

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ
DOKTORA PROGRAMI**

**SIÇANLARDA METFORMİNLE ÖNKOŞULLAMANIN, HEPATİK
İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI MODELİNDE
MITOKONDRIYAL DİNAMİĞE ETKİSİ**

**HAZIRLAYAN
ENDER FAKIOĞLU**

DOKTORA TEZİ

ANKARA – 2025

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ
DOKTORA PROGRAMI**

**SIÇANLARDA METFORMİNLE ÖNKOŞULLAMANIN HEPATİK
İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI MODELİNDE
MITOKONDRIYAL DİNAMİĞE ETKİSİ**

**HAZIRLAYAN
ENDER FAKİOĞLU**

DOKTORA TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. FATMA BELGİN ATAÇ**

ANKARA – 2025

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Tıbbi Biyoloji Doktora Programı çerçevesinde Ender Fakıoğlu tarafından hazırlanan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 18/06/2025

Tez Adı: Sıçanlarda Metforminle Önkoşullanmanın, Hepatik İskemi Reperfüzyon Hasarı Modelinde Mitokondriyal Dinamiğe Etkisi

Tez Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı - Soyadı, Kurumu)

İmza

Prof. Dr. Fatma Belgin ATAÇ, Başkent Üniversitesi

Prof. Dr. Hasibe VERDİ, Başkent Üniversitesi

Prof. Dr. Şefik GÜRAN, Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Prof. Dr. Neslihan BAŞÇIL TÜTÜNCÜ, Başkent Üniversitesi

Prof. Dr. Tanju TÜTÜNCÜ, Sağlık Bilimleri Üniversitesi

ONAY

Prof. Dr. A. Hande ARSLAN

Enstitü Müdürü

Tarih 18 / 06 / 2025

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 18 / 06 / 2025

Öğrencinin Adı, Soyadı:ENDER FAKIOĞLU

Öğrencinin Numarası:21720519

Anabilim Dalı:TIBBİ BİYOLOJİ.

Programı:TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı:PROF. DR. FATMA BELGİN ATAÇ

Tez Başlığı: SIÇANLARDA METFORMİNLE ÖNKOŞULLAMANIN, HEPATİK İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI MODELİNDE MİTOKONDRIYAL DİNAMİĞE ETKİSİ

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans/Doktora tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 48 sayfalık kısmına ilişkin, 10 / 06 / 2025 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından TURNITIN adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %9....'dır. Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç
2. Alıntılar hariç
3. Beş (5) kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

“Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını” inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Öğrenci İmzası

ONAY

Tarih: 18 / 06 / 2025.

Öğrenci Danışmanı Unvan, Ad, Soyad, İmza:

ÖZET

Amaç:

Bu çalışmada, metformin ile yapılan önkoşullamanın sıçanlarda oluşturulan hepatik iskemi-reperfüzyon hasarı (HİRH) modelinde mitokondriyal dinamikler üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Yöntem:

Otuz adet Wistar Albino sıçan rastgele üç gruba ayrıldı: Sham, HİRH, Metformin + HİRH. İskemi, hepatik pedikülün 45 dakika süreyle klampe edilmesiyle oluşturuldu ve ardından 6 saat reperfüzyon uygulandı. Metformin grubuna, cerrahiden önceki 7 gün boyunca orogastrik gavajla 300 mg/kg dozunda metformin verildi.

Bulgular:

HİRH grubunda karaciğer hasarı belirgin olup, ALT, AST, TNF- α düzeyleri artmış; ATP düzeyleri azalmıştır. Metformin ile önkoşullanmış grupta HİRH şiddetinin daha düşük olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$). Karaciğer hasarı metformin önkoşullaması ile anlamlı şekilde azalmıştır. Mitokondriyal dinamik protein analizlerinde, HİRH grubunda Fis1 ve Drp1 artarken MFN1, MFN2 ve OPA1 azalmıştır. Metforminle önkoşullama, bu değişiklikleri anlamlı şekilde sınırlamıştır.

Sonuç:

Metformin ile yapılan önkoşullama, HİRH'ni sınırlamada etkili olmuş; oksidatif stres, inflamasyon ve mitokondriyal disfonksiyonu sınırlamıştır. Bu etkiler, mitokondriyal fizyonu baskılayıp füzyonu artırmasıyla ilişkilidir. Metformin, mitokondriyal dinamiklere etkisi ile, karaciğer hücrelerini HİRH'na karşı koruyucu potansiyel bir ajan olabilir.

Anahtar Kelimeler: iskemi – reperfüzyon, karaciğer, metformin, mitokondriyal dinamikler, önkoşullama

ABSTRACT

Objective: This study aimed to investigate the effects of metformin preconditioning on mitochondrial dynamics in a rat model of hepatic ischemia-reperfusion injury (HIRI).

Methods: Thirty Wistar Albino rats were randomly divided into three groups: Sham, HIRI, and Metformin + HIRI. HIRI was induced by clamping the hepatic pedicle for 45 minutes, followed by 6 hours of reperfusion. The Metformin group received 300 mg/kg of metformin via orogastric gavage once daily for 7 consecutive days prior to surgery.

Results: In the HIRI group, liver injury was prominent, with increased levels of ALT, AST, MPO, TNF- α and decreased levels of ATP. Significant improvements were observed in the Metformin + HIRI group ($p < 0.05$). Liver injury was significantly limited by metformin preconditioning. Analysis of mitochondrial dynamic proteins revealed increased Fis1, Drp1 expression and decreased MFN1, MFN2 and OPA1 levels in the HIRI group. These changes were limited following metformin preconditioning.

Conclusion: Metformin preconditioning is effective in attenuating HIRI by limiting oxidative stress, inflammation, and mitochondrial dysfunction. These protective effects are associated with the inhibition of mitochondrial fission and promotion of fusion. Metformin may serve as a potential therapeutic agent by regulating mitochondrial dynamics and protecting liver cells against HIRI.

Key Words: ischemia – reperfusion, liver, metformin, mitochondrial dynamics, preconditioning

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
TABLolar LİSTESİ	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ.....	3
2.1. İskemi – Reperfüzyon Hasarı	3
2.2. Mitokondri.....	7
2.2.1. Mitokondriyal Kalite Kontrolü.....	12
2.2.2. Mitokondriyal Dinamikler	14
2.3. Hepatik İskemi – Reperfüzyon Hasarı.....	18
2.3.1. Hepatik İskemi – Reperfüzyon Hasarının Klinik Önemi.....	18
2.3.2. Biyokimyasal, Moleküler HİRİ Göstergeleri.....	18
2.4. Metformin ve Önkoşullama	20
3. YÖNTEM	23
3.1. Deneysel Tasarım	23
3.1.1. Deneysel Model Standardizasyonu	23
3.2. Denek Bakımı, Gözetimi ve Cerrahi Uygulama Protokolleri	24
3.2.1. Denek Özellikleri ve Barındırma Koşulları	24
3.2.2. Anestezi ve Cerrahi İşlem Basamakları	24
3.2.3. Örnek Toplama ve Saklama Yöntemi	25
3.3. Veri Toplama ve Analiz Süreci Biyokimyasal Analizler:.....	25
3.3.1. Histopatolojik Değerlendirme	25
3.3.2. Biyokimyasal Analizler	26
3.3.3. Örnek Hazırlama Prosedürü.....	26
3.3.4. TNF- α Düzeylerinin Ölçümü.....	27
3.3.5. ATP Düzeylerinin Ölçümü	28
3.3.6. ROS Düzeylerinin Ölçümü	29
3.3.7. TOS Düzeylerinin Ölçümü	30
3.3.8. MPO Düzeylerinin Ölçümü.....	31

3.3.9. GSH Düzeylerinin Ölçümü.....	32
3.3.10. MDA Düzeylerinin Ölçümü.....	33
3.3.11. AST ve ALT Düzeylerinin Ölçümü	34
3.3.12. Protein Düzeylerinin Western Blot ile Analizi	34
3.3.13. Protein Örneklerinin Denatürasyonu.....	34
3.3.14. Örneklerin Jel Üzerinde Ayrılması (SDS-PAGE).....	35
3.3.15. Protein Transferi (Blotlama).....	35
3.3.16. Membranın Bloklanması	36
3.3.17. Primer Antikor Uygulaması.....	36
3.3.18. Yıkama İşlemi.....	36
3.3.19. Sekonder Antikor İnkübasyonu ve Yıkama	37
3.3.20. Görüntüleme ve Veri Analizi	37
3.3.21. Stripping ve Yeniden İnkübe İşlemi	38
3.3.22. İstatistiksel Analizler.....	38
4. BULGULAR	40
5. TARTIŞMA.....	53
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	57
6.1. Sonuç.....	57
6.2. Öneriler.....	57
KAYNAKLAR.....	58
EKLER	
Ek 1: Etik Kurul Onayı	

TABLÖLÄR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 3.1. Kullanılan antikor bilgileri ile dilüsyon miktarları.	37
Tablo 4.1. Grupların HİRH parametrelerinin analiz sonuçları	40
Tablo 4.2. Grupların total inflamatuvar skorları.....	46
Tablo 4.3. Grupların mitokondriyal dinamik verileri	48



ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Doku iskemisiyle aktifleşerek suksinat birikimine neden olan yollar.....	6
Şekil 2.2. a. İskemi halinde mitokondriyal elektron taşıma zinciri: Oksijen yokluğunda, mitokondriyal kompleks 2, son elektron alıcısı olarak ters yönde çalışarak, fumaratı suksinata indirir. Oksijen yokluğunda elektron taşıma zinciri aksamış, kompleks 3'e aktarım sınırlanmıştır. Enerji yokluğunda, ATP ve ADP, AMP'ye yıkılır. b. Reperfüzyonda TET: Kompleks 2, yeniden, iskemisi sırasında birikmiş suksinatı fumarata metabolize edecek şekilde işler ve suksinatı hızla metabolize eder. Fakat iskemisi sırasında (AMP'ye yıkılarak) düşen ADP düzeylerinin normalizasyonu o hızda olamadığından, bir H^+ kanalı olan ATP sentazın yeniden çalışması gecikir. Bu gecikme esnasında artmış iyonik gradient ve mitokondriyal membran potansiyeli nedeniyle sitozolden mitokondriye H^+ akışı kompleks 1'den olur (TET); bu da mitokondriyal ROS artışına yol açar. c. Normokside elektron taşıma zinciri.	7
Şekil 2.3. Mitokondri yapısı	12
Şekil 3.1. Denek Gruplarının Şeması	23
Şekil 4.1. Sham, İskemi ve Metformin gruplarına ait HIF1A seviyelerindeki değişimler..	41
Şekil 4.2. Sham, İskemi ve Metformin gruplarına ait ATP seviyelerindeki değişimler	41
Şekil 4.3. Sham, İskemi ve Metformin gruplarına ait MPO seviyelerindeki değişimler	42
Şekil 4.4. Sham, İskemi ve Metformin gruplarına ait TNF-a seviyelerindeki değişimler ..	43
Şekil 4.5. Sham, İskemi ve Metformin gruplarına ait ROS seviyelerindeki değişimler	43
Şekil 4.6. Sham, İskemi ve Metformin gruplarına ait TOS seviyelerindeki değişimler	44
Şekil 4.7. Sham, İskemi ve Metformin gruplarına ait GSH seviyelerindeki değişimler	45
Şekil 4.8. Sham, İskemi ve Metformin gruplarına ait konjesyon frekansları.....	46
Şekil 4.9. Grupların total inflamatuvar skorları.....	47
Şekil 4.10. Grupların serum ALT ve AST düzeyleri.....	47

Şekil 4.11. Sham (n=10), İskemi (n=10) ve Metformin (n=10) gruplarına ait FIS1 seviyelerindeki değişimler (FIS1: 17 kDa, Beta Aktin: 47 kDa) ve her deney grubundan bir deneğin triplikate western blot sonuç örnek resmi (kolonlar; 1-3 Sham, 4-6 İskemi, 7-9 ise Metformin grubu deneği triplikate sonuçlarıdır).	48
Şekil 4.12. Sham (n=10), İskemi (n=10) ve Metformin (n=10) gruplarına ait DRP1 seviyelerindeki değişimler (DRP1: 79 kDa, Beta Aktin: 47 kDa) ve her deney grubundan bir deneğin triplikate western blot sonuç örnek resmi (kolonlar; 1-3 Sham, 4-6 İskemi, 7-9 ise Metformin grubu deneği triplikate sonuçlarıdır).	49
Şekil 4.13. Sham (n=10), İskemi (n=10) ve Metformin (n=10) gruplarına ait MFN1 seviyelerindeki değişimler (Mfn1: 84 kDa, Beta Aktin: 47 kDa) ve her deney grubundan bir deneğin triplikate western blot sonuç örnek resmi (kolonlar; 1-3 Sham, 4-6 İskemi, 7-9 ise Metformin grubu deneği triplikate sonuçlarıdır).	50
Şekil 4.14. Sham (n=10), İskemi (n=10) ve Metformin (n=10) gruplarına ait Mitofusin 2 seviyelerindeki değişimler (Mfn2: 86 kDa, Beta Aktin: 47 kDa) ve her deney grubundan bir deneğin triplikate western blot sonuç örnek resmi (kolonlar; 1-3 Sham, 4-6 İskemi, 7-9 ise Metformin grubu deneği triplikate sonuçlarıdır).	51
Şekil 4.15. Sham (n=10), İskemi (n=10) ve Metformin (n=10) gruplarına ait OPA1 seviyelerindeki değişimler -(OPA1: 80 kDa, Beta Aktin: 47 kDa) ve her deney grubundan bir deneğin triplikate western blot sonuç örnek resmi (kolonlar; 1-3 Sham, 4-6 İskemi, 7-9 ise Metformin grubu deneği triplikate sonuçlarıdır).	52

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ALT	Alanin aminotransferaz
AMPK	aktive protein kinaz
AST	Aspartat aminotransferaz
ATP	adenozintrifosfat
DAMP	hasar-ilişkili moleküler yapı
DNA	Deoksiribonükleik asit,
DRP1	Dynamin-related protein 1
ER	endoplazmik retikulum
ETZ	elektron taşıma zinciri
HİRH	Hepatik iskemi reperfüzyon hasarı
IL-6,	İnterlökin-6
İMM	iç mitokondriyal membran
İRH	İskemi reperfüzyon hasarı
LDH	laktat dehidrogenaz
LKB1	karaciğer kinaz B1
MDA	malondialdehit
MFN1/2	Mitofusin 1/2
MPO	myeloperoksidaz
mPTP	mitokondriyal permeabilite geçiş poru
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
NADH	nikotinamid adenin dinükleotid
NRF	nükleer respiratuar faktör
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
OkS	oksidatif stres
OKT	organik katyon taşıyıcıları
OPA1	optic atrophy protein
PGC-1 α	Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1-alpha
PINK1	PTEN-induced kinase 1
PMAT	plazma membran monoamin taşıyıcısı
ROS	reaktif oksijen türleri
Sirtuin 1	Silent Information Regulator 2 homolog 1
SOD	Süperoksit dismutaz
TET	tersine elektron taşınımı
TFAM	mitokondriyal transkripsiyon faktörü
TNF- α ,	tümör nekroz faktörü-alfa
TOS	total oksidan statü
ULK1	unc-51 like kinase 1

1. GİRİŞ

İskemi reperfüzyon hasarı (İRH) tüm canlı dokuları etkileyebilecek çeşitli sebepleriyle birçok klinik sorunun kökeni, bir o kadarının da komplikasyonu olarak; dekadlar boyu popüler bir araştırma konusu olmasına rağmen, tam olarak aydınlatılamayan mekanizmaları ve olası çözümleri, hücresel – moleküler düzeydeki keşiflerin ışığında halen önemli hipotezlerin konusudur [1].

Doku perfüzyon kısıtlılığı ile karakterize iskemi, doku oksijenizasyon yetersizliğine sebep olur. Oksijen kısıtlılığı ile hücrenin ana enerji kaynağı adenozin trifosfatın (ATP) başlıca üretim mekanizması olan oksidatif fosforilasyon aksar. Enerji yoksunluğuna giren hücrede, enerji gerektiren hayati fonksiyonların aksamaması, zincirleme bir dizi hasara yol açar: hücre membranındaki Na^+/K^+ -ATPaz ve endoplazmik retikulum (ER) membranındaki Ca^{++} -ATPaz pompalarının yetersizlikleri sonucu sitozolik sodyum, kalsiyum ve proton düzeyleri artar. Oluşan hiperosmolar ve asidik ortamda protein sentezi aksar, önemli enzimleri içeren mevcut proteinlerin yapı ve işlevleri bozulur. Hücresel hasar, reperfüzyonla daha da şiddetlenir. Oksidatif stres (OkS), inflamasyon ve ilerleyici hücre hasarına neden olan İRH hücre canlılığını tehdit eder [1,2]. Reperfüzyonla şiddetli OkS gelişiminde mitokondrinin merkezî rolü bilinmektedir [2-6].

Hepatik iskemi reperfüzyon hasarı (HİRH), transplantasyon ve travma gibi farklı sebepli karaciğer cerrahisi sonrası önemli bir prognostik faktör, post-transplant greft disfonksiyonunun önemli bir sebebidir [2].

Ökaryotik hücre metabolizmasında merkezî rollere sahip mitokondri; karaciğer, beyin, kalp, iskelet kası gibi enerji ihtiyacı yüksek dokularda daha yoğun gözlenir, fakat fonksiyonu enerji üretimiyle sınırlı değildir. Bilimsel araştırma imkânlarının gelişimi, - hücre sinyal kaskadları başta olmak üzere- hücresel ve moleküler düzeyde büyük hızla devam eden keşiflerle; mitokondrinin bilinen fonksiyonları da artmaktadır. Strese karşı direnci arttırarak hücresel sağkalım sürecinde mitokondriyal füzyon lehine değişim eğilimiyle; hücresel ihtiyaçlara göre adaptif mekanizmaların da merkezinde oluşu nedeniyle mitokondriyal dinamikler bir başka güncel odak noktasıdır [3].

Mitokondrinin hastalıkların patogenezindeki rollerine dair çalışmaların artışı bunun bir başka sonucudur. Bugün, mitokondrinin İRH gelişiminde önemli rolleri saptanmış olup, bu rollere dair detayların keşif süreci devam etmektedir[2-6].

Yaygın kullanılan bir oral antihiperglisemik olan metforminin, son dönemde hücre koruyucu etkileri saptanmış, farklı organlarda hücre hasarını sınırlayıcı rolleri bildirilmiştir [7-17].

Metforminle önkoşullamanın İRH'nı sınırlayıcı etkisi gösterilmiş olsa da, literatürde mitokondriyal dinamiklere odaklı bir çalışma henüz bulunmamaktadır [14]. Bu çalışmada; **“Sıçanlarda, HİRH modelinde metformin ile önkoşullama, mitokondriyal dinamiği füzyon lehine etkiler”** hipoteziyle; metforminle önkoşullamanın, HİRH sıçan modelinde, “hepatik mitokondriyal dinamiklere etkisinin tespiti amaçlanmıştır

2. GENEL BİLGİ

2.1. İskemi – Reperfüzyon Hasarı

Canlı her dokuyu çeşitli sebeplerle tehdit eden İRH, iskemi ve reperfüzyon fazları sonucu gelişir [1,2].

İskemi, doku kanlanması (perfüzyonunun) kısıtlılığı olarak tanımlanan, yıkıcı bir durumdur. Sepsis, organ transplantasyonu, travma, akut koroner sendrom başlıca sebepleridir. İskeminin yol açtığı yetersiz oksijenasyon, hipoksi; hücresel enerji ihtiyacının ana üretim mekanizması olan oksidatif fosforilasyonu da kısıtlı hale getirir. Bu durum, anaerobik metabolizmayı tetiklese de, adenosin trifosfat (ATP) üretimi verimlilik ve sürdürülebilirlik açısından, enerji krizini kompanse edebilecek düzeyden uzaktır.

İskemik dokunun hipoksik hücresinin enerji yoksunluğu, en temel ve vazgeçilmez homeostatik işlevleri kısıtlar. Fonksiyonları ATP gerektiren, hücre içi ve hücre dışı homeostatik dengenin iyonik ve osmotik açılardan en temel ve etkin aktörlerinden, hücre membranındaki Na^+/K^+ -ATPaz ve endoplazmik retikulum (ER) membranındaki Ca^{++} -ATPaz pompalarının yetersizliği baş gösterir.

Fizyolojik olarak yüksek hücre içi K^+ ve hücre dışı Na^+ konsantrasyonlarının sağlanması ve idamesindeki en kritik aktörler olan Na^+/K^+ -ATPaz pompaları durduğunda yükselen hücre içi Na^+ konsantrasyonu ile transmembran Na^+ gradienti kaybolur. Bu gradienti kullanarak hücre dışına H^+ pompalayan $\text{Na}-\text{H}^+$ -değişim pompaları da bu şekilde işleyemez hale gelir. Anaerobik metabolitlere ek olarak, artan sitozolik H^+ konsantrasyonu ile sitozolik asit – baz dengesi de bozulur.

Enerji yoksunluğuyla; ER lümenine Ca^{++} konsantre etmekle görevli Ca^{++} -ATPaz pompalarının da kısıtlanması ile sitozolik Ca^{++} konsantrasyonu artar.

Yükselen hücre içi Na^+ , H^+ ve Ca^{++} konsantrasyonları ile oluşan hiperosmolarite hücresel şişmeye yol açar.

Enerji krizinin yarattığı zincirleme ve çok boyutlu bu sorunlardan, bileşik kaplar misali, hipoksik hücrenin hemen tüm elemanları etkileşerek etkilenir: hücresel aktivitelerin temel elemanları olan enzimlerin, nükleer kromatinin yapı ve fonksiyonları bozulur, ribozomlar ER'dan ayrılır, protein sentezi aksar.

Reperfüzyon, iskemik bir periyodu takiben, doku kanlanması yeniden sağlandığı hâli ifade eder. İskemik dokunun hipoksik hücresinin canlılığını tehdit edecek düzeyde bozulan homeostatik dengeler, beklentilerin aksine, reperfüzyon ve reoksijenasyonla düzelmek bir yana, daha da bozularak hücre hasarını şiddetlendirir ve doku-hücre canlılığı üzerinde daha da büyük bir tehdit oluşturur. Bu durum, İRH olarak ifade edilir.

Reperfüzyon fazı oldukça dinamik bir süreç olup, günlerce sürebilir. Bu süreçte, oksidatif stres (OkS) ve inflamasyon ön plandadır.

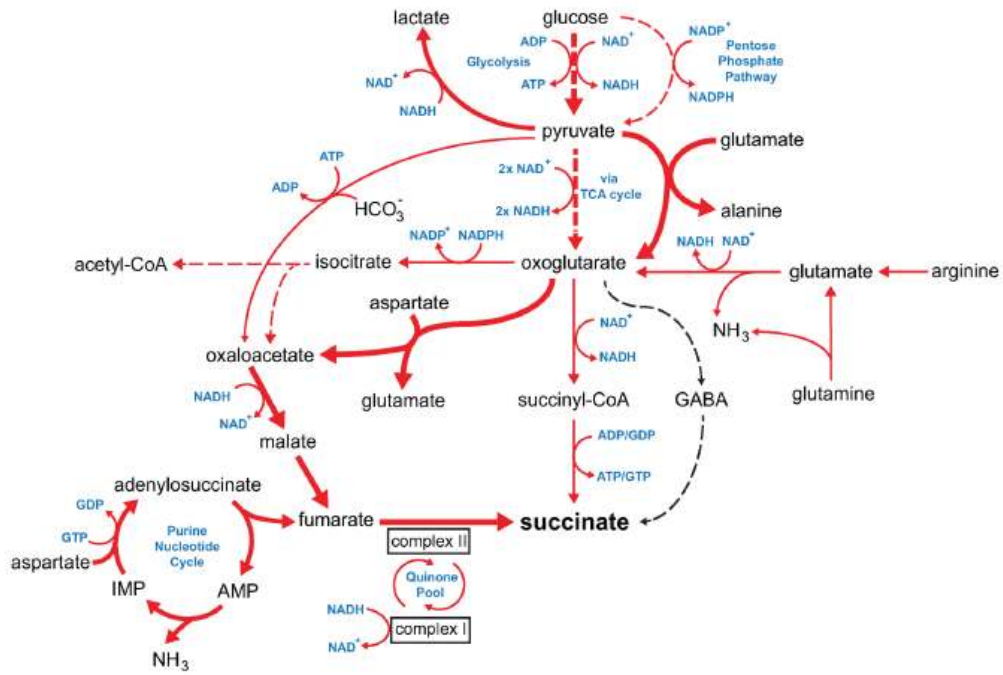
Oksidatif stres, başta reaktif oksijen türleri (*reactive oxygen species*; ROS) olmak üzere oksidan moleküllerle, enzimatik antioksidan mekanizmaların işlev ve kapasitesinin dengesizliğiyle karakterizedir. Antioksidan mekanizmaların yetersizliği söz konusudur. Bu durumu başlıca iki parametre belirler: oksidan düzeyi ve antioksidan kapasite[4].

