T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Oktay KAYA

DENEYSEL MİYOGLOBİNÜRİK AKUT BÖBREK HASARINDA NEKROPTOZİSİN ROLÜ

(Yüksek Lisans Tezi)

Leyla OKUR

Referans no: 10395395

EDİRNE – 2022

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Oktay KAYA

DENEYSEL MİYOGLOBİNÜRİK AKUT BÖBREK HASARINDA NEKROPTOZİSİN ROLÜ

(Yüksek Lisans Tezi)

Leyla OKUR

Destekleyen Kurum: Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (TÜBAP 2021/60)

Tez No:

EDİRNE – 2022

TEŞEKKÜR

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalında aldığım yüksek lisans eğitimim süresince ve tez çalışmamda bilimsel desteğiyle, sabrıyla ve hoşgörüsüyle bana rehberlik eden değerli danışman hocam Doç. Dr. Oktay KAYA başta olmak üzere; bana bilgi ve tecrübeleri ile emek veren Prof. Dr. Levent ÖZTÜRK'e ve Prof. Dr. Selma Arzu VARDAR'a, tez çalışmamda emeği geçen Doç. Dr. Yeşim Hülya UZ'a ve Dr. Öğr. Üyesi Özlem DELEN'e, çalışmamızı destekleyen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (TÜBAP'a) ve tüm Fizyoloji Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

- **AKUT BÖBREK HASARI** 3
- **RABDOMİYOLİZ** 6
- **MİYOGLOBİNÜRİK AKUT BÖBREK HASARI** 8
- **OKSİDATİF STRES VE BİYOBELİRTEÇLERİ** 9
- **HÜCRENİN ÖLÜM MEKANİZMALARI** 12
- **NEKROPTOZİS** 14

GEREÇ VE YÖNTEMLER 18

BULGULAR 24

TARTIŞMA 42

SONUÇLAR 45

ÖZET 46

SUMMARY 48

KAYNAKLAR 50

ŞEKİLLER LİSTESİ 55

ÖZGEÇMİŞ 57

EKLER

SİMGE VE KISALTMALAR

ABH : Akut Böbrek Hasarı

ATP : Adenozin Trifosfat

Cr : Serum Kreatinin

DNA : Deoksiribonükleik asit

GSH : Glutatyon

MABH : Miyoglobinürik Akut Böbrek Hasarı

MDA : Malondialdehit

MLKL : Mixed Lineage Kinase Domain Like Pseudokinase

Nec-1 : Nekrostatin-1

NLRP3 : NLR Family Pyrin Domain Containing 3

RIPK1 : Receptor-interacting Serine/threonine-protein Kinase 1

RIPK3 : Receptor-interacting Serine/threonine-protein Kinase 3

ROS : Reaktif oksjen türleri

TLR : Toll like receptor

TNF-α : Tümör nekroz faktör alfa

TNFR1 : Tümör nekroz faktör reseptörü 1

GİRİŞ VE AMAÇ

Akut böbrek hasarı (ABH), sıvı-elektrolit ve asit-baz homeostazının sürdürülememesiyle sonuçlanan böbrek fonksiyonunda hızlı bozulma ile karakterize klinik bir tablodur (1). Böbrek iskemisi, rabdomiyoliz, dolaşım bozuklukları, karaciğer fonksiyon bozuklukları, sepsis ve toksik ajanlara maruziyet akut böbrek hasarının sebepleri arasında sayılabilir (2). Akut böbrek hasarını azaltabilecek veya iyileşmeyi hızlandırabilecek hiçbir spesifik tedavi ortaya çıkmamıştır, bu nedenle tedavi destekleyicidir (3).

Rabdomiyoliz, iskelet kasının hasara uğramasıyla hücre içeriğinin serum içine salınması ile karakterize bir sendromdur (4). Ağır egzersiz, kas kompresyonları, ilaçlar, enfeksiyonlar, alkolizm, depremler, maden göçükleri rabdomiyolizin sebepleri arasında sayılabilir. Akut böbrek hasarı, rabdomiyolizin en sık görülen sistemik komplikasyonudur. Rabdomiyoliz sonrasında ABH sıklığı %10 ile 55 arasında değişir (5). Miyoglobinürik akut böbrek hasarı (MABH), travmatik ve nontravmatik kas hasarı sonrası gelişen bir durumdur (6).

İnsanlarda gelişen miyoglobinürik akut böbrek hasarının deneysel modelinde en yaygın kullanılan yöntem; sıçanlara %50'lik hipertonik gliserolün intramüsküler (im) enjeksiyonudur (7, 8). Gliserol enjeksiyonuyla kas yıkımı oluşur. Açığa çıkan miyoglobinin içeriğindeki demir, böbreklerde serbest radikal oluşumuna ve lipid peroksidasyonuna neden olarak MABH patogenezinde önemli bir rol oynar (7, 9).

Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 (RIPK1) aracılı nekroz, nekroptozis adı verilen yeni bir düzenlenmiş nekroz türü olarak tanımlanmıştır (10). Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3'ü (RIPK3) aktive ederek mitokondride

reaktif oksjen türlerinin (ROS) üretimine sebep olduğu bilinmektedir (11). Nekroptozisin birçok patolojide önemli rol oynadığı iddia edilmektedir (12). Nekrostatin-1 (Nec-1) gibi kimyasal inhibitörler tarafından nekroptozisin inhibisyonu, bir dizi ölümcül durumda ümit verici bir terapötik strateji olarak gösterilmiştir (13).

Nekrostatin-1 ile nekroptozis inhibisyonunun sıçanlarda glukokortikoid kaynaklı osteoporozda kemik oluşumunu hızlandırdığı bildirilmiştir (14). Sıçan, deri flebi modelinde nekroptozis inhibisyonunun iskemi/reperfüzyon hasarına karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (15). Nekrostatin-1'in, renal iskemi/reperfüzyon hasarını önlemek ve tedavi etmek için terapötik potansiyele sahip olabileceği bildirilmiştir (16). Tersine Nec-1'in nekroptozis inhibisyonunu hedefleyen yıkımının, sepsisin ardından meydana gelen karaciğer hasarını hızlandırdığı bildirilmiştir (17).

Çalışmanın amacı miyoglobinürik akut böbrek hasarında nekroptozisin rolünü ve oksidatif stresle ilişkisini göstermektir.

GENEL BİLGİLER

AKUT BÖBREK HASARI

Akut böbrek hasarı nitrojenli metabolik atıkların tutulumu, sıvı-elektrolit ve asit-baz homeostazının sürdürülememesi ve glomerüler filtrasyon hızında (GFR) hızlı bir düşüş ile karakterize bir tablodur. ABH saatler veya günler içinde meydana gelebilir (1). ABH'nin tipik belirteçleri olarak serum kreatinin (Cr) ve kan üre azotu düzeyi kullanılır (18). ABH serum kreatinin konsantrasyonunda başlangıç noktasından 0,5 mg dL^{-1} veya daha fazla artış ya da hesaplanan kreatinin klirens değerinden %50 düşüş ile açıklanabilir (19). ABH'de birincil hasar bölgesi plazma membranıdır. Ancak çekirdek, hücre iskeleti, endoplazmik retikulum ve mitokondri gibi diğer hücresel bileşenler de anahtar hedeflerdir (20).

Akut böbrek hasarının şiddeti; böbrek fonksiyonunun biyokimyasal belirteçlerinin seviyelerindeki küçük değişikliklerden, renal replasman tedavisinin başlatılmasını gerektiren böbrek yetmezliğine kadar geniş bir yelpazededir (21). Yaşlanan nüfus ve artan hipertansiyon ve diyabet prevalansı nedeniyle, 2005'ten 2014'e, ABH tanısı ile hastaneye yatış sayısı 281.500'den 504.600'e yükselmiştir. İkincil akut böbrek hasarı tanısı ile hastaneye yatış sayısı 1 milyondan 2,3 milyona yükselmiştir (22).

Akut böbrek hasarı hem toplum hem de hastane ortamlarında dünya çapında önemli bir mortalite ve morbidite nedenidir. Uzun ve kısa vadeli mortalite ve morbitenin yanı sıra kronik böbrek hastalığının gelişmesine veya kardiyovasküler hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilecek olumsuz sonuçları da vardır. ABH için birçok risk faktörü vardır ve patolojik mekanizmalar karmaşıktır (23, 24).

Tanı

Akut böbrek hasarı sık görülen, yüksek maliyetli ve yıkıcı bir sendrom olması sebebiyle tanı ve tedavisindeki sınıflandırma sistemi önem kazanır. Günümüzde, ABH saptama çalışmalarının çoğu, idrar çıkışı ölçümü olsun veya olmasın, serum kreatinin düzeylerine dayanmaktadır (25).

Akut böbrek hasarının şiddetinin teşhisi ve değerlendirilmesinde üç sınıflandırma kullanılmaktadır: 2004 yılında Akut Diyaliz Kalite Grubu (ADQI) tarafından RIFLE (Risk, Yaralanma, Arıza, Kayıp, Son dönem böbrek hastalığı) kriterleri yayınlanmıştır. 2007 yılında RIFLE kriterleri AKIN (Akut Böbrek Hasarı Ağı) tarafından geliştirilmiştir. 2012 yılında RIFLE ve AKIN kriterlerinin çeşitli yönleri, KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) Kriterleri ile tek bir tanımda birleştirilmiştir. ABH için günümüzde sık kullanılan sınıflandırma KDIGO'dur (26).

Kidney disease improving global outcomes (25)

1. evre: Serum kretinin düzeyinin ≥ 0.34 artması 7 gün içinde başlangıca göre %50-99 Cr artışı, 6-12 saatte < 0.5 ml/kg/saat idrar çıkışı

2. evre: 7 gün içinde başlangıca göre %100-199 Cr artışı, 12 satten fazla sürede < 0.5 ml/kg/saat

3. evre: 7 gün içinde başlangıca göre ≥ %200 Cr artışı, renal replasman tedavisinin gerekli olması, 24 saat veya daha uzun süreyle idrar çıkışı < 0.3 ml/kg/saat veya 12 saat veya daha uzun süreyle anüri

Sınıflandırma

Akut böbrek hasarı prerenal, intrinsik ve postrenal olmak üzere üç ana kategoriye göre sınıflandırılabilir (20).

Prerenal akut böbrek hasarı: Böbrek parankim bütünlüğünün korunduğu ancak renal kan akışının bozulduğu bir durumdur (6). Prerenal ABH hipovolemi veya hipotansiyondan kaynaklanan sistemik hipoperfüzyon sebebiyle oluşabilir (27).

İntrarenal akut böbrek hasarı: Uzamış renal iskemi, sepsis ve nefrotoksinler en sık görülen sebepleridir. Prerenal ABH hücresel hasara neden olacak kadar uzun sürerse intrinsink ABH'ye dönüşebilir (27).

Postrenal akut böbrek hasarı: Filtrasyon sisteminin tıkanmasına yol açan obstrüksiyonlar sebebiyle gelişir. En yaygın olan sebepler renal/üreteral taşlar, tümörler veya herhangi bir nedenle gelişen üretral obstrüksiyondur (27).

Risk Faktörleri

Akut böbrek hasarına neden olabilecek birçok risk faktörü vardır. Bununla birlikte aynı maruziyetten sonra akut böbrek hasarı gelişme olasılığı kişiden kişiye büyük ölçüde değişen bir dizi duyarlılık faktörüne bağlıdır. Maruziyet faktörlerine sepsis, yanık, travma, kalp cerrahisi, nefrotoksik ilaçlar, radyokontrast ajanlar, zehirli bitkiler ve hayvanlar sayılabilirken; duyarlılık faktörlerine dehidratasyon, ileri yaş, siyah ırk, cinsiyet (kadınlarda fazla olmak üzere), kronik hastalıklar, anemi sayılabilir (28).

Epidemiyoloji

Akut böbrek hasarı tanısında tutarlı kriterler uygulayan uzun süreli çalışmalar, insidansta dramatik bir artışı göstermektedir. ABH tanısındaki artış, artan hastalık veya artan farkındalıktan kaynaklanmaktadır. Yaşlı nüfusundaki ve kronik hastalıklardaki artış ABH tanısındaki artışı da beraberinde getirmektedir (22). ABH Avrupa'da her yıl 1000 kişi başına iki vaka olarak raporlanır. Ancak yatan hastalarda bu oran daha fazladır (%10 ile %20) (29).

Etiyoloji

Akut böbrek hasarının birçok sebebi olmakla birlikte en sık görülen sebepleri arasında sepsis, rabdomiyoliz, cerrahi operasyonlar, kardiyojenik şok, hipovolemi, ilaçlarla ilgili komplikasyonlar, hepatorenal sendrom, obstrüktif üropati sayılabilir. Sepsis kaynaklı ABH tüm vakaların yaklaşık %50'sini oluşturur (30). ABH etiyolojisinin çok heterojen olması, genellikle oksijen arzı ve talebindeki dengesizlikten kaynaklanan çoklu patofizyolojik mekanizmaları devreye sokar. Bu dengesizlik, hipoksemi ve oksidatif stres ile sonuçlanır. Bu durum daha sonra endotel hasarına, bağışıklık sistemi aktivasyonuna, inflamasyona ve buna karşılık oksijen arzını daha da azaltan interstisyel ödem ve vazokonstriksiyona yol açar (31).

RABDOMİYOLİZ

Rabdomiyoliz (RM), iskelet kası liflerinin hasarlanması ve içeriklerinin dolaşıma salınması ile karakterize klinik bir sendromdur. Miyoglobin, laktat dehidrojenaz ve kreatin fosfokinaz kas hasarını gösteren en önemli maddelerdir. Rabdomiyolizin klinik semptomları kaslarda ağrı, zayıflık ve yaralı kaslarda şişlik olarak sayılabilir (32).

Rabdomiyolizin şiddeti, ABH'ye neden olabilen miyoglobinüriden, şişmiş kastan kaynaklanan yaygın intravasküler koagülopati, akut kompartman sendromu gibi diğer ciddi sistemik komplikasyonlara ve yaralı uzuvların makro dolaşımı ve mikro dolaşımında azalmaya kadar geniş bir yelpazededir. Dolaşımdaki bozukluk sebebiyle şişmiş kas gruplarına çekilen sıvı hipotansiyon ve şoka yol açar. RM'ye eşlik eden tipik metabolik değişiklikler hiperkalemi, metabolik asidoz, hipokalsemi veya hiperkalsemi, hiperürisemi, hiponatremi ve hiperfosfatemidir (32, 33). Rabdomiyoliz vakaları çoğunlukla doğal veya insan kaynaklı afetlerden sonraki doğrudan kas travmasıyla gelişir (1).

Rabdomiyolizin Patofizyolojisi

Rabdomiyolizin birçok nedeni vardır ancak kas yaralanması ve nekroz ile sonuçlanan son ortak yol, doğrudan miyosit hasarı veya kas hücresindeki enerji kaynağı yetmezliğidir (34). Fizyolojik koşullar altında, iskelet kası hücresinin kasılması için sinirsel uyarı gerekir. Aksiyon potansiyeli olarak adlandırılan bu uyarı sarkolemmaya aktarılır. Sağlıklı miyositlerde sarkolemma, hücresel elektrokimyasal gradyanlarının sürecini düzenlemek için farklı pompalar içerir. Bu pompalardan enerji kaynağı olarak adenozin trifosfat (ATP) kullanarak işleyen Na^{+}/K^{+}/ATPaz ve Ca^{+2}/ATPaz pompaları, dinlenme durumunda hücre içinde sodyum ve kalsiyum konsantrasyonunun az olmasını ve potasyum konsantrasyonun fazla olmasını sağlamaktadır. Na^{+}/K^{+}/ATPaz ve Ca^{+2}/ATPaz pompalarının çalışma süreci sodyumun aktif olarak uzaklaştırılması sırasında hücre içi elektrik gradyanının değiştirilerek kalsiyumun uzaklaştırılması üzerine kuruludur. Kas kasılması, aktin-miyozin bağlantısıyla sonuçlanan sarkoplazmaya aşırı kalsiyum akışının olduğu ATP kullanan aktif bir süreçtir. İyon kanalları ve plazma zarını bozan herhangi bir durumda sodyum ve kalsiyum akışı bozulur. Hücre içine sodyum iyonu ile birlikte su çekilir. Bu durum hücre şişmesine, hücre içinin ve zarlı yapıların bozulmasına neden olur. Aşırı hücre içi kalsiyumun varlığı, aktin-miyozin çapraz bağının aktivasyonuna, miyofibriler kasılmaya ve ATP'nin tükenmesine

yol açar. Sarkoplazmada yüksek oranda kalsiyum konsantrasyonunun devam etmesi durumunda hidroksilazlar, proteazlar, nükleazlar gibi sitolitik enzimler aktive olur. Hücre organellerinin, özellikle mitokondrinin işlevinin bozulması, ATP'de ilerleyici azalmaya, serbest oksijen radikallerinin üretimine ve hücre hasarına yol açar. Sonuç olarak hiperkalemi ve hiperfosfatemi komplikasyonları oluşur. Rabdomiyolizde önce hipokalsemi, ardından hiperkalsemi görülür. Bunun nedeni, kalsiyumun yaralanma sırasında önce miyosit içine hareket etmesi, ardından hücre lizizinden sonra hücre dışı boşluklara sızmasıdır. Rabdomiyolizin en ciddi sonucu, membran hücre pompalarında işlev bozukluğuna neden olan ATP tükenmesidir. Hücre işlevlerinin bozulmasının sonucu olarak; potasyum, fosfatlar, miyoglobin, kreatin fosfokinaz, laktat dehidrojenaz ve aldolazın kan dolaşımına salınması gibi tipik belirtiler ortaya çıkar (32, 34).

Rabdomiyoliz, hasarlı iskelet kasının parçalanması ve ardından miyoglobin, sarkoplazmik proteinler ve elektrolitler gibi kas içeriklerinin plazmaya salınmasına sebep olur. Bu ürünler glomerüllerden süzülerek protein çökelmesine sekonder intratübüler obstriksiyon, renal vazokonstriksiyon, inflamasyon ve ROS üretimi ile ilişkili tübüler hasar gibi farklı mekanizmalar yoluyla ABH'ye yol açabilir (35). ABH rabdomiyolizin en ciddi komplikasyonudur ve rabdomiyoliz hastalarının %10 ila %55'inde ABH geliştiği tahmin edilmektedir (5). Ancak rabdomiyolizli hastalarda ABH insidansını belirlemek böbrek hasarının farklı tanımları ve bu çalışmalarda bildirilen etiyoloji ve popülasyon heterojenliği nedeniyle zorlaşmaktadır (35).

