN RENAL İSKEMİ REPERFÜZYON MODELİNDE
HUMANİNİN ETKİSİ

Leyla ABUEİD

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Filiz BASRALI

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2021-5549 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2024-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Fizyoloji Anabilim Dalı Fizyoloji Doktora Programında doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 19/02/2024

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Filiz BASRALI
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Nimet UYSAL
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Nazmi YARAŞ
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Berrak YEĞEN
Marmara Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Z. Melek BOR KÜÇÜKATAY
Pamukkale Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

ETİK 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 beyan ederim.

Leyla ABUEİD

İmza

Prof. Dr. Filiz BASRALI

İmza

TEŞEKKÜR

Öncelikle doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, tezimin şekillenmesinde ve yazılmasında büyük emeği olan, bana olan desteğini her zaman hissettiğim danışman hocam Prof. Dr. Filiz Basralı'ya,

Eğitimime olan katkılarından dolayı Akdeniz Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalının değerli Öğretim Üyelerine

Tüm doktora eğitimim boyunca bana her zaman destek olan ve tez çalışmamda büyük katkıları bulunan çalışma arkadaşlarım Erol Nizamoğlu ve Akın Büyükakar'a

Çalışma arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Nur ÖZEN, Arş. Gör. Dr. Osman Sinen, Ahmet Yıldırım, Sıdika Yüksel ve Havva Çetin'e

Tez çalışmama yaptıkları katkılar için Doç. Dr. Nuray Acar Aydemir ve Ezgi Golal'a

Başta Burhan Çakmaz olmak üzere Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünün tüm personeline en içten teşekkürlerimi sunarım.

Destekleri ve sevgileriyle her zaman yanımda olan, doktora eğitimim boyunca en az benim kadar emek harcayan sevgili annem Güldali İsmailoğlu, babam Ekrem İsmailoğlu, ablam Fatma Abueid ve biricik yeğenim Ada Kırıcılı'ya çok teşekkür ederim.

ÖZET

Amaç: İskemi/Reperfüzyon (İ/R) hasarı, olduğu dokuda inflamasyon, reaktif oksijen ürünlerinin artışı, mitokondriyal disfonksiyon ve apoptoza neden olan patolojik bir durumdur ve böbrekte olduğunda renal tübüler hücre ölümü ve akut böbrek hasarıyla sonuçlanabilir. Mitokondriyal türevli bir peptid olan humanin (HN)'nin oksidatif stresi azalttığı, antiapoptotik ve antiinflamatuvar etki gösterdiği bildirilmiştir. Bu tez çalışmasının amacı renal İ/R modelinde HN'nin İ/R hasarı üzerine olası etkilerinin ve bu etkilere aracılık eden mekanizmaların araştırılmasıdır.

Yöntem: Sprague-Dawley erkek sıçanlar rastgele 4 gruba ayrıldı: 1. Sham (yalancı cerrahi), 2. İ/R, 3. HN-Sham, 4. HN-İ/R. İ/R gruplarında 45 dakika renal iskemi oluşturuldu ve reperfüzyondan 10 dk önce 2 mg/kg HN analogu iv olarak uygulandı. 24 saatlik reperfüzyon sürecinde sıçanların idrarları toplandı ve ardından kan ve doku örnekleri de toplanarak deney sonlandırıldı. Böbrek fonksiyon testleri, böbrekte inflamasyon, oksidatif stres ve antioksidan sistem parametreleri ile mitokondriyal fonksiyonlar değerlendirildi. Böbrek doku hasarı ve apoptoz oranının değerlendirilmesinde histopatolojik yöntemler kullanıldı.

Bulgular: İ/R gruplarında kan üre azotu, serum kreatininin, idrar albumin düzeyleri ile sodyum ve potasyum atılımları yüksek; kreatin klirensi ise düşük bulundu ve HN tedavisinden etkilenmedi. İ/R grubunda böbrek dokusunda yüksek bulunan malondialdehit düzeyi ve miyeloperoksidaz aktivitesi HN tedavisiyle azaldı. Yine İ/R grubunda azalmış bulunan glutatyon düzeyi ve süperoksit dismutaz enzim aktivitesi de HN-İ/R grubunda önemli düzeyde artış gösterdi. Ayrıca mitokondriyal kompleks 1 aktivitesi ve ATP düzeyleri HN-İ/R grubunda İ/R grubuna göre yüksekti. İ/R grubunda artan apoptotik hücre yüzdesinin HN-İ/R grubunda önemli düzeyde azaldığı saptandı.

Sonuç: HN'nin renal İ/R hasarını, oksidatif stresi, inflamasyonu ve apoptozu azaltarak, antioksidan savunma sistemini ve mitokondriyal fonksiyonları koruyarak hafiflettiği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Humanin, renal iskemi reperfüzyon, oksidatif stres

ABSTRACT

Objective: Ischemia/reperfusion (I/R) injury causes acute tubular necrosis and renal failure, initiates mechanisms such as inflammation, formation of reactive oxygen species, apoptosis and mitochondrial dysfunction. A mitochondrial-derived peptide HN has been reported to reduce oxidative stress and mitochondrial dysfunction. It has been demonstrated that HN has antiapoptotic and anti-inflammatory effects. The aim of our study is to investigate the effects of HN on renal I/R damage.

Method: Sprague-Dawley male rats were divided into 4 groups (n=48); 1. Sham, 2. I/R, 3. HN-Sham, 4. HN-I/R. Pseudo-Surgery was performed in Sham groups; In I/R groups, renal artery ligation performed for 45 minutes, followed by reperfusion for 24 hours. HN treatment (2mg/kg/iv) was administered 10 minutes before reperfusion. During the 24-hour reperfusion period, the urine of the rats was collected and then the experiment was terminated by collecting blood and tissue samples. Renal functions, inflammation, oxidative stress, antioxidant capacity and mitochondrial functions were investigated. Histopathological methods were used to evaluate kidney tissue damage and apoptosis.

Results: Blood urea nitrogen, serum creatinine, urine albumin levels and sodium and potassium excretions were found to be high and creatine clearance was low in the I/R group and; were not affected by HN treatment. Glutathione levels, superoxide dismutase and catalase enzyme activity, which decreased in the I/R group, were significantly higher in the HN-I/R group. It was found that the myeloperoxidase activity of the I/R group was higher than the HN-I/R group. Adenosine triphosphate levels and mitochondrial complex 1 activity levels were higher in the HN-I/R group than in the I/R group. It was determined that the increased percentage of apoptotic cells in the I/R group decreased significantly in the HN-I/R animals.

Conclusion: HN may play a role to attenuating renal I/R damage by reducing oxidative stress, inflammation and apoptosis, improving antioxidant capacity and mitochondrial functions.

Key words: Humanin, renal ischemia reperfusion, oxidative stress

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Böbrek Fizyolojisi ve Fonksiyonel Anatomisi	3
2.1.1. Böbreğin Kanlanması	4
2.1.2. Böbreğin Fonksiyonları	5
İdrar Oluşumu	5
Sıvı - Elektrolit Dengesinin Düzenlenmesi	11
Arteryel Basıncın Düzenlenmesi	12
Asit – Baz Dengesinin Korunması	13
Hormon Salgılama	15
Glikoneogenez	16
2.2. Akut Böbrek Hasarı	17
2.2.1. Tanım	17
2.2.2. Akut Böbrek Hasarı Etiyolojisi	18
2.2.3. İskemik Akut Böbrek Hasarı	19
İskemi/Reperfüzton Hasarı	20
2.2.4. İ/R Hasarının Patofizyolojisi	22
. Vasküler Değişimler	22
İnflamasyon	23
. Oksidatif Stres	25
Mitokondriyal Disfonksiyon	28
Diğer faktörlerin İ/R Hasarına Katkısı	30
2.2.5. İ/R Hasarında Hücre Ölüm Yolakları	31
Nekroz	32

	Apoptoz	33
2.3.	Humanin	34
2.3.1.	Humaninin yapısı	35
2.3.2.	Humanin Metabolizması	36
2.3.3.	Humanin Reseptörleri ve Etki Mekanizması	37
2.3.4.	Humaninin Fizyolojik Etkileri	39
	HN'nin Nöroprotektif Etkileri	40
	HN'nin Üreme Üzerine Etkileri	41
	HN'nin Glukoz Homeostazisi Üzerine Etkileri	41
	HN'nin Renoprotektif Etkileri	42
	HN'nin İ/R Hasarı Üzerine Etkileri	42
2.4.	Amaç ve Kapsam	44
3. GEREÇ ve YÖNTEM		45
3.1.	Gruplandırma	45
3.2.	Cerrahi Prosedür	46
3.2.1.	İ/R uygulaması	46
3.2.2.	Deneyin Sonlandırılması	46
3.3.	Böbrek Fonksiyon Testlerinin Değerlendirilmesi	47
3.4.	Oksidan Hasar ve Antioksidan Kapasite Parametrelerinin Ölçümü	48
3.4.1.	Doku MDA Düzeyi Ölçümü	48
3.4.2.	Doku GSH Düzeyi Ölçümü	48
3.4.3.	Doku SOD Aktivitesi Ölçümü	49
3.4.4.	Doku CAT Aktivitesi Ölçümü	49
3.5.	İnflamatuvar Belirteçler	50
3.5.1.	Doku MPO Aktivitesi Ölçümü	50
3.6.	Mitokondriyal Fonksiyonların Değerlendirilmesi	50
3.6.1.	Hücre içi ATP Düzeyi Ölçümü	50
3.6.2.	Kompleks 1 Aktivitesi Ölçümü	51
3.7.	Histopatolojik Analiz	51
3.8.	Dokuda Apoptozin Değerlendirilmesi	52

3.9.	İstatistiksel Analiz	53
4.	BULGULAR	55
4.1.	İdrar miktarları	55
4.2.	Böbrek ağırlıkları	55
4.3.	Fonksiyonel Böbrek Parametreleri	56
4.3.1.	sCR	56
4.3.2.	Kan Üre Azotu	57
4.3.3.	İdrar Albümin İçeriği	57
4.3.4.	Fraksiyonel Na ⁺ Atılımı	58
4.3.5.	Fraksiyonel K ⁺ Atılımı	59
4.3.6.	Clcr	60
4.4.	Oksidan Hasar ve Antioksidan Sistem	61
4.4.1.	Doku MDA Düzeyi	61
4.4.2.	Doku GSH Düzeyi	61
4.4.3.	SOD Aktivitesi	61
4.4.4.	CAT Aktivitesi	62
4.5.	İnflamatuvar Belirteçler	63
4.5.1.	MPO Aktivitesi	63
4.6.	Mitokondriyal Fonksiyonlar	64
4.6.1.	ATP Düzeyleri	64
4.6.2.	Kompleks 1 Aktivitesi	65
4.7.	Böbrek Dokularının Histopatolojik Analizi	65
4.8.	Doku Apoptozisinin Değerlendirilmesi	67
5.	TARTIŞMA	68
5.1.	HN'in Böbrek Fonksiyonlarına Etkisi	69
5.2.	HN'nin Oksidatif Hasar Üzerine Etkisi	70
5.3.	HN'nin Antioksidan Sistem Üzerine Etkisi	71
5.4.	HN'nin İnflamasyon Üzerine Etkisi	72
5.5.	HN'nin Mitokondriyal Fonksiyonlara Etkisi	72
5.6.	HN'nin Apoptozis Üzerine Etkisi	73

5.7. HN'nin Doku Hasarı Üzerine Etkisi	74
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	76
KAYNAKLAR	78
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	97



TABLÖLAR DİZİNİ



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Böbreğin yapısı ve kısımları	3
Şekil 2.2.	Böbreğin kanlanması	5
Şekil 2.3.	İdrar oluşumu	6
Şekil 2.4.	Böbrek tübüllerinde geri emilim ve sekresyon	9
Şekil 2.5.	D vitamini biyosentez	16
Şekil 2.6.	Akut böbrek hasarı etiyolojisi	19
Şekil 2.7.	Böbreklerde İ/R hasarının sonucu olarak inflamasyon gelişimi	24
Şekil 2.8.	Mitokondriyal humanin geni	35
Şekil 2.9.	Humaninin amino asit dizilimi	36
Şekil 2.10.	Humanin G'nin amino asit dizilimi	36
Şekil 2.11	Humaninin sinyal yolağı	39
Şekil 3.1.	Cerrahi prosedür	47
Şekil 4.1.	İdrar Miktarları	54
Şekil 4.2.	Normalize Böbrek ağırlıkları	55
Şekil 4.3.	Serum kreatinin seviyeleri	55
Şekil 4.4.	Kan Üre Azotu seviyeleri	56
Şekil 4.5.	İdrar Mıkroalbümin miktarları	57
Şekil 4.6.	Fraksiyonel Na ⁺ Atılımı	58
Şekil 4.7.	Fraksiyonel K ⁺ Atılımı	58

Şekil 4.8.	Kreatinin Klirensi	59
Şekil 4.9.	Doku MDA düzeyleri	60
Şekil 4.10.	Doku GSH seviyeleri	61
Şekil 4.11.	Doku SOD aktivitesi	61
Şekil 4.12.	Doku CAT aktivitesi	62
Şekil 4.13.	Doku MPO aktivite düzeyi	63
Şekil 4.14.	ATP seviyeleri	63
Şekil 4.15.	Kompleks 1 aktivitesi	64
Şekil 4.16.	Böbrek Dokularının Histopatolojik Analizi	65
Şekil 4.17.	Apoptotik Hücre Yüzdesi	66

SİMGELER ve KISALTMALAR

ABH	: Akut Böbrek Hasarı
Abs	: Absorbans
ACE	: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
ADH	: Antidiüretik Hormon
Akt	: Protein Kinase B
AMPK	: AMP İle Aktive Olan Protein Kinaz
Ang	: Anjiyotensin
ANOVA	: Varyans Analizi
ANP	: Atrial Natriüretik Peptit
Apaf-1	: Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör 1
ASK	: Apoptoz Sinyal Düzenleyici Kinaz
AT1	: Anjiyotensin Tip 1
ATP	: Adenozin Trifosfat
Aβ	: Amiloid Beta
BAK	: BCL2-antagonist/killer 1
BAX	: Bcl-2 ilişkili Protein X
Bcl	: B Hücreli Lenfoma
BUN	: Kan Üre Nitrojeni
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
CAT	: Katalaz
Cl_{Cr}	: Kreatinin Klirensi
CNTFR	: Siliyer Nörotrofik Faktör Reseptörü
Cr	: Kreatininin
DAB	: Diaminobenzidin
DAMP	: Hasarla İlişkili Moleküler Modeller
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
eNOS	: Endotelial NOS
ERK	: Hücre Dışı Sinyalle Regüle Edilen Kinazlar

ETZ	: Elektron Transport Zinciri
FADD	: Fas İle İlişkili Ölüm Domeini
FPRL	: Formilpeptid Benzeri Reseptör
GFR	: Glomerüler Filtrasyon Hızı
GLUT	: Glukoz Taşıyıcısı
gp	: Glikoprotein
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GSH	: Glutasyon
GSSG	: Glutasyon Disülfid
H&E	: Hemotoksilen & Eozin
HIF	: Hipoksi İle İndüklenebilir Faktörler
HN	: Humanin
HNG	: Humanin G
HRP	: Horseradish Peroksidaz
IGFBP	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlatıcı Protein
IL	: İnterlökin
İ/R	: İskemi Reperfüzyon
icv	: İntraserebroventriküler
iNOS	: İndüklenebilir NOS
ip	: İntraperitoneal
iv	: İntravenöz
JAK	: Janus Kinaz
JG	: Jugstaglomerüller
JNK	: C-Jun N-Terminal Kinaz
MDA	: Malondialdehit
MSU	: Mono-Sodyum Ürat
NAD⁺	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa B
NLRP	: Nod Benzeri Reseptör Ailesi Protein
NMDA	: N-Metil-D-Aspartat

NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
O₂^{•-}	: Süperoksit Anyonu
OH[•]	: Hidroksil Radikali
PGC-1α	: Peroksizom Proliferator ile Aktive Olan Reseptör γ Koaktivatörü-1 α
PKA	: Protein Kinaz A
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
sCr	: Serum Kreatinin
SGLT	: Sodyum Glukoz Kotransport Taşıyıcıları
sn	: Saniye
SOD	: Süperoksit Dismutaz
STAT3	: Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon 3 Aktivatörü
TBA	: Tiyobarbitürik Asit
TCA	: Triklor Asetik Asit
TdT	: Terminal Deoksinükleotidil Transferaz
TGF	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktörü Alfa
U	: Ünite
uCr	: İdrar Kreatinin
V2	: Vazopresin 2
VEGF	: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
WSX-1	: IL-27 Reseptör WSX-1

1. GİRİŞ

Renal iskemi ile ortaya çıkan ani doku hasarı akut böbrek hasarı olarak adlandırılır (Johnson ve ark., 1993; Hall ve ark., 2021). Böbrek transplantasyonu, enfeksiyonlar, vasküler tıkanmalar veya hidronefroz gibi durumlar ile renal iskemi gelişebilmekte ve bu durum akut böbrek hasarına neden olabilmektedir (Stravodimos ve ark., 2009; Requião-Moura ve ark., 2015). İskemik dönemde dokuya gelen kan akışının azalmasıyla birlikte, dokunun oksijenlenmesinin de azalmasına bağlı olarak mitokondriyal disfonksiyon başlar ve hücre içi adenosin trifosfat (ATP) miktarları azalır. Bu durum hücrelerin metabolik faaliyetlerinin bozulmasına ve hücrelerde reaktif oksijen türleri (ROS)'nin üretiminin artmasına neden olur. Hasarlı dokudan ve özellikle nekrotik hücrelerden sitokinler ve kemokinler salınarak inflamatuvar hasarın başlamasına aracılık eder. İskemiye takiben gerçekleşen reperfüzyon döneminde hasarlı bölgede ROS ve proinflamatuvar sitokinlerin daha da artmasıyla, lökositlerin aktivasyonu ve dokuya göçü meydana gelir (Sharfuddin ve ark., 2011). İ/R'nin ardında oluşan mikrovasküler değişimler ve endotel disfonksiyonu da hasara katkıda bulunur. Nekrotik ve apoptotik ölüm yollarının aktivasyonu ile böbrekte tübül hücre kaybı gerçekleşir ve tübül atrofi böbrek fonksiyonlarının bozulmasıyla sonuçlanır.

Böbrek dokusu metabolik aktivitesi yüksek ve mitokondrilerden zengin bir dokudur. Mitokondriler apoptoz ve otofaji gibi programlanmış hücre ölümü yollarında aktif rol oynar. Renal İ/R hasarına bağlı gelişen mitokondriyal disfonksiyon; organelin şişmesi, kristaller ve zarlar arası boşlukların artması ve mitokondriyal fonksiyonun azalması ile karakterize bir süreçtir. Mitokondriyal disfonksiyon sonucu hücrenin ihtiyaç duyduğu enerji üretilemez (Szeto, 2017).

İ/R ile oluşturulmuş deneysel akut böbrek hasarı modellerinde serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu hasar, hücrenin apoptoza ya da nekroza girerek ölmesine neden olabilmektedir. Özellikle renal iskemi sırasında tübül nekroz başlıca hücre ölümünü şeklidir. Fakat renal İ/R süreci birlikte değerlendirildiğinde apoptotik yollarla gerçekleşen hücre kaybının da akut böbrek yetmezliği gelişiminde önemli rol

oynadığı bilinmektedir (Saikumar ve ark., 2003) (Havasi ve ark., 2011; Gokhan ve ark., 2020; Jun ve ark., 2020).

Humanin (HN) hücresel strese yanıt olarak üretilen mitokondriyal türevli bir peptittir. 24 aminoasitli HN 2001 yılında Alzheimer hastalarında amiloid beta plaklarında tespit edilerek tanımlanmıştır (Hashimoto Yuichi ve ark., 2001a; Hashimoto Yuichi ve ark., 2001b). Sitoprotektif etkileri ortaya konan HN böbrek, kalp iskelet kası, beyin ve karaciğer gibi çeşitli dokularda fizyolojik olarak üretilmektedir (Muzumdar ve ark., 2009; Chin ve ark., 2013). HN'nin hücre zarında yerleşmiş G proteini bağlı formilpeptid benzeri reseptör (FPRL) -1/2' ye bağlanarak ya da trimerik kompleks (CNTFR/WSX-1/gp 130) reseptörlerine bağlanarak etki gösterdiği bulunmuştur (Hashimoto Yuichi ve ark., 2009; Lee ve ark., 2013).

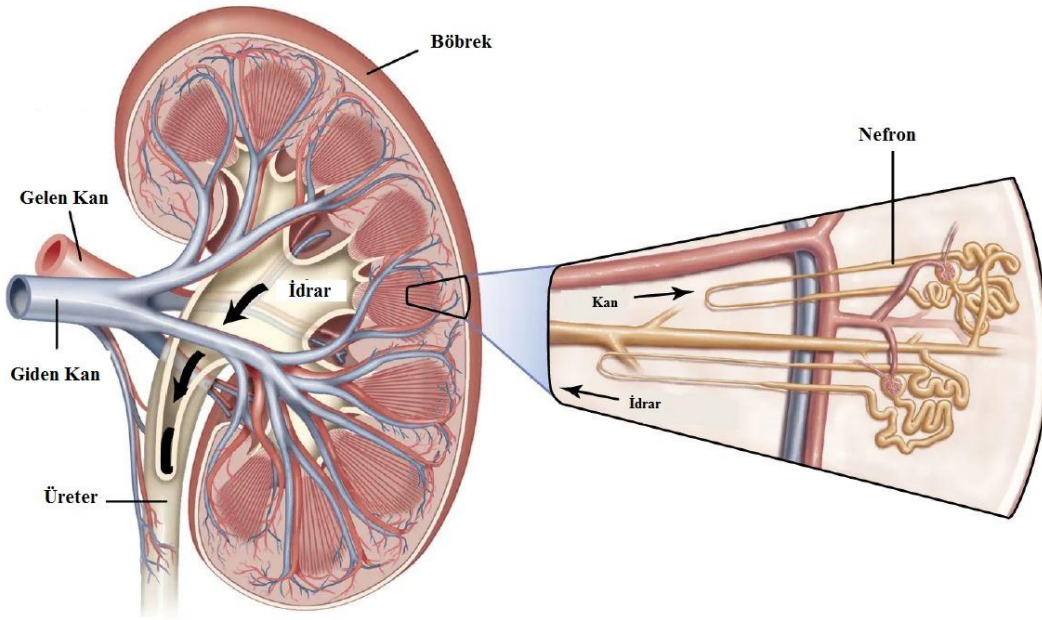
HN'nin sitoprotektif etkilerini inceleyen birçok çalışmada peptidin hücre içinde çeşitli mekanizmalarla ROS üretimini azaltarak etki gösterdiği tespit edilmiştir (Minasyan ve ark., 2017; Yang X. ve ark., 2018; Cai ve ark., 2021). HN'nin İ/R hasarı gibi ROS üretiminin arttığı ve hücresel biyoenerjetik mekanizmaların bozulduğu hücresel stres koşullarında koruyucu görev aldığı düşünülmektedir. Endojen HN seviyelerinin miyokardiyal İ/R hasarı ile değişebileceği gösterilmiştir (Thummasorn Savitree ve ark., 2016). Beyin, kalp ve bağırsak dokusunda İ/R hasarı üzerine HN'nin etkileri incelenmiş ve bu çalışmalarda HN'nin ROS üretimini azalttığı, antioksidan sistemi güçlendirdiği, antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkiler göstererek İ/R hasarına karşı koruyucu bir rol üstlendiği ortaya konmuştur (Thummasorn Savitree ve ark., 2016).

Literatürdeki bu bilgiler göz önüne alındığında HN'nin, böbrek İ/R hasarında doku hasarını iyileştirmeye yönelik etkilerinin bulunması muhtemeldir. Farklı böbrek patolojilerinde antioksidan ve antiapoptotik etki gösteren HN'nin böbrek dokusunun akut hasarlanması durumundaki etkileri daha önce araştırılmamıştır (Liu C. ve ark., 2019). Çalışmamızda HN'nin böbrekte İ/R hasarının patofizyolojisini oluşturan etmenler üzerine olası etkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Böbreğin Fonksiyonel Anatomisi

Böbrekler retroperitoneal olarak 12. trokal ve 3. lumbar vertebralar seviyesinde, bilateral olarak yerleşmiş organlardır. Yaklaşık ortalama bir böbrek ağırlığı 115-170 gr arasında değişir ve ortalama 12cm x 6cm x 2,5cm'lik hacim kaplar (Hall ve ark., 2021). Her bir böbreğin orta kısmında böbrek arterlerinin, venlerinin, lenflerin, sinirlerin ve üreterin girdiği ve/veya çıktığı hilum adı verilen çukur bir bölge bulunur (Marieb ve ark., 2017). Esnek olmayan fibröz bir kapsülle kaplı olan böbrekler sagittal kesitte üç bölgeye ayrılır; korteks, medulla ve papilla (Rhoades ve ark., 2017).



Şekil 2.1. Böbreğin yapısı ve kısımları (Britannica, 2023).

Granüllü görünümüne sahip olan korteks tabakası böbrek kapsülünün hemen altında yer alır. Tüm glomerüller, tübüllerin kıvrımlı bölümleri ve kortikal toplayıcı kanallar kortekste bulunur.

Dış ve iç medulla olarak ikiye ayrılan medulla, tübülleri ve kan damarlarını içeren 8-10 adet koni şeklindeki böbrek piramidinden oluşmuştur (Boron ve ark., 2019). Bu piramitlerin tabanı korteks-medulla sınırından başlar ve papillada son bulur. Renal

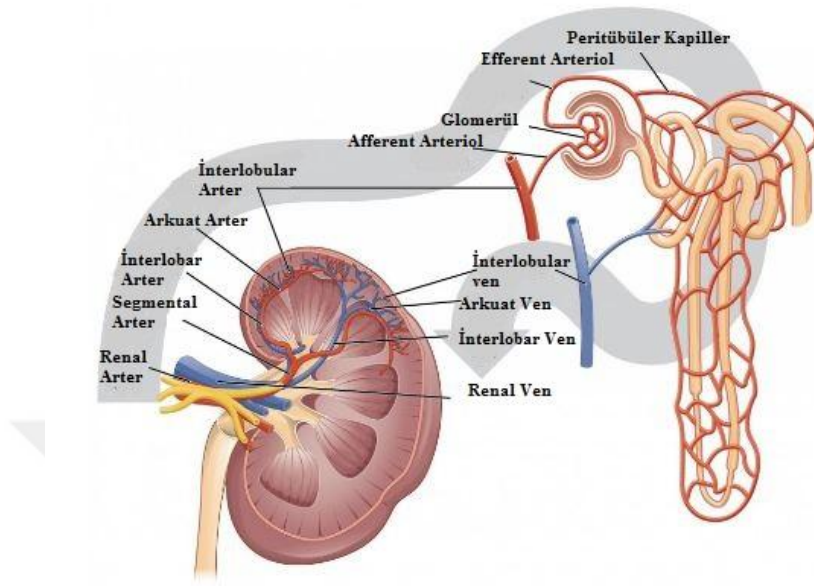
papillalar idrarı minör kalikslere boşaltır, minör kaliksler birleşerek majör kaliksi oluşturur ve idrar buraya iletilir. Majör kaliksten idrar renal pelvise aktarılır. Kaliksler, renal pelvis ve üreterler kasılabilir eleman içeren duvarlara sahiptir ve idrar akışını sağlayan peristaltik hareketlerden sorumludur (Rhoades ve ark., 2017).

Böbreklerin işlevsel birimleri nefron olarak adlandırılır her böbrekte yaklaşık 1 milyon kadar nefron bulunur (Hall ve ark., 2021). Böbrekler farklı yerleşimleri nedeniyle değişik işlevsel roller üstlenen üç farklı tip nefron içerir: süperfisyal, mid-kortikal ve jugstamedüller nefronlar. Tüm nefronların çoğunluğunu oluşturan süperfisyal ve midkortikal nefronlar kısa henle kulbuna sahiptir ve henle kulpları ancak dış medullaya kadar ulaşabilir. Jugstamedüller nefronlar ise nefronların sekizde birini oluşturur ve iç medullaya kadar inebilen uzun henle kulplarına sahiptir (Hommos ve ark., 2017; Hall ve ark., 2021).

2.1.1.Böbreğin Kanlanması

Kalp debisinin yaklaşık %22'sini alan böbrek tek bir renal arter ile beslenir (Hall ve ark., 2021). Hilustan böbreğe giren renal arter önce anterior ve posterior dallarına ayrılır. Bunlar da sırasıyla interlobar arterler, arkuat arterler ve kortikal radyal (interlobüler) arterlere ayrılır (Pallone ve ark., 1998). İnterlobüler arter dalları kortekse girer ve aferent arteriyolları oluşturur. Oluşan çok sayıda aferent arteriyolün her biri glomerüler kapilleri meydana getirir. Glomerüler kapillerler birleşerek efferent arteriyol şeklinde devam eder (Boron ve ark., 2019). Kortikal nefronların tübüllerini besleyen peritübüler kapiller ağ ise efferent arteriyol tarafından oluşturulur (Rhoades ve ark., 2017). Jugstamedüller glomerüllerin (JG) arteriyolları medullanın kan akımından sorumludur. Peritübüler kapillerler ile medullanın derinliklerine kadar uzanan ve konsantre idrar üretiminde görevli olan U şeklindeki vaza recta bu arteriyollerden köken alır (Wallace, 1998).

Aferent arteriyol ile gelen kan, glomerüllerde ultrafiltrasyon gerçekleştikten sonra efferent arteriyole geçer. Geri emilim, nefronu çevreleyen peritübüler kapillerler vasıtasıyla gerçekleşir ve buradan geçen kan önce küçük venlere oradan da renal vene akarak böbreği terk eder (Costanzo, 2018).



Şekil 2.2. Böbreğin kanlanması

2.1.2. Böbreğin Fonksiyonları

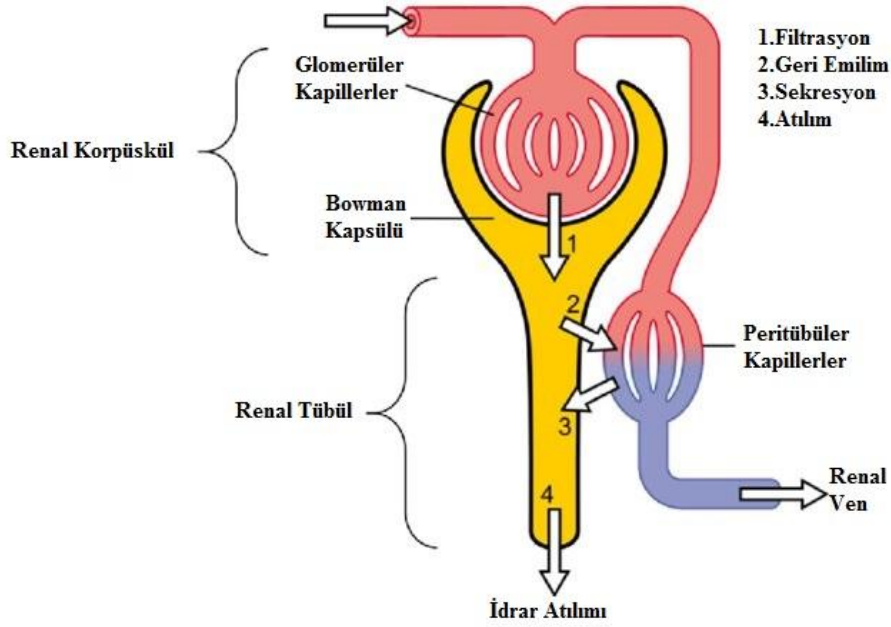
Bilinen en önemli görevi atık maddelerin vücuttan uzaklaştırılması olsa da birçok hayati fonksiyon böbrekler tarafından sürdürülür. Fonksiyonları aşağıda, başlıklar halinde, kapsamlı şekilde özetlenen böbreklerin en önemli fonksiyonu idrar oluşumudur.

Buna ek olarak; hormon salgılama, sıvı-elektrolit dengesinin ve arteriyel basıncın düzenlenmesi, asit-baz dengesinin sağlanması gibi birçok hayati fonksiyonda majör roller üstlenir (Meyer, 1989).

İdrar Oluşumu

Böbrek arterleri ile böbreğe giren kan, böbreklerde süzülerek önce ultrafiltrata dönüştürülür. Nefron kısımları boyunca akan ultrafiltrat, idrar haline getirilerek böbreği terk eder.

İdrar oluşumunun ana bileşenleri: 1.Filtrasyon 2. Geri emilim 3. Sekresyon 4. Atılmadır.



Şekil 2. 3. İdrar oluşumu (Lepowsky ve ark., 2017).

-Filtrasyon

İdrar oluşumu filtrasyon ile başlar. Filtrasyon olarak ifade edilen işlem; kan yoluyla böbreklere gelen maddelerin hemodinamik prensipler doğrultusunda glomerüler kapillerlerden protein içermeyen bir sıvı olarak bowman kapsüllerine süzülmesi işlemidir (Hall ve ark., 2021).

Glomerüler filtrasyon bariyeri moleküler bir süzgeç olarak iş görerek küçük moleküllerin süzülmesine izin verirken, plazma proteinleri gibi büyük moleküllerin filtre olmasına izin vermez (Rhoades ve ark., 2017). Glomerüler filtrasyon bariyerini kat ederek süzülen sıvı; glomerüler filtrat ya da ultrafiltrat olarak isimlendirilir ve madde konsantrasyonları (proteinler hariç) plazmanınki ile oldukça benzerdir (Costanzo, 2018). Glomerüler filtrasyon bariyeri üç tabakadan oluşmaktadır; glomerüler kapillerlerin fenestralı endoteli, bazal membran ve ayaksı uzantılara sahip genişlemiş epitelyal hücreler olan podositler (Marieb ve ark., 2017).