Enzimatik reaksiyonlara dayanan antioksidan yollar, iskemik dokunun hipoksik hücresinde, yukarıda belirtildiği üzere kısıtlı hale gelmiştir. Reperfüzyonla reoksijenasyon sonrası, iskemi esnasında, oksijen yoksunluğu kaynaklı daha sınırlı olan ROS üretimi belirgin şekilde artar. Yani reperfüzyon aşamasında hücrede ciddi oksidan molekül yükü artışı olur. Antioksidan mekanizmaları hasarlı hücrede OkS, reperfüzyonla en belirgin sorunlardan biri haline gelir. Bu, başta kromatin ve membranöz yapılar olmak üzere, çoğu hücresel molekülü yapı ve fonksiyon açısından tehdit eder. OkS; endotel hasarı, DNA hasarı yaratan yıkıcı etkilerine ek olarak inflamatuvar yanıtı tetikler. Sitokin fırtınası ve inflamatuvar yanıt ile hücre ölümü riski artar.[1-4]

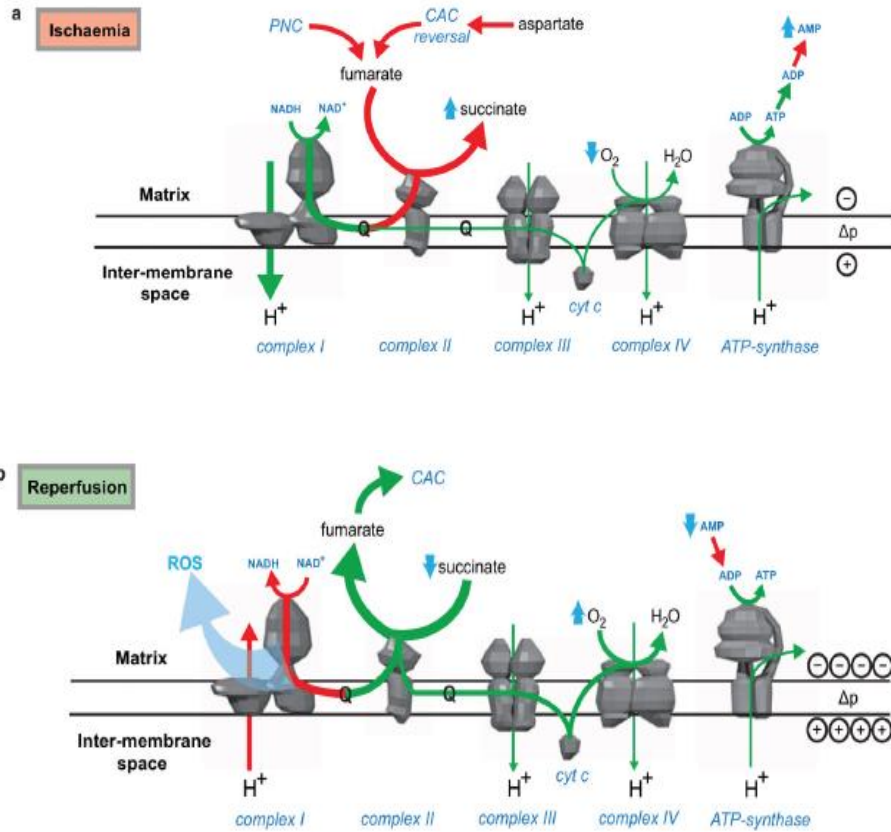
Adenozintrifosfat üretimindeki azalma, iyon pompalarının işlev kaybı, laktik asit birikimi, sitoplazmik asidoz, hücre şişmesi ve sitoskeleton bozulmaları ile başlayan süreçte; reperfüzyon sonrasında oluşan ROS patlaması, DNA kırıkları, protein denatürasyonu ve lipid peroksidasyonu gibi hasarlarla birlikte hücre canlılığı için daha büyük tehdit oluşturur. Ayrıca, mitokondriyal permeabilite geçiş porları (*mitochondrial*

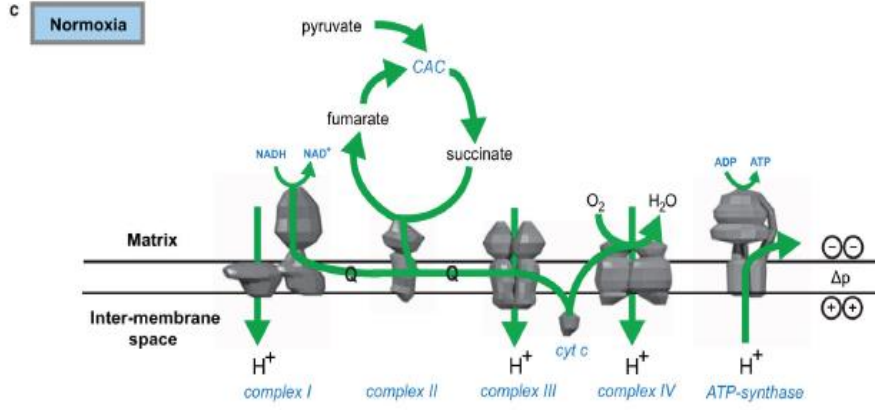
permability transition pores; mPTP) açılarak, mitokondri zar potansiyelini çökertir, apoptoz ve nekroza yol açan sinyal yollarını devreye sokar. Hasar-ilişkili mitokondriyal içeriğin (*damage-associated molecular patterns* – DAMP) sitoplazmaya ve hücre membran hasarı sonrası hücre dışına salınması ile inflamatuvar yanıt daha da şiddetlenir. Reperfüzyon sonrası gerçekleşen şiddetli ROS patlaması mitokondri kaynaklı olup; mitokondri, OkS ve dolayısıyla İRH’nda tetikleyici, merkezî rollere sahiptir [1-6].

Couchani ve arkadaşları; iskemi esnasında, mitokondriyal elektron taşıma zinciri (ETZ), Kompleks I’de “tersine elektron taşınımı (TET)” ile süperoksit üretimini tespit etmiş, bu özgül mekanizmanınsa iskemi sırasında biriken sitrik asit metaboliti, suksinat aracılığıyla aktive olduğunu bildirmiştir (Şekil 2.1, Şekil 2.2) [5]. Metabolomik analiz ile, iskemi esnasında mitokondriye özgü sitrik asit döngüsü metaboliti suksinatın, diğer tüm metabolitlere kıyasla belirgin artışı saptanmış; özellikle kalp dokusunda yapılmış analizlerde suksinat molekülünün aksine diğer sitrik asit döngüsü metabolitlerinin birikmemiş olduğu ve suksinatın sadece iskemik bölgelerde birikmiş olduğu saptanmıştır (Şekil 2.1). Üstelik iskemik kalp, böbrek ve beyin dokusu analizlerinde; biriken suksinatın, reperfüzyonla 5 dakika gibi kısa bir sürede normoksik doku düzeylerine gerilediği in vivo ortamda saptanmıştır. Ayrıca artan suksinat miktarının, iskemi süresiyle orantılı olduğu da tespit edilmiştir. Bu tespitle dramatik suksinat artışının iskemiye özgü olduğu belirtilmiş, hattâ suksinatın “evrensel bir in vivo iskemi belirteci” olabileceği ileri sürülmüştür. İskemiyle biriken suksinatın, reperfüzyonla mitokondriyal ROS üretimi artarken hızlı şekilde metabolize edilişinin ise reperfüzyona özgü olduğu düşünülmüştür. Bu çalışmayla İRH sürecindeki ROS patlamasında mitokondrinin özgün rolüne dair önemli bir dayanak tanımlanmıştır. Suksinatın, akut İRH patogenezindeki kritik rolüne ek olarak, inflamatuvar ve hipoksik sinyalizasyondaki olası rolleriyle, İRH tedavisi için potansiyel bir terapötik hedef olabileceği öne sürülmüştür [5].



Şekil 2.1. Doku iskemisiyle aktifleşerek suksinat birikimine neden olan yollar [5]





Şekil 2.2. a. İskemi halinde mitokondriyal elektron taşıma zinciri: Oksijen yokluğunda, mitokondriyal kompleks 2, son elektron alıcısı olarak ters yönde çalışarak, fumaratı suksinata indirir. Oksijen yokluğunda elektron taşıma zinciri aksamış, kompleks 3'e aktarım sınırlanmıştır. Enerji yokluğunda, ATP ve ADP, AMP'ye yıkılır. **b. Reperfüzyonda TET:** Kompleks 2, yeniden, iskemi sırasında birikmiş suksinatı fumarata metabolize edecek şekilde işler ve suksinatı hızla metabolize eder. Fakat iskemi sırasında (AMP'ye yıkılarak) düşen ADP düzeylerinin normalizasyonu o hızda olamadığından, bir H^+ kanalı olan ATP sentazın yeniden çalışması gecikir. Bu gecikme esnasında artmış iyonik gradient ve mitokondriyal membran potansiyeli nedeniyle sitozolden mitokondriye H^+ akışı kompleks 1'den olur (**TET**): bu da mitokondriyal ROS artışına yol açar. **c. Normokside elektron taşıma zinciri.** [5]

Martinez-Reyes ve Chandel de makrofajlarda bakteriyel lipopopolisakkaritlerce tetiklenen immün yanıtın zeminindeki mitokondriyal ROS salınımının TET aracılığıyla gerçekleştiğini belirtmiş, mitokondriyal kompleks 1 veya 2 inhibisyonu ile bu inflamatuvar yanıtın kısıtlandığına ve ayrıca TET'in kalp ve beyin dokularında İRH'ndaki rolüne atıfta bulunmuştur. Mitokondriyal kompleks 2 veya 1 inhibitörlerinin, TET kaynaklı OxS ve hücre hasarının engellenmesi amaçlı klinik deneylerde kullanıldığı da bildirilmiştir [6].

2.2. Mitokondri

Mitokondri, dış ve iç zar ile çevrili, çift zar yapısına sahip bir organeldir. Dış zar, porin kanalları sayesinde küçük moleküllere geçirgendir; iç zar ise yüksek protein/lipit oranı ve seçici geçirgenliği ile proton gradientinin korunmasını sağlar. Bu zar üzerinde ETZ kompleksleri (I-V) ve ATP sentaz yer alır (Şekil 2.3).

Dış zar aynı zamanda mitofaji, füzyon ve fizyon olaylarında görevli bazı GTPaz proteinlere de ev sahipliği yapar [19].

İç ve dış zar arasında kalan bölge, protonların biriktiği alandır. Elektron taşınımı sırasında protonlar bu boşluğa pompalanarak elektrokimyasal bir gradient oluşturur. Bu gradient ATP sentazca ATP sentezi için itici güç sağlar [20].

İç zarda, krista adı verilen kıvrımlar yüzey alanını genişletir. Bu zar, selektif geçirgenliği sayesinde proton gradientinin korunmasında önemlidir. Mitokondriyal matrikste mitokondriyal DNA, ribozomlar, çeşitli metabolik enzimler (özellikle sitrik asit döngüsü enzimleri) ve aminoasit/keton cisim metabolizmasına katılan proteinler bulunur [21].

Mitokondri kendi DNA'larını taşır ve sınırlı da olsa translasyonel aktivite gösterir. Mitokondriyal DNA (mtDNA), halka şeklinde çift iplikçikli bir moleküldür. İnsan mtDNA'sı yaklaşık 16.569 baz çifti uzunluğunda olup, 13 protein, 22 tRNA ve 2 rRNA kodlar [21]. Bu proteinler ETZ'nin yapısal bileşenlerini oluşturur.

Nükleer DNA'dan kodlanan birçok mitokondriyal protein vardır ve bu durum, mitokondrinin hücre çekirdeği ile sıkı bir koordinasyon içinde çalışmasını zorunlu kılar [19].

Mitokondrinin en temel görevlerinden biri, hücrenin yaşamsal işlevlerini sürdürebilmesi için gerekli olan enerjiyi sağlamaktır. Bu enerji, başta glikoz ve yağ asitleri olmak üzere çeşitli moleküllerin parçalanmasıyla oluşur ve oksidatif fosforilasyon adı verilen süreçle elde edilir [21]. Bu biyokimyasal süreç, iç mitokondriyal membranda (İMM) yer alan ETZ ve ATP sentaz enzimi aracılığıyla gerçekleştirilir.

Oksidatif fosforilasyonun ilk adımında, glikoliz ve TCA (sitrik asit) döngüsünden elde edilen NADH ve FADH molekülleri, taşıdıkları yüksek enerjili elektronları sırasıyla ETZ'nin Kompleks I ve Kompleks II yapılarına aktarır. Bu elektronlar, koenzim Q (ubikinon) ve sitokrom c aracılığıyla Kompleks III ve IV'e taşınır. Elektronların bu kompleksler arasında taşınması sırasında, mitokondri matriksinden intermembran boşluğa protonlar (H^+) pompalanarak bir elektrokimyasal proton gradienti oluşur. Bu proton

gradienti, ATP sentaz kompleksi üzerinden protonların tekrar matrikse dönmesini sağlar. Bu sırada açığa çıkan enerji, ADP'nin ATP'ye fosforilasyonunda kullanılır. Bir glikoz molekülünün tam oksidasyonu ile 32 ATP sentezlenir [22].

Bu süreç, hücrel denge açısından oldukça hassastır. Oksidatif fosforilasyon sırasında oluşan ROS, mitokondriyal zar yapısına ve DNA'ya zarar verebilir. Hücreler, bu zararlı etkileri baskılamak için antioksidan mekanizmaları kullanır. Aksi takdirde mitokondriyal disfonksiyon, inflamasyon, oksidatif stres ve apoptoz gibi süreçler tetiklenebilir [23].

Mitokondri, hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunun düzenlenmesinde aktif rol oynar. Sitoplazmadaki Ca^{2+} artışlarını tamponlamak amacıyla bu iyonları doğrudan matriks içerisine alırlar. Bu süreç, iç mitokondriyal zar üzerindeki mitokondriyal kalsiyum *uniporter* kompleksi aracılığıyla ve zar potansiyeline bağlı olarak gerçekleştirilir. Böylece kalsiyum hücre içinde kontrollü biçimde depolanır ve iyonik denge korunur [24].

Mitokondriye alınan kalsiyum, metabolik aktiviteyi doğrudan etkiler. TCA döngüsünde yer alan başlıca enzimlerden pirüvat dehidrogenaz (PDH), izositrat dehidrogenaz (IDH) ve alfa-ketoglutarat dehidrogenaz (α -KGDH), Ca^{2+} tarafından aktive edilerek NADH üretimini artırır. Bu durum, ETZ'nin daha etkin çalışmasına ve ATP üretiminin hızlanmasına olanak tanır [25].

Mitokondri aynı zamanda ER ile yakın fiziksel bağlantılara sahiptir. Bu temas bölgeleri, mitokondri-ilişkili membranlar (*mitochondria-associated membranes*; MAM), ER'den salınan kalsiyumun doğrudan mitokondriye aktarılmasına olanak sağlar. Böylece hızlı, lokalize kalsiyum sinyalleşmesi mümkün hale gelir [26].

Ancak aşırı Ca^{2+} alımı, mitokondriyal membran potansiyelini ($\Delta\Psi_m$) bozabilir. Bu durumda, mitokondriyal geçiş gözenek kompleksi (*mitochondrial transition pore*; mPTP) açılarak matrikse su girişi, organel şişmesi ve iç yapının bozulması gibi olaylara yol açabilir. Sitokrom c'nin sitozole salınmasıyla birlikte apoptoz süreci tetiklenebilir. Sitokrom c ile birlikte; mitokondriyal DNA, ROS, kardiyolipin gibi mitokondriyal matriks moleküllerinin sitozole salınması, proinflamatuvar etkileriyle de İRH'nda rol oynar [27].

Mitokondri, yalnızca enerji üretim merkezi değil; aynı zamanda hücrel yaşam ve ölüm kararlarında rol oynayan bir organeldir. Hücrel stres, DNA hasarı, ROS birikimi veya kalsiyum dengesizliği gibi durumlarda, mitokondri dış zarı geçirgen hale gelir ve bazı pro-apoptotik moleküller sitozole salınır [28].

Bu süreçte sitokrom c, sitozolde Apaf-1 adlı protein ile birleşerek apoptozom adı verilen moleküler kompleksin oluşumunu başlatır. Apoptozom, kaspaz-9'u aktive eder. Ardından yürütücü kaspazlar olan kaspaz-3 ve kaspaz-7'nin aktivasyonu ile hücrede programlı ölüm süreci ilerler. Çekirdek parçalanır, DNA fragmente olur ve hücre zarında "blebbing" adı verilen kabarcıklanmalar oluşur [29]. Ayrıca, mitokondriden salınan Smac/DIABLO gibi proteinler de kaspaz inhibitörlerini etkisiz hale getirerek apoptozu kolaylaştırır. Apoptozun düzgün işlemesi, organizmanın sağlığı açısından hayati öneme sahiptir. Hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılması, bağışıklık sisteminin dengesi, yaşlanmanın düzenlenmesi ve kanserin önlenmesi bu mekanizmanın etkili işlemesine bağlıdır.

Apoptoz kaskadı sorunları, çeşitli hastalıklara zemin hazırlar. Örneğin; kanser hücreleri genellikle apoptozu baskılayarak çoğalmaya devam ederken, Alzheimer veya Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklarda aşırı apoptoz doku kaybına neden olabilir. Ayrıca İRH sırasında apoptozun mitokondri kaynaklı tetiklenmesi, kalp ve karaciğer dokularında ciddi hasarlara yol açabilir [30].

Sitrik asit döngüsü esnasında ETZ'nde elektronların açığa çıkması ile süperoksit (O_2^-) gibi ROS oluşur. Normalde antioksidan mekanizmaların kompanse edebilecekleri seviyelerde oluşan bu moleküller, yüksek konsantrasyonda DNA, protein ve lipitlere zarar verir. Bu yüzden mitokondri süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan savunma sistemleri de içerir [31,32].

ROS artışı mitokondriyal disfonksiyonu tetikleyerek, daha ileri düzey ROS artışına yol açar ve hücre hasarına neden olur ki, bu süreç OkS ile karakterize İRH ile doğrudan ilişkilidir [33].

Mitokondri, hücrel metabolizmanın merkezinde yer alan ve çok sayıda biyokimyasal yolda aktif rol üstlenen dinamik bir organeldir. Hücrenin enerji ihtiyacının

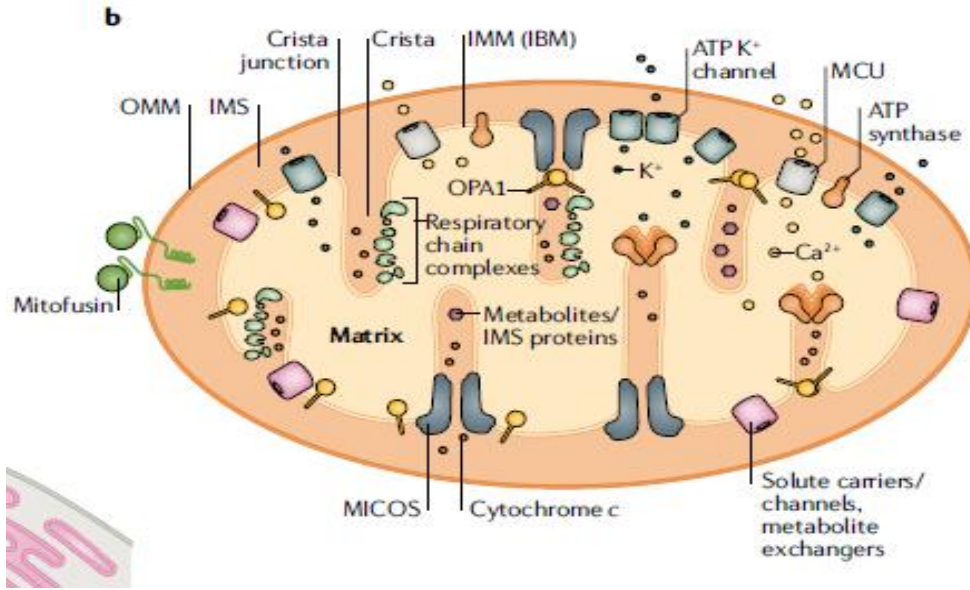
büyük kısmı, mitokondri içerisinde gerçekleşen oksidatif fosforilasyon süreciyle karşılanırken, bu organel aynı zamanda karbonhidrat, yağ ve aminoasit metabolizmasının kritik basamaklarını da yürütür [34]. Glikozdan elde edilen pirüvatın asetil-CoA'ya çevrilmesinden itibaren başlayan ve sitrik asit döngüsü ile devam eden süreçte, yüksek enerjili elektron taşıyıcıları olan NADH ve FADH'nin sentezi gerçekleşir. Bu taşıyıcılar, iç mitokondriyal zar üzerindeki elektron taşıma zincirine katılarak ATP üretimini sağlar.

Bununla birlikte, mitokondri yalnızca bir enerji üretim merkezi değil; aynı zamanda kontrollü ROS üretiminde, kalsiyum sinyallemesinin düzenlenmesinde ve apoptozun başlatılmasında da görevlidir [35]. Ayrıca, karaciğer gibi belirli dokularda üre döngüsünün bazı basamakları ile keton cismi üretimi de mitokondride gerçekleşmektedir. Dolayısıyla mitokondri, hem temel metabolik faaliyetlerin sürdürülebilirliği açısından hem de hücrel stres yanıtlarında belirleyici rolleri nedeniyle yaşamsal öneme sahiptir [21].

Mitokondriler birçok metabolik yolakta görev alır:

- Sitrik asit (Krebs) döngüsü: Matriks içinde gerçekleşir ve yüksek enerjili elektron taşıyıcılarını oluşturur.
- Yağ asidi oksidasyonu (β -oksidasyon): Uzun zincirli yağ asitlerinin parçalanması sonucu asetil-CoA üretimi sağlanır [36]
- Aminoasit metabolizması: Özellikle glutamat, serin, glisin gibi amino asitlerin dönüşüm yollarında aktif rol oynar.
- Heme ve steroid biyosentezi: Endokrin hücrelerde mitokondri, steroid hormonlarının sentezinde kritik görev üstlenir [37]

Bu metabolik süreçler, hepatositlerde iskemi-reperfüzyon sırasında bozulur; metformin aracılı AMP-aktive protein kinaz (AMPK) aktivasyonu bu bozulmayı sınırlandırabilir.