Crush Sendromu

Ezilme sendromu olarak da adlandırılan crush sendromu, travmatik kas yaralanmasının sebep olduğu sistemik bozukluktur (36). Travmatik rabdomiyolizde ezilme sendromu görülme sıklığı %30-%50 arasındadır (34). Yaralanan kas grubunda doku ödemi ile birlikte intravasküler hipovolemi oluşur. Kompartman içi basınç hızla artar ve bu durum kas arterioler perfüzyonunda azalmaya neden olur. Perfüzyondaki azalmanın derecesi, ortalama arter basıncı ile kompartman içi basınç arasındaki basınç gradyanına bağlıdır (36). Baskı altındaki kaslarda sarkolemmanın geçirgenliği artar ve sodyum (Na^{+}), klor (Cl^{-}) ve kalsiyum (Ca^{+2}) kas hücresi içine girerken, potasyum (K^{+}), pürinler, fosfat, laktik asit ve diğer organik asitler, miyoglobin, tromboplastin, kreatin fosfokinaz ve kreatin ise hücre içinden hücre dışına çıkar (6). Sonuç olarak kas şişmesiyle rabdomiyoliz meydana gelir (37).

Dolaşımdaki miyoglobin seviyeleri plazmanın protein bağlama kapasitesini aştığında, miyoglobin glomerulusta süzülür ve tübüller içinde çökerek potansiyel olarak hem pigmenti ile ilişkili akut böbrek hasarına neden olur. Crush sendromunun özellikleri arasında hipovolemik şok, hiperkalemi, hiperfosfatemi, hipokalsemi, metabolik asidoz, aritmiler, kalp durması, akut solunum sıkıntısı sendromu, yaygın damar içi pıhtılaşma ve akut böbrek hasarı bulunur. Travma sonrası diğer hastalarda olduğu gibi gecikmiş tromboembolik hastalık, kanama ve sepsis sıklıkla görülür (36).

MİYOGLOBİNÜRİK AKUT BÖBREK HASARI

Miyoglobin; omurgalıların kas dokusunda bulunan, miyositlerin enerji elde etmesine yardımcı olan, demir ve oksijen bağlayıcı bir proteindir (32). Miyoglobin de hemoglobin gibi oksijenin vücutta taşınmasında görev alan kilit proteinlerden biridir (38). Miyoglobinin oksijen afinitesi hemoglobine göre daha fazladır (32). Bununla birlikte, kimyasal yapısı nedeniyle miyoglobin, rabdomiyoliz veya intravasküler hemoliz gibi patolojik durumlarda kan dolaşımına kitlesel olarak salındığında zararlı etkiler gösterebilir (38). İdrarda 5 μg/l'den küçük konsantrasyonlarda miyoglobin saptanması olası bir durumdur. Ancak 20 μg/l'den fazla miyoglobin konsantrasyonu miyoglobinüriye sebep olur (32).

Miyoglobinürik akut böbrek hasarı travmatik veya nontravmatik kas hasarı sonrası miyoglobinüri ortamında gelişen bir durumdur (6, 32). Miyoglobin proksimal tübül hücrelerinde kolayca katabolize olan, glomerüler filtrattan geri emilebilen ve glomerüler bazal membrandan kolayca filtrelenebilen bir proteindir (32). Oksidatif stresi, enfeksiyonu ve hücre ölümünü teşvik eder. Sonuç olarak renal hasar oluşur (39).

Miyoglobin ABH'de üç farklı mekanizma ile rol oynar; miyoglobinin böbrek tübüler hücrelerine doğrudan toksisitesi, intratübüler obstriksiyon ve renal vazokonstriksiyon (32).

Miyoglobin Toksisitesi

Rabdomiyolizle glomerüler filtrasyon bariyeri tarafından süzülen miyoglobin filtrelendikten sonra megalin-kübilin reseptörleri aracılığıyla tübüler hücreler tarafından endositoza tabi tutulur. Tübüler hücrelerin içinde miyoglobin Fe^{+2} formundan Fe^{+3} formuna oksitlenir ve hidroksil radikalinin oluşumuna yol açar. Bunun ardından miyoglobin, redoks döngüsü ile Fe^{+4} miyoglobin formuna dönüştürülür. Bu döngüler ile oluşan radikaller membran yağ asitlerinin lipid peroksidasyonuna sebep olur ve proteinlerin ve

deoksiribonükleik asitin (DNA) değişikliklerine aracılık eden malondialdehit sentezini indükler. Yağ asitlerinin lipid peroksidasyonu güçlü vazokonstriktör olan F2-izoprostanların oluşumuna sebep olur. Ayrıca, rabdomiyolizli hastaların idrarında bulunan reaktif ferrilmiyoglobin vazokonstriksiyona, endotelyal disfonksiyona ve trombosit agregasyonuna katkıda bulunarak güçlü bir nitrik oksit yakalayıcı görev görür. Miyoglobinin oksidasyonunun pH'a bağlı bir süreç olduğuna dikkat etmek önemlidir. Alkali ortam, ferril türlerini stabilize etme eğilimindedir, bu da miyoglobini daha az reaktif hale getirir (35, 40).

İntratübüler Obstriksiyon

Miyoglobin tübüler lümende Tamm-Horsfall proteini ile kombinasyon halinde çökerek özellikle asit pH ortamında tübüler kastlar oluşturabilir. Bu süreç, hacim azalmasıyla ve konsantre idrarla sonuçlanır, kast oluşumu ile miyoglobinin uzaklaşması engellenir ve miyoglobin tübüler lümendeki yıkıcı etkisini arttırır (35).

Renal Vazokonstriksiyon

Rabdomiyoliz sonucu kas dokusunun nekrozu büyük miktarda intravasküler sıvının biriktiği ve hipovolemiye neden olan bir boşluk yaratır. Bu durum sempatik sinir sistemini aktive eder, vazokonstriktör maddelerin salınımını arttırırken vazodilatörlerin salınımını engeller. Kas hasarı ile miyositlerden salınan miyoglobin güçlü bir vazodilatör faktör olan nitrik oksitin (NO) parçalanmasına sebep olur. Sonuç olarak renal vazokonstriksiyon ve iskemi gelişir (41).

OKSİDATİF STRES ve BİYOBELİRTEÇLERİ

Oksidatif stres, aerobik koşullar altında olmanın verdiği bir sonuçtur. ROS normal fizyolojik koşullar altında organizmalarda salınır ve sinyal molekülleri gibi davranır. Bununla birlikte, aşırı üretimleri ve/veya antioksidan sistem arızaları oksidatif strese yol açabilir (42). Hücreler, ROS kaynaklı olarak sürekli oksidatif saldırı altındadır ve karmaşık antioksidan savunma sistemi genellikle bu saldırıyı dengede tutar. Redoks (indirgeme ve oksidasyon) durumunun düzenlenmesi, hücre canlılığı, aktivasyonu, çoğalması ve organ fonksiyonu için kritik önem arz eder. Bu dengedeki patolojik bir kayma, artan ROS konsantrasyonlarına yol açar ve lipidler, proteinler ve DNA gibi hücre bileşenlerinde olumsuz değişikliklere yol açar. Denge; antioksidanlar, enzimatik olmayan antioksidanlar ve diğer

birçok kimyasal tarafından korunur. Dengenin kimyasal toksik maddelere ve fizyolojik uyaranlara doğrudan tepkiden ziyade ayrı redoks yollarıyla düzenlenmekte olduğu görünmektedir. Bu nedenle, oksidatif stres redoks sinyalizasyonundaki ve kontrolündeki bozulma olarak da tanımlanabilir. Küçük bozukluklar homeostatik adaptasyonlarla kompanse edilebilirken önemli bozukluklar onarılamaz hasara ve hücre ölümüne neden olabilir (43).

Oksidatif strese doğrudan ROS sebep olur. ROS serbest radikaller ve radikal olmayanlar olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Serbest radikaller; kendilerine yüksek reaktivite sağlayan, bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron ($^{\bullet}$) içeren moleküllerdir. Eşlenmemiş elektronlarını paylaşan reaktif oksijen türleri, radikal olmayan formlardır. Önemli kimyasal farklılıklara sahiptirler ancak biyomoleküller düzeyinde hasar oluşturmak için benzer mekanizmalar geliştirirler. Serbest radikaller grubuna; karbonat ($CO_3^{\bullet-}$), karbon dioksit ($CO_2^{\bullet-}$), atomik klor ($Cl^{\bullet}$), süperoksit anyon ($O_2 + e \rightarrow O_2^{\bullet-}$), hidroksil radikali ($H_2O_2 + e \rightarrow OH^- + OH^{\bullet}$), hidroperoksil radikali ($O_2^{\bullet-} + H_2O \rightarrow H_2O^{\bullet}$) örnek verilebilir. Radikal olmayanlar grubuna; hidrojen peroksit ($H_2O^{\bullet} + e + H \rightarrow H_2O_2$), peroksinitröz asit (ONOOH), nitril (nitronyum) klorür (NO_2Cl), kloraminler, klor gazı (Cl_2), nitröz asit (HNO_2), nitrosil katyon (NO^+), nitroksil anyon (NO^-), dinitrojen trioksit (N_2O_3), dinitrojen tetraoksit (N_2O_4), nitril klorür (NO_2Cl), nitronyum (nitril) katyonu (NO_2^+), alkil peroksinitritler (ROONO) örnek verilebilir (43).

Tüm oksijen radikalleri ROS'tur ama tüm ROS'lar oksijen radikalleri değildir. Genellikle kısa yarı ömre sahip parçacıklardır ve önemli rollere sahip kimyasallardır. Biyomoleküllerle reaksiyona girerek hücresel hasara neden olurlar. Bununla birlikte hücresel sinyal ajanları olarak da işlev görürler (43).

Biyolojik dokularda ROS'un varlığı lipidler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler gibi biyokimyasal bileşenler üzerinde zararlı bir oksidasyon etkisine yol açar. Bu nedenle böbrek yetmezliğinin patofizyolojisinde de rol oynar. Böbrekte oksidatif stres ve ROS üretimi; su-elektrolit ve asit-baz dengesini bozar, nefronun her bölümünün boşaltım fonksiyonunu bozar ve böbrek düzenleyici mekanizmalarını etkiler. Oksidatif stres, podosit hasarı (ödem, hücre ölümleri), baskılanmış glomerüler filtrasyon hızı, proteinüri gibi olumsuz renal metabolizma olayları ile doğrudan bağlantılıdır (43).

Lipid Peroksidasyonu

Lipid peroksidasyonu geniş bir ürün yelpazesi oluşturan karmaşık bir süreçtir. Lipid peroksidasyonuyla oluşan ürünler genellikle hücre zarlarında bulunan proteinlerle reaksiyona

girerek protein-lipid eklentileri oluştururlar. Bununla birlikte lipid peroksidasyon ürünlerinin diğer reaksiyonları malondialdehit (MDA) veya 4-hidroksinonenal gibi aldehit sentezlerine yol açar. Lipid peroksidasyonu hücresel hasara ve fonksiyon kaybına neden olur. İyon pompalarını veya solunumda elektron taşınmasını bozabilmesi ve ATP üretiminde azalmaya neden olabilmesi gibi örnekler lipid peroksidasyonunun yıkıcı etkilerindendir (43). Lipid peroksidasyonunu değerlendirmek için temel maddeler tiyobarbitürik asit reaktif maddeler ve MDA'dır. MDA lipid peroksidasyonunun değerlendirilmesinde daha spesifik bir biyobelirteçtir (43). MDA fosfolipidlere, proteinlerin amino gruplarına veya nükleik asitlere bağlanarak toksik etki oluşturur. MDA membranda deformasyon, membranın iyon transportu ve enzim aktivitesi gibi özelliklerinde değişiklikler oluşturur (6).

Protein Oksidasyonu

Proteinlerde oksidatif hasar oluşması; reseptörlerin, enzimlerin ve taşıma proteinlerinin işlevini etkiler. Aynı zamanda DNA replikasyonundaki DNA onarım enzimleri veya polimerazlar gibi diğer biyomoleküllere dolaylı hasara katkıda bulunduğu için ciddi sonuçlar doğurur. Tirozin gibi amino asit kalıntılarının oksidasyonu, ditirozin oluşumuna, protein agregasyonuna, çapraz bağlanma ve parçalanma gibi hasarlara neden olur (43). Serbest radikaller proteinler üzerindeki etkileri ile hücre ölümüyle sonuçlanan çeşitli kimyasal reaksiyonları ve metabolik yolları bozar (6, 43).

Nükleik Asit Oksidasyonu

Serbest radikallerin DNA'ya verdiği hasar, proteinlere ve lipidlere verilen oksijen hasarından çok daha az sıklıkta meydana gelir ancak mutajenik veya immünojenik değişiklikler nedeniyle sonuçlar daha ciddidir (43).

Endojen Antioksidanlar

Antioksidanlar, oksitlenebilir substratlara kıyasla düşük konsantrasyonlarda maddenin oksidasyonunu inhibe eden veya önemli ölçüde geciktiren maddelerdir (26). Endojen antioksidanlar protein (enzimatik aktiviteye sahip) ve protein olmayanlar olarak iki gruba ayrılır. Antioksidan savunma sisteminin ilk basamağını katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz başta olmak üzere protein olanlar oluşturur (43).

Protein olmayan en önemli antioksidan glutatyon (GSH), tüm memeli hücrelerinde yaygın olarak bulunan bir metabolittir (43, 44). GSH, reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türleri (RNS) gibi endojen ve eksojen toksik ajanlara karşı bir koruyucu görevi görerek, oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarında yer alır (44). GSH, hücre içi konsantrasyonunun yüksek olması nedeniyle en önemli hücre içi antioksidanlardan biridir. Sitozoldeki GSH konsantrasyonundaki azalma, mitokondriyal ROS üretiminde artışa ve mitokondriyal membranın depolarizasyonuna yol açar. GSH suda çözünen bir antioksidandır ve öncelikle sitozolde bulunan proteinleri korur. $GSHO_2^{\bullet-}$ ve $HO^{\bullet}$ radikalleri, hidrojen peroksit ve klorlu oksidanlarla reaksiyona girer (42).

HÜCRENİN ÖLÜM MEKANİZMALARI

Hücre ölümleri fiziksel hasar sebebiyle spontan bir süreç olarak, aynı zamanda normal gelişim ve fizyoloji sırasında aktif ve genetik olarak programlanmış yollar aracılığıyla ve patojenlere yanıt olarak ortaya çıkar. Morfolojik incelemelere ve ölü hücrelerin DNA parçalanma durumuna dayanarak, hücre ölümü başlangıçta memeli hücrelerinde programlanmış "apoptoz" ve programlanmamış "nekroz" olarak sınıflandırılmıştır**.** Ancak bilimdeki gelişmeler farklı başlıkların doğmasına katkıda bulunmuştur (45).

Nekroz

Rastgele oluşan, genler tarafından kontrol edilemeyen düzensiz bir hücre ölüm sürecidir (46). Dışarıdan gelen fiziksel ve kimyasal uyarılar ile hücrenin iyon dengesi bozulur. DNA tamirinden sorumlu nüklear enzim PARP (Poli ADP-riboz polimeraz) nikotinamid adenin dinükleotidin NAD^+ formunu ikiye bölerek NAD kaybına sebep olur. Bu durumda ATP eksikliği oluşması iyon pompası yetersizliğine yol açar. Böylelikle hücre sıvı alır ve organeller şişer. Plazma membran bütünlüğü bozulur, osmotik basınç nedeniyle hücre patlar. Hücre ölümünü takiben hücre içeriğinin hücreler arası boşluğa salınması enflamasyona sebep olur (46).

Apoptoz

Apoptoz, hücre küçülmesi, nükleer ve sitoplazmik yoğunlaşma ve kromatin parçalanması ile karakterize bir hücre ölümü sürecidir. Apoptozun embriyolojik gelişimde,

doğumdan sonra ve yetişkinlik döneminde önemli rolü vardır (47). Apoptozu tetikleyen hücre içi sinyaller; DNA hasarı, hücre içi Ca^{+2} düzeyi artışı, pH azalışı, metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları ve hipoksi olarak sayılabilir. Hücre dışı sinyaller ise büyüme ve üreme faktörlerinin yetersizliği, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (FAS – FAS ligand aracılığı ile apoptoz, tümör nekroz faktör aracılığı ile apoptoz), sitotoksik T lenfosit ve dış etkenler (iskemi, toksinler, kemoterapötik ilaçlar, radyasyon vs.)'dir. Her iki sinyal yolunda da kaspazlar görev alır. Hücre dışı sinyaller ekstrinsik yol ile apoptozu indüklerken, hücre içi sinyaller instrinsik apoptoz yolunu devreye sokar (46).

Otofajiye Bağlı Hücre Ölümü

Otofaji, hücre homeostazına katkıda bulunan hücresel materyallerin özellikle gereksiz veya işlevsiz bileşenlerin sitoplazmadan lizozomlara parçalanması için iletildiği bir hayatta kalma mekanizmasıdır. Bununla birlikte, otofajinin hücre ölümüne aracılık ettiği veya onunla ilişkili olduğu bildirilmektedir. Katı bir otofaji gereksinimi olan hücre ölümü, otofajiye bağlı hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır (47).

Parthanatos

Parthanatos, bir düzenlenmiş nekroz şeklidir. Patojenik olarak yüksek seviyelerde poli (ADP-riboz) polimeraz 1 (PARP1) aktivitesinin etkilerinin aracılık ettiği programlanmış bir hücre ölüm yolunu tanımlar. PARP1, güçlü bir nükleer NAD^+ tüketicisidir, bu nedenle aşırı aktifleştirilmiş PARP1, potansiyel olarak ölümcül NAD^+ tükenmesi yoluyla hücre ölümüne sebep olur (47).

Piroptoz

Piroptoz, düzenlenmiş nekroz başlıkları içinde yerini alır. Piropitoz bakteriyel saldırılara yanıt olarak kaspaz-1 aracılı monosit ölümü olarak doğuştan gelen bağışıklık tepkilerini düzenleyen bir hücre ölümü şeklidir (47).

