



T.C.

SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

GÖLHANE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

RATLARDA DOXORUBİCİNLE OLUŞTURULAN BÖBREK HASARI MODELİNDE,
RAT MEZENKİMAL KÖK HÜCRE MİTOKONDRİSİ TRANSPLANTASYONU
TEDAVİSİNİN ETKİNLİĞİNİN ORTAYA KONMASI

GÖKHAN BURÇİN KUBAT

TIBBİ FİZYOLOJİ YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2018





T.C.

SAğLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

GLHANE SAğLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MüDüRLüğü

**RATLARDA DOXORUBİCİNLE OLUŞTURULAN BÖBREK HASARI MODELİNDE,
RAT MEZENKİMAL KÖK HÜCRE MİTOKONDRİSİ TRANSPLANTASYONU
TEDAVİSİNİN ETKİNLİğİNİN ORTAYA KONMASI**

GÖKHAN BURĐİN KUBAT

TİBBİ FİZYOLOJİ YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŐMANI

DOÇ. DR. MEHMET ÖZLER

**Bu tez Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP)
tarafından 2017/051 sayılı kararla desteklenmiŐtir.**

ANKARA

2018

ONAY SAYFASI

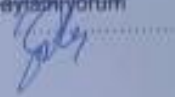
Gökhan Burçin KUBAT tarafından hazırlanan "RATLARDA DOXORUBİCİNLE OLUŞTURULAN BÖBREK HASARI MODELİNDE, RAT MEZENKİMAL KÖK HÜCRE MİTOKONDRİSİ TRANSPLANTASYONU TEDAVİSİNİN ETKİNLİĞİNİN ORTAYA KONMASI" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile Gülhane Sağlık Bilimleri Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç.Dr.Mehmet ÖZLER

Fizyoloji AD.Başkanlığı

Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

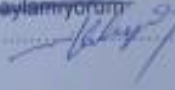


Başkan : Prof.Dr.Necdet KOCABIYIK

Anatomi AD.Başkanlığı

Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Üye : Doç. Dr. Mehmet ÖZLER

Fizyoloji AD.Başkanlığı

Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

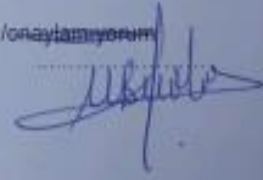


Üye : Doç Dr. Murat Timur BUDAK

Fizyoloji AD.Başkanlığı

Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Tez Savunma Tarihi: 28/06/2018

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Ömer AZAL



G5BE Form No:2017/31

TEŞEKKÜR

Fizyoloji yüksek lisans eğitimimi tamamladığım öğrenim sürem boyunca benimle ilgilenen ve bu tezin başarıya ulaşmasında bilgi ve tecrübelerinden yararlanma olanağı bulduğum Sağlık Bilimleri Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve tez danışmanım değerli Doç.Dr. Mehmet ÖZLER' e,

Mitokondri Transplantasyonu fikrini bir makalesi ile bana aşıl原因 ve tezime katkılarından dolayı Harvard Medical School Boston Children Hospital' dan Doç.Dr. James Donald McCully' e,

Tezime ilk günden beri inanan ve patoloji işlemlerinde yardımlarını esirgemeyen Gazi Üniversitesi Patoloji bölümünden ağabeyim Doç. Dr.Özgür EKİNCİ' ye,

Tezime yaptığı entelektüel katkılarıyla Hacettepe Üniversitesi Fizyoloji AD. Başkanlığı' ndan değerli hocam Doç.Dr.Murat Timur BUDAK' a,

Tez jürimde yer alan Sağlık Bilimleri Üniversitesi Anatomi AD.Başkanlığı' ndan Prof.Dr.Necdet KOCABIYIK' a,

Tez çalışmam süresince aynı yolda ve mitokondrinin gücüne inanan doktora öğrencisi kardeşim Öner ÜLGER' e ve bu çalışmanın her bir aşamasında katkılarını esirgemeyen Doktora öğrencisi ağabeyim Fatih KALKAN' a,

Tezimin istatistik aşamaları ve istatistiksel yorumlarıyla katkılarını yapan Sağlık Bilimleri Üniveristesi Bilgi İşlem Şubesinde görevli Sayın Volkan TÜRKMEN' e, Çalışmamın laboratuvar aşamalarındaki yardımlarını eirgemeyen Histoloji-Embriyoloji Doktora öğrencisi Sema ÖNER' e, Kök hücre laboratuvarından Meral SARPER' e, Fizyoloji laboratuvarından Serpil SUVAY ve Barbaros ULUSOY' a,

Mitokondri transplantasyonu fikrinin bende oluşturduğu bakış açısına sonsuz inanan ve tezim boyunca yanımda olan M. Melike ÇELİK' e,

Sonsuz teşekkürler..İyi ki varsınız...

Gökhan Burçin KUBAT
Fizyoloji Y.Lisans Öğr.
2018

ÖZET

Ratlarda Doxorubicinle oluşturulan böbrek hasarı modelinde, rat mezenkimal kök hücre mitokondrisi transplantasyonu tedavisinin etkinliğinin ortaya konması, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizioloji Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Programı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2018.

Çalışmada ağırlıkları 300-350 gram ağırlığında 42 adet Sprague-Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlar 4 gruba ayrıldı: 1.grup sham grubu, 2.grup Doxorubicin ile nefrotoksisite oluşturacak grup, 3. grup Doxorubicin ile nefrotoksisite oluşturulan mitokondri transplantasyonu yapılan tedavi grubu, 4. grup ise Doxorubicin ve Respiration buffer uygulanan gruptur.

Mitokondri transplantasyonu için Rat mezenkimal kök hücre kültürü yapıldı. Daha sonra mitokondri izolasyonu yapıldı. Mitokondri membran potansiyelini göstermek için Mitotracker RED CMXRos ile immünofloresan yöntem kullanıldı. İzole edilmiş mitokondrinin metabolik aktivitesini belirlemek için ATP Assay ölçümü yapıldı. Mitokondri transplantasyonu için, 2×10^7 rat mezenkimal kök hücresinden mitokondri izolasyonu yapıldı. Doxorubicin+mitokondri grubunda her iki böbreğe bu transfer işleminde yaklaşık 8 milyon mitokondri 500 µl. içinde uygulandı. Histolojik analizler için hematoksilen-eosin boyaması yapıldı. Biyokimyasal analizler için alınan kan örneklerinden üre, kreatin ve BUN analizleri, idrar örneklerinden proteinüri analizleri yapıldı. Alınan böbrek dokusu örneklerinde oksidan-antioksidan dengesi ortaya koymak üzere MDA (Malondialdehit), SOD (Superoksit dismutaz), GPx (Glutasyon peroksidaz) analizleri yapıldı.

Mezenkimal kök hücrelerde mitokondrinin membran bütünlüğü için 5×10^4 hücre sayılması sonucunda %99,39' luk kısmının membran bütünlüğünü koruduğu gözlemlenmiştir. Mezenkimal kök hücreden mitokondri izolasyonu sonrasında %46,30'luk kısımda mitokondrilerin membran bütünlüğünü koruduğu gözlemlenmiştir.

Histolojik analizlerde, sham grubunda hiçbir böbrek hasarı gözlemlenmedi. Doxorubicin grubu, Doxorubicin+respiration buffer grubu ve Doxorubicin+mitokondri gruplarında Doxorubicin enjeksiyonundan sonra tübüler dilatasyon ve tübüllerde protein birikimi gözlemlendi. 5. günde mitokondri transplantasyonundan sonra

Doxorubicin+mitokondri grubunda tübüler protein birikimi anlamlı oranda azaldı. Asıl önemli nokta ise Doxorubicin+mitokondri grubunda transplantasyondan sonra tübüler hücrelerde anlamlı Şekilde rejenerasyon bulundu.

Üre, Kreatin ve BUN ölümünden elde edilen sonuçlarda Sham grubu, Doxorubicin grubu, Doxorubicin+respiration buffer grubu ve Doxorubicin+mitokondri gruplarındaki deęiŐimler istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar bulunamadı. Proteinüri ölümünden elde edilen sonuçlara göre Sham grubunda bir değişiklik gözlemlenmedi. Doxorubicin grubu, Doxorubicin+respiration buffer grubu ve Doxorubicin+mitokondri gruplarında doxorubicin enjeksiyonundan sonra ilk beş günde tüm ratlar 3+ proteinüri değerine ulaştı. Doxorubicin+mitokondri grubunda beşinci günde mitokondri transplantasyonundan sonra anlamlı azalma bulundu.

MDA ölümünden elde edilen sonuçlarda Sham grubu, Doxorubicin grubu, Doxorubicin+respiration grubu ve Doxorubicin+mitokondri gruplarındaki deęiŐimler istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar bulunamadı. SOD enzim seviyesi ölümlerinde elde edilen sonuçlara göre Sham grubuna göre Doxorubicin+mitokondri grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede artış bulundu. Yine Doxorubicin grubuna göre Doxorubicin+mitokondri grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede artış bulundu. Diğer alıŐma gruplarında llen değerler arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı. GPx enzim seviyesi ölümlerinde elde edilen sonuçlara göre Sham grubuna göre Doxorubicin+mitokondri grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede artış bulundu. Yine Doxorubicin grubuna göre Doxorubicin+mitokondri grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede artış bulundu. Diğer alıŐma gruplarında llen değerler arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı.

Bu sonuçlara göre mitokondri transplantasyonunun böbrek hasarı hastalıklarında tedavi edici özelliği dikkat çekmiŐtir. Bu tedavi yönteminin hüresel ya da mitokondriyal hasara neden olan diğer hastalıklarda kullanılabileceği ngrlmektedir.

Anahtar kelimeler: Doxorubicin, böbrek hasarı, rat, mezenkimal kk hücre, mitokondri transplantasyonu

SUMMARY

Demonstrating the efficacy of treatment of rat mesenchymal stem cell mitochondrial transplantation in a model of renal injury induced by Doxorubicin in rats, University of Health Science, Institute of Gulhane Health Sciences, Physiology Program, MSc Thesis, Ankara, 2018.

In this study, Forty-two male Sprague-Dawley male rats weighing 300-350 grams were used. The rats were divided into 4 groups: Group 1 sham group, group 2 doxorubicin with nephrotoxicity, group 3 doxorubicin with nephrotoxicity and mitochondria transplantation, group 4 is the doxorubicin and respiration buffer group.

Rat mesenchymal stem cell culture was performed for mitochondrial transplantation. Then, mitochondrial isolation was performed. To demonstrate the mitochondrial membrane potential, an immunofluorescent method was used Mitotracker RED CMXRos. ATP Assay measurement was performed to determine the metabolic activity of isolated mitochondria. For mitochondrial transplantation, isolated mitochondria from 2×10^7 mesenchymal stem cells were used and approximately 500 μ l (8 million) mitochondria were injected into both kidney in the Doxorubicin + mitochondria group. Hematoxylin-eosin staining was performed for histological analysis. Blood samples for biochemical analysis were analyzed for urea, creatinine and BUN, and urine samples were analyzed for proteinuria. MDA (malondialdehyde), SOD (superoxide dismutase), GPx (glutathione peroxidase) analyzes were performed to determine the oxidant-antioxidant balance in the recipient kidney tissue specimens.

In mesenchymal stem cells, it was observed that 99.39% of the mitochondria preserved membrane integrity for 5×10^4 cell counts for membrane integrity. It has been observed that isolated mitochondria of mesenchymal stem cells maintains membrane integrity in 46.30% for mitochondrial transplantation.

Histologic analysis showed no kidney damage in sham group. Doxorubicin group, doxorubicin + respiratory group and doxorubicin + mitochondria groups showed tubular dilatation and protein accumulation in tubules after dose of doxorubicin. The accumulation of tubular protein in the group of Doxorubicin + Mitochondria group decreased considerably after the 5th day of transplantation of mitochondria. Importantly, there is significant regeneration of tubular cells in the Doxorubicin + Mitochondria group after transplantation.

Differences in the Sham group, Doxorubicin group, Doxorubicin + Respiration buffer group and Doxorubicin + Mitochondria groups were not found to be statistically significant in the results obtained from Urea, Creatine and BUN measurements. No difference was observed in the Sham group according to the results obtained from the measurement of proteinuria. In the Doxorubicin group, Doxorubicin + Respiration buffer group and Doxorubicin + Mitochondria groups, all rats reached 3+ proteinuria in the first five days after doxorubicin injection. Doxorubicin + Mitochondria group showed a significant decrease on day 5 after mitochondrial transplantation.

Differences in the Sham group, Doxorubicin group, Doxorubicin + Respiration buffer group, and Doxorubicin + Mitochondria groups were not found to be statistically significant in MDA measurement results. There was a statistically significant increase in Doxorubicin + Mitochondria group according to Sham group in the results obtained in SOD enzyme level measurements. Moreover, according to the Doxorubicin group, there was a statistically significant increase in Doxorubicin + Mitochondria group. No significant difference was found between the values measured in the other study groups. There was a statistically significant increase in Doxorubicin + Mitochondria group according to Sham group in the results obtained in GPx enzyme level measurements. Moreover, according to the Doxorubicin group, there was a statistically significant increase in Doxorubicin + Mitochondria group. No significant difference was found between the values measured in the other study groups.

According to these results, mitochondrial transplantation has attracted attention to its therapeutic properties in kidney injury diseases. It is envisaged that this treatment may be used in other diseases that cause cellular or mitochondrial damage.

Key words: Doxorubicin, renal injury, rat, mesenchymal stem cell, mitochondrial transplantation

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
İNGİLİZCE ÖZET	viii
İÇİNDEKİLER	x
KISALTMALAR	xiv
RESİMLER	xvii
TABLolar	xviii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1. MİTOKONDRIYE GİRİŞ	2
2.2. MİTOKONDRIYAL DNA	3
2.3. MİTOKONDRIYAL FİZYON, FÜZYON VE MİTOFAJİ	4
2.4. OKSİDATİF FOSFORİLASYON	5
2.5. OKSİDATİF STRES	6
2.5.1. ANTiOKSİDANLAR	6
2.5.1.1. Endojen Antioksidanlar	7
2.5.1.1.1. Enzimatik Antioksidanlar	7
2.5.1.1.2. Nonenzimatik Antioksidanlar	7
2.5.1.2.1. Süperoksit Dismutaz	7
2.5.1.2.2. Katalaz	8
2.5.1.2.3. Glutasyon Peroksidaz	8

2.5.1.2.4. Glutasyon Redüktaz	8
2.5.1.2.5. Glutasyon	9
2.5.1.2.6. Malondialdehit	9
2.6. MİTOKONDRIYAL DİSFONKSİYON	10
2.7. AKUT BÖBREK YETMEZLİĞİ	10
2.7.1. Epidemiyoloji	11
2.7.2. Patofizyoloji	11
2.7.3. Tanı	11
2.7.4. Tedavi	12
2.8. DOXORUBICIN NEFROTOKSİSİTESİ	12
2.9. MİTOKONDRIYAL TRANSPLANTASYON	13
2.10. MEZENKİMAL KÖK HÜCRE	15
3. MATERYAL – METOD	16
3.1. Deney Hayvanları	16
3.2. Deney Grupları	17
3.3. Cerrahi Prosedür	17
3.4. Mezenkimal Kök Hücre Kültürü ve Hücre Sayımı	20
3.5. Mitokondri İzolasyonu	20
3.6. Mitokondri Membran Bütünlüğü Analizi	21
3.6.1. Mitotracker Red CMXRos ile hücre boyaması ve flow sitometri	21
3.6.2. Mitotracker Red CMXRos ile mitokondri boyaması ve flow sitometri	21

3.6.3.Mitotracker Red CMXROS - DAPI boyaması ve immünofloresan mikroskop analizi	21
3.6.4.Mitotracker Red CMXROS ve konfokal mikroskop analizi	22
3.7. Mitokondri ATP Assay Analizi	22
3.8. Histolojik Analizler	22
3.9. Biyokimyasal Analizler	23
3.10. Oksidatif Stres Analizleri	23
3.10.1. Dokuların Homojenizasyonu	23
3.10.2. Protein Ölçümü	23
3.10.3. Lipid Peroksidasyonu Düzeyinin Ölçümü (MDA)	24
3.10.4. Total Süperoksit Dismutaz Aktivitesi (SOD)	24
3.10.5. Glutasyon Peroksidaz Analizi (GPx)	24
3.11. İstatistiksel Analiz	25
4. BULGULAR	25
4.1. Mitokondri Membran Bütünlüğü Analizinin	25
4.1.1. Mitotracker Red CMXROS Flow Sitometri Analizi Sonuçları	25
4.1.2. Mitotracker Red CMXROS – DAPI İmmünofloresan Mikroskop Analizi Sonuçları	26
4.1.3. Mitotracker Red CMXROS Konfokal Mikroskop Analizi Sonuçları	27
4.2. Mitokondri ATP Assay Analizi	27

4.3. Histolojik Analizler	28
4.4. Biyokimyasal Analizler	33
4.5. Oksidatif Stres Analizler	35
4.5.1. Lipid Peroksidasyonu (MDA) Düzeyi	35
4.5.2. Total Süperoksit Dismutaz Aktivitesi (SOD)	35
4.5.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Düzeyi	35
5. TARTIŞMA	36
6. SONUÇ	43
7. KAYNAKLAR	45

KISALTMALAR

ADP	: Adenozin Difosfat
ACE	: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
AKI	: Akut böbrek hasarı
ALT	: Alanin aminotransferaz
ATP	: Adenozin Trifosfat
BSA	: Bovine Serum Albumin
BUN	: Kan üre nitrojen
CAT	: Katalaz
Ca⁺⁺	: Kalsiyum
Cu	: Bakır
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
ETC	: Elektron Transport Chain
FAD	: Flavin Adenin Dinükleotid
FADH₂	: Flavin Adenin Dinükleotid (indirgenmiş hali)
GFR	: Glomerüler Filtrasyon Oranı
GR	: Glutasyon Redüktaz
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
g	: Gram
hMSC	: İnsan Mezenkimal Kök Hücre
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit

H&E	: Hematoksilen Eozin
JC-1	: Tetrachloro-tetraethylbenzimidazolocarbo-cyanine iodide
K	: Potasyum
kg	: Kilogram
L	: Litre
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
i.m.	: İntramüsküler
MCP-1	: Monosit Kemotraktan Protein
MDA	: Malondialdehit
Mg+2	: Magnezyum
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mmol	: Milimol
mOsm	: Miliosmol
mRNA	: Messenger RiboNucleic Acid
mtDNA	: Mitokondriyal Deoksiribo Nükleik Asit
NADH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid (okside olmuş)
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NaHCO₃	: Sodyum Bikarbonat
NF-κB	: Nükleer Faktör-Kappa B
NaCl	: Sodyum Klorür

nm	: Nanometre
NO	: Nitrik Oksit
O2	: Oksijen
OH	: Hidroksil Radikali
PBS	: Fosfat Buffer Saline
PEP-1	: Cell Penetrating Peptide
pH	: Potansiyel Hidrojen
ROS	: Reactive Oxygen Species
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
rRNA	: Ribozomal Ribonukleik Asit
SDF-1	: Stromal Kökenli Faktör-1
SF	: Serum Fizyolojik
SOD	: Süperoksit Dismutaz
tRNA	: Taşıyıcı Ribonukleik Asit
°C	: Santigrat Derece
Zn	: Çinko