Şekil 2.3. Mitokondri yapısı [38]

2.2.1. Mitokondriyal Kalite Kontrolü

Mitokondri, hücrel enerji üretiminin merkezinde yer alan dinamik bir organeldir ve oksidatif fosforilasyon, redoks denge, kalsiyum homeostazı ve apoptotik sinyalizasyon gibi süreçlerde kritik rol oynar. Hepatik İRH ile elektron taşıma zinciri (ETZ) fonksiyonu bozulur, elektron kaçağı artar ve reaktif oksijen türleri (ROS) aşırı üretilir. Bu oksidatif yük, mitokondriyal zar potansiyelinin ($\Delta\Psi_m$) çökmesine, açık mPTP aktivasyonuna ve hücre ölümüne yol açar [39].

Bu yıkıcı sürece karşı hücre, 'mitokondriyal kalite kontrolü (*mitochondrial quality control*; MQC)' olarak adlandırılan çok katmanlı bir savunma sistemi geliştirir. MQC; biyogenez, füzyon-fizyon dinamikleri ve mitofaji mekanizmalarının koordineli etkileşimini içerir. Bu mekanizmaların üst düzey düzenleyicisi ise enerji sensörü AMPK ve onun aşağı akım hedefleri olan Sirtuin 1 (*Silent Information Regulator 2 homolog 1*; SIRT1) ve *Peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator 1-α* (PGC-1α)'dır.

AMPK, hücrel enerji durumunun hassas bir göstergesi olarak AMP/ATP oranındaki artışa duyarlıdır. Enerji stresinde veya mitokondriyal Kompleks I inhibisyonu sonrasında AMP bağlanması, AMPK'nin γ -alt biriminde allosterik aktivasyon oluşturur ve karaciğer kinaz B1 (*liver kinase B1*; LKB1)-kompleksi (LKB1-STRAD-MO25) aracılığıyla Thr172 fosforilasyonu gerçekleşir. Böylece AMPK aktif hale gelerek katabolik

süreçleri uyarır (örneğin glikoz alımı, yağ asidi oksidasyonu) ve anabolik süreçleri (örneğin lipid sentezi, protein sentezi) baskılar [2].

Metformin, mitokondriyal NADH:ubikinon oksidoredüktaz (Kompleks I)'i kısmen inhibe ederek AMP/ATP oranını artırır; bu da AMPK aktivasyonunu tetikler. Aktive AMPK, aşağı akımda hem nükleer hem de mitokondriyal hedefleri fosforile ederek enerji homeostazının yeniden kurulması yönünde etki gösterir [40].

PGC-1 α , mitokondriyal biyogenezin ana transkripsiyonel kofaktörüdür. AMPK, PGC-1 α 'yı doğrudan fosforile ederken, SIRT1 (NAD⁺-bağımlı deasetilaz) aracılığıyla deasetile ederek aktivitesini güçlendirir. Bu koordineli aktivasyon sonucunda PGC-1 α ; nükleer respiratuar faktör (NRF)-1, NRF-2 ve mitokondriyal transkripsiyon faktörü (TFAM) A ekspresyonunu artırır. Bu transkripsiyonel kaskad, nükleus-mitokondri etkileşimini destekleyerek yeni mitokondri DNA'sının replikasyonunu ve mitokondri proteinlerinin sentezini uyarır [39]. Ayrıca, SIRT1 aktivitesi NAD⁺/NADH oranına bağımlıdır; dolayısıyla metformin ile AMPK aktivasyonu sonucu NAD⁺ artışı, SIRT1 üzerinden mitokondriyal biyogenezi daha da güçlendirir. Bu eksen, mitokondriyal kapasitenin yeniden yapılandırılması ve enerji rezervinin sürdürülmesi açısından kritik önemdedir.

Mitofaji, hasarlı veya depolarize olmuş mitokondrilerin seçici olarak otofaji yoluyla ortadan kaldırılmasıdır. AMPK, otofaji başlatıcı kompleksi oluşturan ULK1 (*unc-51 like kinase 1*)'i Ser317 ve Ser777 bölgelerinden fosforile ederek mitofajiyi doğrudan uyarır. Bu süreç, mTORC1 (*mechanistic Target of Rapamycin*) baskılanması ile birlikte ULK1 aktivasyonunu kolaylaştırır. Hasarlı mitokondrilerde PINK1 (*PTEN-induced kinase 1*) mitokondri dış zarında birikir ve Parkin (E3-ubikuitin ligaz)'i fosforile ederek mitokondri proteinlerinin ubikuitinasyonunu başlatır. Bu sinyal, otofagozomların hasarlı mitokondrilere yönlendirilmesini sağlar. AMPK'nin ULK1 üzerindeki fosforilasyonu, PINK1/Parkin aracılı bu yıkım sürecinin hızlanmasını destekler.[41] Bu mekanizma sonucunda, ROS birikimi ve mitokondri kaynaklı inflammatuar sinyal moleküllerinin (örneğin mitokondriyal DNA, NLRP3 inflammatuomu aktivatörleri) yayılımı önlenir.

Mitokondriler, füzyon (birleşme) ve fizyon (bölünme) olaylarıyla dinamik bir ağ oluştururlar. Füzyon, MFN1/2 (Mitofusin 1/2) ve OPA1 (*optic atrophy protein*)

proteinleriyle yürütülürken, fizyon DRP1 (*Dynamin-related protein 1*) aracılığıyla gerçekleştirilir. HIRI sırasında aşırı fizyon, mitokondriyal parçalanmaya ve fonksiyon kaybına yol açar. AMPK aktivasyonu, DRP1'in Ser637 fosforilasyonunu artırarak fisyonu baskılar; buna karşın OPA1 stabilizasyonu ile füzyonu destekler. Böylece mitokondriyal morfoloji ve membran bütünlüğü korunur [2].

AMPK aynı zamanda redoks dengesini de modüle eder. Nrf2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) yolunu aktive ederek HO-1, SOD ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonunu artırır. Bu sayede lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu baskılanır. Öte yandan AMPK, NF- κ B p65 alt biriminin nükleer translokasyonunu inhibe eder ve proinflamatuar sitokinlerin (TNF- α , IL-6) üretimini azaltır. Bu durum, metformin önkoşullamasının hem hepatik dokuda hem de uzak organlarda (örneğin miyokard) inflamatuvar yanıtı sınırlandırmasını açıklar [40].

Sonuç olarak, mitokondriyal kalite kontrolü, HIRH'nda enerji üretimi, redoks dengesi ve hücre hayatta kalımını sürdüren temel savunma ağını oluşturur. AMPK-SIRT1-PGC-1 α eksen, biyogenez, mitofaji ve dinamiklerin senkronizasyonunu sağlayarak hem mitokondri bütünlüğünü hem de hücre fonksiyonunu korur. Bu eksenin farmakolojik olarak hedeflenmesi — özellikle metformin ve benzeri AMPK aktivatörleriyle — transplantasyon sonrası karaciğer fonksiyonunun korunmasında umut verici bir strateji olarak değerlendirilmektedir [2,39-41].

2.2.2. Mitokondriyal Dinamikler

Mitokondriler, sabit şekilli organeller olmaktan ziyade, sürekli olarak biçim ve sayı bakımından değişiklik gösteren dinamik yapılardır. Bu değişiklikler, hücrenin metabolik ihtiyaçlarına, stres koşullarına ve hücre döngüsünün evresine bağlı olarak şekillenir. Mitokondriyal morfoloji ve sayının düzenlenmesi, hücre fonksiyonu ve sağkalımı için kritik öneme sahiptir [34].

Mitokondri sayısı, hücre tipine ve işlevine göre büyük farklılıklar gösterir. Örneğin kas hücreleri (özellikle kalp kası) Yüksek enerji gereksinimi nedeniyle binlerce mitokondri içerir. Karaciğer hücreleri metabolik aktiviteleri yoğun olduğu için yüksek sayıda

mitokondri barındırır. Lenfosit veya fibroblast gibi hücreler görece daha az mitokondriye sahiptir.

Bir hücredeki mitokondri sayısı, hücrenin enerji üretme kapasitesinin önemli bir göstergesidir. Bu sayı, hücre farklılaşması, büyümesi ve stres altında kalması gibi durumlarda artabilir veya azalabilir. Örneğin, egzersiz sırasında iskelet kası hücrelerinde mitokondriyal biyogenez artar; benzer şekilde, açlık veya hipoksi gibi koşullarda da hücreler daha fazla mitokondri üretir [42].

Mitokondri sayısının artışı, hücrede mitokondriyal biyogenez olarak adlandırılan süreçle sağlanır. Bu süreç; nükleer ve mitokondriyal gen ekspresyonunun koordineli bir şekilde artması, ribozomal protein sentezi ve yeni mitokondri zarlarının oluşumu ile gerçekleştirilir [21]. Biyogenezin ana düzenleyici faktörlerinden biri, PGC-1 α adlı transkripsiyonel koaktivatördür. PGC-1 α , özellikle egzersiz, soğuğa maruz kalma ve oksidatif stres gibi durumlarda uyarılır [35].

Mitokondriler genellikle elipsoidal ya da tübüler yapılarda gözlemlense de, hücre tipine ve fizyolojik duruma göre yuvarlak, filamentöz (ipliksi), dallanmış veya parçalı yapılarda bulunabilir. Özellikle enerji ihtiyacı yüksek hücrelerde (örneğin kardiyomiyositler, hepatositler ve nöronlar) mitokondriler uzun, ağ benzeri bir ağda birleşmiş filamentöz yapılarda olabilir. Bu morfolojik yapı, MQC kapsamında kalan ve mitokondriyal dinamikler olarak adlandırılan füzyon ve fisyon süreçleri tarafından sürekli olarak düzenlenir. Füzyon, birden fazla mitokondrinin birleşerek tek, daha büyük bir mitokondri oluşturmasıdır ve genellikle enerji ihtiyacının yüksek olduğu veya hasarın onarılması gerektiği durumlarda görülür. Fisyon ise bir mitokondrinin ikiye ayrılmasıdır; bu süreç yeni hücre oluşumları (mitoz), mitofaji (hasarlı mitokondrilerin yok edilmesi) ve stres yanıtlarıyla ilişkilidir [38,42-44].

Mitokondri sayısı ve şekli ile ilgili anormallikler, birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir[34,45]:

- Nörodejeneratif hastalıklar (ör. Parkinson, Alzheimer): Dallı yapıların kaybı ve fisyon artışı görülür.
- Kas distrofileri ve mitokondriyal miyopatiler: Sayıca azalmış, şişmiş veya parçalanmış mitokondriler tespit edilir.
- **İRH: Fisyon artar**, enerji üretimi bozulur ve apoptoz tetiklenir.

- Kanser: Bazı tümör hücrelerinde mitokondri sayısı azalır veya morfolojik olarak düzensiz yapılarda gözlenir.

Mitokondri, hücre yaşamı için vazgeçilmez olan enerji üretimi başta olmak üzere çok sayıda kritik biyolojik fonksiyonu yerine getirir. Yapısal bütünlüğü ve zarlar arası koordinasyonları, bu görevlerin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesini mümkün kılar. Ancak bu organel aynı zamanda hücresel strese oldukça duyarlıdır ve küçük yapısal bozulmalar bile geniş çaplı patolojik sonuçlara yol açabilir. Dolayısıyla, mitokondrilerin yapısal özelliklerini ve işlevsel kapasitelerini anlamak, hücresel sağlık ve hastalık süreçlerinin aydınlatılmasında kilit bir adımdır.

Yukarıda belirtildiği üzere, mitokondriler yalnızca enerji üretiminden sorumlu statik yapılar değil, aynı zamanda hücre içerisinde yüksek düzeyde dinamik davranışlar sergileyen organellerdir. Bu dinamik süreçler; füzyon, fisyon, mitofaji ve hücre içi taşınım gibi mekanizmaları içerir. Mitokondriyal dinamikler, hücre metabolizmasının sürekliliği, stres yanıtlarının düzenlenmesi, apoptoz ve organel kalitesinin korunması açısından kritik öneme sahiptir [38,45].

Mitokondriyal füzyon, iki veya daha fazla mitokondrinin birleşerek daha büyük ve fonksiyonel bir yapı oluşturduğu süreçtir. Bu mekanizma, enerji ihtiyacının arttığı veya mitokondriyal hasarın onarılması gerektiği durumlarda ön plana çıkar. Füzyon sayesinde mitokondriler, içeriklerini paylaşarak hasarlı bölgelerin telafisini sağlar. Süreçte görev alan başlıca proteinler MFN1, MFN2 ve OPA1'dir. MFN1 ve MFN2 dış mitokondriyal zar üzerinde görev alırken, OPA1 iç zarda krista bütünlüğünü sağlar [38,45,46].

Füzyon, iki mitokondrinin zarlarının ve içeriklerinin birleştirilmesiyle, enerji verimliliğini ve mitokondriyal DNA bütünlüğünü koruyan bir süreçtir. Bu olay iki aşamada gerçekleşir: dış zar füzyonu ve iç zar füzyonu. Dış zar füzyonu, GTPaz ailesinden MFN1 ve MFN2 proteinleri tarafından yürütülür. MFN1/2, karşılıklı mitokondri zarları üzerinde homodimer veya heterodimer kompleksler oluşturarak GTP hidrolizi ile zarları yaklaştırır. Bu etkileşim, mitokondriyal dış zarın kaynaşmasını sağlar.

İç zar füzyonu, OPA1 proteini tarafından gerçekleştirilir. OPA1, mitokondriyal iç zarda bulunur ve uzun (L-OPA1) ile kısa (S-OPA1) izoformları arasında bir denge mevcuttur. L-OPA1 füzyonu desteklerken, aşırı proteolitik işleme sonucu artan S-OPA1

formları füzyon kapasitesini düşürür. OPA1'in GTPaz aktivitesi, zarların kaynaşmasını ve krista yapısının korunmasını sağlar. Bu mekanizma, enerji üretimi ve ETZ verimliliği için gereklidir[38].

Mitokondriyal fisyon, hasarlı mitokondrilerin elimine edilmesi (mitofaji) ve mitokondri sayısının hücre bölünmesi sırasında yeniden dağıtılması için gereklidir. Fisyonun ana düzenleyicisi, sitozolik bir GTPaz olan DRP1'dir. DRP1, sitoplazmadan mitokondriyal dış zara taşınır ve burada *Mitochondrial Fission Factor* (MFF), *Mitochondrial Dynamics proteins of 49 and 51 kDa* (MID49, MID51) ve *Fission 1* (FIS1) gibi reseptör proteinlere bağlanarak halka şeklinde bir kompleks oluşturur. GTP hidroliziyle bu halka daralır ve mitokondri ikiye ayrılır.

Fisyonun başlangıç noktaları genellikle ER ile mitokondri arasındaki temas bölgeleridir. ER filamentleri, fisyon öncesinde mitokondriyi sarmalayarak daralma bölgelerini tanımlar. Aktin polimerizasyonu ve mikrotübül motor proteinleri (kinesin, dynein) bu süreci mekanik olarak destekler [38].

Mitokondriyal füzyon ve fisyon süreçleri arasındaki denge, hücrel homeostazın korunmasında kritik rol oynar. Füzyon artışı, mitokondri ağlarının uzamasına ve enerji verimliliğinin artmasına neden olurken, aşırı fisyon mitokondriyal fragmentasyona, ROS üretiminde artışa ve apoptoz eğilimine yol açar. AMPK, mTOR ve kalsiyum sinyali bu dengeyi düzenleyen başlıca metabolik sensörlerdir. Enerji eksikliğinde AMPK aktivasyonu fisyonu sınırlarken, stres koşullarında mTORC1 inhibisyonu mitofajiyi artırır. Bu karşılıklı denge, hücre sağkalımı ve doku rejenerasyonu için hayati önemdedir [38,45-47].

Mitokondriyal dinamiklerin dengesizliği çeşitli hastalıklarla ilişkilidir. Örneğin, Alzheimer hastalığında MFN2 düzeyleri azalırken DRP1 aktivitesi artar ve bu durum mitokondrilerin fragmentasyonuna (fisyon) neden olur. Kanserde ise artan fisyon, glikolitik metabolizmaya kaymayı kolaylaştırır [46]. Deneysel modellerde DRP1, MFN1 veya MFN2'nin genetik susturulması; kas zayıflığı, kardiyomiyopati ve nörodejenerasyon gibi fenotiplere neden olmuştur. Bu bulgular, mitokondriyal dinamiklerin tedavi hedefi olarak ele alınabileceğini göstermektedir. Mesela, DRP1 inhibitörleri (ör. Mdivi-1) ile füzyonun kontrolü veya mitofajiyi artıran urolithin A gibi ajanlarla mitokondri sağlığının korunması hedefleyen çalışmalar yapılmıştır [49].

İslemi – reperfüzyon hasarı gibi akut stres durumları, mitokondriyal dinamikleri etkiler. İskemi sırasında ATP eksikliği, reperfüzyonla birlikte aşırı ROS üretimi meydana gelir. DRP1'in hiperaktivasyonu mitokondriyal fragmentasyonu (fasyon) artırır, OPA1'in parçalanması ve MFN2 kaybı ise füzyonu engeller [50].

Mitokondriyal dinamikleri hedef alan tedavi stratejileri üzerinde yoğun çalışmalar yürütülmektedir. DRP1 inhibitörleri, OPA1 ekspresyonunu destekleyen ajanlar ve mitofajiyi tetikleyen moleküller, İRH gibi sorunlara karşı potansiyel terapötik seçeneklerdir[51,52].

2.3. Hepatik İskemi – Reperfüzyon Hasarı

2.3.1. Hepatik İskemi – Reperfüzyon Hasarının Klinik Önemi

İskemi reperfüzyon hasarı önceleri daha çok kalp dokusunda incelenmiş, zamanla karaciğer, böbrek, beyin ve akciğer gibi organlarda da önemli sonuçlara neden olduğu anlaşılmıştır. Hepatik İRH, özellikle karaciğer transplantasyonları, majör hepatik cerrahiler, travmatik kan kayıpları ve hipovolemik şok durumlarında önemli bir komplikasyondur. Klinik olarak HİRH, transaminaz düzeylerinde artış, safra akışında azalma, mikrosirkülasyon bozuklukları ve hepatik yetmezlik bulguları ile kendini gösterir. Karaciğer transplantasyonlarında greftin işlevselliği, greft rejeksiyon riski, safra kanallarındaki bozulmalar ve alıcıdaki sistemik inflamatuvar yanıtın şiddeti doğrudan HİRH düzeyi ile ilişkilidir [2]. Hepatik İRH moleküler temellerinin anlaşılması, hem greft sağkalımını hem de postoperatif komplikasyonların azaltılmasını hedefleyen klinik stratejiler için kritik öneme sahiptir.

2.3.2. Biyokimyasal, Moleküler HİRİ Göstergeleri

Karaciğerde İRH; doku hasarı, OkS ve inflamasyonla karakterizedir. Bu üç ana parametre belirteçleri HİRİ tespiti ve değerlendirmesinde esastır [1,2,18]:

Alanin aminotransferaz (ALT) ve Aspartat aminotransferaz (AST), hepatosit zarı hasarı sonucu sitoplazmadan dolaşıma salınan özgül karaciğer enzimleridir. Hepatik İRH sonrasında, serum ALT ve AST düzeyleri iskemi süresi uzunluğuyla doğru orantılı olarak yükselir. Serum ALT, AST, laktat dehidrogenaz (LDH) gibi sitoliz göstergelerinde artış; enerji üretim kısıtlılığına paralel, doku ATP düzeyinde düşüş; tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α), interlökin-6 (IL-6) gibi proinflamatuvar sitokinler ve nötrofil aktivitesi belirteci myeloperoksidaz (MPO) düzeylerinde yükseliş; OkS parametrelerinden glutatyon düzeylerinde düşüş; ROS, total oksidan statü (TOS) ve hücre membranı peroksidasyonu metaboliti olan malondialdehit (MDA) düzeylerinde yükseliş; en sık kullanılan bu parametrelerde HİRH'nın yol açması beklenen sonuçlardır.

Hücrel membran bütünlüğü bozulduğunda salınan (ALT ve AST gibi) sitozolik bir enzim olan LDH düzeyi, İRH sonrası nekroz ciddiyetini yansıtır ve özellikle transplantasyon sonrası takiplerde prognostik değere sahiptir[2].

Tümör Nekroz Faktörü-alfa ve IL-6, İRH sürecinde aktive olan immün hücreler tarafından üretilir. Bu sitokinler, sistemik inflamatuvar yanıtın başlatılmasında önemli rol oynar. Reperfüzyon sonrasındaki saatler içinde serum düzeylerinin yükselmesi, proinflamatuvar kaskadın aktivasyonuna paraleldir. Bu sitokinlerin düzeyleri, aynı zamanda greft disfonksiyonu ve sistemik inflamatuvar yanıt sendromu gelişme riskini öngörmede kullanılabilir[2].

Liu ve arkadaşları, HİRH temelinde oksidatif stres, inflamasyon, mitokondriyal disfonksiyon ve apoptozun yer aldığını, bu süreçlerin birbiriyle sıkı bir ağ oluşturduğunu ve tedavi yaklaşımlarının en etkili hedefinin mitokondri olduğunu belirtmişlerdir [2].

Çalışmada, AMPK/SIRT1/PGC-1 α ekseninin mitokondriyal biyogenezi uyarak oksidatif stres yükünü azalttığı, enerji metabolizmasını dengelediği ve hepatik hücre bütünlüğünün korunmasında kritik rol oynadığı bildirilmiştir [2].

Liu ve arkadaşları, mitokondriyi hedef alan farmakolojik ajanların, özellikle AMPK aktivasyonu yoluyla mitokondriyal fonksiyonun sürdürülmesini ve reperfüzyon kaynaklı ROS artışının sınırlandırılmasını sağladığını vurgulamışlardır. Bu bulgu, metforminin benzer mekanizmalar üzerinden hepatoprotektif etki potansiyelini desteklemektedir [2].

Ayrıca, çalışmada mitokondriyal dinamiklerin (füzyon/fisyon dengesi) korunmasının, karaciğer dokusunun iskemi-reperfüzyon hasarına karşı direncini artırdığı, bu dengenin AMPK aracılığıyla düzenlenmesinin terapötik açıdan umut verici olduğu vurgulanmıştır [2].

2.4. Metformin ve önkoşullama

1922 yılında keşfedilen metformin, sentetik bir biguaniddir. Polar guanidin yapısı nedeniyle oldukça hidrofiliktir ve fizyolojik pH'de katyonik halde bulunabilir ve pasif difüzyon yoluyla hücreye girebilir. 1950'lerden beri metformin, hipergliseminin tedavisinde kullanılmaktadır [7].

İnsanda metformin, organik katyon taşıyıcıları (OCT) aracılığıyla çalışır. OCT ile etkileşim, metforminin absorpsiyonunu, dağılımını ve biyokimyasal etkilerini kontrol eder. İnce bağırsakta metforminin emilimi, enterositlerde bulunan plazma membran monoamin taşıyıcısı (PMAT) tarafından kontrol edilir. Enterositler metformini PMAT ve OCT3 tarafından alır, ancak OCT1, metforminin kana geçişini sağlar. Metforminin kandan hepatositlere geçişi, OCT1 ve OCT3 aracılığıyla gerçekleşir. Ek olarak, OCT2, kandan böbreklere geçişi sağlar. OCT1 ve çoklu ilaç/toksin ekstrüzyon proteinleri, renal tübüler hücrelerden idrara geçişte rol oynar[7,8].

Metformin, mitokondriyi hedef alır. Mitokondri matriksinde metformin, mitokondriyal elektron transferi zincirinde kompleks I'i inhibe eder. Bu durum, ATP sentezini azaltmanın yanı sıra nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) oksidasyonunu da azaltır. Karaciğerde ATP seviyeleri düşerken, karaciğer kinaz B1 (LKB1), 5'-adenozin monofosfat kinazın indüklenmesini sağlar. Bu durum, hepatik glukogenezini durdurur ve kaslarda glukoz kullanımını artırır. Metforminin etkilerinin, LKB1 ve adenoazinmonofosfat kinaz (AMPK)'dan bağımsız olabileceği de bildirilmiştir[9-12].