Ferroptoz

Ferroptoz bir düzenlenmiş nekroz şeklidir. Oksidatif stresle karşılaşıldığında ortaya çıkan, düzenlenmiş hücre ölümünün demire bağımlı bir şekli olarak tanımlanır. Ferroptozun

birçok hastalıkta rol oynadığı bilinmektedir. Lipofilik antioksidanlar, lipid peroksidasyon inhibitörleri ve demir şelatörleri tarafından inhibe edilebilir (47).

NEKROPTOZİS

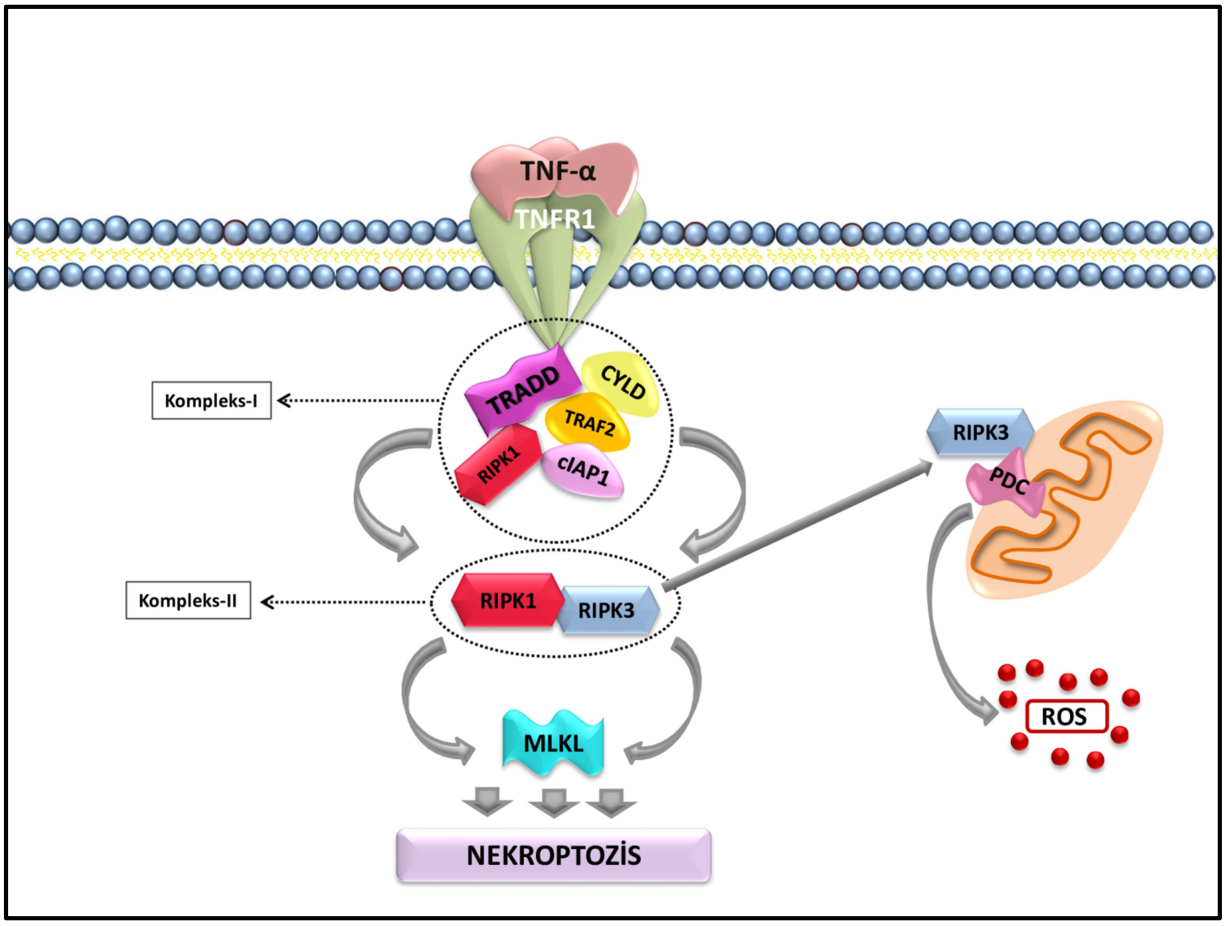
Nekroptozis, birçok insan hastalığında önemli rol oynayan, genetik olarak düzenlenmiş bir hücre ölümü şeklidir. Programlanmış bir hücre ölümü olan apoptozun aksine nekroptozis, hücre şişmesi ve plazma zarı yırtılmasının temel özellikleri ile düzenlenmiş nekrozdur (48). Nekroptozis morfolojik olarak parçalanmış kromatin, şişmiş hücre gövdesi ve organeller, hücre membranında parçalanma ve otofaji ile karakterizedir (49). Hücre içi ve hücre dışı uyaranlar nekroptozisi tetikler. Nekroptotik sinyal yolunun başlıca anahtar bileşenleri mixed lineage kinase domain like pseudokinase (MLKL), RIPK1, RIPK3'tür (49).

Nekroptozis Yolları

Tümör nekroz faktör reseptörü 1 (TNFR1) ve nekroptozis: Nekroptoziste TNFR1, enflamasyonu düzenleyen birçok genin ekspresyonunu indükler. Bununla birlikte, tümör nekroz faktör alfa (TNF-α) ayrıca hücre ölümünü de indükleyebilir. Tümör nekroz faktör'ün (TNF) neden olduğu hücre ölümü, TNF-α'nın hücre zarı üzerinde TNFR1'e bağlanmasını ve hücrede farklı kompleksler oluşturmak için bir dizi protein ile etkileşime girmesini gerektirir. Tümör nekroz faktörü reseptörü tip 1-ilişkili ölüm alanı proteini (TRADD), RIPK1, TNF reseptörü ile ilişkili faktör 2 (TRAF2), apoptoz protein 1'in hücresel inhibitörü (cIAP1), silindirindromatoz ve CYLD geni birleşerek kompleks-I'i oluşturur (49). Kaspaz-8 aktivitesinin yokluğunda yani apoptozisin gerçekleşemediği durumda RIPK1, RIPK3'ü alır ve fosforile ederek ripoptozom adı verilen kompleks-II'yi oluşturur. RIPK1/RIPK3 kompleksi, MLKL'yi alır ve fosforile eder. Fosforile edilen MLKL oligomerize olur, böylece nekrozomu oluşturur (11, 50). İnflamasyonda rol alan NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3), MLKL'nin oligomerize olması ile aktive olur. Böylelikle hücre içi inflamasyon süreci de başlamış olur (51, 52). MLKL oligomerleri, plazma zarında büyük gözenekler oluşturur. Sonuç olarak oluşan gözenekler iyon akışına, hücre şişmesine ve membran lizisine sebep olarak nekroptotik hücre ölümüne ve ardından hücre içi materyalin kontrolsüz salınımına yol açar (11).

RIPK3 mitokondriyal ROS üretiminin kilit düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır. RIPK3, piruvat dehidrojenaz kompleksi (PDC) gibi mitokondriyal enzimlerle etkileşime girer ve enzim aktivasyonunu gerçekleştirir. Enzim aktivasyonu, mitokondriyal solunum zinciri tarafından ROS oluşumuna neden olur. ROS oluşumu nekroptozisin bir parçasıdır. Bu sebeple mitokondri nekroptozis oluşumunda kolaylaştırıcı etki göstermiş olur (53).

Nekroptozisin TNFR1 ile indüklenmesi ile oluşum mekanizması Şekil 1'de gösterilmiştir.

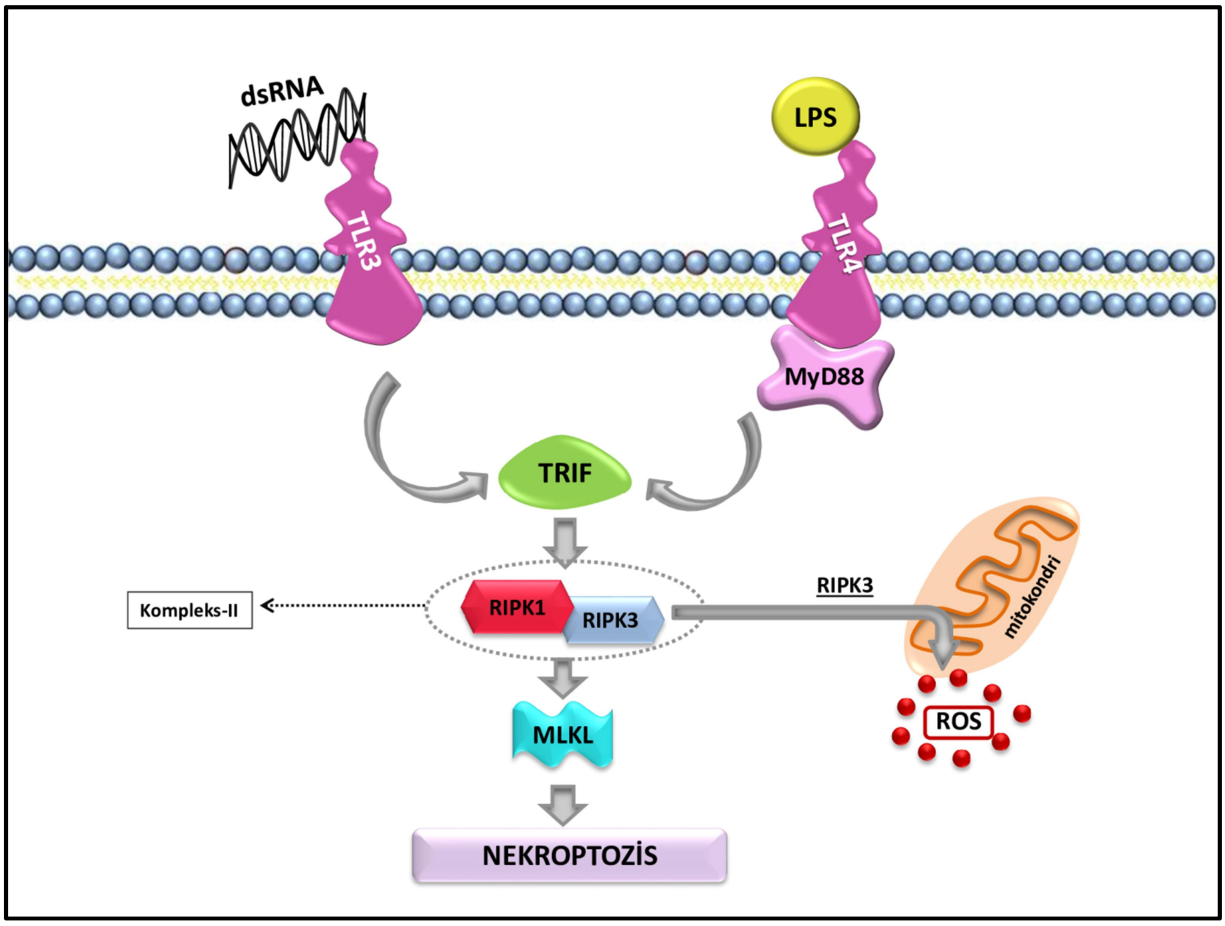


Şekil 1. TNFR1'in indüklediği nekroptozis

Toll like receptor ve nekroptozisin düzenlenmesi: TLR'ler bakteriler, virüsler, mantarlar, parazitler gibi patojenlerle ilişkili birçok moleküler modele yanıt verirler. TLR3 viral çift sarmallı RNA veya yapay analogları algılarken TLR4 lipopolisakarite (LPS) yanıt verir. TLR3 ve TLR4'ün ligandlara bağlanmasından sonra Toll/IL-1 (Toll-interlökin-1) reseptörü alanı içeren adaptörler alınır. Adaptörlerin alınmasının ardından tip I interferon (IFN) yanıtlarına yol açan inflamatuar sitokinler salınır. TLR3 için Toll/IL-1 receptor

domaincontaining adaptor inducing IFN-β/TIR domain-containing adaptor molecule 1 (TRIF/TICAM-1) olmak üzere yalnızca bir adaptör protein vardır. TLR4 yolu ise TRIF veya myeloid differentiation primary response 88 (MyD88) ile devam eder. Kaspaz-8 aktivasyonunu baskıladığında TLR ye gelen uyarılar nekroptozisi indükler (49). RIPK1, RIPK3'ü alır ve fosforile ederek kompleks-II'yi oluşturur. RIPK1/RIPK3 kompleksi, MLKL'yi alır ve fosforile eder. Nekroptozis gerçekleşir. RIPK3 TNFR1'in indüklediği nekroptozis mekanizmasında olduğu gibi TLR ile düzenlenen nekroptozis mekanizmasında da mitokondride ROS üretimini tetikler (11).

Nekroptozisin TLR yolu ile oluşma mekanizması Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. TLR ile nekroptozisin düzenlenmesi

Nekroptozisin İnhibisyonu

Nekroptozisin keşfi bu ölüm sürecinin düzenleyici bileşenlerini, yani RIPK1, RIPK3 ve MLKL'yi hedef alan çeşitli inhibitörlerin geliştirilmesine yol açmıştır. Nekrostatinler, RIPK1'in kinaz aktivitesininin inhibisyonuna sebep olan triptofan bazlı bileşiklerdir.

Nekrostatin-1 ilk olarak nekroptozis antagonistleri için bir kimyasal tarama sırasında keşfedilmiştir. Daha sonra Nec-1'in aktif olmayan bir konformasyonda RIPK1'e bağlandığı ve stabilize ettiği saptanmıştır. Bu nedenle hücreleri nekroptozise karşı koruduğu gösterilmiştir. Nec-1 birçok hastalık modelinde kullanılmıştır ve güçlü klinik potansiyel göstermiştir. Ek olarak Nec-1 veya Nec-1'ler orta derecede etkiye ve zayıf farmakokinetik özelliklere sahiptir. GSK2982772 klinik deneylerde test edilen bir RIPK1 inbitörüdür. RIPK3 de nekroptoziste spesifik bir düzenleyicidir. RIPK3'e yüksek potansiyel ile bağlanabilen ve onu engelleyebilen birkaç bileşik keşfedilmiştir ancak bu bileşikler tek başına uygulandıklarında konsantrasyona bağlı bir şekilde apoptozu indükler. MLKL, nekroptozis oluşumunda spesifik bir hedef olabilir. RIPK1 ve RIPK3 ile karşılaştırıldığında, MLKL'yi hedefleyen daha az inhibitör keşfedilmiştir. En yaygın olarak kullanılan MLKL inhibitörü nekrosülfonamiddir. Nekrosülfonamid sadece MLKL'nin insan varyantına bağlanabildiğinden klinik öncesi hastalık modellerinde değerlendirilmesi zor olmuştur (13).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamızda Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Birimi'nde üretilen ve standart laboratuvar koşullarında (22 ± 1^0C, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda) tutulan 2-2,5 aylık Wistar dişi sıçanlar kullanıldı. Tüm deney aşamalarında aynı birimde tutulan sıçanlara standart sıçan yemi ve musluk suyu verildi. Çalışma için Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (Ek-1) onay alındı (2021.03.01).

Çalışmamızda sıçanlar 4 gruba ayrıldı. Her grupta 8 adet olmak üzere toplam 32 adet sıçan kullanıldı. 1. grup ve 3. grup sıçanlar fizyolojik serum (FS), diğer gruplar intramusküler hipertonik (%50) gliserol enjeksiyonundan 24 saat önce susuz bırakıldı. Enjeksiyonlardan sonra su alımı serbest bırakıldı. 1. ve 3. grup sıçanlara fizyolojik serum (FS), 2 ve 4. gruplardaki sıçanlara miyoglobinürik ABH oluşturmak için %50'lik gliserol solüsyonundan 5 ml/kg'a göre bulunan toplam hacim arka bacak kaslarına enjekte edildi. Tüm gruplara verilecek im (intramüsküler) ve ip (intraperitoneal) enjeksiyon hacimleri eşit tutuldu**.**

Kontrol Grubu sıçanlara 5 ml/kg dozunda FS'nin intramüsküler enjeksiyonundan 1 saat sonra intraperitoneal yolla DMSO verildi.

ABH Grubu sıçanlara 5 ml/kg dozunda intramüsküler gliserol enjeksiyonundan 1 saat sonra intraperitoneal yolla DMSO verildi.

NEC Grubu sıçanlara 5 ml/kg dozunda intramüsküler FS enjeksiyonundan 1 saat sonra intraperitoneal yolla 1.63 mg/kg nekrostatin-1 verildi.

ABH+NEC Grubu sıçanlara 5 ml/kg dozunda intramüsküler gliserol enjeksiyonundan 1 saat sonra intraperitoneal yolla 1.63 mg/kg nekrostatin-1 verildi.

Sıçanlar gliserol enjeksiyonundan sonra, metabolik kafese alınarak 24 saatlik idrarları toplandı. Sıçanların 10 mg/kg rompun ve 50 mg/kg ketamin anestezisi altında kanları ve her iki böbreği alındı, eksanguinasyon yöntemi ile ötenazi uygulandı. Böbrekler uzunlamasına ikiye bölünerek böbreğin bir yarısı histopatolojik inceleme için % 10'luk formalin solüsyonuna konuldu, diğer yarısı iki parça halinde uygun tampon ile soğuk şartlarda homojenize edilip ependorf tüplere konularak analizler yapılıncaya kadar -80^0C'de saklandı. Kanlar tüplere alınarak santrifüj edildikten sonra serumları laboratuar çalışmaları yapılıncaya kadar -80^0C'de saklandı.