RESİMLER

RESİM-1 Deney Hayvanları Mitokondri Transplantasyonu ve cerrahi işlem

RESİM-2 Deney Hayvanları Sakrifikasyonu

RESİM-3 Flow Sitometri Analizi Mitotracker Boyanmış Hücre

RESİM-4 Flow Sitometri Analizi Mitokondri İzolasyonu Sonrası Boyanmış Mitokondri

RESİM-5 İmünofloresan Mikroskop Analizi

RESİM-6 Konfokal Mikroskop Analizi

RESİM-7 Mitokondri ATP Assay Analizi

RESİM-8 Histolojik Analiz Grafiği

RESİM-9 Tübüler Dilatasyon H&E Boyama

RESİM-10 Tübüler Protein Birikimi H&E Boyama

RESİM-11 Tübüler Rejenerasyon H&E Boyama

RESİM-12 İdrar Proteinüri Düzeyleri

TABLÖLAR

TABLÖ-1 Akut Böbrek yetmezliği Tanı Sınıflaması

TABLÖ-2 Histolojik Analizler

TABLÖ-3 Biyokimyasal Analizler (Üre, Kreatin, BUN)

TABLÖ-4 Biyokimyasal Analizler (Proteinüri)

TABLÖ-5 Oksidatif Stres Analizleri



1.GİRİŞ ve AMAÇ

1.1 GİRİŞ

Böbrek sıvı elektrolit dengesi ve kandan atık ürünlerin atılmasını sağlamak için çok fazla mitokondri içeren organların başında gelir. Mitokondri böbreğin bu önemli fonksiyonlarını yerine getirmek için enerji sağlar. Mitokondriyal disfonksiyon ATP üretiminde azalışa, hücresel fonksiyon ve yapısındaki değişimlere ve hatta böbrek fonksiyonlarının kaybına neden olur. Mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, akut böbrek yetmezliği ve diyabetik nefropati gibi önemli böbrek hastalıklarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

İnsanlarda kullanılan bazı ilaçlar özellikle kemoterapotik ajanlar birçok yan etkiye sahiptir. Doxorubicin, over, meme, akciğer, uterus, serviks kanseri ve Hodgkin's hastalığı gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılan antikanser bir ilaçtır. Fakat klinik kullanımı kardiyotoksisite, nefrotoksisite ve hepatotoksisite gibi yan etkilerinden dolayı sınırlıdır. Hücresel fonksiyon ve homeostazisin korunması ve sürdürülmesinde mitokondri önemli bir rol alır. Mitokondri hasarı ve fonksiyon kaybı ile gerçekleşen birçok hastalık ve gelişim bozukluğu vardır. Mitokondriyal disfonksiyonu başlatan mekanizmalar çeşitlidir ve bu disfonksiyon mitokondriyal ya da nükleer genomda genetik değişikliklere neden olmaktadır. Mitokondriyal disfonksiyon sonucunda; organların fonksiyon kaybı ve nekroza neden olan hücresel disfonksiyon meydana gelir. Mitokondrinin bu organ ya da dokulardaki enerji ihtiyacının temeli olduğu bilinmekte olup bunu örneğin miyokard dokusunda oksidatif fosforilasyon ve koroner akım sayesinde yapmaktadır. Miyokard dokusunda meydana gelen bir iskemi sonucunda koroner akım durur ve dokunun ihtiyacı olan oksijen azalır.

Mitokondriyal disfonksiyona sahip organlarda, başka doku veya organdan elde edilen sağlıklı mitokondrinin hasarlı veya işlevsiz mitokondrilerin yerine nakledilmesi ile ilgili araştırmalar yapılmaktadır. Bu araştırmalar, enerji üretimini artırarak ve oksidatif hasarı azaltarak doku/hücre korunmasına yönelik umut verici sonuçlar içermektedir.

1.2 AMAÇ

Mitokondri vücut hücrelerinin hemen hepsinde hücrenin enerji ihtiyacını karşılama ve bu yolla organizmanın canlılığını ve homeostatik dengeyi sürdürmede anahtar bir

rol oynar. Bunlara ek olarak mitokondrinin apoptosiz gibi önemli hücrel aktivitelere görevleri bulunmaktadır. Vücuttaki bu yaygın etkilerine bağlı olarak çeşitli nedenlerle mitokondriyal disfonksiyon meydana geldiğinde çeşitli hastalıklar görülebilmektedir. Bu hastalıklar Kearns-Sayre Sendromu, Melas Sendromu (Mitokondriyal Ensefalopati, Laktik asidoz, Stroke-Like episodlar), Pearson Sendromu, MERRF Sendromu (Miyoklonik Epilepsi, Ragged-Red Fibers), NARP (Nöropati, Ataksi, Retinitis Pigmentosa), LEIGH Sendromu, MNGIE (Myopathy and external ophthalmoplegia; Neuropathy; Gastrointestinal; Encephalopathy), LEBER'in Herediter Optik Nöropatisi (LHON), Alexander Hastalığı, Menkes Hastalığı, Alper Hastalığı, Barth Sendromu, Luft Hastalığı, Costeff Sendromu, Mitokondriyal Solunum Zincir Anormallikleri, Karnitin Eksikliği, Familial Rekürren Rabdomiyoliz, Friedreich Ataksisi, Spastik Paraparezi, Kartilaj-Saç Hipoplazisi(KSH)'dir (1,2). Mitokondriyal hasar bunların dışında çeşitli ilaçların uygulanması ile de görülmektedir. Örneğin antineoplastik bir kemotepötik ilaç olan doxorubicin hücrel ve özellikle mitokondri hasarı oluşturarak doku fonksiyon bozulmalarına neden olmaktadır (3,4).

Mitokondri böbreğin fonksiyonlarını yerine getirmesi için büyük oranda enerji sağlar. Mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ATP üretiminde azalmaya, hücrel fonksiyon ve yapıda değişikliklere ve böbrek fonksiyonlarının kaybına neden olmaktadır. Devam eden mitokondri fonksiyon bozukluğu, akut böbrek yetmezliği ve diyabetik nefropati gibi böbrek hastalıklarının ilk aşamalarında önemli bir etkiye sahiptir (5). Bu çalışmadaki amacımız sıvı elektrolit dengesini düzenleyen, vücuttan atık ürünlerin atılmasını sağlayan ve kalpten sonra en çok mitokondriyal içeriğe sahip olan böbreklerin mitokondriyal homeostazisin geliştirilmesinin böbrek fonksiyonlarındaki iyileşmeye katkısını incelemektir. Doxorubicin ile böbrek hasarı oluşturduğumuz dokuya/hücrelere yönelik bir tedavi olarak rat mezenkimal kök hücrelerinden elde edilen mitokondriyal böbreklere naklinin etkileri incelenmiştir (6).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MİTOKONDRIYE GİRİŞ

Mitokondri güç kaynağı olarak bilinir ve hücre sitoplazmasında bulunur. Hücrelerin temel organellerinin başında gelir. Mitokondriyal biyoenerji sürecinde özellikle oksidatif fosforilasyon ve glukoz ve yağın aerobik metabolizmasında anahtar bir rol oynar. Mitokondriyal adenosin trifosfat (ATP) formunda hücrenin enerjisinin

çoğunu üretir. Mitokondri vücut hücrelerinin hemen hepsinde hücrenin enerji ihtiyacını karşılar ve bu yolla organizmanın canlılığını ve homeostatik dengeyi sürdürür (7). Ayrıca mitokondrinin kalsiyum depolama ve apoptozis gibi önemli hücrenel olaylarda da görevleri bulunmaktadır (8,9).

2.2. MİTOKONDRIYAL DNA

Mitokondriyal DNA (mt DNA), hücrenin çekirdeğinde bulunan DNA' dan farklı olarak hücrenin enerji üretiminin çoğunu gerçekleştiren mitokondride bulunan kendine özgü DNA parçasıdır. Mitokondrinin sahip olduğu mt DNA kendi proteinlerini üretir (10). mt DNA koruyucu histon proteinlerinden yoksundur ve nükleer DNA' dan bağımsız replikasyon mekanizmasına sahiptir. Bu yüzden mutasyon oranı çok yüksektir. mt DNA mitokondriyal proteinlerin % 2-3'ünü, nükleer DNA ise % 98'ini sentezler ve sentezlenen proteinler mitokondriye taşınır. Mitokondri iç membranı geçirgen değildir, bu yüzden nükleer DNA tarafından sentezlenen proteinlerin matrikse taşınması için bazı mekanizmalar vardır. Aminoasitler, karbonhidratlar ve yağ asitleri iç membrana gelerek burada oksidatif yıkıma uğrayarak yüksek enerjili ATP sentezlenir ve hücrenin enerji ihtiyacı sağlanır (11).

İnsan mt DNA' sı 16.569 baz çiftinden oluşan, küçük, çift zincirli bir moleküldür. Herbiri kendi kendine replike olabilen hafif (L) ve ağır (H) zincirden meydana gelir. Ağır zincirin replikasyonunu displacement loop bölgesi kontrol eder ve zincirler içinde promotor bölge görevi yapar. Hepsi anneden gelen mitokondriler 37 tane geni içeren DNA molekülüne sahiptir. Sadece 13 mitokondriyal protein mt DNA tarafından kodlanır. Diğer mitokondriyal proteinleri sağlamak için hücrenin nükleer DNA' sına ihtiyaç duyar (11).

mt DNA' nın kendine ait replikasyon ve transkripsiyon mekanizması mevcuttur. Fakat mt DNA' nın replikasyon ve transkripsiyonu için gerekli enzimler, nükleer DNA tarafından sentezlendiği için, mt DNA tam bir otonomi göstermez. mtDNA kopyalama ve transkripsiyonu, hücre döngüsü içinde S ve G2 fazlarında oluşur (12,13). Ancak mitokondriyal protein sentezi interfaz döneminde ikiye katlanır ve hücre döngüsünde sabit kalır (14).

mt DNA replikasyonu, Displacement loop mekanizmasına göre meydana gelir. Bu mekanizmada ilk olarak, ağır (H) zincirin replikasyon kısmından 5'-3' yönüne doğru

sentez olayı ile başlar. Bu sentez sonrasında ağır zincir, hafif zincirin replikasyon kısmına ulaştığı anda, ters yönde ilerler ve hafif zincir sentezlenir. mt DNA transkripsiyonu ise Displacement loop bölgesindeki promotordan ters yönde başlar. Sonuçta iki zincir aynı anda transkripsiyona uğrar, rRNA, tRNA ve mRNA'lar oluşur. Birbirine benzer rRNA, tRNA ve bazı proteinleri kodlayan genler mitokondrilerde bulunur. (15).

Mitokondri yaklaşık 4-5 mm uzunluğunda olup, 107 dalton moleküler kütesine sahiptir. mtDNA insanın her hücresinde yaklaşık 500 ile 8000 adet bulunur (16,17).

Mitokondri kendine ait bir DNA polimeraza sahiptir (18). mtDNA, daha sıkı bir yapısal oluşum gösterir nükleer DNA gibi eksonlar ve histonları içermez. Elektron taşıma zincirine (ETC) yakın olması ve bu süreçte oluşan oksidatif moleküllerden etkilendiği için, mtDNA nükleer DNA' dan daha çok mutasyona uğrar (19).

Mitokondri genetik olarak annenin mtDNA' sından kendi çocuğuna geçer ama babanın mtDNA' sından hiç girdi almaz (20).

2.3. MİTOKONDRIYAL FİZYON, FÜZYON VE MİTOFAJİ

Mitokondriyal fizyon iki membranın ayrılması, füzyon ise iki mitokondrionun iç ve dış zarlarının tamamen kaynaşmasıdır. Fizyon-füzyon, mitokondriyal homeostaz için gerekli olan bütünleştirici bir mekanizmadır. Sağlıklı hücrelerde fizyon ve füzyon hem mitokondrinin hem de hücrenin sağlıklı olarak yaşamını sağlar.

Mitokondrinin kalsiyum dengesinde, yaşlanma sürecinde, çeşitli hastalıklarda, hücrenin canlılığı ve ölümündeki rolü kaçınılmazdır. Bu süreçlerde mitokondriyal fizyon ve füzyon önemli bir role sahiptir (21). Fizyon ve füzyon arasındaki denge, mitokondri morfolojisini ve mitokondriyal DNA/proteinlerindeki problemleri ortaya çıkmasını engeller (22,23). Bazı çalışmalar oksidatif fosforilasyonun füzyonla artıp, fizyonla azaldığını göstermiştir (24,25).

Mitofaji ise hasarlı olan mitokondrinin hasarı giderilemediğinde yok edilmesidir. Burada en önemli belirteç mitokondri membran potansiyelinin azalmasıdır. Birçok hücre tipinde mitofaji, PINK1-PARKIN mekanizması üzerinden gerçekleşir. Bu mekanizma ile bir yandan hasarlı ve hasarsız mitokondri arasındaki füzyon önlenirken, diğer yandan hücrenin apoptoza gitmesi engellenir (26, 27, 28, 29).

Tümör süpresörü p53 geni sıklıkla insan kanserlerinde mutasyona uğrar ve p53 proteini kanseri baskılamaktadır. Bununla birlikte, p53'ün aracılık ettiği tümör baskısının arkasındaki mekanizma hala belirsizdir. Son zamanlarda, Miap (mitokondri yiyen protein) proteini bir p53 - indüklenebilir protein olarak tanımlandı. Miap mitokondriyal hasara yanıt olarak mitokondri (mitokondri içinde lizozom - benzeri organellerin mitokondriyal birikimi proteini ya da MALM) içinde lizozomal proteinlerin birikimini indükler ve sağlıklı mitokondriyi onarmak için oksitlenmiş mitokondriyal proteinleri ortadan kaldırır (183).

2.4. OKSİDATİF FOSFORİLASYON

Karbonhidrat ya da yağların yıkılmasıyla hücrelerde kullanılan enerjinin büyük çoğunluğu mitokondri içinde bulunan oksidatif fosforilasyon ile dağıtılır. Örneğin, glikoliz ile glukozun yıkımı ve sitrik asit döngüsü ile, NADH'ın 10 molekülünü, FADH₂'nin 2 molekülünü ve ATP' nin 4 molekülünü üretilir. Bu üretilen moleküllerden de, NADH ve FADH₂' den elektronlar oksidatif fosforilasyon ile moleküler oksijene elektron transport zincirine aktarılır. İç mitokondriyal membranda bulunan protein kompleksleri ETZ ve oksidatif fosforilasyon vasıtası ile açığa çıkan enerjide kritik öneme sahiptir (30, 31, 32, 33).

Oksidatif fosforilasyon süresince, NADH ve FADH₂' daki oksidasyon reaksiyonlarından açığa çıkan enerji mitokondri iç membranında bulunan dört kompleks ile gerçekleştirilir. Daha sonra kompleks beş ATP sentezi görevini yapar (30, 31, 32, 33).

NADH' dan elektronların transferinde, NADH' daki elektronlar yaklaşık kırk polipeptit zincirinden oluşan kompleks I' deki elektron transport zincirine girer ve NADH' dan flavin mononükleotide transfer olur. Daha sonra ise on polipeptitten oluşan ve kompleks I' den kompleks III' e elektronları taşıyan Coenzyme Q vardır. Kompleks III' de elektronlar sitokrom b' den periferik membran proteini sitokrom c' ye transfer olur. Sitokrom c elektronları O₂ e transfer olduğu kompleks IV' e taşıma işlemi yapar (30, 31, 32, 33).

Elektronların kompleks I, III ve IV yoluyla geçişinden elde edilen serbest enerji, bu elektron taşıma reaksiyonlarından elde edilen enerjinin ATP sentezine bağlandığı mekanizma, glikoliz veya sitrik asit döngüsü sırasında ATP sentezinden temel olarak

farklıdır. Sonraki durumlarda, yüksek enerjili bir fosfat, enerji üreten reaksiyonun diğer substratından doğrudan ADP'ye transfer edilir. Örneğin, glikolizin son reaksiyonunda, fosfoenolpiruvatın yüksek enerjili fosfatı, piruvat+ATP üreterek ADP'ye aktarılır. Böyle yüksek enerjili fosfat gruplarının direk transferi elektron transferi sırasında oluşmaz. Bunun yerine, elektron taşınmasından elde edilen enerji, iç mitokondriyal membran boyunca bir proton gradyanının oluşturulmasında kullanılır. Bu gradyanta depolanan potansiyel enerji daha sonra kompleks V tarafından üretilir (25). Oksidatif fosforilasyon sırasında ROS oluşturulur, ancak bunlar genellikle mitokondri içindeki antioksidan mekanizmalar tarafından tamponlanabilen küçük miktarlarda bulunur (26).

2.5. OKSİDATİF STRES

Serbest radikallerin artması ve antioksidanların yetersiz kalması durumunda “Oksidatif Stres” oluşur. Hücresel yapılarda, çeşitli moleküllerde oksidan birikimi ve fizyolojik olaylarda aksama/bozulma meydana gelir. Oksidan/antioksidan ve ROS'ların yararlı/zararlı etkileri arasında bir dengenin olması gerekmektedir. Organizmada serbest radikaller açığa çıkar ve bunun sonucu olarak vücutta hasar oluşur. Bu hasarı engelleyen, oluşan zararı azaltan “antioksidan savunma sistemleri” geliştirilmiştir (34). Antioksidan enzimler serbest radikalleri inhibe ederek oluşabilecek hasarları önlerler (35). Bu savunma sistemleri serbest radikalleri tutar veya daha zayıf başka bir moleküle dönüştürerek aktivitelerini azaltır, serbest radikalleri kendine bağlayıp reaksiyon zincirini kırar ya da onarır (36).

Mitokondri elektron transport zinciri (ETZ) yoluyla ATP üretir. Elektronlar ETZ yoluyla moleküler oksijene aktarıldığı zaman, oluşabilen süperoksit anyonlarının düşük konsantrasyonu kompleks I' den ve kompleks III' den geçerken oluşan elektron kaçaklarından olur. Süperoksit gibi oluşan serbest oksijen radikallerinin düşük seviyede olması hücre fonksiyonu için önemlidir ve yüksek konsantrasyonlarda bulunması mitokondri ve hücreye zararlıdır. Oksidatif stres altında artan ROS miktarı mt DNA' da kırılmalara ve mutasyonlara neden olabilir. mt DNA kırılmaları elektron transport zincirinin etkinliğini negatif olarak etkiler. Bu yüzden mitokondri ROS'un aşırı dönüşümü ile başa çıkmak için antioksidan savunma sistemlerine sahiplerdir (37, 38).