Yetişkin sağlıklı bir insanda glomerüler filtrasyon hızı (GFR) 125 ml/dakikadır. GFR böbrek kan akış hızı ile yakından ilişkilidir ve bu hızı etkileyen birçok mekanizma ile düzenlenebilir (Wallace, 1998).

-Geri Emilim

Glomerüler filtrat bowman kapsülünü terk ederek tübüller boyunca ilerlerken; sırasıyla proksimal tübül, henle kulbunun inen ve çıkan kolları, distal tübül ile toplayıcı kanalları kat eder (Costanzo, 2018). Bu akış boyunca ultrafiltrat içindeki çözülmüş maddeler ve su; tübül hücreleri tarafından, emici kuvvetlerin etkisi altında, hücre zarında bulunan taşıyıcılar aracılığı ile geri alınır (Rhoades ve ark., 2017). Tübül hücrelerine seçici şekilde alınan maddeler, tübüllerin etrafını saran peritübüler kapillerlere iletilir ve bu şekilde ultrafiltratın içeriği değiştirilir. Tübüler geri emilim pasif ve aktif transport mekanizmalarını barındırır (Hall ve ark., 2021).

Farklı tübül segmentleri farklı özelliklere sahip epitelyal hücrelerle döşenmiştir. Bu hücreler farklı yapısal özellikler gösterir örneğin sıkı ya da gevşek hücre-hücre bağlantıları içerebilir, hücrelerin apikal membranlarının fırçamsı kenar çıkıntıları yapı ve yoğunluk olarak farklılık gösterebilir. Ayrıca metabolizmaları, içerdikleri enzimler, reseptörler ve zar taşıyıcı proteinleri farklılık gösterir. Bu nedenle farklı tübüller segmentler farklı emilim ve sekresyon özellikleri gösterir. Diğer bir değişle tübüller boyunca solütlerin ve suyun emilimi sabit değildir (Vallon ve ark., 2006). Örneğin fizyolojik koşullarda filtre edilen sodyumun %99'undan fazlası geri emilir. Geri emilen sodyumun yaklaşık olarak %70'i proksimal tübülden, %20'si çıkan kalın henleden, %6'sı distal tübülden ve %3'ü toplayıcı kanallardan geri emilmektedir (Rhoades ve ark., 2017).

Proksimal Tübüllerde Geri Emilim

Toplam geri emilimin büyük kısmı (yaklaşık %70'i) proksimal tübüllere gerçekleşir. Filtre edilen glukoz ve amino asitlerin tamamı proksimal tübülden geri emilir. Ayrıca H_2O , Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{+2} ve HCO_3^- 'in emilimi de başlıca proksimal tübülde gerçekleşir (Marieb ve ark., 2017).

Proksimal tübülün ilk yarısında Na^+ apikal membrandan; sekonder aktif transport mekanizmasıyla aminoasit, glukoz ve fosfat kotransport taşıyıcıları aracılığı ile birlikte taşınır; tübülün ikinci yarısında bu maddelerin konsantrasyonu azalır ve Na^+ ; Cl^- iyonları

ile birlikte emilir. Buna ek olarak Na^+ ; H^+/Na^+ zıt taşıyıcısı ile de aktif olarak geri emilir (Vallon ve ark., 2017). Bazolateral membranda ise Na^+/K^+ ATPaz ile interstisyel boşluğa pompalanır (Vallon ve ark., 2020).

Proksimal tübül suya oldukça geçirgendir; Na^+ emilimini su emilimi takip eder. Dolayısıyla proksimal tübülde su geri emilimi için sürücü kuvvet Na^+ emilimidir. Su akuaporinler aracılığıyla transselüler yolla ya da doğrudan parasellüler yolla bazolateral tarafa ulaşır. Proksimal tübülde suyun ve solütlerin aynı oranda birlikte emilmesi nedeniyle tübül sıvı plazma ile izoozmotik kabul edilir (de Wardener, 1969).

Glukoz transportu apikal membrandan sodyum glukoz kotransport taşıyıcıları (SGLT) aracılığı ile gerçekleşir. Proksimal tübülde iki farklı SGLT vardır; yüksek kapasite düşük affiniteye sahip SGLT 2 (1 Na^+ ile 1 glukoz taşır) ve yüksek affinite düşük kapasiteye sahip SGLT 1 (2 Na^+ ile 1 glukoz taşır). Fizyolojik koşullarda filtre olan glukozun %97'si SGLT 2 ile %3'ü SGLT 1 ile olmak üzere hemen hemen tamamı geri emilir. Glukoz bazolateral membrandan glukoz taşıyıcısı (GLUT) 1 ve 2 aracılığı ile kolaylaştırılmış difüzyon ile taşınır (Vallon ve ark., 2017; Ahmad ve ark., 2021).

Amino asitler de glukoz ile benzer şekilde yalnızca proksimal tübülde, apikal membrandan Na^+ ile birlikte sekonder aktif transport yoluyla; bazolateral membrandan ise kolaylaştırılmış difüzyonla taşınır (Fotiadis ve ark., 2013).

Henle Kulbundan Geri Emilim

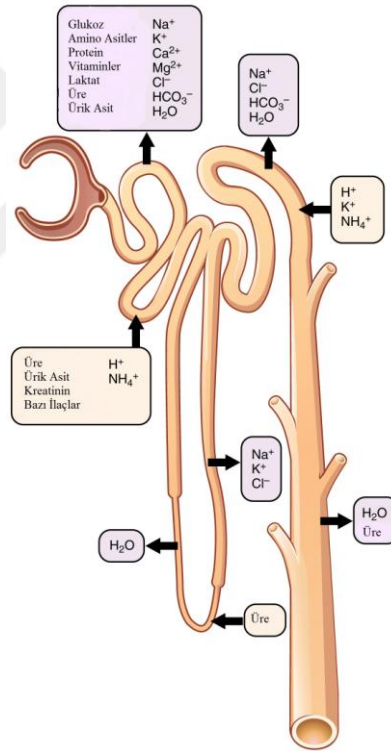
Henle kulbu fizyolojik olarak farklı fonksiyonlara sahip üç bölge içerir; inen henle, çıkan ince henle ve çıkan kalın henle. İnen ve çıkan ince henle kısımları fırçamsı kenar içermez ve buradaki hücreler düşük metabolik aktiviteleri nedeniyle çok az mitokondri içerir (Ahmad ve ark., 2021). Bununla uyumlu olarak ince henle kısımlarında esas olan taşınma şekli basit difüzyondur. Suyun yaklaşık %20'si inen henleden geri emilirken çıkan henle suya geçirgen değildir (Costanzo, 2018).

Çıkan kalın henle; aktif taşıma mekanizmalarına olanak sağlayacak şekilde, yüksek metabolik aktiviteye sahiptir. Na^+ , K^+ ve Cl^- iyonları apikal membrandan $\text{Na}/2\text{Cl}/\text{K}$ taşıyıcısıyla geri emilir. Ek olarak; Ca^{+2} , Mg^{+2} , HCO_3^- gibi iyonlar da çıkan kalın henle

kulbunda geri emilir. H^+/Na^+ zıt taşıyıcısı ile sodyum emilimi ve hidrojen sekresyonu tübülün bu segmentinde de gerçekleşir. Suyu geçirgen olmayan bu kısımda solütlerin emilmesiyle tübül sıvı seyreltilmiş olur (Hall ve ark., 2021).

Distal Tübülde Geri Emilim

Distal tübül çıkan kalın henle kulbu ile benzer şekilde suya geçirgen değilken solütlere geçirgendir. Sodyum ve klorür iyonları Na^+/Cl^- kotransport taşıyıcısı ile hücre içine alınır. Bazolateral membrandan taşınırken sodyum Na^+/K^+ ATPaz pompası aracılığı ile; klorür ise klor kanalları ile interstisyel aralığa iletilir (Boron ve ark., 2019).



Şekil 2.4. Böbrek tübüllerinde geri emilim ve sekresyon

Kortikal Toplayıcı Kanallardan Geri Emilim

Distal tübülün son kısımları da onu takip eden kortikal toplayıcı tübüllerle benzer özelliktedir. Yapısında iki farklı hücre barındırır; esas hücreler ve interkale hücreler (Hall ve ark., 2021). Bu bölgelerin suya geçirgenliği, aquaporin-2'nin ekspresyonunu ve apikal membranına translokasyonunu uyaran antidiüretik hormonunun (ADH) varlığına

bağlıdır (mekanizma 2.1.2.2. başlığında açıklanmıştır). Aquaporin-2 ile hücreye giren su bazolateral plazma membranında bulunan aquaporin-3 ve aquaporin-4 ile interstisyel alana geçer (Nedvetsky ve ark., 2009).

Esas hücreler bazolateral membranda Na^+/K^+ ATPaz pompası aktivitesine bağlı olarak özel Na^+ kanalları (ENaC) aracılığıyla sodyumu emerken, potasyumu tübül lümenine difüzyon ile gönderir. Burada sodyumun emilim hızı aldesteron ile kontrol edilir (Booth ve ark., 2002).

İnterkale hücreler karbonik anhidraz enzimi içerir; bu enzim H_2O ve CO_2 'nin H^+ ve HCO_3^- 'e dönüşümünü katalizler. H^+ ATPaz pompası aracılığı ile H^+ iyonunu tübüle sekrete ederken HCO_3^- iyonunu bazolateral membrandan Cl^- ile zıt şekilde taşınır (Hamm ve ark., 2015).

Medüller Toplayıcı Kanallardan Geri Emilim

Medüller Toplayıcı Kanalların suya geçirgenliği kortikal toplayıcı tübüllerle benzer şekilde ADH'a bağlıdır. Farklı olarak bu bölge üreye de geçirgendir; bu özellik burada idrarın yoğunlaşmasına katkı sağlar (Bankir ve ark., 2017).

-Sekresyon

Tübüler sekresyon; birçok salgılama mekanizması ile ilaçlar, toksinler ve belirli endojen maddelerin, peritübüler kapiller ağlardan alınarak, tübül içinde bulunan ultrafiltrata eklenmesidir. Ayrıca bazı maddeler tübül hücrelerinde sentez edilerek de sekrete edilebilir. Bu şekilde istenmeyen maddelerin idrar ile atılması sağlanır (Rhoades ve ark., 2017). Tübüller boyunca farklı maddeler farklı tübül segmentinden sekrete edilebilir.

Metabolizma son ürünü olan organik asitler ve bazlar, ilaçlar ve toksinler gibi maddelerin çoğu proksimal tübül hücrelerince özel taşıyıcıları aracılığıyla salgılanır (Hall ve ark., 2021). Distal tübülün son kısmı ve kortikal toplayıcı tübüllerde geri emilim başlığı altında açıklanan mekanizmalar ile H^+ ve K^+ iyonları sekrete edilir. H^+ iyonları benzer şekilde medüller toplayıcı kanallarca da sekrete edilir (Rhoades ve ark., 2017).

-Atılma

Tübüllerde geri emilim ve sekresyon işlemlerine tabi tutulan ultrafiltrat, toplayıcı kanallara akar ve burada son halini alır. Toplayıcı kanalların renal pelvis'e bakan kısımları kaynaşır ve idrarı piramitlerin papillaları aracılığı ile minör kalikslere iletir (Marieb ve ark., 2017). İdrarın nihai bileşenleri hem süzölmüş (ve geri emilmemiş) hem de sekrete edilmiş maddelerden oluşur. Glomerüllerden yaklaşık 180 litre/gün hızında sıvı filtre olsa da yaklaşık 179 litresi geri emilime uğrar, ancak 1 litre civarında sıvı idrar olarak atılır (Costanzo, 2018).

Sıvı - Elektrolit Dengesinin Düzenlenmesi

Vücutta elektrolitlerin ve vücut suyunun homeostatik dengesi, sıvı giriş çıkış dengesine bağlıdır (Boron ve ark., 2019). Böbrekler ekstraselüler sıvı hacmini başlıca elektrolit dengesini düzenleyerek; ekstraselüler sıvı osmolaritesini ise su dengesini kontrol ederek düzenler (Rhoades ve ark., 2017).

Böbreklerden su atılımı arjinin vazopressin (antidiüretik hormon - ADH) hormonu tarafından kontrol edilir. Ön hipotalamustaki osmoreseptör hücreler, plazma osmolaritesinin artması durumunda, büzölür ve supraoptik ve paraventriküler çekirdeklerdeki hücrelerin uyarılmasına neden olur (Hall ve ark., 2021). Böylece ADH salgılanır ve kan yoluyla böbreklere taşınır. Böbrek toplayıcı kanallarında suyun geri emilimini vazopressin 2 (V2) reseptörleri aracılığıyla artırır (Nielsen ve ark., 1993). ADH kortikal ve medüller toplayıcı kanal hücrelerinde V2 reseptörüne bağlanarak hücre içi siklik adenosin monofosfat (cAMP) miktarını artırır. Artan cAMP, protein kinaz A (PKA) aktivasyonuna neden olur. PKA sitoplazmik veziküllerdeki aquaporin-2 kanallarının membrana translokasyonunu sağlar (Nedvetsky ve ark., 2009). Çekirdekte ise transkripsiyon faktörlerini aktive ederek aquaporin-2 sentezini uyarır (Hasler ve ark., 2009; Salhadar ve ark., 2021). Buna ek olarak medüller toplayıcı kanal hücrelerinde aynı mekanizmayla üre transporterlarını da artırır ve ultrafiltrattaki ürenin geri emilimini sağlar. İntrestisyel alana geçen üre medulla osmolaritesini artırır. Bu da suyun geri emiliminde artışa neden olur (Nielsen ve ark., 1993). ADH salınımı kan hacim değişikliklerine bağlı olarak da değişir. ADH salgısının düzenlenmesi aracılığı ile idrar

hacmi düzenlenerek sıvı dengesi homeostazı sağlanır (Bankir ve ark., 2017; Marieb ve ark., 2017).

Sıvı elektrolit dengesinin sağlanmasında böbrekler üzerinde etkili bir diğer hormon atrial natriüretik peptitdir (ANP) (Costanzo, 2018). Kan hacmindeki artış atriumların genişlemesine neden olur. Genişleyen atriumlarda bulunan gerim reseptörleri uyarılır ve ANP salgılanır. ANP böbreklerde Na^+ geri emilimini regüle eder. Böbrek kan akımını ve GFR'yi artırır, medüler toplayıcı kanallar yoluyla Na^+ geri emilimini engeller (Bekheirnia ve ark., 2006). Neticede böbreklerden su ve tuz kaybı gerçekleşir. ANP bu etkisiyle kan basıncını düşürülmesinde de rol oynar (Atlas ve ark., 1986).

Su ve elektrolit dengesinin bir diğer düzenleyicisi tuz tutucu sistem olarak da tanımlanan renin-anjiyotensin-aldosteron sistemidir. Böbreklerden salgılanan reninin başlattığı bir dizi reaksiyon sonucu oluşan anjiyotensin (Ang) II adrenal korteksi uyararak aldosteron salgılanmasını sağlar (Booth ve ark., 2002). Aldosteron, distal tübül hücrelerinde Na^+/K^+ ATPaz miktarını ve Na^+/Cl^- geri emilimini artırır (Radi, 2019). Bununla birlikte Ang II direkt olarak proksimal tübülden Na^+ geri emilimini uyarır. Ang II ek olarak ADH salınımını ve susamayı da uyararak sıvı hacminin artışına katkı yapar.

Arteriyel Basıncın Düzenlenmesi

Böbreklerce gerçekleştirilen renal düzenleme mekanizmaları kan hacmini değiştirerek kan basıncının uzun süreli kontrolünde görev alır (Mimran, 1988). Böbrekler kan basıncı homeostazına direkt ve dolaylı olarak iki farklı şekilde katkı sunar.

-Direkt Renal Mekanizma

Hormonlardan bağımsız gerçekleşen mekanik bir mekanizmadır. Otoregülasyon olarak anlandırılan bu mekanizmaya göre kan hacmi ya da basıncı arttığında GFR artar. Tübüllerde akış hızı yüksek olan ultrafiltrat yeteri kadar hızlı düzeyde geri emilemez. İdrar miktarında artış gerçekleşir; kan hacmi ve dolayısıyla kan basıncı düşer (Hall ve ark., 2021).

-Dolaylı Renal Mekanizma

Böbrekler renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi aracılığıyla kan basıncını düzenleyebilir. Kan basıncının azalmasına cevaben özelleşmiş hücreler olan JG (jugstaglomerüller) hücrelerden renin salgılanır (2.1.2.5.'te bu mekanizma açıklanmıştır). Renin, anjiyotensinojenden bir peptit bağıını kopararak anjiyotensin I oluşumunu sağlayan bir proteazdır. Akciğer kapiller endotelinde yüksek aktivite gösteren anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) Ang I'ı aktif form olan Ang II'ye dönüştür (Boron ve ark., 2019). Ang II dört farklı yolla kan hacmini artırarak arteriyel kan basıncının düzenlenmesine aracılık eder.

1. Adrenal korteksi uyararak aldosteron salgılanmasına neden olur. Aldosteron renal Na^+ geri emilimini artırır. Na^+ emilimindeki artış su emilimini artırır ve bu da kan hacminin artışına neden olur (Booth ve ark., 2002).

2. Arka hipofiz bezini uyarır ve buradan ADH salgılanmasını sağlar. ADH su geri emilimini artırır (Bankir ve ark., 2017).

3. Hipotalamustaki susama merkezini uyararak su tüketiminin artışına neden olur. Böylece kan hacmi artar (Todini ve ark., 2023).

4. Ang II efferent arteriolde vazokonstrüksiyona neden olur, bunun sonucunda glomerüler kapiller basınç ve filtrasyon fraksiyonu artar. Sonuçta peritübüler kapillerlerde artan onkotik basınç nedeniyle sıvı geri emilimi artar (Helal ve ark., 2012).

Ang II kan hacmini artırarak kan basıncını artırmanın yanı sıra periferik vasküler direnci artırarak da kan basıncının artışına neden olabilir (Hall ve ark., 2021).

Asit – Baz Dengesinin Korunması

İnsan vücudunda asit-baz dengesi hassas şekilde ayarlanır ve çok dar bir aralıkta tutulur (arteriyel pH 7,36 ile 7,44 arasında). Vücutta metabolik süreçlerden sürekli halde üretilen asitler kan pH'ının düşmesine neden olur (Hamm ve ark., 2015). Asit kaynaklarının başında metabolizmada üretilen CO_2 gelir, bundan başka beslenme ile

alınan makro besinlerin metabolizması nedeniyle ortaya çıkan uçucu ya da sabit asitler de önemli asit kaynaklarıdır (Costanzo, 2018).

Üç basamaklı bir savunma hattı kan pH'ının korunmasında rol oynar.

1. Kimyasal tamponlama

Vücut sıvı bölümlerinde ve kemiklerde bulunan, konjuge asit baz çiftlerini içeren kimyasal tamponlar hızla devreye girmeleri nedeniyle kan pH'ını sabit tutulmasında ilk koruma hattıdır. Bu tamponlar pH değişimlerine bağlı H^+ iyonunu bağlayarak ya da serbest bırakarak fonksiyon gösterir. H_2PO_4 (fosfat tamponu), HCO_3^-/CO_2 tamponu ve protein tamponlar pH düzenlemesinde iş gören başlıca tamponlardır (Rhoades ve ark., 2017).

2. Solunumsal düzenleme

Kan pH'ında meydana gelen azalmalara cevaben dakikalar içinde devreye giren solunumsal düzenleme volatil asitlerin vücuttan CO_2 'ye dönüşerek uzaklaştırılmasını içerir. Kan-beyin bariyeri H^+ ya da HCO_3^- iyonlarına geçirgen olmadığı için kanda H^+ iyonu artışının, beyin omurilik sıvısında karşılığı yoktur. Santral kemoreseptörler CO_2 artışına yanıt vererek solunumu uyarır ve hiperventilasyona neden olur (Nattie ve ark., 1986; Esquivel ve ark., 2010).

Akciğerlerde H^+ ve HCO_3^- iyonları karbonik anhidraz enzimi aracılığıyla H_2O ve CO_2 'e dönüşür ve oluşan CO_2 'nin artan ventilasyon ile uzaklaştırılması sağlanır. Respiratuvar kompensasyon kan pH'ının düzenlemesinde ikinci koruma hattını oluşturur. Bu koruma hattı kimyasal tamponlama sistemlerinden daha güçlü olsa da akciğerler dışı nedenler ile oluşan H^+ artışı solunumsal düzenleme ile tamamıyla düzeltilemez (Palmer ve ark., 2023)

3. Böbrek ile düzenlenme

Kandaki fazla H^+ iyonu diğer koruma hatları ile kısmen etkisiz hale getirilse bile, bu iyonun vücuttan tamamen uzaklaştırılması ancak böbrekler aracılığı ile sağlanabilir. Böbrekler fazla H^+ iyonunu idrarla atarken, ek olarak fazladan HCO_3^- oluşturarak da pH düşüşünü engeller. Böbreklerle atılan H^+ 'in çok azı serbest formdadır, H^+ 'in çoğu tamponlarla birlikte ya da NH_4^+ ile atılır. Buna ek olarak fosfat, klorür ve sülfat gibi kuvvetli asitlerden serbest kalan anyonlar da

idrar yoluyla uzaklaştırılır. Kan pH'ında artış gerçekleştiğinde HCO_3^- atılımında da artış yaşanır, bu şekilde kan pH'ı düzenlenir (Dussol, 2014).

Hormon Salgilama

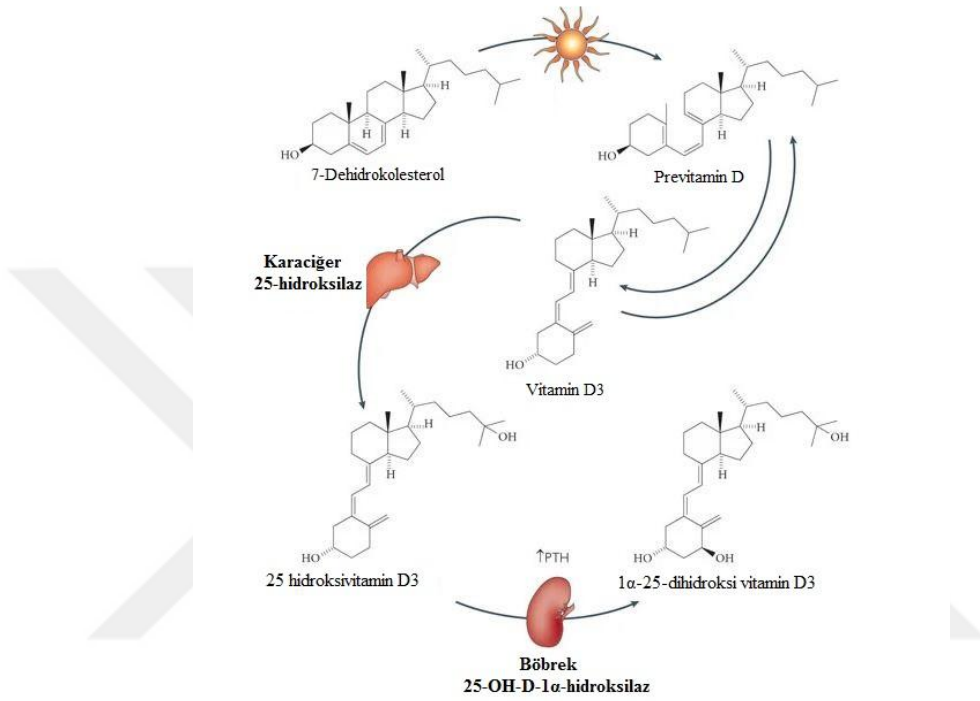
Böbreklerin endokrin fonksiyonları üç hormonun salgılanmasını içerir: renin, eritropoietin ve kalsitriol (1,25-dihidroksikolekalsiferol) (Peart, 1977).

Her bir nefronda çıkan kalın henle kulbu bir kıvrım oluşturur ve glomerüllerde arteriöl duvarı ile temas eder. Jukstaglomerüler aparat olarak adlandırılan bu alan makula densa, mezenjial hücreleri ve JG hücreleri içerir (Boron ve ark., 2019). JG hücreler reninin inaktif formu olan prorenini üretir. Kan basıncı sensörü olarak görev yapan JG hücreleri prorenini, proteolitik özellikteki renine dönüştürür ve sitoplazmik veziküllerde depolar. Azalan renal perfüzyon basıncı ve hiponatremi, renin salınımına neden olan ana etmenlerdir (Morganti, 2019). Hücre içi artan cAMP'ye bağlı ekzositozla salınan renin, karaciğerde üretilen ve dolaşımla böbreğe gelen anjiyotensinojenden preteolitik olarak Ang I oluşumunu sağlar, ACE AngI'i Ang II'ye dönüştürür. Güçlü bir vazokonstriktör olan Ang II'nin böbreklerdeki en önemli etkisi adrenal korteksin glomeruloza hücrelerinden aldosteron salınımını uyarmasıdır. (Carey ve ark., 1997) (Iwai ve ark., 2009).

Eritropoietin, renal kortikal peritübüler interstisyel hücreler tarafından hipoksik koşullara cevaben üretilir. Eritropoietin hormonu eritropoezi ve kemik iliğinde kırmızı kan hücresi oluşumunu uyarır (Acharya ve ark., 2018).

Böbrekler paratiroid hormonunun etkisi altında D vitamininin aktif formunun üretiminden sorumludur (Haussler ve ark., 1977; Peart, 1977). Bir prohormon olan D3 Vitamini (kolekalsiferol), ciltteki 7-dehidrokolesterolün güneş ışığındaki ultraviyole ışınları ile etkileşimi sonucu sentezlenir (Plum ve ark., 2010). Oluşan bu prohormon karaciğerde hidroksile edilir ve 25-hidroksikolekalsiferol üretilir. 25-hidroksikolekalsiferol daha sonra böbrek proksimal tübüllerinde 1α -hidroksilaz enzimi ile 1-25 dihidroksikolekalsiferole hidroksile edilir (Stamp, 1973). Aktifleştirilmiş D vitamini, nükleer bir reseptör aracılığıyla etki göstererek kalsiyum ve fosfor

homeostazisinde görev alır (Acharya ve ark., 2018). Bağırsak epitel hücrelerinde Ca^{+2} bağlayıcı bir protein olan kalbindin sentezini uyarır ve ince bağırsakta gerçekleşen Ca^{+2} emiliminin önemli rol oynar (Lambers ve ark., 2006)



Şekil 2.5. D vitamini biyosentezi (Plum ve ark., 2010)

Böbrekler Ca^{+} konsantrasyonundaki değişikliklere doğrudan cevap verir. Paratiroid hormonu düşük Ca^{+} konsantrasyonlarına cevaben artar ve böbreklerde 1-25 dihidrolksikolekalsiferol üretimini sağlar (Lips, 2006). Bunun tersi de geçerlidir; Ca^{+} konsantrasyonları arttığında paratiroid hormonu baskılanır ve böbrekler paratiroid hormon yokluğunda 25-hidroksikolekalsiferolün 1-25 dihidrolksikolekalsiferol yerine D vitamininin inaktif formu olan 24-25 dihidrolksikolekalsiferole dönüşümü gerçekleşir (Hall ve ark., 2021).

Bunların yanı sıra Na^{+} geri emilimini inhibe ederek natriürezi arttıran prostaglandin E2 ve bradikinin; trombositlerin üretimini ve aktivasyonunu uyararak trombopoetin; spesifik bir ANP tipi olan ürodilatin de böbreklerce üretilir (Acharya ve ark., 2018) (Vallon ve ark., 2006).

Glikoneogenez

Glukoneogenez, aminoasitler, gliserol, laktat gibi öncü maddelerden glukoz üretimidir (Costanzo, 2018). Glukoneojenezin bir sonucu olarak glikozun dolaşıma salınmasını sağlayacak enzim olan glukoz-6-fosfataz aktivitesine sahip olduğu için böbrekler karaciğer ile birlikte dolaşıma glukoz sağlar (Sahoo ve ark., 2023).

Glikoneogenezin ana kaynağı karaciğer olsa da böbrek de bu reaksiyonu gerçekleştirme yeteneğine sahiptir. Öyle ki uzun süreli açlık durumunda karaciğer ile böbreklerin glukoz üretme kapasitesi benzerdir (Hall ve ark., 2021), hatta uzayan açlık durumunda hepatik glukoneogenezin azaldığı renal glukoneogenezin ise 2-3 kat arttığı gösterilmiştir (Björkman ve ark., 1980).

Böbrekler günde yaklaşık 15-55 gr glukoz üretir. Böbreklerde glukoz salınımı renal korteksle sınırlıdır, renal medulla ise hızlı şekilde glukoz harcayan bir dokudur (Vallon ve ark., 2017). Bu durum böbrekten net glikoz salınımının normal koşullar altında karaciğere göre daha düşük gözlenmesinin nedenidir. Laktat, glutamin ve gliserol, insanlarda böbrekler için ana glukoneojenik kaynaklardır (Gerich ve ark., 2001).

2.2. Akut Böbrek Hasarı

2.2.1. Tanım

Akut böbrek hasarı (ABH) GFR’de gerçekleşen ani azalma ile tanımlanan bir dizi sendromu barındırır (Reis, 2020) Perfüzyon basıncındaki azalmaya paralel olarak gelişen GFR’nin azalması, başta serum kreatininin (Cr) ve kan üre nitrojeni (BUN) olmak üzere azotlu atıkların kanda birikmesine neden olur. ABH tanısı bu azotlu atık ürünlerin kanındaki seri ölçümlerine dayanır (Edelstein, 2008).

GFR’nin azalmasıyla kanda biriken azotlu atıklar, böbrek parankiminde de birikerek böbrek hasarına neden olur. 48 saat içinde böbrek fonksiyonlarında hızlı bir düşüş meydana gelir ve bu durum ABH olarak isimlendirilir. ABH GFR’de daha fazla düşüşe, GFR’deki düşüş ise hasarın daha da şiddetlenmesine neden olur ve bu olaylar kısır döngü şeklinde devam eder. ABH sıvı-elektrolit homeostazının sürdürülememesi

sebebiyle kritik hale gelir (Thadhani ve ark., 1996). Daha önceleri akut böbrek yetmezliği olarak bilinen ABH, kronik böbrek hastalığına ya da son dönem böbrek hastalığına dönüşebilir (Murugan ve ark., 2011). Yüksek mortalite ve morbidite ile ilişkili bulunan ABH nedeniyle yılda 2 milyondan fazla ölüm gerçekleşmektedir (Farrar, 2018).

Tübüler hücre hasarı ve vasküler endotel hasarı ile seyreden ABH patofizyolojisi; oksidatif stres, renal hücre apoptozu ve nekrozu, mitokondriyal disfonksiyon ve inflamasyon gibi birçok hasar mekanizmasını barındırır (Basile ve ark., 2012).

2.2.2. Akut Böbrek Hasarı Etiyolojisi

Klinik olarak ABH üç ana etiyolojiye ayrılabilir: postrenal, renal ve prerenal.

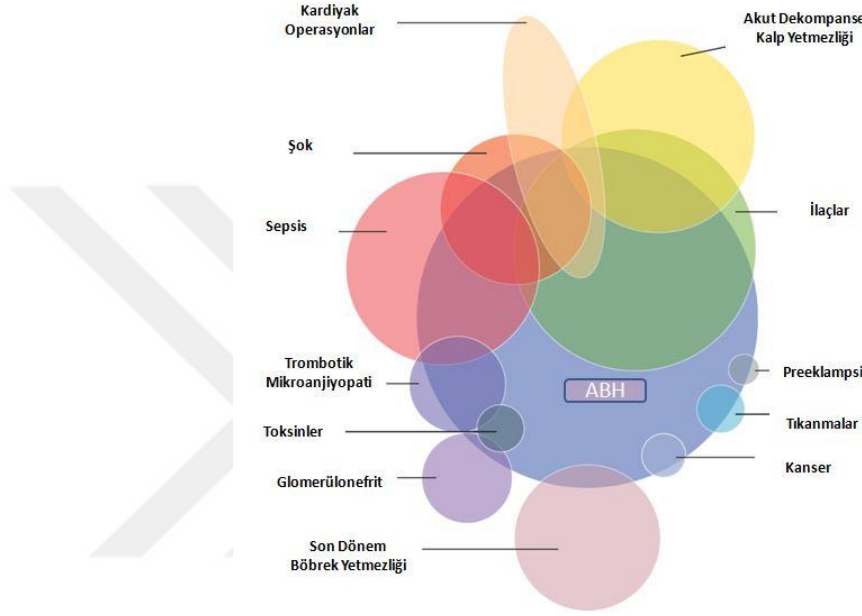
Postrenal ABH adından da anlaşılacağı gibi böbrekten sonra gelen yapılarda gerçekleşen bozukluklar nedeniyle böbrek fonksiyonlarının bozulduğu durumlardır (Jones, 2012). Postrenal ABH'nin nedenleri arasında üreter taşları, nörojenik mesane, papiller nekroz, retroperitoneal fibrozis asiklovir veya indinavir gibi çeşitli maddelerin çökmesine bağlı intratübüler tıkanma, erkeklerde prostat hiperplazisi/kanseri ve kadınlarda jinekolojik kanserler yer almaktadır (Lam ve ark., 2012; Perazella ve ark., 2022). İdrar akışını engelleyen idrar yolu tıkanıklıkları sonucu tübüllerde sıvı basıncı artar ve buna bağlı olarak GFR azalır. Akut idrar yolu tıkanıklığı böbrek kan akışının bozulmasına ve yine GFR'nin azalmasına katkıda bulunan inflamatuvar süreçlere de yol açabilir (Ronco Claudio ve ark., 2019).

Renal ABH, intrarenal ABH olarak da isimlendirilir. Böbrekte kan damarları tübülleri ve glomerülleri de içerebilen, kısacası böbreğin kendisinde gerçekleşen bozukluklardan kaynaklanır (Turgut ve ark., 2023).