Kullanılan Cihazlar

Spektrofotometre	: Spectronic Unicam Helios α, İngiltere
Hassas terazi	: Mettler Toledo, AB204-S, İsviçre
Soğutmalı santrifüj	: MPW 350R, Polonya
Su banyosu	: Nickel Clifton Elektro LTD, İngiltere
Otomatik pipetler	: Biohit Proline, Finlandiya, Mettler Toledo, İsviçre Eppendorf Multipipette/Repeate(Xstream), Amerika
Vorteks	: Heidolp, Almanya
Derin dondurucu	: Thermo Elektron Corporation, USA
pH metre	: InoLab, Level 1, Almanya
Manyetik karıştırıcı	: Remi Equipments, Hindistan
Homojenizatör	: Polytron Kinematica AG, İsviçre
Otoanalizör	: C16000, Architect, ABBOTT, Amerika
Distile su cihazı	: Millipore, France
Cam malzemeleri	: Deney tüpleri, beherler vb.
Elisa plaka okuyucu	: Bio Tek Instruments, Inc (USA)
Elisa plaka yıkayıcı	: Bio Tek Instruments, Inc (USA)

Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Nekrostatin-1	:	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH Seinheim, Almanya)
Gliserol	:	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH Seinheim, Almanya)

Tiyobarbitürik asit	:	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH Seinheim, Almanya)
Sodyum dodesil sülfat	:	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH Seinheim, Almanya)
NaCl	:	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH Seinheim, Almanya)
DTNB	:	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH Seinheim, Almanya)
NaOH	:	(Merck&Co., Inc., Darmstadt, Almanya)
Na-K tartarat	:	(Merck&Co., Inc., Darmstadt, Almanya)
Folin fenol reaktifi	:	(Merck&Co., Inc., Darmstadt, Almanya)
KH_2PO_4	:	(Merck&Co., Inc., Darmstadt, Almanya)
Na_2HPO_4	:	(Merck&Co., Inc., Darmstadt, Almanya)
EDTA	:	(Merck&Co., Inc., Darmstadt, Almanya)
KCl	:	(Merck&Co., Inc., Darmstadt, Almanya)
MPA	:	(Merck&Co., Inc., Darmstadt, Almanya)
Na_2HPO_4	:	(Merck&Co., Inc., Darmstadt, Almanya)
$CuSO_4$	:	(Panreac, İspanya)

Biyokimyasal Çalışmalar

Serum numunelerinde üre, kreatinin, sodyum (Na^+) düzeyleri incelendi. Bu parametreler böbrek fonksiyonlarının değerlendirilmesinde kullanıldı. Ölçümler Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Laboratuvarı' nda bulunan otoanalizör (AU5800; Beckman Coulter Inc., CA, USA) kullanılarak yapıldı. İdrar numunelerinde kreatinin ve sodyum (Na^+) ölçümleri Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Laboratuvarı' nda bulunan otoanalizör (AU5800; Beckman Coulter Inc., CA, USA) kullanılarak yapıldı.

Böbrek Homojenizasyonu

Böbrek dokuları kesildi. Bistüri ile kesilen dokular tüplere konuldu. Fosfat tamponu (PBS) ile 1/10 sulandırılan dokular buz üzerinde tutularak homojenizatör ile homojenize edildi. Hazırlanan homojenatlar 1500 g 15 dk +4 ^{0}C'de santrifüj edildi. Süpernatant kısmı ayrıldı. Ayrılan süpernatantlar; RIPK1, RIPK3, MLKL, NLRP3, TNFalfa, MDA ve GSH düzeyi ölçümlerinde kullanıldı.

Malondialdehit Miktar Tayini

Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile sıcak ve asit ortamda reaksiyona girmesi sonucu oluşan renk spektrofotometrik olarak ölçüldü (54).

Çözeltiler:

1. % 8,1'lik Sodyum dodesil sülfat (SDS)

2. % 20'lik Asetik asit (NaOH ile pH 3,5'e ayarlandı)

3. % 0,8'lik Tiyobarbitürik asit (TBA)

Deneyin yapılışı:

0,2 ml 10 kat dilüe edilmiş doku homojenatı; 0,2 ml % 8,1'lik SDS, 1,5 ml % 20'lik asetik asit, 1,5 ml % 0,8'lik TBA ve 0,6 ml distile su ile karıştırıldı. Karışım 95 ^{o}C'deki sıcak su banyosunda 1 saat tutuldu. Musluk suyu ile soğutulduktan sonra absorbanslar homojenat içermeyen ayıraç körüne karşı 650 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu.

Sonuçların hesaplanması:

$$C\ (nmol/ml) = \frac{A \times Vt \times 10^{9}}{E \times Vs \times L \times 10^{3}}$$

A : Absorbans

E : Tüketim katsayısı ($1.56\ 10^{5}\ M^{-1}\ cm^{-1}$)

Vt : Total reaksiyon hacmi

Vs : Total reaksiyon içindeki numune hacmi

L : Küvet çapı

10^{9} : Molün nanomole çevrilmesi

10^{3} : Litrenin mililitreye çevrilmesi

Sonuçlar MDA nmol/g yaş doku olarak ifade edildi.

Glutatyon Düzeyinin Ölçümü

Glutatyon içeriğinin belirlenmesi için, doku homojenatlarındaki serbest sülfidril gruplarının Ellman ayıracı ile oluşturduğu renk spektrofotometrik olarak belirlendi (55).

Çözeltiler:

1. Proteinsizleştirme çözeltisi: 120 g NaCl, 6.68 g metafosforik asit ve 0.8 g sodyum EDTA tartıldı ve 400 ml distile suda çözüldü.

2. 0.3 M Disodyum fosfat (Na2HPO4)

3. 1 mM Elman ayıracı: 4 mg 5.5-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) (DNTB), 10 ml %1' lik sodyum sitrat çözeltisinde çözüldü.

4. Glutatyon standardı: 10 mg/dl GSH

Deneyin yapılışı:

1.5 ml 0.15 M KCI ve 3 ml proteinsizleştirme çözeltisi, 0.5 ml doku homojenatı üzerine eklendi. Bu karışım 3000xg' de 20 dk santrifüj edildi. Ardından 0.5 ml süpernatant alınarak üzerine 2 ml M Na2HPO4 ve 0.5 ml Ellman ayıracı eklendi. Absorbanslar homojenat içermeyen ayıraç körüne karşı 412 nm' de okundu. GSH düzeyleri ekstinksiyon katsayısı (Σ =1.36 104 M-1cm-1) kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar μmol GSH/g doku olarak belirtildi.

Protein Miktarı Tayini

Protein miktarı tayini Lowry metoduna göre yapıldı (56).

Çözeltiler:

A Çözeltisi: %2' lik Na_2CO_3' ın 0,1 N NaOH' teki çözeltisi

B Çözeltisi: %1' lik $CuSO_4$ çözeltisi

C Çözeltisi: %2' lik Sodyum Potasyum tartarat çözeltisi

D Çözeltisi: 98 hacim A çözeltisi+1 hacim B çözeltisi+1 hacim C çözeltisi karışımı

E Çözeltisi: 1 hacim Folin Fenol belirteci+1 hacim distile su karışımı

Bovin Serum Albumin (BSA) Çözeltisi: Standart protein çözeltisi olarak kullanılan BSA 10 mg/ml konsantrasyondaki stok çözeltiden 1, 2, 3, 5, 7, 5, 10 mg/ml' lik çözeltileri hazırlandı.

Deneyin yapılışı:

Test ve standart tüplerine 490 μl, kör tüpüne 500 μl distile su kondu. Tüm tüplere 2,5 ml D çözeltisi ilave edildikten sonra, test tüplerine 10 kat dilüe edilmiş numuneden 10μl; standart tüplerine de 10 μl her bir standarttan ilave edildi ve tüpler vorteks ile iyice karıştırıldı. Karanlıkta oda ısısında 10 dk. Bekletildikten sonra, tüm tüplere 250 μl E çözeltisi eklendi. 25°C' de 30 dk beklediltikten sonra, spektrofotometrede 650 nm' de köre karşı sıfırlanarak okuma yapıldı.

Histolojik Çalışmalar

Deney sonunda sakrifiye edilen hayvanların böbrekleri çıkarılarak %10'luk nötral formalin ile fikse edildi. Ardından çeşme suyu altında yıkanan doku örnekleri artan alkol serilerinden (%70, %90, %96, %100) geçirilerek daha sonra şeffaflaştırma için toluende bekletildi ve parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklarından 5 mikrometre (µm)'lik kesitler alınarak hematoksilen ve eozin (H&E) ile boyandı. Ayrıca, proksimal tübül fırçamsı kenar kaybını belirlemek amacıyla periyodik asit Schiff (PAS) prosedürü uygulandı. H&E ve PAS boyalı preparatlar ışık mikroskobunda (Olympus BX51 mikroskop, DP20 dijital kamera ataçmanlı, Tokyo, Japonya) farklı büyütmelerde incelenerek fotoğraflandırıldı.

Böbreğin korteks ve dış medulla bölgesinin histopatolojik değerlendirmesi, Al Asmari ve ark. ile Yang ve ark. tarafından daha önce tanımlanan skorlama kriterlerinin modifiye edilmesiyle semikantitatif olarak yapıldı. Histopatolojik değerlendirmede tübüler hasar; tübüler dilatasyon, tübüler vakuolizasyon, tübüler nekroz, kast oluşumu, intratübüler debris ve fırçamsı kenar kaybı olarak tanımlandı. Doku hasarının boyutu, hasar gösteren tübüllerin yüzdesinin 0-4 arasında derecelendirmesi ile aşağıdaki şekilde yapıldı; 0= tübüler değişiklik yok, 1= <%25 (hafif), 2= %25-%50 (orta), 3= %50-%75 (şiddetli), 4= >%75 (çok şiddetli). Tüm değerlendirmeler birbirinden bağımsız iki araştırmacı tarafından kör bir şekilde her hayvandan x200 büyütmede elli alan üzerinde yapılarak ortalaması alındı.

İstatistiksel Analiz

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak gösterildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov Smirnov testi ile değerlendirildi. Serum üre ve serum sodyum parametreleri için Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve gruplar arası karşılaştırmalarda Tukey testi kullanıldı. Diğer parametreler parametrik test şartlarını sağlamadığı için Kruskal-Wallis ve gruplar arası karşılaştırmalarda Dunnett T3 testi kullanıldı. $P<0.05$ değeri istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Kontrol grubunda 2, Nec grubunda 1 sıçandan idrar örneği alınamadı. ABH+Nec grubunda 1 sıçandan kan örneği alınamadı. Gruplarda herhangi bir ölüm görülmedi.

Tüm gruplardaki sıçanlara ait serum üre düzeyi mg/dl, serum kreatinin düzeyi mg/dl, serum sodyum düzeyi mmol/l, idrar kreatinin düzeyi mg/dl, idrar sodyum mmol/l, böbrek RIPK1 düzeyi ng/mL/mg protein, böbrek RIPK3 düzeyi ng/mL/mg protein, böbrek MLKL düzeyi ng/mL/mg protein, böbrek TNF alfa düzeyi pg/mL/ mg protein, böbrek NLRP3 düzeyi ng/mL/mg protein, böbrek MDA düzeyi nmol/mg protein, böbrek GSH düzeyi µMol/mg protein olarak hesaplandı. Grupların serum, idrar ve böbrek dokularına ait bulgular ve istatistiki değerlendirme sırasıyla Tablo 1, 2 ve 3'te verilmiştir.

Tablo 1. Grupların serumlarına ait parametreler

Parametreler	Kontrol	ABH	NEC	ABH+NEC	p (p<0,05 ise anlamlı)	
	ORT±SD	ORT±SD	ORT±SD	ORT±SD		
Serum Kreatinin mg/dL	0,2350 ± 0,0207	1,521 ± 0,5322	0,2425 ± 0,01909	3,086 ± 1,096	**K - ABH**	**0,0008**
					K - NEC	p>0,9999
					K - ABH + NEC	**p<0,0001**
					ABH - NEC	**0,0009**
					ABH - ABH+NEC	**0,0001**
					NEC - ABH+NEC	**p<0,0001**
Serum Sodyum mmol/L	139,6 ± 2,2	138,4 ± 3,623	32,63 ± 7,15	135,3 ± 9,394	K - ABH	0,9766
					K - NEC	**p<0,0001**
					K - ABH + NEC	0,5290
					ABH - NEC	**p<0,0001**
					ABH - ABH+NEC	0,7649
					NEC - ABH+NEC	**p<0,0001**
Serum Üre mg/dL	36,5 ± 5,529	227 ± 69,87	32,63 ± 7,15	334,6 ± 77,04	**K - ABH**	**p<0,0001**
					K - NEC	0,9987
					K - ABH + NEC	**p<0,0001**
					ABH - NEC	**p<0,0001**
					ABH - ABH+NEC	**0,002**
					NEC - ABH+NEC	**p<0,0001**

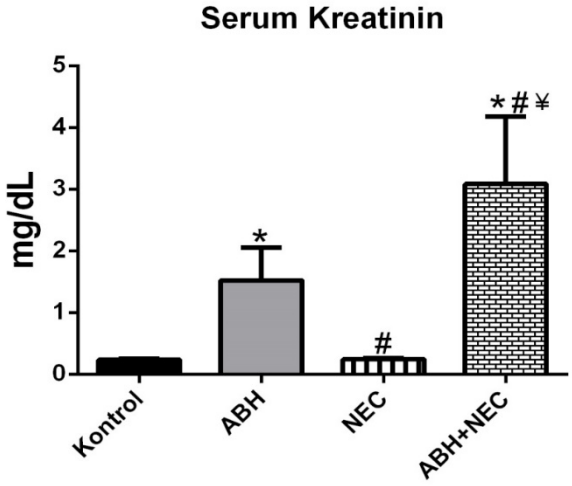
Tablo 2. Grupların idrarlarına ait parametreler

Parametreler	Kontrol	ABH	NEC	ABH+NEC	p (p<0,05 ise anlamlı)	
	ORT±SD	ORT±SD	ORT±SD	ORT±SD		
İdrar Kreatinin mg/dL	48,48 ± 11,5	23,84 ± 4,296	50,97 ± 7,468	23,87 ± 4,692	**K - ABH**	**p<0,0001**
					K - NEC	0,9284
					K - ABH + NEC	**p<0,0001**
					ABH - NEC	**p<0,0001**
					ABH - ABH+NEC	p>0,9999
					NEC - ABH+NEC	**p<0,0001**
İdrar Sodyum mmol/L	145 ± 32,32	37,88 ± 11,58	144 ± 22,05	47,43 ± 18,16	**K - ABH**	**p<0,0001**
					K - NEC	0,9998
					K - ABH + NEC	**p<0,0001**
					ABH - NEC	**p<0,0001**
					ABH - ABH+NEC	0,8251
					NEC - ABH+NEC	**p<0,0001**

Tablo 3. Grupların böbrek dokularına ait parametreler

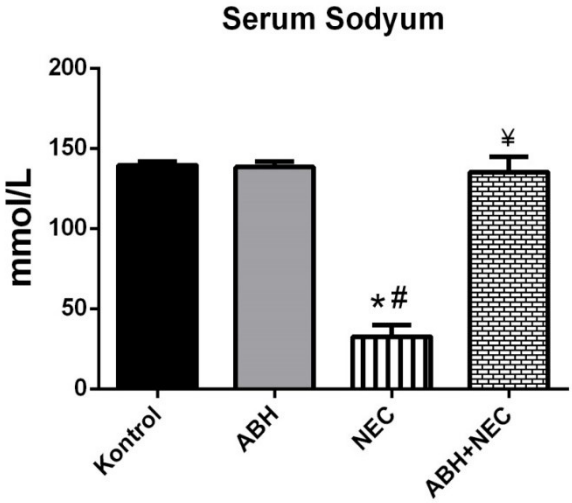
Parametreler	Kontrol	ABH	NEC	ABH+NEC	p (p<0,05 ise anlamlı)	
	ORT±SD	ORT±SD	ORT±SD	ORT±SD		
RIPK1 ng/mL/mg protein	9,658 ± 0,8724	9,48 ± 0,6008	8,724 ± 0,2687	8,948 ± 0,4067	K - ABH	0,9431
					K - NEC	**0,0361**
					K - ABH + NEC	0,2068
					ABH - NEC	0,1126
					ABH - ABH+NEC	0,442
					NEC - ABH+NEC	0,917
RIPK3 ng/mL/mg protein	47,42 ± 4,608	43,11 ± 9,346	39,61 ± 3,673	32,71 ± 8,537	K - ABH	0,6093
					K - NEC	0,1378
					K - ABH + NEC	**0,0013**
					ABH - NEC	0,7501
					ABH - ABH+NEC	**0,0286**
					NEC - ABH+NEC	0,2207
MLKL ng/mL/mg protein	8,717 ± 0,819	10,67 ± 1,818	13,03 ± 5,989	10,18 ± 1,663	0,1091	
TNF alfa pg/mL	1346 ± 394,7	887,1 ± 951,1	979,5 ± 454,4	1469 ± 205,1	0,1601	
NLRP3 ng/mL/mg protein	43,76 ± 7,132	36,22 ± 6,413	34,76 ± 3,769	27,99 ± 5,278	K - ABH	0,0654
					K - NEC	**0,021**
					K - ABH + NEC	**p<0,0001**
					ABH - NEC	0,9576
					ABH - ABH+NEC	**0,0391**
					NEC - ABH+NEC	0,1135
MDA nmol/mg protein	0,6871 ± 0,2205	0,5832 ± 0,1596	0,6509 ± 0,09795	0,4762 ± 0,1252	0,0802	
GSH µMol/mg protein	323,2 ± 239,9	189,7 ± 62,56	265,1 ± 132,2	238,2 ± 173,9	0,4494	

Gruplar arası serum kreatinin düzeylerinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlendi (p<0,0001). Serum kreatinin düzeylerinin gruplara göre dağılımı Şekil 3'te gösterildi.



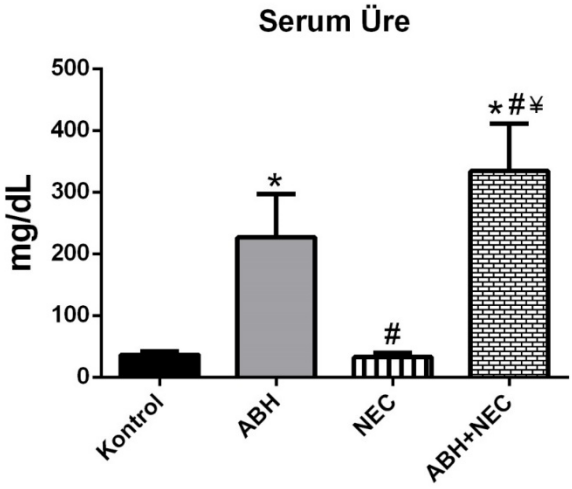
Şekil 3. Gruplar arası serum kreatinin düzeylerinin dağılımı
*Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05
#ABH grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05
¥Nec grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05

Gruplar arası serum sodyum düzeylerinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlendi (p<0,0001). Serum sodyum düzeylerinin gruplara göre dağılımı Şekil 4'te gösterildi.