Metformin, çeşitli kaynaklara göre antioksidan etkilere sahiptir. Bu nedenle, metformin sadece diyabet tedavisinde ve çalışmalarında değil, aynı zamanda karaciğer hasarı, serebral iskemi/reperfüzyon hasarı, Parkinson hastalığı ve organ yetmezliği gibi birçok farklı patolojik durumda incelenmiştir. Bu araştırmalar, metforminin antioksidan özelliğinin SIRT3, bir antioksidan olan paraoksonaz 1 (PON1) ve AMP aktive protein

kinaz (AMPK) aktivasyonu ile üretilen tiyoredoksin aracılığıyla gerçekleşebileceğini öne sürmüştür.[9-12]

Metforminin mitokondriyal kompleks 1 inhibisyonu sonucu oksidatif fosforilasyonun duraklamasıyla yükselen AMP/ATP oranı AMPK'ı aktifleştirerek, hedef genlerin AMPK-aracılı transkripsiyonuna yol açar. Böylece hepatic glukoneogenez azalır, insulin sensitivitesi ve yağ asidi oksidasyonu artar ve glikoz düzeyi düşer. AMPK-bağımsız etkilerinin olduğu da kabul edilmiştir [13].

En sık kullanılan antidiyabetik olan metforminin, kompleks 1 ve TET inhibisyonunun, İRH olgularında organ koruyucu etkisi saptanmış, bu etki birçok araştırmaya konu olmuştur [14].

Önkoşullama, odaklanılan bir patolojik durum öncesinde, belli olumsuz etken, koşul veya koşulların hücre ölümüne sebep olmayacak düzeyde uygulanması olarak tanımlanabilir. Literatürde ilk kez anıldığı 1964 tarihli çalışmada “tolerans” ile ilişkili bir anlam kastedilmiştir [15]. Özellikle son iki dekada iskemik önkoşullama kavramıyla güncel anlamı daha net şekillenmiştir: “ölümcül olmayacak düzeyde hipoksik veya iskemik olaylar (önoşullama); daha sonra o olayla ölümcül şiddette karşılaşsa dahi, bir doku, organ, hattâ organizmanın tolerans ve direncini geliştirip, arttırabilir” [16].

Önkoşullamanın, hücre için ölümcül olmayacak düzeydeki etkenin, hücre savunma ve adaptasyon mekanizmalarını aktive ettiği ve hücrenin strese direncini arttırdığı tespiti, farklı önkoşullayıcı ajanlara dair çalışmalara ilham vermiştir. Ancak TET'in İRH'deki rolü bu ajanlar içinde metforminin, bir mitokondriyal Kompleks 1 inhibitörü olarak, özel bir konuma sahip olmasını sağlamıştır. Bu yüzden metformin ile önkoşullamanın etkileri popülerliği artan bir araştırma odağıdır.

Kardiyak hastalıklar, metformin uygulamasının araştırma konusu olduğu önemli bir gruptur: metforminin AMPK aktivasyonu yoluyla otofajiyi tetiklediği ve mitokondriyal fonksiyona katkıda bulunduğu gösterilmiş, kardiyak arrest geçiren farelerde kardiyak ve renal İRH'nın azaldığı da kaydedilmiştir[17].

Metforminin koruyucu etkileri renal sorunlarda da çalışılmıştır. Sıçan ve domuzlarda AMPK'yi aktive ettiği ve NFkB aracılı inflamasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca, metforminin kronik böbrek hastalığına sahip sıçanlardan elde edilen mezenkimal kök hücrelerde DNA hasarını önlediği ve hücreleri senesensten koruduğu başka bir araştırmada da gösterilmiştir [14].

AMPK-temelli mitokondri koruma mekanizmalarının HİRH'deki belirgin rolü, bu tezde kullanılan metformin önkoşullama yaklaşımının biyolojik rasyonelini güçlendirmektedir. Metforminin karaciğer dokusunda AMPK aracılı mitokondriyal koruma mekanizmaları, iskemi-reperfüzyon modeliyle ilişkilendirildiğinde, hepatik oksidatif stresin azaltılmasına ve mitokondriyal dinamiklerin düzenlenmesine katkı sağlayabileceği bildirilmiştir [39].

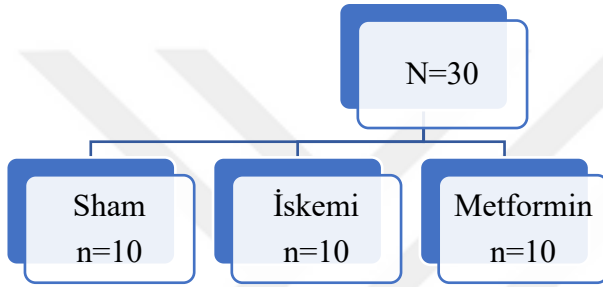
AMPK aktivasyonunun downstream etkilerinden biri, DRP1 fosforilasyonunu azaltarak mitokondriyal fisyonu baskılaması ve MFN2 aracılı füzyonu desteklemesidir [19]. Bu durum, metforminle önkoşullamanın mitokondriyal bütünlüğü koruma potansiyelini düşündürür.

Metforminle önkoşullamanın İRH'nı sınırlayıcı etkisi gösterilmiş olsa da, literatürde mitokondriyal dinamiklere odaklı bir çalışma henüz bulunmamaktadır [14]. Bu çalışmada; **“Sıçanlarda, HİRH modelinde metformin ile önkoşullama, mitokondriyal dinamiği füzyon lehine etkiler”** hipoteziyle; metforminle önkoşullamanın, HİRH sıçan modelinde, “hepatik mitokondriyal dinamiklere etkisinin tespiti amaçlanmıştır

3. YÖNTEM

3.1. Deneysel Tasarım

Karşılaştırılacak üç grup; “sham” grubu, sadece HİRH yaratılan “iskemi” grubu ve yedi gün metformin uygulandıktan sonra HİRH yaratılan “metformin” grubu olarak adlandırılarak tasarlandı; istatistiksel ön değerlendirme (*power* analizi) uyarınca denek sayısı her grupta 10 olmak üzere, toplamda 30 olarak belirlendi [54]. (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Denek Gruplarının Şeması

Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulundan, gerekli onay alındı (Onay no: DA 23/21, tarih: 13/10/2023).

3.1.1. Deneysel Model Standardizasyonu

Literatürde standart olmayan, çok çeşitli iskemi ve reperfüzyon süreleri uygulanmış olduğundan, deneysel HİRH sıçan modeli için gerekli iskemi ve reperfüzyon süreleri, tez çalışması öncesinde ayrıca yapılmış bir çalışma (proje no: DA23/14; başlık: Sıçanlarda ideal HİRH modeli standardizasyonu) sonuçlarına göre; HİRH yaratmak için gerekli minimum süreler olarak belirlenen, 45 dakika iskemi sonrası 6 saat reperfüzyon olarak planlandı.

Literatürde daha önce uygulanmış metformin dozları ve çalışmaların sonuçları dikkate alınarak, sıçanlara orogastrik gavajla uygulanacak metformin dozu, insandaki doku konsantrasyonunu simüle eden 300 mg/kg/gün olarak belirlendi [14, 55-57].

Literatürde metformin önkoşullamasına yönelik yapılmış görece az sayıda çalışmada dahi çok çeşitli metformin uygulama süreleri mevcut olduğundan, uygun Metformin önkoşullama süresinin belirlenmesi için yapılan ikinci bir çalışmanın (Proje No: DA23/18; Başlık: "Sıçanlarda hepatik iskemi-reperfüzyon hasarı modelinde metformin ile ön koşullama standardizasyonu") sonuçlarına dayalı olarak, metformin grubuna, iskemiden önceki 7 gün metformin uygulanarak önkoşullamanın modelleme açısından en uygun protokol olduğu belirlendi.

3.2. Denek Bakımı, Gözetimi ve Cerrahi Uygulama Protokolleri

3.2.1. Denek Özellikleri ve Barındırma Koşulları

Çalışmada 250 – 300 g. ağırlıklarında, 6 – 9 aylık erkek Wistar albino sıçanlar kullanılmıştır. Denekler, Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir. Deney süresince; şeffaf polikarbon kafeslerde, 12 saat aydınlık / 12 saat karanlık döngüsünde, 22 ± 2 °C sıcaklık ve %45–50 nem oranı sağlanan kontrollü çevre koşulları sağlanmıştır.

Metformin önkoşullaması, “metformin” grubundaki 10 sıçana, hepatic iskemiden önceki 7 gün boyunca, günlük 300 mg/kg metformin, orogastrik gavajla verilerek gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Anestezi ve Cerrahi İşlem Basamakları

Cerrahi işlemler, Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nin operasyon odasında, steril koşullarda gerçekleştirilmiştir. İntraperitoneal 60 mg/kg ketamin ve 7 mg/kg ksilazin ile genel anestezi sağlanmış, deneklere işlem öncesi 500 IU intraperitoneal heparin uygulanmıştır.

Cerrahi alanın, tüy temizliği sonrası povidon iyot ile dezenfeksiyonu ve steril örtünmeyi takiben sağ subkostal kesi ile karın boşluğuna girilmiş, portal triad izole edilerek hepatik hilus düzeyinde Scanlan Vasco-Stat™ *bulldog* pens ile geçici olarak

klemplenmiştir. İnsizyon, tek kat ve tek tek seyrek dikişlerle kapatılmış, denekler iskemi süresi boyunca ısıtıcı altında tutulmuştur.

İskemi süresi sonunda batin yeniden açılarak klempten alınmış, hepatic reperfüzyon sağlanmış, insizyon tam kat sürekli olarak tekrar suture edilmiştir. Altışar saatlik reperfüzyon süreleri sonunda denekler yeniden uyutulmuş, kardiyak ponksiyon ile 2'şer ml kan örneği alınmıştır. Ardından, karın bölgesi tekrar açılarak denekler total hepatektomi sonrası genel anestezi altında sakrifiye edilmiştir.

3.2.3. Örnek Toplama ve Saklama Yöntemi

Hepatektomi materyali her dilimde santral ve periferik doku içerecek şekilde, bistüri ile dilimlenerek, bir bölümü histopatolojik inceleme için %10'luk formaldehit solüsyonuna konmuş; kalan dokular sıvı azot içerisinde şoklanarak -80 °C'de analiz zamanına kadar saklanmıştır.

3.3. Veri Toplama ve Analiz Süreci Biyokimyasal Analizler:

3.3.1. Histopatolojik Değerlendirme

Karaciğer dokusunda uygulanan modelin oluşturduğu etkiler öncelikle histopatolojik yöntemlerle incelenmiştir. Bu analizler, Başkent Üniversitesi Ankara Hastanesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada elde edilen karaciğer dokuları, parafin bloklara gömülerek doku saklama ve kesit alma işlemleri yapılmıştır. Bloklardan 5–6 mikrometre kalınlığında alınan doku kesitleri, standart Hematoksilen-Eozin (H&E) boyama protokolü kullanılarak boyanmıştır.

Boyanan preparatlar ışık mikroskobu altında incelenmiş ve mikroskopik görüntüler dijital olarak kaydedilmiştir. Elde edilen görüntüler üzerinden doku hasarına ilişkin konjesyon, vakuolizasyon, nekroz ve nötrofil infiltrasyonu histopatolojik olarak değerlendirilmiş; sonuçlar **Suzuki skorlaması** esas alınarak, her parametre için, 0 – 4 arası semikantitatif sayısal değerler şeklinde ifade edilmiştir: 0: “izlenmedi”, 1: “minimum

düzeyde izlendi”, 2: “orta düzeyde izlendi”, 3: “yüksek düzeyde izlendi”, 4: “şiddetli düzeyde izlendi” [58].

3.3.2. Biyokimyasal analizler

Deneklerden alınmış karaciğer örneklerinde; HİRİ varlığı ve şiddetinin tespiti amacıyla belirlenmiş parametreler:

- Enflamatuar yanıt için tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) ve nötrofil aktivitesi belirteci miyeloperoksidaz (MPO),
 - Lipid peroksidasyonu için malondialdehit (MDA),
 - Antioksidan kapasite için glutatyon (GSH),
 - Enerji düzeyi için adenosin trifosfat (ATP),
 - Oksidatif yük içinse reaktif oksijen türleri (ROS) ve total oksidan statüsü (TOS).
- Bu biyokimyasal düzeyler, **enzime bağlı immünosorbent analiz (ELISA)** yöntemi kullanılarak kantitatif olarak belirlenmiştir.

Serum örneklerinde ise karaciğer hasarı belirteci olan hepatositlere özgü enzimler aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) düzeyleri çalışılmıştır.

Her örnek için biyokimyasal analizler üç teknik tekrarlar (triplikat) gerçekleştirilmiştir. Ölçümler ortalama $\pm$ standart sapma ve median (min – maks) olarak değerlendirilmiştir.

Analizlerin tümü aynı günde, aynı cihaz ve kit lot numaralarıyla yürütülmüş; her ölçüm öncesinde cihaz kalibrasyonu yapılmıştır.

3.3.3. Örnek Hazırlama Prosedürü

Eksi 80 santigrad derecede muhafaza edilmiş karaciğer dokuları, steril bir bistüri kullanılarak küçük parçalara ayrılmış, ölçüm için her bir denekten 100 mg doku tartılmıştır.

İnce parçalar hâlindeki dokuların bulunduğu 1.5 ml'lik Eppendorf tüplerine 1 ml soğutulmuş fosfat tamponlu salin (PBS) eklenmiş ve tüpler homojenize edilmeden doğrudan 4 °C'de, 8000 rpm hızında, 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.

Santrifüjü takiben süpernatant yeni bir tüpe aktarılmış, ELISA analizlerinde kullanılmıştır.

Serum bazlı enzim analizleri (AST ve ALT) için, 2 ml kan örneği kullanılmıştır. Alınan tam kan, 1500 rpm, 10 dakika santrifüj edilerek serum kısmı ayrılmış ve analizleri yapılmıştır.

Karaciğer süpernatantlarında protein düzeylerinin normalizasyonu için Bradford protein tayin yöntemi kullanılmıştır (ABT Bradford Assay, Kat. No: W04-01-50; ABT Laboratory Industry, Ankara, Türkiye):

- Kitteki bovin serum albümin (BSA) standart stok çözeltisi, saf moleküler su ile 0–2 µg/µl aralığında seyreltilerek çeşitli konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanmıştır.
- Hazırlanan her bir standarttan 5 µl, mikrolaka kuyucuklarına eklenmiş ve üzerine 200 µl Bradford reaktifi ilave edilerek, oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonrası, optik yoğunluk değerleri 595 nm dalga boyunda bir mikrolaka okuyucu (MB-580 Full-Automatic Micro-Plate Reader; Nanbei, Çin) ile ölçülmüştür.
- Standartlara ait absorpsiyon ve konsantrasyon verileri doğrultusunda oluşturulan kalibrasyon eğrisine ait regresyon formülü ve belirleme katsayısı hesaplanmıştır.
- Elde edilen matematiksel model kullanılarak, denek örneklerinin protein konsantrasyonları hesaplanmıştır.

3.3.4. TNF- α Düzeylerinin Ölçümü

Tüm deneklerden elde edilmiş karaciğer doku örneklerinde TNF- α düzeyleri, üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda sıçanlara özgü TNF- α ELISA kiti (Katalog No:

E0764Ra; Bioassay Technology Laboratory, BT Lab, Güney Kore) kullanılarak ölçülmüştür.

Kitte mevcut 1280 ng/L derişimli stok standart çözeltiden seri dilüsyonlarla 640, 320, 160, 80 ve 40 ng/L derişimli standart çözeltiler hazırlanmış; bu çözeltilerden, her bir kuyucuğa 50 µl, doku örneklerinden ise her kuyucuğa 40 µl olacak şekilde aktarılmıştır. Örnek kuyucuklarına 10 µl sıçan TNF-α antikoru ilave edilmiştir; standart kuyucuklara ise (kit bileşenleri içerisinde antikor hazır olarak bulunduğu) bu adım uygulanmamıştır.

Takiben tüm kuyucuklara 50 µl streptavidin-HRP konjugat çözeltisi eklenmiş ve içerik iyice karıştırıldıktan sonra plaka üzeri izole edici film ile kapatılmıştır. Reaksiyon, 37 °C sıcaklıkta 60 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresi sonunda sıvılar aspire edilerek uzaklaştırılmış, ardından her kuyucuk 300 µl yıkama tamponu ile toplam beş kez yıkanmıştır.

Yıkama adımları sonrası her kuyucuğa 50'şer µl Substrat A ve Substrat B solüsyonları eklenmiştir. Plaka ışıksız ortamda 37 °C'de 10 dakika daha inkübe edilmiştir. Son adımda, reaksiyonu durdurmak amacıyla her kuyucuğa 50 µl durdurucu solüsyon (*stop solution*) eklenmiş ve 10 dakika içerisinde mikropilaka okuyucu aracılığıyla 450 nm dalga boyunda optik dansite (OD) değerleri ölçülmüştür.

Standart çözeltilerden elde edilen OD değerleri ve bilinen konsantrasyonlar temel alınarak regresyon analizi yapılmış, doğrusal olmayan eğri uydurma yöntemi ile standart eğri ve buna ait matematiksel denklem oluşturulmuştur. Bu eğri yardımıyla, bilinmeyen örneklerin TNF-α konsantrasyonları hesaplanmıştır.

3.3.5. ATP Düzeylerinin Ölçümü

Deney gruplarından elde edilen örneklerdeki ATP konsantrasyonları, üretici firmanın protokolü doğrultusunda sıçanlara özgü ELISA kiti (Katalog No: E0920Ra; Bioassay Technology Laboratory, BT Lab, Güney Kore) kullanılarak belirlenmiştir.

Kitin içerdiği 1600 ng/ml derişimli stok standart çözeltiden 800, 400, 200, 100 ve 50 ng/ml derişimli standart çözeltiiler hazırlanmış, bu çözeltiilerden her bir kuyucuğa 50 µl, örneklerden ise 40 µl, kullanıma hazır ELISA plakasına aktarılmıştır. Örnek kuyucuklarına ayrıca 10 µl anti-ATP antikoru eklenmiştir.

Tüm kuyucuklara 50 µl streptavidin-HRP konjugat çözeltisi eklendikten sonra, plaka 37 °C sıcaklıkta 60 dakika süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından, kuyucuklar 300 µl yıkama solüsyonu ile toplam beş kez yıkanmıştır.

Yıkama işlemi sonrası her kuyucuğa 50 µl Substrat A ve 50 µl Substrat B çözeltiileri ilave edilmiş ve plaka 37 °C'de karanlıkta 10 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyonu durdurmak amacıyla her kuyucuğa 50 µl durdurucu solüsyon (stop solution) eklenmiştir. İşlemi takiben, absorbans değerleri 450 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucu ile ölçülmüştür.

Elde edilen standartlara ait optik dansite (OD) değerleri ve karşılık geldikleri ATP konsantrasyonları kullanılarak bir regresyon eğrisi oluşturulmuş, bu eğriye ait belirleme katsayısı ve matematiksel denklem saptanmıştır. Bu denklem aracılığıyla bilinmeyen örneklerdeki ATP düzeyleri kantitatif olarak hesaplanmıştır.

3.3.6. ROS Düzeylerinin Ölçümü

Doku örneklerinde reaktif oksijen türleri (ROS) düzeyleri, üretici firmasının protokolüne uygun olarak sıçan ROS ELISA kiti (Katalog No: E0304Ra; Bioassay Technology Laboratory, BT Lab, Güney Kore) kullanılarak belirlenmiştir.

Analiz için, kit içerisinde sağlanan 1600 U/ml konsantrasyonundaki standart stok solüsyondan seri dilüsyonlar yapılmak suretiyle 800, 400, 200, 100 ve 50 U/ml seviyelerinde ara standartlar hazırlanmıştır. Hazırlanan bu standartlardan her bir kuyucuğa 50 µl; test örneklerinden ise 40 µl olacak şekilde, kullanıma hazır ELISA plakalarına aktarım gerçekleştirilmiştir. Örnek kuyucuklarına ilave olarak 10 µl anti-ROS antikoru eklenmiştir.

Tüm kuyucuklara 50 µl streptavidin-HRP çözeltisi ilave edilmiş ve plakalar 37 °C'de 60 dakika süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında her kuyucuk 300 µl yıkama solüsyonu ile toplam beş kez yıkanmıştır.

Yıkama işleminin ardından tüm kuyucuklara 50'şer µl Substrat A ve Substrat B çözeltileri eklenmiş ve karanlık ortamda 37 °C'de 10 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Reaksiyonu sonlandırmak amacıyla her kuyucuğa 50 µl durdurucu solüsyon (stop solution) eklenmiş ve ardından absorbans değerleri 450 nm dalga boyunda mikroparka okuyucu ile ölçülmüştür.

Elde edilen standart OD değerleri ile bunlara karşılık gelen konsantrasyonlar kullanılarak doğrusal olmayan eğri uydurma işlemi gerçekleştirilmiş; bu analiz sonucunda belirleme katsayısı ve matematiksel denklem elde edilmiştir. Bu denklem aracılığıyla test örneklerine ait ROS düzeyleri hesaplanmıştır.

3.3.7. TOS Düzeylerinin Ölçümü

Karaciğer doku örneklerindeki total oksidan statüsü (TOS) seviyeleri, üretici firmasının yönergeleri doğrultusunda sıçan TOS ELISA kiti (Katalog No: E1512Ra; Bioassay Technology Laboratory, BT Lab, Güney Kore) kullanılarak kantitatif olarak belirlenmiştir.

Analiz sürecinde, 64 U/ml konsantrasyonundaki stok standart solüsyondan seri dilüsyonlar yapılarak sırasıyla 32, 16, 8, 4 ve 2 U/ml düzeylerinde ara standart çözelti hazırlanmıştır. Bu standartlardan 50 µl'lik hacimlerle, örneklerden ise 40 µl olacak şekilde kullanıma hazır ELISA plakalarının kuyucuklarına aktarım gerçekleştirilmiştir. Örnek kuyucuklarına ayrıca 10 µl anti-TOS antikoru eklenmiştir. Tüm kuyucuklara 50 µl streptavidin-HRP konjugatı ilave edilerek plakalar 37 °C'de 60 dakika süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresi sonunda, her kuyucuk 300 µl yıkama solüsyonu ile beş kez yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrası, tüm kuyucuklara 50'şer µl Substrat A ve Substrat B çözeltileri eklenmiş ve 37 °C'de karanlık ortamda 10 dakika daha inkübe edilmiştir.

Reaksiyonun durdurulması amacıyla her kuyucuğa 50 µl durdurucu solüsyon (stop solution) eklenmiş ve ardından 450 nm dalga boyunda optik dansite (OD) değerleri mikropłaka okuyucu ile ölçölmüştür.

Elde edilen standartlara ait OD değeri ve karşılık gelen konsantrasyonlar doğrultusunda eğri uydurma algoritması kullanılarak regresyon denklemi ve belirleme katsayısı elde edilmiştir. Bu eğri yardımıyla, test edilen örneklerin TOS düzeyleri güvenilir şekilde hesaplanmıştır.

3.3.8. MPO Düzeylerinin Ölçümü

Karaciğer doku örneklerinde miyeloperoksidaz (MPO) düzeyleri, üretici talimatlarına uygun olarak sıçan MPO ELISA kiti (Katalog No: E0574Ra; Bioassay Technology Laboratory, BT Lab, Güney Kore) kullanılarak kantitatif olarak belirlenmiştir.

Analiz sırasında, kitin sağladığı 128 ng/ml konsantrasyonundaki stok standart çözeltiden seri dilüsyonlar yapılarak 64, 32, 16, 8 ve 4 ng/ml konsantrasyonlarında ara standartlar hazırlanmıştır. Hazırlanan standart çözeltilerden her bir kuyucuğa 50 µl, örneklerden ise 40 µl aktarılmıştır. Örnek kuyucuklarına ilave olarak 10 µl anti-MPO antikoru eklenmiştir.