2.5.1. ANTİOKSİDANLAR

Antioksidanlar serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasardan hücreleri koruyabilen maddelerdir. Antioksidanlar serbest radikallerin toksik etkilerine karşı hücreleri korur, serbest radikalleri stabilize eder ve hastalıkları önlemede katkı sağlar (39). Bu şekilde antioksidanların vücutta oluşturdukları bu savunma sistemlerine “antioksidan savunma sistemleri” denilmektedir (41). Antioksidanlar, serbest radikallerle çok hızlı bir reaksiyona girer ve otooksidasyon/peroksidasyonun ilerlemesini önlerler (42, 43).

Antioksidanlar doğada eksojen veya endojen olabilir. Endojen antioksidanlar ise enzimatik ve nonenzimatik olarak sınıflandırılabilir (39, 40).

2.5.1.1. Endojen Antioksidanlar

Endojen antioksidanlar, enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar olarak iki alt grupta sınıflandırılabilir (39,40).

2.5.1.1.1. Enzimatik Antioksidanlar

Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutasyon peroksidaz (GPx) ve Glutasyon redüktaz (GR) enzimatik savunma hattını oluşturan enzimsel antioksidanlardır (43).

2.5.1.1.2. Nonenzimatik Antioksidanlar

Başlıca non enzimatik antioksidanlar doğada yiyeceklerle aldığımız antioksidanlardır. Bunlardan en önemlileri; mineraller (çinko, selenyum), vitaminler (Vitamin C,E,A,K), karotenoidler, organosülfür bileşikler, antioksidan kofaktör (koenzim Q) ve polifenollerdir.

2.5.1.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Hücrelerde oksijeni metabolize eden ve süperoksidin hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) katalizlenmesi yoluyla işlev gören enzimatik bir antioksidandır. Görevi ise fizyolojik olarak hücreleri süperoksit radikaline karşı korumaktır. Bu oksidatif strese karşı savunma hattının birincisini oluşturur. Zincirleme olarak meydana gelen reaksiyonların başlamasına yol açar. İnsan vücudunda 3 çeşit SOD türü vardır (44,45).

1. Sitozolde Cu/Zn-SOD: Bakır (Cu) ve çinko (Zn) içerir. 32 kDa molekül ağırlığında ve iki alt birimden meydana gelir. Bu alt birimler Cu ve Zn atomu içerir (44,46).

2. Mitokondrial Mn-SOD: Manganez (Mn) içerir ve mitokondride bulunur. 80 kDa molekül ağırlığında ve mitokondriyal bir enzimdir. Farklı olmasına rağmen Cu/Zn SOD ile aynı reaksiyonu katalizler (44, 45, 46, 47).

3. Ekstrasellüler SOD(EC-SOD): Mn içerir ve ekstrasellüler sıvıda bulunur. Organizmalarda tetramer, dimer ve multimer olarak üç formda bulunur. Her alt birim Cu ve Zn atomu içerir. EC-SOD ekstrasellüler matriks ve hücre yüzeylerinde bulunur. EC-SOD salgılanma ve sentezlenmesi fibroblast hücreleri, glia hücreleri ve endotel hücreleri ile gerçekleştirilir. Ekstrasellüler seviyede enzimatik olarak süperoksit radikallerini etkisizleştirebilen tek antioksidandır ve EC SOD oksidan hasarı ve fibrozis gibi akciğer hastalıklarından korunmak için çok önemlidir (44, 45, 48).

Süperoksit anyonlarını H_2O_2 ' e dönüştüren SOD mitokondri için önemlidir. Aşırı ROS üretimini engelleyen bir mekanizma oluşturur. Bu antioksidan savunma sisteminin amacı, ATP üretimini optimal koşullarda sağlamak ve mitokondriyal fonksiyonu sürdürmektir (49, 50).

2.5.1.2.2. Katalaz (CAT)

Katalaz hücre içi organellerde (peroksizom) çok miktarda, mitokondri ve endoplazmik retikulumda az miktarda bulunur. H_2O_2 ' i O_2 ' ye yıkararak uzaklaştırır. Dört alt proteine sahiptir. Her alt ünite bir Hem grubu bir NADPH molekülü içerir. CAT' ın hızlı çalışması için yüksek H_2O_2 konsantrasyonuna ihtiyaç vardır (51). H_2O_2 bir radikal değildir ve biyolojik moleküllerle reaksiyona girmez, ama OH oluşmasında bir ön madde rolü üstlenir (52,53). Ek olarak fenol ve alkollerin detoksifikasyonunu sağlar (54).

2.5.1.2.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx)

Glutasyon peroksidaz, hücreyi H_2O_2 ' den temizleyerek oksidatif hasara karşı hücreleri korur ve bu işlemde glutasyonu (GSH) kullanır. H_2O_2 'den OH' nin oluşmasına karşı koyar.

GPx hücrelerin sitoplazmasında bulunur ve her alt birimi selenyum atomu içeren dört protein alt biriminden meydana gelir (55). H_2O_2 'nin uzaklaştırılması işleminde CAT ile aynı görevi yapar. Karaciğer ve eritrositte yüksek aktivitede, kalp, akciğer ve beyinde orta aktivitede, kasta düşük aktivitede bulunmaktadır. %55-80'i sitoplazmada, %20-40'ı mitokondride bulunur. İki ana türe sahip olup, bunlar selenyuma bağlı glutatyon peroksidaz (Se-GPx) ve selenyuma bağımlı olmayan glutatyon peroksidaz (GPx)'dir. Se-GPx'in H_2O_2 ve organik hiperoksitlere karşı etkisi vardır. Buna karşın GSH yalnız lipid hidroperoksitleri metabolize ederek lipid peroksidasyonunun başlamasını ve ilerlemesini önler (56, 57, 58, 59).

Glutatyon disülfid (GSSG) GR tarafından mitokondriyal glutatyona (mGSH) dönüştürülür. GSSG'nin mGSH'ye dönüştürülmesi, NADPH'yi gerektirir; mGSH seviyeleri ve pentoz fosfat yolu NADPH üretir. Bu mekanizmalar aşırı ROS seviyelerini önlemede ve mitokondriyal fonksiyonun sürdürülmesinde önemli bir rol oynar (60).

2.5.1.2.4. Glutatyon Redüktaz (GR)

GR; flavin adenin dinükleotid (FAD) içeriğine sahip olan protein bir enzimdir. GSH endojen peroksitlerin detoksifikasyonu için önemli bir yere sahiptir. GPx peroksitleri temizlemek için GSH'a ihtiyaç duyar. Oksitlenmiş olan GSSG, GR ile GSH'a dönüşmektedir. Bu sebeple NADPH serbest radikal hasarını engelleme için gereklidir ve en önemli kaynağı pentoz fosfat yolağıdır (61).

2.5.1.2.5. Glutatyon (GSH)

GSH, bütün ökaryotik hücrelerden sentezlenir ve yüksek yoğunlukta bulunur. Glutatyonun yaklaşık %90'ı sitozolde, %10'u mitokondride, az oranda da endoplazmik retikulumda bulunur ve düşük molekül ağırlıklıdır. GSH detoksifikasyon sisteminin düzgün çalışmasında, hücre sinyal mekanizmasının düzenlenmesinde, gen ekspresyonu ve apoptozisde antioksidan olarak görev yapar (62, 63, 64).

Glutatyonun sentez mekanizması iki aşama ile gerçekleşir. İlk glutamin-sistein ligaz (GCL), glutamilsisteini oluşturur. İkinci olarak glutatyon sentetaz (GSS), glutamilsisteine glisini bağlayarak GSH molekülünü meydana getirir. GSH negatif geri besleme (feedback) ile glutamilsistein oluşum hızını ve böylelikle kendi sentezini de

denetler. Bu sentezde bir molekül GSH için iki molekül ATP' nin hidrolizi gerekmektedir (65).

GSH oksidasyonu, apoptotik sürecin erken dönem belirtisidir ve bu yüzden metabolik sinyal gibi davranabilir (66). GSH' ın görevleri; DNA sentezi ve hasarlı DNA' nın onarılması, metabolik fonksiyonların yerine getirilmesi, serbest radikallerin olası hasarlarının önlenmesi, zehirli maddelerin inaktif hale dönüştürülmesidir (67). Bunlara ek olarak antioksidan etkili olan C ve E vitaminleri üzerinde de orta düzeyde koruyucu etki gösterir (68).

Mitokondriyal olarak GSH diğer önemli antioksidan sistemidir. Mitokondriyal GSH sadece aşırı ROS seviyesini azaltmakla kalmaz aynı zamanda iç membrandan sitokrom c salınımını engeller. Ayrıca direk olarak süperoksit anyonları ile etkileşime geçerek glutatyon disülfite okside olur (69).

2.5.1.2.6. Malondialdehit (MDA)

Doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu ile üç karbonlu bir dialdehid olan MDA oluşur (70). Lipid peroksidasyon ürünleri serbest oksijen radikallerinin son oksidasyon ürünleridir. Bunlar uzun yaşam süresine sahip olup, zarları geçebilme yeteneğine sahiptir. Oksidatif lipid peroksitlerin parçalanması ile toksik etkiye sahip bir son ürün oluşur. Bu son ürünler hücre ölümüne neden olur ve mitokondriyal solunumda protein sentezi gibi önemli fonksiyonları inhibe ederler (71). MDA etkisini proteinlerin amino gruplarına, fosfolipidler veya nükleik asitlere bağlanarak gösterir. Diğer önemli etkileri ise deformasyon, hücre yüzey bileşenlerinin bozulması, iyon transportu ve enzim aktivitesi gibi zar özelliklerini değiştirmesidir (72). Aşırı lipid peroksidasyonunda MDA konsantrasyonu önemli derecede artarak doku hasarına yol açar (73). MDA, proteinlerin lizin rezidüleri ve fosfolipidlerin amin grupları ile kolaylıkla reaksiyona girer. Diffüze olabilme yeteneği çok yüksek olduğu için, DNA'nın nitrojen bazlarıyla reaksiyona girerek hasara neden olabilir (74, 75). Oksidatif stresin ölçülmesinde günümüzde en yaygın metod MDA ölçümüdür. İnsan vücudunda oksidasyon fizyolojik olarak devamlı oluşur ve buna ek olarak dışarıdan alınan ROS' lar bu oksidasyon sürecini hızlandırır. Vücutta serbest radikallerin artması ile ciddi hasarlar veya hastalıklar meydana gelebilir. Örneğin bu artışla gastrointestinal sistem hastalıkları, infertilite, kardiyovasküler hastalıklar, ilaçların toksisitesi (doxorubicin) gibi birçok

sistemi ilgilendiren sorunlar ortaya çıkabilir. Bu sorunların ortadan kaldırılması için oksidan-antioksidan sistemlerin bir dengede bulunması gerekmektedir.

2.6. MİTOKONDRIYAL DİSFONKSİYON

Mitokondri hücre içindeki görevini bir bütünlük sağlayacak şekilde yerine getirmelidir. Biyolojik işlevlerini yerine getirmediği zaman yakınındaki mitokondriye ve hücreye zarar vermeye başlayarak son derece tehlikeli sonuçlar doğurabilmektedir. Mitokondriyal disfonksiyon Parkinson Hastalığı (76), Alzheimer Hastalığı (77), kas distrofisi (78) ve yaşla ilişkili nörodejenerasyon (79) gibi hastalıklarda rol oynar. Ayrıca mitokondri disfonksiyonu birçok hastalıkta görülen patolojilerde de rol oynar. Bu patolojiler travmatik beyin hasarı (80), omurilik hasarı (81), kardiyak enfarktüs (82) ve inme (83) olarak gösterilebilir.

2.7. AKUT BÖBREK YETMEZLİĞİ

Akut renal yetmezliği böbrek fonksiyonlarının hızlı bir şekilde azalması ve bu azalmanın uzun süre devam etmesi ile karakterize bir sendromdur. Glomerüler filtrasyon hızında azalma ile üre azotu, kreatinin gibi toksinler vücutta birikir ve akut böbrek yetmezliği ortaya çıkar (84). Akut böbrek yetmezliğinin prognozu hastalığın şiddetine ve klinik durumuna bağlı olarak önemli bir şekilde değişebilir. Bununla birlikte kısa ve uzun dönem komplikasyonları özellikle artan mortalite ve morbidite, kronik böbrek yetmezliği gelişmesi ve yüksek bakım maliyeti akut böbrek yetmezliğinin majör bir halk sağlığı sorunu olduğunu göstermektedir (85, 86).

Birçok araştırma göstermiştir ki; mitokondri fonksiyon bozukluğu birçok hastalıkla ilişkili olduğu gibi akut böbrek yetmezliğinin de nedenidir. ATP üretiminde azalma, ROS üretiminde artış, sitokrom c salınımı ve mitokondriyal kristalarda bozulma akut böbrek yetmezliğinde mitokondrinin rolünü destekleyen belirteçlerdir (87).

2.7.1. Epidemiyoloji

Akut böbrek yetmezliği artan nüfus, nefrotoksik ilaçların kullanımı gibi sağlık alanındaki değişmelerle artış göstermektedir (88, 89, 90). Ayrıca yaşlılar ve hastanede yatan hastaların % 7-22 sini etkilemektedir. Büyük, çok uluslu bir meta-analiz yapılarak 2004-2012 yılları arasında 3 milyon hastanede yatan yetişkinleri içeren 154 kohort çalışmasında, akut böbrek yetmezliği insidansı % 22 olarak bulunmuştur (91). Akut

böbrek yetmezliğinin yoğun bakım ünitesinde ve hastanede uzun süreli yatışlarındaki artış finansal olarak maliyetleri artırmaktadır (92).

2.7.2. Patofizyoloji

Akut böbrek yetmezliği patofizyolojisi kompleks bir seyir izler. En yaygın olarak; sistemik vazodilatasyon, hipovolemi, kardiyak fonksiyonların bozulması gibi birçok sebeple meydana gelebilen iskemidir. Fizyolojik olarak kan akımındaki azalmaya vücut belli bir noktaya kadar ayarlama yapabilir ancak oksijen yetersizliği ve metabolik ürünler eksik olduğunda hücrel hasarın sonucu olarak organ disfonksiyonuna neden olabilir. Böbrek; vazokonstriksiyon, endotel hasarı ve inflamasyonla sonuçlanan iskemi ile ilgili hasarlara çok duyarlıdır (93). Böbrek perfüzyonundaki azalmayı takiben, epitelyal hücreler yeterli ATP sağlayamazlar. Bu ATP yetersizliği hücre hasarına ya da nekroz/apoptozis ile hücre ölümüne neden olabilir (94, 95, 96).

2.7.3.Tanı

Akut böbrek yetmezliği tanısı serum kreatininde artış ve idrar miktarında düşüş ile konulmaktadır. 2007 yılındaki Akut böbrek yetmezliği Network sınıflamasına göre RIFLE(Risk, Injury, Failure, Loss, End-stage) kriterleri tanı için önemlidir. Ek olarak, serum kreatin seviyesi 0,3 mg/dl ya da 48 saatte daha fazla artarsa akut böbrek yetmezliği tanısını gerektirir (97, 98).

TABLO-1: Akut Böbrek Yetmezliği Tanı Sınıflaması (KDIGO)

AKI Evrelemesi	Serum Kreatin Kriteri	İdrar Kriteri
Evre I	Serum Kreatin ≥0.3 mg/dl (≥26.4 µmol/L)	İdrar miktarı <0.5 ml/kg/h for 6–12 h
Evre II	Serum Kreatin normal değerin 2-2,9 katı	İdrar miktarı <0.5 ml/kg/h for ≥12 h
Evre III	Serum Kreatin normal değerin 3 katı	İdrar miktarı <0.3 ml/kg/h for ≥24 h

Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group. KDIGO clinical practice guideline for acute kidney injury. *Kidney Int.* 2012;2: 1–138(99).

2.7.4. Tedavi

Akut Böbrek yetmezliğin tedavisi etiyolojik olarak farklılıklar göstermektedir. Tedavide korunma ilk planda olmalıdır. Nefrotoksik ilaç kullanımı/ ilaç takibi ile böbrek fonksiyonlarının bozulması engellenebilir.

Prerenal azotemi renal perfüzyon/volüm replasmanının yerine konması ile hızla gerileme gösterebilir. Sıvı replasmanı için temel tedavi %0.45 NaCl ile olmalıdır.

Renal azotemide, böbrek kan akımını artırmak, tübüler tıkanıklığı açmak, hücre ödemi azaltmak için düşük doz dopamin, tübüler obstrüksiyonu açmak için mannitol, atrial natriüretik peptid ve loop diüretikleri verilir (100, 101, 102).

Serbest radikal oluşumuna engel olmak için SOD, CAT, mannitol, hücre içi Ca++ birikimini önlemek için kalsiyum kanal blokerleri, hücre rejenerasyonu için aminoasit solüsyonları kullanılır (103).

2.8. DOXORUBİCİN NEFROTOKSİSİTESİ

Doxorubicin etkili ve geniş spektrumlu anti-tümör aktiviteye sahip antraksilin glikozid türü bir antibiyotiktir. Over, meme, akciğer, uterus, serviks, Hodgkin's lenfoma, primer kemik sarkomları ve hematolojik kanser türlerine karşı 1969' dan beri kanser tedavisinde kullanılmaktadır (104, 105, 106).

Doxorubicin'in yüksek antitümör etkinliği olmasına rağmen, kardiyak, böbrek, pulmoner, testiküler ve hematolojik toksisitelerinden dolayı kullanımı sınırlı kalmaktadır (107).

Doxorubicin kaynaklı nefrotoksisitenin tam mekanizması bilinmese de toksik etkisinin serbest radikal oluşumu, demir bağımlı biyolojik makromoleküllerin oksidatif hasarı, zar lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu ile meydana geldiği düşünülmektedir (108). Sıçanlarda yapılan çalışmalarda, doxorubicinin böbreklerde artmış glomerüler kılcal damar geçirgenliğine ve tübüler atrofiye neden olduğu gösterilmiştir (109).

Hayvan çalışmalarında, doxorubicin ile oluşturulmuş nefropati modelinde yoğun proteinüri gözlemlenmiş olup proteinüri ciddi böbrek hasarına neden olmuştur. Bu ciddi hasar, böbrekte glomerüler lezyonlar, tübüler dilatasyon, tübül lümeninde protein birikimi ve stromal fibrosizasyon neden olduğu uzun dönemli çalışmalarda gösterilmiştir (110, 111, 112).

Doxorubicin toksisitesinin mekanizması serbest radikal üretimi ile yakından ilişkilidir ve bu antioksidan savunma sistemlerinin bozulmasına yol açmaktadır. Böbrekteki protein oksidasyonu ile ortaya çıkan oksidan-antioksidan sistemdeki hasar doxorubicinle meydana gelen nefrotoksistenin biyokimyasal mekanizmalarından biri olarak gösterilmektedir. (113).