Şekil 4. Gruplar arası serum sodyum düzeylerinin dağılımı
*Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05
#ABH grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05
¥Nec grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05

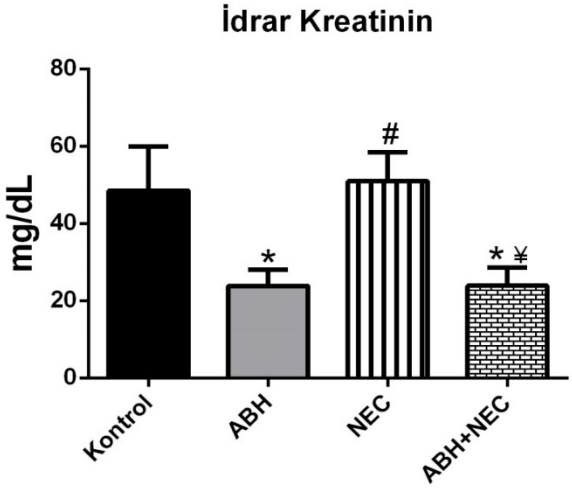
Gruplar arası serum üre düzeylerinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlendi (p<0,0001). Serum üre düzeylerinin gruplara göre dağılımı Şekil 5'te gösterildi.



Şekil 5. Gruplar arası serum üre düzeylerinin dağılımı

*Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05
#ABH grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05
¥Nec grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05

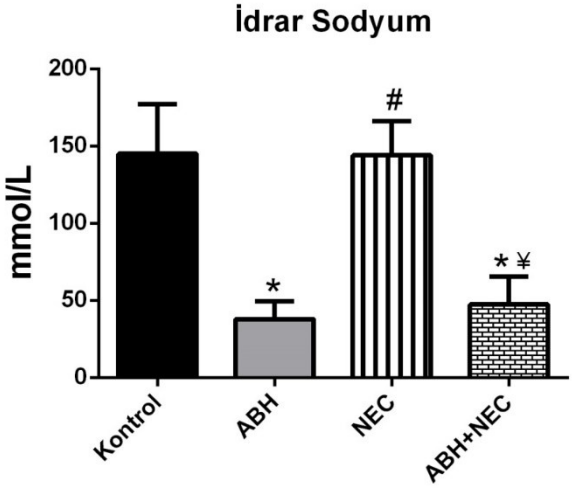
Gruplar arası idrar kreatinin düzeylerinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlendi (p<0,0001). İdrar kreatinin düzeylerinin gruplara göre dağılımı Şekil 6'da gösterildi.



Şekil 6. Gruplar arası idrar kreatinin düzeylerinin dağılımı

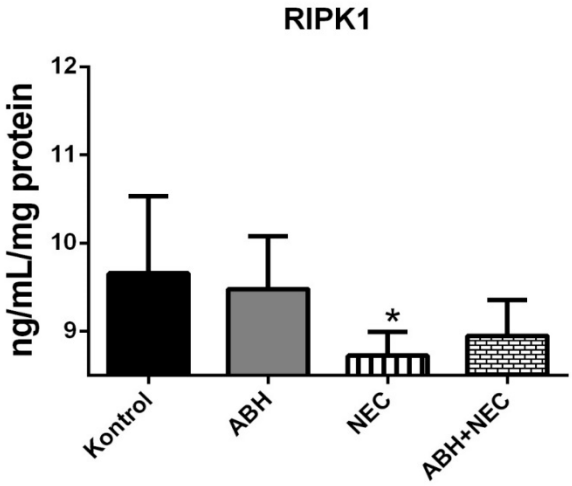
*Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05
#ABH grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05
¥Nec grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05

Gruplar arası idrar sodyum düzeylerinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlendi (p<0,0001). İdrar sodyum düzeylerinin gruplara göre dağılımı Şekil 7'de gösterildi.



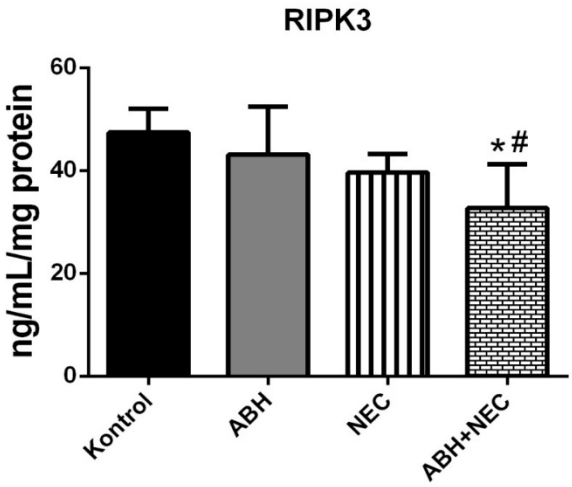
Şekil 7. Gruplar arası idrar sodyum düzeylerinin dağılımı
*Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05
#ABH grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05
¥Nec grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05

Gruplar arası RIPK1 düzeylerinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlendi (p=0,028). RIPK1 düzeylerinin gruplara göre dağılımı Şekil 8'de gösterildi.



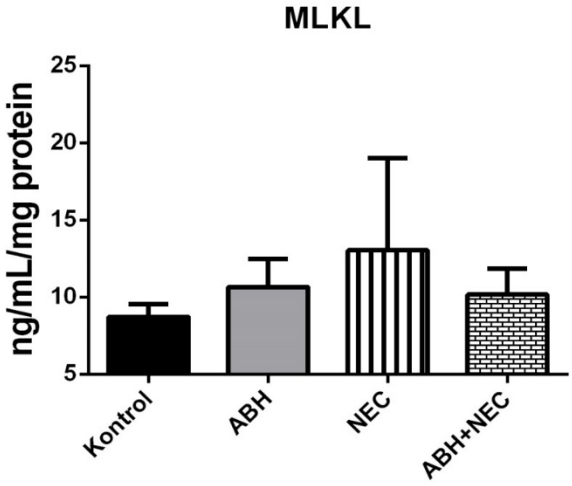
Şekil 8. Gruplar arası RIPK1 düzeylerinin dağılımı
*Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05

Gruplar arası RIPK3 düzeylerinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlendi (p=0,002). RIPK3 düzeylerinin gruplara göre dağılımı Şekil 9'da gösterildi.



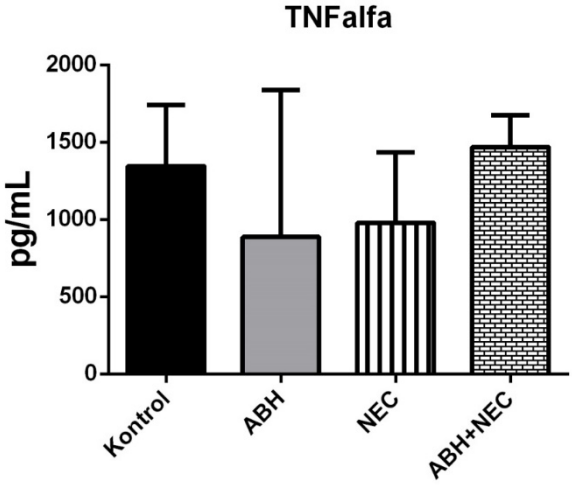
Şekil 9. Gruplar arası RIPK3 düzeylerinin dağılımı
*Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05
#ABH grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05

Gruplar arası MLKL düzeylerinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmedi (p=0,1091). MLKL düzeylerinin gruplara göre dağılımı Şekil 10'da gösterildi.



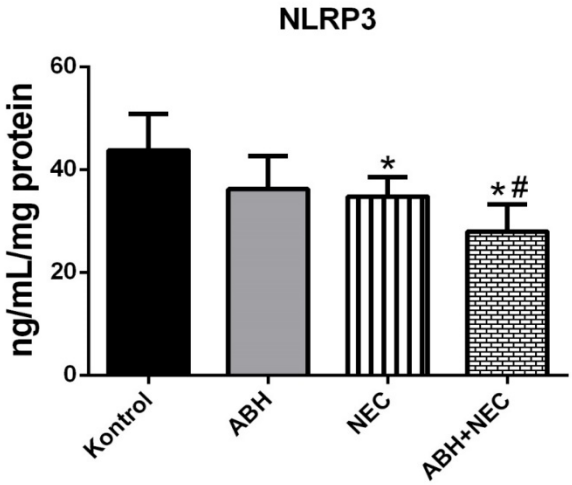
Şekil 10. Gruplar arası MLKL düzeylerinin dağılımı

Gruplar arası TNF alfa düzeylerinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmedi (p= 0,1601). TNF alfa düzeylerinin gruplara göre dağılımı Şekil 11'de gösterildi.



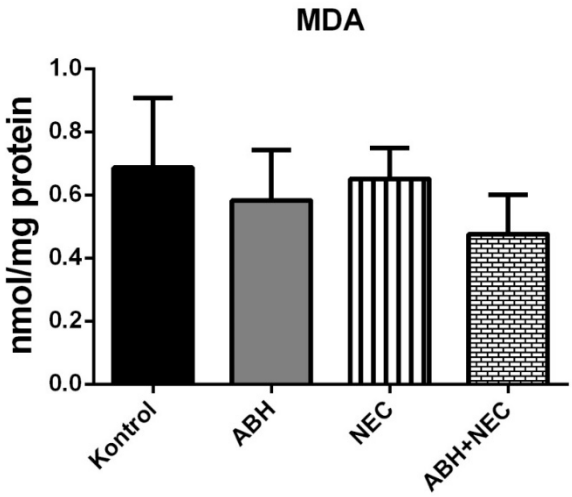
Şekil 11. Gruplar arası TNF alfa düzeylerinin dağılımı

Gruplar arası NLRP3 düzeylerinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlendi (p= 0,0001). NLRP3 düzeylerinin gruplara göre dağılımı Şekil 12'de gösterildi.



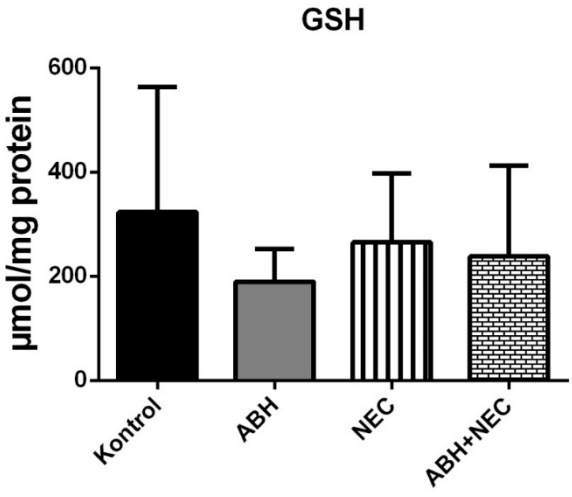
Şekil 12. Gruplar arası NLRP3 düzeylerinin dağılımı
*Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05
#ABH grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05

Gruplar arası MDA düzeylerinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmedi (p= 0,0802). MDA düzeylerinin gruplara göre dağılımı Şekil 13'te gösterildi.



Şekil 13. Gruplar arası MDA düzeylerinin dağılımı

Gruplar arası GSH düzeylerinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmedi (p= 0,4494). GSH düzeylerinin gruplara göre dağılımı Şekil 14'te gösterildi.



Şekil 14. Gruplar arası GSH düzeylerinin dağılımı

Histopatolojik Bulgular

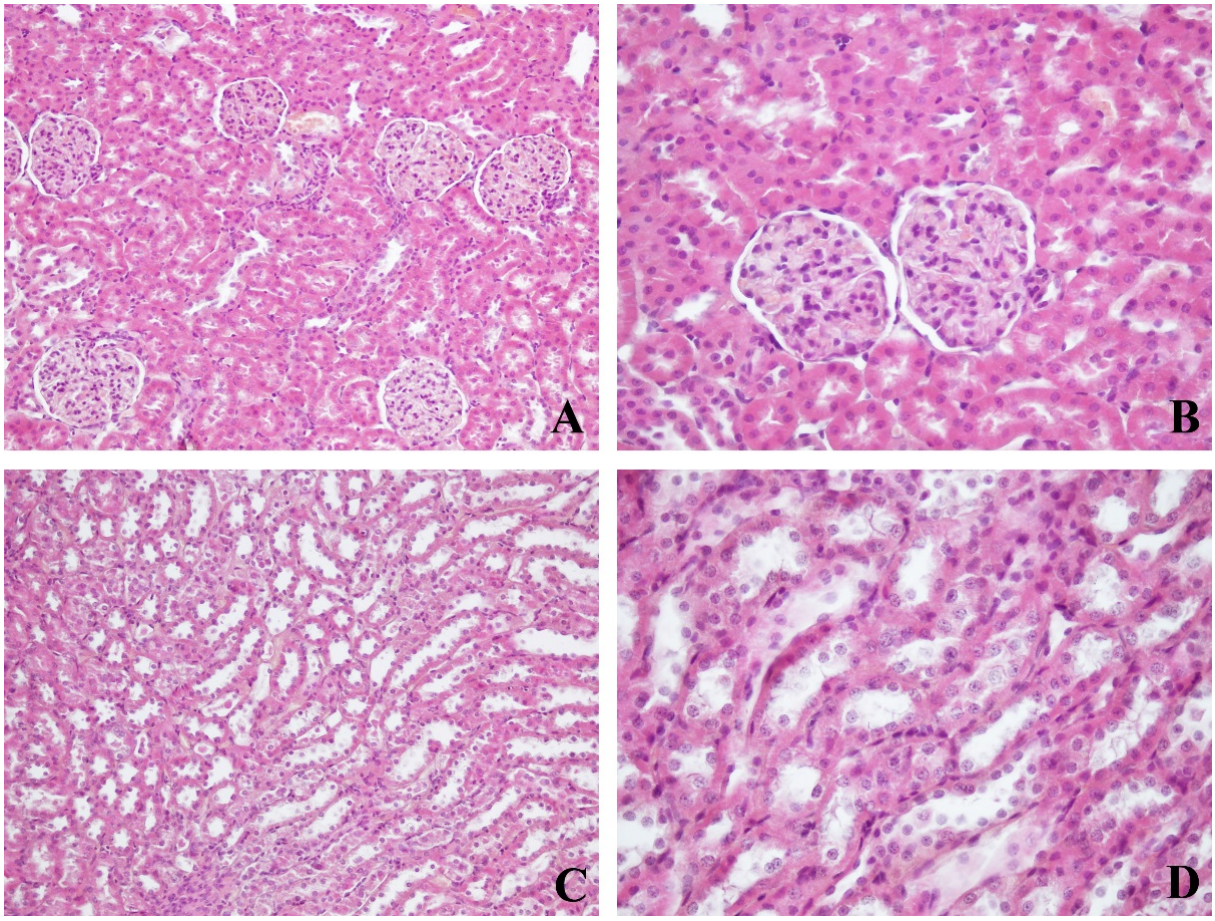
Kontrol grubuna ait böbrek dokularında, Malpighi cisimcikleri ile çevresinde fırçamsı kenara sahip proksimal tübüller ve geniş lümenli distal tübüllerin korteks veya medulla bölgelerinin normal yapıda olduğu görüldü (Şekil 15). Bununla birlikte, gliserol verilen ABH grubu böbrek dokuları incelendiğinde, korteks ve dış medulla bölgelerinde yaygın ve belirgin hasar izlendi. Mikroskobik olarak bu hasar; tübüler dilatasyon, tübüler vakuolizasyon, tübüler nekroz, kast oluşumu, intratübüler debris ve fırçamsı kenar kaybı olarak gözlendi ve skorlandı. Bu değişikliklere ek olarak, lökositik infiltrasyon ve konjesyon da yer yer gözlenen bulgulardı. Tübüler vakuolizasyon, tübüler nekroz ve kast oluşumunun medullar bölgede kortekse göre daha belirgin olduğu tespit edildi (Şekil 16). NEC grubu böbrek dokularının kontrol grubu ile aynı özelliklere sahip olduğu gözlenirken (Şekil 17), ABH+NEC grubuna ait böbrek kesitleri değerlendirildiğinde de hasarın ABH grubuna benzer bulgular gösterdiği tespit edildi (Şekil 18). Ek olarak, fırçamsı kenar kaybını değerlendirmek için PAS prosedürü uygulanan kontrol grubu böbrek kesitlerinde proksimal tübül fırçamsı kenarları oldukça düzenli ve PAS (+) izlenirken (Şekil 19), ABH grubu böbrek kesitlerinin hasarlı tübüllerinde belirgin olarak kayba uğramıştı ve dolayısıyla PAS (+)'liği zayıftı. Bundan başka, bazı Malpighi cisimciklerinin Bowman kapsülü parietal yaprak bazal membranı ile tübüler bazal membranlarda kalınlaşma gözlendi (Şekil 20). NEC grubu böbrek dokularının kontrol grubu ile aynı özellikler göstererek proksimal tübül fırçamsı kenarlarının PAS (+) boyanma özelliği sergilediği tespit edilirken (Şekil 21) ABH+NEC grubuna ait böbrek kesitleri incelendiğinde ise, ABH grubuna benzer olarak fırçamsı kenar kaybı bulguları tespit edildi (Şekil 22).

Necrostatin-1 uygulamasının böbrekte gliserol kaynaklı histopatolojik hasarı belirgin olarak değiştirmediği gözlendi (Şekil 18 ve Şekil 22).

Tüm gruplara ait korteks ve dış medullada gözlenen histopatolojik bulgular ve skorları Tablo 4'te özetlenmiştir.