Tüm kuyucuklara ardından 50 µl streptavidin-HRP çözeltisi ilave edilmiş ve plaka 37 °C'de 60 dakika süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından, her kuyucuk 300 µl yıkama tamponu ile beş kez yıkanmıştır.

Yıkama işlemini takiben, her kuyucuğa 50 µl Substrat A ve 50 µl Substrat B çözeltileri eklenmiştir. Renk oluşumu sonrasında reaksiyon, 50 µl durdurucu solüsyon (stop solution) eklenerek sonlandırılmıştır. Optik dansite (OD) değeri 450 nm dalga boyunda mikropłaka okuyucu ile ölçölmüştür.

Standartlara ait OD ölçümleri ve karşılık gelen konsantrasyonlar doğrultusunda oluşturulan standart eğri ile eğriye ait regresyon denklemi ve belirleme katsayısı

hesaplanmıştır. Bu eğri yardımıyla, örneklerin MPO düzeyleri güvenilir biçimde tayin edilmiştir.

3.3.9. GSH Düzeylerinin Ölçümü

Glutasyon (GSH) düzeyleri, kompetitif bağlanma esasına dayanan sıçan GSH ELISA kiti (Katalog No: ELK8577; ELK Biotechnology, Çin) kullanılarak, üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde belirlenmiştir.

Analiz kapsamında, 100 ng/ml konsantrasyonundaki stok standart çözeltiden seri dilüsyon yöntemiyle 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 ve 1.57 ng/ml düzeylerinde ara standart çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan standartlar ile doku örneklerinden her birinden 50 µl, ELISA plakasının ilgili kuyucuklarına eklenmiştir. Tüm kuyucuklara ardından 50 µl biyotin konjugat solüsyonu ilave edilmiştir. Plaka, 37 °C’de 60 dakika süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyonun ardından kuyucuklar, 200 µl yıkama solüsyonu kullanılarak üç kez yıkanmıştır. Takiben, her kuyucuğa 100 µl streptavidin-HRP çözeltisi eklenmiş ve plaka tekrar 37 °C’de 60 dakika inkübe edilmiştir. Bu aşamadan sonra kuyucuklar beş kez 200 µl yıkama tamponu ile yıkanmıştır.

Yıkama sonrası, her kuyucuğa 90 µl TMB (tetrametilbenzidin) substrat çözeltisi eklenmiş ve plakalar 37 °C’de 20 dakika boyunca karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Reaksiyon, her kuyucuğa 50 µl durdurucu solüsyon (stop solution) ilave edilerek sonlandırılmıştır. Son aşamada absorbans değerleri, 450 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucu ile ölçülmüştür.

Elde edilen standartlara ait OD değerleri ve bu değerlere karşılık gelen konsantrasyonlar doğrultusunda regresyon analizi gerçekleştirilmiş; bu işlem sonucunda belirleme katsayısı ve matematiksel denklem elde edilmiştir. Bu standart eğri yardımıyla, örneklerdeki GSH düzeyleri hesaplanmıştır.

3.3.10. MDA Düzeylerinin Ölçümü

Malondialdehit (MDA) düzeylerinin tayini, rekabetçi bağlanma esasına dayalı sıçan MDA ELISA kiti (Katalog No: ELK8612; ELK Biotechnology, Çin) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçümler, üretici firmanın sağladığı protokol doğrultusunda yapılmıştır.

Bu kapsamda, 1000 pg/ml konsantrasyonundaki stok standart çözeltiden seri dilüsyonlar gerçekleştirilmiş ve sırasıyla 500, 250, 125, 62.5, 31.25 ve 15.63 pg/ml düzeylerinde standart çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan bu standartlardan ve test örneklerinden 50 µl'lik hacimler, kullanıma hazır ELISA plakalarının kuyucuklarına aktarılmıştır. Tüm kuyucuklara ardından 50 µl biyotin konjugat solüsyonu eklenmiş ve plakalar 37 °C'de 60 dakika süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklar, 200 µl yıkama solüsyonu ile üç kez yıkanmıştır. Sonrasında her kuyucuğa 100 µl streptavidin-HRP çözeltisi eklenmiş ve plakalar tekrar 37 °C'de 60 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Bu aşamadan sonra kuyucuklar beş kez daha 200 µl yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır.

Ardından, her kuyucuğa 90 µl TMB (tetrametilbenzidin) substrat çözeltisi ilave edilmiş ve plakalar karanlık koşullarda 37 °C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyon, 50 µl durdurucu solüsyon (stop solution) eklenerek sonlandırılmış ve ardından optik dansite (OD) değerleri 450 nm dalga boyunda mikroparka okuyucu ile ölçülmüştür.

Standartlara ait OD değerleri ve karşılık gelen MDA konsantrasyonları doğrultusunda regresyon analizi uygulanmış; bu işlem sonucunda eğriye ait matematiksel denklem ve belirleme katsayısı elde edilmiştir. Elde edilen bu eğri aracılığıyla, test örneklerinin MDA düzeyleri hesaplanmıştır.

3.3.11. AST ve ALT Düzeylerinin Ölçümü

Serum örneklerinde aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) düzeyleri, kardiyak ponksiyon alınan 2 ml kan örneğinin santrifügasyonu ile elde edilen serum örneklerinde ölçülmüştür.

Analizler, Roche Diagnostics firmasına ait **Cobas C701** tam otomatik biyokimya analiz cihazı (Roche Diagnostics, İsviçre) kullanılarak yapılmıştır. Bu sistemde, insan serumunda AST ve ALT ölçümü için geliştirilmiş, klinik tanı amaçlı kullanılabilen ticari kitler (AST için Katalog No: 05850819188; ALT için Katalog No: 05850797188) kullanılmıştır.

Uygulama sonucunda elde edilen sayısal veriler, serumda bulunan AST ve ALT enzim konsantrasyonlarını yansıtmaktadır.

3.3.12. Protein Düzeylerinin Western Blot ile Analizi

İskemi-reperfüzyon hasarı (IRH) ve metformin ön koşullamasının mitokondriyal dinamik belirteci proteinlerine etkisi, **Western blot** yöntemiyle protein düzeylerinin tespiti yoluyla değerlendirilmiştir. Analiz 3 biyolojik, 3 teknik tekrar yapılarak gerçekleştirilmiştir. Yöntem aşağıdaki adımlarla gerçekleştirilmiştir:

3.3.13. Protein Örneklerinin Denatürasyonu

- Protein miktarları Bradford yöntemiyle belirlendikten sonra, her örneğe uygun hacimde **5X Pagesta Reducing SDS-Page tamponu** (Kat. No: 751-001; GeneAll Biotechnology Co., Çin) ilave edilmiştir.
- Toplam hacim 20 µl'ye tamamlanacak şekilde distile su eklenmiştir.
- Elde edilen karışım 95 °C'de 10 dakika inkübe edilmiş, ardından buz üzerine alınarak soğutulmuştur.

3.3.14. Örneklerin Jel Üzerinde Ayrılması (SDS-PAGE)

- Dikey elektroforez tankı içerisine yerleştirilen **%4–12 gradiyent bis-tris jel** (Kat. No: NP0321; Invitrogen, ABD) üzerindeki jel tırağı dikkatlice çıkarılarak kuyucuklar açılmıştır.
- **20X MOPS yürütme tamponu** (Kat. No: NP0050; Invitrogen, ABD), 50 ml ölçülerek 950 ml distile su ile seyreltilmiş ve **1X MOPS tamponu** hazırlanmıştır.
- Elektroforez tankının iç kısmına ve dış kısmına toplam 600 ml 1X MOPS tamponu doldurulmuştur.
- Örnekler yüklenmeden önce kuyucuklar temiz uçlu pipet yardımıyla nazikçe temizlenmiştir.
- Marker olarak ilk ve son kuyucuklara 5 µl protein merdiveni (marker) eklenmiştir. Diğer kuyucuklara 20 µl denatüre edilmiş protein örneği dikkatlice yüklenmiştir.
- Dikey elektroforez cihazı, güç kaynağına bağlanmış; ilk olarak 80 V'de 10 dakika boyunca örneklerin kuyucuklardan çıkışı sağlanmıştır.
- Ardından, 220 V ve 150 mA'de 50 dakika boyunca elektroforez işlemi tamamlanmıştır.

3.3.15. Protein Transferi (Blotlama)

- SDS-PAGE işlemi tamamlandıktan sonra elektroforez sistemine ait güç kabloları çıkartılarak cihazın kapağı açılmış, jel kaseti dikkatlice sistemden ayrılmıştır. Jel kaseti, özel jel bıçağı yardımıyla kenarlarından kesilerek açılmış ve jelin üst (tarak) kısmı ile alt kısmındaki kalın tabaka uzaklaştırılmıştır. Jel, zarar görmemesi için distile su içeren bir kaba alınmıştır.
- Proteinlerin membrana transferi, **iBlot2 jel transfer sistemi** (Invitrogen, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu işlemde, iBlot 2 Nitrocellulose Transfer Stack kiti içeriğindeki membran ve transfer aparatları kullanılmıştır. Transfer aparatı plastik destekle birlikte iBlot cihazına yerleştirilmiş ve iki aparat arasındaki beyaz ayırıcı parça çıkarılmıştır. Jel, membran üzerine dikkatlice yerleştirilmiş; kit içerisindeki filtre kâğıdı distile su ile ıslatıldıktan sonra jelin üzerine serilmiştir. Hava kabarcıkları uzaklaştırılmış ve transfer süngeri, cihaz kapağındaki elektrotla hizalanacak şekilde yerleştirilmiştir. Cihazın kapağı

dikkatlice kapatılmış, **P3 transfer programı** seçilerek **7 dakikalık** transfer işlemi başlatılmıştır.

- Transferin başarıyla gerçekleştiği, özellikle marker bantlarının membrana net şekilde geçtiği doğrulandıktan sonra membran distile suya aktarılmıştır.

3.3.16. Membranın Bloklanması

- Transfer edilen **nitroselüloz membran**, protein dışı bağlanmaları önlemek amacıyla %5 BSA (bovin serum albümini) içeren **Western Blot Blocking Buffer** (PBST bazlı; ABT Laboratory Industry, Ankara, Türkiye) içerisine alınmıştır. Membran, oda sıcaklığında çalkalayıcı sistemde **1 saat süreyle inkübe edilmiştir.**

3.3.17. Primer Antikor Uygulaması

- Primer antikorlar, **Tablo 3.1**'de belirtilen bilgiler doğrultusunda hazırlanmış ve %5 BSA + PBST içeren blocking buffer kullanılarak seyreltilmiştir. Elde edilen primer antikor çözeltileri, bir sonraki adım olan membran inkübasyonu için kullanılmıştır. Bloklama işlemi tamamlanan membranlar, üzerindeki bloklama çözeltilisi uzaklaştırıldıktan sonra, her biri **10 ml** olacak şekilde seyreltilmiş **primer antikor solüsyonları** içerisine yerleştirilmiştir. Membranlar, bu koşullarda **+4 °C'de gece boyunca** inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün, soğuk ortamdan çıkarılan membranlar, oda sıcaklığında **hafif çalkalama eşliğinde 2 saat** daha inkübe edilerek bağlanmanın güçlendirilmesi sağlanmıştır.

3.3.18. Yıkama İşlemi

- Primer antikor inkübasyonu sonrasında antikor çözeltilisi uzaklaştırılmış ve membranlar, **10X PBST pH 7.6** (Kat. No: B25-01-05; ABT Laboratory Industry, Ankara, Türkiye) içinde **üç kez, her biri 5 dakika sürecek şekilde** nazikçe çalkalanarak yıkanmıştır.

3.3.19. Sekonder Antikor İnkübasyonu ve Yıkama

- Sekonder antikorlar, üretici talimatlarına göre uygun dilüsyonda hazırlanmıştır. Membranlar, primer antikor sonrası yıkamadan geçirilmiş ve ardından **oda sıcaklığında 1 saat süreyle, 10 ml sekonder antikor çözeltisi** içinde inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon tamamlandıktan sonra, membranlar yeniden **10X PBST pH 7.6** çözeltisi ile **üç kez, 5'er dakikalık sürelerle** yıkanarak fazla sekonder antikor uzaklaştırılmıştır.

Tablo 3.1. Kullanılan antikor bilgileri ile dilüsyon miktarları.

Marka	Katalog No	Antikor İsmi	Moleküler Ağırlık	Dilüsyon Oranı
Affinity Biotech, Inc., ABD	AF7018	Beta Aktin	47 kDa	1:3000
Affinity Biotech, Inc., ABD	DF7543	MFN1	84 kDa	1:500
Affinity Biotech, Inc., ABD	AF1009	HIF1A	120 kDa	1:500
Affinity Biotech, Inc., ABD	DF8106	MFN2	86 kDa	1:500
Affinity Biotech, Inc., ABD	DF12005	FIS1	17 kDa	1:500
Affinity Biotech, Inc., ABD	DF7037	DRP1	79 kDa	1:500
Thermo Fisher., ABD	PA579771	OPA1	80 kDa	1:1000
Affinity Biotech, Inc., ABD	S0001	Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) HRP		1:3000

3.3.20. Görüntüleme ve Veri Analizi

- Yıkama adımlarının ardından, membranlar **2 ml ECL substrat solüsyonu** (ECL Western Blotting Substrate, SUN; Kat. No: W63-01-05; ABT Laboratory

Industry, Ankara, Türkiye) ile temas ettirilmiş ve **1 dakika süreyle** oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

- Fazla reaktif uzaklaştırıldıktan sonra, membranlar **G: Box Chemi XRQ görüntüleme sistemi** (Syngene, Hindistan) içerisine yerleştirilmiş ve **kemilüminesan sinyaller** kaydedilmiştir.
- Elde edilen bant yoğunlukları, **ImageJ yazılımı** kullanılarak sayısallaştırılmış; her bir hedef proteinin sinyali, **beta-aktin iç kontrol proteini** referans alınarak **rölatif yoğunluk** biçiminde normalize edilmiştir.

3.3.21. Stripping ve Yeniden İnkübe İşlemi

- Western Blot analizlerinde, bir hedef proteine yönelik gerçekleştirilen primer antikor inkübasyonunun ardından, membranlar **A.B.T.™ Stripping Buffer for Western Blot** (Kat. No: W11-01-25; ABT Laboratory Industry, Ankara, Türkiye) ile işleme tabi tutulmuştur. Bu işlem sayesinde, membran yüzeyinde bağlanmış olan primer ve sekonder antikorlar etkili bir şekilde uzaklaştırılmıştır.
- Stripping işlemi sonrası, membranlar farklı bir hedef proteine özgü primer antikor ile yeniden inkübe edilmiştir. Bu protein için tüm Western Blot adımları (bloklama, primer/sekonder antikor inkübasyonu, yıkama, ECL ile görüntüleme) aynı şekilde tekrarlanmıştır. Tüm hedef proteinlerin analizi tamamlanıncaya kadar bu döngü, her bir antikor için sistematik biçimde uygulanmıştır.

3.3.22. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler, Statistical Package for Social Sciences (SPSS) sürüm 25.0 (IBM Corp., Armonk, NY, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Değişkenlerin dağılımının normalliği Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Tanımlayıcı istatistikler ortalama, standart sapma, medyan, minimum ve maksimum değerler olarak sunuldu. Normal dağılım gösteren değişkenlerde iki grup arasındaki karşılaştırmalar Student's t-testi ile, ikiden fazla grup arasındaki karşılaştırmalar ise Tek Yönlü ANOVA testi ile yapıldı. Normal dağılım göstermeyen değişkenlerde ise iki bağımsız grup arasındaki karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi ile, ikiden fazla grup arasındaki karşılaştırmalar ise Kruskal-Wallis testi ile

yaıldı. Gruplar arasındaki farklar Dunn'un Bonferroni testi ile belirlendi. Kategorik değişkenler frekans ve yüzde olarak sunuldu. Kategorik değişkenler arasındaki ilişkiler Ki-Kare ve *Fisher's Exact* testleri ile analiz edildi. p değeri 0.05'ten küçük olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

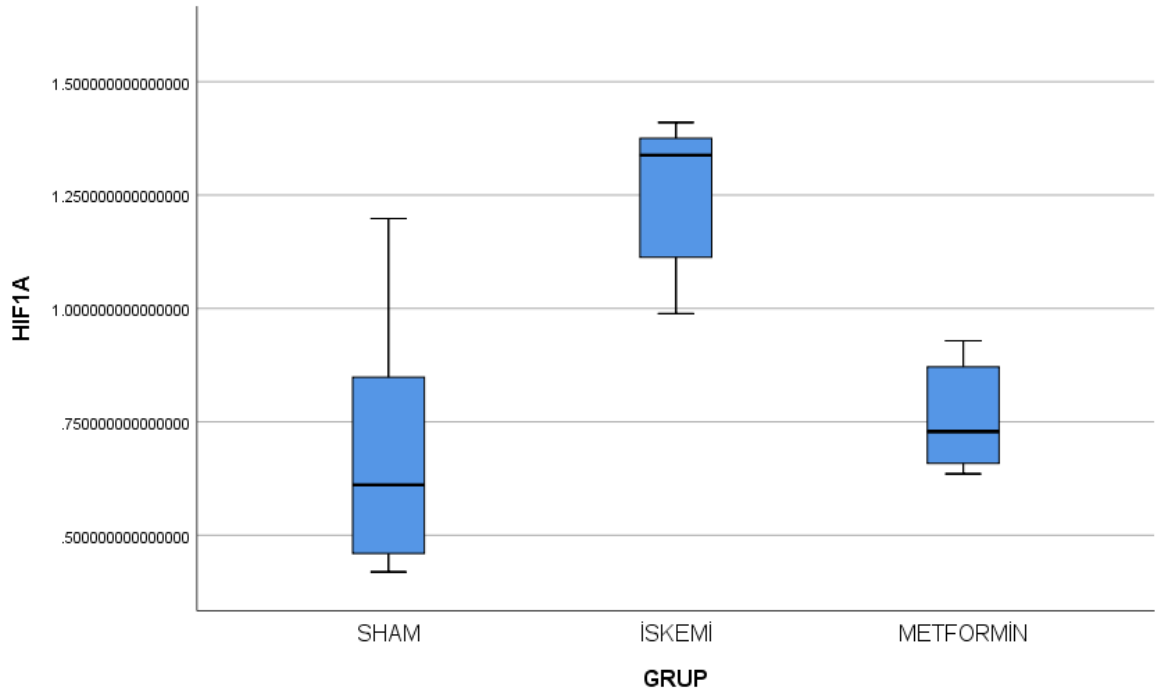
Tablo 4.1. Grupların HİRH parametrelerinin analiz sonuçları

(Kruskal–Wallis followed by Dunn’s test; $p<0.05$ significant.)

	GRUP															p
	SHAM					İSKEMİ					METFORMİN					
	Mean	Standard Deviation	Median	Minimum	Maximum	Mean	Standard Deviation	Median	Minimum	Maximum	Mean	Standard Deviation	Median	Minimum	Maximum	
MDA (pg/mL)	609.926	171.883	658.650	150.364	731.628	664.631	96.598	655.425	519.244	861.250	685.923	76.580	700.553	579.443	777.942	0,628
ATP (ng/mL)	162.178	75.999	139.283	73.871	326.250	96.177	28.090	85.378	69.893	141.789	115.868	43.235	107.428	74.731	214.402	0,037
MPO (ng/mL)	3.707	.145	3.674	3.519	3.958	4.878	2.666	3.951	3.690	12.400	4.031	.168	4.030	3.696	4.252	0,003
ROS (U/mL)	927.626	495.532	827.975	70.970	1,791.271	1,427.390	154.274	1,441.529	1,176.028	1,648.39	1,105.71	313.467	1,036.956	702.813	1,694.954	0,014
TOS (U/mL)	17.771	23.389	9.863	1.638	75.285	47.675	37.612	29.440	12.519	103.213	23.888	14.966	17.188	4.414	49.374	0,030
GSH (mg/L)	883.819	503.353	709.028	187.047	1,782.624	462.271	318.854	436.534	129.468	1,148.986	625.232	222.328	591.145	323.859	1,095.141	0,076
TNF-a (pg/mL)	235.482	144.700	191.392	67.412	462.947	431.165	108.177	428.348	245.364	601.894	428.311	400.908	292.918	82.829	1,465.621	0,021
HIF1A	.692	.264	.611	.419	1.198	1.248	.165	1.338	.989	1.410	.756	.110	.728	.635	.929	<0,001

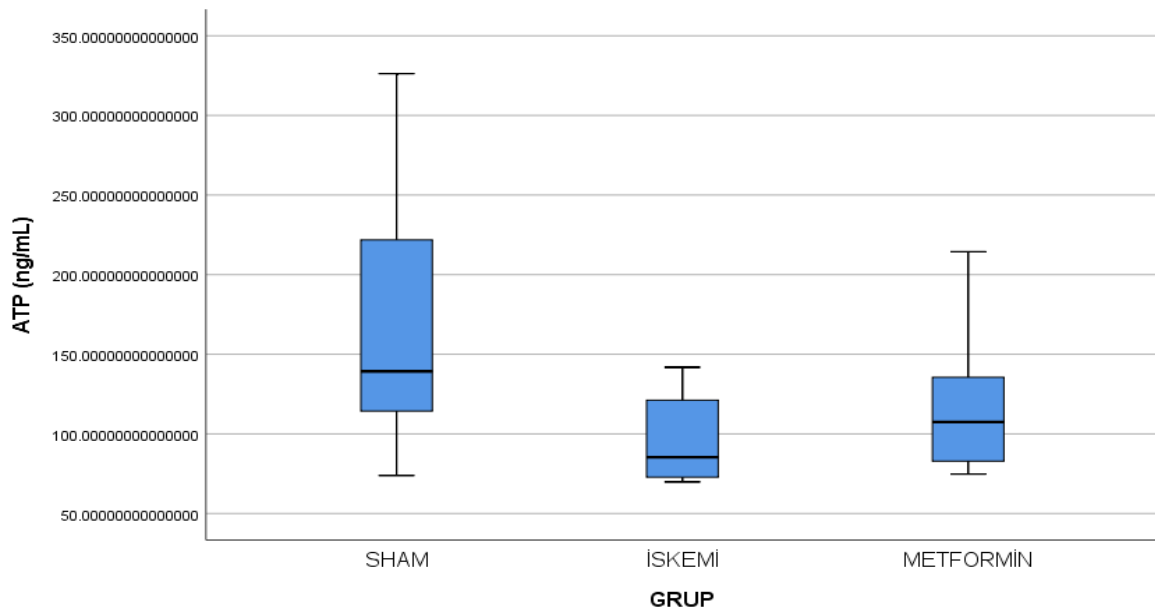
Grupların ikili mukayeselerini içeren post-hoc değerlendirme sonucunda (*One-way ANOVA, post-hoc Tukey test; $p<0.05$ considered significant*);

İskemi ve Metformin grupları hepatik HIF1 α rölatif ekspresyon düzeyleri (1,338 ve 0,728) sham grubununkinden (0,611) anlamlı olarak yüksek bulunmuş ($p=0,001$ ve 0.004), İskemi grubu değeri Metformin grubununkinden yüksek olsa da, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır

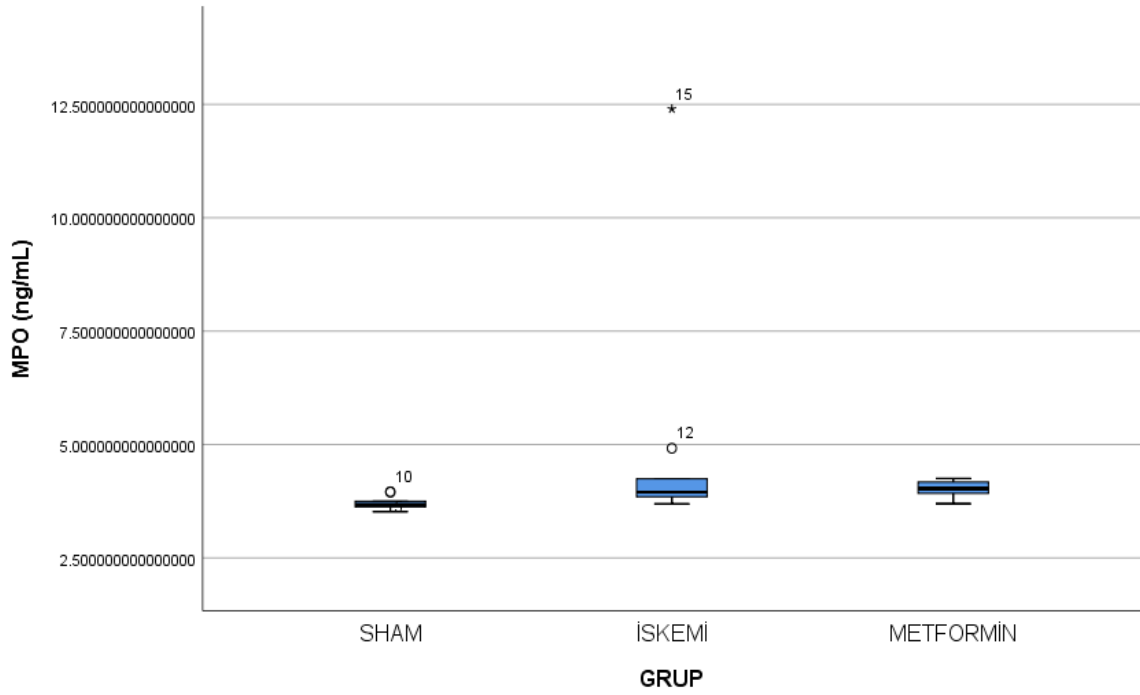


Şekil 4.1. Sham, İskemi ve Metformin gruplarına ait HIF1A seviyelerindeki değişimler

İskemi grubu median hepatik ATP düzeyi (85,378 mg/ml), sham grubu median (139,283 mg/ml) düzeyine göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ($p=0,031$). Metformin grubu ile iskemi ve Sham grupları arasında, ATP düzeyleri açısından anlamlı fark bulunmamıştır (Şekil 4.2).