Böbreklere giden kan akımının azalmasından kaynaklanan prerenal ABH en sık karşılaşılan ABH nedenidir ve iskemik ABH olarak da isimlendirilir Normalde böbreklere dakikada 1100 ml kan ulaşır (kalp debisinin %20-25'i). Vücut sıvılarının ve bunun içinde çözünmüş maddelerin konsantrasyonlarının hassas şekilde ayarlanabilmesi için GFR'nin korunması şarttır (Hall ve ark., 2021). Glomerüllere gelen kan akımının

azalması, GFR’de düşüşe neden olarak böbrek hasarı tablosunu başlatabilir (Stein, 1992).

ABH bazı durumlarda birden çok nedenle başlayabilir örneğin prerenal hasar ve intrarenal hasar aynı anda bulunabilir.



Şekil 2.6. Akut böbrek hasarı etiyolojisi (Ronco Claudio ve ark., 2019).

Şekil 2.6’de bahsedilen birçok neden böbreklere gelen kan akımının azalmasını içerir.

2.2.3. İskemik Akut Böbrek Hasarı

Yüksek mortalite oranlarıyla ilişkilendirilen ABH’nın yaygın bir nedeni renal iskemidir. Böbrek transplantasyonu, enfeksiyonlar, vasküler tıkanmalar veya hidronefroz gibi durumlarda renal iskemi gelişebilmekte ve bu durum akut böbrek hasarına neden olabilmektedir (Böhmová ve ark., 2001; Wan ve ark., 2003; Requião-Moura ve ark., 2015; Poston ve ark., 2019). Böbrekler normal şartlar altında kan akışındaki azalmalara cevaben GFR’yi düzenleme yeteneğindedir ancak vasküler tıkanmalar gibi kompanse edilemeyen bir durumda oksijen ve metabolik substratların böbreğe ulaşımı yetersizdir (Ronco C. ve ark., 2016). Bu nedenle tübül hücreleri, hücresel metabolizma için gerekli ATP’yi üretmeye devam edemez (Versteilen ve ark., 2004).

İskemik ABH patofizyolojisinde böbrekte hasarın başladığı ilk yer tübüler epitel hücreleridir. Özellikle proksimal tübül hücreleri böbrekte iskemik hasardan en çok etkilenen hücrelerdir. Bunun bir nedeni yüksek metabolizmaya sahip olmaları ve anaerobik glikoliz kapasitelerinin görece düşük olmasıdır (Sutton, 2009). Bir diğer neden ise dış medullada bulunan proksimal tübül segmentlerinin mikrovasküler yapılanmasının çok zayıf olmasıdır. İskemi sonlandığında bile bu bölgeler yeterli perfüzyonu almakta gecikir. Lokal mikrovasküler akışın azalması hipoksinin devam etmesine yol açarak hasara katkıda bulunur (Sharfuddin ve ark., 2011).

İskemi süresince hücrel metabolizmanın bozulması sonucu tübül hücreleri şişer, hücre iskeleti değişiklikleri meydana gelir ve fonksiyonları bozulur (Flores ve ark., 1972; Molitoris, 2004). Tüm nefron segmentlerinde iskeminin neden olduğu hücre şişmesi, başlıca luminal membrandan alınan Na^+ miktarı değişmezken ATP yoksunluğuna bağlı olarak bazolateral membrandaki Na^+/K^+ ATPaz pompasının aktivitesinin ve hızının azalmasından kaynaklanır (Greger, 1987). Bu durum renal tübüler hücre kaybına ve böbreğin fonksiyonlarını sürdürememesine neden olur. Metabolik atık ürünler uzaklaştırılamaz; su ve elektrolit dengesi sağlanamaz (Pefanis ve ark., 2019). Hasarın uzaması durumunda tüm böbrek işlevlerinde bozulma görülür; eritropoietin üretimi azalır ve D vitamininin 25-hidroksilasyonu gerçekleşemez. Vücutta oluşan elektrolit birikimi hızla renal fonksiyonları bozar. ABH'nın devam etmesi sonucunda metabolik asidoz ortaya çıkabilir. (Sharfuddin ve ark., 2011).

Proksimal tübül hücrelerinden vazokonstriksiyona ve hücre adhezyon moleküllerinin aşırı ekspresyonuna neden olan proinflamatuvar sitokinler salınır ve dokuya lökosit hücre infiltrasyonu gerçekleşir (Bonventre ve ark., 2003). Endotel fonksiyonlarında bozulmanın başlaması ve inflamasyonun gelişmesi ABH'yı şiddetlendirir. Dahası böbrek yeniden kanlansa yani reperfüzyon sağlansa bile böbrek hasarlanması devam eder. İ/R hasarı olarak bilinen bu durum, temelinde birçok mekanizmayı barındırır (Basile ve ark., 2012).

İ/R hasarı ve patofizyolojisinde rol oynayan mekanizmalara aşağıda daha ayrıntılı olarak yer verilmiştir.

İskemi/Reperfüzyon Hasarı

İ/R hasarı organların fonksiyonunu bozan hipoksi ve takiben reperfüzyon sırasında ortaya çıkan güçlü inflamatuvar yanıt ve yaygın oksidatif stres ile ilişkilidir (Kanagasundaram, 2015).

İskemik dönemde dokuya gelen kan akımının azalmasıyla dokunun oksijenlenmesinin azalmasına bağlı ATP miktarı azalır ve mitokondriyal disfonksiyon başlar; hücrelerin metabolik faaliyetleri bozulur (Pabla ve ark., 2022). Oksijen yokluğunda hücrelerin aerobik metabolizması sekteye uğrar, anaerobik metabolizma baskın hale gelir. Anaerobik yolla ATP üretimi sonucu meydana gelen laktat birikimi ve diğer metabolik atıkların uzaklaştırılamaması hücrenin asidik hale gelmesine neden olur ve bir süre sonra enerji üretimi tamamen durur (Kosieradzki ve ark., 2008). Hücrelerde ROS, sitokinler ve kemokinler gibi hasarın başlamasına aracılık eden maddeler de birikmeye başlar (Kinsey ve ark., 2008).

Reperfüzyon fazı aerobik metabolizmayı tekrar kazandırıp böbrek hücrelerinin pH'sını ve boyutunu normalleştirir. Fakat aynı zamanda yeniden başlayan kan akımı dokularda serbest radikallerin oluşumu ile de ilişkilidir. Burada ROS kaynakları tübüler epitel hücrelerine ek olarak nötrofiller ve endotel hücreleri gibi hücrelerdir (Johnson ve ark., 1993). İskemiye takiben gerçekleşen reperfüzyon döneminde; hasarlı bölgede ROS üretimi, lökositlerin aktivasyonu ve göçü meydana gelir; böylece doku hasarını şiddetlendiren bir kaskad başlamış olur. Sonuç olarak inflamasyonun artması doku hasarını daha da artırır (Eltzschig ve ark., 2011).

İskemi sırasında fonksiyonlarını yitirmiş mitokondriler doku tekrar oksijenlendiğinde bile hala yeterli ATP'yi üretemezler (Stromski ve ark., 1986). İskemi sırasında mitokondriyal fizyonun artması, mitokondrilerin şişme sonucu normal yapı ve bütünlüğünü koruyamaması normal fonksiyonlarını sürdüremeyen mitokondrilerin oluşmasına neden olur (Wang J. ve ark., 2020). Buna ek olarak mitokondriyal komplekslerin aktiviteleri iskemi sırasında azalır ve reperfüzyonda oksijen sağlandığında bile kompleks aktivitesi düşük seyreder. Tüm bunlar dokuda ATP' nin tükenmesi ve ROS üretiminde artış ile sonuçlanır (Duann ve ark., 2017). Buna ek olarak

İ/R sırasında hücrel antioksidan savunma sistemlerinin aktivitelerinin azaldığı, bazı durumlarda tamamen işlevsiz kaldığı görülür. Tüm bu mekanizmalar beraberce İ/R hasarını şekillendirir (Singh ve ark., 1993).

2.2.4. İ/R Hasarının Patofizyolojisi

2.2.4.1. Vasküler Değişimler

İ/R hasarından böbrek hücreleriyle birlikte vasküler hücreler de etkilenir. İskemiye takiben böbrek mikrovasküler sistemde değişimler ve vasküler endotel tabakasında bozulmalar meydana gelir (Basile ve ark., 2012). Mikrovasküler yoğunlukta iskeminin şiddetine bağlı olarak %20-50 azalma görülür ve bu durum renal fonksiyonların kalıcı kaybına, kronik böbrek hastalığının gelişmesine zemin hazırlayabilir (Hörbelt ve ark., 2007). Endotel hücrelerinde gerçekleşen kayıp sonucu endotelyal hücre-hücre bağlantıları bozulur ve hücre etkileşimleri zayıflar. Buna ek olarak selektinler gibi adhezyon moleküllerinin artmasıyla, lökosit-endotel etkileşimleri de artar ve bu durum endotel geçirgenliğinin artmasına neden olarak endotel disfonksiyonuna katkı sağlar (Basile ve ark., 2012).

Böbreğin mikrovasküler yoğunluğunda ortaya çıkan azalmaya İ/R hasarına bağlı olarak meydana gelen vasküler endotel hücre apoptozu da katkıda bulunur. İskemik hasarı takiben endotelyal hücre katmanı sağlam kaldığında bile bu hücrelerde proapoptotik proteazların aktivasyonunun meydana geldiği gösterilmiştir. Sonuçta iske mi ya da erken reperfüzyon sırasında görülen endotel hücre apoptozu mikrovasküler yoğunluğun azalması ile sonuçlanır (Kwon ve ark., 2009; Sutton, 2009).

İ/R hasarında olduğu gibi mikrovasküler yapının kaybıyla karakterize patolojik durumlarda, mikrovasküler yeniden şekillenme doku onarımı için gereklidir. Bu mikrovasküler yeniden yapılanma vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gibi anjiyogenik faktörler aracılığıyla meydana gelir. VEGF anjiyogenez ve vasküler korumanın güçlü bir düzenleyicisidir. Böbrekte iskeminin neden olduğu VEGF sentezindeki değişiklikler halen tartışmalı olmakla birlikte, İ/R uygulaması ile VEGF üretiminin arttığı tespit edilmiştir (Banai ve ark., 1994; Kanellis ve ark., 2000). Bu

bilgiye zıt olarak İ/R hasarı sonrasında VEGF protein (Hörbelt ve ark., 2007) ve mRNA seviyelerinin artmadığını ortaya koyan çalışmalar da bulunmaktadır (Kanellis ve ark., 2000). Vannay ve ekibi, iskemi sonrası böbreklerde VEGF protein seviyeleri artarken mRNA ekspresyonlarının artmadığını bildirmiştir (Vannay ve ark., 2004). Bu sonuçlar yolağın tanslasyonel aşamada düzenlendiğini düşündürmektedir. İ/R hasarında VEGF seviyelerinin düzenlenmesi ile ilgili olarak literatürde farklı bilgiler yer alsa da, Basile ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada VEGF yolağının inhibisyonunun, İ/R sonrasında görülen böbrek mikrovasküler yoğunluğundaki azalmaya katkıda bulunabileceği gösterilmiştir (Basile ve ark., 2008). Ekzojen VEGF uygulamasının renal İ/R hasarından sonra vasküler yapıyı koruyabildiğini ve böbrek fonksiyonlarının iyileştirdiği gösterilmiştir (Leonard ve ark., 2008).

Sonuç olarak İ/R hasarı mikrovasküler yapının seyrekleşmesine, geçirgenliğinin artmasına ve endotelial bariyer fonksiyonunun bozulmasına ve interstisyuma sıvı geçişine neden olur, bu durum doku hasarını şiddetlendirir (Sutton, 2009).

İ/R hasarı nedeniyle gelişen endotel disfonksiyonu sonucunda, vasküler tonusun düzenlenmesinde rol oynayan endotel kaynaklı vazodilatör ve vazokonstriktör mediyatörler arasındaki denge de bozulur. Endotel kaynaklı nitrik oksit gibi vazodilatör maddeler azalırken, endotelin-1, Ang II, tromboksan A2, prostaglandin H2, lökotrienler gibi vazokonstriktörler artar ayrıca gelişen sempatik tonus artışı da vazokonstriksiyona katkıda bulunur (Kwon ve ark., 2009; da Silveira ve ark., 2010). Böbreğin vasküler yapısı nedeniyle, korteksten medullaya doğru olan kanlanma giderek azalır (Verma ve ark., 2015). Bu nedenle medullaya kan akışı, iskemik hasar sonrasında toplam böbrek perfüzyonundaki azalmayla orantısız bir şekilde azalır (Pallone ve ark., 1998).

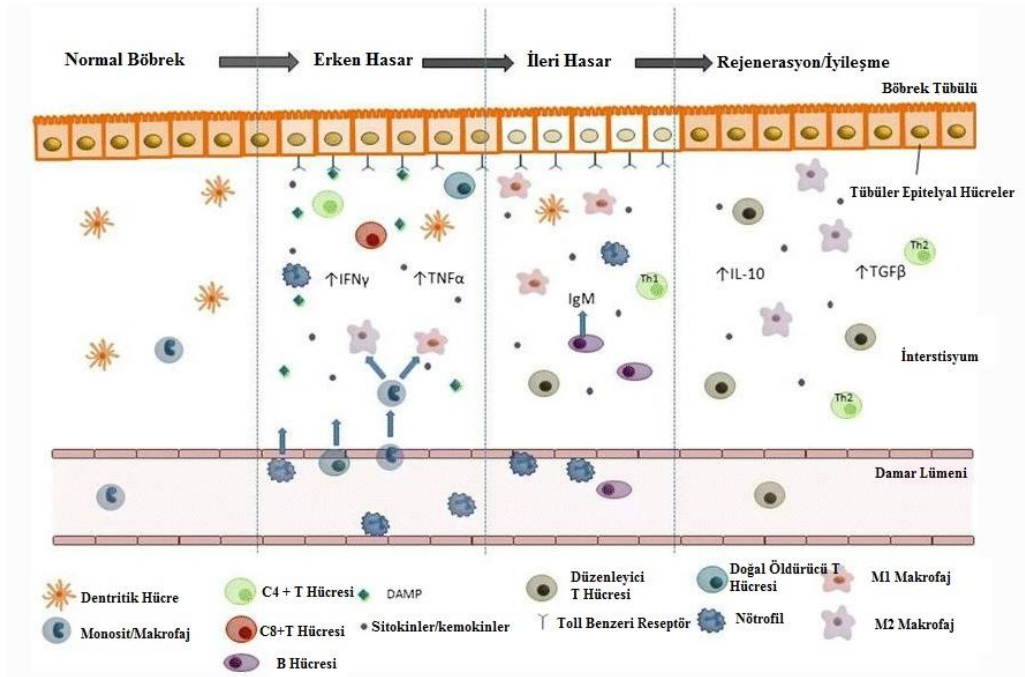
İnflamasyon

İskemik ABH aynı zamanda inflamatuvar bir hastalıktır (Bonventre ve ark., 2004). Renal İ/R durumunda hasarın vasküler endotel hücrelerde ve tübüler epitelde morfolojik ve fonksiyonel değişikliklerle başladığı bilinmektedir (Thurman, 2007). Nekrotik hücreler ile hasarlı tübüler ve endotelial hücreler sitokinler ve kemokinler gibi inflamatuvar medyatörlerin üretilmesine neden olur ve bu da lökositlerin böbreklere infiltrasyonunu

başlatır. Nötrofiller, makrofajlar, doğal öldürücü hücreler ve lenfositler hasarlı böbrek dokusuna sızarlar (de Bhailís Á ve ark., 2021) .

Hasarlı böbrekte inflamatuvar yanıtlar ilk olarak renal vasküler endotel hücrelerinde başlar (Tanaka ve ark., 2017). Ardından tübüler epitel hücreleri de inflamatuvar modülatörleri üretmeye başlayarak bu yanıtı katkıda bulunur. Dokuya immün hücrelerin ulaşması ile lökositler ve renal tübüler hücreler tarafından salınan tümör nekroz faktörü α (TNF- α), interlökin (IL) 1, IL-6 gibi pro-inflamatuvar sitokinler hasarlı böbrekte inflamasyon yanıtını artırır (Thurman, 2007).

Nekrotik hücrelerden salınan hasarla ilişkili moleküler modeller (DAMP) ve hipoksi ile indüklenebilir faktörler (HIF), dolaşımdaki immün hücreleri hasarlı dokuya çeken ana faktörlerdir ve hasarın erken aşamalarında doğuştan gelen bağışıklık sistemini aktive ederler (Bonventre ve ark., 2011). Daha sonra iskemik böbrekte kompleman sistemi aktive olur. Kompleman sisteminin aktivasyonu, bir dizi biyoaktif ürünün (C4a, C3a ve C5a, C5b-9 gibi) serbest bırakılmasını sağlayarak inflamatuvar etkiler gösterir (Malek ve ark., 2015).



Şekil 2.7. Böbreklerde İ/R hasarının sonucu olarak inflamasyon gelişimi.

İskemik ABH'da nötrofiller, dendritik hücreler, monositler/makrofajlar, T ve B lenfositleri rol oynar ve hasarın derecesine göre bu bağışıklık hücrelerinin böbrekteki yoğunlukları değişir (Heinzelmann ve ark., 1999). Bununla birlikte M2 makrofajlar ve düzenleyici T hücreleri, inflamasyonun baskılanmasında ve doku onarımında görev alır. Bu düzenleyici hücreler antiinflamatuvar sitokinler olan ve hasara karşı oluşan immün yanıtı hafifleten IL-10 ve dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)- β 'nın üretiminden sorumludur (Thurman, 2007).

Renal interstisyumdaki nötrofillerin oranı, reperfüzyonun ilk 30 dakikasında yoğun şekilde artar ve yaklaşık 24 saatte en yüksek seviyeye ulaşır (Awad ve ark., 2009). Endotel hücrelerinde eksprese edilen bir adhezyon molekülü olan vasküler adhezyon proteini-1, kemotaktik faktör olarak davranarak renal İ/R hasarında hidrojen peroksit üretimi yoluyla dokuya nötrofil infiltrasyonunu artırır (Tanaka ve ark., 2017). Hasarlı dokuda nötrofiller yapısal apoptoza girerek tanınır hale gelir ve doku makrofajları tarafından fagosite edilir (Savill ve ark., 1989). Bu şekilde apoptotik hücrelerin fagositozla ortadan kaldırılması da doğuştan gelen bağışıklık uyarılarına bağlı olarak pro-inflamatuvar yanıtları tetikleyebilir (Filardy ve ark., 2010).

Oksidatif Stres

-İ/R hasarında ROS oluşumu

Oksidatif stres, doku hasarından kaynaklanan serbest radikal üretimindeki artış olarak tanımlanmaktadır (Peake ve ark., 2004). ROS'lar, yapılarında en az bir eşleşmemiş elektron bulunduran, hücrelerde lipid ve proteinler ile reaksiyona girerek hücrelerin yapı ve fonksiyonlarında bozulmaya neden olan moleküllerdir. Hidroksil radikali ($\text{OH}\cdot$), süperoksit anyonu ($\text{O}_2^{\cdot-}$) hücrede en çok üretilen serbest radikallerdendir. Hidrojen peroksit (H_2O_2) ise bir serbest radikal olmasa da radikal üretiminde görev alarak oksidatif strese katkı sağlar (Kaminski ve ark., 2002).

Normal böbrek fonksiyonları sırasında mitokondriyal solunum zinciri ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidazlar böbrekteki serbest radikallerin ana

kaynağıdır ve süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimler üretilen bu ROS'lara karşı ilk savunma hattını oluşturur (de Bhailis Á ve ark., 2021).

İ/R sırasında hasarlı dokuda büyük miktarlarda ROS üretilir ve bu durum başlıca oksidatif fosforilasyonun yavaşlamasına neden olarak ATP tükenmesi ile sonuçlanır. Bunun yanı sıra hücre içi sitoplazmik kalsiyum artar ve membran fosfolipit proteazlarının aktivasyonu gerçekleşir. ROS'taki artış membran lipidlerinin peroksidasyonu artırır, birçok proteinin, DNA'nın ve mitokondriyal deoksiribonükleik asit (DNA)'nın oksidatif hasarına neden olur. Tüm bu etkiler hücrede ATP'nin tükenmesine, hücre ile mitokondrilerin bütünlüğünün ve fonksiyonlarının bozulmasına, apoptozun artışına katkıda bulunur (Malek ve ark., 2015).

İskemi sırasında hasarlı böbrek hücreleri tarafından üretilen serbest radikaller dokuda oksidatif stresi başlatan faktördür. Ancak reperfüzyon periyodunda, yeniden kan akımı sağlandıktan sonra üretilen radikallerin İ/R hasarına katkısı çok daha büyüktür. Buna ek olarak endotel hücreleri ve reperfüzyon fazında dokuya infiltre olan inflamatuvar hücreler de ROS üretimine katkıda bulunur (Henson ve ark., 1987). Reperfüzyon sırasında üretilen serbest radikallerin büyük ölçüde nötrofil kaynaklı olduğu bilinmektedir (Kaminski ve ark., 2002).

Hücrelerde O_2 molekülünün elektron alarak indirgenmesi ile oluşan $O_2^{\cdot-}$ 'nin ana kaynağı mitokondrilerdir. Enerji üretim aşamasında görülen elektron sızıntıları $O_2^{\cdot-}$ oluşmasına neden olur. İskemi sırasında başlayan ve reperfüzyon döneminde de devam eden mitokondriyal disfonksiyon nedeniyle elektron sızıntıları ve buna bağlı serbest radikaller artar. İskemi durumunda mitokondriyal aktivitede azalma görülse de elektron sızıntıları devam eder ve daha fazla serbest radikal üretilir.

İ/R hasarı dokuya nötrofillerin ve diğer inflamatuvar hücrelerin migrasyonuna neden olur (Li Z. ve ark., 2022). Hasarlı hücreler ve inflamatuvar hücrelerin neden olduğu proinflamatuvar sinyaller, nötrofillerin plazma membranlarında bulunan NADPH oksidaz enzimi aracılığıyla ROS üretimine katkı sağlar. Üretilen ROS genellikle $O_2^{\cdot-}$ dur ve interstisyel aralığa serbestlenir (Weiss, 1989). Bu $O_2^{\cdot-}$ ları daha sonra $OH^{\cdot}$, H_2O_2 ve hipokloröz asit gibi diğer ROS'lara dönüştürülebilir (Henson ve ark., 1987).

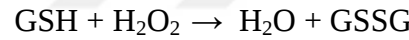
-İ/R hasarında antioksidan savunma sistemleri

Normal koşullarda hücrel metabolizma nedeniyle üretilen düşük miktarlarda ROS, savunma sistemleri tarafından hızla temizlenir. Bu savunma sisteminde görev alan başlıca enzimler SOD, glutatyon peroksidaz (GPx), CAT'dır ve bu enzimlerin aktivitelerinin azalması, İ/R patofizyolojisine katkıda bulunur.

SOD serbest radikallerin temizlenmesinde en etkili endojen antioksidan enzimdir ve aşağıda da gösterildiği gibi; bir $O_2^{\cdot-}$ yükseltgeyerek moleküler oksijen oluştururken bir diğerini H_2O_2 'ye indirgenmesini kataliz eder (Kaminski ve ark., 2002).

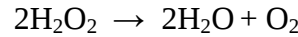


GPx; aşağıdaki reaksiyonda görüldüğü gibi, selenyum varlığında glutatyon (GSH)'dan glutatyon disülfid (GSSG) üretirken aynı zamanda H_2O_2 'den su üretilmesini sağlayan antioksidan enzimdir.



İskemi sırasında böbrekte SOD ve GPx seviyeleri değişmezken enzim aktivitelerinin azaldığı bildirilmiştir (Singh ve ark., 1993). Buna ek olarak renal iskemi sonrasında önemli bir hücre içi antioksidan olan GPx substratı GSH'ın seviyelerinin de düştüğü bilinmektedir (Wang B. ve ark., 2010).

Hücrede peroksizomlar tarafından üretilen CAT enzimi H_2O_2 'in su ve oksijene ayrılmasını katalizler.



İskemi sırasında böbrekte CAT protein seviyeleri değişmese de enzim aktivitesinin 90 dakikalık renal iskemi ile yaklaşık %35 azaldığı gözlenmiştir (Gulati ve ark., 1992). Reperfüzyon sırasında ise hem enzim sentezindeki azalma hem de proteolitik aktivitede görülen artış CAT protein seviyelerinin de azalmasına neden olur. Bunun sonucunda reperfüzyon periyodunda CAT aktivitesinin daha fazla azaldığı gözlenir (Singh ve ark., 1993).

İskemi sırasında CAT dışındaki antioksidan enzim aktiviteleri değişmese de reperfüzyon periyodunda ve sonrasında SOD, CAT ve GPx gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinde düşüş görülür, bu durum reperfüzyonda oksidatif stres kaynaklı hasarın şiddetlenmesine katkıda bulunur (Singh ve ark., 1993).

Mitokondriyal Disfonksiyon

Hücre içinde enerji üretiminden sorumlu olan mitokondriler; hücre içi kalsiyum depolanması ve homeostazisi, apoptotik yolların düzenlenmesi gibi görevleri de yerine getirmektedir (Ng ve ark., 2021). Bununla birlikte mitokondriler, ROS üretiminde de başlıca rolü üstlenmektedir. Normal şartlarda enerji üretimi sırasında elektron transport zincirindeki (ETZ) elektron sızıntıları nedeniyle üretilen az miktarda serbest radikalın, hücrenin redoks durumunun korunmasında fonksiyon gösterdiği düşünülmektedir (Pabla ve ark., 2022).

Böbrek dokusu metabolik aktivitesi yüksek bir dokudur ve kalpten sonra en zengin mitokondriyal içeriğe sahiptir (Bhargava ve ark., 2017). Renal sistemde yer alan hücreler farklı mitokondriyal içeriğe, morfolojiye ve zar potansiyeline sahiptir. Bunun başlıca nedeni hücrenin enerji üretim tercihidir (Ahmad ve ark., 2021). Örneğin madde taşınımı için yüksek enerjiye ihtiyaç duyan ve glikolitik kapasiteleri düşük olan proksimal tübül epitel hücreleri, bu enerjiyi neredeyse tamamen mitokondriyal oksidatif fosforilasyon yoluyla üretir ve bu durumla uyumlu olarak yüksek mitokondri yoğunluğuna sahiptir. Buna karşın inen ve çıkan ince henle kulbu epitel hücreleri, vasküler endotel hücreleri ve podositler daha yüksek glikolitik kapasiteye, daha düşük mitokondriyal içeriğe sahiptir (Wirthensohn ve ark., 1986). Bu durum İ/R hasarı gibi direkt mitokondrileri etkileyen bir hasar durumunda mitokondrilerden zengin hücrelerin daha fazla hasar almasına neden olur. Gerçekten de gerek mikrovasküler yapılanmaları gerekse mitokondriyal disfonksiyondan daha fazla etkilenmeleri nedeniyle proksimal tübüler epitelyal hücreler böbrekte İ/R hasarından en fazla etkilenen hücrelerdir (Sharfuddin ve ark., 2011).

Normal böbrek dokusunda mitokondriyal içerik denge halindedir, enerji ihtiyaçlarına cevaben mitokondriyal biyogenez devam ederken diğer yandan hasarlı mitokondriler

ortadan kaldırılır ve bu şekilde mitokondriyal homeostaz sürdürülür (Ahmad ve ark., 2021; Su ve ark., 2023).

Renal İ/R hasarına bağlı gelişen mitokondriyal disfonksiyon; organelin şişmesi, kristalar ve zarlar arası boşlukların artması, mitokondriyal zar potansiyelinin ve dolayısıyla mitokondriyal fonksiyonun azalması ile karakterize bir süreçtir (Duann ve ark., 2017). Renal mitokondriler İ/R hasarı sonrası tamamen fonksiyonlarını yitirebilir. Fonksiyonunu sürdürebilen mitokondrilerde yüksek düzeyde elektron sızıntıları gözlenir ve kompleks I, kompleks II, ATP sentaz gibi ETZ enzimlerinin aktiviteleri azalır. Tüm bunların sonucunda hücrede üretilen ATP miktarları azalır. Hasarlanmanın devam etmesi durumunda nekrotik ya da apoptotik ölüm yolları aktive edilebilir ve renal tübüler hücre ölümü gerçekleşebilir bunun sonucu olarak da böbrek fonksiyonlarının kaybı gerçekleşebilir (Szeto, 2017).

Sağlıklı hücrelerde mitokondriyal fizyon (ayrılma/bölünme) ve füzyon (birleşme) reaksiyonlarının oranı dengede tutulur. Hücrede iskemi durumunda enerji ihtiyacının artışı mitokondriyal bölünmeyi indükler ve İ/R hasarı mitokondriyal fizyon reaksiyonlarının artışı ile sonuçlanır. Aşırı mitokondriyal bölünme solunum fonksiyonu gerçekleştiremeyen mitokondriyal fragmentlerin oluşumu ile sonuçlanır (Quiles ve ark., 2022). Renal İ/R sonrası mitokondriyal füzyon sürecini düzenleyen füzyon proteinlerinin aktivasyonun, apoptozu ve doku hasarını azalttığı ortaya konmuştur (Yang W. ve ark., 2023).

Normal şartlarda hasarlanan mitokondrilerin zar potansiyellerinde azalmalar aracılığı ile tanınarak mitofaji mekanizmalarıyla ortadan kaldırılır (Su ve ark., 2023). IR hasarı sonrasında böbrek dokusunda ROS artışına bağlı olarak mitokondriyal DNA hasarı gerçekleşir ve mitokondriyal membran potansiyeli azalır. İ/R hasarı sonrasında mitofaji mekanizmaları devreye girer ve hasarlı mitokondrilerin yok edilmesi sağlanır. Renal İ/R modelinde deneysel olarak mitofajinin baskılanmasının hücre apoptozu ve böbrek hasarını artırdığı gösterilmiştir. İ/R ile artan mitofaji yoluyla hasarlı mitokondrilerin ortadan kaldırılmasının böbreklerde gelişebilecek fonksiyon bozukluğuna karşı koruyucu bir rol üstlendiği düşünülmektedir (Li N. ve ark., 2018).

Diğer faktörlerin İ/R Hasarına Katkısı

Nitrik oksit

NO endotel hücrelerinden salınarak difüze olabilen biyoaktif bir moleküldür. Yarılanma ömrü çok kısa olan NO güçlü bir vazodilatördür. NO nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla üretilir (Moncada ve ark., 2006). Renal vasküler fonksiyonlarda görev alan iki farklı NOS izoenzimi bulunur; endotelyal NOS (eNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS) (Kone ve ark., 1997) . Renal İ/R, renal sistemde yer alan endotel hücrelerinin hasar görmesine neden olur. Hasarlı endotel hücrelerinde eNOS aktivitesi baskılanır ve buna bağlı olarak eNOS kaynaklı NO azalır (Bonventre ve ark., 2003).

Renal İ/R hasarında düşük konsantrasyonlarda NO'nun vazodilatasyonu sağlayarak, trombosit agregasyonunu baskılayarak, iskemik dokuya göçen lökositlerin endotele adhezyonunu azaltarak ve antioksidan etki göstererek iskemik hasarı azalttığı gösterilmiştir (Phillips ve ark., 2009). Aynı şekilde nitritin de renal İ/R hasarında böbrek fonksiyonlarını koruyucu etkilerinin bulunduğu ortaya konmuştur (Tripathi ve ark., 2007) Nitritin bu etkiyi iskemik koşullarda ksantin oksidaz ve NOS enzimleri aracılığıyla NO'ya dönüştürülerek gösterdiği düşünülmektedir (Millar ve ark., 1998).

Renal İ/R gibi oksidatif stres koşullarında eNOS inhibisyonuna karşı, iNOS aktivasyonu gerçekleşir. iNOS aktivasyonu yüksek konsantrasyonlarda ve daha uzun sürelerde NO üretimi ile sonuçlanır (Pararajasingam ve ark., 1999). İ/R da artan süperoksit anyonu NO ile birleşerek, DNA hasarına ve lipid peroksidasyonuna neden olan peroksinitritin oluşumuna neden olur. Uzun süreli NO maruziyeti miyokondriyal solunum kompleksleri üzerine baskılayıcı etkiler yapar, hatta bu durumun kompleks 1'in kalıcı inhibisyonuna neden olarak sitotoksik etki gösterebilir (Goligorsky ve ark., 2002) (Küçük ve ark., 2012; Malek ve ark., 2015).

Renin Anjiyotensin Sistemi

Daha öne açıklandığı gibi İ/R hasarı endotel hücrelerinde ve vasküler fonksiyonlarda değişikliklere neden olur. İ/R hasarı sonrası Ang II gibi vazokonstriktör ajanlar artar ve bu durum vasküler direncin kalıcı olarak artması ve GFR'nin azalması ile sonuçlanır.

(Bonventre ve ark., 2003). Ang II renal etkilerini anjiyotensin tip 1 (AT1) reseptörleri üzerinden gösterir. Yapılan çalışmalarda AT1 reseptör antagonistlerinin renal iskekiye bağlı gelişen oksidatif stresi azalttığı ve renal İ/R hasarında böbrek fonksiyonlarını koruduğu bildirilmiştir (Kontogiannis ve ark., 1998; Seifi ve ark., 2015).