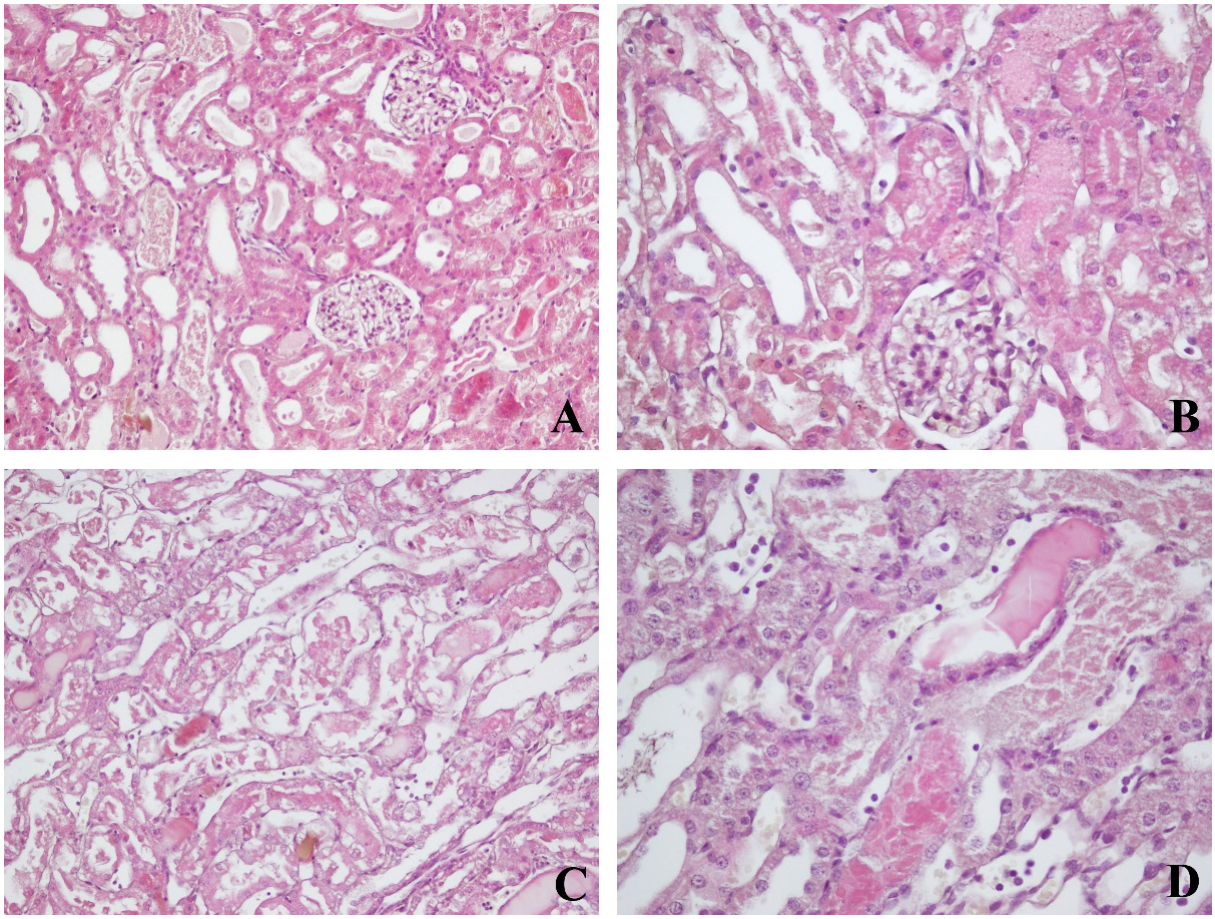
Tablo 4. Böbrek dokusu korteks ve dış medulla bölgelerine ait histopatolojik skorlar

Histopatolojik değişiklikler		Kontrol (n=8)	ABH (n=8)	NEC (n=8)	ABH+NEC (n=8)
Tübüler dilatasyon	Korteks	0	±3.00	0	±2.63
	Dış Medulla	0	±3.13	0	±3.00
Tübüler vakuolizasyon	Korteks	0	±2.00	0	±2.00
	Dış Medulla	0	±3.38	0	±3.13
Tübüler nekroz	Korteks	0	±1.88	0	±1.63
	Dış Medulla	0	±3.13	0	±3.13
Kast oluşumu	Korteks	0	±1.63	0	±1.25
	Dış Medulla	0	±3.25	0	±3.00
İntratübüler debris	Korteks	0	±2.50	0	±2.38
	Dış Medulla	0	±3.25	0	±3.25
Fırçamsı kenar kaybı	Korteks	0	±2.38	0	±2.13
	Dış Medulla	0	±3.00	0	±3.00



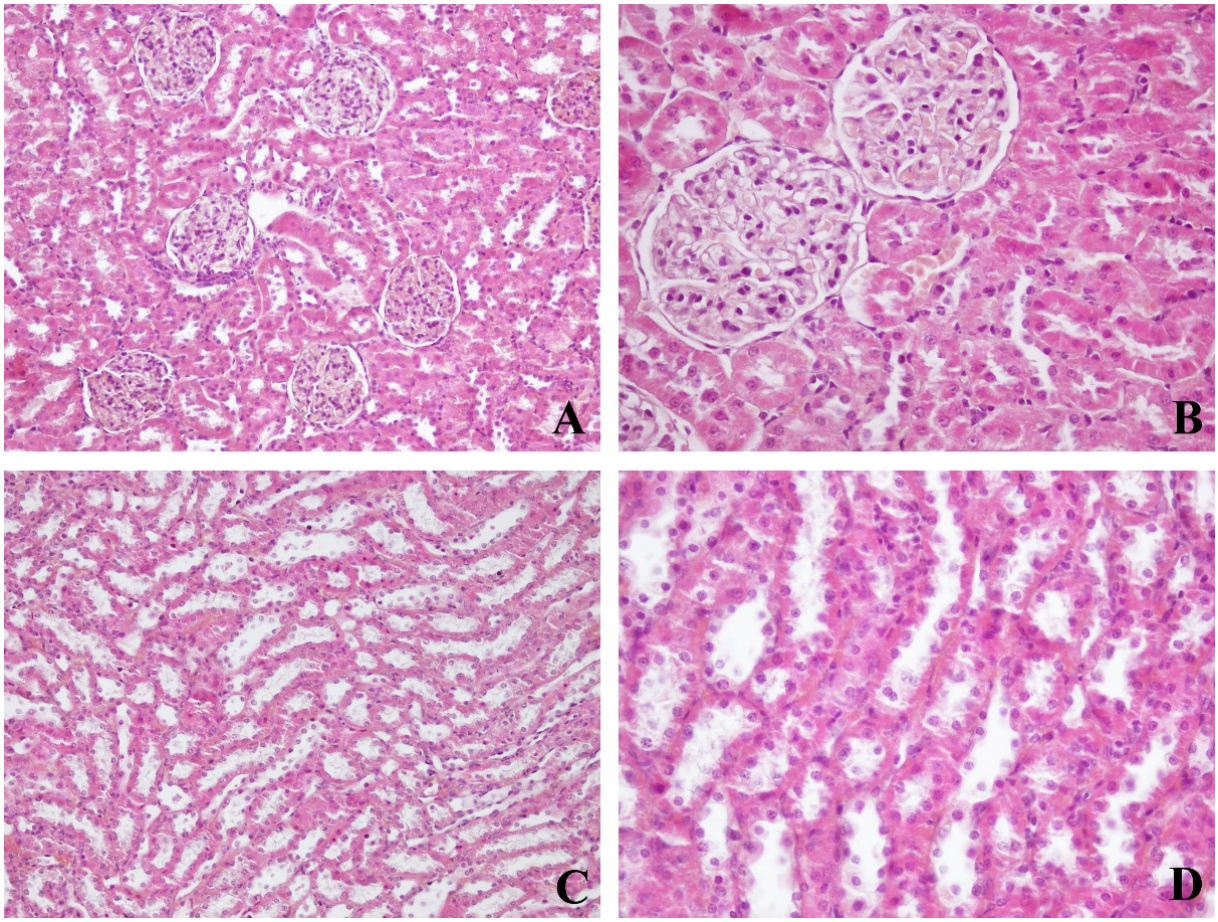
Hematoksilen&Eozin, x200 (A,C), x400 (B,D).

Şekil 15. Kontrol grubu böbrek dokusu korteks (A,B) ve dış medulla (C,D) bölgelerine ait histopatolojik bulgular



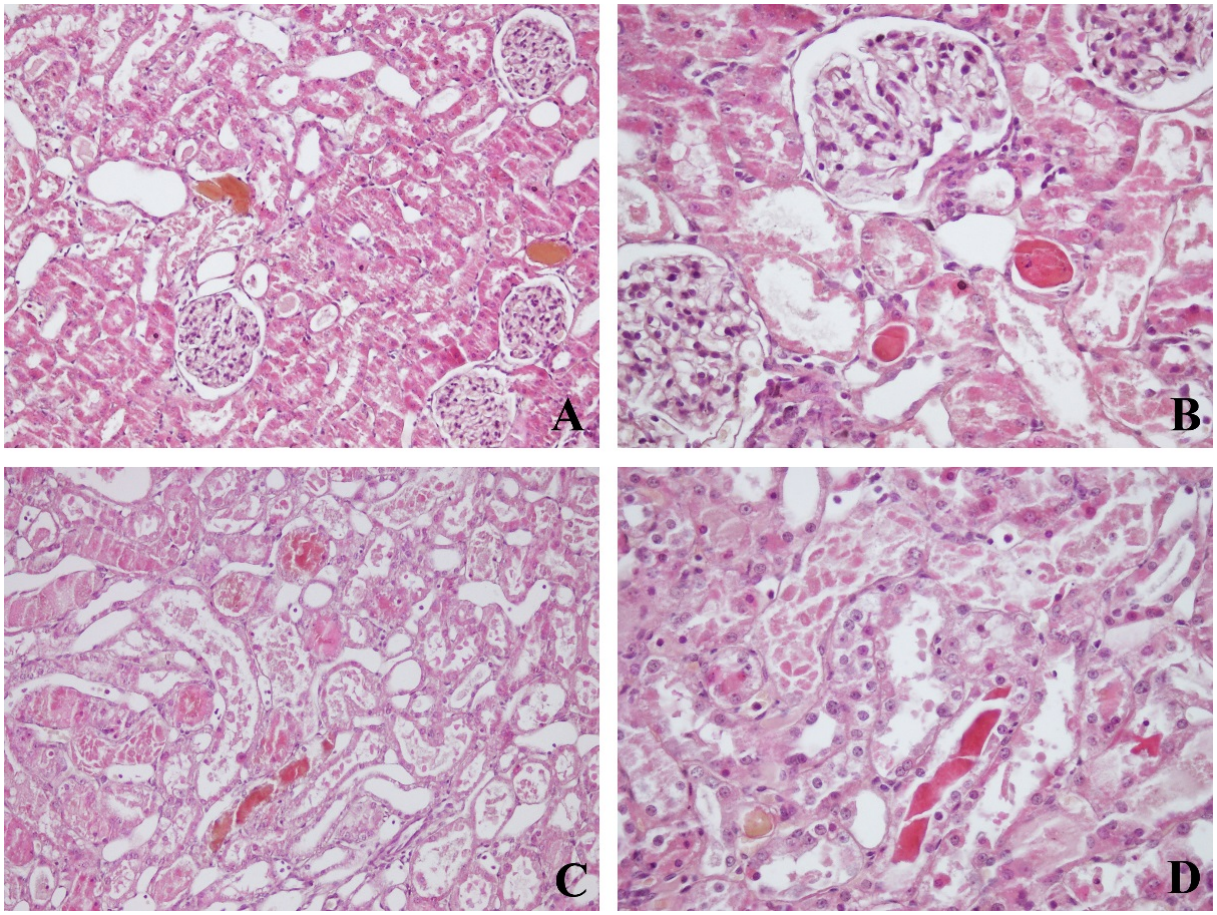
Hematoksilen&Eozin, x200 (A,C), x400 (B,D).

Şekil 16. ABH grubu böbrek dokusu korteks (A,B) ve dış medulla (C,D) bölgelerine ait histopatolojik bulgular



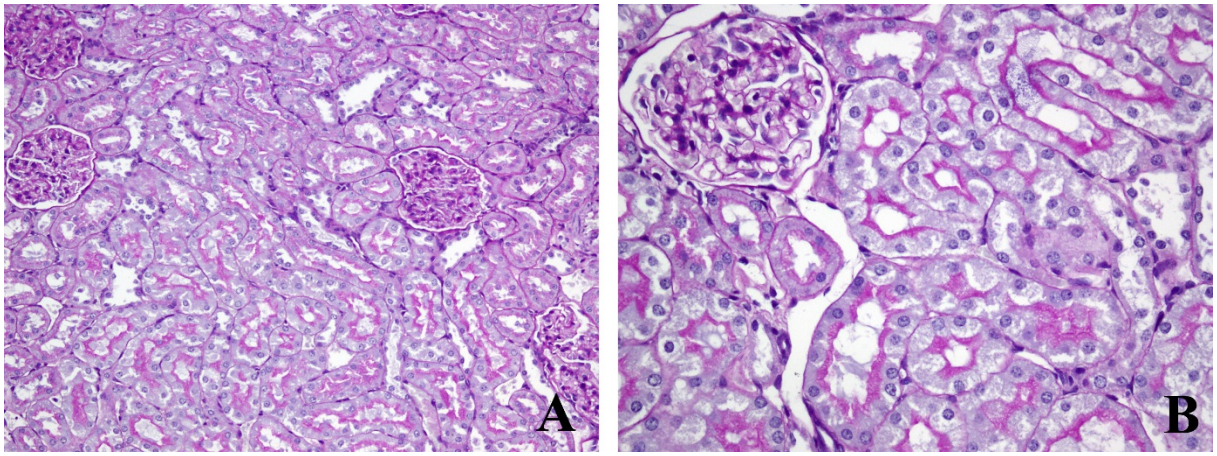
Hematoksilen&Eozin, x200 (A,C), x400 (B,D).

Şekil 17. NEC grubu böbrek dokusu korteks (A,B) ve dış medulla (C,D) bölgelerine ait histopatolojik bulgular



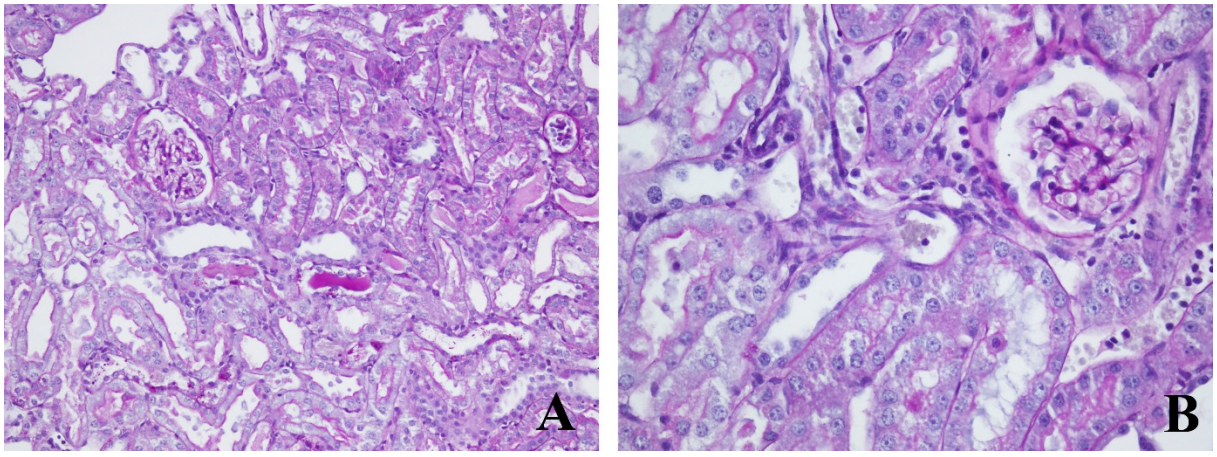
Hematoksilen&Eozin, x200 (A,C), x400 (B,D

Şekil 18. ABH+NEC grubu böbrek dokusu korteks (A,B) ve dış medulla (C,D) bölgelerine ait histopatolojik bulgular



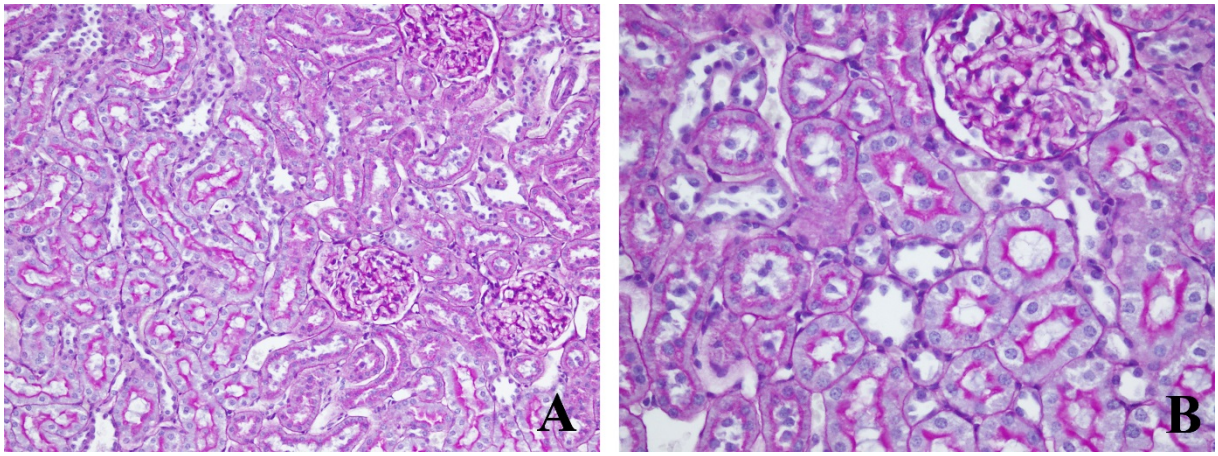
Periyodik Asit-Schiff, x200 (A); x400 (B).