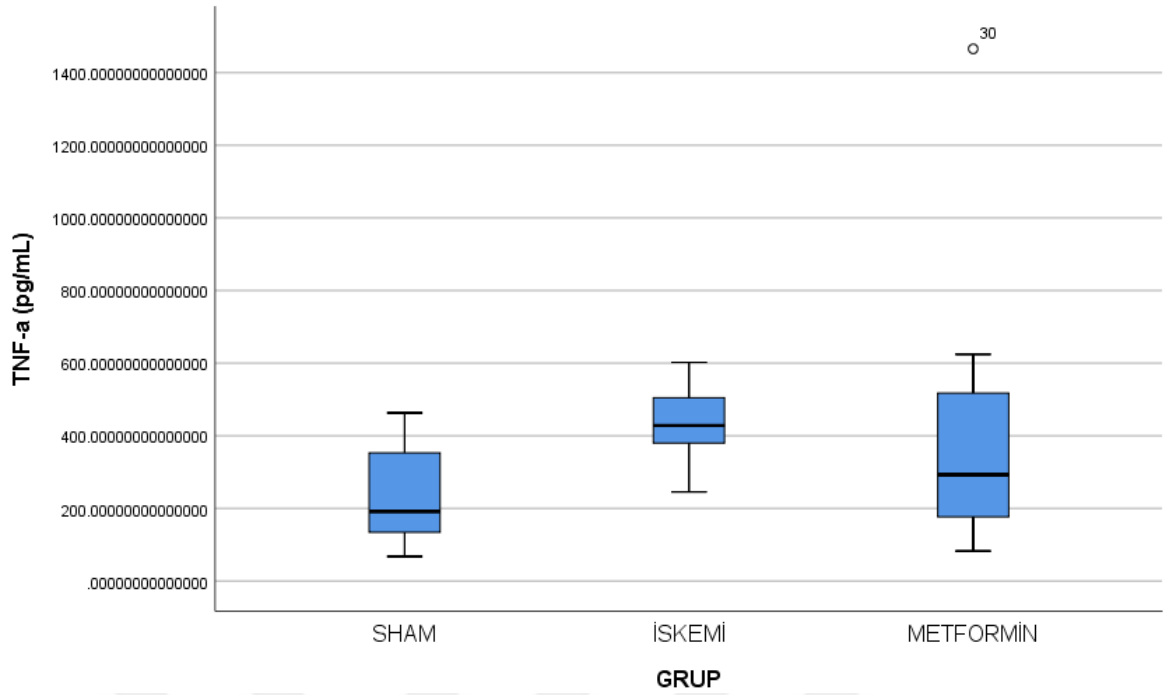
Şekil 4.2. Sham, İskemi ve Metformin gruplarına ait ATP seviyelerindeki değişimler



Şekil 4.3. Sham, İskemi ve Metformin gruplarına ait MPO seviyelerindeki değişimler

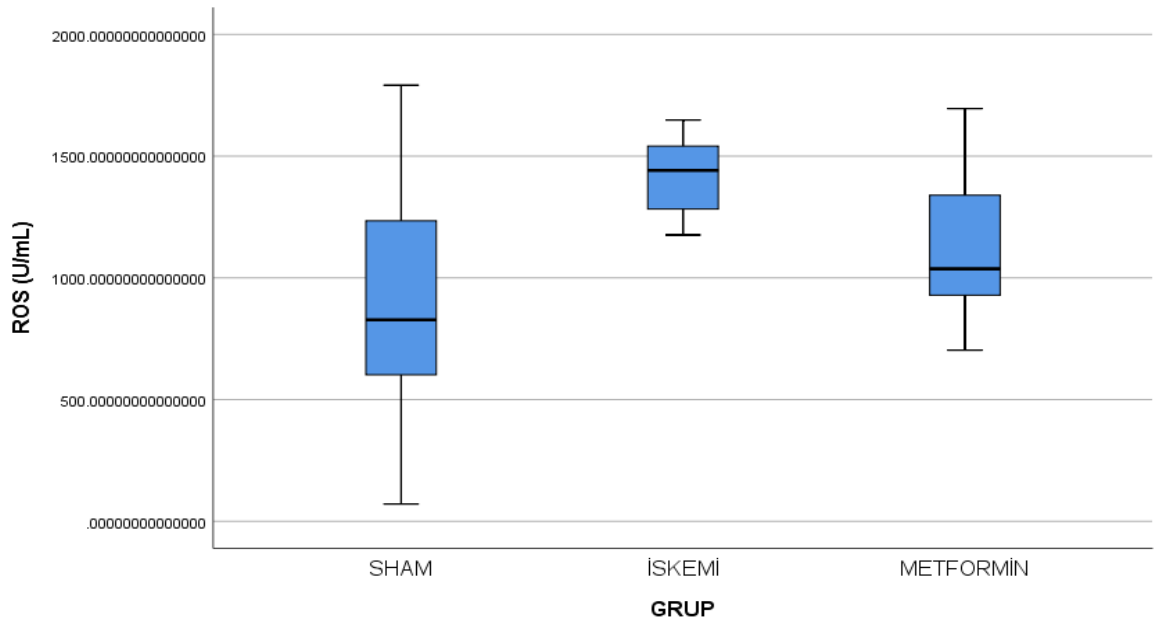
İskemi ve metformin grupları median hepatik MPO düzeyleri (3,95 ng/ml ve 4,03 ng/ml) sham grubununkinden anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0,016$ ve $0,005$). Bu parametre, İskemi ve Metformin grupları arasında, istatistiksel olarak anlamlı fark arz etmemiştir (Şekil 4.3).

Hepatik $TNF\alpha$ median düzeyleri; İskemi grubunda (428,348 pg/ml), Sham grubuna (191,392 pg/ml) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek saptanmıştır ($p=0,017$). Metformin grubu (292,918 pg/ml) diğer gruplarla anlamlı fark göstermemiştir (Şekil 4.4).



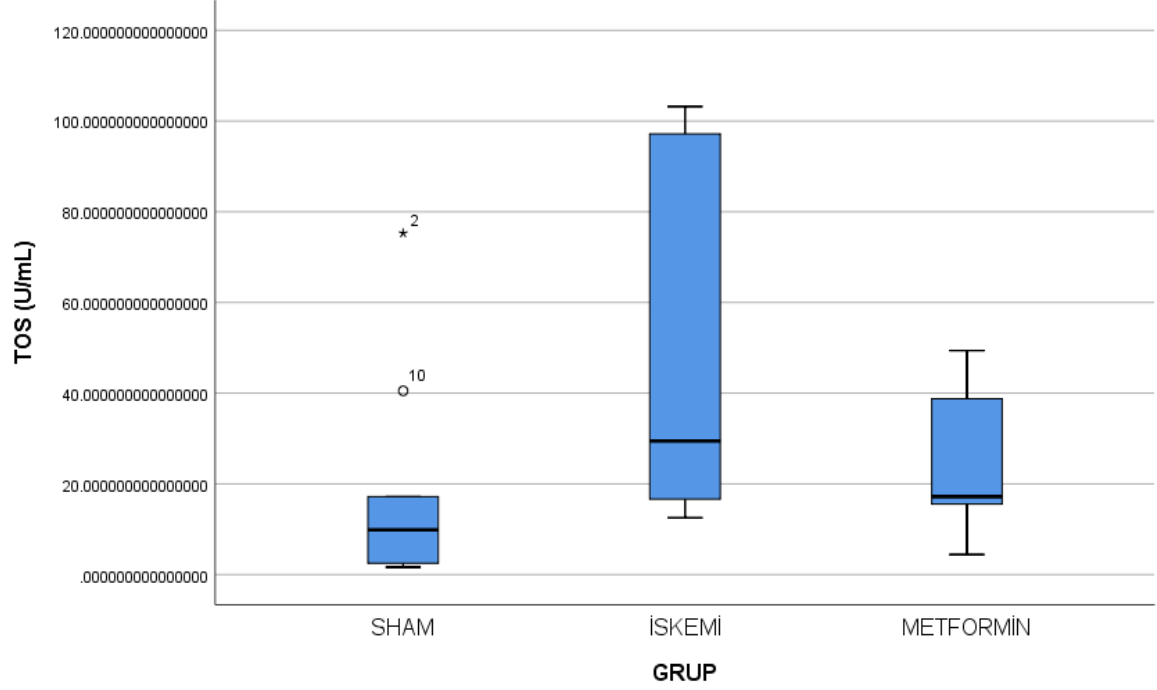
Şekil 4.4. Sham, İskemi ve Metformin gruplarına ait TNF-a seviyelerindeki değişimler

ROS değişkeninde, post-hoc karşılaştırma sonuçlarına göre; İskemi grubu medyan değeri (1441 U/ml), Sham grubu medyan değerine (827 U/ml) göre anlamlı olarak daha yüksek ölçülmüş ($p=0,017$); Metformin grubu (1036 U/ml), diğer gruplarla anlamlı fark arz etmemiştir (Şekil 4.5).



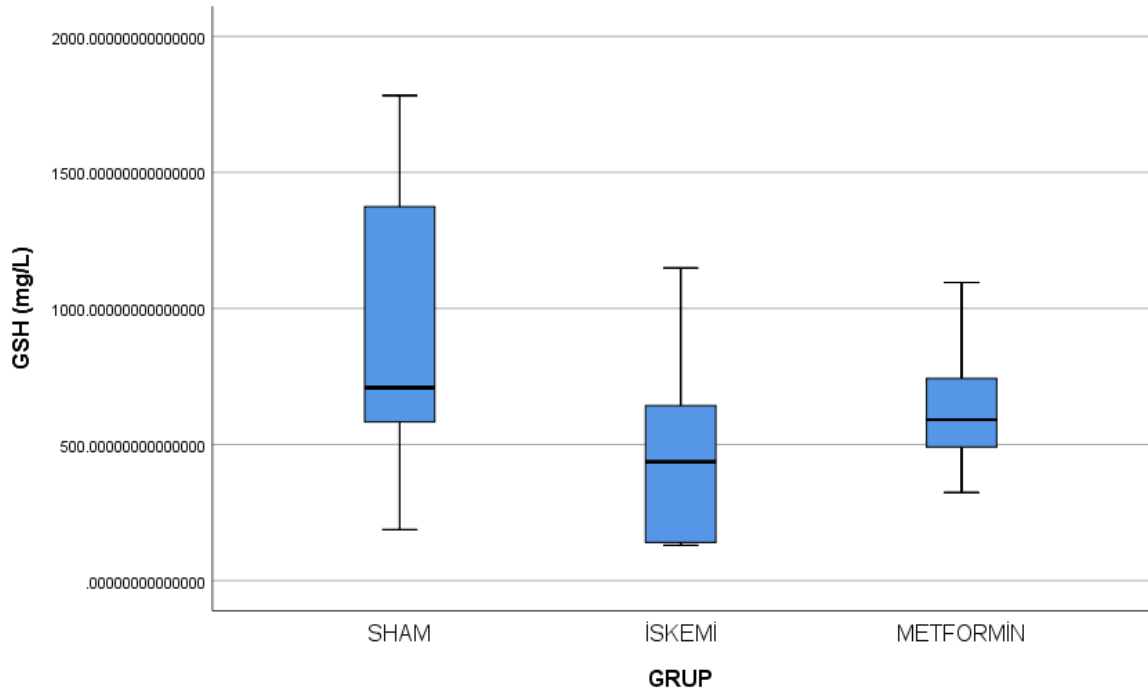
Şekil 4.5. Sham, İskemi ve Metformin gruplarına ait ROS seviyelerindeki değişimler

İskemi grubu TOS medyan değeri (29,44 U/ml) Sham grubu medyan değerine (9,86 U/ml) göre anlamlı olarak daha yüksektir ($p=0,025$). Metformin grubu (17,188 U/ml) TOS düzeyi, diğer iki grupta da anlamlı farklılık göstermemiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Sham, İskemi ve Metformin gruplarına ait TOS seviyelerindeki değişimler

Hepatik GSH düzeyleri karşılaştırıldığında, Sham grubunda en yüksek (709,028 mg/L), İskemi grubunda en düşük (436,534 mg/L) değerler ölçülmüş olmasına rağmen, gruplar arası anlamlı farklılık saptanmamıştır (Şekil 4.7).

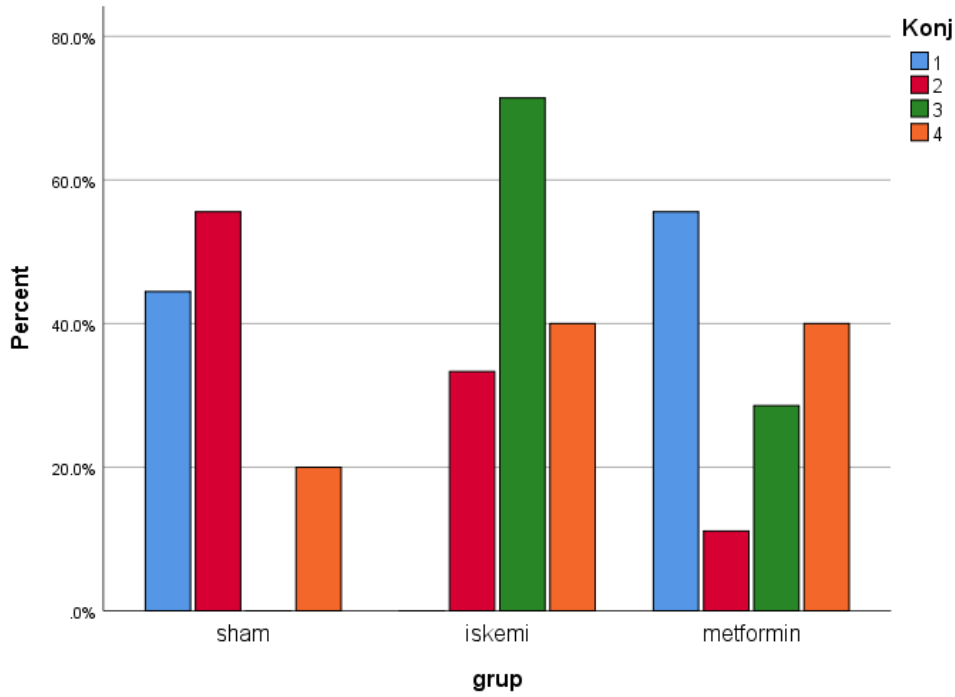


Şekil 4.7. Sham, İskemi ve Metformin gruplarına ait GSH seviyelerindeki değişimler

MDA değişkeni mukayesesi gruplar arası anlamlı fark arz etmemiştir.

Sham, iskemi ve metformin grupları karaciğer örnekleri, ışık mikroskopu altında, modifiye Suzuki skalası değişkenlerine göre karşılaştırılmıştır. Sadece konjesyon değişkeninde anlamlı farklılık elde edilmiştir ($p=0,037$). Farklılığın hangi Suzuki kategorisinde olduğunun belirlenmesi için yapılan post hoc karşılaştırmalara göre, “1” ve “3” konjesyon skorları frekanslarında anlamlı farklılık belirlenmiştir: İskemi grubunda konjesyon skoru 1 olan denek frekansı sıfır iken, sham grubunda %40 gözlenmiştir. Benzer şekilde konjesyon skoru “3” olan denekler de iskemi ve sham grubu arasında anlamlı farklılık göstermiştir. İskemi grubunda 5 (%50) denekte konjesyon skoru “3” gözlenmiş, sham grubunda konjesyon skoru “3” olan denek gözlenmemiştir (Şekil 4.8).

Grupların vakualizasyon, nekroz ve nötrofil infiltrasyonu frekansları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir.

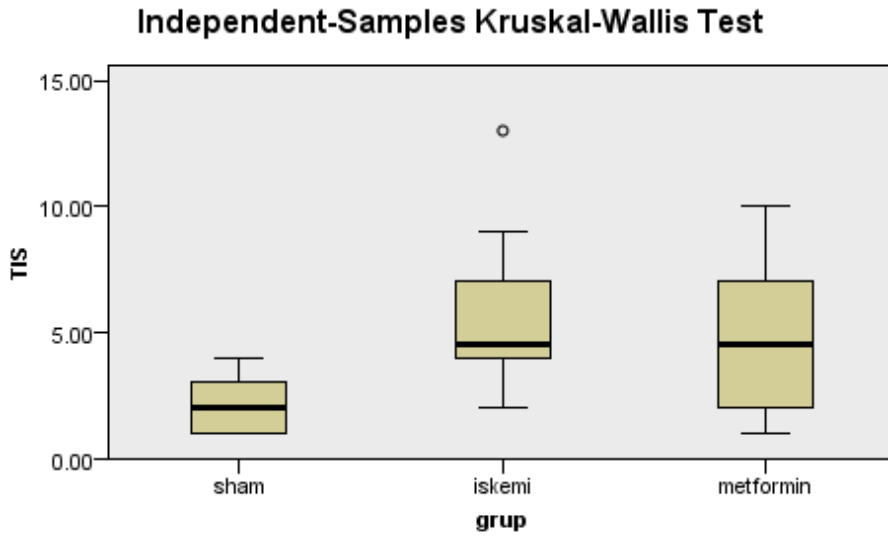


Şekil 4.8. Sham, İskemi ve Metformin gruplarına ait konjesyon frekansları

Hepatik konjesyon, vakuolizasyon ve nekroz parametrelerine, nötrofil infiltrasyonunun da eklenmesiyle oluşan modifiye Suzuki skorlarının, her denek için toplamını (Total İnflamatuvar Skor-TIS) içeren mukayesede; bu skor, İskemi ve Metformin gruplarında, aynı medyan değeri ile (4,5), sham grubununkine (2) göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p=0,009$) (Tablo 4.2 ve Şekil 4.9).

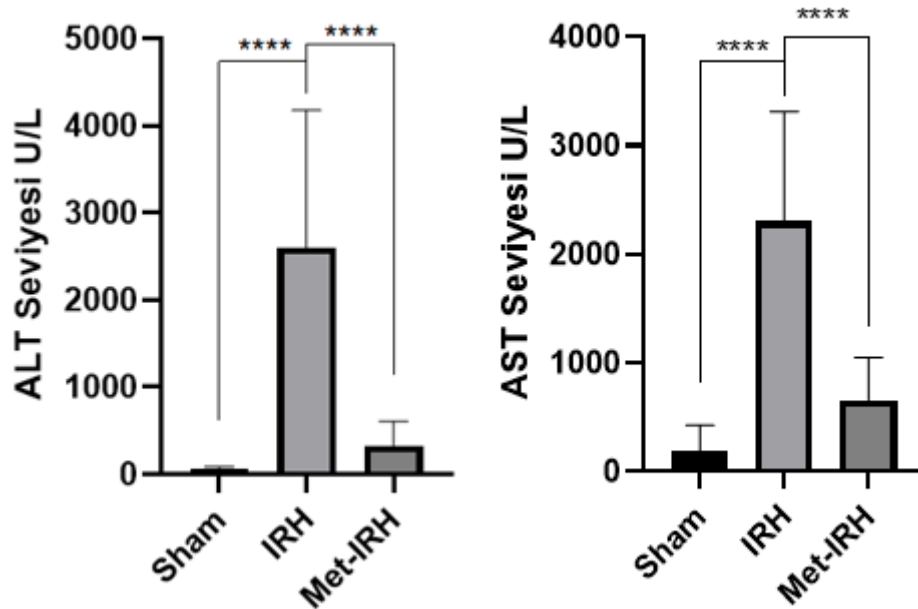
Tablo 4.2. Grupların total inflamatuvar skorları (*Kruskal–Wallis followed by Dunn’s test; $p<0.05$ significant.*)

	grup															p
	sham					iskemi					metformin					
	Mean	SD	Median	Min	Max	Mean	SD	Median	Min	Max	Mean	SD	Median	Min	Max	
TIS	2.20	1.14	2.00	1.00	4.00	5.70	3.20	4.50	2.00	13.00	4.80	3.08	4.50	1.00	10.00	0,009



Şekil 4.9. Grupların total inflamatuvar skorları

Serum ALT ve AST düzeylerinde; İskemi grubunda, diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış ($p < 0,0001$) gözlenmiştir. Sham grubuna kıyasla, Metformin grubunda da gözlenen bu artışın, İskemi grubundakine göre belirgin olarak daha kısıtlı olduğu saptanmıştır (Şekil 4.10).