2.9. MİTOKONDRIYAL TRANSPLANTASYON

Mitokondriyal transfer tedavisi genetik hastalıklarda başarılı sonuçları olan terapötik bir yöntemdir. mt DNA hasarı ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğu olan bazı hastalıklarda organel olarak mitokondrinin transplant edilmesine büyük ihtiyaç vardır. Bu konuda yapılan birçok çalışma ile çeşitli hücre kaynaklarından (mezenkimal kök hücre, hücre kültürü, hastanın kendi doku örnekleri) izole edilmiş mitokondrinin hasarlı doku, organ ya da hücrelerde başarılı sonuçları olduğu gösterilmiştir. Kalp ve karaciğer iskemisinde ve Parkinson hastalığında oldukça olumlu sonuçlar elde edilmiştir (114, 115, 116).

Yıllardır süren çalışmalar neticesinde mitokondri transplantasyonunda iki farklı yöntem belirlenmiştir.

- Doğal mitokondriyal transfer: Mikrovezikül transportu ve nanotüp transportu
- Yapay mitokondriyal transfer: Koinkübasyon, mikroenjeksiyon, in situ enjeksiyon, Pep-1 ve mitokondrinin koinkübasyonu, MitoCeption ve intravenöz enjeksiyon

Doğal mitokondriyal transfer için bazı bilim insanları tarafından yeni bir hücresel özelliği tanımlayan in vitro ve in vivo olarak farklı hücre tiplerinde mitokondrinin horizontal transferi bildirilmiştir (117, 118). Horizontal transferde mitokondri ya da mtDNA hücreler arasında doğal olarak taşınabilir ve kök hücre/somatik hücrelerden bu aktif transfer fonksiyon bozukluğu olan hücrelerdeki aerobik solunumu sağlayabilir. Bir hücreden diğerine mitokondri transferi ile ilgili çalışmaların çoğu mezenkimal kök hücre gibi sağlıklı bir hücre kaynağından elde edilmiş mitokondri ile hasar gören hücrelerin tamir edilmesi ile ilgili olmuştur (119). Hücreler arası materyalin (mitokondri) transferi ile ilgili birçok araştırma yapılmıştır. Bunlardan 2004' de Rustom ve arkadaşları, 2006' da Spees ve arkadaşları, 2012' de Islam ve arkadaşları ve 2016' da Jackson tarafından

yapılan in vivo analizlerde Mezenkimal kök hücre mitokondrilerinin transfer için en iyi mitokondriler olduğu gösterilmiştir. (120, 121, 122, 123).

İlk transfer mekanizması, mitokondrinin mikrovezikül ile taşınmasıdır. Bu taşınma özellikle immün hücrelerin fagositik özelliklerini artırır ve hücreyi hasardan kurtarır. Mikroveziküller ile taşınma genellikle mezenkimal kök hücreler tarafından gerçekleştirilen mitokondri iletilisinde görülmektedir (124).

İkinci transfer yolu nanotüp tünel transferidir. Hücresel hasar iyileştirmek için hastalıklı hücrelere mitokondri iletilme yeteneğine sahiptir. Bu tür mitokondri transferi metabolik yeniden programlama, immün güçlendirme ve ayrıca diferensiyasyon ile ilişkilidir (125).

Bir hücreden diğerine mitokondri transferi çok hücreli organizmalarda homeostazisin sürdürülmesi ve gelişmesi için gerekli bir sürecin bir parçasıdır. Mitokondri bir hücreden diğerine nanotüp tüneli ve mikroveziküller gibi hücre içi yapılarla geçebilir (126, 127).

Mitokondri transplantasyonu için araştırmacılar arasında farklı bakış açıları olsa da tüm transplantasyon tekniklerinde Clark ve Shay'ın 1982' de bir hücreden diğerine mitokondri transferinin ilk örneği "mitokondriyal transformasyon" ön ayak olmuştur. (128). Bu çalışmada mitokondrinin ATPaz fonksiyonu ve protein sentezini inhibe etmek için kloramfenikol ve efrapentin antibiyotiklerini kullandılar. Kloramfenikole dirençli hücreler, mitokondriyal büyük alt tipi rRNA geninin bir alanında bulunan mtDNA'larında mutasyonlara sahipti. Kloramfenikol ve efrapentine dirençli fibroblastlardan mitokondri transferi ile bu antibiyotiklere duyarlı alıcı hücrelerin canlılığını koruduğunu ispatlamışlardır. Clark ve Shay'ın mitokondriyal transfer mekanizması ile ilgili gözlemleri ve soruları bu alanda ileride yapılacak çalışmaların önünü açmıştır.

İn vivo ve in vitro uygulamalarda mitokondrinin doğal transferini taklit etmek için çok farklı teknikler ortaya çıkmıştır. Koinkübasyon tekniği, mitokondriyal DNA'da taşınan antibiyotik direncinin duyarlı hücrelere geçirildiği bir yöntemdir (128). Daha sonra bu teknik hasarlı hücreler arasında solunum yetmezliği bulunan hücreleri kurtarmak için kullanılmıştır (129, 130). Ekzojen mitokondri mikroenjeksiyonu mitokondriyal hastalıkları taşıyan oositlerin sağlıklı mitokondri içeriğine ulaşması için uygulanmıştır (131). Fototermal nanoblade endositoz ve hücre füzyonunu kestirme

yoldan gerçekleştiren ve hücre içine izole edilmiş mitokondrinin etkili bir şekilde transfer edilmesine olanak sağlamıştır. Ancak uygulaması az sayıda hücre ile sınırlıdır (132). Alıcı hücrelerde mitokondri girişini kolaylaştırmak için iki farklı yaklaşım geliştirilmiştir. Birincisi Pep-1 ve diğeri mitokondriyal membran reseptör kompleksine bağlanmak (TOM22) üzere tasarlanmış manyetik boncuklardır. (Magnetomitotransfer). MitoCeption tekniği, kültüre edilmiş hücrelere izole edilmiş mitokondrinin transfer edilme işleminde koinkübasyon yöntemine termik şok ve santrifüjleme basamakları eklenerek standardize edilmiş bir transplantasyon yöntemidir. Bu yöntem mitokondrinin hücre içine alımını iyileştirmektedir. İlk olarak kanser hücrelerinde uygulanan bu teknik, hücrelerin metabolik yeniden programlanmasını başlatmıştır (133). İn vivo mitokondri transferinin uygulanması iki şekilde uygulanır. Birincisi, zarar görmüş dokuya mitokondriyi doğrudan enjekte etmek, diğeri ise dolaşım sistemine direk vermektir.

2.10. MEZENKİMAL KÖK HÜCRE

Mezenkimal kök hücreler birçok dokuda bulunurlar. Bunlara mezenkimal stromal hücreler veya multipotent mezenkimal stromal hücreler de denilmektedir. Bu hücreler sağlam dokudan hasar görmüş dokuya geçebilme yeteneğine sahip olup hasarlı olan dokularda doku tamiri işlevini yerine getirirler. Son yıllarda mezenkimal kök hücre çalışmaları ve tedavileri için hücre kültürü ortamında mezenkimal kök hücre çoğaltılması ve bunların uygulanması yaygınlaşmıştır.

Mezenkimal kök hücreler yüzey antijenlerinin (CD71, CD90, CD29 v.b.) ekspresyonu ile tanınırlar ve multipotent farklılaşma potansiyeline sahiptir (134, 135, 136). Bu kök hücreler en çok kemik iliğinde bulunur (137, 138). Kemik iliği dışında kas dokusu, kordon kanı, plasenta, karaciğer, periferik ve amniyon sıvısında da bulunabilmektedirler.

Kemik iliği aspirasyonu içinde 1×10^6 mononükleer hücreye karşı yaklaşık olarak 1-100 arasında değişen sayıda mezenkimal kök hücre bulunmaktadır. (139, 140, 141). Çoğaltılmak için elverişli, dayanıklı bir yapıya sahiptirler ve kültür ortamında proliferasyon ve farklılaşma özelliklerini korurlar. Laboratuvar ortamında çoğaltıldıktan sonra mezenkimal kök hücreler mikroskopta iğ şeklinde ve fibroblasta benzeyen kümelenmeler gösterir. Mezenkimal kök hücreler, hasarlı dokudaki hücreler ile füzyon yapma, biyolojik maddeler ve sitokin-kemokin salgılaması (interlökin 7, 8, 11, 14, 15, v.b.)

ve migrasyon yaparak ihtiyaç olan dokuya ulaşma gibi özelliklere sahiptirler. Bu özelliklerinden dolayı immünmodülatör, antiinflamatuvar ve antiapoptotik etki sağlarlar.

Mezenkimal kök hücrelerin klinik kullanımı bu kök hücrenin transplantasyonunu kapsar ve lokal ya da sistemik infüzyon şeklinde verilebilir. Mezenkimal kök hücre ile kardiyovasküler onarım, akciğer fibrozu tedavisi, omurilik hasarı ve kemik/kıkırdak doku tedavisi yapılabildiği gösterilmiştir. Hematopoetik kök hücre transplantasyonu lösemi ve diğer bazı kanser türlerinde de kullanılmaktadır (142). Lokal olarak verilen kemik iliği hücrelerinin koroner arter hastalığında miyokard hasarını düzeltmede etkili olabileceği iddia edilmiştir (143). Örneğin, fare quadriceps kasına enjekte edilen mezenkimal kök hücrenin kas distrofisinin tedavisine olumlu katkı sağladığı belirlenmiştir (144). Alzheimer hastalığında mezenkimal kök hücre ile in vivo ve in vitro modellerde nöron etkinliğini artırarak hücre otofaji yolağını olumlu etkilediği gözlemlenmiştir (145).

3. MATERYAL – METOD

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmada ağırlıkları 300-350 gram ağırlığında 42 adet Sprague-Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. SBU Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yerel Etik Kurulu' nun 05.09.2017 tarih ve 2017/ 17/ 29 karar no' lu etik kurulu yazısı ile onay alındıktan sonra çalışmaya başlandı. Hayvanlar, SBU Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü Deney Hayvanları Biriminden temin edilerek çalışma süresince 25 °C oda sıcaklığında ve 12 saatlik karanlık aydınlık periyodu altında Doxorubicin uygulamasından sonra metabolik kafeslerde barındırıldı. Ticari yem ve musluk suyu ile kendi başlarına serbestçe beslenmesine olanak sağlanan deneklere çalışma öncesinde herhangi bir sıvı ve diyet kısıtlaması uygulanmadı.

3.2. Deney Grupları

Ratlar " basit rastgele örnekleme" ile toplam 4 gruba ayrıldı gruplar aşağıda listelenmiştir.

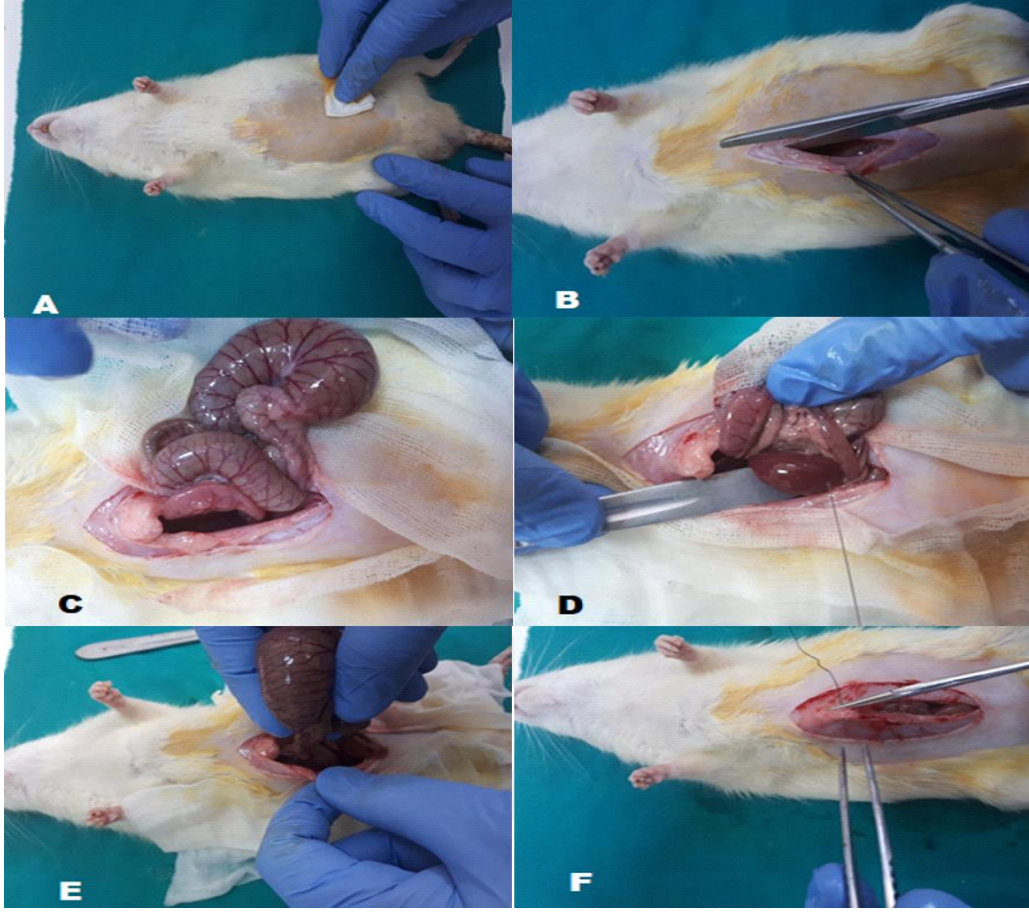
- **Sham Grubu (n=6):** Deney hayvanlarına hiçbir ilaç, anestezi madde ve cerrahi işlem uygulanmayan ve kendi haline bırakılan grup.

- **Doxorubicin Grubu (n=12):** Deney hayvanlarına intraperitoneal ve tek doz olarak 6 mg/kg doxorubicin uygulanan grup. Uygulanma sonrası deney süresince metabolik kafeslerde proteinüri takibi yapıldı.
- **Doxorubicin+Respiration Buffer Grubu (n=12):** Deney hayvanlarına intraperitoneal ve tek doz olarak 6 mg/kg doxorubicin uygulanan ve her iki böbreğe 300 µl respirasyon buffer uygulanan grup. Uygulanma sonrası deney süresince metabolik kafeslerde proteinüri takibi yapıldı (Respiration Buffer: mitokondriyi içinde beklettiğimiz tampon).
- **Doxorubicin+Mitokondri Grubu (n=12):** Deney hayvanlarına intraperitoneal ve tek doz olarak 6 mg/kg doxorubicin uygulanan ve her iki böbreğe toplam 500 µl. izole edilmiş mitokondri uygulanan grup. Uygulanma sonrası deney süresince metabolik kafeslerde proteinüri takibi yapıldı.

3.3. Cerrahi Prosedür

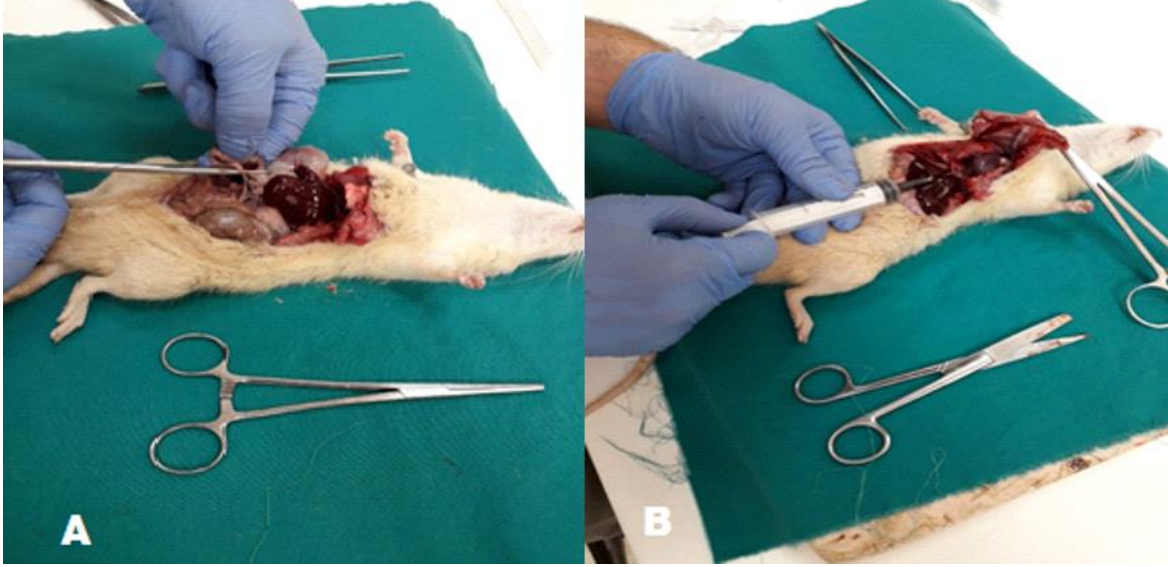
Çalışmanın ilk aşaması böbrek hasarı oluşturmak üzere doxorubicin uygulaması gerçekleştirildi. Bu amaçla önce Sham grubu hariç diğer tüm deney hayvanlarına intraperitoneal ve tek doz olarak 6 mg/kg doxorubicin uygulandı. Uygulamadan sonra beşinci günde mitokondri transplantasyonu ve respirasyon buffer uygulaması için, Sham grubu ve Doxorubicin grubu hariç diğer tüm grupların deney hayvanları intramüsküler (i.m.) ketamin (90 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) kombinasyonu ile anestezi altına alındı. Anestezi derinliği ayak parmakları pens ile sıkıştırılarak ağrı duyuları kontrol edildi. Sırt üstü yatırılarak batın bölgesi traş edildi ve sterilizasyon sağlanması için batikon ile temizlendi. Cilt bistüri yardımı ile orta hat boyunca kesildi ve duvarı yukarı asılarak makasla açıldı (bu aşamada bağırsakların perforasyon olmamasına özen gösterildi). Açılacak bölgenin etrafına steril örtü ve ıslak spanç ile örtüldükten sonra bağırsaklar dışarı çıkarıldı. Ratların sırayla sağ ve sol böbreğine 28 gauge uçlu dental iğne kullanılarak bir gruba mitokondri transplantasyonu diğer gruba Respiration buffer transfer işlemi gerçekleştirildi. Transfer işlemi korteksin yan yüzüne üç ve renal pelvisin tam karşısına iki girişim olarak yapıldı. Doxorubicin+mitokondri grubundaki bu transfer işleminde yaklaşık 8 milyon mitokondri 500 µl. içinde uygulandı. Doxorubicin+Respiration Buffer (respiration buffer: mitokondriyi içinde beklettiğimiz tampon) grubuna 300 µl. Respiration Buffer transferi yapıldı. Transplantasyon işleminden sonra iç organlar batına yerleştirildi. İki batın

duvarı sürekli sütürle kapatıldı, ardından deri sütürle kapatıldı. Batikonla iyice yıkanarak temizlendi ve kafese alınarak yan yatar pozisyonda bırakıldı (Resim-1).