İ/R sonrası Ang II düzeyleri renin-anjiyotensin sisteminin aktivasyonu yoluyla artar. Bu sistemin aktivasyonu Mas reseptörleri üzerinden etki gösteren Ang 1-7'nin de artmasına neden olur (Iwai ve ark., 2009). Fizyolojik rolleri henüz tam olarak aydınlatamasa da Ang 1-7'nin, bradikinin ve NO düzeylerini artırarak vazodilatasyona neden olduğu bilinmektedir (Nakamoto ve ark., 1995; Brosnihan ve ark., 1996; Fernandes ve ark., 2001). AT1 reseptörlerini antagonize ederek de etki gösteren Mas reseptör aktivasyonunun renal İ/R hasarına karşı renoprotektif etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Kostenis ve ark., 2005; Barroso ve ark., 2012)

2.2.5. İ/R Hasarında Hücre Ölüm Yolakları

İskemik hasarın ardından böbrek dokusunda hem apoptotik hem de nekrotik hücreler görülür. İ/R ile oluşturulmuş akut böbrek yetmezliği modellerinde, oksijen yoksunluğunun ve serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu hasar, hücrenin apoptoza ya da nekroza girerek ölmesine neden olabilmektedir. Özellikle renal iskei sırasında gelişen tübüler nekroz dokudaki hasarın kaynağını oluştursa da renal İ/R hasarının akut böbrek yetmezliği ile sonuçlanmasında patolojik apoptoz mekanizmalarının rolü büyüktür (Saikumar ve ark., 2003).

Hücrenin apoptoz ile mi yoksa nekroz ile mi öleceğini hücre içi ATP seviyeleri belirler. Hücresel hasar fazla ise apoptotik yolak için gereken enerji sağlanamayacaktır ve hücre nekroz ile parçalanarak ölecektir. Fakat eğer enerji sağlanabilirse hücre kendisini aktif olarak yok edeceği, yangı yanıtı oluşturmayan, apoptoz yollarına girebilecektir (Gokhan ve ark., 2020). Bu ayrımı hasarlanmış hücrelerin ölüm şekillerinde mitokondrilerin çok büyük bir rol üstlendiğini gözler önüne sermektedir. İskei sırasında hücre ölüm mekanizmalarında nekrotik ölüm mekanizmaları başrol oynasa da, reperfüzyon periyodunda dokunun yeniden oksijenlenmesiyle ATP miktarının artması

apoptotik hücrelerin daha fazla görülmesine neden olur. (Havasi ve ark., 2011; Jun ve ark., 2020).

Nekroz

İskemik böbrek hasarı nedeniyle ortaya çıkan fonksiyon kaybı, tübüler nekroz ve buna bağlı gerçekleşen nefron fonksiyon kaybıyla ilişkilidir (Venkatachalam ve ark., 2015). İskemi durumunda oluşan nekrozda hücre ölümünü başlatan esas faktör ATP tükenmesidir (Kosieradzki ve ark., 2008).

ATP tükenmesine bağlı olarak gerçekleşen Na^+/K^+ ATPaz inhibisyonu, hücrede Na^+ birikmesine ve hücrenin şişmesine neden olur. Şişme sonucu hücrelerin parçalanması ile ölüm gerçekleşebilir. Bu tip nekrotik hücre ölümü bazı eski kaynaklarda onkoz (oncosis) olarak da isimlendirilse de bu terim günümüzde nadiren kullanılmaktadır (Majno ve ark., 1995).

Nekrotik hücre ölümünde lipid peroksidasyonu büyük rol oynar. İ/R hasarı sonrasında artan oksidatif stres plazma membran lipidlerinin peroksidasyonuna neden olur, bu durum plazma membran bütünlüğünün kaybı ile sonuçlanır (Palipoch, 2013).

“Demire Bağlı Nekroz” olarak da adlandırılan ferroptotik hücre ölümünde fosfolipit peroksidasyonuna hücre içinde biriken demir aracılık eder (Dixon ve ark., 2012). Artan oksidatif stres sonucu artan Fenton Reaksiyonu sitoplazmada kararsız bir demir havuzu oluşmasına neden olur ve ferroptozise bağlı hücre ölümünü stimüle eder (Liu J. ve ark., 2023). Ferroptoziste tipik nekrotik hücre morfolojisinden farklı olarak sitoplazma ve organellerin şişmesi söz konusu değildir (Li J. ve ark., 2020).

Normal şartlarda demir kaynaklı lipid peroksidasyonu GPx4 tarafından önlenir. Fakat iskemi durumunda, sistenin hücre içine alınamasından sorumlu sistin/glutamat zıt taşıyıcısı inhibe olur ve sistin hücre içine alınamaz. Sistein yokluğuna bağlı GSH'nın tükenmesi, bu savunma sisteminin çalışamamasına neden olur (Dixon ve ark., 2012; Maremonti ve ark., 2022).

Her ne şekilde meydana gelirse gelsin nekroz durumunda gerçekleşen hücre zarı yırtılması DAMP'lerin serbest kalmasına yol açar, bu durum apoptozisin aksine inflamasyonun tetiklenmesine neden olur (Pefanis ve ark., 2019).

Apoptoz

Programlı hücre ölümü anlamına gelen “apoptoz”, homeostazisin sağlanması için gereklidir. Hücre çoğalması ve hücre farklılaşmasında önemli yeri olan bu hücre ölümleri fizyolojik bir sürecin sonucudur (Elmore, 2007). Bu mekanizma normal şartlar altında bir dokuda hasarlanmış hücrelerin çevresine zarar vermeden, immünolojik olarak sessiz şekilde, ortadan kaldırılmasını sağlar. Hasarlı hücede gerçekleşen biyokimyasal ve morfolojik değişimin ardından oluşan apoptotik hücrelerin fagositik hücrelerce tanınması ve yok edilmesi gerçekleşir (Müller ve ark., 2004; Gokhan ve ark., 2020).

Hasarlanmış hücrelerde kaspazların aktivasyonunu içeren patolojik apoptoz ekstrinsik ve intrinsik yollardan gerçekleşebilir;

Ekstrinsik yol adından da anlaşılacağı gibi ölüm sinyalinin hücre dışından gelmesiyle aktifleşen apoptoz yoludur. Bu ölüm sinyali T lenfositleri gibi hasarlanmış hücreleri tanıyan hücreler tarafından getirilir. Ekstrinsik yol Fas ligandının hedef hücre yüzeyindeki fas reseptörlerine bağlanmasıyla başlatılır. Fas reseptörlerinin ekstraselüler domeini ligandını bağlayınca reseptörün intraselüler domeininde konformasyonel bir değişiklik gerçekleşir. Fas reseptörünün değişime uğrayan intraselüler domeini hücre içinde bulunan Fas ile ilişkili ölüm domeini (FADD) adındaki protein ile etkileşime girer ve bu etkileşim prokaspaz 8'in kaspaz 8'e dönüşümünü sağlar. Bu şekilde ekstrinsik yolda apoptotik kaspaz kaskadı başlatılır (Kiraz ve ark., 2016).

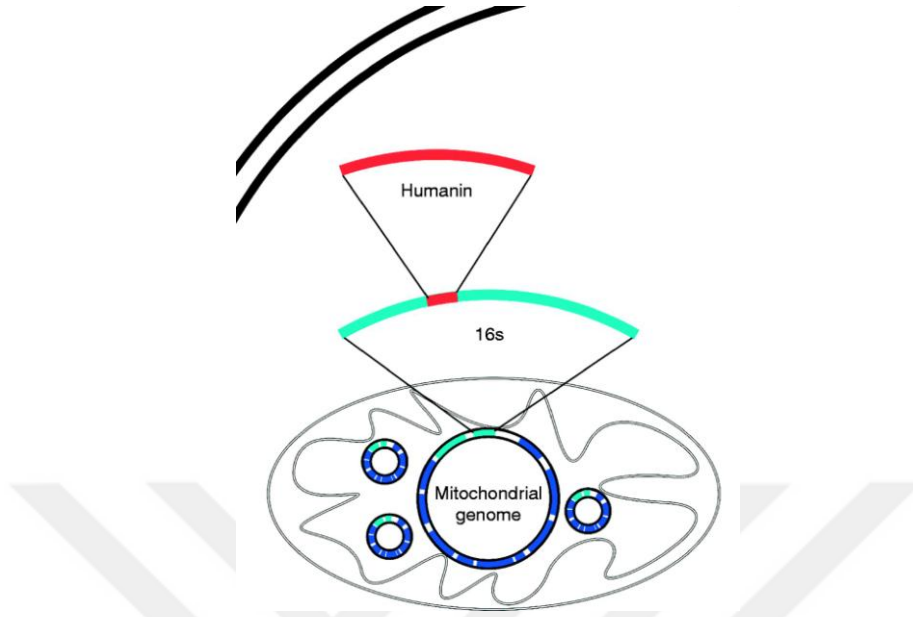
İntrinsik yolda ise ölüm sinyali apoptoza gidecek olan hücrenin içinden gelir. Apoptozun mitokondriyal yolu olarak da adlandırılan bu yolak B hücreli lenfoma (Bcl) 2 protein ailesinin üyeleri tarafından düzenlenir (Adams ve ark., 2007). Bcl-2 protein ailesinin üyeleri mitokondriyel membranda yerleşmiş bulunan iki protein setinden oluşur ve apoptoz bu protein setleri arasındaki denge ile düzenlenir. Bunlar BCL-2, BCL-x gibi

antiapoptotik proteinler ve (Bcl-2 ilişkili protein X) (BAX) , BCL2-antagonist/killer 1 (BAK) gibi proapoptotik proteinlerdir. Hücrelerde normal şartlar altında antiapoptotik proteinler proapoptotik proteinleri bağlayarak bloklamaktadır. Fakat İ/R hasarında artan mitokondriyal hasar durumunda BCL-2 ve BCL-x bloklanır ve BAX ve BAK serbest hale geçerek mitokondriyal membranda porlar oluşturur. Mitokondriyal içerik organel dışına sitoplazmaya geçer. Sitozole salınan sitokrom-c, apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (Apaf-1) adındaki sitoplazmik proteinine bağlanarak kaspaz kaskadını aktifleştirecek kompleksi oluşturur (Gibson ve ark., 2015).

Apoptoz hücre içinde farklı yollarla da indüklenebilir, bu programlanmış hücre ölümünü başlatan başlıca sinyal sitoplazmik Ca^{2+} birikimi olarak görülmektedir (Hajnóczky ve ark., 2003). İskemi sırasında ATP yoksunluğu sebebiyle Na^+/K^+ ATPaz pompası çalışmaz ve sodyumu uzaklaştıramaz; bu durum hücre içinde Na^+ birikmesine neden olur (Müller ve ark., 2004). Normal şartlarda hücre içi Na^+ konsantrasyonu düşüktür ve Na^+/Ca^{2+} zıt taşıyıcısı Na^+ u hücre içine alırken Ca^{2+} u sitoplazmadan uzaklaştırır. Ancak iskemik hücrelerde Na^+ birikimi gerçekleşir ve Na^+/Ca^{2+} zıt taşıyıcısı ters yönde çalışmaya başlar. Bu durum sitozolde Ca^{2+} birikmesiyle sonuçlanır. Sitozolik Ca^{2+} birikimi kaspazları aktive ederek apoptozisi başlatabilir (Versteilen ve ark., 2004).

2.3. Humanin

HN hücrel stresle yanıt olarak üretilen mitokondriyal türevli bir peptittir ve mitokondriyal *MT-RNR2* geni tarafından kodlanır. 24 aminoasitli HN, 2001 yılında Alzheimer hastalarında amiloid beta ($A\beta$) plaklarında tespit edilerek tanımlanmıştır ve Alzheimer hastalarının “insanlığını” geri kazandırma potansiyeline ithafen “Humanin” olarak isimlendirilmiştir (Hashimoto Yuichi ve ark., 2001a; Hashimoto Yuichi ve ark., 2001b; Tajima ve ark., 2002). HN mitokondriyal 16S ribozomal ribonükleik asit (rRNA) içindeki bir açık okuma çerçevesindeki 75 baz çiftinden kodlanır (Yen ve ark., 2013).



Şekil 2.8. Mitokondriyal humanin geni. Humanin, mitokondriyal genomdaki 16s ribozomal alt biriminde bulunan ORF tarafından kodlanır (Yen ve ark., 2013).

Tanımlandığı Alzheimer hastalığında nöroprotektif etkileri yoğun şekilde araştırılan HN'nin, daha sonra birçok farklı dokuda eksprese edildiği saptanmış ve çalışmalar hız kazanmıştır. HN'nin etkilerini hücre membranında yerleşik reseptörlerine bağlanarak gösterdiği bilinmektedir. Bununla birlikte hücre içinde çeşitli moleküllerle etkileşime girerek de hücresel olayları düzenliyor olabileceği bildirilmiştir (Rochette, 2020).

2.3.1 Humaninin yapısı

HN peptidinin yapısı; negatif yüklü C-terminali (PVKRRA), pozitif yüklü N-terminali (MAPR) ve merkezi hidrofobik bölge (GFSCLLLLLTSEIDL) olmak üzere üç bölgeden oluşur (Yamagishi ve ark., 2003; Maftei ve ark., 2012).

Dizi analizi çalışmaları 14 insan HN izoformunun bulunduğunu göstermektedir. Buna ek olarak insan HN'ni şempanzeler, bonomo maymunları, balina ve farelerdeki HN ile dizi homolojisi gösterir. Bu bulgu HN'nin türler arasında korunduğunu göstermektedir (Zhu ve ark., 2022). Bununla birlikte HN ile %73 homoloji gösteren bir sıçan geni tanımlanmış ve bu genin ürünü Rattin olarak isimlendirilmiştir. Rattinin keşfi benzer fizyolojik etkilere sahip, HN benzeri peptitlerin bulunduğunu göstermektedir (Caricasole ve ark., 2002).

HN'nin yapı analizleri fonksiyonu hakkında da bilgi verir; HN yapısında proapoptotik BAX ve insülin benzeri büyüme faktörü bağlatıcı protein (IGFBP) 3 ile etkileşime girmesini sağlayan aminoasit rezidüleri barındırır (Ikonen ve ark., 2003; Choi ve ark., 2007; Hazafa ve ark., 2021). Sitoprotektif etkileri ortaya konan ve plazma konsantrasyonu yaş ile birlikte azalan HN'nin böbrek, kalp, iskelet kası, beyin, karaciğer ve testis dahil olmak üzere çeşitli dokularda ve sperm hücrelerinde fizyolojik olarak üretildiği bilinmektedir (Muzumdar ve ark., 2009; Moretti ve ark., 2010; Chin ve ark., 2013).



Şekil 2.9. Humanin aminoasit yapısı ve aktif bölgeleri (Zhu ve ark., 2022).

Humanin G (HNG) adı verilen HN analogu, 14. Pozisyonda yerleşmiş olan serin amino asidinin glisinile değiştirilmesiyle oluşturulmuştur ve HN'den daha potenttir (Hashimoto Yuichi ve ark., 2001a; Hashimoto Yuichi ve ark., 2001b).



Şekil 2.10. Humanin G'nin amino asit dizilimi (Zhu ve ark., 2022).

2.3.2. Humanin Metabolizması

Fizyolojik koşullarda HN'nin endojen üretiminin ve metabolizmasının ne şekilde düzenlendiği henüz netlik kazanmamıştır ancak HN'nin kan düzeylerinin fizyolojik ve çeşitli patolojik durumlarda ne şekilde etkilendiği ile ilgili çalışmalar sürmektedir. Kronik hastalıklarda ve yaşlanma ile plazma HN seviyelerinin azaldığı bilinmektedir. Mitokondriyal disfonksiyon ve mitokondriyal solunumda azalma geliştiği bilinen iskemik kalp hastalığı teşhisi almış kişilerde ve koroner endotel disfonksiyonuna sahip hastalarda plazma HN seviyelerinin belirgin şekilde azaldığı tespit edilmiştir (Widmer ve ark., 2013; Zhloba ve ark., 2018). Ayrıca korunmuş koroner endotel fonksiyonlarının

dolaşımdaki HN seviyeleri ile pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur (Widmer ve ark., 2013). İnsanlarda akut dayanıklılık egzersizi takiben 30 dakika içinde HN plazma seviyelerinin arttığı, egzersizden 3 saat sonra yüksek kalmaya devam ettiği gözlemlenmiştir. Akut direnç egzersizi ise HN plazma seviyelerini etkilememiştir (von Walden ve ark., 2021). Direnç egzersizi ile plazma HN seviyeleri değiştirmezken, iskelet kasında HN seviyelerini arttığı belirlenmiştir (Gidlund ve ark., 2016).

HN ve analoglarıyla yapılan farmakokinetik çalışmalar HN'nin yarı ömrünün farelerde 10-30 dk, sıçanlarda ise 4-24 saat arasında olduğunu ortaya koymuştur (Chin ve ark., 2013).

HN analoglarının ip enjeksiyonlarının ardından 10-30 dk sonra kanda pik seviyelere ulaştığı görülmüştür. HN'nin IGFBP-3'e bağlanmayan analoglarının daha düşük pik konsantrasyonlarına sahip olduğu ve plazmadan daha yavaş temizlendiği tespit edilmiştir. Bu bulgular dolaşımdaki IGFBP-3'ün, HN analoglarını bağlayarak kandaki pik noktası, yarılanma süresi ve plazmadan temizlenme hızlarını modüle edebildiğini göstermiştir. Çalışmalar HN analoglarının plazmadan temizlenmesini dolaşımdaki IGFBP-3 düzeylerinde azalmanın takip ettiğini ortaya koymuştur (Chin ve ark., 2013).

2.3.3. Humanin Reseptörleri ve Etki Mekanizması

Çeşitli çalışmalarda HN'nin antiapoptotik antiinflamatuvar ve antioksidan etkiler gösterdiği ortaya konmuştur, ayrıca mitokondriyal fonksiyonları düzenleyerek de etki gösterdiği bilinmektedir (Jin ve ark., 2010). Mitokondriyal genomdan ifade edilerek üretilen HN hücre dışına salınarak kan dolaşımına geçer. HN etkilerini otokrin, parakrin ve endokrin şekilde gösterebilir. Hücre içi proteinler ile direkt olarak etkileşime girebildiği gibi hücre membran reseptörlerine bağlanarak da etki gösterebilir (Rochette, 2020).

HN'nin bilinen farklı iki reseptörü vardır. Bunlardan ilki formilpeptid benzeri reseptör (FPRL) -1/2; ikincisi trimerik kompleks reseptörüdür. Trimerik reseptör; siliyer nörotrofik faktör reseptörü (CNTFR), IL-27 reseptör WSX-1 (WSX-1) ve glikoprotein (gp) 130'dan oluşur (Ying ve ark., 2004; Hashimoto Y. ve ark., 2005). HN'nin periferik

dokularda henüz keşfedilmemiş alternatif bir reseptörüne bağlanarak da etki gösterebileceği düşünülmektedir (Matsuoka ve ark., 2010).

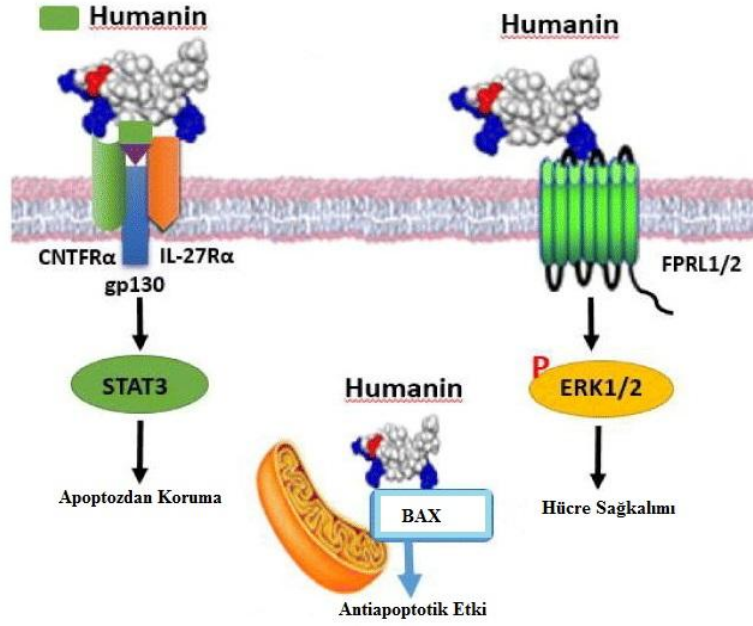
FPRL-1/2 Reseptörü

FPRL-1/2 reseptörü G proteini bağlı bir reseptördür. HN'nin FPRL-1/2 reseptörüne bağlanarak apoptoz sinyal düzenleyici kinaz (ASK) ve c-Jun N-terminal kinaz (JNK) sinyal yollarını aktive ettiği ve bu yolla hücre dışı sinyalle regüle edilen kinazların (ERK)1/2 fosforilasyonunu uyardığı gösterilmiştir (Ying ve ark., 2004).

Trimerik Kompleks Reseptörü

HN trimetrik kompleks reseptörüne bağlanarak Janus kinaz (JAK)2/Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 3 aktivatörü (STAT3) yolağını başlatır. Lökositler, nöronlar, kardiyomiyositler gibi çeşitli hücre tiplerinde hücrel stres koşullarında gösterdiği sitoprotektif ve antiapoptotik etkilerinin trimerik reseptörü üzerinden, JAK2/STAT3 yolağı aracılığıyla gerçekleştirdiği ortaya konmuştur (Hashimoto Yuichi ve ark., 2009; Zuccato ve ark., 2019).

Buna ek olarak hücre içinde BAX ve insulin IGFBP3'e bağlanarak da antiapoptotik fonksiyon gösterdiği bildirilmiştir (Guo ve ark., 2003; Ikonen ve ark., 2003; Choi ve ark., 2007). HN'nin, mitokondrinin dış zarında BAX'ın translokasyonunu durdurarak mitokondriyal porların açılmasını engellediği ve bu şekilde apoptozu inhibe ettiği bilinmektedir (Ma ve ark., 2018). HN'nin, ek olarak antiapoptotik BCL-2 ekspresyonunu stimüle ederken proapoptotik BAX ekspresyonunu baskıladığı, dolayısıyla bu şekilde de apoptozu inhibe edebildiği ortaya konmuştur (Gottardo ve ark., 2017; Zaman ve ark., 2019).



Şekil 2.11. HN sinyal yolağı (Yahne 2021)

2.3.4. Humaninin Fizyolojik Etkileri

HN' nin hücrel homeostazda görevli olduğu; mitokondri ile nükleer genom arasındaki retrograd sinyalleme bir parçası olduğu düşünülmektedir (Guo ve ark., 2003). Antiapoptotik etkileri ortaya konmuş olan HN'nin hücrel sağ kalımı uyardığı bilinmektedir. Mitokondriyal fonksiyonları, mitokondriyal biyogenezi artırarak, zar potansiyelini ve mitokondriyal enzim aktivitelerini düzenleyerek koruduğu gösterilmiştir. HN'nin sitoprotektif etkilerini inceleyen birçok çalışmada, peptidin hücre içinde çeşitli mekanizmalarla ROS üretimini azaltarak etki gösterdiği tespit edilmiştir (Minasyan ve ark., 2017; Yang X. ve ark., 2018; Cai ve ark., 2021).

HN'nin çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik durumlardaki rolünü araştıran çalışma sayısı sınırlı olsa da literatürde üzerinde durulan konulara aşağıda başlıklar halinde yer verilmiştir.

HN'nin Nöroprotektif Etkileri

İlk olarak Alzheimer hastalarında tanımlanan HN'nin nöronları Aβ kaynaklı sitotoksiteden koruduğu tespit edilmiş ve bu etkisine zemin oluşturan mekanizmalar

yoğun şekilde araştırılmıştır (Hashimoto Yuichi ve ark., 2001a; Hashimoto Yuichi ve ark., 2001b; Niikura ve ark., 2004). HN'nin nöronlarda da trimerik kompleks reseptörleri aracılığıyla etki gösterdiği bulunmuştur (Hashimoto Yuichi ve ark., 2009; Matsuoka ve ark., 2010; Lee ve ark., 2013). Yapılan çalışmalarda HN ve HN analoglarının hücreleri apoptozdan koruduğu tespit edilmiştir (Ikonen ve ark., 2003). Çeşitli çalışmalarda HN'nin nöronlarda Protein kinase B (Akt)'yi ve ERK'i aktive ederek fonksiyon gösterdiği gösterilmiştir (Hashimoto Yuichi ve ark., 2009; Hoang ve ark., 2010; Wang T. ve ark., 2013; Kim ve ark., 2016). HN'nin hücre zarı homeostazını sağlayarak A β ' in neden olduğu hücre membran yapısında ve fonksiyonundaki bozuklukları hafiflettiği belirlenmiştir (Li X. ve ark., 2013). A β ile indüklenen mitokondriyal fonksiyon bozukluğunu azalttığı ve mitokondriyal zar potansiyelini düzenlediği ve mitokondrilerden kaynaklanan ROS üretimini azalttığı bildirilmiştir (Ikonen ve ark., 2003; Jin ve ark., 2010; Li X. ve ark., 2013; Yen ve ark., 2018). HN, nöronlarda N-metil-d-aspartat (NMDA) kaynaklı nörotoksisiteyi intraselüler Ca⁺² artışını tersine çevirerek ve ROS üretimini inhibe ederek azaltmaktadır (Yang X. ve ark., 2018).

HN seviyelerinin yaşa bağlı azaldığı; güçlü bir HN analogu olan HNG ile tedavi edilen yaşlı farelerde yaşa bağlı olarak artan nöroinflamasyonu geriletmediği ve bilişsel fonksiyonlarda iyileşme sağlandığı görülmüştür (Yen ve ark., 2018). Travmatik beyin hasarı modelinde de HN'nin anti-inflamatuvar etki gösterdiği, astrosit proliferasyonunu azalttığı ve kognitif fonksiyonların korunmasında etkili olduğu bulunmuştur (Thapak ve ark., 2024).

Sonuç olarak santral sinir sisteminde HN'nin mitokondriyal disfonksiyonu, ROS üretimini ve inflamasyonu azaltarak ayrıca apoptozu baskılayarak nöronal sağkalıma katkı sağladığı anlaşılmaktadır (Thiankhaw ve ark., 2022).

HN'nin Üreme Üzerine Etkileri

Germ hücrelerinde üretimi bilinen HN'nin üreme fonksiyonunda görev aldığı düşünülmektedir. Öyle ki HN düzeylerinin polikistik over sendromuna sahip kişilerin

foliküler sıvılarında azaldığı, sperm hareketliliği ile pozitif korelasyon gösterdiği ortaya konmuştur (Wang Y. ve ark., 2021).

HN'nin Glukoz Homeostazisi Üzerine Etkileri

HN'in trimetrik reseptörü üzerinden STAT3 ekspresyonundaki artış yoluyla pankreasta beta hücre sağ kalımının artırdığı göstermiştir (Hoang ve ark., 2010). Pankreas β hücre hattında HN analogunun insülin salınımını artırdığı bulunmuştur. Aynı zamanda diyabetik sıçanlarda HN'nin iv infüzyonunun insülin duyarlılığını artırdığı, kan glukoz düzeyini azalttığı; intraserebroventriküler (icv) infüzyonunun ise hipotalamusta STAT3 aktivasyonu aracılığıyla periferik glukoz alımını artırdığı gösterilmiştir (Muzumdar ve ark., 2009).

Diyabetik farelerden izole edilen β hücrelerinde glukoz ile uyarılan insülin sekresyonu HN analogu ile muamele sonucu 2,5 kat artmıştır. β hücreleri üzerine HN analogu uygulanmasının da hücre içi ATP seviyelerini artırdığı görülmüştür. Bu iki etki zamana bağlı incelenmiş ve insülin eksositozunun ATP seviyelerindeki belirgin artışları takip ettiği saptanmıştır. HN'nin mitokondriyal fonksiyonları artırarak ATP sentezini artırdığı düşünülmektedir (Kuliawat ve ark., 2013). Bu etkide mitokondrilerin rolünü incelemek isteyen araştırmacılar β hücre kültürü ortamına HN eklenmesinin mitokondriyal biyogenezi, peroksizom proliferator ile aktive olan reseptör γ koaktivatörü-1 α (PGC-1 α) aracılığı ile artırdığını ortaya koymuşlardır. Ayrıca fosforile AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK) miktarlarında artış tespit etmiş ve AMPK aktivasyonunun PCG-1 α protein seviyelerindeki artışa aracılık edebileceğini öne sürmüşlerdir. Sonuç olarak β hücrelerinde HN uygulamasıyla görülen ATP artışının mitokondriyal biyogeneze paralel olduğunu belirlemişlerdir (Qin ve ark., 2018).

Ayrıca açlık kan glukoz regülasyonu bozulmuş prediyabetik hastalarda plazma HN seviyeleri, sağlıklı kontrole göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur (Voigt ve ark., 2016). Bu bulgular HN'nin glukoz homeostazisinde rol oynadığını düşündürmektedir.

HN'nin Renoprotektif Etkileri

HN'nin streptozotosin ile indüklenen diyabetik nefropatide böbrek fonksiyonları üzerine etkileri araştırılmıştır. 16 haftalık HN tedavisi, kan glukoz seviyelerini azaltarak diyabet kontrolüne katkı sağlamış ve bunun sonucu olarak diyabetik nefropati gelişini yavaşlatmıştır. Bu çalışmada aynı zamanda, BUN ve sCr seviyelerinin ve doku pro-inflamatuar sitokin düzeylerinin azaldığı, ayrıca doku anti-inflamatuar sitokin seviyelerinin arttığı da gösterilmiştir. Sonuç olarak HN'nin diyabetik nefropatide böbrek fonksiyonlarını koruyucu etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Moin ve ark., 2023).

Endotel hücrelerinde ifade edilen HN'nin çeşitli patolojilerde vasküler fonksiyonlarda rol oynadığı düşünülmektedir. HN analogu ile yapılan tedavinin Apoprotein E eksikliğine sahip transgenik fare aortalarında apoptozu, aterosklerotik plak gelişimini ve endotelial disfonksiyonunu azalttığı gösterilmiştir (Oh ve ark., 2011). Bu transgenik ateroskleroz modelinde, 16 hafta boyunca uygulanan HN tedavisinin böbrek fonksiyonlarına etkisi incelenmiştir. HN'nin böbrek dokusunda VEGF ve angiopoetin gibi anjiyojenik proteinlerin ifadesini artırdığı, inflamasyonu ve apoptozu azalttığı gösterilmiştir. HN'nin ateroskleroza bağlı gelişen böbrek fibrozunu böbrek korteksi ve medullasında kollajen birikimini engelleyerek azalttığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak HN'nin ateroskleroza bağlı gelişen böbrek yetmezliğinde doku hasarını ve mikrovasküler yapıyı koruyarak renoprotektif etki gösterebileceği düşünülmüştür (Zhang X. ve ark., 2012).

HN'nin İ/R Hasarı Üzerine Etkileri

HN'nin İ/R hasarında olduğu gibi ROS üretiminin arttığı, mitokondriyal disfonksiyonun gözlemlendiği ve hücrel biyoenerjetik mekanizmaların bozulduğu hücrel stres koşullarında koruyucu rol oynadığı düşünülmektedir. HN'nin İ/R hasarı üzerine etkileri ilk olarak serebral İ/R modelinde araştırılmış ve iskemiden önce ve iskemi sonrasında icv HN enjeksiyonunun, apoptozu ve infarkt boyutunu azaltarak nöroprotektif etki gösterdiği tespit edilmiştir (Xu ve ark., 2006). HN'nin İ/R uygulanan kortikal nöronlarda SOD enzim aktivitesini arttırdığı ve lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA) miktarlarını ve oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (Zhao S.-

T. ve ark., 2012). Total beyin İ/R hasarında HN'nin antiapoptotik etkileri incelenmiş ve nöronlarda STAT3 mRNA seviyelerini atırdığı; proapoptotik BAX ve kaspaz 3 protein seviyelerini azalttığı ortaya konmuştur (Gao ve ark., 2017). Ayrıca miyokardiyal iskemi sonrasında beyinde ortaya çıkan nöronal hasar üzerine HN'nin etkisi de incelenmiştir. İskemi öncesi iv HN enjeksiyonunun beyinde ROS üretimini, mitokondriyal şişmeyi azalttığı ve mitokondriyal membran depolarizasyonu artırırken mitokondriyal füzyon oranı üzerinde etkili olmadığı gözlenmiştir (Kumfu ve ark., 2016).

Farelerde iskemi veya reperfüzyon sırasında HN'nin intrakardiyak yolla uygulanmasının, miyokardda enfarktüs boyutunu azalttığı ve kardiyak fonksiyonu iyileştirdiği ortaya konmuştur (Muzumdar ve ark., 2010). Kronik kalp hastalarında plazma seviyelerinin azaldığı bilinen HN'nin miyokardiyal İ/R hasarına maruz bırakılan sıçanlarda da plazma seviyelerinin anlamlı şekilde arttığı gözlemlenmiş ve bunun bir kompensasyon mekanizması olabileceği düşünülmüştür (Muzumdar ve ark., 2010). Tersine miyokardiyal İ/R ile HN seviyelerinin azaldığını rapor eden bir diğer çalışmada bu durumun oksijensiz koşullarda mitokondrilerin normal fonksiyonlarını sürdürememesi sebebiyle ortaya çıkmış olabileceği öne sürülmüştür. (Thummasorn Savitree ve ark., 2016). HN tedavisinin kalpte İ/R hasarına karşı koruma sağlayabileceğini araştıran Thummasorn ve ark; bu korumanın ROS oluşumundaki azalmadan kaynaklanabileceğini göstermiştir (Thummasorn Savitree ve ark., 2016). Aynı ekip HN'nin mitokondriyal kompleks 1 aktivitesini azaltarak ROS üretiminde azalma sağladığını öne sürmüştür (Thummasorn Savitree ve ark., 2018).

Bağırsak İ/R hasarında reperfüzyondan 30 dk önce yapılan HN enjeksiyonunun dokuda pro-inflamatuar sitokinleri ve MDA düzeylerini azalttığı, SOD ve GPx aktivitelerini artırdığı gösterilmiştir. Araştırmacılar doku kaspaz 3 immünoreaktivitesinin HN tedavisiyle anlamlı olarak azaldığını tespit etmişlerdir. Dahası HN'nin, enterositlerde doku bütünlüğünü ve fırçamsı kenarları İ/R hasarından koruduğu da gösterilmiştir (Abozaid ve ark., 2023).