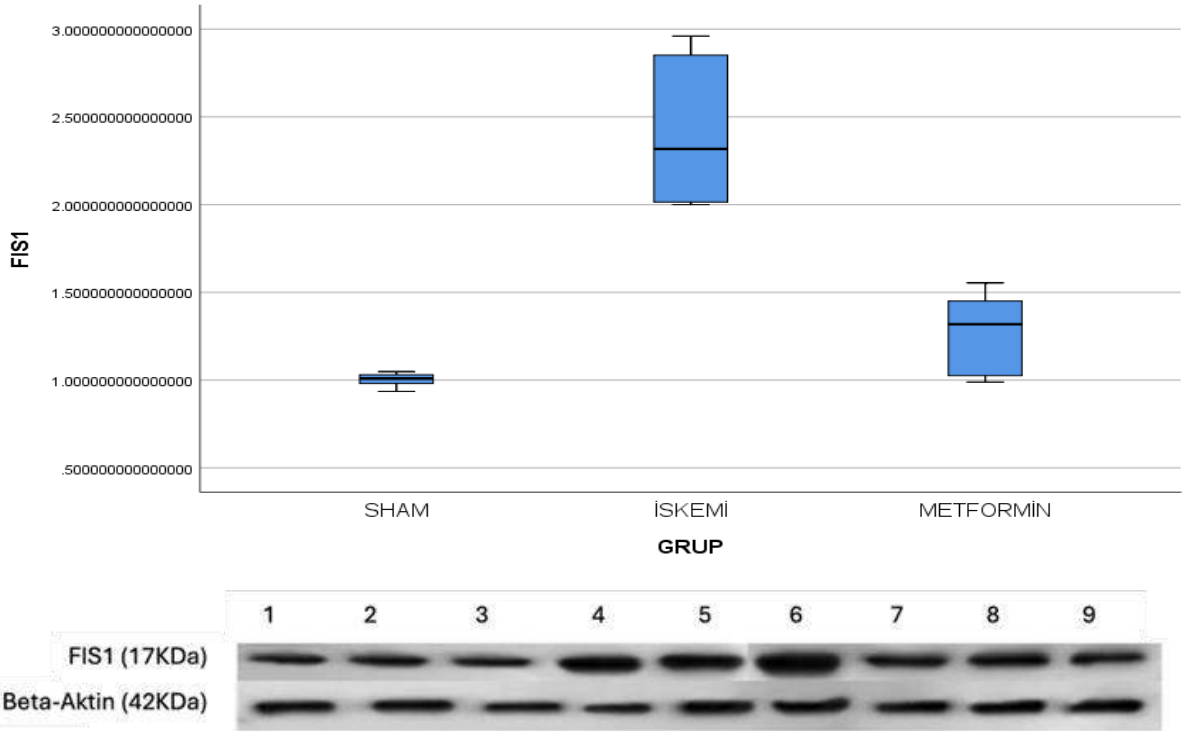


Şekil 4.10. Grupların serum ALT ve AST düzeyleri

Tablo 4.3. Grupların mitokondriyal dinamik verileri (*Kruskal–Wallis followed by Dunn’s test; $p<0.05$ significant.*)

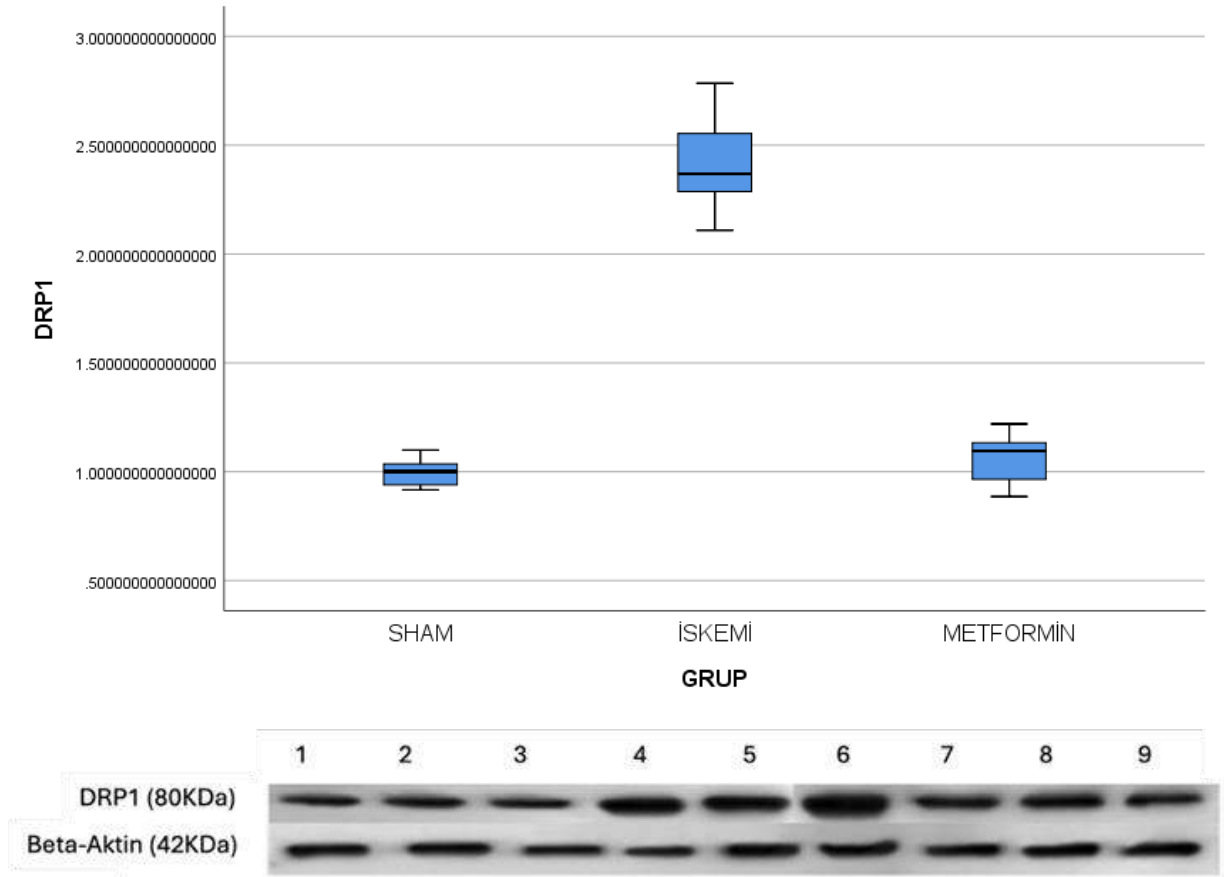
	GRUP															p
	SHAM					İSKEMİ					METFORMİN					
	Mean	SD	Median	Min	Max	Mean	SD	Median	Min	Max	Mean	SD	Median	Min	Max	
FIS1	1.00	.04	1.01	.94	1.05	2.42	.38	2.32	2.00	2.96	1.28	.21	1.32	.99	1.55	<0,001
DRP1	1.00	.06	1.00	.92	1.10	2.40	.22	2.37	2.11	2.78	1.06	.11	1.10	.89	1.22	<0,001
MFN1	1.00	.11	.99	.84	1.16	.39	.10	.37	.25	.53	.89	.06	.90	.77	1.00	<0,001
MİTOFUSİN	1.00	.10	1.00	.85	1.17	.40	.03	.41	.33	.44	.74	.08	.73	.62	.85	<0,001
OPA1	1.00	.04	.99	.95	1.06	.40	.08	.42	.25	.48	1.08	.10	1.11	.90	1.17	<0,001

FIS1 rölâtif ekspresyon düzeyi, gruplar arasında anlamlı farklılık göstermiştir ($p<0,001$). Post hoc (*One-way ANOVA, post-hoc Tukey test; $p<0.05$ considered significant*) analiz sonucunda iskemi grubu FIS1 rölâtif ekspresyon medyan değeri (2,32) sham (1,01) ve metformin (1,32) grubuna göre anlamlı olarak daha yüksektir ($p<0,001$ ve $p=0,01$). Sham ve metformin grupları mukayesesi istatistiksel olarak anlamlı fark arz etmemiştir (Şekil 4.11).



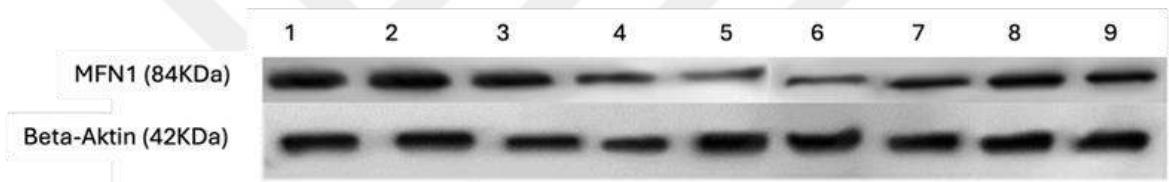
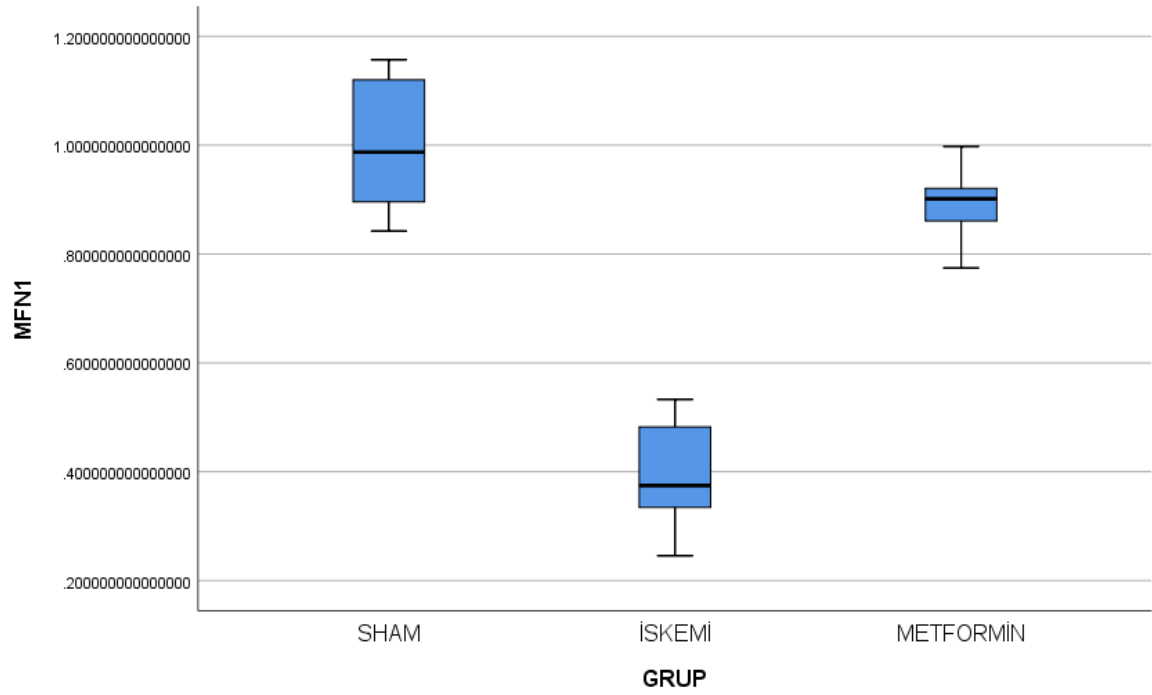
Şekil 4.11. Sham (n=10), İskemi (n=10) ve Metformin (n=10) gruplarına ait FIS1 seviyelerindeki değişimler (FIS1: 17 kDa, Beta Aktin: 47 kDa) ve her deney grubundan bir deneğin tripliklat western blot sonuç örnek resmi (kolonlar; 1-3 Sham, 4-6 İskemi, 7-9 ise Metformin grubu deneği tripliklat sonuçlarıdır).

DRP1 rölatif ekspresyon düzeyleri, gruplar arasında anlamlı farklılık göstermiştir ($p<0,001$). Post hoc analiz sonucunda iskemi grubu medyan değeri (2,37) sham (1,00) ve metformin (1,10) gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksektir ($p<0,001$; $p=0,002$). Metformin ve sham grupları arasında anlamlı fark saptanmamıştır (şekil 4.12).



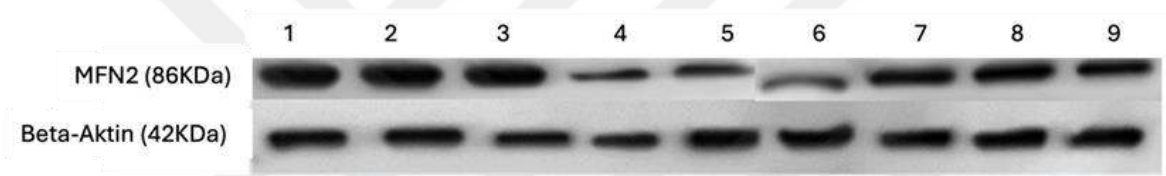
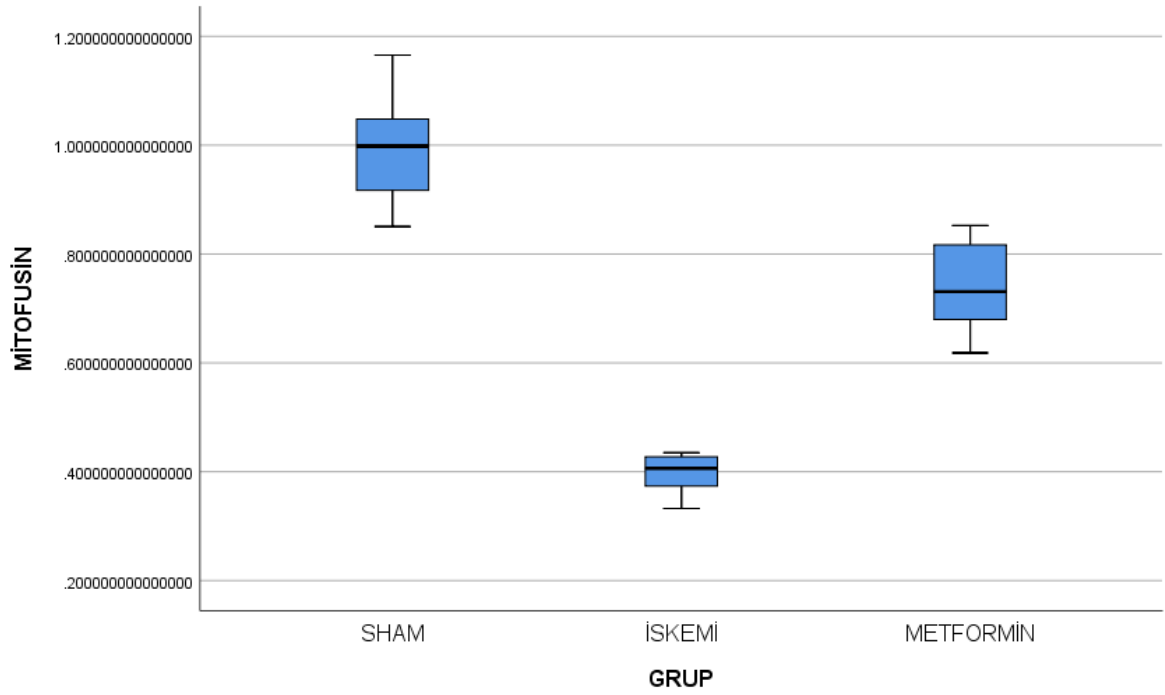
şekil 4.12. Sham (n=10), İskemi (n=10) ve Metformin (n=10) gruplarına ait DRP1 seviyelerindeki değişimler (DRP1: 79 kDa, Beta Aktin: 47 kDa) ve her deney grubundan bir deneğin triplikate western blot sonuç örnek resmi (kolonlar; 1-3 Sham, 4-6 İskemi, 7-9 ise Metformin grubu deneği triplikate sonuçlarıdır).

Mfn1 rölatif ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında; gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmiştir ($p<0,001$). Post hoc analiz sonucunda iskemi grubu medyan değeri (0,37), sham (0,99) ve metformin (0,90) gruplarınıninkilere göre anlamlı olarak daha düşüktür ($p<0,001$ ve $p=0,006$) (şekil 4.13).



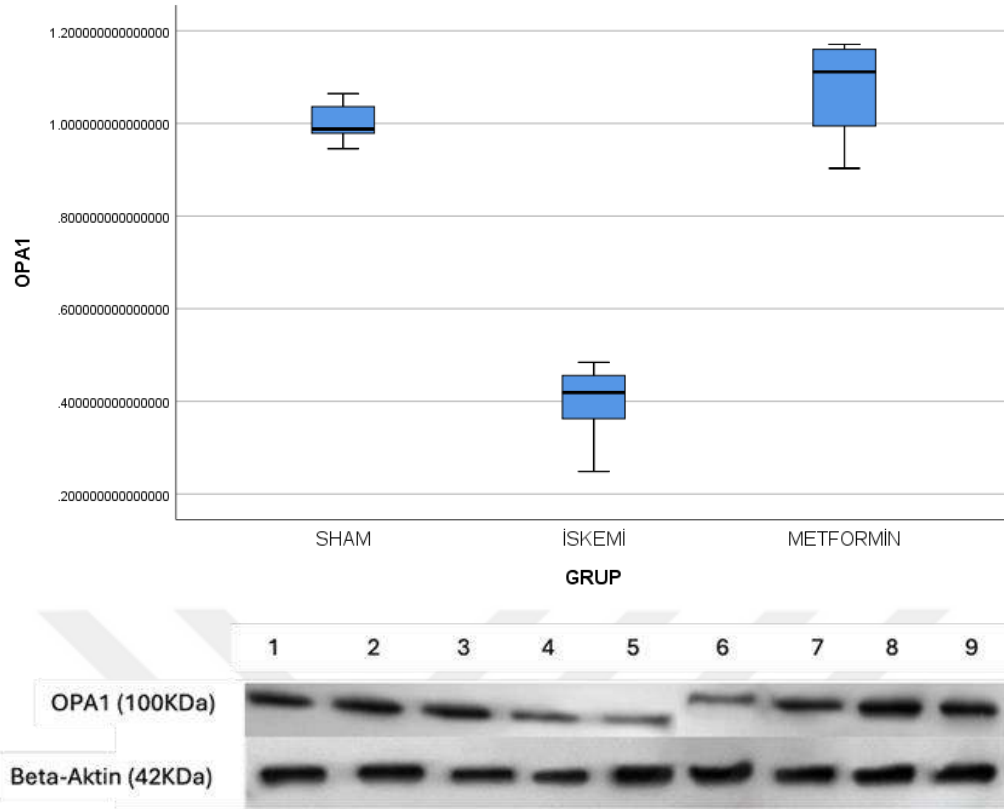
Şekil 4.13. Sham (n=10), İskemi (n=10) ve Metformin (n=10) gruplarına ait MFN1 seviyelerindeki değişimler (Mfn1: 84 kDa, Beta Aktin: 47 kDa) ve her deney grubundan bir deneğin triplikate western blot sonuç örnek resmi (kolonlar; 1-3 Sham, 4-6 İskemi, 7-9 ise Metformin grubu deneği triplikate sonuçlarıdır).

MİTOFUSİN 2 değişkeni gruplar arasında anlamlı farklılık göstermiştir ($p<0,001$). Post hoc analiz sonucunda iskemi grubu medyan değeri (0,41), sham (1,00) ve metformin (0,73) gruplarınıninkilere göre anlamlı olarak daha düşüktür ($p<0,001$ ve $p=0,031$). Aynı zamanda metformin grubu medyan değeri sham grubu medyan değerine göre anlamlı olarak daha düşük elde edilmiştir ($p=0,038$) (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Sham (n=10), İskemi (n=10) ve Metformin (n=10) gruplarına ait Mitofusin 2 seviyelerindeki değişimler (Mfn2: 86 kDa, Beta Aktin: 47 kDa) ve her deney grubundan bir deneğin triplikate western blot sonuç örnek resmi (kolonlar; 1-3 Sham, 4-6 İskemi, 7-9 ise Metformin grubu deneği triplikate sonuçlarıdır).

OPA1 rölatif ekspresyon düzeyleri açısından gruplar, anlamlı farklılık göstermiştir ($p < 0,001$). Post hoc analiz sonucunda iskemi grubu medyan değeri (0,49), sham (0,99) ve metformin (1,11) gruplarınıninkilere göre anlamlı olarak daha düşüktür ($p < 0,004$ ve $p < 0,001$). Metformin ve sham grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Sham (n=10), İskemi (n=10) ve Metformin (n=10) gruplarına ait OPA1 seviyelerindeki değişimler -(OPA1: 80 kDa, Beta Aktin: 47 kDa) ve her deney grubundan bir denegin triplikate western blot sonuç örnek resmi (kolonlar; 1-3 Sham, 4-6 İskemi, 7-9 ise Metformin grubu denegi triplikate sonuçlarıdır).

5. TARTIŞMA

Çalışmada metformin önkoşullamasının hepatik iskemi-reperfüzyon hasarında mitokondriyal dinamikler üzerindeki koruyucu etkileri araştırılmıştır. Çalışmanın özgün yönü, metforminin yalnızca antioksidan bir ajan olarak değil, mitokondriyal füzyon-fisyon dengesini modüle eden bir önkoşullayıcı olarak değerlendirilmesidir.

Sham grubuna kıyasla, İskemi grubunda düşük hepatik ATP; yüksek serum ALT ve AST, hepatik HIF1 α , MPO, TNF α , ROS, TOS düzeyleri dikkate alındığında HİRH başarıyla oluşturulmuştur. Suzuki kriterleri ve nötrofil infiltrasyonunun dikkate alındığı histopatolojik inceleme sonucu semikantitatif Total İnflamatuvar Skorlarının da İskemi grubunda, Sham grubuna göre daha yüksek oluşu da bunu desteklemektedir.

Metforminle önkoşullamanın HİRH üzerinde etkileri, literatürle uyumlu şekilde oluşmuş; metforminle önkoşullamanın, HİRH'ni sınırlayıcı etki yarattığını düşündürmüştür.

Bu çalışmada, metformin ile yapılan önkoşullamanın sıçanlarda oluşturulan HİRH modelinde mitokondriyal dinamikler üzerindeki etkilerine odaklanıldı. Bulgularımız, metforminin HİRH'ni anlamlı şekilde sınırladığını ve bunun mitokondriyal fisyon ve füzyon proteinleri üzerinde füzyon lehine düzenleyici bir role sahip olduğu hipotezini desteklemektedir.

İskemi reperfüzyon hasarı sırasında oluşan oksidatif stres, inflamasyon ve mitokondriyal disfonksiyon karaciğer hücre hasarının başlıca nedenlerindendir. Bu süreçte reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışı ve ATP üretiminin bozulması ile hücre hasar tetiklenir [1]. Mitokondriler, bu patofizyolojik olayların merkezinde yer alır ve fonksiyonel bütünlüklerini koruyamamaları durumunda hücre ölümü kaçınılmaz hale gelir [2]. Mitokondriyal dinamikler – özellikle fisyon ve füzyon – hücre sağlığı ve enerji dengesi için kritik düzenleyici mekanizmalardır. Drp1 aracılı mitokondriyal bölünme hasar sürecini şiddetlendirirken, MFN2 ve OPA1 ile sağlanan mitokondriyal birleşme, hücre hayatta kalımı destekler [3, 38].

Çalışmamızda, İskemi grubunda Fis 1 ve Drp1 ekspresyonunun arttığı, buna karşın MFN1, MFN2 ve OPA1 düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir. Bu durum mitokondriyal bütünlüğün bozulmuş ve apoptozun tetiklenmiş olma olasılığını işaret etmektedir. Metformin önkoşullama grubunda ise Fis 1 ve Drp1 düzeylerinde, İskemi grubundakine göre anlamlı düşüş; MFN1, MFN2 ve OPA1 düzeylerinde ise artış gözlenmiştir. Bu sonuçlar, metforminle önkoşullamanın mitokondriyal fisyon aleyhine ve füzyon lehine etkiyle hücrel hasarı azalttığını desteklemektedir. Martin ve arkadaşları, metformin gibi mitokondriyal hedefli ajanların İRH'nı azaltıcı etkilerini benzer şekilde göstermiş olsa da moleküler düzeyde mitokondriyal dinamiklere odaklanmamıştır [3].

Bulgularımız aynı zamanda metforminin anti-inflamatuar ve antioksidan etkilerini de desteklemektedir. İskemi grubuna kıyasla; TNF- α düzeylerinde Metformin grubunda, belirgin azalma, ATP düzeylerinde ise anlamlı artış saptanmıştır. Bu sonuçlar, mitokondriyal dinamiğin düzenlenmesinin yalnızca morfolojik değil aynı zamanda biyokimyasal düzeyde de koruyucu etki sağladığı savını desteklemektedir. Wu ve ark., İRH'nda mitokondriyal stresin merkezi rolünü vurgulamış ve ROS üretiminin doğrudan mitokondriyal disfonksiyon ile ilişkili olduğunu belirtmiştir [1].