RESİM-1: Deney hayvanları mitokondri transplantasyonu ve cerrahi işlem

Çalışmanın ikinci aşamasında cerrahi işlemler doxorubicin uygulamasından on gün sonra bütün gruptaki ratlara uygulandı. Tüm ratlar intramüsküler (i.m.) ketamin (90 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) kombinasyonu ile anestezi altına alındı. Ağrı duyuları, ayak parmakları pens ile sıkıştırılarak kontrol edildi. Genel anestezi altında histopatolojik ve biyokimyasal (re, kreatinin) analizler için böbrekler ve kan örnekleri alındı. Histopatolojik analizler için alınan doku örnekleri %10'luk formaldehit içinde, biyokimyasal analizler için alınan doku ve kan örnekleri ise endorf tüplerde sıvı nitrojende Şok dondurma yapılarak -80°C derin dondurucuda analizlerin yapılacağı tarihe kadar saklandı (Resim-2).



RESİM-2: Deney Hayvanları Sakrifikasyonu

3.4. Mezenkimal Kök Hücre Kültürü ve Hücre Sayımı

Ticari olarak satın aldığımız hücre hattından Rat mezenkimal kök hücreleri inkübe edilerek çoğaltıldı. (Milipore Rat mesenchymal Stem Cells 1×10^6 -Catalog Number: SCR027) Mezenkimal Kök Hücreler temel hücre kültürü prensipleri kullanılarak T75 kültür flasklarında çalışma için yeter sayı olana kadar çoğaltıldı.

3.5. Mitokondri İzolasyonu

Mitokondri izolasyonu ticari bir kit olan Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells-Thermo Scientific-USA olan mitokondri izolasyon kiti ile yapıldı. İşlem basamakları aşağıda olduğu gibidir:

1. Hücre kültüründen elde edilen hücrelere 800 μ l. Reagent A eklendi ve buz kabında 2 dakika inkübe edildi.
2. Sonra Reagent B eklendi ve buz kabında 5 dakika inkübe edildi ancak her 1 dakikada bir vortekslle karıştırıldı.
3. Daha sonra Reagent C eklendi ve 4° C' de 700xg hızda 10 dakika santrifüj işlemi yapıldı. Supernatantı alıp ve 500 ul Reagent C ile pellet yıkandı.
4. Ardından 4° C'de 12000xg hızda 5 dakika santrifüj işlemi yapıldı, supernatant yeni tüpe alındı. Mitokondri hazırıldı üzerine 1 ml. Respirasyon buffer konuldu.

3.6. Mitokondri Membran Bütünlüğü Analizi

Mitokondri membran potansiyelini göstermek için immüno Floresan yöntemle MitoTracker® Mitochondrion-Selective (Invitrogen, Ltd.UK) problemleri kullanıldı.

3.6.1 Mitotracker Red CMXRos ile hücre boyaması ve flow sitometri

1. DMEM içinde bulunan mezenkimal kök hücre 3000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan sıvı atıldı.
2. Altta kalan hücre peletine 2 ml PBS ilave edildi ve 3000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Aynı işlem iki kez tekrarlandı.
3. Önceden ısıtılmış (37° C) 200 nM MitoTracker® Mitochondrion-Selective (Invitrogen, Ltd.UK) boyama solüsyonu 500 µl hücre süspansiyonu içine aktarıldı ve 30 dakika inkübe edildi.
4. Daha sonra %4 Paraformaldehit ile hücreler 10 dakika fikse edildi.
5. Fikse edilen hücreler Beckman Coulter (Cytomics FC500) cihazında analiz edildi.

3.6.2 Mitotracker Red CMXRos ile mitokondri boyaması ve flow sitometri

1. İzole edilmiş 500 µl mitokondri içine 200 nM önceden ısıtılmış (37° C) MitoTracker® Mitochondrion-Selective (Invitrogen, Ltd.UK) eklendi.
2. Etüvde 37° C' de 30 dakika boyunca inkübe edildi.
3. Boyanmış olan izole mitokondriler Beckman Coulter (Cytomics FC500) cihazında analiz edildi.

3.6.3. Mitotracker Red CMXRos- DAPI boyaması ve immüno Floresan mikroskop analizi

1. DMEM içinde bulunan mezenkimal kök hücre 3000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan sıvı atıldı.
2. Altta kalan hücre peletine 2 ml. PBS ilave edildi ve 3000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Aynı işlem iki kez tekrarlandı.
3. Önceden ısıtılmış (37° C) 100 nM MitoTracker® Mitochondrion-Selective (Invitrogen, Ltd.UK) boyama solüsyonu ile 10 µl hücre süspansiyonu karıştırılarak lam üzerine yayıldı. 30 dakika inkübe edildi.
4. Daha sonra %4 Paraformaldehit ile hücreler 10 dakika fikse edildi.
5. Üzerine 15 µl kullanıma hazır DAPI (Zytovision) boyası eklenerek 5 dakika beklendi.

6. Örnekler Nikon Eclipse 80'i immünofloresan mikroskofta görüntülendi.

3.6.4. Mitotracker Red CMXRos ve konfokal mikroskop analizi

1. DMEM içinde bulunan mezenkimal kök hücre 3000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan sıvı atıldı.
2. Altta kalan hücre peletine 2 ml. PBS ilave edildi ve 3000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Aynı işlem iki kez tekrarlandı.
3. Önceden ısıtılmış (37° C) 100 nM MitoTracker® Mitochondrion-Selective (Invitrogen, Ltd.UK) boyama solüsyonu ile 10 µl hücre süspansiyonu karıştırılarak lam üzerine yayıldı. 30 dakika inkübe edildi.
4. Daha sonra %4 Paraformaldehit ile hücreler 10 dakika fikse edildi.
5. Hücreler Zeiss LSM 510 marka Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop cihazı ile görüntülendi.

3.7. Mitokondri ATP Assay Analizi

İzole edilmiş mitokondrinin metabolik aktivitesini belirlemek için ATP Assay ölçümü yapıldı. Bu ölçüm ATP Assay kiti (ATPlite Luminescence Assay System, 300 Assay Kit-Perkin Elmer-USA) ile yapıldı. İşlem basamakları:

1. Kit içinde toz halde bulunan ATP stok solüsyonu distile su ile hazırlandı.
2. 10 µl. izole edilmiş mitokondri 96 kuyucuklu mikropate içine koyuldu ve tüm kuyucuklara 50 µl. Hücre Lysis Solüsyonu eklendi. 5 dakika 37 ° C 'de ve 125 rpm karıştırıldı. Bu aşama ATP' yi stabilize etmek içindir.
3. Mikropate kuyucuklarına 50 ul Substrate Solüsyonu eklendi. 5 dakika 37° C'de ve 125 rpm karıştırıldı.
4. Ardından Spektrofotometre cihazında ölçüm yapıldı. Verilere göre yüksek çıkan veriler artmış ATP seviyesini ve yüksek metabolik aktiviteyi gösterdi.

3.8. Histolojik Analizler

Histolojik analizler için böbrek dokusu örnekleri doku takip cihazında (Sakura, Tissue TEK) takip işlemine tabi tutuldu. Bu işlemde örnekler formalin, alkol, ksilen ve parafinden sırayla geçirildi. Takip sonrası örnekler doku bloklama cihazında (Sakura, Tissue TEK) parafin bloklar haline getirildi. Parafin bloklar mikrotom cihazında (Microm HM355S) adezivli lamlara 4-5 mikron kalınlığında kesitler alınarak lam boyama

cihazında (Sakura, Tissue TEK) hematoksilen-eosin boyaması yapıldı. Boyanan örnekler ışık mikroskopunda (Olympus BX 51) değerlendirildi. Değerlendirme aşamasında tübüler dilatasyon derecesi, tübüler dilatasyon alanı, tübüler protein birikimi ve tübüler rejenerasyon semikantitatif olarak izlendi. Tübüler dilatasyon derecesi 3 üzerinden (0, 1, 2, 3 olarak) skorlandı. Tübüler dilatasyon alanı ve tübüler protein birikimi skorlaması ise 1: %1-25, 2:%26-50, 3:%51-75 ve 4:%76-100 şeklinde ifade edildi. Tübüler rejenerasyon olup olmadığı var ya da yok olarak gösterildi.

3.9. Biyokimyasal Analizler

Biyokimyasal analizler için alınan kan örneklerinden üre, kreatin ve BUN (Blood Urea Nitrogen) analizleri Beckman Coulter Autoanalyzer AU 680 cihazında fotometrik yöntemle göre yapıldı. İdrar örneklerinin ise Trueline 10 M idrar stripleri kullanılarak manuel olarak proteinüri analizleri yapıldı.

3.10. Oksidatif Stres Analizleri

Alınan böbrek dokusu örneklerinde oksidan-antioksidan dengeneyi ortaya koymak üzere MDA, SOD, GPx analizleri yapıldı.

3.10.1. Dokuların Homojenizasyonu

-80°C`de bekletilen böbrek dokusu örnekleri homejenizasyon işlemi için 40-100 mg arasında hassas terazide (Scaltec SBC21) tartıldı. Daha sonra tartılan dokular numaralandırılmış ependorf tüplerin içine konuldu ve 1/10 oranında uygun tampon (0.84 gr Tris-Base + 2.86 gr Tris-HCl + 6 gr KCl ve 1 ml Tween 20, 500 ml distile suda hazırlandı) ile bilyeli homojenizatörde (Retsch MM400) homojenize edildi. Homojenatlar +4°C`de 10000 rpm`de 10 dakika santrifüj (Hermle-Z323K) edildi. Süpernatantlar MDA, SOD ve GPx analizleri için parçalara ayrılarak -80 °C` de derin dondurucuda saklandı.

3.10.2. Protein Ölçümü

Protein ölçümü BCA (*bicinchoninic acid*) yöntemi ile yapıldı. Ölçüm için *BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)* kullanıldı. Kitin üretici firma tarafından belirlenmiş prosedürü uygulanarak absorbanslar spektrofotometrede (Molecular Devices Filter Max F5) 562 nanometrede (nm) okundu.

3.10.3. Lipid Peroksidasyonu Düzeyinin Ölçümü (MDA)

Oksidatif stresin bir göstergesi olan lipid peroksidasyon düzeyi için MDA ölçümü yapıldı. Bunun için %10`luk triklorasetik asit (TCA) ve %0,37` lik tiobarbitürik asit (TBA) kullanıldı. 10 ml` lik deney tüplerinin içerisine 2,5 ml %10` luk TCA, 0,5 ml %0,37`lik TBA konuldu. Daha sonra üzerine 0,25 ml süpernatant ilâve edilerek 5–7 sn vorteksledi. 90°C`de 15 dakika su banyosunda inkübe edildi ve buz üzerine alınarak soğutuldu. 10000 rpm`de 10 dk santrifüj edilerek sonrasında kalan ornekten 250 µl hacminde eliza 96` lik pleyte yüklendi. Daha sonra 532 nm`de okundu. TBA-MDA kompleksinin ekstinksiyon katsayısından (1,56x10⁵ cm⁻¹M⁻¹) yararlanılarak mmol/g-protein cinsinden MDA değerleri hesaplandı.

3.10.4. Total Süperoksit Dismutaz Aktivitesi (SOD)

SOD aktivitesi için ilk olarak 400 mmol/L sodyum karbonat (Na₂CO₃), 0,3 mmol/L ksantin, 150 µmol/L nitro blue tetrazolium klorür (NBT), 0,6 mmol/L etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) ve 1g/L bovine serum albumin (BSA) karışımı ile reaktif hazırlandı. Bu reaktif hazırlandıktan sonra 2M amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄), 0,8 mmol/L bakır–II-klorür (CuCl₂) ve amonyum sülfat içinde 167 U/L XO solüsyonları hazırlandı. Cam tüplerin içine 25 µl 167 U/L XO, 1425 µl ölçüm reaktifi ve 50 µl süpernatant ilave edildi. Kontrol tüpüne etanol fazı yerine 50 µl distile su ilave edilerek, 25 °C`de 20 dk inkübe edildi. Inkübasyon sonunda her bir numuneye 100 µl 0,08 mM/L CuCl₂ eklenerek reaksiyon durduruldu ve distile suya göre absorbans sıfırlanarak kontrolden itibaren örnekler 560 nm` de okundu. Bulunan değerler aşağıdaki formüle konarak SOD aktivitesi hesaplandı:

$$[(K-N) / N] \times D \times 20 / P = U/g\text{-protein}$$

Bu formülde; K: körün absorbansı; N: numune absorbansı; D: dilüsyon miktarı; P: süpernatant protein miktarını (g/ml) ifade etmektedir.

3.10.5. Glutasyon Peroksidaz ölçümü (GPx)

Bir örnek için bir deney tüpünde 2650 µl GPx tamponu, 150 mM rGSH, 8 mM β-NADPH, 0.35 mM glutasyon redüktaz 1M sodyum asit çözeltileri karıştırılarak üzerine 20 µl numune koyulduktan sonra 30 dk oda ısısında inkübe edildi. Enzim aktivitesi 30 saniyede bir 5 dakika boyunca 340 nm`deki absorbans değişimi ile hesaplandı. U/L cinsinden bulunan enzim aktivitesi, homojenizasyon esnasındaki dilüsyon katsayısı ile

çarpıldıktan sonra doku protein değerine bölünerek sonuçlar U/gr birimi olarak ifade edildi.

3.11. İstatistiksel Analiz

Tüm gruplar arasında “Kruskal Wallis” testi ile analiz yapıldıktan sonra, anlamlı sonuca uygun olan gruplar arasında ikişerli karşılaştırmalar yapılarak non-parametrik yöntem “Mann Whitney U Test” kullanıldı. Sonuçlar Median±Ortalamanın Standart Hatası (Median±SEM)” veya “Median(Min-Max)” olarak ifade edildi. Sonuçta $p < 0.05$ bulunduğu sonuç anlamlı olarak kabul edildi.

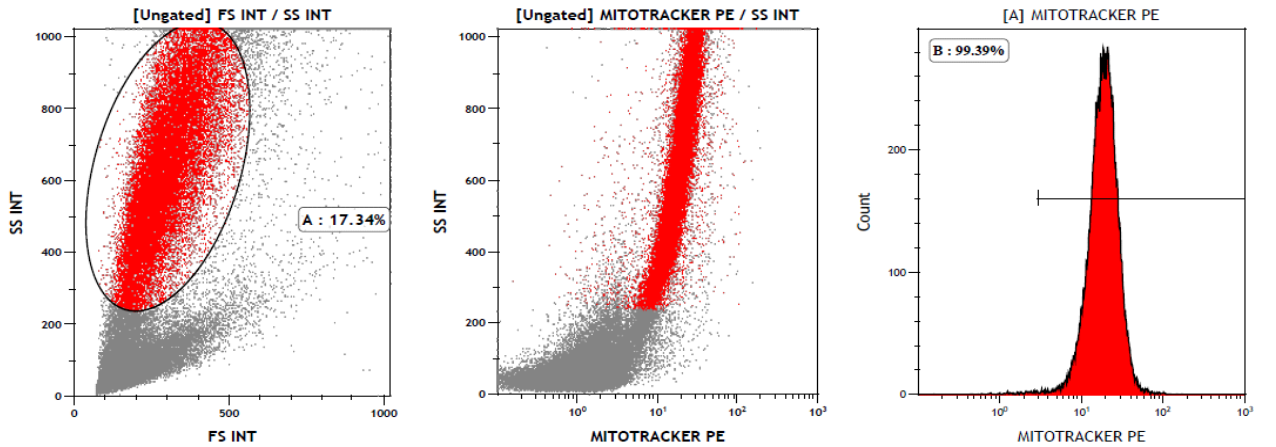
4. BULGULAR

4.1. Mitokondri Membran Bütünlüğü Analizleri

Mitokondriyal membran bütünlüğü ve canlılığının tespitinde iki aşamalı analiz uygulandı. Bu analizler flow sitometri, immünofloresan mikroskop ve konfokal mikroskop cihazları ile yapıldı.

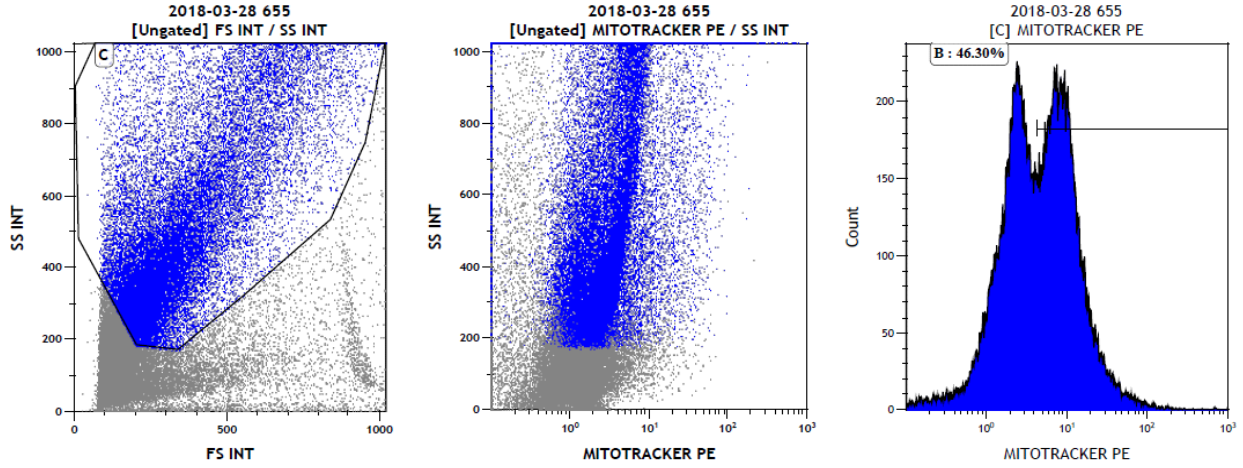
4.1.1. Mitotracker Red CMXRos Flow Sitometri Analizi Sonuçları

Mezenkimal kök hücrelerde mitokondri membran bütünlüğü için 5×10^4 hücre sayılması sonucunda %99,39’ luk kısmının membran bütünlüğünün korunduğı gözlemlendi.