Şekil 19. Kontrol grubuna ait böbrek dokusu proksimal tübüllerinde fırçamsı kenar yapısı



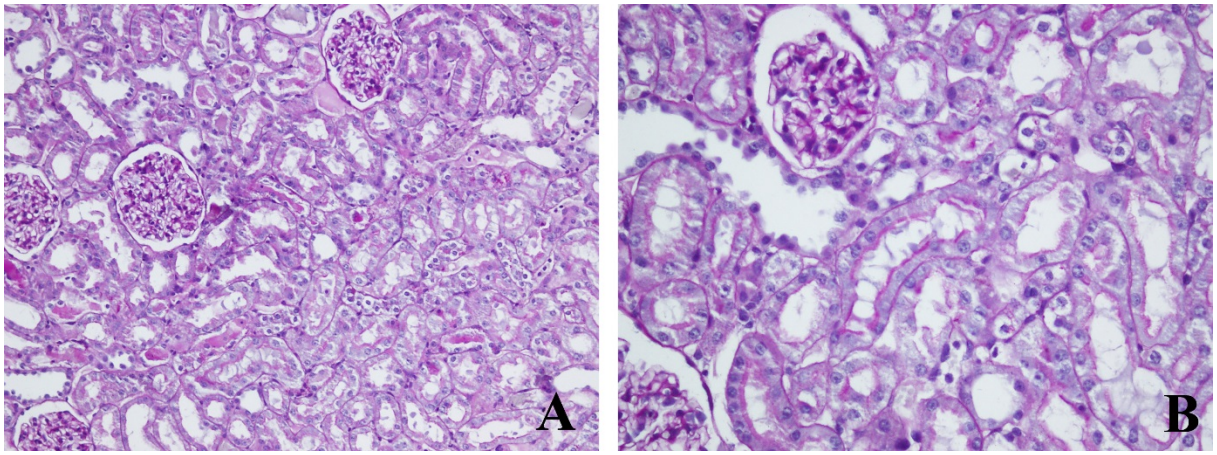
Periyodik Asit-Schiff, x200 (A); x400 (B).

Şekil 20. ABH grubuna ait böbrek dokusu proksimal tübüllerinde fırçamsı kenar yapısı



Periyodik Asit-Schiff, x200 (A); x400 (B).

Şekil 21. NEC grubuna ait böbrek dokusu proksimal tübüllerinde fırçamsı kenar yapısı



Periyodik Asit-Schiff, x200 (A); x400 (B).

Şekil 22. ABH+NEC grubuna ait böbrek dokusu proksimal tübüllerinde fırçamsı kenar yapısı

TARTIŞMA

Çalışmamızın en önemli ve yeni bulgusu RIPK-1 blokeri nekrostatin-1 uygulamasının miyoglobinürik akut böbrek hasarında oluşan böbrek fonksiyon bozukluğunu şiddetlendirmesidir. Serum üre ve kreatinin seviyeleri böbrek fonksiyonlarının değerlendirilmesinde kullanılan önemli parametrelerdir. Çalışmamızda serum üre ve kreatinin düzeyi gliserol uygulanan gruplarda yükseldi ve bu bulgu deneysel modelin başarıyla uygulandığının bir göstergesi olarak kabul edildi. Gruplar arasında idrar sodyum ve kreatininleri karşılaştırıldığında gliserol verilen gruplarda azalma gözlendi. Bu sonuç böbrek fonksiyonundaki bozulmanın bir göstergesi olarak değerlendirildi.

Homsi ve arkadaşlarının 7 ml/kg dozunda gliserol uygulayarak oluşturdukları mABH modeli çalışmasında tek doz (1.65 mg/kg) intraperitoneal nekrostatin-1 uygulaması kontrol ve ABH gruplarına benzer serum kreatinin düzeyiyle sonuçlanmıştır (57). Tristao ve arkadaşlarının farelerde sisplatinle uyarılmış böbrek hasarı modeli oluşturdukları çalışmada 5 mg/kg necrostatin-1 uygulaması üre ve kreatinin düzeylerinde anlamlı bir düzelme oluşturmamıştır. Eş zamanlı olarak apoptozisin bloke edilmesiyle koruyucu etki ortaya çıkmıştır (58). Martin-Sanchez D ve arkadaşlarının farelerde folik asitle uyarılmış böbrek hasarı modeli oluşturdukları çalışmada necrostatin-1 uygulaması serum üre ve kreatinin düzeyini değiştirmemiştir (59). Linkerman ve arkadaşlarının farelerde renal iskemi-reperfüzyon modeli ile ABH oluşturdukları bir çalışmada 1.65 mg/kg necrostatin-1 uygulaması reperfüzyonun 48. saatinde serum üre ve kreatinin düzeylerini düşürmüştür (60). Çalışma sonuçları toplu olarak değerlendirildiğinde nekrostatin-1 uygulamasıyla nekroptozisin bloke edilmesinin farklı böbrek hasarı modellerinde böbrek fonksiyonları

üzerine farklı etkiler ortaya çıkardığı görülmektedir. Bildiğimiz kadarıyla çalışmamız, Nec-1 uygulamasının bir sıçan MABH modelinde böbrek hasarını şiddetlendirdiğini ilk defa ortaya koymuştur.

Düzenlenmiş hücre ölümü mekanizmaları kaspaz ve peroksidasyon kontrollü sistemler olarak ayrışmaktadır. Kaspaz kontrollü sistem apoptoz, nekroptoz ve piroptozu içerirken peroksidasyon kontrollü sistem ferroptozu içerir. Kaspaz kontrollü sistem içinde bir yolun inhibisyonunun alternatif yolların aktivasyonuna neden olabileceği bildirilmiştir (61). Nec-1'in, proapoptotik protein Bax'ın ekspresyonunu artırarak ve anti-apoptotik protein Mcl-1'in ekspresyonunu azaltarak nötrofil apoptozunu uyardığı, kaspaz 3 bölünmesini de aktive ettiği gösterilmiştir (62). Hücre ölüm yolları paralel olarak hareket eden bağımsız süreçler değildir. Ölüm yönünde ve karşısında olan sinyaller arasındaki hassas dengede anahtar düzenleyicilerin durumu, yürütülecek yolu belirler (11). Sıçanlarda çekal ligasyon ve ponksiyon ile sepsisin indüklenmesinden sonra nekrostatin-1 uygulamasının karaciğer fonksiyonundaki bozulmayı ve histopatolojik değişiklikleri şiddetlendirdiği ve yaşam süresini kısalttığı gösterilmiştir. Bu sonucun olası nedeninin nec-1 uygulamasının nekroptozisi inhibe ederken apoptozisi şiddetlendirmesi olabileceği öne sürülmüştür (17). Benzer şekilde Mcneal ve arkadaşlarının çalışmasında nec-1 uygulaması septik farelerde serumda inflamatuar sitokinlerin ve karaciğer enzimlerinin artışına yol açmış, hepatositler üzerine zararlı etkiler ortaya çıkarken apoptozisin uyarıldığı gösterilmiştir. Ayrıca hayatta kalmayı da artırmıştır. Bu sonuç RIPK1'in bir yandan Fas ligasyonu yoluyla nekroptotik ölümü indükleyebilirken diğer taraftan NF-kB aktivasyonu yoluyla yetkin bir bağışıklık tepkisinin sürdürülmesini ve hayatta kalmayı sağlayabileceği şeklinde yorumlanmıştır (63).

Çalışmamızda nekrostatin uygulamasının renal fonksiyon bozukluğunu şiddetlendirmesi apoptoz ve piroptoz gibi yolların aktive olmasına bağlı olarak gerçekleşmiş olabilir. Nekrostatin uygulamalarıyla ilgili yapılan çalışmalarda doza bağlı olarak zıt etkiler ortaya çıkması ilginç görünmektedir. Takahashi ve arkadaşlarının çalışmasında TNF ile uyarılmış şok modelinde orta ve yüksek dozda necrostatin hayatta kalma üzerine olumlu etkiler gösterirken düşük dozda necrostatin farelerin duyarlılığını artırmış, hipotermi ve hayatta kalma oranındaki düşüşle sonuçlanmıştır (64). Çalışmamızda üre kreatinin seviyelerindeki artışla kendini gösteren böbrek fonksiyon bozukluğunda nekrostatine bağlı şiddetlenme kullanılan doz sebebiyle meydana gelmiş olabilir.

Çalışmamızda nekrostatin-1 uygulaması beklendiği gibi RIPK1 ve RIPK3 düzeylerini düşürdü. Ayrıca NLRP3 düzeyi de nekrostatin-1 uygulanan gruplarda azaldı. Önceki çalışmalar RIPK3-MLKL nekroptotik sinyallemesinin NLRP3 aktivasyonunu tetikleyebileceğini ve bunun inflamatuar aracıların sekresyonuyla sonuçlanabileceğini bildirmiştir (65). İlginç olarak gliserol verilen gruplarda MLKL düzeyindeki artış eğilimi istatistiksel anlamlılığa ulaşamamıştır. Necrostatin uygulaması da MLKL düzeyini değiştirmemiştir. Önceki yıllarda böbrek fibrozisi oluşturulan çalışmalarda olduğu gibi reseptör ilişkili protein kinazların MLKL'den bağımsız etkileri olabileceği de akılda tutulmalıdır (66).

Çalışma verilerimize göre nec-1 uygulaması MABH modelinde oksidatif stres süreçleri üzerine etki göstermemiştir. Ning ve arkadaşlarının sisplatinle uyarılmış böbrek hasarı modeli çalışmasında nekrostatin-1 uygulaması MDA seviyesini düşürmüştür (67). Oksidatif stres gelişimi çalışılan böbrek hasarı modeli ve kullanılan ilaç dozlarından etkilenmektedir. Sonuçlarımızın farklılığı modelin farklı olmasından kaynaklanmış olabilir.

Çalışma gruplarında böbrekte meydana gelen histolojik değişiklikler hematoksilen eozin ve PAS boyama ile değerlendirildi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında gliserol verilen gruplarda değişik şiddette tübüler nekroz ve kast birikimi ile kortikal peritübüler ödem ve fırçamsı kenar kaybı gözlendi. Nekrostatin-1 uygulamasının böbrekte gliserol kaynaklı histopatolojik hasarı değiştirmediği gözlendi. Homsi ve arkadaşlarının çalışmasında nekrostatin-1 uygulaması ABH grubunda görülen tübüler nekrozu önemli oranda azaltmıştır (57). Tristao ve arkadaşlarının çalışmasında nekrostatin-1 uygulaması sisplatine bağlı oluşan proksimal tübüler hasarı önleyememiştir (58). Görüldüğü gibi değişik böbrek hasarı modellerinde histopatolojik bulgular farklılık göstermektedir. Kullandığımız gliserol dozundaki farklılık Homsi ve arkadaşlarının çalışmasıyla ortaya çıkan çelişkili sonuçların sebebi olabilir.

Çalışmamızın bazı kısıtlılıkları bulunmaktadır. Çalışmamızda apoptozis ve proptozisin değerlendirilmemesi bir kısıtlılıktır. İkinci olarak gen delesyonu veya nakavt fare modeli nec-1 uygulamasının yanına eklenebilir ve sonuçlar doğrulanabilirdi.

SONUÇLAR

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yaptığımız çalışmamızda deneysel MABH modelinde nekroptozis inhibitörü nekrostatin-1'in böbrek fonksiyonları, oksidatif parametreler ve histopatolojik değişiklikler üzerindeki etkilerini inceledik. Çalışmamız ile MABH modelinde eksojen uygulanan Nec-1'in böbrek fonksiyonlarını etkilediği gösterilmiştir. Çalışma verilerimiz, nekrostatin-1 uygulamasının böbrek fonksiyonları üzerine olumsuz etkiler ortaya çıkardığını göstermiştir. Önceki çalışmaların büyük çoğunluğu ile farklı sonuçlar elde etmemiz apoptozis ve piroptozis gibi çalışmamızda rolünü incelemediğimiz diğer hücre ölüm mekanizmalarının uyarılmasına bağlı olarak gerçekleşmiş olabilir. Ayrıca kullanılan farklı nekrostatin-1 dozlarının zıt etkilere sebep olabildiği de düşünüldüğünde doz seçiminin çeşitlendirileceği ve değerlendirilmeyen hücre ölümü yolaklarının da dahil edileceği daha geniş kapsamlı çalışmalar nekroptozisin böbrek fonksiyonları üzerine etkilerinin daha iyi anlaşılması için faydalı olacaktır.

ÖZET

Akut böbrek hasarı mortalitenin bağımsız bir risk faktörüdür. ABH'de fizyopatolojik ve moleküler mekanizmaları içeren karmaşık süreç tam olarak anlaşılamamıştır. Çok sayıda çalışmada nekroptozisin klinik hastalıklarda önemli bir etkiye sahip olduğu ifade edilmiştir. Nekroptozisin ROS üretimini etkilediği bilinmektedir. Nekrostatin-1 gibi kimyasal inhibitörler tarafından nekroptozis inhibisyonunun, renal iskemi / reperfüzyon hasarını önlemek ve tedavi etmek için terapötik potansiyele sahip olabileceği bildirilmiştir. Çalışmamızdanekroptozisin miyoglobinürik akut böbrek hasarında biyokimyasal ve histopatolojik parametreler üzerine etkilerini ve bu etkilerin oksidatif stres biyobelirteçleriyle ilişkisini incelemeyi amaçladık.

Çalışmamızda toplam 32 adet sıçan kullanıldı. Her grupta 8 adet olmak üzere sıçanlar 4 gruba ayrıldı. Tüm gruplar intramusküler enjeksiyonlardan önce 24 saat susuz bırakıldı. Kontrol ve NEC gruplarına fizyolojik serum, diğer gruplara hipertonik (%50) gliserol enjeksiyonları yapıldı. İntramüsküler enjeksiyonlardan 1 saat sonra kontrol ve ABH gruplarına DMSO, NEC ve ABH+NEC gruplarına nekrostatin-1 maddesi intraperitoneal yolla verildi. Sıçanlar intramusküler enjeksiyonlar yapıldıktan hemen sonra metabolik kafese alınarak 24 saatlik idrarları toplandı. Ardından anestezi altında kan ve böbrekleri alındı. Böbrek dokusunda RIPK1, RIPK3, MLKL, TNF alfa, NLRP3, MDA, GSH düzeyleri ve histopatolojik değişiklikler; serumda üre, kreatinin, sodyum düzeyleri; idrarda kreatinin, sodyum düzeyleri incelendi.

Çalışmamızda gliserol uygulanan grupların tamamında kontrol grubuna göre serum kreatinin ve üre seviyelerinde anlamlı bir artış gözlenirken idrar sodyum ve kreatinin

seviyelerinde azalma gözlendi. Nekrostatin-1 uygulanan gruplarda böbrek dokusunda RIPK1, RIPK3, NLRP3 düzeylerinde azalma olduğu görüldü. Gruplar arasında MLKL ve TNF alfa düzeylerinde anlamlı bir değişiklik olmadı. Çalışma verilerimize göre nec-1 uygulaması MABH modelinde oksidatif stres süreçleri üzerine etki göstermemiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında gliserol verilen gruplarda değişik şiddette tübüler nekroz ve kast birikimi ile kortikal peritübüler ödem ve fırçamsı kenar kaybı gözlendi. Nec-1 uygulamasının böbrekte gliserol kaynaklı histopatolojik hasarı değiştirmediği gözlendi.

Çalışma verilerimiz miyoglobinürik akut böbrek hasarında nekrostatin-1 uygulamasının böbrek fonksiyonları üzerine olumsuz etkiler ortaya çıkardığını göstermiştir. Bu etkilerin doz seçimine ve/veya diğer hücre ölüm mekanizmalarının uyarılmasına bağlı olarak gerçekleşmiş olabileceği düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: Miyoglobinürik Akut Böbrek Hasarı, Rabdomiyoliz, Nekroptozis, Nekrostatin-1, Oksidatif Stres

THE ROLE OF NECROPTOSIS IN EXPERIMENTAL MYOGLOBINURIC ACUTE RENAL INJURY

SUMMARY

Acute kidney injury is an independent risk factor for mortality. The complex process involving the physiopathological and molecular mechanisms in AKI has not been fully understood. Numerous studies have reported that necroptosis has a significant impact on clinical diseases. It is known that necroptosis affects ROS production. It has been reported that inhibition of necroptosis by chemical inhibitors such as necrostatin-1(Nec-1) may have therapeutic potential to prevent and treat renal ischemia/reperfusion injury. In our study, we aimed to investigate the effects of necroptosis on biochemical and histopathological parameters in myoglobinuric acute kidney injury and the relationship of these effects with oxidative stress biomarkers.

A total of 32 rats were used in our study. Rats were divided into 4 groups, 8 in each group. All groups were dehydrated for 24 hours before intramuscular injections. Physiological serum injections were given to the control and NEC groups, and hypertonic glycerol injections to the other groups. One hour after the intramuscular injections, DMSO was given to the control and AKI groups, and necrostatin-1 was given intraperitoneally to the NEC and AKI+NEC groups. The rats were taken into the metabolic cage immediately after intraperitoneal injections and their 24-hour urine was collected. Then, blood and kidneys were

taken under anesthesia. RIPK1, RIPK3, MLKL, TNF alpha, NLRP3, MDA, GSH levels and histopathological changes in kidney tissue; serum urea, creatinine, sodium levels; The creatinine and sodium levels in the urine were analyzed.

In our study, a significant increase was observed in serum creatinine and urea levels in all glycerol administered groups compared to the control group, while a decrease was observed in urine sodium and creatinine levels. Necrostatin-1 administered groups showed a decrease in RIPK1, RIPK3, NLRP3 levels in kidney tissue. There was no significant change in MLKL and TNF alpha levels between the groups. When compared to the control group, tubular necrosis of varying severity and caste deposition, cortical peritubular edema and brush border loss were observed in the glycerol-treated groups. It was observed that Nec-1 administration did not change glycerol-induced histopathological damage in the kidney.

Our study data have shown that necrostatin-1 administration in myoglobinuric acute kidney injury has negative effects on kidney functions. It was thought that these effects might have occurred depending on dose selection and/or stimulation of other cell death mechanisms.