2.4. Amaç ve Kapsam

Yüksek mortalite oranlarıyla ilişkilendirilen ABH'nın yaygın bir nedeni renal iskemidir. İskemiye bağlı oksijen yokluğu ya da yoksunluğu hücre içinde mitokondriyal disfonksiyonu başlatır ve ATP'nin tükenmesine neden olur. Kanlanma yeniden sağlansa bile artan ROS üretimi, inflamasyon ve mitokondriyal disfonksiyonun tetiklediği bir dizi hasarı oluşur ve sonuçta tübüler hücre ölümü gerçekleşebilir. Böbrek dokusunda İ/R hasarına bağlı gelişen nekroz ve apoptozla tübüler atrofi ve vasküler kayıp meydana gelir ve böylece böbreklerin normal fonksiyonları bozulur.

Hücre içi homeostazda görevli olduğu bilinen mitokondriyal HN peptidi birçok hücrel stres durumunda üretilir ve salgılanır. HN, iskei gibi stres koşullarında bozulan mitokondriyal fonksiyonları düzelterek ve düzenleyerek ROS üretimini azaltabilir, antioksidan sistemi güçlendirebilir ve apoptozu azaltarak hücre kaybını önleyebilir. HN'nin beyin, miyokard ve bağırsak dokularında İ/R hasarı üzerine koruyucu ve iyileştirici etkileri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Öte yandan HN'nin bazı kronik böbrek hastalıkları üzerine etkileri az sayıda çalışma ile incelenmiş olsa da, ABH üzerine olası akut etkileri henüz araştırılmamıştır.

Bu çalışmanın amacı, sıçan renal İ/R modelinde HN uygulamasının akut etkilerini ve etki mekanizmalarını ortaya koymaktır. Renal İ/R, deneysel ABH modeli olarak kullanılmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada 200-250 gr ağırlığında 8-10 haftalık erkek Sprague-Dawley sıçanlar kullanıldı. Çalışmada kullanılan deney hayvanları Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edildi ve tüm hayvan deneyi prosedürleri boyunca Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinde, $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ oda sıcaklığı ve %65-70 sabit nem oranına sahip koşullarda barındırıldı. 12 saat aydınlık-12 saat karanlık gün döngüsü uygulanan hayvanlar, standart laboratuvar yemiyle beslendi. Hayvanların su ve yeme erişimleri ad libitum olarak sağlandı.

Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan 2020.08.004 numarasıyla etik onay alınmış ve tüm cerrahi prosedürler Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Ameliyathanelerinde gerçekleştirilmiştir.

3.1. Gruplandırma

Çalışmada kullanılan toplam 48 sıçan rastgele 4 gruba ayrıldı:

- 1- Sham (n=12)
- 2- İskemi/Reperfüzyon (İ/R; n=12)
- 3- Humanin-Sham (HN-Sham; n=12)
- 4- Humanin- İskemi/Reperfüzyon (HN-İ/R; n=12)

Sham gruplarında İ/R uygulamasına yer verilmezken, IR gruplarında 45 dk bilateral renal iskemi ve 24 saat reperfüzyon uygulandı. Ayrıca HN-Sham ve HN-İ/R gruplarına iskeminin 35. Dakikasında, reperfüzyondan 10 dk önce humanin analogu (HNG) kuyruk veninden iv (intravenöz) yolla verilirken, diğer gruplara HNG çözücüsü olarak kullanılan PBS solüsyonu uygulandı (Şekil 3.1).

3.2. Cerrahi Uygulamalar

3.2.1. İ/R uygulaması

Bu amaçla, tüm sıçanlara intraperitoneal (ip) ketamin/ksilazin (90/10 mg/kg) anestezisi uygulandı. Tüm deney gruplarında HNG ya da çözücüsünü (PBS) iv olarak uygulamak amacıyla kuyruk veni 24G kanül kullanılarak kanüle edildi. Sham ve İ/R gruplarına HNG çözücüsü olarak kullanılan PBS enjekte edilirken; HN-Sham ve HN-İ/R gruplarına HNG, 2 mg/kg dozunda ve reperfüzyondan 10 dk önce uygulandı.

Sham gruplarında batın insizyonu yapılarak batın orta hattın açıldı, renal arter ve renal ven ekspozite edildi; damarlara ligasyon uygulanmadan 45 dk beklendi ve süre sonunda batın 3/0 ipek süturla dikilerek kapatıldı (Wilhelm ve ark., 2001).

İ/R gruplarında batın orta hattın açılarak renal arterler ve renal venler ekspozite edildi; damarlara zarar vermeyecek düz klempler ile renal arterler ve renal venler kapatılarak 45 dk bilateral iskemi uygulandı. Böbrek yeniden konumlandırılarak iskemi boyunca hayvanın stabil halde kalması sağlandı. 45 dakikalık iskemiye takiben klempler çıkarılarak reperfüzyon başlatıldı. Cerrahi prosedürün sonunda organlar yeniden konumlandırıldı ve batın 3/0 ipek süturla dikilerek kapatıldı (Wilhelm ve ark., 2001).

Tüm sıçanlar iskemi/yalancı iskemi periyodu boyunca ısıtıcı lamba altında ve anestezi altında tutuldu. Cerrahi prosedür boyunca insizyon bölgesi serum fizyolojik ile ıslatılmış steril gazlı bez ile kapatılarak nemli kalması sağlandı. Tüm sıçanlar cerrahi uygulama sonrasında metabolik kafeslere alındı ve 24 saat reperfüzyon sürecine bırakıldı. Reperfüzyon periyodu boyunca sıçanların 24 saatlik idrarları toplandı.

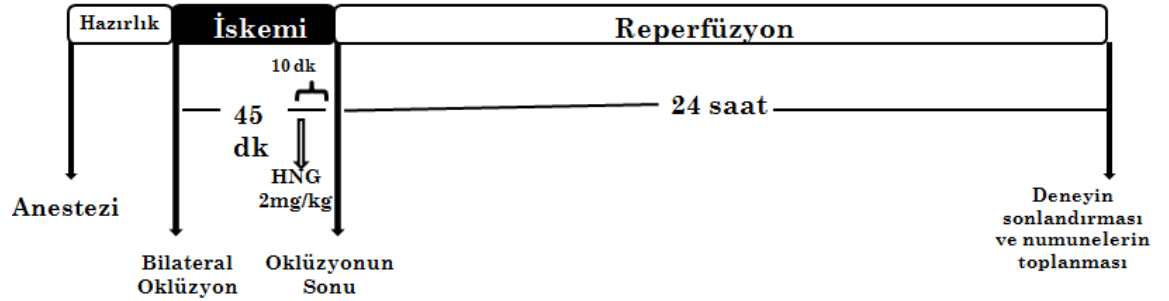
3.2.2. Deneyin Sonlandırılması

24 saat reperfüzyon boyunca toplanan idrarlar, miktarları ölçülerek biyokimyasal parametrelerin ölçümüne kadar -80°C derin dondurucuda (Thermo Forma -86c ULT Freezer) saklandı.

Reperfüzyon süresinin sonunda ketamin/ksilazin (90/10 mg/kg) anestezisi altında sıçanların ötenazileri gerçekleştirildi. Abdominal aortadan vücut kanının alınmasıyla ötenazi gerçekleştirildi ve böbrek dokuları çıkarıldı.

Abdominal aortadan alınan kan örnekleri tüplere aktarıldı ve 2500 rpm (dakikadaki devir sayısı)'de 10 dk santrifüj (Kubota 5800) edilerek serumlarının ayrılması sağlandı. Elde edilen serumlar biyokimyasal parametrelerin ölçümüne kadar -80°C derin dondurucuda (Thermo Forma -86c ULT Freezer)'de saklandı.

Alınan böbrek dokuları serum fizyolojikle yıkandı ve kandan arındırılarak tartıldı. Çıkarılan dokuların bir bölümü biyokimyasal ve mitokondriyal ölçümlerde kullanılmak üzere parçalara ayrıldı ve parametrelerin ölçümüne kadar -80°C derin dondurucuda (Thermo Forma -86c ULT Freezer)'de saklandı. Böbrek dokularının kalan kısmı ise histolojik değerlendirme ve apoptoz tayininde kullanılmak üzere % 10'luk formalin solüsyonuna alınarak tespit edildi.



Şekil 3. 1. Cerrahi prosedürün şematik olarak gösterimi.

3.3. Böbrek Fonksiyon Testlerinin Değerlendirilmesi

İdrar ve serumda biyokimyasal ölçümler Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarında otoanalizör (Marka: ROCHE COBAS, Model: C502) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu yöntemle idrar örneklerinde kreatinin (Cr), albumin, sodyum ve potasyum miktarları; serum örneklerinde BUN, Cr, sodyum ve potasyum ve miktarları ölçüldü. Elde edilen veriler kullanılarak aşağıdaki formüllerle GFR göstergesi olan kreatinin klirensi (Cl_{Cr}), fraksiyonel sodyum atılımı ve fraksiyonel potasyum atılımı hesaplandı (Tobias ve ark., 1962).

- $Cl_{Cr} (ml/dk) = \text{İdrar (u) Cr (mg / dl)} \times \text{idrar akışı (ml/dk)} / \text{serum (s) Cr (mg/dl)}$
- $\text{Fraksiyonel Atılımı K (\%)} = (uK/sK) / (uCr/sCr) \times 100$
- $\text{Fraksiyonel Atılımı Na (\%)} = (uNa/sNa) / (uCr/sCr) \times 100$

3.4. Oksidan Hasar ve Antioksidan Kapasite Parametrelerinin Ölçümü

3.4.1. Doku MDA Düzeyi Ölçümü

Lipit peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeyleri, MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) (Sigma-Aldrich, T5500) ile reaksiyonu sonucu belirlenir. Bu amaçla 0,2-0,5 g böbrek dokusu tartıldı ve %10'luk triklor asetik asit (TCA) (Merck Millipore, 1008071000) solüsyonu ile 10 kat süspanse edildi. Küçük paçalar haline getirilen doku sonikatör (Bandelin HD2070) ile 10-20 saniye (sn) %65-75 güçte homojenize edildi. Homojenizasyonun ardından 3,000 rpm'de ve 4°C'de 15 dk süreyle santrifüj (Kubota 5800) edildi. Süpernatantlar ikinci seri tüplere aktararak 10000 rpm'de 8 dk daha santrifüj (Beckman Coulter Microfuge 22R) edildi. Elde edilen süpernatantlara eş hacimde % 0,67'lik TBA eklenerek su banyosunda 15 dk kaynatıldı. Oluşan reaksiyonun absorbas değerleri spektrofotometrede (Shimadzu UV-1601) 535 nm dalga boyunda okundu. $1.56 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ düzeltme katsayısı kullanılarak lipid peroksidasyon düzeyi hesaplandı ve nmol MDA/g doku olarak ifade edildi (Buege ve ark., 1978).

3.4.2. Doku GSH Düzeyi Ölçümü

Dokudaki endojen antioksidan GSH miktarı ölçümü, sülfhidril gruplarının belirlenmesinde kullanılan Ellman yönteminin modifiye edilmesiyle gerçekleştirildi (Ellman, 1959; Aykaç ve ark., 1985). Bu amaçla böbrek dokuları tartıldı ve %10'luk TCA (Merck Millipore, 1008071000) solüsyonu ile 10 kat dilüe edildi. Küçük paçalar haline getirilen doku örnekleri sonikatör (Bandelin HD2070) ile %65-75 güçte 10-20 sn homojenize edildi ve 4 °C'de, 3,000 devirde 15 dk santrifüj (Kubota 5800) edilerek elde edilen süpernatantlar toplandı.

Ellman reaktifi 100 ml %1 Na Sitrat (Sigma-Aldrich, S4641) solüsyonu içine 40 mg 5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoic Acid (DTNB) (Sigma-Aldrich, D8130) eklenerek hazırlandı. 1 ml sodyum fosfat tamponu (0,3M) (Merck Millipore, 1065860500) içine 125 µl Ellman reaktifi ve 250 µl süpernatant eklenerek karanlıkta 10 dk inkübe edildi. Örnekler spektrofotometrede (Shimadzu UV-1601) 412 nm dalga boyunda okundu. Düzeltme katsayısı kullanılarak hesaplanan GSH düzeyi µmol/gr doku olarak ifade edildi (Aykaç ve ark., 1985).

3.4.3.Doku SOD Aktivitesi Ölçümü

Ortamdaki süperoksit radikallerinin SOD aktivitesine bağlı olarak gerçekleşen fotooksidasyonunun o-dianisidin HCl ile tespit edilmesi esasına dayanır (Masayasu ve ark., 1979). Riboflavinin floresans ışığı etkisiyle oluşturduğu süperoksit radikali, ortamdaki SOD'un etkisiyle H₂O₂'ye dönüşür. Bu ölçümü gerçekleştirmek amacıyla böbrek dokuları tartılarak (0,2-0,5 g) serum fizyolojik ile 1/10 seyreltildi. Küçük paçalar haline getirilen doku örnekleri sonikatör (Bandelin HD2070) yardımıyla %65-75 güçte 10-20 sn homojenize edildi ve arından 10 dk 4000 rpm'de santrifüj (Beckman Coulter Microfuge 22R) edilerek elde edilen süpernatantlar toplandı.

SOD aktivitesi ölçümü için 2,6 ml PBS (50 mM, pH:7,5), 0,1 ml 6 mM odianisidin HCl (Cayman, 17316) 0,2 ml 0,2 mM riboflavin içeren reaksiyon tamponu hazırlandı. Reaksiyon tamponuna 0,1 ml süpernatant eklenerek karışımın absorbansı spektrofotometrede (Shimadzu UV-1601) 460 nm dalga boyunda okundu. Bu absorbans değeri reaksiyon öncesi bazal absorbans olarak kaydedildi.

Daha sonra reaksiyon karışımı 20 W floresans lamba bulunan kabinde oda sıcaklığında 8 dakika inkübe edilerek fotooksidasyon reaksiyonu indüklendi. İnkübasyon sonunda reaksiyonun absorbansı 460 nm dalga boyunda okundu. Bu absorbans değeri reaksiyon absorbansı olarak kaydedildi. SOD aktivitesi reaksiyon absorbans değerinden bazal absorbans değerinin çıkarılmasıyla hesaplandı. U/gr doku olarak ifade edildi (Mylroie ve ark., 1986).

3.4.4. Doku CAT Aktivitesi Ölçümü

Böbrek dokularında peroksizomal antioksidan bir enzim olan CAT'ın H_2O_2 'nin, H_2O 'ya dönüşümünü katalizlemesi esasına dayanır. Bu ölçümü gerçekleştirmek amacıyla böbrek dokuları tartılarak (0,2-0,5 g) serum fizyolojik ile 1/10 seyreltildi. Küçük paçalar haline getirilen doku sonikatör (Bandelin HD2070) ile %65-75 güçte 10-20 sn homojenize edildi ve 10 dk 4000 rpm'de santrifüj (Beckman Coulter Microfuge 22R) edilerek elde edilen süpernatantlar toplandı.

CAT aktivitesi ölçümü için reaksiyon tamponu olarak 50 mM fosfat tamponu (pH: 7.0) içinde %0,1'lik H_2O_2 (Merck Millipore, 108600) solüsyonu hazırlandı. 0,2 ml reaksiyon tamponu içine 0,4 ml süpernatant eklendi. Absorbans değeri 0,4 ml süpernatant ve 0,2 ml 50 mM fosfat tamponu (pH: 7.0) içeren köre karşı spektrofotometrede (Shimadzu UV-1601) 240 nm dalga boyunda okundu. CAT aktivitesi $0,004 \text{ mM}^{-1}/\text{mm}^{-1}$ ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplandı ve U/gr doku olarak ifade edildi (Aebi, 1984).

3.5. İnflamatuvar Belirteçler

3.5.1. Doku MPO Aktivitesi Ölçümü

MPO aktivitesinin belirlenmesi, birim zamanda MPO aktivitesine bağlı olarak başlatılan H_2O_2 'e bağlı gerçekleşen oksidasyonun o-dianisidin HCl ile tayini esasına dayanır. Bu amaçla böbrek dokuları (0,2-0,5 g) tartıldı ve %0,5'lik hekzadesiltrimetilamonyum bromür (HETAB) (Sigma-Aldrich, H5882) içeren 50 mM potasyum fosfat (Merck Millipore, 1048731000) (pH: 6.0) tamponu ile 10 kez dilüe edildi. Küçük paçalar haline getirilen doku örnekleri sonikatör (Bandelin HD2070) ile %65-75 güçte 10-20 sn homojenize edildi. Homojenizasyonun ardından 4°C 'de 40000 G'de 15 dk süreyle santrifüj (Beckman Optima Ultracentrifuge) edildi. MPO ölçümü için 50 mM PBS içinde 0,167 mg/ml odianisidin HCl (Cayman, 17316) ve % 0,0005 H_2O_2 (Merck Millipore, 108600) içeren reaksiyon tamponu hazırlandı. 37°C 'de 100 μl doku süpernatantı üzerine 2,9 ml reaksiyon tamponu eklendi ve 6 dk boyunca zamana bağlı değişen absorbans değerleri spektrofotometrede (Shimadzu UV-1601) 460 nm dalga boyunda okundu. MPO aktivitesi U/gr doku olarak ifade edildi (Bradley ve ark., 1982).

3.6. Mitokondriyal Fonksiyonların Değerlendirilmesi

3.6.1. Hücre içi ATP Düzeyi Ölçümü

Dokuda ATP düzeyi ölçümü ticari ATP ölçüm kiti kullanılarak (Elabscience Katalog No: E-BC-K157-S) gerçekleştirildi. Bu ölçümün algılama esası kreatin kinaz enziminin, ATP ile kreatinin reaksiyonunu katalizleyerek kreatin fosfat üretmesi esasına dayanır. Üreticinin talimatlarına göre saklanan ve homojenize edilen doku örneklerinde ATP düzeylerinin ölçümü gerçekleştirildi. Bu amaçla kit ölçüm protokolü takip edilerek reaksiyon oluşturuldu ve reaksiyon sonunda absorbans değerleri spektrofotometrede (Shimadzu UV-1601) 636 nm dalga boyunda okundu. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak üretici talimatlarında belirlenen şekilde hesaplama yapıldı ve sonuçlar gr doku başına ATP miktarı şeklinde ifade edildi.

3.6.2. Kompleks 1 Aktivitesi Ölçümü

Bu amaçla homojenize edilen doku örneklerinde kompleks 1 aktivite düzeyi ölçümü, ticari kompleks 1 aktivite ölçüm kiti (Abcam Katalog No: ab109721) kullanılarak üreticinin talimatına uygun olarak yapıldı. Bu yöntemde kompleks I aktivitesi kuyucuklarda immobilize edilen kompleks I proteininin, NADH (nikotinamid adenin dinükleotid)'in NAD⁺'ya oksidasyonunu katalizlemesi ve eş zamanlı olarak indirgenen NAD⁺'ın tayin edilmesi ilkesine dayanmaktadır.

Bu ölçümde üreticinin belirttiği kit protokolü takip edilerek dokular homojenize edildi ve mitokondriler açığa çıkarıldı. Ardından dilüsyon tamponu ile seyreltilen örnekler kit plakalarında 3 saat inkübe edildi. Bu işlem ile kompleks 1 proteinlerinin kuyucuklarda tutulması sağlandı. Kit protokolü takip edilerek kit içeriğinde bulunan NADH reaktifi ile reaksiyon kuruldu ve oluşan ürünün absorbans değerleri plaka okuyucuda kolorimetrik olarak 450 nm dalga boyunda 30 dk boyunca ölçüldü. Hesaplama kullanılan kit protokolünde açıklandığı şekilde aşağıdaki formül kullanılarak yapıldı. Kompleks 1 aktivite düzeyi mg doku başına enzim aktivitesi olarak ifade edildi.

$$\text{Kompleks I aktivitesi (mOD/min)} = (\text{Abs (ilk)} - \text{Abs (son)}) / (\text{dk(ilk)} - \text{dk(son)})$$

3.7. Histopatolojik Analiz

Böbrekte hasar alanının histolojik olarak belirlenmesi amacıyla Hemotoksilen & Eozin (H&E) boyaması yapılan parafin kesitler incelendi ve hasar skorlandı. Tüm histolojik prosedürler Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalında gerçekleştirildi.

Bu amaçla 4 saat %10'luk formalin solüsyonu içine alınarak tespit edilen böbrek dokuları, çeşme suyu altında yıkanarak formalinden arındırıldı. Dokular birer gün süreyle alkol serilerinden geçirildi (%70-%80-%90). Son aşamada %100'lük alkolde 4 saat bekletildikten sonra ksilol ile alkolden arındırılarak şeffaflaştırma işlemi yapıldı. Ardından 56°C etüvde bulunan parafin içine alındı ve bir saat bekletildi. Bu işlem 3 kez tekrar edildi. Parafine doyurulan dokular kasetler içine alınarak parafine gömüldü ve parafin bloklar hazırlandı. Parafin bloklar içine gömülen böbrek dokuları mikrotoma (Leica RM2125 RTS) yerleştirilerek 5mm kalınlığında, longitudinal kesitler alındı. Kesitler su banyosunda düzleştirildikten sonra lam üzerine aktarıldı. Kesitler parafinin uzaklaştırılması amacıyla iki kez 10'ar dk ksilolden geçirilip 5'er dk sırasıyla %100, %90, %80, %70'lik alkol serilerine alındı. Hazırlanan preperatlarda H&E boyaması yapılarak ışık mikroskobu (Zeiss, Primo Star) ile 10x10 ve 40x10 büyütmede incelendi. Her gruptan 8-12 kesitte 5 alan rastgele seçilerek semi-kantitatif olarak değerlendirildi. Tübüllerdeki yapısal değişiklikler; tübüler nekroz-atrofi, tübüler fırçamsı kenar kaybı, tübülerde ve bowman kapsülünde dilatasyon ve kast formasyonu izlenerek skorlandı. Bu skorlama yönteminde;

0 = hiç

1 = % 0–10

2 = % 11–25

3 = % 26–45

4= % 46–75

5 > % 76 olarak kaydedilerek değerlendirildi (Tighe, 1977; Chen ve ark., 2011).

3.8. Dokuda Apoptozin Değerlendirilmesi

Apoptozun değerlendirilmesi parafin kesitlerde apoptoz ile oluşan DNA kırıklarını tespit eden TUNEL ölçüm kiti (Abcam, Katalog No: ab206386) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu ölçüm etiketli deoksinükleotidlerin DNA fragmentlerinin serbest 3'-OH uçlarına terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) enzimi ile eklenmesi esasına dayanmaktadır.

Apoptozun değerlendirilmesine ilişkin tüm prosedürler Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalında gerçekleştirildi. Doku apoptoz miktarını tayin etmek amacıyla 4 saat %10'luk formalin solüsyonu içine alınarak tespit edilen böbrek dokuları çeşme suyu altında yıkandı ve birer gün süreyle alkol serilerinden geçirildi (%70-%80-%90-%100). Dokular %100'lük alkolde bekletildikten sonra ksilol ile alkolden arındırılarak şeffaflaştırma işlemi yapıldı. Parafine doyurulan dokular kasetler içine alınarak parafine gömüldü ve parafin bloklar hazırlandı. Parafin bloklar içine gömülen böbrek dokuları mikrotoma (Leica, RM2125 RTS) yerleştirilerek 5mm kalınlığında, longitudinal kesitler alındı. Kesitler su banyosunda düzleştirildikten sonra lam üzerine aktarıldı. Kesitler parafinin uzaklaştırılması amacıyla iki kez 10'ar dk ksilolden geçirilip 5'er dk sırasıyla %100, %90, %80, %70'lik alkol serilerine alındı. Parafini uzaklaştırılan preperatlarda aşağıda belirtilen işlemler üretici protokolü takip edilerek yapıldı. Buna göre uygulanan TdT, apoptotik sinyallere yanıt olarak oluşan DNA kırıklarının açıkta kalan 3'-OH uçlarına, biyotin etiketli deoksinükleotitlerin eklenmesini katalizledi. Biyotinlenmiş nükleotidlere, streptavidin-horseradish peroksidaz (HRP) konjugatı uygulandı. Diaminobenzidin (DAB) boyaması ile DNA fragmentasyon bölgesinde kahverengi bir substrat oluşturmak üzere DAB'ın HRP etiketli numuneyle reaksiyona girmesi sağlandı. Zıt boyama metil yeşili ile yapıldı. Kesitler mounting medium ile ışık mikroskobu (Zeiss, Primo Star) altında 10x10 ve 40x10 büyütmede incelendi. Hücreler sayım çerçevesi kullanılarak 10x10 büyütmede sayıldı. Normal ve apoptotik hücreler sayılarak apoptotik hücrelerin yüzdesi hesaplandı.

3.9. İstatistiksel Analiz

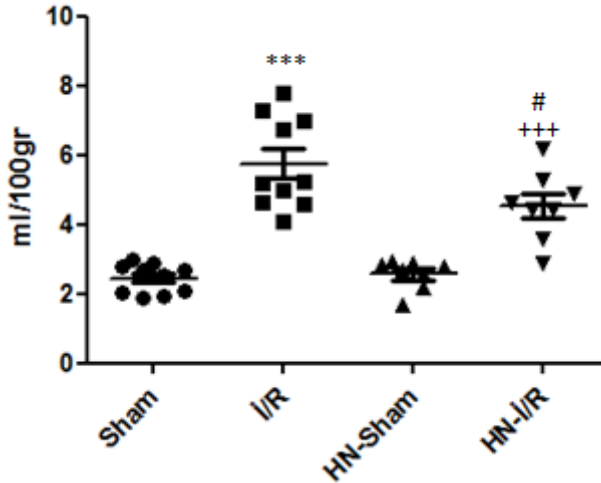
Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edildi. Değerlendirme parametreleri karşılaştırılırken GraphPad Software istatistik programı kullanıldı. Verilerin değerlendirilmesinde Student-t testi veya varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. ANOVA'yı takiben post hoc test olarak Tukey veya Dunnet testi yapıldı. Mikroskopik skorların değerlendirilmesinde ANOVA ve takiben Kruskal-Wallis testi uygulandı. p değerinin 0.05'den küçük olması ($p < 0.05$) halinde veriler istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. İdrar miktarları

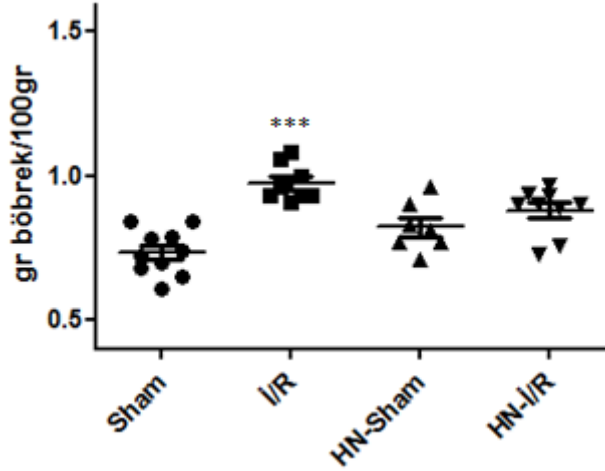
24 saatlik reperfüzyon periyodunda toplanan idrar miktarları vücut ağırlığına oranlanarak normalize edildi ve 100 gr vücut ağırlığı başına düşen idrar miktarı (ml) olarak ifade edildi (Şekil 4.1). HN tedavisi alan ve almayan İ/R gruplarının idrar miktarları kendi Sham gruplarına göre anlamlı olarak yüksek tespit edildi ($p<0,001$). İ/R grubundan toplanan idrar miktarı HN-İ/R grubuna kıyasla anlamlı olarak daha fazlaydı ($p<0,05$).



Şekil 4.1. İdrar miktarları. *** $p<0,001$, Sham grubundan fark; +++ $p<0,001$ HN-Sham ; # $p<0,05$, İ/R grubundan fark ($n=10$). İ/R; iskemi/reperfüzyon, HN; humanin.

4.2. Böbrek ağırlıkları

Deneyin sonlandırılması aşamasında çıkarılarak tartılan böbrek ağırlıkları vücut ağırlığına oranlanarak normalize edildi ve 100 gr vücut ağırlığı başına düşen gram böbrek ağırlığı şeklinde ifade edildi (Şekil 4.2). İ/R grubunun normalize böbrek ağırlıkları Sham grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksekken ($p<0,001$), HN-İ/R grubundan farklı değildi. Benzer şekilde HN-İ/R grubunun böbrek ağırlıkları HN-Sham grubuna kıyasla önemli bir fark göstermedi.

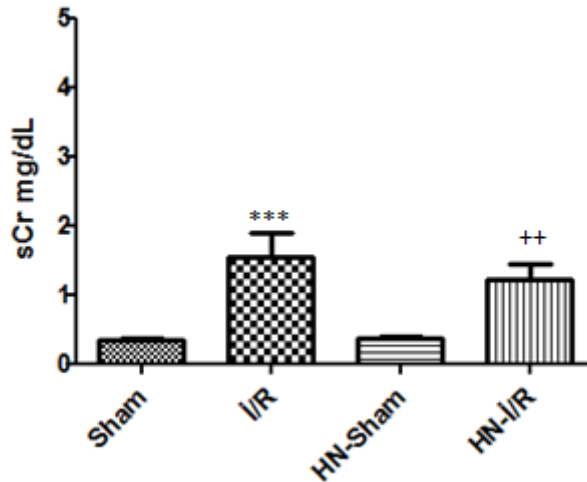


Şekil 4.2. Normalize Böbrek Ağırlıkları. *** $p<0,001$, Sham grubundan fark ($n=8$). I/R; iskemi/reperfüzyon, HN; humanin.

4.3. Fonksiyonel Böbrek Parametreleri

4.3.1. sCR

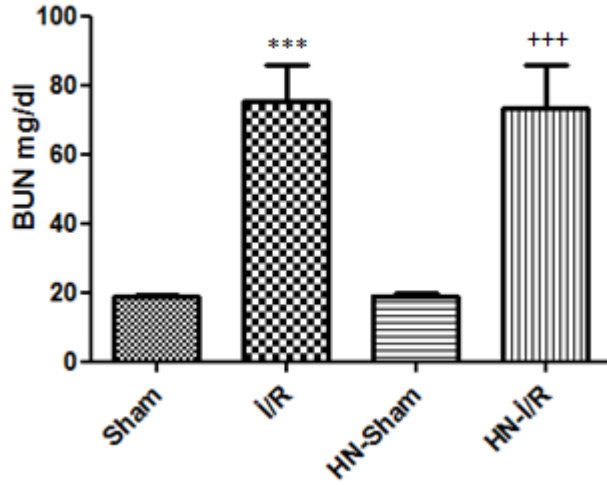
Reperfüzyon periyodunun ardından deneyin sonlandırılması aşamasında hayvanlardan elde edilen serum örneklerinde Cr miktarları belirlendi (Şekil 4.3). I/R gruplarının sCr seviyesi Sham grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti ($p<0,001$). HN-Sham grubuna kıyasla HN-I/R grubunda da benzer şekilde anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,01$). HN- I/R grubunun sCr seviyeleri I/R grubuna göre düşüş eğilimi gösterse de gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edilmedi.



Şekil 4.3. Serum kreatinin seviyeleri. *** $p<0,001$, Sham grubundan fark; ++ $p<0,01$ HN-Sham grubundan fark ($n=10$). sCr; serum kreatinin I/R; iskemi/reperfüzyon, HN; humanin.

4.3.2. Kan Üre Azotu

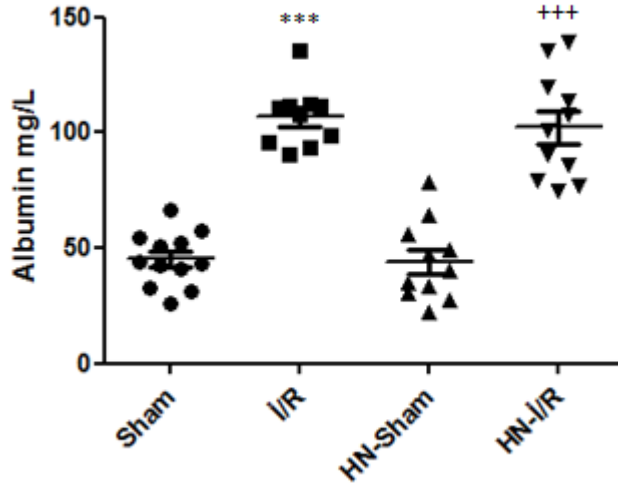
Reperfüzyon sonunda hayvanlardan elde edilen serum örneklerinde BUN miktarları incelendi (Şekil 4.4). İ/R grubunda BUN seviyesi Sham grubuna göre anlamlı olarak yüksekti ($***p<0,001$). BUN seviyesindeki bu yükseklik HN-İ/R grubunda da kendini göstermeye devam etti ($+++ p<0,01$). HN tedavisi alan İ/R grubunda BUN seviyesi İ/R grubuna göre anlamlı bir farklılık göstermedi.



Şekil 4.4. Kan üre azotu seviyesi. $*** p<0,001$, Sham grubundan fark; $+++ p<0,01$ HN-Sham grubundan fark (n=10). BUN; kan üre azotu, İ/R; iskemi/reperfüzyon, HN; humanin.

4.3.3. İdrar Albümin İçeriği

İskeminin ardından reperfüzyona tabi tutulan hayvanlar idrar toplamak amacıyla 24 saatlik reperfüzyon boyunca metabolik kafeste tutuldu. Toplanan idrar örneklerinde mikroalbümin içerikleri ölçüldü (Şekil 4.5). Sonuçlarımıza göre İ/R grubunun idrar albümin miktarı Sham grubuna göre anlamlı olarak yüksekti ($***p<0,001$). Aynı şekilde HN-İ/R grubunda ölçülen idrar albümin miktarları HN-Sham grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksekti ($+++ p<0,01$). HN-İ/R grubu ile İ/R grubu arasında anlamlı fark tespit edilmedi.