RESİM-3: Flow Sitometri Analizi Mitotracker Boyanmış Hücre

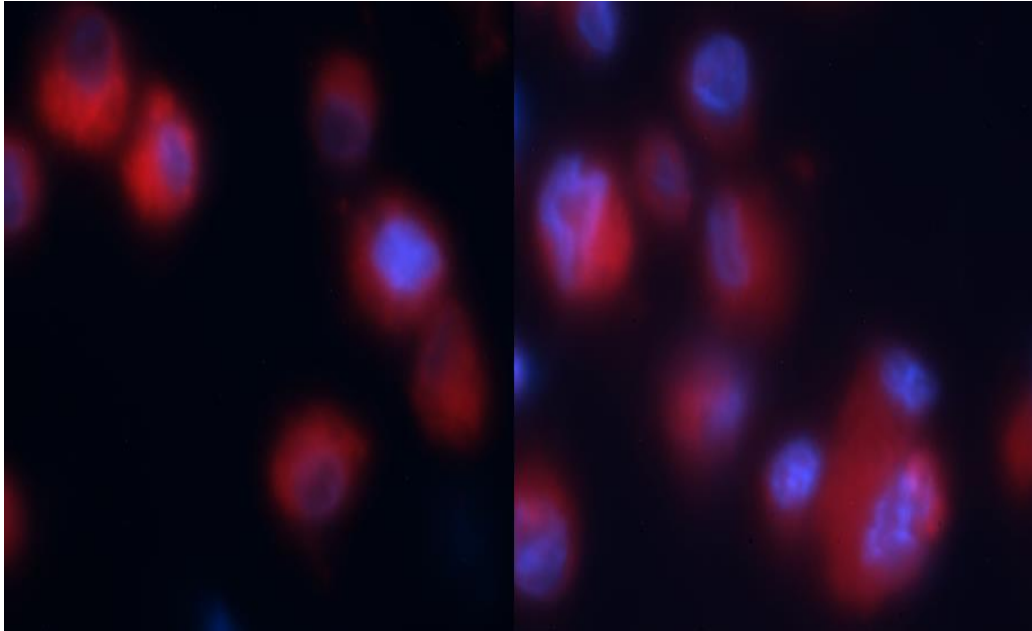
Mezenkimal kök hücreden mitokondri transplantasyonu için izole edilen mitokondrilerin %46,30’luk kısmında mitokondrilerin membran bütünlüğünün korunduğı gözlemlendi.



RESİM-4 Flow Sitometri Analizi Mitokondri izolasyonu sonrası boyanmış mitokondri

4.1.2. Mitotracker Red CMXRos – DAPI İmmüno Floresan Mikroskop Analizi Sonuçları

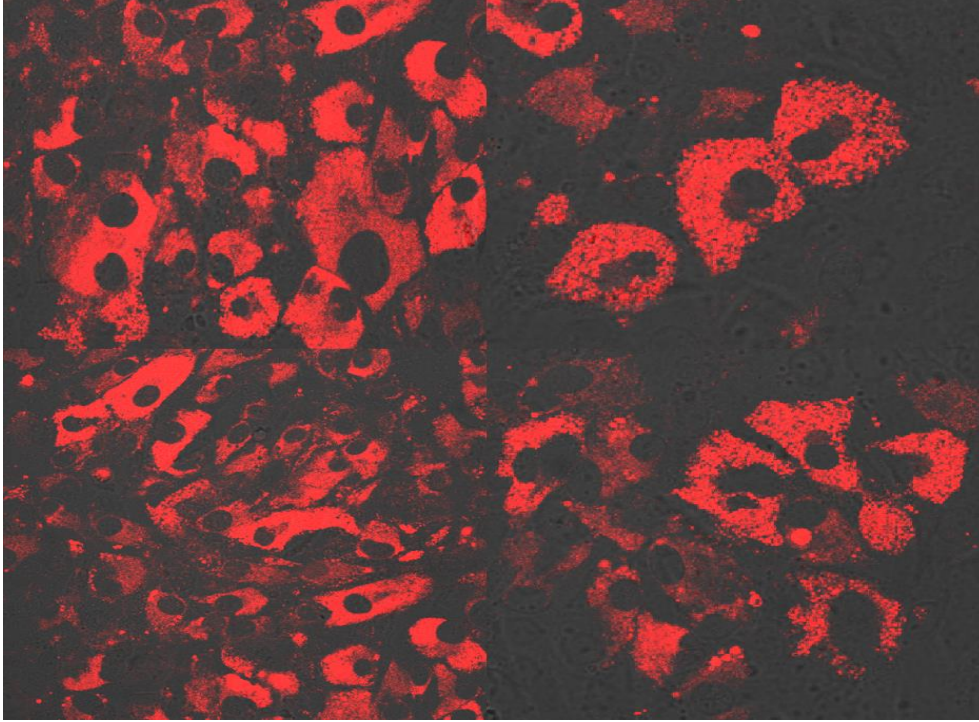
Mitokondri izolasyonu yapılacak mezenkimal kök hücrelerin Mitotracker Red CMXRos ve DAPI boyanması ile izlenen hücrelerde hem hücre çekirdeği hem mitokondrilerin tümünün canlılığını ve membran bütünlüğünü koruduğu gözlemlendi. Herhangi bir istatistiksel işlem yapılmadı.



RESİM-5 İmmüno Floresan Mikroskop Analizi (x100 Mitotracker+DAPI)

4.1.3. Mitotracker Red CMXRos Konfokal Mikroskop Analizi Sonuçları

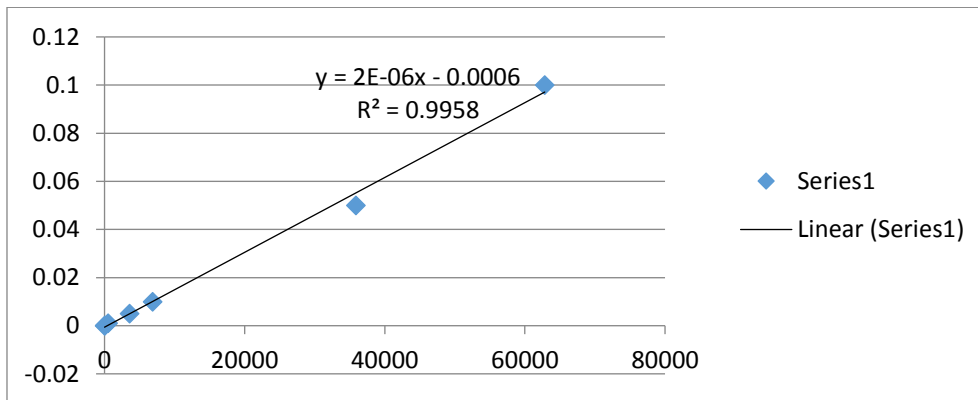
Mitokondri izolasyonu yapılacak mezenkimal kök hücrelerin Mitotracker Red CMXRos boyanması ile izlenen hücrelerde mitokondrilerin tümünün canlılığını ve membran bütünlüğünü koruduğu gözlemlendi. Herhangi bir istatistiksel işlem yapılmadı.



RESİM-6 Konfokal Mikroskop Analizi (x 40, Mitotracker)

4.2. Mitokondri ATP Assay Analizi

İzole edilmiş mitokondrilerin ATP içerikleri ATP ölçüm kiti standart eğrisine göre değerlendirildiğinde yüksek metabolik aktivite içerdiği görüldü. Herhangi bir istatistiksel işlem yapılmadı.



RESİM-7 Mitokondri ATP Assay Analizi

4.3. Histolojik Analizler

Sham grubunda kortikal tübülleri, medüller yerleşimli distal ve toplayıcı kanal tübül epitel hücreleri ve Jukstamedüller yerleşimli tübül epitel hücreleri (Henle kulpunun inen ve çıkan kollarında) normal olarak kabul edildi.

Doxorubicin (1.grup) grubunda kortikal tübülleri, medüller yerleşimli distal ve toplayıcı kanal tübül epitel hücreleri ve Jukstamedüller yerleşimli tübül epitel hücrelerinde (Henle kulpunun inen ve çıkan kollarında) dilatasyon varlığı normal kabul edildi ancak bu hücrelerde tübüler protein birikimi varlığı sham grubuna göre anlamlı olarak arttı (Resim-9), (Resim-10).

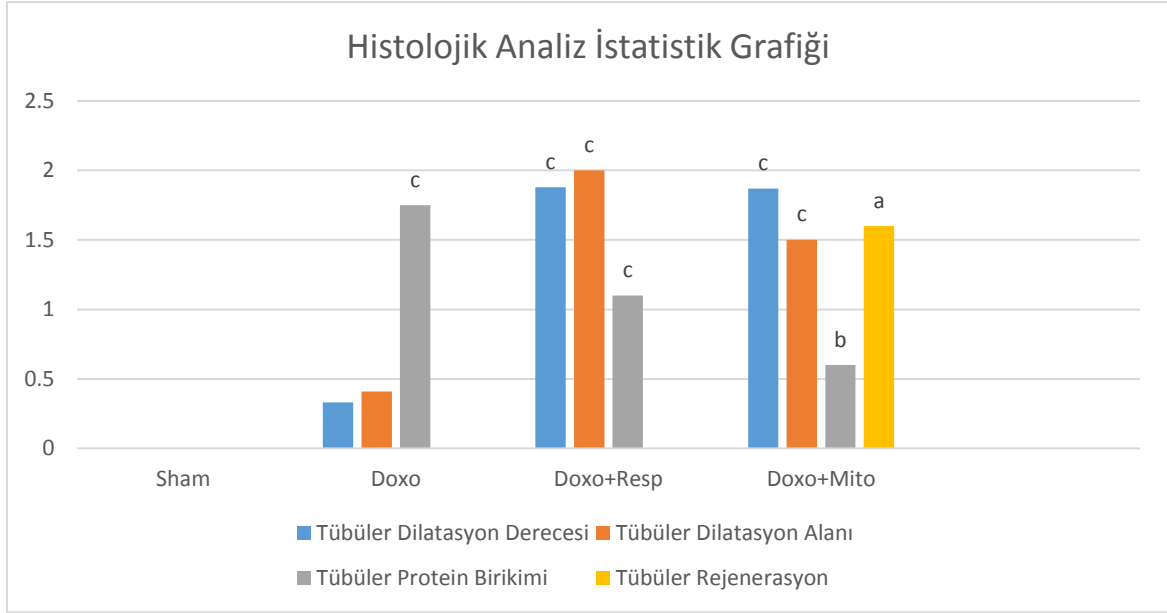
Doxorubicin+Respirasyon Buffer (2.grup) grubunda kortikal tübülleri, medüller yerleşimli distal ve toplayıcı kanal tübül epitel hücreleri ve Jukstamedüller yerleşimli tübül epitel hücrelerinde (Henle kulpunun inen ve çıkan kollarında) dilatasyon varlığı ve bu hücrelerde tübüler protein birikimi varlığı sham grubuna göre anlamlı olarak arttı (Resim-9), (Resim-10).

Doxorubicin+Mitokondri (3.grup) grubunda kortikal tübülleri, medüller yerleşimli distal ve toplayıcı kanal tübül epitel hücreleri ve Jukstamedüller yerleşimli tübül epitel hücrelerinde (Henle kulpunun inen ve çıkan kollarında) dilatasyon varlığı, bu hücrelerde mitokondri transplantasyonundan sonra tübüler protein birikiminin varlığı diğer gruplara göre anlamlı şekilde azalırken rejenerasyon anlamlı olarak artmıştı. (Resim-11).

	<i>Sham Grubu</i> (n=6)	<i>Doxorubicin Grubu</i> (n=12)	<i>Doxorubicin+Respiration Buffer Grubu</i> (n=9)	<i>Doxorubicin+Mitokondri Grubu</i> (n=8)
<i>Tübüler Dilatasyon Derecesi</i>	0(0-0)	0(0-2)	2(0-3) ^c	2(1-3) ^c
<i>Tübüler Dilatasyon Alanı</i>	0(0-0)	0(0-2)	2(0-3) ^c	1(1-2) ^c
<i>Tübüler Protein Birikimi</i>	0(0-1)	2(0-3) ^c	1(0-3) ^c	1(0-2) ^b
<i>Tübüler Rejenerasyon</i>	6(-)	12(-)	1(+)	5(+) ^a

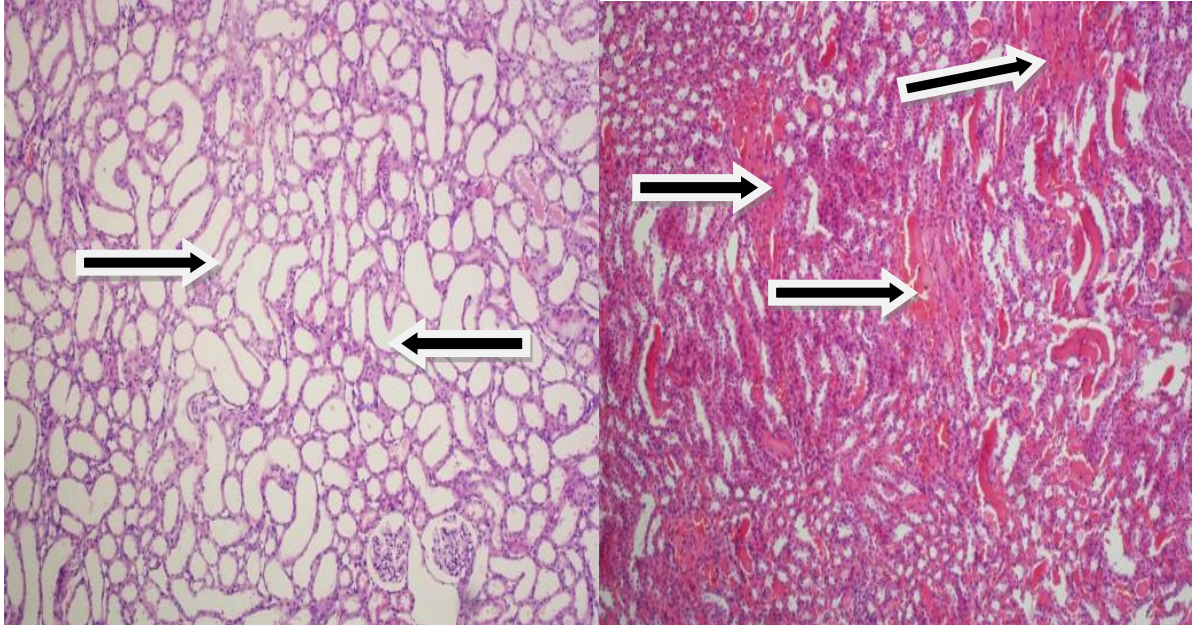
TABLO-2 Histolojik Analizler

- a: $p < 0.05$ tüm gruplara göre Doxo+mito grubunda anlamlı artış.
b: $p < 0.05$ tüm gruplara göre Doxo+mito grubunda anlamlı azalış.
c: $p < 0.05$ sham grubuna göre Doxo, Doxo+resp ve Doxo+mito gruplarında anlamlı artış.
(+): tübüler rejenerasyon var
(-) : tübüler rejenerasyon yok



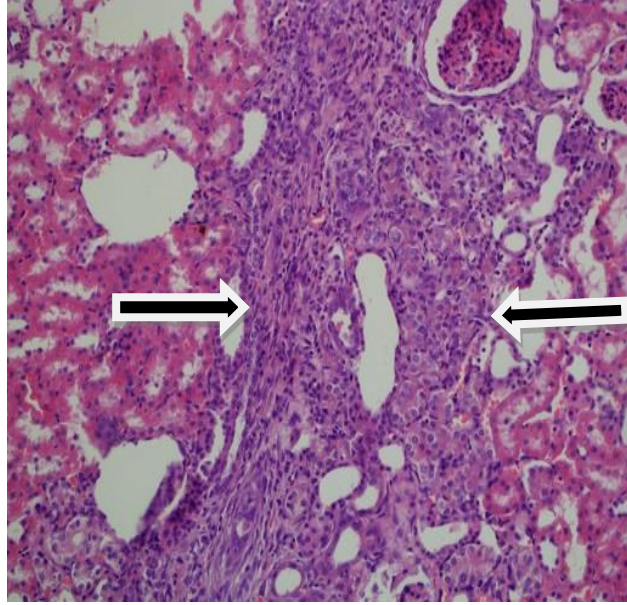
RESİM-8 Histolojik Analiz Grafiği

- a: $p < 0.05$ tüm gruplara göre Doxo+mito grubunda anlamlı artış.
b: $p < 0.05$ tüm gruplara göre Doxo+mito grubunda anlamlı azalış.
c: $p < 0.05$ sham grubuna göre Doxo, Doxo+resp ve Doxo+mito grubunda anlamlı artış.
(+): tübüler rejenerasyon var
(-) : tübüler rejenerasyon yok



RESİM-9 Tübüler Dilatasyon
(X 100 H&E Boyama)

RESİM-10 Tübüler Protein Birikimi
(X 100 H&E Boyama)



RESİM-11 Tübüler Rejenerasyon
(X 200 H&E Boyama)

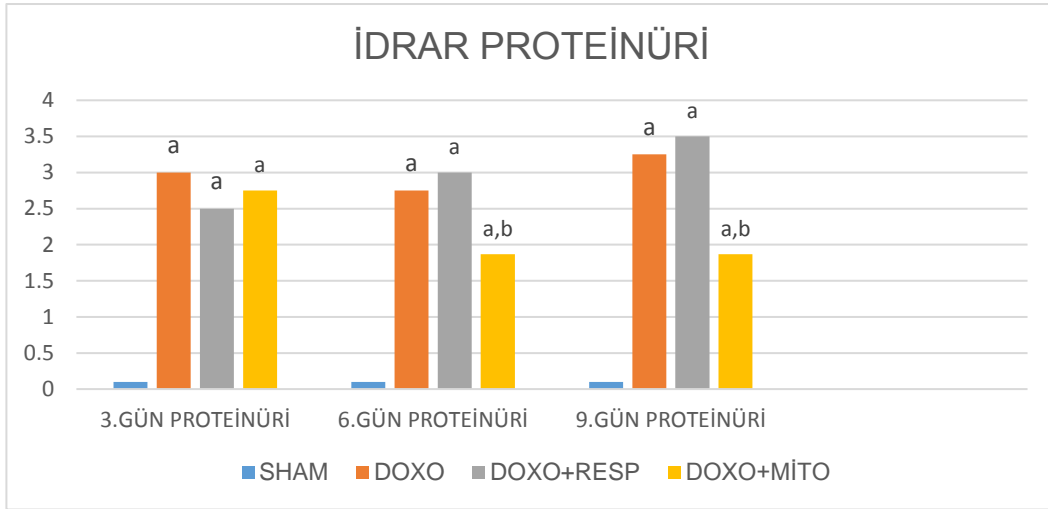
4.4. Biyokimyasal Analizler

Üre, Kreatin ve BUN ölçümünden elde edilen sonuçlarda Sham grubu, Doxorubicin Grubu, Doxorubicin+Respiration Grubu ve Doxorubicin+Mitokondri grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı (Tablo-3).

Gruplar	ÜRE	KREATİN	BUN
Sham	53,16+/-9,86	0,51+/-0,051	25+/-4,60
Doxorubicin+Mitokondri	36,7+/-6,36	0,41+/-0,086	17,25+/-3,10
Doxorubicin+Respiration Buffer	110,88+/-206,91	1,42+/-3,07	51,77+/-96,57
Doxorubicin	31,58+/-4,67	0,39+/-0,046	14,7+/-2,22

TABLO-3 Biyokimyasal Analizler (Üre, Kreatin, BUN)

Doxorubicin grubu, Doxorubicin+Respiration grubu ve Doxorubicin+Mitokondri gruplarında doxorubicin enjeksiyonundan sonra ilk beş günde tüm ratlar 3+ proteinüri değerine ulaştı. Doxorubicin+Mitokondri grubunda beşinci günde mitokondri transplantasyonundan sonra anlamlı azalma bulundu (Tablo-4). Sham grubunda proteinüri değerlerinde ilerleyen günlerde anlamlı bir değişiklik olmadı.