Keywords: Myoglobinuric Acute Kidney Injury, Rhabdomyolysis, Necroptosis, Necrostatin-1, Oxidative Stress

KAYNAKLAR

1. Wang J, Wang D, Li Y, Zuo H, Wang S, Xu X, et al. Rhabdomyolysis-induced acute kidney injury under hypoxia and deprivation of food and water. Kidney & blood pressure research. 2013;37(4-5):414-21.
2. Wu J, Pan X, Fu H, Zheng Y, Dai Y, Yin Y, et al. Effect of curcumin on glycerol-induced acute kidney injury in rats. Scientific reports. 2017;7(1):10114.
3. Bellomo R, Kellum JA, Ronco C. Acute kidney injury. Lancet (London, England). 2012;380(9843):756-66.
4. Özge O, Güneysel Ö, Eroğlu S, Denizbaşı A, Ünlüer E. Rabdomiyolize bağlı gelişen akut tubuler nekrozda kas kitlesinin önemi: Olgu sunumu. Marmara Medical Journal. 2006;19(1):30-2.
5. Chavez LO, Leon M, Einav S, Varon J. Beyond muscle destruction: a systematic review of rhabdomyolysis for clinical practice. Critical care (London, England). 2016;20(1):135.
6. Kaya O. Deneysel miyoglobinürik akut böbrek yetmezliğinde losartanın etkileri (tez). 2010.
7. Aydogdu N, Atmaca G, Yalcin O, Taskiran R, Tastekin E, Kaymak K. Protective effects of L-carnitine on myoglobinuric acute renal failure in rats. Clinical and experimental pharmacology & physiology. 2006;33(1-2):119-24.
8. Shah SV, Walker PD. Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in glycerol-induced acute renal failure. The American journal of physiology. 1988;255(3 Pt 2):F438-43.
9. Vanholder R, Sever MS, Erek E, Lameire N. Rhabdomyolysis. Journal of the American Society of Nephrology : JASN. 2000;11(8):1553-61.
10. Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. Nature chemical biology. 2005;1(2):112-9.

11. Bertheloot D, Latz E, Franklin BS. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. Cellular & molecular immunology. 2021;18(5):1106-21.

12. Zhou W, Yuan J. Necroptosis in health and diseases. Seminars in cell & developmental biology. 2014;35:14-23.

13. Khoury MK, Gupta K, Franco SR, Liu B. Necroptosis in the Pathophysiology of Disease. The American journal of pathology. 2020;190(2):272-85.

14. Feng M, Zhang R, Gong F, Yang P, Fan L, Ni J, et al. Protective effects of necrostatin-1 on glucocorticoid-induced osteoporosis in rats. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology. 2014;144 Pt B:455-62.

15. Liu H, Zhang M, Dong X, Liu Y, Hao Y, Wang Y. Necrostatin-1 protects against ischemia/reperfusion injury by inhibiting receptor-interacting protein 1 in a rat flap model. Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS. 2019;72(2):194-202.

16. Linkermann A, Bräsen JH, Himmerkus N, Liu S, Huber TB, Kunzendorf U, et al. Rip1 (receptor-interacting protein kinase 1) mediates necroptosis and contributes to renal ischemia/reperfusion injury. Kidney international. 2012;81(8):751-61.

17. Zhang Q, Wei S, Lu J, Fu W, Chen H, Huang Q, et al. Necrostatin-1 accelerates time to death in a rat model of cecal ligation and puncture and massively increases hepatocyte caspase-3 cleavage. American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology. 2019;316(4):G551-g61.

18. Edelstein CL. Biomarkers of acute kidney injury. Advances in chronic kidney disease. 2008;15(3):222-34.

19. Öğütmen MB. Acute Renal Failure Seen After Cardiovascular Surgery. GKDA Derg 2011;17(2):25-33.

20. Zhang X, Agborbesong E, Li X. The Role of Mitochondria in Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease and Its Therapeutic Potential. International journal of molecular sciences. 2021;22(20).

21. Rewa O, Bagshaw SM. Acute kidney injury-epidemiology, outcomes and economics. Nature reviews Nephrology. 2014;10(4):193-207.

22. Mercado MG, Smith DK, Guard EL. Acute Kidney Injury: Diagnosis and Management. American family physician. 2019;100(11):687-94.

23. Hahn K, Kanbay M, Lanaspa MA, Johnson RJ, Ejaz AA. Serum uric acid and acute kidney injury: A mini review. Journal of advanced research. 2017;8(5):529-36.

24. Schrezenmeier EV, Barasch J, Budde K, Westhoff T, Schmidt-Ott KM. Biomarkers in acute kidney injury - pathophysiological basis and clinical performance. Acta physiologica (Oxford, England). 2017;219(3):554-72.

25. Thomas ME, Blaine C, Dawnay A, Devonald MA, Ftouh S, Laing C, et al. The definition of acute kidney injury and its use in practice. Kidney international. 2015;87(1):62-73.

26. ERGE Ü. Deneysel miyoglobinürik akut böbrek hasarında kannabinoid reseptör agonist ve antagonistlerinin etkisi (tez) 2021.

27. Goyal A, Daneshpajouhnejad P, Hashmi MF, Bashir K, John BK. Acute Kidney Injury (Nursing). StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.

28. Kellum JA, Lameire N. Diagnosis, evaluation, and management of acute kidney injury: a KDIGO summary (Part 1). Critical care (London, England). 2013;17(1):204.

29. Alscher MD, Erley C, Kuhlmann MK. Acute Renal Failure of Nosocomial Origin. Deutsches Arzteblatt international. 2019;116(9):149-58.

30. Murugan R, Kellum JA. Acute kidney injury: what's the prognosis? Nature reviews Nephrology. 2011;7(4):209-17.

31. Fortrie G, de Geus HRH, Betjes MGH. The aftermath of acute kidney injury: a narrative review of long-term mortality and renal function. Critical care (London, England). 2019;23(1):24.

32. Petejova N, Martinek A. Acute kidney injury due to rhabdomyolysis and renal replacement therapy: a critical review. Critical care (London, England). 2014;18(3):224.

33. Zimmerman JL, Shen MC. Rhabdomyolysis. Chest. 2013;144(3):1058-65.

34. Stanley M, Chippa V, Aeddula NR, Quintanilla Rodriguez BS, Adigun R. Rhabdomyolysis. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.

35. Panizo N, Rubio-Navarro A, Amaro-Villalobos JM, Egido J, Moreno JA. Molecular Mechanisms and Novel Therapeutic Approaches to Rhabdomyolysis-Induced Acute Kidney Injury. Kidney & blood pressure research. 2015;40(5):520-32.

36. Gibney RT, Sever MS, Vanholder RC. Disaster nephrology: crush injury and beyond. Kidney international. 2014;85(5):1049-57.

37. Demirkiran O, Dikmen Y, Utku T, Urkmez S. Crush syndrome patients after the Marmara earthquake. Emergency medicine journal : EMJ. 2003;20(3):247-50.

38. Guerrero-Hue M, Rubio-Navarro A, Sevillano Á, Yuste C, Gutiérrez E, Palomino-Antolín A, et al. Adverse effects of the renal accumulation of haem proteins. Novel therapeutic approaches. Nefrologia. 2018;38(1):13-26.

39. Guerrero-Hue M, García-Caballero C, Palomino-Antolín A, Rubio-Navarro A, Vázquez-Carballo C, Herencia C, et al. Curcumin reduces renal damage associated with rhabdomyolysis by decreasing ferroptosis-mediated cell death. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2019;33(8):8961-75.

40. Boutaud O, Roberts LJ, 2nd. Mechanism-based therapeutic approaches to rhabdomyolysis-induced renal failure. Free radical biology & medicine. 2011;51(5):1062-7.

41. Chatzizisis YS, Misirli G, Hatzitolios AI, Giannoglou GD. The syndrome of rhabdomyolysis: complications and treatment. European journal of internal medicine. 2008;19(8):568-74.

42. Gwozdzinski K, Pieniazek A, Gwozdzinski L. Reactive Oxygen Species and Their Involvement in Red Blood Cell Damage in Chronic Kidney Disease. Oxidative medicine and cellular longevity. 2021;2021:6639199.

43. Tejchman K, Kotfis K, Sieńko J. Biomarkers and Mechanisms of Oxidative Stress-Last 20 Years of Research with an Emphasis on Kidney Damage and Renal Transplantation. International journal of molecular sciences. 2021;22(15).

44. Bottino F, Lucignani M, Napolitano A, Dellepiane F, Visconti E, Rossi Espagnet MC, et al. In Vivo Brain GSH: MRS Methods and Clinical Applications. Antioxidants (Basel, Switzerland). 2021;10(9).

45. Wang Y, Kanneganti TD. From pyroptosis, apoptosis and necroptosis to PANoptosis: A mechanistic compendium of programmed cell death pathways. Computational and structural biotechnology journal. 2021;19:4641-57.

46. Coşkun G, Özgür HJAKTD. Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. 2011;20(3):145-58.

47. Cao L, Mu W. Necrostatin-1 and necroptosis inhibition: Pathophysiology and therapeutic implications. Pharmacological research. 2021;163:105297.

48. Uni R, Choi ME. Novel Roles of Necroptosis Mediator Receptor-Interacting Protein Kinase 3 in Kidney Injury. Nephron. 2021:1-5.

49. Yu Z, Jiang N, Su W, Zhuo Y. Necroptosis: A Novel Pathway in Neuroinflammation. Frontiers in pharmacology. 2021;12:701564.

50. Belavgeni A, Meyer C, Stumpf J, Hugo C, Linkermann A. Ferroptosis and Necroptosis in the Kidney. Cell chemical biology. 2020;27(4):448-62.

51. Chen H, Fang Y, Wu J, Chen H, Zou Z, Zhang X, et al. RIPK3-MLKL-mediated necroinflammation contributes to AKI progression to CKD. Cell death & disease. 2018;9(9):878.

52. Aranda-Rivera AK, Srivastava A, Cruz-Gregorio A, Pedraza-Chaverri J, Mulay SR, Scholze A. Involvement of Inflammasome Components in Kidney Disease. Antioxidants (Basel, Switzerland). 2022;11(2).

53. Cai Z, Liu ZG. Execution of RIPK3-regulated necrosis. Molecular & cellular oncology. 2014;1(2):e960759.

54. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical biochemistry. 1979;95(2):351-8.

55. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. Archives of biochemistry and biophysics. 1959;82(1):70-7.

56. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. The Journal of biological chemistry. 1951;193(1):265-75.

57. Homsi E, Andreazzi DD, Faria JB, Janino P. TNF-α-mediated cardiorenal injury after rhabdomyolysis in rats. American journal of physiology Renal physiology. 2015;308(11):F1259-67.

58. Tristão VR, Pessoa EA, Nakamichi R, Reis LA, Batista MC, Durão Junior Mde S, et al. Synergistic effect of apoptosis and necroptosis inhibitors in cisplatin-induced nephrotoxicity. Apoptosis : an international journal on programmed cell death. 2016;21(1):51-9.

59. Martin-Sanchez D, Ruiz-Andres O, Poveda J, Carrasco S, Cannata-Ortiz P, Sanchez-Niño MD, et al. Ferroptosis, but Not Necroptosis, Is Important in Nephrotoxic Folic Acid-Induced AKI. Journal of the American Society of Nephrology : JASN. 2017;28(1):218-29.

60. Linkermann A, Bräsen JH, Darding M, Jin MK, Sanz AB, Heller JO, et al. Two independent pathways of regulated necrosis mediate ischemia-reperfusion injury. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2013;110(29):12024-9.

61. Tonnus W, Gembardt F, Latk M, Parmentier S, Hugo C, Bornstein SR, et al. The clinical relevance of necroinflammation-highlighting the importance of acute kidney injury and the adrenal glands. Cell death and differentiation. 2019;26(1):68-82.

62. Jie H, He Y, Huang X, Zhou Q, Han Y, Li X, et al. Necrostatin-1 enhances the resolution of inflammation by specifically inducing neutrophil apoptosis. Oncotarget. 2016;7(15):19367-81.

63. McNeal SI, LeGolvan MP, Chung CS, Ayala A. The dual functions of receptor interacting protein 1 in fas-induced hepatocyte death during sepsis. Shock (Augusta, Ga). 2011;35(5):499-505.

64. Takahashi N, Duprez L, Grootjans S, Cauwels A, Nerinckx W, DuHadaway JB, et al. Necrostatin-1 analogues: critical issues on the specificity, activity and in vivo use in experimental disease models. Cell death & disease. 2012;3(11):e437.

65. Conos SA, Chen KW, De Nardo D, Hara H, Whitehead L, Núñez G, et al. Active MLKL triggers the NLRP3 inflammasome in a cell-intrinsic manner. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2017;114(6):E961-e9.

66. Imamura M, Moon JS, Chung KP, Nakahira K, Muthukumar T, Shingarev R, et al. RIPK3 promotes kidney fibrosis via AKT-dependent ATP citrate lyase. JCI insight. 2018;3(3).

67. Ning Y, Shi Y, Chen J, Song N, Cai J, Fang Y, et al. Necrostatin-1 Attenuates Cisplatin-Induced Nephrotoxicity Through Suppression of Apoptosis and Oxidative Stress and Retains Klotho Expression. Frontiers in pharmacology. 2018;9:384.

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİLLER

Şekil 1. TNFR1'in indüklediği nekroptozis……..**15**
Şekil 2. TLR ile nekroptozisin düzenlenmesi……...**16**
Şekil 3. Gruplar arası serum kreatinin düzeylerinin dağılımı……...**28**
Şekil 4. Gruplar arası serum sodyum düzeylerinin dağılımı…….**28**
Şekil 5. Gruplar arası serum üre düzeylerinin dağılımı……**29**
Şekil 6. Gruplar arası idrar kreatinin düzeylerinin dağılımı…….**29**
Şekil 7. Gruplar arası idrar sodyum düzeylerinin dağılımı……...**30**
Şekil 8. Gruplar arası RIPK1 düzeylerinin dağılımı…….**30**
Şekil 9. Gruplar arası RIPK3 düzeylerinin dağılımı…….……**31**
Şekil 10. Gruplar arası MLKL düzeylerinin dağılımı……...**31**
Şekil 11. Gruplar arası TNF alfa düzeylerinin dağılımı……...**32**
Şekil 12. Gruplar arası NLRP3 düzeylerinin dağılımı……..**32**
Şekil 13. Gruplar arası MDA düzeylerinin dağılımı…….**33**
Şekil 14. Gruplar arası GSH düzeylerinin dağılımı……..**33**
Şekil 15. Kontrol grubu böbrek dokusu korteks (A,B) ve dış medulla (C,D) bölgelerine ait histopatolojik bulgular……..**36**
Şekil 16. ABH grubu böbrek dokusu korteks (A,B) ve dış medulla (C,D) bölgelerine ait histopatolojik bulgular……..**37**
Şekil 17. Necrostatin-1 grubu böbrek dokusu korteks (A,B) ve dış medulla (C,D) bölgelerine ait histopatolojik bulgular…….**38**

Şekil 18. ABH+Necrostatin-1 grubu böbrek dokusu korteks (A,B) ve dış medulla (C,D) bölgelerine ait histopatolojik bulgular**……..39**
Şekil 19. Kontrol grubuna ait böbrek dokusu proksimal tübüllerinde fırçamsı kenar yapısı**...40**
Şekil 20. ABH grubuna ait böbrek dokusu proksimal tübüllerinde fırçamsı kenar yapısı**…...40**
Şekil 21. Necrostatin-1 grubuna ait böbrek dokusu proksimal tübüllerinde fırçamsı kenar yapısı**…….41**
Şekil 22. ABH+Necrostatin-1 grubuna ait böbrek dokusu proksimal tübüllerinde fırçamsı kenar yapısı**……...41**

TABLOLAR

Tablo 1. Grupların serumlarına ait parametreler**……..25**
Tablo 2. Grupların idrarlarına ait parametreler**……...…….26**
Tablo 3. Grupların böbrek dokularına ait parametreler**……...…….27**
Tablo 4. Böbrek dokusu korteks ve dış medulla bölgelerine ait histopatolojik skorlar**……...35**

ÖZGEÇMİŞ

Yozgat'ın Yerköy ilçesinde doğdum. İlköğrenimimi Sekili Osman Pekşen İlköğretim Okulu'nda, lise eğitimimi Kırşehir Prof. Dr. İlhan Kılıçözlü Fen Lisesi'nde tamamladım. Lisans eğitimimi Pamukkale Üniversitesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksekokulu'nda 2016 yılında tamamladım. 2020 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı' nda yüksek lisans eğitimine başladım.

EKLER

EK-1

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(Trakya University, Local Ethics Committee of Animal Experiments)

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Oturum Sayısı: 2021/03 **Karar Tarihi**: 31.03.2021
Karar No: 2021.03.01
Hayvan Sayısı ve Cinsi: Sıçan 32 adet

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi Oktay KAYA'nın yaptığı, Leyla OKUR'un Yüksek Lisans tezi olarak planlanan, TÜHADYEK-2021/09 protokol nolu "**Deneysel Miyoglobinürik Akut Böbrek Hasarında Nekroptozisin Rolü**' başlıklı çalışma isteği görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri etik kurullarının çalışma usul ve esaslarına dair yönetmelik ve Trakya Üniversitesi hayvan deneyleri yerel etik kurulu yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Prof. Dr. Hakan ERBAŞ
Başkan
Araştırma ile İlişki: □ var ☑ yok
Toplantı Katılım: ☑ evet □ hayır

~~Prof.~~ Dr. Enis ULUÇAM
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var ☑ yok
Toplantı Katılım: ☑ evet □ hayır

Prof. Dr. Suat ERDOGAN
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var □ yok
Toplantı Katılım: □ evet □ hayır

Prof. Dr. Y. Alakan SEZER
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var □ yok
Toplantı Katılım: ☑ evet □ hayır

Prof. Dr. Tevfik AKTOZ
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var ☑ yok
Toplantı Katılım: ☑ evet □ hayır

Prof. Dr. Necdet SUT
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var □ yok
Toplantı Katılım: □ evet □ hayır

Doç. Dr. Elvan BAKAR
Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var ☑ yok
Toplantı Katılım: ☑ evet □ hayır

Doç. Dr. Filiz SANAL
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var □ yok
Toplantı Katılım: □ evet □ hayır

Dr. Öğr. Üyesi F. Gülfeşan ÇANAKÇI
Diş Hekimliği Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var □ yok
Toplantı Katılım: □ evet □ hayır

Vet. Hek. Kenan SELVİ
Vet. Hek. Üye
Araştırma ile İlişki: □ var ☑ yok
Toplantı Katılım: ☑ evet □ hayır

Ecz. F. Uygar GÜLER
Sivil Toplum Kuruluşu Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: □ var □ yok
Toplantı Katılım: ☑ evet □ hayır

Ayhan YILMAZ
Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: □ var □ yok
Toplantı Katılım: □ evet □ hayır