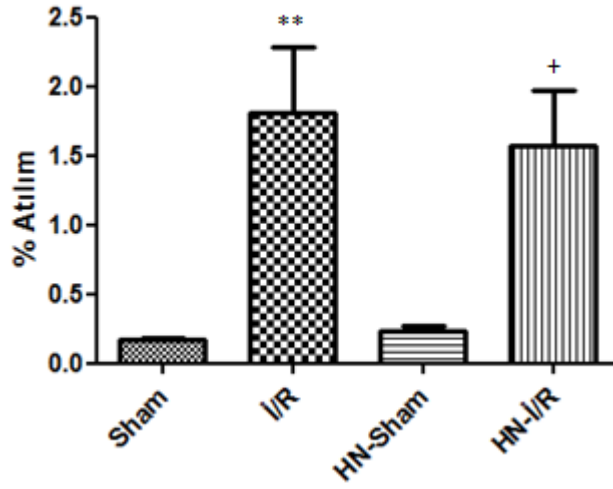
Şekil 4.5. İdrar Mikroalbumin miktarları *** p<0,001, Sham grubundan fark; +++ p<0,01 HN-Sham grubundan fark (n=11). İ/R; iskemi/reperfüzyon, HN; humanin.

4.3.4. Fraksiyonel Na⁺ Atılımı

Fraksiyonel Na⁺ atılımının hesaplanması için serum ve idrar örneklerinde Na⁺ ve Cr düzeyleri ölçüldü ve aşağıdaki formül kullanılarak sonuçlar % Na⁺ atılımı şeklinde ifade edildi (Şekil 4.6).

$$\text{Fraksiyonel Na}^+ \text{ Atılımı (\%)} = \left(\frac{\text{u/s Na}}{\text{u/s Cr}} \right) \times 100$$

Fraksiyonel Na⁺ atılımı İ/R grubunda Sham grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (**p<0,01). HN-İ/R grubunda da HN-Sham grubuna kıyasla yüksek bulunan fraksiyonel Na⁺ atılım oranları (+ p<0,01), İ/R ve HN-İ/R grupları arasında fark göstermedi. HN tedavisi alan İ/R grubunda BUN seviyesi İ/R grubuna göre anlamlı bir farklılık göstermedi.

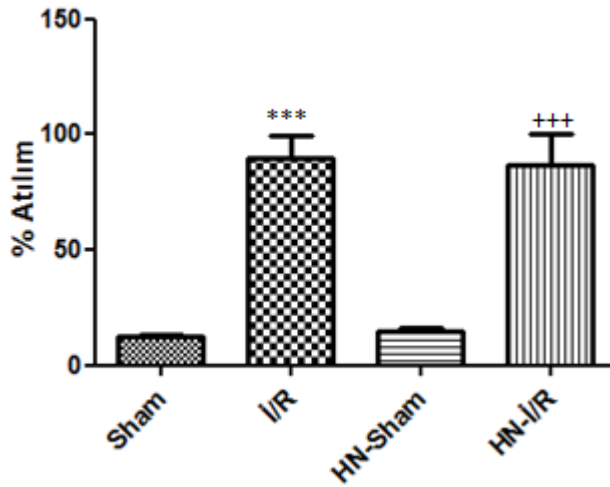


Şekil 4.6. Fraksiyonel Na⁺ Atılımı *** p<0,001, Sham grubundan fark; +++ p<0,01 HN-Sham grubundan fark (n=12). I/R; iskemi/reperfüzyon, HN; humanin.

4.3.5. Fraksiyonel K⁺ Atılımı

Fraksiyonel K⁺ atılımının hesaplanması için serum ve idrar örneklerinde K⁺ ve Cr düzeyleri ölçüldü ve aşağıdaki formül kullanılarak sonuçlar % K⁺ atılımı şeklinde ifade edildi (Şekil 4.7).

$$\text{Fraksiyonel K}^+ \text{ Atılımı (\%)} = (\text{u/s K}) / (\text{u/s Cr}) \times 100$$



Şekil 4.7. Fraksiyonel K⁺ Atılımı *** p<0,001, Sham grubundan fark; +++ p<0,01 HN-Sham grubundan fark (n=12). I/R; iskemi/reperfüzyon, HN; humanin.

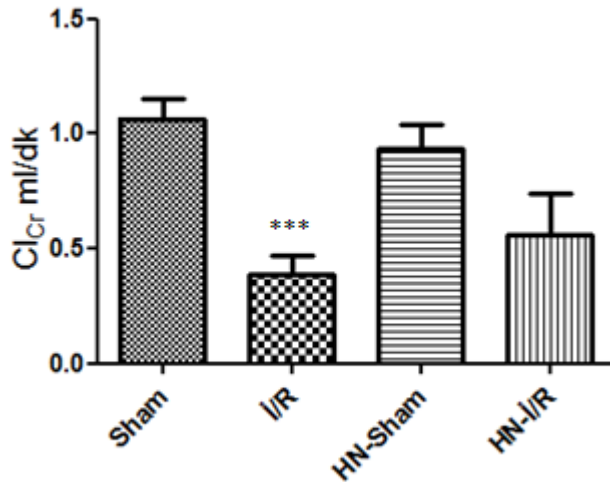
Fraksiyonel K^+ atılımı İ/R grubunda Sham grubuna göre ve HN-İ/R grubunda da HN-Sham grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla, *** $p<0,001$; +++ $p<0,001$). HN tedavisi alan İ/R grubunda İ/R grubuna kıyasla fraksiyonel K^+ atılımı açısından fark saptanmadı.

4.3.6. Cl_{cr}

GFR'nin bir göstergesi olarak kullanılan Cl_{cr} 'yi hesaplamak amacıyla serum ve idrar kreatinin miktarları ölçüldü, idrar akış hızı tespit edildi ve aşağıdaki formül kullanılarak endojen Cl_{cr} hesaplandı (Steinitz ve ark., 1940). Hesaplanan klirens değeri ml/dk olarak ifade edildi (Şekil 4.8).

$$Cl_{cr} = uCr \text{ (mg/dl)} \times \text{İdrar Akışı (ml/dk)} / sCr \text{ (mg/dl)}$$

Sonuçlarımıza göre İ/R grubunda hesaplanan endojen Cl_{cr} Sham grubuna göre anlamlı olarak düşüktü ($p<0,001$). HN-İ/R grubunda düşüş eğilimi görünse de İ/R grubu ile benzerdi. HN-İ/R grubunda hesaplanan Cl_{cr} HN-Sham grubundan da farklı değildi.

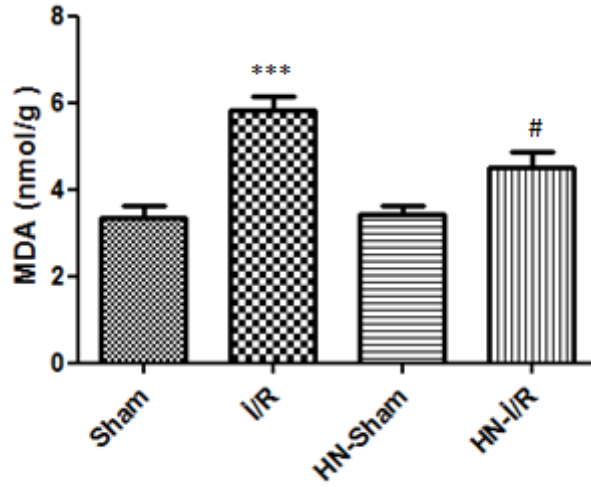


Şekil 4.8.Kreatinin klirensi *** $p<0,001$, Sham grubundan fark (n=10). İ/R; iskemi/reperfüzyon, HN; humanin.

4.4. Oksidan Hasar ve Antioksidan Sistem

4.4.1. Doku MDA Düzeyi

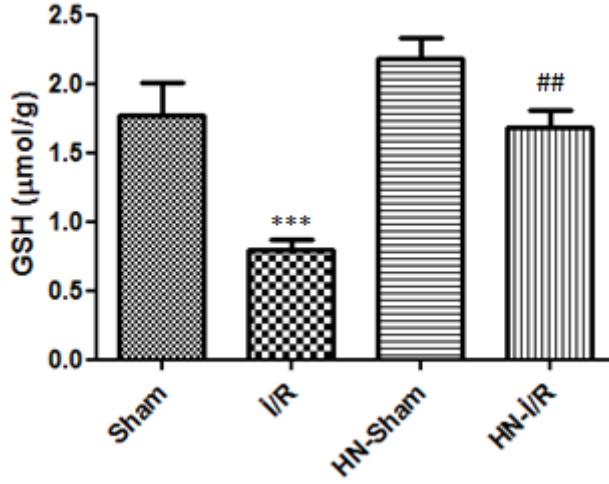
Böbrek doku homojenatlarında lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA düzeyleri Şekil 4.9’da sunulmuştur. İ/R grubunda Sham grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,001$). HN-İ/R grubunda da MDA seviyeleri HN-Sham grubundan farklı değildi. Doku MDA düzeyleri, HN tedavisi alan İ/R grubunda almayan gruba kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0,05$).



Şekil 4.9. Doku MDA düzeyleri. *** $p<0,001$, Sham grubundan fark; # $p<0,05$ İ/R grubundan fark (n=10). MDA; malondialdehit, İ/R; iskemi/reperfüzyon, HN; humanin.

4.4.2. Doku GSH Düzeyi

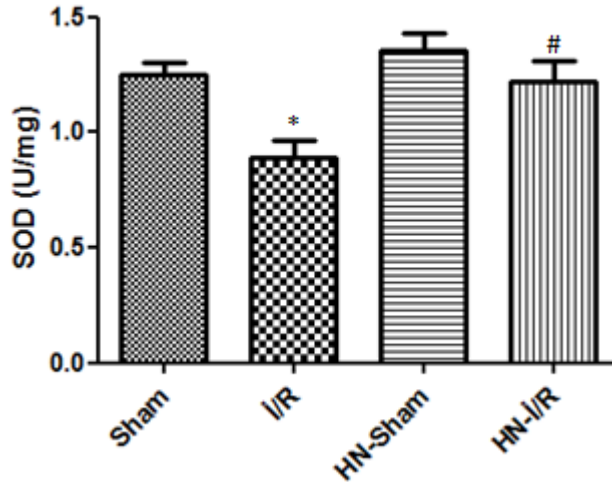
Böbrek doku homojenatlarında ölçülen GSH düzeyleri Şekil 4.10’da izlenmektedir. İ/R grubunda ölçülen GSH düzeyleri Sham grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0,001$). HN-İ/R grubunun GSH seviyeleri HN-Sham grubundan farklı değildi. HN-İ/R grubunun böbrek GSH düzeyleri ise İ/R grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde artış gösterdi ($p<0,01$).



Şekil 4.10. Doku GSH seviyeleri. *** $p < 0,001$, Sham grubundan fark ; ## $p < 0,01$ I/R grubundan fark (n=10). GSH; glutatyon, I/R; iskemi/reperfüzyon, HN; humanin.

4.4.3. SOD Aktivitesi

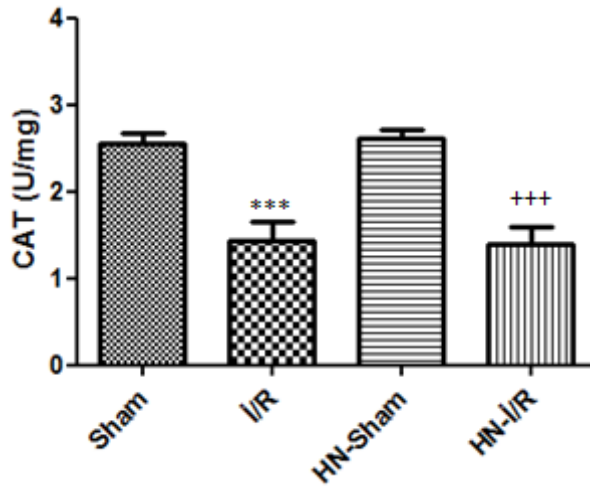
Hücrel antioksidan savunma hattında en etkili endojen antioksidan enzim olan SOD aktivitesi böbrek doku homojenatlarında antioksidan kapasitenin göstergesi olarak ölçüldü (Şekil 4.11). I/R grubunun SOD aktivitesi Sham grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0,05$). HN-I/R grubunun SOD aktivitesi HN-Sham grubundan farklı değildi. Reperfüzyon öncesinde HN tedavisi uygulanan HN-I/R grubunun böbrek SOD aktivitesi I/R grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p < 0,05$).



Şekil 4.11. Doku SOD aktivitesi. * $p < 0,05$, Sham grubundan fark; # $p < 0,05$ I/R grubundan fark (n=8). SOD; süperoksit dismutaz, I/R; iskemi/reperfüzyon, HN; humanin.

4.4.4. CAT Aktivitesi

Böbrek doku homojenatlarında peroksizomal antioksidan enzim olan CAT aktivitesi antioksidan bir belirteç olarak ölçüldü (Şekil 12). İ/R grubunun CAT aktivitesi Sham grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0,001$). HN-İ/R grubunun CAT aktivitesi de benzer şekilde HN-Sham grubuna göre anlamlı olarak düşüktü ($p<0,001$). Reperfüzyon öncesinde HN tedavisi uygulanan HN-İ/R grubunun böbrek CAT aktivitesi İ/R grubundan farklı bulunmadı.

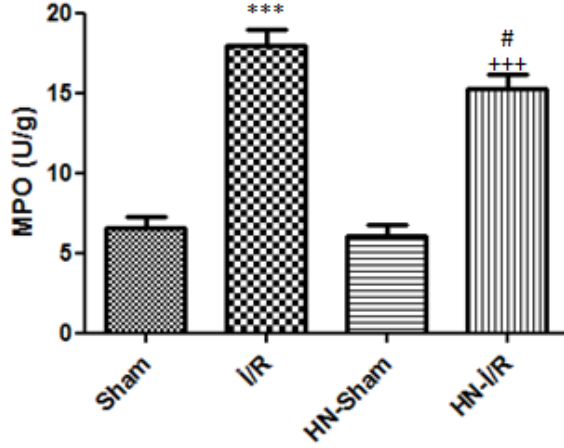


Şekil 4.12. Doku CAT aktivitesi *** $p<0,001$, Sham grubundan fark; +++ $p<0,01$ HN-Sham grubundan fark ($n=8$). CAT; katalaz, İ/R; iskemi/reperfüzyon, HN; humanin.

4.5. İnflamatuar Belirteçler

4.5.1. MPO Aktivitesi

İmmün hücrelerden nötrofillerde bulunan MPO enzimi hasarlı dokuya gerçekleşen nötrofil göçünün bir göstergesidir. Dokudaki inflamatuvar yanıtı değerlendirmek amacıyla ölçülen doku MPO aktivitesi, İ/R grubunda Sham grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,001$) (Şekil 4.13). HN-İ/R grubunun MPO aktivitesi de benzer şekilde HN-Sham grubuna göre anlamlı olarak yüksekti ($p<0,001$). Ek olarak HN-İ/R grubunda ölçülen MPO aktivitesinin İ/R grubuna göre anlamlı şekilde düşük olduğu tespit edildi ($p<0,05$).

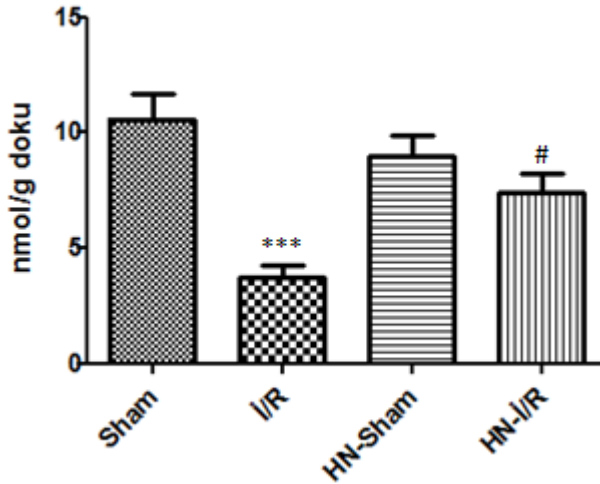


Şekil 4.13. Doku MPO aktivite düzeyi. *** $p < 0,001$, Sham grubundan fark; +++ $p < 0,001$ HN-Sham grubundan fark; # $p < 0,05$ I/R grubundan fark (n=8). MPO; miyeloperoksidaz, I/R; iskemi/reperfüzyon, HN; humanin.

4.6. Mitokondriyal Fonksiyonlar

4.6.1. ATP Düzeyleri

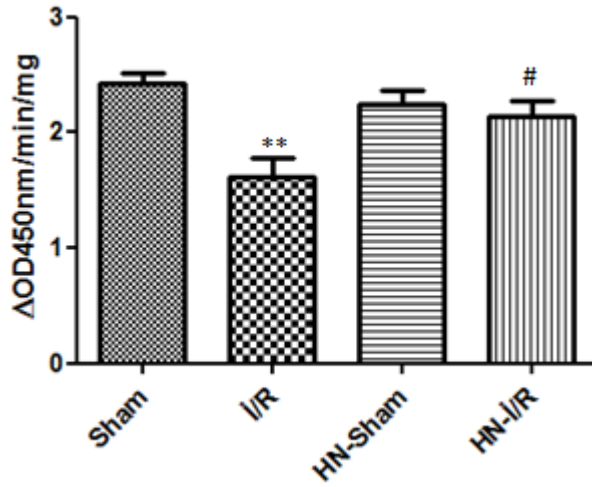
Mitokondriyal fonksiyonların değerlendirmesi amacıyla böbrek dokusu homojenatlarında hücre içi ATP seviyeleri ölçüldü (Şekil 4.14). I/R grubunun ATP seviyelerinin Sham grubuna göre anlamı olarak düşük olduğu tespit edildi ($p < 0,001$). HN-I/R grubunda ölçülen ATP seviyeleri ise HN-Sham grubundan farklı değildi. I/R grubuna göre HN-I/R grubunun ATP düzeyi anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0,05$).



Şekil 4.14. ATP seviyeleri. *** $p < 0,001$, Sham grubundan fark; # $p < 0,05$ I/R grubundan fark (n=8). ATP; adenozin trifosfat, I/R; iskemi/reperfüzyon, HN; humanin.

4.6.2. Kompleks 1 Aktivitesi

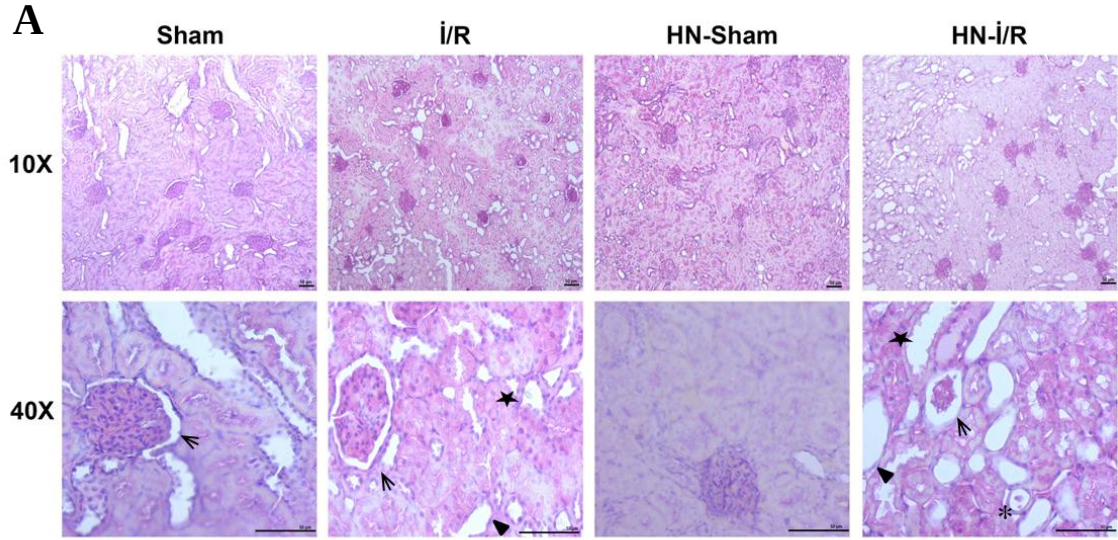
Mitokondriyal fonksiyonların bir göstergesi olarak böbrek dokusundan elde edilen homojenatlarda kompleks 1 aktivite düzeyleri ölçüldü (Şekil 4.15). İ/R grubunun kompleks 1 aktivitesinin Sham grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu tespit edildi ($p<0,01$). HN-İ/R grubunda ölçülen kompleks 1 aktivitesi ise HN-Sham grubundan farklı değildi. İ/R grubuna göre HN-İ/R grubunun kompleks 1 aktivite düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,05$) .



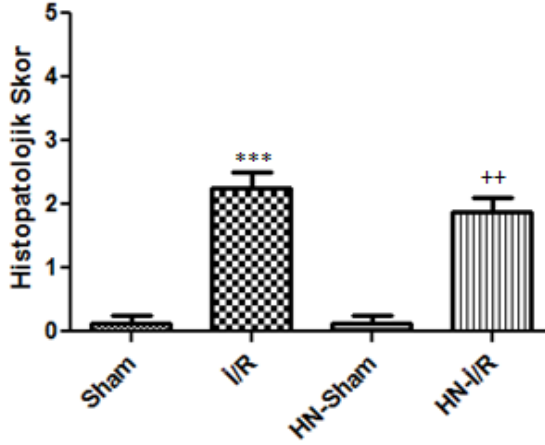
Şekil 4.15. Kompleks 1 aktivitesi. ** $p<0,01$, Sham grubundan fark; # $p<0,05$ İ/R grubundan fark (n=8). OD; optik yoğunluk, İ/R; iskemi/reperfüzyon, HN; humanin.

4.7. Böbrek Dokularının Histopatolojik Analizi

Böbrek dokularından alınan parafin kesitler H&E boyama yapılarak incelendi (Şekil 4.16-A). Tübüllerde yapısal değişiklikler tübüler nekroz - atrofi, tübüler fırçamsı kenar kaybı, tübülerde ve bowman kapsülünde dilatasyon ve kast formasyonu izlenerek histopatolojik olarak skorlandı (Şekil 4.16-B). Buna göre İ/R grubunda tespit edilen histopatolojik hasar skoru Sham grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0,001$). HN-İ/R grubunun histopatolojik hasar skoru da HN-Sham grubundan anlamlı olarak yüksekti ($p<0,01$). HN-İ/R grubunda tespit edilen hasar İ/R grubundakinden farklı bulunmadı.



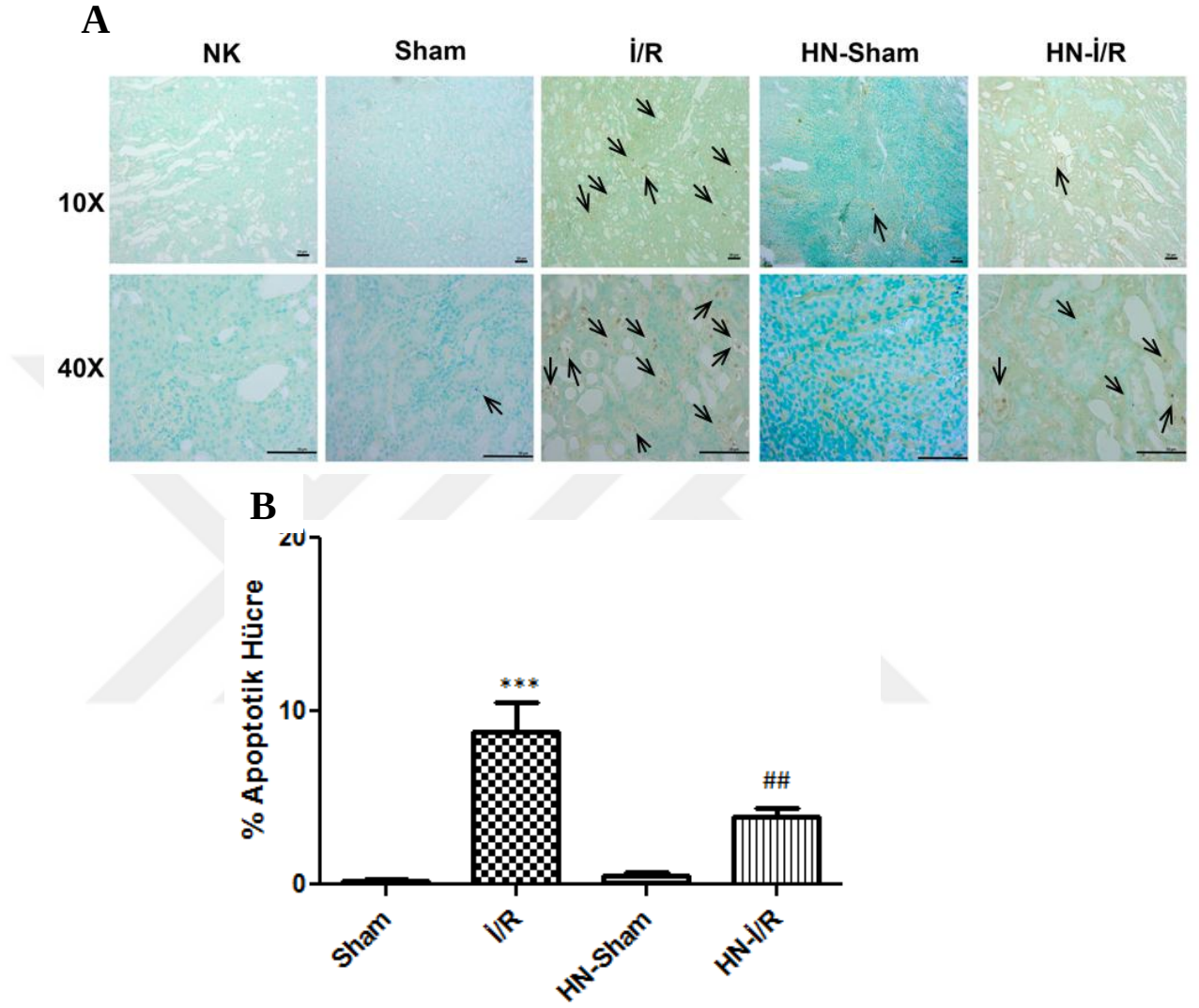
B



Şekil 4.16. Böbrek Dokularının Histopatolojik Analizi A. H&E boyama; tübül dilatasyon ve atrofi, ok başı (►); tübül fırçasmsı kenar kaybı yıldız (★); bowman kapsülü dilatasyonu ok (→); kast formasyonu asterisk (*) ile gösterilmiştir. **B.** Histopatolojik Skorlama *** $p<0,01$, Sham grubundan fark; ++ $p<0,01$ HN-Sham grubundan fark (n=8). İ/R; iskemi/reperfüzyon, HN; humanin.

4.8. Doku Apoptozisinin Değerlendirilmesi

Böbrek dokularındaki apoptotik hücreler Apoptotik Tunel Kiti kullanılarak immünohistokimyasal olarak saptandı (Şekil 4.17 A). Bu amaçla apoptotik hücreler sayıldı ve hücrelerin yüzdesi hesaplandı (Şekil 4.17 B). İ/R grubunda hesaplanan apoptotik hücrelerin yüzdesi Sham grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,001$). HN-İ/R grubunun apoptotik hücre yoğunluğu İ/R grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0,01$).



Şekil 4.17. Tunel boyama. A. Apoptotik hücreler oklar (→) ile işaretlenmiştir. **B.** Apoptotik Hücre Yüzdesi *** $p<0,001$, Sham grubundan fark; ## $p<0,01$ I/R grubundan fark (n=8). I/R; iskemi/reperfüzyon, HN; humanin.

5. TARTIŞMA

Böbrek perfüzyonundaki ani düşüş ile gelişen iskemik ABH sepsis, şok, kalp ameliyatları gibi birçok durumda gelişebilir. Renal İ/R hasarı; ATP eksikliği, hücre içi pH değişiklikleri, artan intraselüler Ca^{+2} miktarı, ROS üretiminde artış, mitokondriyal disfonksiyon ve apoptozun artması gibi bir dizi hücrel hasar mekanizmasını içerir ve böbrek fonksiyonlarının kaybı ile sonuçlanır (Sharfuddin ve ark., 2011).

Renal İ/R modeli iskemik ABH modeli olarak kullanılmaktadır. Böbreklere giden kan akımının azalmasından kaynaklanan iskemik ABH en sık karşılaşılan ABH türlerindendir (Farrar, 2018; Turgut ve ark., 2023). İskemiye ek olarak erken reperfüzyon periyodunda gelişen hasarın ABH'a katkı yaptığı bilinmektedir (Karami ve ark., 2020).

Literatürde GFR'deki ani azalmaya bağlı olarak gelişen sCr miktarlarında en az %50 oranında gerçekleşen artış ABH olarak kabul edilmektedir (Kellum ve ark., 2011). Çalışmamızda sıçanlarda iskemik ABH modeli olarak bilateral renal İ/R oluşturduk ve modelin geçerliliğini sCr düzeylerindeki artış ile doğruladık.

Çalışmamızda iskemik İ/R hasarı üzerine mitokondriyal bir peptit olan HN'nin etkilerini anlamak amacıyla HN tedavisi uyguladık. Tedaviyi reperfüzyon periyodundan hemen önce iv olarak vererek HN'nin reperfüzyon hasarı üzerine etkilerini gözlemledik (Muzumdar ve ark., 2009). Bulgularımıza göre HN uygulaması İ/R hasarına bağlı olarak üretimi artan ROS'ların neden olduğu lipid peroksidasyonunu ve artan nötrofil göçünü azaltarak böbrek dokusunda oksidatif stresi ve inflamatuvar yanıtı baskıladı. Aynı zamanda HN, İ/R sonrası azalan doku GSH seviyeleri ile SOD aktivitesini arttırarak antioksidan kapasitenin de artmasını sağladı. Ayrıca İ/R hasarı ile azalan hücrel ATP seviyelerini ve mitokondriyal kompleks 1 aktivitesini arttırarak mitokondriyal fonksiyonların korunmasına ve sürdürülmesine katkı sağladı. Bu sonuçların yanı sıra HN uygulaması böbrek dokusunda İ/R ile indüklenen apoptozu baskılayarak tübüler hücre kaybının da azalmasına neden oldu.

Bununla birlikte HN tedavisi İ/R hasarı sonucu bozulan böbrek fonksiyonları, azalan CAT aktivitesi ve artan tübüler nekroz üzerine herhangi bir etkide bulunmadı.

5.1. HN'in Böbrek Fonksiyonlarına Etkisi

Renal İ/R hasarı böbrek fonksiyonlarındaki azalmaya bağlı olarak vücuttan atık maddelerin uzaklaştırılamaması ile karakterize bir süreçtir. Azotlu atıklar iskemik böbrek parankiminde birikerek hasarı şiddetlendirir (Bonventre ve ark., 2003). Çalışmamızda İ/R uygulanan gruplarda böbrekte gelişen hasara bağlı olarak sCr ve BUN seviyeleri anlamlı olarak yüksek bulundu. Sodyum ve potasyum atılımları ve idrar albumin miktarları da İ/R gruplarında anlamlı olarak daha yüksekti.

Literatürde HN'nin böbrek fonksiyonları ile ilişkisini konu alan iki çalışma bulunmaktadır. Moin ve ark. diyabetik sıçanlara HN'nin 16 haftalık tedavisinin glisemik kontrol sağlayarak diyabetik nefropati gelişimini baskıladığını ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada HN tedavisinin sCr ve BUN seviyelerini azalttığı ve böbrek fonksiyonlarında koruma sağladığı gösterilmiştir (Moin ve ark., 2023). Zhang ve ark.'nın yaptığı bir diğer çalışmada, apoprotein E eksikliği olan transgenik hayvanlarda HN'nin ateroskleroza bağlı gelişen böbrek hasarı üzerine etkileri incelenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, 16 haftalık HN tedavisinin böbrek fibrozisini azaltarak böbrek hasarını engellediği ancak sCr ve BUN seviyelerini etkilemediği ortaya konmuştur (Zhang X. ve ark., 2012). Bu çalışmanın sonuçlarıyla uyumlu olarak biz de renal İ/R hasarında, reperfüzyon öncesi akut HN uygulamasının, sCr ve BUN seviyelerinde anlamlı bir iyileşmeye neden olmadığını tespit ettik. Dahası İ/R hasarı ile artan idrar albumin miktarları ile sodyum ve potasyum atılımlarında da HN uygulaması ile azalma tespit edilmedi. GFR'nin bir göstergesi olarak hesaplanan Cl_{Cr} İ/R grubunda kendi kontrolüne göre (Sham) anlamlı olarak düşük bulunurken, HN tedavisi alan İ/R grubunun Cl_{Cr} değerinin kendi kontrolünden (HN-Sham) farksız bulunması, bu grupta HN uygulamasının GFR'nin en azından korunmasına aracılık etmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Bizim çalışmamızda HN'nin doku düzeyindeki olumlu etkilerine karşın benzer etkilerin böbrek fonksiyonlarına yansımalarının birkaç nedeni olabilir. Çalışmamızda tek dozluk

akut HN tedavisi uyguladığımız için literatürdeki en yüksek doz olan 2 mg/kg dozunu seçtik (Muzumdar ve ark., 2010). Bununla birlikte 45 dk iskemi 24 saat reperfüzyon uyguladığımız çalışmamızda, HN tedavisini reperfüzyondan 10 dk önce ve tek doz olarak uyguladık (Wilhelm ve ark., 2001). Daha yüksek HN dozu, daha uzun süreli HN uygulaması ve/veya reperfüzyon döneminde tedavinin tekrarlanması gibi faktörlerin, çalışmamızda olduğu gibi HN'nin böbrek fonksiyonlarını etkilemeyişinde rolü olabileceğini düşünüyoruz. Ayrıca çalışmamızda uyguladığımız 24 saatlik reperfüzyon ve idrar toplama sürecinde HN'nin böbrek fonksiyonları üzerine olası olumlu etkilerinin ortaya çıkması için yeterli süre sağlanamamış olabilir. Daha uzun reperfüzyon süresi ile tasarlanacak İ/R modellerinde HN tedavisinin böbrek fonksiyonları üzerine etkilerini inceleyecek daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

5.2. HN'nin Oksidatif Hasar Üzerine Etkisi

Hücrede başlıca proteinler ve lipitler ile reaksiyona girerek hücresel yapı ve fonksiyonların bozulmasına neden olan ROS'lar birçok patolojik durumda artar. Yapılan çalışmalarda nöronlar, kardiyak miyoblastlar, endotel hücreleri gibi farklı hücrelerde H₂O₂, yüksek glukoz, NMDA gibi sitotoksik ajanlar tarafından indüklenen ROS üretiminin HN tarafından engellendiği bulunmuştur (Klein ve ark., 2013; Xie ve ark., 2014; Cui ve ark., 2017). Biz de çalışmamızda İ/R ile artan MDA seviyelerinin HN tedavisi ile azaldığını gösterdik. Yapılan benzer çalışmalarda HN'nin beyin ve kalp İ/R hasarı ile artan ROS üretimini azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca beyinde ve bağırsakta ROS'ların neden olduğu lipid peroksidasyonunun da HN ile önlendiği ortaya konmuştur (Zhao S.-T. ve ark., 2012; Gao ve ark., 2017; Abozaid ve ark., 2023).