RESİM-12 İdrar Proteinüri Düzeyleri

a: sham grubuna göre anlamlı artış

b: doxo ve doxo+resp gruplarına anlamlı azalış

Gruplar	3.GÜN PROTEİNÜRİ	6.GÜN PROTEİNÜRİ	9.GÜN PROTEİNÜRİ
Sham	0+/-0	0+/-0	0+/-0
Doxorubicin	3+/-0,92 ^a	2,75+/-0,88 ^a	3,25+/-0,46 ^a
Doxorubicin+Respiration Buffer	2,5+/-0,92 ^a	3+/-0,53 ^a	3,50+/-0,53 ^a
Doxorubicin+Mitokondri	2,75+/-1,03 ^a	1,87+/-0,64 ^{a,b}	1,87+/-0,35 ^{a,b}

TABLO-4 Biyokimyasal Analizler (Proteinüri)

a: sham grubuna göre anlamlı artış.

b: doxo ve doxo+resp gruplarına anlamlı azalış.

4.5. Oksidatif Stres Analizleri

Gruplar	MDA (mmol/gpro)	SOD (U/gpro)	GPx(U/gpro)
Sham	1,93+/-1,04	442,61+/-142,72	15,42+/-3,18
Doxorubicin	1,38+/-0,52	474,61+/-75,96	15,47+/-2,89
Doxorubicin+Respiration Buffer	1,50+/-0,71	543,31+/-148,25	16,48+/-7,11
Doxorubicin+Mitokondri	1,50+/-0,95	626,99+/-84,59 ^a	20,25+/-1,48 ^a

TABLO-5 Oksidatif Stres Analizleri

a: Sham ve Doxo grubuna göre anlamlı artış

4.5.1. Lipid Peroksidasyonu (MDA)

Sham, Doxorubicin, Doxorubicin+Respiration ve Doxorubicin+Mitokondri gruplarının MDA düzeyleri arasında anlamlı farklılık yoktu (Tablo 5).

4.5.2. Total Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD enzim seviyesi Doxorubicin+Mitokondri grubunda Sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artış bulundu. Ayrıca Doxorubicin Grubuna göre Doxorubicin+Mitokondri grubunda SOD düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı bulundu (Tablo 5).

4.5.2. Glutasyon Peroksidaz (GPx)

GPx enzim seviyesi Sham grubuna göre Doxorubicin+Mitokondri grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede arttı. Ayrıca Doxorubicin Grubuna göre Doxorubicin+Mitokondri grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede artış bulundu. Diğer Çalışma grupları arasında anlamlı bir farklılık yoktu (Tablo 5).

5. TARTIŞMA

Doxorubicin nonspesifik etki eden anti-tümör bir ilaçtır. Doxorubicinin etki mekanizması DNA ile direk etkileşime girerek DNA kopyalamasını engellemesidir. Bunu açılan DNA zincirini stabilize ederek ve DNA çift sarmalının tekrar kapanmasını önleyerek gerçekleştirir. Genellikle uterus, meme, tiroid, akciğer tümörü, akut lösemi, Hodgkin lenfoma gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Birçok kullanım alanı olmasına rağmen kardiyotoksik, nefrotoksik ve hepatotoksik yan etkisi bu kullanımı kısıtlayan en temel nedendir (146, 147, 148)

Doxorubicin, renal proksimal tübüler hücrelerde kaspaz-3'ün aktivasyonu yoluyla mitokondriye bağlı apoptozise neden olur. Ueno ve arkadaşları tarafından mitokondri, doxorubicin ve apoptosis arasındaki ilişkiyi incelemek için HK-2 hücrelerinde ayrıntılı çalışmalar yapılmışlardır. Bu çalışmada, doxorubicinin kardiyomiyositlerde kaspaz aktivasyonu yoluyla apoptoza neden olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada hem rat kalbi ve rat primer kültüre edilmiş kardiyomiyositleri kullanmışlardır. Mitokondriye bağlı apoptoz, mitokondriden salınımından sonra Apto-1, Cyto-c ve Cleaved kaspaz-9'dan oluşan bir apoptozom olan çok proteinli bir kompleks oluşumu ile karakterizedir. Buna uygun olarak bu çalışmada doxorubicin tedavisi, kaspaz-9, Apaf-1 ve Bax / Bcl-2'nin oranı ve kaspaz-3 gibi parçalanmış apoptotik molekül ekspresyonlarını arttırmıştır. Kardiyomiyositlerde 24 saatlik doxorubicin tedavisi ile kaspaz-3 aktivasyonunun önemli oranda arttığını bulmuşlardır (149).

İlaç kullanımına bağlı nefrotoksisite ABY' nin en önemli nedenlerinden biridir. Doxorubicin' in nefrotoksisite mekanizması tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Toksik etkilerinin patogeneğinde oksidatif stres olduğu düşünülmektedir. Oksidatif stres reaktif oksijen türlerinin üretilmesiyle metabolizmada oluşan zararlı etkiler lipid peroksidasyonu ile sonuçlanarak MDA seviyelerinde artışa neden olur. Buna karşın vücudun antioksidan sistemlerinin en etkili olanlarının başında gelen SOD ve GPx devreye girer ve bu oksidatif hasarı gidermeye çalışır (150).

Doxorubicin kullanımı yukarıda da bahsedildiği gibi lipidlerle hızla reaksiyona girerek lipid peroksidasyona neden olma potansiyeline sahip süperoksit ve hidroksil gibi serbest radikallerin üretimine yol açmaktadır. Bu durum doxorubicinin toksik etkilere yol açmasının ana nedeni olarak kabul edilmektedir (151). Doxorubicin

uygulanması yapılmış ratların böbrek ve karaciğer dokusunda MDA seviyesinde yükseliş olduğu rapor eden çalışmalar vardır (152). Yapılan bir başka çalışmada ratlarda doxorubicin ile oluşturulan nefrotoksisite modelinde osteoartrit tedavisinde kullanılan diacerinin etkinliği değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre doxorubicin uygulanan grupta MDA ve NOx seviyelerinde anlamlı artış olduğu ve tedavi grubunda ise ilgili parametrelerin azaltıldığı gösterilmiştir (153). Oluşturduğumuz nefrotoksisite modelinde MDA seviyesinde bir artış bulamadık. Bu durumun bizim çalışmamızdan farklı olarak daha önce yapılan çalışmalarda doxorubicin enjeksiyonundan sonra en az on beş günlük bir bekleme periyodunun mevcudiyetinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

SOD, ROS kaynaklı oksidatif hasara karşı önemli koruyucu bir role sahip bir enzim olup tüm hücrelerde yaygın olarak bulunmaktadır. Rashid ve arkadaşları tarafından yapılmış bir çalışmaya göre doxorubicinin 40 mg/kg ve 80 mg/kg i.p. dozları uygulanan ratlarda on altıncı günde nefrotoksisite ve hepatotoksisite oluşmuştur. SOD ve CAT aktiviteleri doxorubicin uygulanan ratlarda kontrol grubuna göre hem böbrek hem de karaciğerde azaldığı bulunmuştur. Böbrek ve karaciğerde histolojik olarak önemli yapısal hasar meydana gelmiştir (154). Başka bir çalışmaya göre 10mg/kg i.v. dozu ile verilen doxorubicin ile SOD seviyesinde önemli bir azalma meydana gelmiştir (155). Bir çalışmada, SOD azalmasının hücre membran bütünlüğü ve fonksiyonunun kaybına neden olduğu gösterilmiş ve bu azalmanın hücre içi H₂O₂ seviyesinin artmasına bağlı olduğunu değerlendirmişler (156).

GPx, hücreyi H₂O₂' den temizleyerek oksidatif hasara karşı korur ve bu işlem için redükte formda GSH kullanır. H₂O₂' den OH oluşmasına karşı engelleyici bir görev üstlenmiş olur. Oksidatif streste GSH seviyesinde azalma olduğu bildirilmiştir (157). Bir çalışmada Sprague Dawley cinsi ratlarda oluşturulan nefrotoksisitede Fullerenol tedavisinin etkinliği araştırılmış ve bu çalışmada böbrek dokusunda GPx'in düşük olduğu bulunmuştur (158). Başka bir çalışmada ise histopatolojik olarak doxorubicinin, renal tübül hücrelerinde apoptozu indüklediği ve apoptoz ile atrofiye neden olduğu gözlemlenmiştir (159). Histolojik olarak tübül protein birikimi böbrek fonksiyonlarında oksidatif stres oluşumunda GPx düzeyini azaltmıştır.

Doxorubicin uyguladığımız nefrotoksisite gruplarında literatür bilgisinin aksine MDA seviyelerinde anlamlı bir artış elde edilememiştir. Bunun nedeni hastalık

gruplarının doxorubicine maruziyet süresinin kısa olması olabilir. Mitokondri transplantasyonu yapılan grubun SOD ve GPx değerleri artarken diğer gruplarda bir artış olmamıştır. MDA artışının olmamasının antioksidan enzimlerin artışın bağlı olduğu görüşü literatür bilgileri ile uyumludur. Bu durumda mitokondri transplantasyonu yapılan grubun SOD ve GPx değerlerinin artışının oksidatif stresle ilgili bir yolak üzerinden olmayabileceğini düşündürmektedir.

Bizim çalışmamızda oksidatif stres ve böbrek hasarını göstermek için MDA, SOD, GPx antioksidan enzimlerinin miktarlarının yanında böbrek fonksiyonlarını göstermek için plazma üre, kreatin ve idrar protein seviyeleri ölçülmüştür.

Doxorubicin tedavisine bağlı yan etkilerin klinik göstergeleri ise plazma üre, kreatinin seviyelerinde artış ve idrarda protein görülmesidir (160). Doxorubicin nefrotoksik etkisi serum üre ve kreatinin artışına yol açan glomerüler filtrasyon oranının azalması ile karakterizedir. Bu çalışmada histopatolojik incelemede yaygın glomerüler skleroz rapor edilmiştir. (161). Bu literatür bilgisi ile uyumlu olarak bizim çalışmamızda da histopatolojik olarak doxorubisinin zararları gözlenmiştir. Çalışmamızda tübüler dilatasyon ve tübüler protein birikimi doxorubicin uygulanan gruplarda böbrekteki yapısal hasarı göstermektedir.

Bahsi geçen kan ve idrar analizlerinden elde edilen ölçümler nefrotoksisitenin en önemli belirteçleridir ve böbrek hasarı tanısında rol oynar. Doxorubicin uygulanan ratlarda serum kreatinindeki artış, kreatinin atılımındaki azalma ve idrarda protein miktarının artması ile görülen renal fonksiyonun etkilenme durumu, akut böbrek hastalığı ve nefrotik sendromla uyumlu bulunmuştur. Bir çalışmada El-Shinaty ve arkadaşları ratlarda doxorubicin ile kardiyotoksisite ve nefrotoksisite oluşturmuş ve bu toksisitelere Silymarinin etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada 10 mg/kg doxorubicin dozu uygulayarak otuz gün sonunda üre ve kreatin seviyesinde anlamlı bir artışla böbrek fonksiyonlarının bozulduğunu tespit etmişlerdir (162). Miyokard hasarı ve böbrekte tübüler hasar meydana gelmiştir. Başka bir çalışmada da Doxorubicin böbrekte toksik etkisiyle glomerüler hücreler, membran ve podositleri içine alan glomerüler filtrasyon bariyerinde anlamlı değişikliklere neden olmuştur (163). Bizim çalışmamızda histopatolojik incelemelerde glomerüler bir patoloji saptanmasada tübüler dilatasyon ve tübüler proteini doxorubicinin ana hasarı olarak tespit edilmiştir.

Böbrek fonksiyonlarının test edildiği plazma üre, kreatin ve idrarda protein ölçümleri ile yaptığımız değerlendirme sonuçlarına göre; üre, kreatin analizleri açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık olmadığı, ancak proteinürinin anlamlı derecede arttığı görülmüştür. Üre, kreatin seviyesinde artış olmamasının doxorubicine maruziyet zamanı ile korelasyon içinde olduğu değerlendirilmektedir. Yukarıda bahsedilen literatür bilgisinde bahsedildiği bu çalışmalar en az 1 ay ve fazla sürelerde yapılmıştır (160, 162). Buna rağmen çalışmamız gruplarında idrarda proteinüri miktarının artması doxorubicinin nefrotoksisite etkisinin gerçekleştiğini fakat süreye bağlı olarak üre ve kreatin artışını gerektirecek böbrek yetmezliğinin henüz oluşmadığı şeklinde değerlendirilmiştir. Ayrıca çalışmamızda doxorubicin uygulanan üç grupta da kortikal tübüller, medüller yerlesimli distal ve toplayıcı kanal tübül epitel hücreleri ve Jukstamedüller yerlesimli tübül epitel hücrelerinde dilatasyon varlığı ve bu hücrelerde tübüller protein birikimi varlığı gösterilmiştir. Bu nedenle histolojik bulgularımız ve idrarda protein analizlerimiz birbiri ile örtüşmektedir.

Mitokondri hücrenin temel enerji kaynağıdır ve kardiyak hasar, travmatik beyin hasari, spinal kord yaralanması, yaşlanmaya bağlı norodejenerasyon ve Alzheimer gibi önemli bir çok hastalıkta rolünün olduğu bilinmektedir (164, 165, 166, 167, 168). Bunlardan başka birçok hastalığın sebebi olarak mitokondriyal disfonksiyon veya mitokondri genetik bozukluğu gösterilmektedir. Son yıllarda işlevsiz mitokondrilerin yerine sağlıklı olanların nakledilmesi düşüncesi üzerine kurulu bir tedavi yöntemi yaygın ve güvenilir şekilde kullanılmaktadır. Daha önceki çalışmalarda başarılı olarak kullanılan mitokondri transplantasyonunu bizde nefrotik sendrom modelinde başarılı bir şekilde kullandık.

Ancak mitokondri nakil yöntemleri ile ilgili bazı görüş ayrılıkları bulunmaktadır. Bunlardan biri dokuya direkt enjeksiyon veya kan yolu ile uygulama diğeri verilen mitokondrilerin hedef hücre içine girmesi ile ilgilidir. Çalışmamızda mitokondrinin nasıl hücre içine girdiği ile ilgili bir analiz yapılmamıştır. Ancak daha önce tarif edildiği gibi doxorubicinle oluşturduğumuz nefrotik sendrom gelişmiş Doxorubicin+Mito grubundaki ratların her iki böbreğine mikroenjeksiyon yöntemi ile mitokondri transplantasyonunu gerçekleştirilmiştir.

Mitokondri nakli ile ilgili üzerinde daha fazla bilgiye ihtiyaç duyulan konulardan biri ise hangi hücrelerin bu işlem için uygun olduğudur. Yaygın görüşe göre kültüre

edilmiş hücreleri mitokondri kaynağı olarak kullanmak için en uygun hücre hattının mezenkimal kök hücre olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (169). Bizim çalışmamızda da mitokondri transplantasyonu için mezenkimal kök hücreleri donör olarak kullanılmıştır. Yapılan çeşitli çalışmalarda ise farklı hücre hatları da kullanılmıştır. 2007' de yapılan bir çalışmaya göre, genç farelerin karaciğerlerinden transfer edilen mitokondriyi alan zigotlar mitokondri transferi yapılmayan yetişkin zigotlara kıyasla blastosit aşamasıyla daha iyi gelişme göstermiştir (170). 2010' da ise Takeda ve arkadaşları %10 ve %0,5 serumda kültüre edilmiş bovine fibroblastlardan elde ettiği mitokondriyi kullanmıştır(171). Ayrıca son zamanlarda, mikroenjeksiyon ile mitokondrinin transferi sağlıklı bir donörün ovülünden alınarak mitokondriyal mutasyon içeren bir taşıyıcıdaki zigota eklenmesi yöntemi kullanılmıştır (172). Çalışmamızda mitokondri kaynağı olarak literatürde en olumlu görüş ve sonuçların olduğu mezenkimal kök hücreler kullanılmıştır. Kültüre edilerek çoğaltılan mezenkimal kök hücrelerden elde edilen mitokondriyi ratların her iki böbreğine mikroenjeksiyon yöntemiyle transfer edildi.

Mitokondri nakli uygulaması 1982 yılında ilk defa Clark ve Shay tarafından gerçekleştirilmiştir. Onlar mitokondri protein sentezi ve ATPaz fonksiyonunu inhibe eden cloramfenikol ve efrapentin antibiyotiklerini kullandılar. Kloramfenikol ve efrapentine dirençli fibroblastlardan izole edilmiş mitokondri transferi alıcı hücrelerin sağ kalimini önemli oranda artırmıştır. Bu öncü çalışma ile birçok farklı hücre tipine uygulanabilen bir teknik ortaya çıkmış ve bu prosedür alıcı hücreler içine transfer edilen eksojen mitokondrilerin tedavi edici etkisini göstermek için bir fırsat sağlamıştır (128). Bu prosedürün başarısına rağmen, 2005' de yapılan insan akciğer karsinomu alıcı hücreleri (A549) ile hMSCs hücrelerinden izole edilmiş mitokondri koinkübasyonu istenen sonucu vermemiştir (173). Ancak başka bir grup King ve Attardi' nin yöntemi ile insan akciğer karsinomu alıcı hücreleri (A549) ile insan mezenkimal kök hücrelerinden izole edilmiş mitokondri arasındaki transferi gerçekleştirmiştir (131). Daha sonra eksojenik modelde, insan kanser hücreleri (MDA-MB-231 ve MCF-7) içine rat karaciğerinden izole edilmiş mitokondri başarıyla transplant edilmiştir. Katrangi ve arkadaşları bu tekniği dört modelde kanser hücrelerinin her bir tipini kullanarak test etmiştir (174). Bu çalışmaların başarısı mitokondri izolasyonu metoduna katkı yapmıştır.

Liu ve arkadaşları, izole edilmiş mitokondrinin hücre içine alınma fonksiyonunu artırmak için Pep-1 tipi bir peptitle konjugasyon yöntemini geliştirmiş. Pep-1 ve izole mitokondri karışımı, mitokondriyal hastalık miyoklonik epilepsisi ragged red fiber (MERRF) sendromu modelinde Pep-1'in mitokondrinin transplantasyonunu hızlandırdığı gösterilmiştir. Aynı şekilde yine 2016 yılında Liu ve ekibi Parkinson Hastalığı in vivo modelinde Pep-1 ile konjuge edilmiş allojenik ve eksojenik mitokondriyi kullanmış. Kontrol grubu ile kıyaslandığında deney grubundaki hayvanların hareketlerinde iyileşme ve nöronların sağkalımında artış gözlemlenmiştir. Sonuç olarak mitokondrinin nörodejeneratif hastalıkları tedavisi konusunda yardımcı bir yöntem olacağı rapor edilmiştir (175, 176).