Metforminin mitokondriyal iç membrandaki Kompleks I inhibisyonunun, direkt veya dolaylı birçok sonucu vardır. Geleneksel bakış açısı, İRH patogenezinde, ROS artışını tüm hücredeki genel bir durumdan ibaret görürken, Couchani ve arkadaşlarının suksinat – suksinat dehidrogenaz (Kompleks II) – Kompleks I aracılı TET çözümü, mitokondinin İRH'ndaki merkezî rolünü perçinlemiş, bu durum metformini kâğıt üzerinde daha çok umut vaadeden bir ajan haline getirmiştir [5]. Çalışma sonuçlarımız bunu destekler niteliktedir.

Metformin, kompleks I inhibitörü olarak mitokondride hafif bir stres oluşturarak mitohormetik adaptasyonları indükler. Bu süreç, hücrel savunma mekanizmalarının aktivasyonunu sağlayarak daha dirençli bir fenotip gelişimine yol açar [59]. Mitohormesis kavramı doğrultusunda, çalışmamızda gözlenen mitokondriyal protein modülasyonları ve ATP artışı bu adaptif yanıtı desteklemektedir.

Metforminin, belirtilen sonuçları tam olarak nasıl sağladığı konusunda ise tartışmaya açık noktalar vardır: bu bir tedavi midir, yoksa bir önlem midir?

Önkoşullama, var olan bir hastalığın tedavisinden ziyade, hücre – doku hasarı potansiyeli olan bir durum öncesinde; önkoşullayıcının, sınırlı hasar yaratarak, hücrenin adaptif – kompensatuar mekanizmaları uyarmasıyla hücre direncini arttırması prensibi ve böylece olası hasarı sınırlayıp sağkalımı arttırması beklentisine dayanır. Bu tarif “hormesis” olarak da adlandırılmakta, mitokondri özelinde “mitohormesis” olarak anılmaktadır [59]. Entegre stress yanıtı kapsamında, oldukça iç içe yoğun sinyalizasyon ve aksiyon trafiği içinde bu sürece özgü bir belirteç henüz bulunmasa da Cheng ve arkadaşları metforminin hücre koryucu etkilerini, Kompleks I inhibisyonu ile hafif mitokondriyal hasar yaratarak yol açtığı mitohormesise bağlamaktadır [59].

Metforminin, bir önkoşullayıcı ajan olarak, sağlıklı bir hücreye verildiğinde mitokondriyal Kompleks I’I inhibe edip mitokondriyal stress yaratması ve bu şekilde önkoşullanan hücrelerdeki mitohormetik etkisi farklı organların farklı patolojik durumlarında doğrulanmıştır. Fakat Couchani ve arkadaşları ile Martinez-Reyes ve arkadaşlarının İRH sebebiyle Kompleks I aracılı TET vurgusuyla Kompleks I inhibitörlerini potansiyel terapötik ajanlar olarak görmeleri, önkoşullama/hormesis kavramından farklıdır [5,6]. Çünkü adaptif bir direnç sağlamaktan ziyade, Kompleks I’deki tersine elektron akışı sebebiyle mitokondriyal OkS gelişimini sınırlamak için, tanımlanmış problem üzerine çözüm amaçlı bir tedaviye işaret etmektedir.

Aguilar Mora ve arkadaşlarının, morfolojik mitokondri değerlendirmelerinde; metforminin önkoşullayıcı olarak füzyon, tedavi ajanı olarak fisyon lehine mitokondriyal dinamik yarattığına dair bulguları da denklemin bir diğer bileşenidir [60].

Metforminin, önkoşullayıcı olarak verildiği bir gruba, tedavi ajanı olarak verildiği bir grubun karşılaştırıldığı bir çalışma, bu duruma ışık tutabilir.

Literatürde, metformin ile yapılan normotermik makine perfüzyon çalışmaları da benzer koruyucu etkileri ortaya koymuştur. Özellikle Huijink ve Westerkamp’ın böbrek ve karaciğer modellerinde metformin önkoşullamasının dokusal hasarı azalttığı ve fonksiyonları iyileştirdiği bildirilmiştir [14, 55]. Bizim bulgularımız da bu deneysel verileri, mekanistik açıdan, mitokondriyal dinamik verileriyle tamamlar niteliktedir.

Bu bulgular, metforminin transplantasyon gibi HİRH maruziyetinin yüksek olduğu klinik durumlarda İRH'nı sınırlayıcı bir ajan olarak kullanım potansiyelini ortaya koymaktadır. Bu potansiyel, daha ileri klinik çalışmalarla desteklenme ihtiyacıyla birlikte, özellikle canlıdan transplantasyon vakalarında karaciğer donörüne preoperatif önkoşullayıcı olarak Metformin verilmesi ile hayat bulabilir. Ancak yukarıda da belirtildiği üzere; Metforminin, önkoşullayıcı olarak verildiği bir grupta, tedavi ajanı olarak verildiği bir grubun karşılaştırıldığı bir çalışma ve sonrasında daha geniş retrospektif ve prospektif randomize klinik çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışma metforminin hepatik iskemi-reperfüzyon hasarında mitokondriyal dinamikler üzerine etkisini bütüncül biçimde gösteren az sayıdaki deneysel çalışmadan biridir. Bulgular, metforminin füzyon artırıcı ve inflamasyon azaltıcı etkilerinin, AMPK-DRP1-MFN2 eksenini üzerinden gerçekleştiğini düşündürse de, etki mekanizmasının bununla sınırlı olmama olasılığının araştırılmasına ihtiyaç vardır. Bu etki mekanizmasının daha ileri in vivo modellerle ve mitokondriyal solunum ölçümleriyle doğrulanması, metforminin klinik önkoşullayıcı olarak kullanımının daha da rasyonelize edebilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1. Sonuç

Bu çalışma, metforminle önkoşullamanın hepatik iskemi-reperfüzyon hasarı sırasında mitokondriyal dinamikler üzerinde koruyucu bir düzenleme sağladığını ortaya koymuştur. Elde edilen bulgular, metforminin DRP1 aktivitesini baskılayarak mitokondriyal fizyonu azalttığını, buna karşılık MFN1, MFN2 ve OPA1 ekspresyonlarını artırarak füzyon yönünde bir denge oluşturduğunu göstermektedir. Bu düzenleme sonucunda mitokondriyal bütünlük korunmuş, oksidatif stres ve inflamatuvar yanıt belirgin biçimde azalmış, ATP üretim kapasitesi artmıştır.

Hepatik iskemi-reperfüzyon modelinde, metformin önkoşullamasının hepatosit hasarını sınırladığı ve karaciğer dokusunda anlamlı bir koruma sağladığı gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, metforminin bu etkisini doğrudan mitokondri üzerinden, özellikle füzyon-fizyon dengesini yeniden şekillendirme yoluyla gösterdiğine işaret etmektedir.

Sonuç olarak, metformin önkoşullamasının mitokondriyal bütünlüğü koruyarak enerji dengesini sürdürmesi, karaciğerin iskemi-reperfüzyon sonrası rejenerasyon kapasitesine katkıda bulunabilecek potansiyel bir mekanizmadır. Bu bulgular, metforminin karaciğer cerrahisi ve transplantasyon gibi iskemi-reperfüzyonun ön planda olduğu klinik durumlarda koruyucu bir ajan olarak değerlendirilebileceğini desteklemektedir.

6.2. Öneriler

Metformin, pleiotrofik etkileriyle tıbbın birçok alanında umut vaadeden bir molekül olup; etki mekanizmasına dair tartışmalar devam etmektedir. İRH mekanizmaları ve özellikle hücre sinyal yollarında yarattığı etkileşimlerle, mitokondrinin bu karmaşık yollar yumağındaki rollerine, metforminin etki mekanizmaları ve potansiyel pleiotrofik etkilerine, mitohormesis – önkoşullanma mekanizmasına dair ileri moleküler çalışmalara ihtiyaç vardır. Metforminin, önkoşullayıcı olarak verildiği bir grupta, tedavi ajanı olarak verildiği bir grubun karşılaştırıldığı bir çalışma, sıradaki basamak olarak uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Wu MY, Yiang GT, Liao WT, et al. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury. *Cell Physiol Biochem*. 2018;46(4):1650-1667.
2. Liu J, Luo R, Zhang Y, Li X. Current status and perspective on molecular targets and therapeutic intervention strategy in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Clin Mol Hepatol*. 2024;30(4):585-619.
3. Martin JL, Zhang M, Schumacker PT, et al. Mitochondrial mechanisms and therapeutics in ischaemia reperfusion injury. *Pediatr Nephrol*. 2019;34:1167-1174
4. George J, Lu Y, Tsuchishima M, Tsutsumi M. Cellular and molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury: The role of oxidative stress and therapeutic approaches. *Redox Biol*. 2024 Sep;75:103258. doi: 10.1016/j.redox.2024.103258. Epub 2024 Jun 27. PMID: 38970988; PMCID: PMC11279328.
5. Chouchani, E., Pell, V., Gaude, E. *et al.* Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* **515**, 431–435 (2014). <https://doi.org/10.1038/nature13909>
6. Martínez-Reyes, I., Chandel, N.S. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat Commun* **11**, 102 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13668-3>
7. Bailey CJ. Metformin: historical overview. *Diabetologia*. 2017 Sep;60(9):1566-1576. doi: 10.1007/s00125-017-4318-z. Epub 2017 Aug 3. PMID: 28776081.
8. Peng Q, Chen X, Liang X, Ouyang J, Wang Q, Ren S, Xie H, Wang C, Sun Y, Wu X, Liu H, Hei C, Sun M, Chang Q, Liu X, Li G, He R. Metformin improves polycystic ovary syndrome in mice by inhibiting ovarian ferroptosis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023 Jan 23;14:1070264. doi: 10.3389/fendo.2023.1070264. PMID: 36755918; PMCID: PMC9900736.

9. Feng J, Wang X, Ye X, Ares I, Lopez-Torres B, Martínez M, Martínez-Larrañaga MR, Wang X, Anadón A, Martínez MA. Mitochondria as an important target of metformin: The mechanism of action, toxic and side effects, and new therapeutic applications. *Pharmacol Res.* 2022 Mar;177:106114. doi: 10.1016/j.phrs.2022.106114. Epub 2022 Feb 3. PMID: 35124206
10. Foretz M, Guigas B, Viollet B. Metformin: update on mechanisms of action and repurposing potential. *Nat Rev Endocrinol.* 2023 Aug;19(8):460-476. doi: 10.1038/s41574-023-00833-4. Epub 2023 May 2. PMID: 37130947; PMCID: PMC10153049.
11. Apostolova N, Iannantuoni F, Gruevska A, Muntane J, Rocha M, Victor VM. Mechanisms of action of metformin in type 2 diabetes: Effects on mitochondria and leukocyte-endothelium interactions. *Redox Biol.* 2020 Jul;34:101517. doi: 10.1016/j.redox.2020.101517. Epub 2020 May 25. PMID: 32535544; PMCID: PMC7296337.
12. Zheng Z, Bian Y, Zhang Y, Ren G, Li G. Metformin activates AMPK/SIRT1/NF- κ B pathway and induces mitochondrial dysfunction to drive caspase3/GSDME-mediated cancer cell pyroptosis. *Cell Cycle.* 2020 May;19(10):1089-1104. doi: 10.1080/15384101.2020.1743911. Epub 2020 Apr 14. PMID: 32286137; PMCID: PMC7217368.
13. **National Center for Biotechnology Information (2025). PubChem Compound Summary for CID 14219, Metformin Hydrochloride. Retrieved June 17, 2025 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Metformin-Hydrochloride>.**
14. Huijink TM, Venema LH, Posma RA, de Vries NJ, Westerkamp AC, Ottens PJ, Touw DJ, Nijsten MW, Leuvenink HGD. Metformin Preconditioning and Postconditioning to Reduce Ischemia Reperfusion Injury in an Isolated Ex Vivo Rat and Porcine Kidney Normothermic Machine Perfusion Model. *Clin Transl Sci.* 2021 Jan;14(1):222-230. doi: 10.1111/cts.12846. Epub 2020 Jul 31. PMID: 32702185; PMCID: PMC7877823.
15. Janoff A. Alterations in lysosomes (intracellular enzymes) during shock; effects of preconditioning (tolerance) and protective drugs. *Int Anesthesiol Clin.* 1964 Feb;2:251-69. doi: 10.1097/00004311-196402000-00008. PMID: 14125012.

16. Li S, Hafeez A, Noorulla F, Geng X, Shao G, Ren C, Lu G, Zhao H, Ding Y, Ji X. Preconditioning in neuroprotection: From hypoxia to ischemia. *Prog Neurobiol*. 2017 Oct;157:79-91. doi: 10.1016/j.pneurobio.2017.01.001. Epub 2017 Jan 18. PMID: 28110083; PMCID: PMC5515698.
17. Shoaib M, Choudhary RC, Chillale RK, Kim N, Miyara SJ, Haque S, Yin T, Frankfurt M, Molmenti EP, Zanos S, Kim J, Becker LB. Metformin-mediated mitochondrial protection post-cardiac arrest improves EEG activity and confers neuroprotection and survival benefit. *FASEB J*. 2022 May;36(5):e22307. doi: 10.1096/fj.202200121R. PMID: 35394702.
18. Karatzas T, Neri AA, Baibaki ME, Dontas IA. Rodent models of hepatic ischemia-reperfusion injury: time and percentage-related pathophysiological mechanisms. *J Surg Res*. 2014;191(2):399-412. doi:10.1016/j.jss.2014.06.024
19. Ryan MT, Hoogenraad NJ. Mitochondrial-nuclear communications. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:701-22. doi: 10.1146/annurev.biochem.76.052305.091720. PMID: 17227225.
20. Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191(4784), 144–148. <https://doi.org/10.1038/191144a0>
21. Spinelli, J. B., & Haigis, M. C. (2018). The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nature Cell Biology*, 20(7), 745–754. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0124-1>
22. Friedman, J. R., & Nunnari, J. (2014). Mitochondrial form and function. *Nature*, 505(7483), 335–343. <https://doi.org/10.1038/nature12985>
23. Chandel, N. S. (2020). Evolution of mitochondria as signaling organelles. *Cell Metabolism*, 32(3), 379–387. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.06.013>
24. Gherardi, G., Nogara, L., Ciciliot, S., Fadini, G. P., Blaauw, B., & Braghetta, P. (2020). Mitofusin 2 promotes mitochondrial calcium uptake via mitochondria–endoplasmic reticulum contact sites. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1867(6), 118575. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118575>

25. Baughman, J. M., Perocchi, F., Girgis, H. S., Plovanich, M., Belcher-Timme, C. A., Sancak, Y., ... & Mootha, V. K. (2011). Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 476(7360), 341–345. <https://doi.org/10.1038/nature10234>
26. Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., & Mammucari, C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(9), 566–578. <https://doi.org/10.1038/nrm3412>
27. Giorgi, C., Marchi, S., & Pinton, P. (2018). The machineries, regulation and cellular functions of mitochondrial calcium. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(11), 713–730. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0052-8>
28. Tait, S. W., & Green, D. R. (2013). Mitochondrial regulation of cell death. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(9), a008706. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008706>
29. Cai, Q., Jeong, Y. Y., & Mitophagy. (2018). Mitochondrial quality control in the regulation of cell survival and death. *Cell & Bioscience*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13578-018-0201-y>
30. Westphal, D., Dewson, G., Czabotar, P. E., & Kluck, R. M. (2019). Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1866(1), 12–31. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.08.005>
31. Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1), 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
32. Sena, L. A., & Chandel, N. S. (2012). Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular Cell*, 48(2), 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.025>
33. Zorov, D. B., Juhaszova, M., & Sollott, S. J. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiological Reviews*, 94(3), 909–950. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2013>

34. Nunnari, J., & Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: In sickness and in health. *Cell*, 148(6), 1145–1159. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.035>
35. Chandel, N. S. (2014). Mitochondria as signaling organelles. *BMC Biology*, 12(1), 34. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-12-34>
36. Schonfeld, P., & Reiser, G. (2013). Why does brain metabolism not favor burning of fatty acids to provide energy? Reflections on disadvantages of the use of free fatty acids as fuel for brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 33(10), 1493–1499. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.128>
37. Miller, W. L. (2013). Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 379(1–2), 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.06.019>
38. Giacomello M, Pyakurel A, Glytsou C, Scorrano L. The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020 Apr;21(4):204-224. doi: 10.1038/s41580-020-0210-7. Epub 2020 Feb 18. PMID: 32071438.
39. Zhou Y, Qiu T, Wang T, Yu B, Xia K, Guo J, Liu Y, Ma X, Zhang L, Zou J, et al. Research progress on the role of mitochondria in the process of hepatic ischemia-reperfusion injury. *Gastroenterology Report*. 2024; 12: goae066. DOI: 10.1093/gastro/goae066
40. An W, Fan J, Meng F, et al. Effect of Metformin on Myocardial Injury Induced by Hepatic Ischemia-Reperfusion in Rats. *Front Pharmacol*. 2022;13:822743.
41. Wang, Y., Dai, X., Li, H., Jiang, H., Zhou, J., Zhang, S., Guo, J., Shen, L., Yang, H., Lin, J., & Yan, H. (2023). The role of mitochondrial dynamics in disease. *MedComm*, 4(6), e462. <https://doi.org/10.1002/mco2.462>
42. Wallace, D. C. (2018). Mitochondrial genetic medicine. *Nature Genetics*, 50(12), 1642–1649. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0264-3>
43. Pagliarini, D. J., & Rutter, J. (2013). Hallmarks of a new era in mitochondrial biochemistry. *Genes & Development*, 27(24), 2615–2627. <https://doi.org/10.1101/gad.229724.113>

44. Calvo, S. E., Clauser, K. R., & Mootha, V. K. (2016). MitoCarta2.0: An updated inventory of mammalian mitochondrial proteins. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1251–D1257. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1003>
45. Chiu YH, Lin SA, Kuo CH, Li CJ. Molecular Machinery and Pathophysiology of Mitochondrial Dynamics. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Sep 17;9:743892. doi: 10.3389/fcell.2021.743892. PMID: 34604240; PMCID: PMC8484900.
46. Chen, H., & Chan, D. C. (2017). Mitochondrial dynamics in regulating the unique phenotypes of cancer and stem cells. *Cell Metabolism*, 26(1), 39–48.
47. Archer, S. L. (2013). Mitochondrial dynamics—mitochondrial fission and fusion in human diseases. *N Engl J Med*, 369(23), 2236–2251.
48. Gao, F., et al. (2022). Mitochondrial dynamics in Parkinson's disease. *Front Aging Neurosci*, 14, 885500. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.885500>
49. Wang, T., et al. (2024). Role of mitochondria in doxorubicin-mediated cardiotoxicity: molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Int J Med Sci*, 21(5), 809–816. <https://doi.org/10.7150/ijms.94485>
50. Ong, S. B., et al. (2010). Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Circulation*, 121(18), 2012–2022.
51. Lai, Y., et al. (2020). Restoration of L-OPA1 alleviates acute ischemic stroke injury in rats. *Redox Biology*, 34, 101503. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101503>
52. Lin, J., et al. (2022). Mitochondrial Dynamics and Mitophagy in Cardiometabolic Disease. *Front Cardiovasc Med*, 9, 917135. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.917135>
53. Trujillo-Rangel, W. Á., García-Valdés, L., Méndez-Del Villar, M., Castañeda-Arellano, R., Totsuka-Sutto, S. E., & García-Benavides, L. (2022). Therapeutic Targets for Regulating Oxidative Damage Induced by Ischemia-Reperfusion Injury: A Study from a Pharmacological Perspective. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 8624318. <https://doi.org/10.1155/2022/8624318>
54. Charan J, Kantharia ND. How to calculate sample size in animal studies? *J Pharmacol Pharmacother*. 2013;4(4):303-306. doi:10.4103/0976-500X.119726

55. Westerkamp AC, Fujiyoshi M, Ottens PJ, et al. Metformin Preconditioning Improves Hepatobiliary Function and Reduces Injury in a Rat Model of Normothermic Machine Perfusion and Orthotopic Transplantation. *Transplantation*. 2020;104(9):e271-e280.
56. Yu H, Wang J, Liu M, Hu C, Sun J, Xu B, Lu S, Huang D, Pang Q, Hu C. Metformin alleviates lung ischemia-reperfusion injury in a rat lung transplantation model. *Exp Lung Res*. 2024;50(1):15-24. doi: 10.1080/01902148.2023.2301615. Epub 2024 Feb 5. PMID: 38317565.
57. Rouru J, Koulu M, Peltonen J, Santti E, Hänninen V, Pesonen U, Huupponen R. Effects of metformin treatment on glucose transporter proteins in subcellular fractions of skeletal muscle in (fa/fa) Zucker rats. *Br J Pharmacol*. 1995 Aug;115(7):1182-7. doi: 10.1111/j.1476-5381.1995.tb15022.x. PMID: 7582542; PMCID: PMC1908777.
58. Suzuki S, Nakamura S, Koizumi T, Sakaguchi S, Baba S, Muro H, Fujise Y. The beneficial effect of a prostaglandin I₂ analog on ischemic rat liver. *Transplantation*. 1991 Dec;52(6):979-83. doi: 10.1097/00007890-199112000-00008. PMID: 1750084.
59. Cheng YW, Liu J, Finkel T. Mitohormesis. *Cell Metab*. 2023 Nov 7;35(11):1872-1886. doi: 10.1016/j.cmet.2023.10.011. PMID: 37939657; PMCID: PMC10632604.
60. Mora FAA, Musheshe N, Arroyave Ospina JC, Geng Y, Soto JM, Rodrigo JA, Alieva T, Buist-Homan M, Lezoualc'h F, Cheng X, Schmidt M, Moshage H. Metformin protects against diclofenac-induced toxicity in primary rat hepatocytes by preserving mitochondrial integrity via a pathway involving EPAC. *Biomed Pharmacother*. 2021 Nov;143:112072. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112072. Epub 2021 Aug 28. PMID: 34464747.

Ek 1: Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 15.12.2023-295374



1993

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu

15.12.2023

Sayı :E-94603339-604.01.02-295374
Konu :Proje Onayı

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında görev yapmakta olan Prof. Dr. F. Belgin Ataç'ın danışmanlığında Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Tıbbi Biyoloji Doktora Programı öğrencisi Ender Fakioğlu'nun sorumluluğunda yürütülecek olan DA23/21 nolu "Sıçanlarda metformin ile önkoşullamanın, hepatik iskemi-reperfüzyon hasarı modelinde mitokondriyal dinamiğe etkisi" başlıklı araştırma projesi Kurulumuz ve Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 27/11/2023 tarih ve 23/22 sayılı kararı ile uygun görülmüştür. Projenin başlama tarihi ile çalışmanın sunulduğu kongre ve yayımlandığı dergi konusunda Kurulumuza bilgi verilmesini rica ederim.

Not: Çalışma bildiri ve/veya makale haline geldiğinde "Gereç ve Yöntem" bölümüne aşağıdaki ifadelerden uygun olanının eklenmesi gerekmektedir.

— Bu çalışma Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no:...) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

— This study was approved by Baskent University Ethical Committee for Experimental Research on Animals (Project no:...) and supported by Baskent University Research Fund.



1993
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KARARI		
TOPLANTI SAYISI	KARAR SAYISI	KARAR TARİHİ
15	23/22	27/11/2023

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında görev yapmakta olan Prof. Dr. F. Belgin Ataç tarafından yürütülecek olan DA23/21 nolu " Sıçanlarda metformin ile önkoşullamanın, hepatik iskemi-reperfüzyon hasarı modelinde mitokondriyal dinamiğe etkisi" başlıklı araştırma projesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından incelendi ve etik açıdan uygun olduğuna oybirliği ile karar verildi.