HN oksidatif stresi baskılayıcı etkileri birkaç şekilde açıklanmaktadır. Egzojen olarak ortama verilen HN mitokondriler ile kolokelize olur ve mitokondriyal fonksiyonları doğrudan düzenleyerek etki gösterir (Sreekumar ve ark., 2016). Ayrıca HN'nin oksidatif stresi ve MDA seviyelerini azaltıcı etkilerini trimerik reseptörleri ve STAT3 yolağı üzerinde de yapabileceği öne sürülmüştür (Gao ve ark., 2017).

5.3. HN'nin Antioksidan Sistem Üzerine Etkisi

İ/R hasarında böbrekte antioksidan kapasitenin azaldığı bilinmektedir. İskemi sonrasında yalnızca CAT enzim aktivitesinde azalma görülse de reperfüzyon hasarı CAT protein miktarında, SOD ve GPx aktivitelerinde de azalma ile sonuçlanır (Gulati ve ark., 1992; Singh ve ark., 1993). Çok sayıda çalışmada HN'nin antioksidan etkinlik gösterdiği kanıtlanmıştır. HN'nin, H₂O₂'ye maruz bırakılan kardiyak miyoblastlarda SOD, CAT ve GPx enzim aktivitelerini artırdığı gösterilmiştir (Klein ve ark., 2013). Ayrıca endoplazmik retikulum stresi oluşturulmuş insan retinal pigment epitelyal hücrelerinde (hRPE) azalan mitokondriyal GSH düzeylerinin HN uygulaması ile korunduğu ortaya konmuştur (Matsunaga ve ark., 2016). Bu verilerle uyumlu olarak bizim çalışmamızda da İ/R hasarına bağlı olarak azalan GSH seviyeleri ve SOD aktivitesi HN tedavisi ile anlamlı olarak artmış bulundu. Fakat çalışmamızda HN, İ/R hasarı ile azalan CAT enzim aktivitelerinde bir iyileşmeye neden olmadı. Renal İ/R sırasında diğer antioksidan enzimlerden farklı olarak yalnızca CAT aktivitesi değil, CAT protein sentezi de azalmaktadır (Singh ve ark., 1993). Çalışmamızda HN tedavisi ile CAT aktivitesinde artış tespit edilememesinin nedeni CAT protein seviyelerindeki azalma olabilir. Nitekim İ/R modeli kullanılarak yapılan çalışmalarda da bağırsak ve beyin dokularında İ/R hasarı ile azalan SOD ve GPx aktivitesinin HN tedavisi ile korunduğu gösterilmiş, ancak bu çalışmalarda CAT aktivitesi araştırılmamıştır (Zhao S.-T. ve ark., 2012; Abozaid ve ark., 2023).

HN'nin antioksidan etkinliğinin mekanizmasını araştırmak isteyen Gao ve ark. nöroblastoma hücrelerinde uygulanan oksijen-glikoz yoksunluğu/reoksijenasyonun neden olduğu hücresel hasarda HN'nin SOD ve GPx aktivitesini arttırarak antioksidatif ve antiapoptotik etkiler gösterdiğini tespit etmiş ve HN'nin bu etkilerini trimerik reseptörleri üzerinden Jak2/STAT3 sinyal yolağının aktivasyonu yoluyla gösterdiğini ortaya koymuşlardır (Gao ve ark., 2017). Ayrıca, HN mitokondriyal fonksiyonları koruyarak ve hücre içi ATP düzeylerini arttırarak da antioksidan enzim aktivitelerinin korunmasına katkı sağlıyor olabilir (Kariya ve ark., 2005; Kuliawat ve ark., 2013; Cohen ve ark., 2015).

5.4. HN'nin İnflamasyon Üzerine Etkisi

Renal İ/R nedeniyle hasarlanan tübüler ve endotelyal hücreler, sitokinler ve kemokinler gibi inflamatuvar mediyatörleri üreterek böbreklere lökosit göçünü başlatır (de Bhailís Á ve ark., 2021). HN, nöronal hücre kültürleriyle yapılan çok sayıda çalışmada pro-inflamatuvar sitokinler üzerine yaptığı baskılayıcı etkileri nedeniyle, anti-inflamatuvar bir peptit olarak nitelendirilmiştir (Zhao S. T. ve ark., 2013; Shi ve ark., 2021). HN'nin yaşlanmaya bağlı gelişen nöroinflamasyonu azalttığı, diyabetik nefropatide ve travmatik beyin hasarında pro-inflamatuvar sitokinleri baskıldığı gösterilmiştir (Moin ve ark., 2023; Thapak ve ark., 2024). Bağırsak İ/R modelinde HN'nin pro-inflamatuvar sitokinleri baskıladığı ortaya konmuştur (Abozaid ve ark., 2023). Biz de çalışmamızda renal İ/R hasarında oluşan inflamatuvar yanıt hakkında fikir sahibi olmak amacıyla nötrofillerin dokuya göçünün bir göstergesi olan MPO aktivitesini inceledik. Sonuçlarımıza göre HN uygulaması İ/R hasarının neden olduğu MPO aktivitesini azalttı. Bener şekilde farelerde mono-sodyum ürat (MSU) kristalleri ile oluşturulan Gut artriti modelinde 7 günlük HN tedavisi, eklem luminal sinovyal dokularında MPO aktivitesini azaltarak ve nod benzeri reseptör ailesi protein (NLRP) 3'ü baskılayarak anti-inflamatuvar etki gösterdiği saptanmıştır (Zhang J. ve ark., 2022). Ayrıca HN'nin nükleer faktör kappa B (NF-κB) aktivasyonunu baskılayarak da anti-inflamatuvar etkiler gösterebileceği bildirilmiştir (Wu ve ark., 2023).

5.5. HN'nin Mitokondriyal Fonksiyonlara Etkisi

İ/R hasarına bağlı gelişen mitokondriyal disfonksiyon organelin şişmesi, kristalar ve zarlar arası boşlukların artması, mitokondriyal zar potansiyelinin azalması ile karakterize bir süreçtir (Bonventre ve ark., 2011). İ/R sonrası dokuda fonksiyonel mitokondri sayısında kayıp görülür (Szeto, 2017). HN'nin mitokondriyal biyogenezi arttırarak, ETZ komplekslerinin aktivitelerini ve mitokondriyal zar potansiyelini düzenleyerek mitokondriyal fonksiyonlarda düzenleyici roller üstlenebileceği düşünülmektedir (Klein ve ark., 2013; Kuliawat ve ark., 2013; Qin ve ark., 2018; Rochette, 2020).

HN'nin nöronlar, kas hücreleri, pankreatik β hücreleri gibi birçok farklı hücre tipinde hücre içi ATP seviyelerini arttırdığı rapor edilmiştir (Kariya ve ark., 2005; Kuliawat ve

ark., 2013; Cohen ve ark., 2015; Voigt ve ark., 2016). Biz de bu bulgularla uyumlu olarak çalışmamızda, İ/R hasarı ile azalan hücre içi ATP seviyelerinin HN tedavisi ile arttığını gösterdik. Cohen ve ark. HN'nin bu etkisini ATP sentaz (kompleks V) enzim aktivitesini arttırarak gerçekleştirdiğini ortaya koymuştur (Cohen ve ark., 2015).

İ/R hasarı sonrası renal mitokondriler fonksiyonlarını yitirebilir ve mitokondrilerde yüksek düzeyde elektron sızıntıları gözlenir. Kompleks I, kompleks II, ATP sentaz gibi ETZ enzimlerinin aktiviteleri azalır. Reperfüzyon sonrasında bu enzim aktivitelerinin artması beklenir. Renal İ/R sonrasında özellikle kompleks I aktivitesinde gözlenen kalıcı azalma mitokondriyal disfonksiyonun bir belirteci olarak kullanılır (Ishimoto ve ark., 2015; Li L. ve ark., 2023).

Çalışmamızda renal İ/R hasarı sonrasında mitokondriyal fonksiyonun göstergesi olarak kompleks I aktivitesini ölçtük. HN tedavisinin İ/R hasarına bağlı olarak azalan kompleks I aktivitesini arttırdığını tespit ettik. HN'nin diğer ETZ kompleks aktiviteleri ile etkileşimine dair literatürde pek veri bulunmamaktadır Thummasorn ve ark.; kardiyomiyositlerden izole edilen mitokondrilerde HN'nin, mitokondriyal kompleks I aktivitesini inhibe ettiğini göstermiş ve H₂O₂ maruziyeti sonrası artan ROS üretimini de bu yolla azalttığını öne sürmüşlerdir (Thummasorn Savitree ve ark., 2018). Bu çelişkili sonuç, çalışmalarda uygulanan metod farklılıklarından kaynaklanıyor olabilir. Nitekim Thummasorn ve ark.'nın mitokondrilere izole koşullarda sitotoksik bir ajanla muamele etmesi, mitokondrilerin fizyolojik koşullardan farklı davranmasına neden olmuş olabilir ve bu durum sonuçlarımızdaki farklılığın nedenini oluşturuyor olabilir (Thummasorn Savitree ve ark., 2018).

5.6. HN'nin Apoptozise Etkisi

Renal İ/R hasarı sonrasında vasküler endotelial hücreler ve tübüler hücreler iç ve dış uyarılar ile apoptotik süreçlere girebilir ve doku hasarına katkı yapabilir (Bonventre ve ark., 2003; Saikumar ve ark., 2003). HN'nin keşfinin ardından in vitro ve in vivo antiapoptotik etkileri birçok çalışmada ortaya konmuştur (Guo ve ark., 2003; Ikonen ve ark., 2003; Thiankhaw ve ark., 2022; Abozaid ve ark., 2023). Bağırsak İ/R modelinde HN tedavisinin bağırsak dokusunda apoptozisi kaspaz 3 inhibisyonu yoluyla baskıladığı

gösterilmiştir (Abozaid ve ark., 2023) Biz de çalışmamıza böbrekte İ/R ile indüklenen apoptozisin HN tedavisi ile azaldığını ortaya koyduk. Yapılan çalışmalar, HN'nin hücre içinde pro-apoptotik protein olan BAX'a bağlanarak mitokondrilere translokasyonunu engellediğini ve apoptozisi inhibe ettiğini göstermiştir (Guo ve ark., 2003). Yine hücre içinde IGFBP-3'e bağlanarak IGFBP-3'ün neden olduğu apoptozisten hücreleri koruduğu bilinmektedir (Ikonen ve ark., 2003). Ek olarak hücre içinde STAT3 fosforilasyonunu artırarak kaspaz 3 inhibisyonuna neden olduğu da oraya konmuştur (Sreekumar ve ark., 2016).

5.7. HN'nin Doku Hasarı Üzerine Etkisi

Renal İ/R hasarında iskemi ile gelişen tübüler nekroz dokudaki hasarın kaynağını oluştursa da patolojik apoptoz mekanizmaları da doku hasarlanmasına katkı sağlar (Saikumar ve ark., 2003). İskemi sırasında uygulanan HN tedavisinin bağırsak İ/R hasarında doku hasarını azaltarak bağırsaklarda fırçamsı kenar kaybını önlediği gösterilmiştir (Abozaid ve ark., 2023). Biz çalışmamızda renal İ/R uygulayarak böbrekte tübüler nekroz, atrofi, dilatasyon, fırçamsı kenar kaybı ve kast formasyonunu değerlendirdik ve reperfüzyon öncesinde uygulanan HN'nin bu parametrelerde iyileşmeye neden olmadığını gördük.

İ/R ve HN-İ/R grublarında böbrek fonksiyonlarının Sham gruplarına göre bozulduğunu çalışmamızda ortaya koymuştuk. Bu gruplarda histopatolojik hasar skorunun da Sham gruplarına göre yüksek gözlenmesi böbrek fonksiyon kaybını açıklar niteliktedir.

Bulgularımızdan farklı olarak kardiyak İ/R hasarında HN etkisinin incelendiği bir çalışmada iskemiden 15 dk önce uygulanan yüksek doz HN analogunun infarkt boyutunda azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Thummasorn S. ve ark., 2017). Bulgularımızın literatür ile farklılık göstermesinin en olası nedeninin, HN uygulamasının zamanlamasındaki farklılık olduğunu düşünüyoruz. Biz çalışmamızda İ/R modelinde HN tedavisini reperfüzyon hasarı üzerine etkilerini araştırmak amacıyla reperfüzyondan 10 dk önce uyguladık (Muzumdar ve ark., 2010). Oysa yukarıdaki çalışmalarda HN iskemiden önce bir ön koşullama olarak uygulanmıştır ve dolayısıyla

bu çalışmalarda HN'nin iskemi sırasında oluşan nekrozdan koruyucu etkileri incelenmiştir (Thummasorn S. ve ark., 2017; Abozaid ve ark., 2023). Böbrek İ/R hasarında iskemi sırasında başlıca hücre ölüm yolunun nekroz olduğu bilinmektedir (Kosieradzki ve ark., 2008; Venkatachalam ve ark., 2015). Çalışmamızda reperfüzyon sırasında uygulanan HN dokuyu apoptozisten korumuştur fakat iskemik periyotta dokunun maruz kaldığı nekrotik hasar çok yoğun olduğu için HN histopatolojik hasar skorunda iyileşme üzerine etkisiz kalmıştır. İ/R hasarında böbrek doku hasarı zerine HN'nin etkilerinin, iskemi öncesinde HN tedavisi uygulanarak incelenmesi HN'nin nekroz üzerine etkilerini daha net şekilde ortaya koyacaktır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Akut böbrek yetmezliğinin en sık nedeni olan iskemik böbrek hasarı; böbrek transplantasyonu, enfeksiyonlar, vasküler tıkanmalar gibi durumlarda gelişebilmekte ve bu durum akut böbrek hasarına neden olabilmektedir(Böhmová ve ark., 2001). Renal tübüler hücre kaybına ve böbrek fonksiyonlarının sürdürülememesine bağlı olarak, metabolik atık ürünler uzaklaştırılmaz, su ve elektrolit dengesi sağlanamaz ve vücut iç dengesinde önemli bozulmalar ortaya çıkar (Pefanis ve ark., 2019). Dahası böbrek dokusu reperfüze olduğunda yani kanlanma yeniden sağlandığında bile hasarlanma devam eder ve böbrek fonksiyonları daha fazla bozulabilir (Basile ve ark., 2012).

İskemi-Reperfüzyon (İ/R) hasarı organların fonksiyonunu bozan hipoksi ve takiben reperfüzyon sırasında ortaya çıkan güçlü inflamatuvar yanıt ve yaygın oksidatif stres ile ilişkilidir(Kanagasundaram, 2015). Doku kanlanmasının azalmasıyla birlikte ATP üretimi azalır, mitokondriyal disfonksiyon başlar, ROS üretiminin artmasına ve inflamasyon yanıtının gelişmesine bağlı olarak doku hasarı gelişir (Bonventre ve ark., 2011; Sharfuddin ve ark., 2011). Ayrıca antioksidan sistem aktivitesinin azalması da İ/R hasarına katkı sağlar (Singh ve ark., 1993).

Hücrel strese yanıt olarak üretilen ve mitokondriyal türevli bir peptid olan HN ilk kez Alzheimer hastalarında amiloid beta plaklarında tanımlanmıştır (Hashimoto Yuichi ve ark., 2001a). Sitoprotektif etkileriyle öne çıkan HN'nin, beyin, kalp ve bağırsak dokusunda İ/R hasarı üzerine etkileri incelenmiş ve bu çalışmalarda ROS üretimini azalttığı, antioksidan sistemi güçlendirdiği, antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkiler göstererek İ/R hasarına karşı koruyucu bir rol üstlendiği ortaya konmuştur (Xu ve ark., 2006; Muzumdar ve ark., 2010; Abozaid ve ark., 2023). Öte yandan HN'nin renal İ/R hasarı üzerine olası etkileri bugüne kadar araştırılmamıştır.

Çalışmamızda reperfüzyondan önce uygulanan HN tedavisinin oksidatif stresi azalttığını, antioksidan kapasiteyi artırdığını, inflamasyonu ve apoptozu azalttığını tespit ettik. Ek olarak mitokondriyal fonksiyonları koruyarak kompleks 1 aktivitesini ve ATP

seviyelerini arttırdığını kanıtladık. Elde ettiğimiz bu veriler, HN'nin reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etki gösterdiğini düşündürmektedir

Bununla birlikte çalışmamızda, İ/R gruplarında yüksek bulunan kan üre azotu, serum kreatininin, idrar albumin düzeyleri ile sodyum ve potasyum atılımları ve HN tedavisinden etkilenmedi. Öte yandan İ/R grubunda düşük bulunan kreatin klirensi HN tedavisiyle artma eğilimi gösterse de bu durum anlamlı bir farka neden olmadı. Elde ettiğimiz bu sonuçlar, HN'nin hücresel düzeyde gösterdiği koruyucu etkilerin böbrek fonksiyonlarına tam olarak yansımadığını düşündürmektedir.

Çalışmamızda HN'nin doku düzeyindeki olumlu etkilerinin renal fonksiyonlara yansımamış olmasının birkaç nedeni olabilir. Bunlar arasında reperfüzyon süresinin görece kısa olması, reperfüzyon periyodunda HN uygulamasının tekrarlanmamış olması gibi faktörler etkili olmuş olabilir. Bu değişkenler göz önüne alınarak yeni çalışmaların planlanmasının faydalı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abozaid ER, Abdel-Kareem RH, Habib MA. A novel beneficial role of humanin on intestinal apoptosis and dysmotility in a rat model of ischemia reperfusion injury. *Pflugers Arch.* 2023; 475: 655-666.
- Acharya V, Olivero J. The kidney as an endocrine organ. *Methodist Debaquey Cardiovasc J.* 2018; 14: 305-307.
- Adams JM, Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: Mechanism and therapeutic potential. *Current Opinion in Immunology.* 2007; 19: 488-496.
- Aebi H. [13] catalase in vitro. In *Methods in enzymology.* Academic Press; 1984, 105, p. 121-126.
- Ahmad AA, Draves SO, Rosca M. Mitochondria in diabetic kidney disease. *Cells.* 2021; 10.
- Atlas SA, Volpe M, Sosa RE, Laragh JH, Camargo MJ, Maack T. Effects of atrial natriuretic factor on blood pressure and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Fed Proc.* 1986; 45: 2115-2121.
- Awad AS, Rouse M, Huang L, Vergis AL, Reutershan J, Cathro HP , ve ark. Compartmentalization of neutrophils in the kidney and lung following acute ischemic kidney injury. *Kidney Int.* 2009; 75: 689-698.
- Aykaç G, Uysal M, Yalçın AS, Koçak-Toker N, Sivas A, Oz H. The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. *Toxicology.* 1985; 36: 71-76.
- Banai S, Shweiki D, Pinson A, Chandra M, Lazarovici G, Keshet E. Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia: Implications for coronary angiogenesis. *Cardiovasc Res.* 1994; 28: 1176-1179.
- Bankir L, Bichet DG, Morgenthaler NG. Vasopressin: Physiology, assessment and osmosensation. *J Intern Med.* 2017; 282: 284-297.
- Barroso LC, Silveira KD, Lima CX, Borges V, Bader M, Rachid M , ve ark. Renoprotective effects of ave0991, a nonpeptide mas receptor agonist, in experimental acute renal injury. *Int J Hypertens.* 2012; 2012: 808726.
- Basile DP, Anderson MD, Sutton TA. Pathophysiology of acute kidney injury. *Compr Physiol.* 2012; 2: 1303-1353.

Basile DP, Fredrich K, Chelladurai B, Leonard EC, Parrish AR. Renal ischemia reperfusion inhibits vegf expression and induces adamts-1, a novel vegf inhibitor. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008; 294: F928-936.

Bekheirnia MR, Schrier RW. Pathophysiology of water and sodium retention: Edematous states with normal kidney function. *Curr Opin Pharmacol*. 2006; 6: 202-207.

Bhargava P, Schnellmann RG. Mitochondrial energetics in the kidney. *Nat Rev Nephrol*. 2017; 13: 629-646.

Björkman O, Felig P, Wahren J. The contrasting responses of splanchnic and renal glucose output to gluconeogenic substrates and to hypoglucagonemia in 60-h-fasted humans. *Diabetes*. 1980; 29: 610-616.

Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2003; 14: 2199-2210.

Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest*. 2011; 121: 4210-4221.

Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: An inflammatory disease? *Kidney Int*. 2004; 66: 480-485.

Booth RE, Johnson JP, Stockand JD. Aldosterone. *Adv Physiol Educ*. 2002; 26: 8-20.

Boron WF, Boulpaep EL. Medical physiology, 3. Edition. In M Baştuğ, M Uzun, M Edremitlioğlu, HA Eroğlu (Eds.), *Medikal fizyoloji*. 3. ed., Malatya: Medipres; 2019, p. 722-745.

Böhmová R, Viklický O. Renal ischemia--reperfusion injury: An inescapable event affecting kidney transplantation outcome. *Folia Microbiol (Praha)*. 2001; 46: 267-276.

Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *Journal of Investigative Dermatology*. 1982; 78: 206-209.

Britannica E. (2023). Human kidney; nephron. Retrieved from <https://www.britannica.com/science/human-renal-system/Renal-vessels-and-nerves#/media/1/1800823/99765>

Brosnihan KB, Li P, Ferrario CM. Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension*. 1996; 27: 523-528.

Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978; 52: 302-310.

Cai H, Liu Y, Men H, Zheng Y. Protective mechanism of humanin against oxidative stress in aging-related cardiovascular diseases. *Frontiers in Endocrinology.* 2021: 680.

Carey RM, McGrath HE, Pentz ES, Gomez RA, Barrett PQ. Biomechanical coupling in renin-releasing cells. *J Clin Invest.* 1997; 100: 1566-1574.

Caricasole A, Bruno V, Cappuccio I, Melchiorri D, Copani A, Nicoletti F. A novel rat gene encoding a humanin-like peptide endowed with broad neuroprotective activity. *Faseb j.* 2002; 16: 1331-1333.

Chen Y-T, Sun C-K, Lin Y-C, Chang L-T, Chen Y-L, Tsai T-H , ve ark. Adipose-derived mesenchymal stem cell protects kidneys against ischemia-reperfusion injury through suppressing oxidative stress and inflammatory reaction. *Journal of Translational Medicine.* 2011; 9: 51.

Chin YP, Keni J, Wan J, Mehta H, Anene F, Jia Y , ve ark. Pharmacokinetics and tissue distribution of humanin and its analogues in male rodents. *Endocrinology.* 2013; 154: 3739-3744.

Choi J, Zhai D, Zhou X, Satterthwait A, Reed JC, Marassi FM. Mapping the specific cytoprotective interaction of humanin with the pro-apoptotic protein bid. *Chem Biol Drug Des.* 2007; 70: 383-392.

Cohen A, Lerner-Yardeni J, Meridor D, Kasher R, Nathan I, Parola AH. Humanin derivatives inhibit necrotic cell death in neurons. *Mol Med.* 2015; 21: 505-514.

Costanzo LS. Physiology, sixth edition. In L Öztürk (Ed.), *Fizyoloji.* 6 ed., Ankara: Hipokrat Kitapevi; 2018, p. 245-246.

Cui AL, Zhang YH, Li JZ, Song T, Liu XM, Wang H , ve ark. Humanin rescues cultured rat cortical neurons from nmda-induced toxicity through the alleviation of mitochondrial dysfunction. *Drug Des Devel Ther.* 2017; 11: 1243-1253.

da Silveira KD, Pompermayer Bosco KS, Diniz LR, Carmona AK, Cassali GD, Bruna-Romero O , ve ark. Ace2-angiotensin-(1-7)-mas axis in renal ischaemia/reperfusion injury in rats. *Clin Sci (Lond).* 2010; 119: 385-394.

de Bhailís Á M, Chrysochou C, Kalra PA. Inflammation and oxidative damage in ischaemic renal disease. *Antioxidants (Basel).* 2021; 10.

de Wardener HE. Control of sodium reabsorption. *Br Med J*. 1969; 3: 611-616 contd.

Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE , ve ark. Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*. 2012; 149: 1060-1072.

Duann P, Lin PH. Mitochondria damage and kidney disease. *Adv Exp Med Biol*. 2017; 982: 529-551.

Dussol B. Équilibre acidobasique : Acidoses et alcaloses métaboliques. *Néphrologie & Thérapeutique*. 2014; 10: 246-257.

Edelstein CL. Biomarkers of acute kidney injury. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2008; 15: 222-234.

Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1959; 82: 70-77.

Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*. 2007; 35: 495-516.

Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med*. 2011; 17: 1391-1401.

Esquivel G, Schruers KR, Maddock RJ, Colasanti A, Griez EJ. Acids in the brain: A factor in panic? *J Psychopharmacol*. 2010; 24: 639-647.

Farrar A. Acute kidney injury. *Nursing Clinics of North America*. 2018; 53: 499-510.

Fernandes L, Fortes ZB, Nigro D, Tostes RC, Santos RA, Catelli De Carvalho MH. Potentiation of bradykinin by angiotensin-(1-7) on arterioles of spontaneously hypertensive rats studied in vivo. *Hypertension*. 2001; 37: 703-709.

Filardy AA, Pires DR, Nunes MP, Takiya CM, Freire-de-Lima CG, Ribeiro-Gomes FL , ve ark. Proinflammatory clearance of apoptotic neutrophils induces an il-12(low)il-10(high) regulatory phenotype in macrophages. *J Immunol*. 2010; 185: 2044-2050.

Flores J, DiBona DR, Beck CH, Leaf A. The role of cell swelling in ischemic renal damage and the protective effect of hypertonic solute. *J Clin Invest*. 1972; 51: 118-126.

Fotiadis D, Kanai Y, Palacín M. The slc3 and slc7 families of amino acid transporters. *Molecular Aspects of Medicine*. 2013; 34: 139-158.

Gao G, Fan H, Zhang X, Zhang F, Wu H, Qi F , ve ark. Neuroprotective effect of g14-humanin on global cerebral ischemia/reperfusion by activation of socs3 – stat3 – mcl-1 signal transduction pathway in rats. *Neurological Research*. 2017; 39: 895-903.

Gerich JE, Meyer C, Woerle HJ, Stumvoll M. Renal gluconeogenesis: Its importance in human glucose homeostasis. *Diabetes Care*. 2001; 24: 382-391.

Gibson CJ, Davids MS. Bcl-2 antagonism to target the intrinsic mitochondrial pathway of apoptosis. *Clin Cancer Res*. 2015; 21: 5021-5029.

Gidlund EK, von Walden F, Venojärvi M, Risérus U, Heinonen OJ, Norrbom J , ve ark. Humanin skeletal muscle protein levels increase after resistance training in men with impaired glucose metabolism. *Physiol Rep*. 2016; 4.

Gokhan A, Kılıc K, Gulle K, Uyanıkgil Y, Çavusoglu T. Apoptotic pathways and targeted therapies. *Med. J*. 2020; 27: 565-573.

Goligorsky MS, Brodsky SV, Noiri E. Nitric oxide in acute renal failure: Nos versus nos. *Kidney Int*. 2002; 61: 855-861.

Gottardo MF, Moreno Ayala M, Ferraris J, Zárate S, Pisera D, Candolfi M , ve ark. Humanin inhibits apoptosis in pituitary tumor cells through several signaling pathways including nf-kb activation. *Journal of Cell Communication and Signaling*. 2017; 11: 329-340.

Greger R. [pathophysiology of renal ischemia]. *Z Kardiol*. 1987; 76 Suppl 4: 81-86.

Gulati S, Singh AK, Irazu C, Orak J, Rajagopalan PR, Fitts CT , ve ark. Ischemia-reperfusion injury: Biochemical alterations in peroxisomes of rat kidney. *Arch Biochem Biophys*. 1992; 295: 90-100.

Guo B, Zhai D, Cabezas E, Welsh K, Nouraini S, Satterthwait AC , ve ark. Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with bax activation. *Nature*. 2003; 423: 456-461.

Hajnóczky G, Davies E, Madesh M. Calcium signaling and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 304: 445-454.

Hall JE, Hall ME. Guyton and hall textbook of medical physiology. In BÇ Yeğen (Ed.), *Guyton ve hall medikal fizyoloji*. Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri; 2021, p. 321-338.

Hamm LL, Nakhoul N, Hering-Smith KS. Acid-base homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015; 10: 2232-2242.

Hashimoto Y, Kurita M, Aiso S, Nishimoto I, Matsuoka M. Humanin inhibits neuronal cell death by interacting with a cytokine receptor complex or complexes involving cntf receptor α /wsx-1/gp130. *Molecular biology of the cell*. 2009; 20: 2864-2873.

Hashimoto Y, Niikura T, Ito Y, Sudo H, Hata M, Arakawa E , ve ark. Detailed characterization of neuroprotection by a rescue factor humanin against various alzheimer's disease-relevant insults. *Journal of Neuroscience*. 2001a; 21: 9235-9245.

Hashimoto Y, Niikura T, Tajima H, Yasukawa T, Sudo H, Ito Y , ve ark. A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial alzheimer's disease genes and $\alpha\beta$. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001b; 98: 6336-6341.

Hashimoto Y, Suzuki H, Aiso S, Niikura T, Nishimoto I, Matsuoka M. Involvement of tyrosine kinases and stat3 in humanin-mediated neuroprotection. *Life Sci*. 2005; 77: 3092-3104.

Hasler U, Leroy V, Martin PY, Féraille E. Aquaporin-2 abundance in the renal collecting duct: New insights from cultured cell models. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009; 297: F10-18.

Haussler MR, McCain TA. Basic and clinical concepts related to vitamin d metabolism and action. *New England Journal of Medicine*. 1977; 297: 974-983.

Havasi A, Borkan SC. Apoptosis and acute kidney injury. *Kidney international*. 2011; 80: 29-40.

Hazafa A, Batool A, Ahmad S, Amjad M, Chaudhry SN, Asad J , ve ark. Humanin: A mitochondrial-derived peptide in the treatment of apoptosis-related diseases. *Life Sciences*. 2021; 264: 118679.

Heinzelmann M, Mercer-Jones MA, Passmore JC. Neutrophils and renal failure. *Am J Kidney Dis*. 1999; 34: 384-399.

Helal I, Fick-Brosnahan GM, Reed-Gitomer B, Schrier RW. Glomerular hyperfiltration: Definitions, mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Nephrol*. 2012; 8: 293-300.

Henson PM, Johnston RB, Jr. Tissue injury in inflammation. Oxidants, proteinases, and cationic proteins. *J Clin Invest*. 1987; 79: 669-674.

Hoang PT, Park P, Cobb LJ, Paharkova-Vatchkova V, Hakimi M, Cohen P , ve ark. The neurosurvival factor humanin inhibits β -cell apoptosis via signal transducer and activator

of transcription 3 activation and delays and ameliorates diabetes in nonobese diabetic mice. *Metabolism*. 2010; 59: 343-349.

Hommos MS, Glassock RJ, Rule AD. Structural and functional changes in human kidneys with healthy aging. *J Am Soc Nephrol*. 2017; 28: 2838-2844.

Hörbelt M, Lee SY, Mang HE, Knipe NL, Sado Y, Kribben A , ve ark. Acute and chronic microvascular alterations in a mouse model of ischemic acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007; 293: F688-695.

Ikonen M, Liu B, Hashimoto Y, Ma L, Lee K-W, Niikura T , ve ark. Interaction between the alzheimer's survival peptide humanin and insulin-like growth factor-binding protein 3 regulates cell survival and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003; 100: 13042-13047.

Iwai M, Horiuchi M. Devil and angel in the renin-angiotensin system: Ace-angiotensin ii-at1 receptor axis vs. Ace2-angiotensin-(1-7)-mas receptor axis. *Hypertens Res*. 2009; 32: 533-536.

Jin H, Liu T, Wang WX, Xu JH, Yang PB, Lu HX , ve ark. Protective effects of [gly14]-humanin on beta-amyloid-induced pc12 cell death by preventing mitochondrial dysfunction. *Neurochem Int*. 2010; 56: 417-423.

Johnson KJ, Weinberg JM. Postischemic renal injury due to oxygen radicals. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 1993; 2: 625-635.

Jones M. Recognising acute kidney injury. *Clin Med (Lond)*. 2012; 12: 287-289.

Jun W, Benjanuwattra J, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Necroptosis in renal ischemia/reperfusion injury: A major mode of cell death? *Archives of biochemistry and biophysics*. 2020; 689: 108433.

Kaminski KA, Bonda TA, Korecki J, Musial WJ. Oxidative stress and neutrophil activation—the two keystones of ischemia/reperfusion injury. *International Journal of Cardiology*. 2002; 86: 41-59.

Kanagasundaram NS. Pathophysiology of ischaemic acute kidney injury. *Ann Clin Biochem*. 2015; 52: 193-205.

Kanellis J, Mudge SJ, Fraser S, Katerelos M, Power DA. Redistribution of cytoplasmic vegf to the basolateral aspect of renal tubular cells in ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int*. 2000; 57: 2445-2456.

Kariya S, Hirano M, Furiya Y, Ueno S. Effect of humanin on decreased atp levels of human lymphocytes harboring a3243g mutant mitochondrial DNA. *Neuropeptides*. 2005; 39: 97-101.

Kellum JA, Unruh ML, Murugan R. Acute kidney injury. *BMJ Clin Evid*. 2011; 2011.

Kim S-J, Guerrero N, Wassef G, Xiao J, Mehta HH, Cohen P , ve ark. The mitochondrial-derived peptide humanin activates the erk1/2, akt, and stat3 signaling pathways and has age-dependent signaling differences in the hippocampus. *Oncotarget*. 2016; 7: 46899.

Kinsey GR, Li L, Okusa MD. Inflammation in acute kidney injury. *Nephron Exp Nephrol*. 2008; 109: e102-107.

Kiraz Y, Adan A, Kartal Yandim M, Baran Y. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumour Biol*. 2016; 37: 8471-8486.

Klein LE, Cui L, Gong Z, Su K, Muzumdar R. A humanin analog decreases oxidative stress and preserves mitochondrial integrity in cardiac myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 440: 197-203.

Kone BC, Baylis C. Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney. *Am J Physiol*. 1997; 272: F561-578.

Kontogiannis J, Burns KD. Role of at1 angiotensin ii receptors in renal ischemic injury. *Am J Physiol*. 1998; 274: F79-90.

Kosieradzki M, Rowiński W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: Mechanisms and prevention. *Transplantation Proceedings*. 2008; 40: 3279-3288.

Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, Sanchez-Ferrer CF, Heringer-Walther S, Sexton PM , ve ark. G-protein-coupled receptor mas is a physiological antagonist of the angiotensin ii type 1 receptor. *Circulation*. 2005; 111: 1806-1813.

Kuliawat R, Klein L, Gong Z, Nicoletta-Gentile M, Nemkal A, Cui L , ve ark. Potent humanin analog increases glucose-stimulated insulin secretion through enhanced metabolism in the β cell. *Faseb j*. 2013; 27: 4890-4898.

Kumfu S, Charununtakorn ST, Jaiwongkam T, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Humanin prevents brain mitochondrial dysfunction in a cardiac ischaemia-reperfusion injury model. *Exp Physiol*. 2016; 101: 697-707.

Küçük A, Yucel M, Erkasap N, Tosun M, Koken T, Ozkurt M , ve ark. The effects of pde5 inhibitory drugs on renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Mol Biol Rep.* 2012; 39: 9775-9782.

Kwon O, Hong SM, Ramesh G. Diminished no generation by injured endothelium and loss of macula densa nnos may contribute to sustained acute kidney injury after ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009; 296: F25-33.

Lam AQ, Humphreys BD. Onco-nephrology: Aki in the cancer patient. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2012; 7: 1692-1700.

Lambers TT, Bindels RJ, Hoenderop JG. Coordinated control of renal ca^{2+} handling. *Kidney Int.* 2006; 69: 650-654.

Lee C, Yen K, Cohen P. Humanin: A harbinger of mitochondrial-derived peptides? *Trends in Endocrinology & Metabolism.* 2013; 24: 222-228.

Leonard EC, Friedrich JL, Basile DP. Vegf-121 preserves renal microvessel structure and ameliorates secondary renal disease following acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008; 295: F1648-1657.

Lepowsky E, Ghaderinezhad F, Knowlton S, Tasoglu S. Paper-based assays for urine analysis. *Biomicrofluidics.* 2017; 11.

Li J, Cao F, Yin HL, Huang ZJ, Lin ZT, Mao N , ve ark. Ferroptosis: Past, present and future. *Cell Death Dis.* 2020; 11: 88.

Li N, Wang H, Jiang C, Zhang M. Renal ischemia/reperfusion-induced mitophagy protects against renal dysfunction via drp1-dependent-pathway. *Exp Cell Res.* 2018; 369: 27-33.

Li X, Zhao W, Yang H, Zhang J, Ma J. S14g-humanin restored cellular homeostasis disturbed by amyloid-beta protein. *Neural Regen Res.* 2013; 8: 2573-2580.

Li Z, Ludwig N, Thomas K, Mersmann S, Lehmann M, Vestweber D , ve ark. The pathogenesis of ischemia-reperfusion induced acute kidney injury depends on renal neutrophil recruitment whereas sepsis-induced aki does not. *Front Immunol.* 2022; 13: 843782.

Lips P. Vitamin d physiology. *Prog Biophys Mol Biol.* 2006; 92: 4-8.

Liu C, Gidlund E-K, Witasp A, Qureshi AR, Söderberg M, Thorell A , ve ark. Reduced skeletal muscle expression of mitochondrial-derived peptides humanin and mots-c and

nrf2 in chronic kidney disease. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2019; 317: F1122-F1131.

Liu J, Han X, Zhou J, Leng Y. Molecular mechanisms of ferroptosis and their involvement in acute kidney injury. *J Inflamm Res*. 2023; 16: 4941-4951.

Ma Z-w, Liu D-x. Humanin decreases mitochondrial membrane permeability by inhibiting the membrane association and oligomerization of bax and bid proteins. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2018; 39: 1012-1021.

Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*. 1995; 146: 3-15.

Malek M, Nematbakhsh M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. *J Renal Inj Prev*. 2015; 4: 20-27.

Maremonti F, Meyer C, Linkermann A. Mechanisms and models of kidney tubular necrosis and nephron loss. *J Am Soc Nephrol*. 2022; 33: 472-486.

Marieb EN, Hoehn K. Anatomy and physiology. F A., Trans. In T İ. (Ed.), *Anatomi ve fizyoloji*. 5 ed., Ankara: Nobel; 2017, p. 834-863.

Masayasu M, Hiroshi Y. A simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use. *Clinica Chimica Acta*. 1979; 92: 337-342.

Matsunaga D, Sreekumar PG, Ishikawa K, Terasaki H, Barron E, Cohen P , ve ark. Humanin protects rpe cells from endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by upregulation of mitochondrial glutathione. *PLoS One*. 2016; 11: e0165150.

Matsuoka M, Hashimoto Y. Humanin and the receptors for humanin. *Mol Neurobiol*. 2010; 41: 22-28.

Meyer BR. Renal function in aging. *J Am Geriatr Soc*. 1989; 37: 791-800.

Millar TM, Stevens CR, Benjamin N, Eisenthal R, Harrison R, Blake DR. Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions. *FEBS Lett*. 1998; 427: 225-228.

Mimran A. Renal function in hypertension. *The American Journal of Medicine*. 1988; 84: 69-75.

Minasyan L, Sreekumar PG, Hinton DR, Kannan R. Protective mechanisms of the mitochondrial-derived peptide humanin in oxidative and endoplasmic reticulum stress in rpe cells. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2017; 2017.

Moin H, Shafi R, Ishtiaq A, Liaquat A, Majeed S, Zaidi NN. Effectiveness of analog of humanin in ameliorating streptozotocin-induced diabetic nephropathy in sprague dawley rats. *Peptides*. 2023; 165: 171014.

Molitoris BA. Actin cytoskeleton in ischemic acute renal failure. *Kidney International*. 2004; 66: 871-883.

Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol*. 2006; 147 Suppl 1: S193-201.

Moretti E, Giannerini V, Rossini L, Matsuoka M, Trabalzini L, Collodel G. Immunolocalization of humanin in human sperm and testis. *Fertil Steril*. 2010; 94: 2888-2890.

Morganti A. Renin and prorenin. In I Huhtaniemi L Martini (Eds.), *Encyclopedia of endocrine diseases* (second edition). Oxford: Academic Press; 2019, p. 478-482.

Murugan R, Kellum JA. Acute kidney injury: What's the prognosis? *Nat Rev Nephrol*. 2011; 7: 209-217.

Muzumdar RH, Huffman DM, Atzmon G, Buettner C, Cobb LJ, Fishman S , ve ark. Humanin: A novel central regulator of peripheral insulin action. *PloS one*. 2009; 4: e6334.

Muzumdar RH, Huffman DM, Calvert JW, Jha S, Weinberg Y, Cui L , ve ark. Acute humanin therapy attenuates myocardial ischemia and reperfusion injury in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010; 30: 1940-1948.

Müller GJ, Stadelmann C, Bastholm L, Elling F, Lassmann H, Johansen FF. Ischemia leads to apoptosis—and necrosis-like neuron death in the ischemic rat hippocampus. *Brain pathology*. 2004; 14: 415-424.

Myroie AA, Collins H, Umbles C, Kyle J. Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1986; 82: 512-520.

Nakamoto H, Ferrario CM, Fuller SB, Robaczewski DL, Winicov E, Dean RH. Angiotensin-(1-7) and nitric oxide interaction in renovascular hypertension. *Hypertension*. 1995; 25: 796-802.

Nattie EE, Moore P. Csf acid-base regulation and ventilation in iso- and hypocapnic hacetate acidosis. *J Appl Physiol* (1985). 1986; 61: 851-858.

Nedvetsky PI, Tamma G, Beulshausen S, Valenti G, Rosenthal W, Klussmann E. Regulation of aquaporin-2 trafficking. *Handb Exp Pharmacol*. 2009; 133-157.

Ng MYW, Wai T, Simonsen A. Quality control of the mitochondrion. *Developmental Cell*. 2021; 56: 881-905.

Nielsen S, Knepper MA. Vasopressin activates collecting duct urea transporters and water channels by distinct physical processes. *Am J Physiol*. 1993; 265: F204-213.

Niikura T, Yamada M, Chiba T, Aiso S, Matsuoka M, Nishimoto I. Characterization of v642i-abetapp-induced cytotoxicity in primary neurons. *J Neurosci Res*. 2004; 77: 54-62.

Oh YK, Bachar AR, Zacharias DG, Kim SG, Wan J, Cobb LJ, et al. Humanin preserves endothelial function and prevents atherosclerotic plaque progression in hypercholesterolemic apoe deficient mice. *Atherosclerosis*. 2011; 219: 65-73.

Pabla N, Bajwa A. Role of mitochondrial therapy for ischemic-reperfusion injury and acute kidney injury. *Nephron*. 2022; 146: 253-258.

Palipoch S. A review of oxidative stress in acute kidney injury: Protective role of medicinal plants-derived antioxidants. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2013; 10: 88-93.

Pallone TL, Silldorff EP, Turner MR. Intrarenal blood flow: Microvascular anatomy and the regulation of medullary perfusion. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1998; 25: 383-392.

Palmer BF, Clegg DJ. Respiratory acidosis and respiratory alkalosis: Core curriculum 2023. *American Journal of Kidney Diseases*. 2023; 82: 347-359.

Pararajasingam R, Weight SC, Bell PR, Nicholson ML, Sayers RD. Endogenous renal nitric oxide metabolism following experimental infrarenal aortic cross-clamp-induced ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg*. 1999; 86: 795-799.

Peake J, Suzuki K. Neutrophil activation, antioxidant supplements and exercise-induced oxidative stress. *Exerc Immunol Rev*. 2004; 10: 129-141.

Pearl WS. The kidney as an endocrine organ. *The Lancet*. 1977; 310: 543-548.

Pefanis A, Ierino FL, Murphy JM, Cowan PJ. Regulated necrosis in kidney ischemia-reperfusion injury. *Kidney International*. 2019; 96: 291-301.

Perazella MA, Rosner MH. Drug-induced acute kidney injury. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2022; 17: 1220-1233.

Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *Journal of Investigative Surgery*. 2009; 22: 46-55.

Plum LA, DeLuca HF. Vitamin d, disease and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2010; 9: 941-955.

Poston JT, Koyner JL. Sepsis associated acute kidney injury. *Bmj*. 2019; 364: k4891.

Qin Q, Jin J, He F, Zheng Y, Li T, Zhang Y, et al. Humanin promotes mitochondrial biogenesis in pancreatic min6 β -cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018; 497: 292-297.

Quiles JM, Gustafsson Å B. The role of mitochondrial fission in cardiovascular health and disease. *Nat Rev Cardiol*. 2022; 19: 723-736.

Radi ZA. Kidney pathophysiology, toxicology, and drug-induced injury in drug development. *Int J Toxicol*. 2019; 38: 215-227.

Reis T. Acute kidney injury. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2020; 66.

Requião-Moura LR, Durão Junior MdS, Matos ACCd, Pacheco-Silva A. Ischemia and reperfusion injury in renal transplantation: Hemodynamic and immunological paradigms. *Einstein (Sao Paulo)*. 2015; 13: 129-135.

Rhoades RA, Bell DR. Medical physiology, principles for clinical medicine. In E Agar (Ed.), *Tıbbi fizyoloji klinik tıbbın temelleri*. 1 ed., İstanbul: İstanbul Tıp Kitapevleri; 2017, p. 399-408.

Rochette L. Humanin: A mitochondria-derived peptide with emerging properties. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*. 2020; 69: 155-157.

Ronco C, Bellomo R, Kellum JA. Acute kidney injury. *The Lancet*. 2019; 394: 1949-1964.

Ronco C, Chawla LS. Glomerular and tubular kidney stress test: New tools for a deeper evaluation of kidney function. *Nephron*. 2016; 134: 191-194.

Sahoo B, Srivastava M, Katiyar A, Ecelbarger C, Tiwari S. Liver or kidney: Who has the oar in the gluconeogenesis boat and when? *World J Diabetes*. 2023; 14: 1049-1056.

Saikumar P, Venkatachalam MA. (2003). *Role of apoptosis in hypoxic/ischemic damage in the kidney*. Paper presented at the Seminars in nephrology.

Salhadar K, Matthews A, Raghuram V, Limbutara K, Yang CR, Datta A , ve ark. Phosphoproteomic identification of vasopressin/camp/protein kinase a-dependent signaling in kidney. *Mol Pharmacol*. 2021; 99: 358-369.

Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest*. 1989; 83: 865-875.

Seifi B, Kadkhodae M, Bakhshi E, Ranjbaran M, Zahmatkesh M, Sedaghat Z , ve ark. Angiotensin ii in paraventricular nucleus contributes to sympathoexcitation in renal ischemia-reperfusion injury by at1 receptor and oxidative stress. *J Surg Res*. 2015; 193: 361-367.

Sharfuddin AA, Molitoris BA. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nature Reviews Nephrology*. 2011; 7: 189-200.

Shi D, Zhou X, Wang H. S14g-humanin (hng) protects retinal endothelial cells from uv-b-induced nlrp3 inflammation activation through inhibiting egr-1. *Inflamm Res*. 2021; 70: 1141-1150.

Singh I, Gulati S, Orak JK, Singh AK. Expression of antioxidant enzymes in rat kidney during ischemia-reperfusion injury. *Mol Cell Biochem*. 1993; 125: 97-104.

Sreekumar PG, Ishikawa K, Spee C, Mehta HH, Wan J, Yen K , ve ark. The mitochondrial-derived peptide humanin protects rpe cells from oxidative stress, senescence, and mitochondrial dysfunction. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2016; 57: 1238-1253.

Stamp TC. Vitamin d metabolism. Recent advances. *Arch Dis Child*. 1973; 48: 2-7.

Stein JH. Acute renal failure. Lessons from pathophysiology. *West J Med*. 1992; 156: 176-182.

Steinitz K, Türkand H. The determination of the glomerular filtration by the endogenous creatinine clearance. *J Clin Invest*. 1940; 19: 285-298.

Stravodimos KG, Koritsiadis G, Lazaris AC, Agrogiannis G, Koutalellis G, Constantinides C , ve ark. Hydronephrosis promotes expression of hypoxia-inducible factor 1 α . *Urologia Internationalis*. 2009; 82: 38-42.

Stromski ME, Cooper K, Thulin G, Gaudio KM, Siegel NJ, Shulman RG. Chemical and functional correlates of postischemic renal atp levels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986; 83: 6142-6145.

Su L, Zhang J, Gomez H, Kellum JA, Peng Z. Mitochondria ros and mitophagy in acute kidney injury. *Autophagy*. 2023; 19: 401-414.

Sutton TA. Alteration of microvascular permeability in acute kidney injury. *Microvasc Res*. 2009; 77: 4-7.

Szeto HH. Pharmacologic approaches to improve mitochondrial function in aki and ckd. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2017; 28: 2856-2865.

Tajima H, Niikura T, Hashimoto Y, Ito Y, Kita Y, Terashita K , ve ark. Evidence for in vivo production of humanin peptide, a neuroprotective factor against alzheimer's disease-related insults. *Neurosci Lett*. 2002; 324: 227-231.

Tanaka S, Tanaka T, Kawakami T, Takano H, Sugahara M, Saito H , ve ark. Vascular adhesion protein-1 enhances neutrophil infiltration by generation of hydrogen peroxide in renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int*. 2017; 92: 154-164.

Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure. *New England Journal of Medicine*. 1996; 334: 1448-1460.

Thapak P, Ying Z, Palafox-Sanchez V, Zhang G, Yang X, Gomez-Pinilla F. Humanin ameliorates tbi-related cognitive impairment by attenuating mitochondrial dysfunction and inflammation. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2024; 1870: 166937.

Thiankhaw K, Chattipakorn K, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Roles of humanin and derivatives on the pathology of neurodegenerative diseases and cognition. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2022; 1866: 130097.

Thummasorn S, Apaijai N, Kerdphoo S, Shinlapawittayatorn K, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Humanin exerts cardioprotection against cardiac ischemia/reperfusion injury through attenuation of mitochondrial dysfunction. *Cardiovascular therapeutics*. 2016; 34: 404-414.

Thummasorn S, Shinlapawittayatorn K, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. High-dose humanin analogue applied during ischemia exerts cardioprotection against ischemia/reperfusion injury by reducing mitochondrial dysfunction. *Cardiovasc Ther*. 2017; 35.

Thummasorn S, Shinlapawittayatorn K, Khamseekaew J, Jaiwongkam T, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Humanin directly protects cardiac mitochondria against dysfunction initiated by oxidative stress by decreasing complex i activity. *Mitochondrion*. 2018; 38: 31-40.

Thurman JM. Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion. *Clin Immunol*. 2007; 123: 7-13.

Tighe JR. The pathology of renal ischaemia. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)*. 1977; 11: 114-124.

Tobias GJ, Mc LR, Jr., Hopper J, Jr. Endogenous creatinine clearance. A valuable clinical test of glomerular filtration and a prognostic guide in chronic renal disease. *N Engl J Med*. 1962; 266: 317-323.

Todini L, Fantuz F. Thirst: Neuroendocrine regulation in mammals. *Vet Res Commun*. 2023; 47: 1085-1101.

Tripatara P, Patel NS, Webb A, Rathod K, Lecomte FM, Mazzon E , ve ark. Nitrite-derived nitric oxide protects the rat kidney against ischemia/reperfusion injury in vivo: Role for xanthine oxidoreductase. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18: 570-580.

Turgut F, Awad AS, Abdel-Rahman EM. Acute kidney injury: Medical causes and pathogenesis. *J Clin Med*. 2023; 12.

Vallon V, Mühlbauer B, Osswald H. Adenosine and kidney function. *Physiol Rev*. 2006; 86: 901-940.

Vallon V, Thomson SC. Targeting renal glucose reabsorption to treat hyperglycaemia: The pleiotropic effects of sglt2 inhibition. *Diabetologia*. 2017; 60: 215-225.

Vallon V, Thomson SC. The tubular hypothesis of nephron filtration and diabetic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2020; 16: 317-336.

Vannay A, Fekete A, Adori C, Tóth T, Losonczy G, László L , ve ark. Divergence of renal vascular endothelial growth factor mrna expression and protein level in post-ischaemic rat kidneys. *Exp Physiol*. 2004; 89: 435-444.

Venkatachalam MA, Weinberg JM, Kriz W, Bidani AK. Failed tubule recovery, aki-ckd transition, and kidney disease progression. *J Am Soc Nephrol*. 2015; 26: 1765-1776.

Verma SK, Molitoris BA. Renal endothelial injury and microvascular dysfunction in acute kidney injury. *Semin Nephrol*. 2015; 35: 96-107.

Versteilen AMG, Di Maggio F, Leemreis JR, Groeneveld ABJ, Musters RJP, Sipkema P. Molecular mechanisms of acute renal failure following ischemia/reperfusion. *The International Journal of Artificial Organs*. 2004; 27: 1019-1029.

Voigt A, Jelinek HF. Humanin: A mitochondrial signaling peptide as a biomarker for impaired fasting glucose-related oxidative stress. *Physiol Rep*. 2016; 4.

von Walden F, Fernandez-Gonzalo R, Norrbom J, Emanuelsson EB, Figueiredo VC, Gidlund EK , ve ark. Acute endurance exercise stimulates circulating levels of mitochondrial-derived peptides in humans. *J Appl Physiol* (1985). 2021; 131: 1035-1042.

Wallace MA. Anatomy and physiology of the kidney. *Aorn j*. 1998; 68: 800, 803-816, 819-820; quiz 821-804.

Wan L, Bellomo R, Di Giantomasso D, Ronco C. The pathogenesis of septic acute renal failure. *Current opinion in critical care*. 2003; 9: 496-502.

Wang B, Bai M, Bai Y, Li Q. Liver injury following renal ischemia reperfusion in rats. *Transplant Proc*. 2010; 42: 3422-3426.

Wang J, Zhu P, Toan S, Li R, Ren J, Zhou H. Pum2-mff axis fine-tunes mitochondrial quality control in acute ischemic kidney injury. *Cell Biol Toxicol*. 2020; 36: 365-378.

Wang T, Huang Y, Zhang M, Wang L, Wang Y, Zhang L , ve ark. [gly14]-humanin offers neuroprotection through glycogen synthase kinase-3 β inhibition in a mouse model of intracerebral hemorrhage. *Behavioural Brain Research*. 2013; 247: 132-139.

Wang Y, Zeng Z, Zhao S, Tang L, Yan J, Li N , ve ark. Humanin alleviates insulin resistance in polycystic ovary syndrome: A human and rat model-based study. *Endocrinology*. 2021; 162.

Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med*. 1989; 320: 365-376.

Widmer RJ, Flammer AJ, Herrmann J, Rodriguez-Porcel M, Wan J, Cohen P , ve ark. Circulating humanin levels are associated with preserved coronary endothelial function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013; 304: H393-397.

Wilhelm SM, Stowe NT, Robinson AV, Schulak JA. The use of the endothelin receptor antagonist, tezosentan, before or after renal ischemia protects renal function. *Transplantation*. 2001; 71: 211-216.

Wirthensohn G, Guder WG. Renal substrate metabolism. *Physiol Rev.* 1986; 66: 469-497.

Wu Y, Zhang H, Guan L, Jia X, Wang M. S14g-humanin alleviates acute lung injury by inhibiting the activation of nf- κ b. *Aging (Albany NY).* 2023; 15: 13865-13875.

Xie Y, Liu ZH, Li XY, Zhou YD, Xu X, Hu LF , ve ark. Protection effect of [gly14]-humanin from apoptosis induced by high glucose in human umbilical vein endothelial cells. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014; 106: 560-566.

Xu X, Chua CC, Gao J, Hamdy RC, Chua BH. Humanin is a novel neuroprotective agent against stroke. *Stroke.* 2006; 37: 2613-2619.

Yang W, Li X, He L, Zhu S, Lai S, Zhang X , ve ark. Empagliflozin improves renal ischemia-reperfusion injury by reducing inflammation and enhancing mitochondrial fusion through ampk-*opa1* pathway promotion. *Cell Mol Biol Lett.* 2023; 28: 42.

Yang X, Zhang H, Wu J, Yin L, Yan L-J, Zhang C. Humanin attenuates nmda-induced excitotoxicity by inhibiting ros-dependent jnk/p38 mapk pathway. *International journal of molecular sciences.* 2018; 19: 2982.

Yen K, Lee C, Mehta H, Cohen P. The emerging role of the mitochondrial-derived peptide humanin in stress resistance. *J Mol Endocrinol.* 2013; 50: R11-19.

Yen K, Wan J, Mehta HH, Miller B, Christensen A, Levine ME , ve ark. Humanin prevents age-related cognitive decline in mice and is associated with improved cognitive age in humans. *Sci Rep.* 2018; 8: 14212.

Ying G, Iribarren P, Zhou Y, Gong W, Zhang N, Yu Z-X , ve ark. Humanin, a newly identified neuroprotective factor, uses the g protein-coupled formylpeptide receptor-like-1 as a functional receptor. *The Journal of Immunology.* 2004; 172: 7078-7085.

Zaman F, Zhao Y, Calvin B, Mehta HH, Wan J, Chrysis D , ve ark. Humanin is a novel regulator of hedgehog signaling and prevents glucocorticoid-induced bone growth impairment. *The FASEB Journal.* 2019; 33: 4962.

Zhang J, Lei H, Li X. The protective effects of s14g-humanin (hng) against mono-sodium urate (msu) crystals- induced gouty arthritis. *Bioengineered.* 2022; 13: 345-356.

Zhang X, Urbietta-Caceres VH, Eirin A, Bell CC, Crane JA, Tang H , ve ark. Humanin prevents intra-renal microvascular remodeling and inflammation in hypercholesterolemic apoe deficient mice. *Life Sci.* 2012; 91: 199-206.

Zhao S-T, Huang X-t, Zhang C, Ke Y. Humanin protects cortical neurons from ischemia and reperfusion injury by the increased activity of superoxide dismutase. *Neurochemical research*. 2012; 37: 153-160.

Zhao ST, Zhao L, Li JH. Neuroprotective peptide humanin inhibits inflammatory response in astrocytes induced by lipopolysaccharide. *Neurochem Res*. 2013; 38: 581-588.

Zhloba AA, Subbotina TF, Molchan NS, Polushin YS. [the level of circulating humanin in patients with ischemic heart disease.]. *Klin Lab Diagn*. 2018; 63: 466-470.

Zhu S, Hu X, Bennett S, Xu J, Mai Y. The molecular structure and role of humanin in neural and skeletal diseases, and in tissue regeneration. *Front Cell Dev Biol*. 2022; 10: 823354.

Zuccato CF, Asad AS, Nicola Candia AJ, Gottardo MF, Moreno Ayala MA, Theas MS ,
ve ark. Mitochondrial-derived peptide humanin as therapeutic target in cancer and degenerative diseases. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2019; 23: 117-126.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Leyla	Uyruğu	T.C.
Soyadı	Abueid	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Metin Nuran Çakallıklı Anadolu Lisesi	2007
Lisans	Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi	2011
Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı	2015
Doktora	Akdeniz Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı	

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi	2018-

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce		

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Sıçan Renal İskemi Reperfüzyon Modelinde Humaninin Etkisi	Akdeniz Üniversitesi BAP	2021-
Eritrositlerin Fenilefrin Aracılı Vasküler Kasılma Yanıtlarına Katkısı	Akdeniz Üniversitesi BAP	2022-

Pulmoner Arteriyel Hipertansiyonda Eritrositlerin Vasküler Gevşeme Yanıtlarına Etkisi.	TÜBİTAK (1002)	2022 - 2023
Preeklampsia Hastalarından Elde Edilen Eritrositlerin İletim Tipi Damarlarda Endotel Aracılı Gevşeme Yanıtlarına Etkisinin İncelenmesi	Akdeniz Üniversitesi BAP	2020 - 2023
Sağlıklı Gebelerden Elde Edilen Eritrositlerin ATP Aracılı Gevşeme Yanıtlarına Olası Etkisinin İncelenmesi	Akdeniz Üniversitesi BAP	2020 - 2023
Sıçan Miyokard İnfarktüsü Modelinde 5-Lipoksijenaz İnhibisyonunun Etkisi Ve Siklooksijenaz Sistemiyle Etkileşimi	Marmara Üniversitesi BAP	2013-2015

Burslar-Ödüller:

Yayınlar ve Bildiriler:

The Effect of Humanin on Rat Renal Ischemia Reperfusion Model Leyla Abueid, Filiz Basralı. 5 th International 34th National Biophysics Congress. September 6-9, 2023, İzmir, ss:142.

Effect of Exercise on Angiotensin (1-7) Mediated Vasodilation Responses in Nitric Oxide Synthase Inhibition Hypertension Model Özen N., Abueid L., Ülker P., Basralı F. Acta Physiologica , cilt.234, ss.30, 2022 (SCI-Expanded).

Contribution of red blood cells to pulmonary arterial hypertension pathogenesis: NOS activity and vessel responses. Ulker P. , Başarıcı İ. , Ozen N., Kılavuz E., Kısak F., Basralı F. , Yaraş N. , Köksoy S. , Çelik M. L. , Abueid L. , Yildirim A. 2nd Joint Meeting of the The European Society for Clinical Hemorheology and Microcirculation

The International Society for Clinical Hemorheology The International Society of Biorheolog. ESCHM-ISCH-ISB Fukuoka, Japonya, 04 Temmuz 2021.

Central apelin administration and restraint stress induce hypothalamic cholecystokinin release via the APJ receptor Bülül M., Sinen O., Abueid L., Akkoyunlu G., Özsoy Ö. Journal Of Neuroendocrinology , cilt.30, sa.9, 2018 (SCI-Expanded).

Inhibition of 5-lipoxygenase by zileuton in a rat model of myocardial infarction. Abueid L., USLU Ü., Cumbul A., Ogunc A. V., ERCAN F., Alican I. Anatolian Journal Of Cardiology , cilt.17, sa.4, ss.269-275, 2017 (SCI-Expanded)

Treatment with oestrogen-receptor agonists or oxytocin in conjunction with exercise protects against myocardial infarction in ovariectomized rats. Bulut E. C., Abueid L., Ercan F., Suleymanoglu S., Agirbasli M., Yegen B. Experimental Physiology, cilt.101, sa.5, ss.612-627, 2016 (SCI-Expanded)

The Effect of 5-lipoxygenase inhibition and its interaction with cyclooxygenase pathway in a rat model of myocardial infarction. Abueid L., Cumbul A., Ogunc A. V., Ercan F., Uslu U., Alican I. 7. European Congress of Pharmacology, İstanbul, Türkiye, 26 - 30 Haziran 2016, ss.299

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

Kemirgenlerde Yaygın Kullanılan Üç Farklı Stres Modelinin Karşılaştırılması: Sempato-Vagal Denge ve Mide Motor Fonksiyonları Üzerine Farklı Etkiler. Bülül M., Abueid L., Sinen O. 44. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 1 - 04 Kasım 2018, cilt.225, ss.25

Santral Nöropeptit-S'nin Mide Motor Fonksiyonları Üzerine Etkisi: Stres-İlişkili Etkiler. Bülül M., Bayramoğlu O., Abueid L., Sinen O. 44. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 1 - 04 Kasım 2018, ss.48

Strese Bağlı Oluşan Gastrointestinal Dismotilitede Enterik Nöronal Apelinin Rolü. Bülbül M., Sinen O., Abueid L., Akkoyunlu G. 44. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 1 - 04 Kasım 2018, cilt.225, ss.47

Sıçanlarda Santral Ekzojen Nöropeptit-S'in 6-OHDA ile Oluşturulan Gastrointestinal Disfonksiyona Etkisi. Bülbül M., Abueid L., Sinen O., Özkan A., Ağar A. 44. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 1 - 04 Kasım 2018, ss.47

Kolonik Nöronal Apelin ve CRF'de Strese Bağlı Değişimler. Akkoyunlu G., Bülbül M., Sinen O., Abueid L. 44. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 1 - 04 Kasım 2018, ss.63

Hipotalamik Apelin Otonomik Çıkışı Paraventriküler Çekirdekten Kolesistokininin Salgısını Uyararak Düzenler. Bülbül M., Sinen O., Abueid L. 44. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 1 - 04 Kasım 2018, cilt.225, ss.21

Östrojen Reseptör Agonistlerinin Menapoz Sonrası Miyokard Hasarında Koruyucu Etkisi. Bulut E. C., Abueid L., Ercan F., Süleymanoğlu S., Ağırbaşı M. A., Yeğen B. 39. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Ankara, Türkiye, 10 - 14 Eylül 2013, ss.37

Menapoz Sonrası Stres Algısına Fiziksel Aktivitenin, Oksitosinin Ve Östrojen Reseptör Agonistlerinin Etkisi. Bulut E. C., Abueid L., Yeğen B. 39. Ulusal Fizyoloji Kongresi 2013, Ankara, Türkiye, 10 - 14 Eylül 2013, ss.51

CPCI'da Yayımlanmış Bildiriler

Ulker, P., Basarici, I., Ozen, N., Kilavuz, E., Kisak, F., Basrali, F., Yaras, N., Koksoy, S., Celik, M. L., Abueid, L., & Yildirim, A. (2021). Contribution of red blood cells to pulmonary arterial hypertension pathogenesis: NOS activity and vessel responses. Biorheology, 58(3-4 MA-S8-3), 122–123.

Kilavuz, E., Abueid, L., Yildirim, A., Ozen, N., Karadag, B., Basrali, F., & Ulker, P. (2023). Effect of Erythrocytes on ATP Mediated Vascular Relaxation Responses in Preeclampsia. *Acta Physiologica*, 237 MA-OC-20, 25.

Yildirim, A., Abueid, L., Ozen, N., Kilavuz, E., Basarici, I., Basrali, F., & Ulker, P. (2023). Role of Erythrocytes from Pulmonary Arterial Hypertension Patients in ATP-mediated Vascular Relaxation Responses. *Acta Physiologica*, 237 MA-PC-25, 57–58.

Bilimsel Kuruluslara Üyelikler

Türk Fizyolojik Bilimler Derneği

Türk Biyofizik Derneği