Mitokondri transplantasyonu ile hasar gören dokuyu onarmak için McCully ve arkadaşları in vivo bir çalışma yapmış (177). İskemik hasarlı dokuda hasar gören alanı iyileştirmek için mitokondri transferi gerçekleştirmiştir. Sol koroner arter oklüzyonu ile tavşan kalp hasarı modeli oluşturduğu bu çalışmada mitokondri enjekte etmiştir. Mitokondri enjeksiyonu ile enfarktüs alanında azalma ve fonksiyonel iyileşme gözlemlenmiştir (178). Yine tavşanlarda iskemik kalp modelinde başka bir çalışmada, Masuzawa ve arkadaşları iskemik şok modelinde mitokondri nakli ile enfarktüs seviyelerinde azalma ile enerji ve hücre solunum için gerekli öncül metabolitlerde artma olduğunu gözlemlenmişler. Bu çalışmada mitokondrinin transplantasyonundan iki saat sonra kardiyomiyositler içine girdiği ve yirmi sekiz gün sonra bile kardiyak koruyucu etkisinin devam ettiği rapor edilmiştir (179).

Han-Chen Lin ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada karaciğerin iskemisinde mitokondri transferi yapılan alanlarda daha az doku hasarı olduğu görülmüştür (180).

2017 yılında mitokondri transplantasyonunda ilk olarak klinik kullanıma başlanmıştır. Bu çalışma miyokard iskemisi bulunan pediatrik hastalara uygulanmış. İskemi-reperfüzyona bağlı miyokarta disfonksiyonu bulunan beş pediatrik hasta mitokondri transplantasyonu yapılarak tedavi edilmiş. Hastalar 4-25 günlük, hipoplastik sol kalp sendromu, sol ventrikül obstrüksiyonu ve triküspid atrezisine sahipti. Mitokondriler hastaların kendi rectus abdominis kaslarından alınan örneklerden izole edildi ve her biri 100 mikrolitre olan 10' ar direk enjeksiyonla miyokardına enjekte edilmiş. Transplantasyonu takiben beş hastanın tümünde miyokard sistolik

fonksiyonlarda önemli bir gelişme göstermiştir. 4-6 günde ventrikül fonksiyonları normale dönmüş (181).

Mitokondri transferi, Liu ve arkadaşlarının yapmış olduğu Parkinson hastalığı modelinde noronların sağkalımında artış, McCully ve ekibi ve Masuzawa ve arkadaşlarının gerçekleştirmiş olduğu enfarktüs modelinde iskemik alandaki iyileşme, karaciğer iskemi reperfüzyon modelindeki mitokondri transplantasyonu ile doku hasarının azaltılması gibi patolojik durumların iyileştirilmesinde önemli bir yerde bulunmaktadır (176, 177, 180, 182). Literatürde bir çok patolojik durumda mitokondri transferi uygulanmış ve olumlu sonuçlar sunulmuş olmasına rağmen bizim çalışmamızdaki nefrotik sendrom modelinde daha önce mitokondri transferi ile ilgili bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışma ile doxorubicinin böbrek toksisitesinde mitokondri transferinin etkinliği gösterilmiştir. Uyguladığımız tedavi yönteminde dikkat çeken en önemli nokta histolojik olarak tübüler hücrelerde rejenerasyon varlığı daha önceki çalışmalarda farklı doku ve organlardaki yeniden düzenlemelerle son derece paralellik göstermektedir.

6. SONUÇ

Mitokondri transplantasyonunun son yıllarda gelişen bir tedavi yöntemi olduğu açıktır. Hasarlı doku ya da organa dışarıdan direk enjeksiyonla verilen izole edilmiş mitokondrinin etkinliğini yaptığımız farklı analiz yöntemleri ile değerlendirdik. Bu kapsamda elde ettiğimiz sonuçlara göre;

1. Mezenkimal kök hücreden izole ettiğimiz mitokondrinin %46,30'luk kısımda mitokondrilerin membran bütünlüğünü koruduğunu gözlemledik. Transplantasyon için uygun olduğunu değerlendirilmiştir.
2. Mezenkimal kök hücreden izole ettiğimiz mitokondrinin ATP oranlarının yüksek metabolik aktivite içerdiği tespit edilmiş olup, organel izolasyonunun başka çalışmalara entegre edilebileceği değerlendirilmiştir.
3. Doxorubicin enjeksiyonundan sonra tübüler dilatasyon ve tübüllerde protein birikimi gözlemledik ve 5. günde mitokondri transplantasyonundan sonra Doxorubicin+mitokondri grubunda tübüler protein birikiminin anlamlı oranda azaldığı tespit edilmiştir.

4. Doxorubicin+mitokondri grubunda transplantasyondan sonra tübüler hücrelerde anlamlı Şekilde rejenerasyon bulundu. Bu tedavimizin hasarlı böbrek hücrelerinin yeniden düzenlendiği gösterilmiştir.
5. Metabolik kafeslerde proteinüri takibi ile elde ettiğimiz sonuÇlara göre Doxorubicin grubu, Doxorubicin+respiration buffer grubu ve Doxorubicin+mitokondri gruplarında doxorubicin enjeksiyonundan sonra ilk beş günde tüm ratlar 3+ proteinüri değerine ulaştı. Doxorubicin+Mitokondri grubunda beşinci günde mitokondri transplantasyonu uygulandıktan sonra proteinürinin anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir.
6. SOD ve GPx enzim seviyesi ölümlerinde diğer gruplara göre Doxorubicin+mitokondri grubunda anlamlı artış bulundu.

Bu sonuÇlara göre mitokondri transplantasyonunun böbrek hasarı hastalıklarında tedavi edici özelliği olduğu gösterilmiştir. Bu tedavi yönteminin hücresel ya da mitokondriyal hasara neden olan diğer hastalıklarda da kullanılabileceği değerlendirilmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Chang JC, Liu KH, Li YC, Kou SJ, Wei YH, Chuang CS, Hsieh M, Liu CS (2013) Functional recovery of human cells harbouring the mitochondrial DNA mutation MERRF A8344G via peptide-mediated mitochondrial delivery. *Neurosignals* 21: 160–173
2. Chang JC, Wu SL, Liu KH, Chen YH, Chuang CS, Cheng FC, Su HL, Wei YH, Kuo SJ, Liu CS (2016) Allogeneic/xenogeneic transplantation of peptidelabeled mitochondria in Parkinson's disease: restoration of mitochondria functions and attenuation of 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. *Transl Res* 170: 40–56
3. Summya Rashid*, Nemat Ali*, Sana Nafees, Shiekh Tanveer Ahmad, Wani Arjumand, Syed Kazim Hasan, and Sarwat Sultana (2013) Alleviation of doxorubicin-induced nephrotoxicity and hepatotoxicity by chrysin in Wistar rats, Informa Healthcare USA, Inc. DOI: 10.3109/15376516.2012.759306
4. Rade Injac, Marija Boskovic, Martina Perse, Eva Koprivec-Furlan, Anton Cerar, Aleksandar Djordjevic, Borut Strukelj Acute doxorubicin nephrotoxicity in rats with malignant neoplasm can be successfully treated with fullereneol C60(OH)24 via suppression of oxidative stress, *Pharmacological Reports*, 2008, 60, 742–749 ISSN 1734-1140
5. Pallavi Bhargava and Rick G. Schnellmann (2017) Mitochondrial energetics in the kidney, *Nature Review/ Nephrology* doi:10. 1038/nrneph.2017.107
6. James D. McCully, Sidney Levitsky, Pedro J. del Nido and Douglas B. Cowan (2016) Mitochondrial transplantation for therapeutic use, *Clin Trans Med* (2016) 5: 16 DOI 10. 1186/s40169-016-0095-4
7. Chen L, Winger AJ, Knowlton AA (2014) Mitochondrial dynamic changes in health and genetic diseases. *Mol Biol Rep* 41: 7053–7062
8. Wallace, D.C. 1994. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 8739-8746.

9. Dyall, S.D., M.T. Brown, and P.J. Johnson. 2004. Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science* 304:253-257.
10. Mc LJ, Cohn GL, Brandt IK, Simpson MV. 1958. Incorporation of labeled amino acids into the protein of muscle and liver mitochondria. *The Journal of biological chemistry* 233: 657-63
11. Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N (2009) Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 138:628–644
12. Pica-Mattoccia L, Attardi G. 1971. Expression of the mitochondrial genome in HeLa cells. V. Transcription of mitochondrial DNA in relationship to the cell cycle. *J Mol Biol* 57: 615-21
13. Pica-Mattoccia L, Attardi G. 1972. Expression of the mitochondrial genome in HeLa cells. IX. Replication of mitochondrial DNA in relationship to cell cycle in HeLa cells. *J Mol Biol* 64: 465-84.
14. England JM, Attardi G. 1974. Expression of the mitochondrial genome in HeLa cells. XXI. Mitochondrial protein synthesis during the cell cycle. *J Mol Biol* 85: 433-44
15. Newton, K.J. (1988). Plant mitochondrial genomes: organization, expression and variation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plan: Mol. Biol.* 39,503-532.
16. Bogenhagen, D. and Clayton, DA.(1974). The number of mitochondrial deoxyribonucleic acid genomes in mouse L and human HeLa cells. Quantitative isolation of mitochondrial deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* 251,2938-44.
17. Becker, w.M.(1986). *The World of the Cell*. The Benjamin/Cumming Publ., California
18. Meyer RR, Simpson MV. 1970. Deoxyribonucleic acid biosynthesis in mitochondria. Purification and general properties of rat liver mitochondrial deoxyribonucleic acid polymerase. *J Biol Chem* 245: 3426-35
19. Brown WM, George M, Jr., Wilson AC. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 1967-71

20. Hutchison CA, 3rd, Newbold JE, Potter SS, Edgell MH. 1974. Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature* 251: 536-8
21. Bereiter-Hahn, J. and Jendrach, M. (2010). Mitochondrial dynamics. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 284, 1-65.
22. Nakada, K., Inoue, K. and Hayashi, J. (2001). Interaction theory of mammalian mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288, 743-746.
23. Malka, F., Guillery, O., Cifuentes-Diaz, C., Guillou, E., Belenguer, P., Lombe`s, A. and Rojo, M. (2005). Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. *EMBO Rep.* 6, 853-859.
24. Rossignol, R. et al. Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res.* 64, 985–993 (2004).
25. Mishra, P., Carelli, V., Manfredi, G. & Chan, D. C. Proteolytic cleavage of Opa1 stimulates mitochondrial inner membrane fusion and couples fusion to oxidative phosphorylation. *Cell Metab.* 19, 630–641 (2014).
26. Eiyama, A. & Okamoto, K. PINK1/Parkin-mediated mitophagy in mammalian cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 33, 95–101 (2015).
27. Cho D., Nakamura T., Lipton S. , Mitochondrial Dynamics in Cell Death and Neurodegeneration. *Cell Mol. Life Sci.* 67: 3435-3447, 2010
28. Perier C , Vila M., Mitochondrial biology and Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012
29. Youle R. J., Narendra D. P., Mechanisms of mitophagy *Molecular cell Biology* VOLUME 12. 2011
30. Guyton AC. Textbook of Physiology WB. Saunders Company-Phl 1976, 5 th. (vol 1). ; 34.
31. Leonard JV, Schapira AHV. Mitochondrial respiratory chain disorders I: Mitochondrial DNA defects. *The Lancet* 2000;355;389.
32. Fasman, G.D. In Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, 3rd ed., CRC Press, Inc.: Cleveland, OH, 1976, Vol. I (Physical and Chemical Data), pp. 132-137.

33. Taanman JW. The human mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta* 1999;1410:103
34. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser J, (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39: 44–84.
35. Kleczkowski M, Klucinski W, Sikora J, Zdanowicz M, Dziekan P, (2003). Role of antioxidants in the protection against oxidative stress in cattle nonenzymatic mechanism. *Pol J. Vet. Sci.* 6: 301- 308
36. Traber M.G, Packer L, (1995). Vitamin E. Beyond antioxidant function. *Am. J. Clin. Nutr.* 62: 1501- 1509
37. Holmstrom, K. M. & Finkel, T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 15, 411–421 (2014).
38. Ruiz, S. Targeting the transcription factor Nrf2 to ameliorate oxidative stress and inflammation in chronic. *Kidney Int.* 83, 1029–1041 (2013)
39. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci.* 2008; 4(2): 89-96.
40. Sen S, Chakraborty R, Sridhar C, Reddy YSR, De B. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: Current status and future prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.* 2010; 3(1): 91-100.
41. Şener G, Yeğen Berrak Ç. İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Klinik Gelişim Dergisi.* 2009; 22: 5-13.
42. Dündar Y, Aslan R. Hücre Moleküler Statüsünün Anlaşılması ve Fizyolojik Önem Açısından Radikaller, Antioksidanlar. *İnsizyon Cerrahi Tıp Bilim Dergisi.* 1999; 2(2): 134-142.
43. Sen S, Chakraborty R. The Role of Antioxidants in Human Health. *American Chemical Society, Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention and Therapy.* Chapter 1: 1-37. 2011.
44. Lai CC, Huang W, Askari A, Wang Y. Differential regulation of superoxide dismutase in copper deficient rat organs. *Free Radic Biol Med* 1994; 16(5): 613-20.
45. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine.*

2 nd ed. Oxford: Clarendon Pres; 1983; 19-234.

46.NordbergJ, Arner SJ. Reactive Oxygen Species, Antioxidant, And The Mammalian Thioredoxin System. *Free Radic Biol Med.* 2001; 31(11): 1287-1312.

47.Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 3rd. ed. p.10-121. Oxford University Press, New York, USA; 1999.

48.Gao F, Kinnula VL, Myllärniemi M, Oury TD. Extracellular Superoxide Dismutase in Pulmonary Fibrosis. *Antioxid Redox Signal.* 2008; 10(2): 343-354.

49.Weisiger, R. A. & Fridovich, I. Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J. Biol. Chem.* 248, 4793–4796 (1973).

50.Teruya, R.et al. Expression of oxidative stress and antioxidant defense genes in the kidney of inbred mice after intestinal ischemia and reperfusion. *Acta Cir. Bras.* 28, 848–855 (2013).

51.Gutteridge JMC, Halliwell B. *Antioxidants in nutrition, health and disease.* New York: Oxford University Pres; 1994; 81: 7-14.

52.Cheung CCC, Zheng GJ, Li AMY, Richardson BJ, Lam PKS. Relationship Between Tissue Concentrations of Polycylic Aromatic Hydrocarbons and Antioxidative Responses of Marine Mussels, *Perna viridis.* *Aquat Toxicol.* 2001; 52(3-4): 189-203.

53.Larson RA. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry.* 1988; 27(4): 969-978. 21. Cnubben NHP, Rietjens IMCM, Wortelboer H, Van-Zanden J, Van Bladeren PJ. The Interplay of Glutathione Related Processes in Antioxidant Defense. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2001; 10(4): 141- 152.

54.Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species; antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001; Dec 1, 31 (11): 1287-31263.Sen S, Chakraborty R. *The Role of Antioxidants in Human Health.* American Chemical Society, *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention and Therapy.* Chapter 1: 1-37. 2011.

55.J. L. Spees, S. D. Olson, M. J. Whitney, and D. J. Prockop, “Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 5,pp. 1283–1288, 2006

56. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Seglutathione peroxidase, catalase, Cu-Zn superoxide dismutase for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1994; 17: 235-48.
57. Cnubben NHP, Rietjens IMCM, Wortelboer H, Van-Zanden J, Van Bladeren PJ. The Interplay of Glutathione Related Processes in Antioxidant Defense. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2001; 10(4): 141- 152.
58. Deaton CM, Marlin DJ. Exercise Associated Oxidative Stress. *Clinical Techniques Equine Practice*. 2003; 2(3): 278-291.
59. Guemouri L, Artur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cuny G, Siest G. Biological Variability of Superoxide Dismutase, Glutathione peroxidase, and Catalase in Blood. *Clin Chem*. 1991; 37(11): 1932- 1937.
60. Lushchak, V. I. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J. Amino Acids* 2012, 26 (2012).
61. Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radical in Biology and Medicine*. Thirded. Oxford: Oxford University Pres; 2000; 160-5.
62. TownsendDM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother*. 2003; 57(3-4): 145-155.
63. Green RM, Graham M, O'Donovan MR, Chipman JK, Hodges NJ. Subcellular compartmentalization of glutathione: correlations with parameters of oxidative stress related to genotoxicity. *Mutagenesis*. 2006; 21(6): 383-390.
64. KalininaEV, Chernov NN, Novichkova MD. Role of Glutathione, Glutathione Transferase, and Glutaredoxin in Regulation of Redox-Dependent Processes. Published in *Uspekhi Biologicheskoi Khimii*. 2014; 54: 299-348.
65. Cochrane CG. Cellular injury by oxidants. *Am J Med* 1991; 23-30.
66. Esteve JM, Mompo J, Asuncion JG, Sastre J, Asensi M, Boix J, et al. Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis studies in vivo and in vitro. *FASEB J* 1999; 13: 1055-64.
67. Chavan S, Sava L, Saxena V, Pillai S, Sontakke A, Ingole D. Reduced glutathione: Importance of specimen collection. *Indian J Clin Biochem* 2005; 20(1): 50-52.

68. Parcell S. Sulfur in human nutrition and applications in medicine. *Altern Med. Rev* 2002; 7: 22-44.
69. Lushchak, V. I. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J. Amino Acids* 2012, 26 (2012)
70. Freeman BA, Crapo JD, (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 47: 412-426
71. Dündar Y, Aslan R. Oksidan-Antioksidan denge ve korunmasında vitaminlerin rolü. *Hayvancılık Araştırma Dergisi* 1999; 9(1-2): 32-39
72. Cighetti G, Duca L, Bortone L, Sala S, Nava I, Fiorelli G, Cappellini M.D, (2002). Oxidative Status and Malondialdehyde in β -thalassaemia Patients. *European Journal of Clinical Investigation.* 32: 55- 601
73. Ulus NN, Sahilli M, Avci A, Canbolat O, Ozansoy G, Ari N, et al. Pentose phosphate pathway, glutathione-dependent enzymes and antioxidant defense during oxidative stress in diabetic rodent brain and peripheral organs: effects of stobadine and vitamin E. *Neurochem Res* Jun2003; 28(6): 815-23.
74. Uchida K. 4-Hydroxy-2-Nonenal. A product and mediator of oxidative stress. *Progr Lip Res* 2003; 569:1-26.
75. Donato, H. Lipid peroxidation Cross Linking Reaction and Aging. In *Age Pigments*. Sohal R W, editor. Elsevier. Amsterdam: North Holland Biomedical press; 1981.p.63-81.
76. Mizuno Y, Ohta S, Tanaka M, Takamiya S, Suzuki K, et al. 1989. Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 163: 1450-5
77. Swerdlow RH, Khan SM. 2004. A "mitochondrial cascade hypothesis" for sporadic Alzheimer's disease. *Med Hypotheses* 63: 8-20
78. Onopiuk M, Brutkowski W, Wierzbicka K, Wojciechowska S, Szczepanowska J, et al. 2009. Mutation in dystrophin-encoding gene affects energy metabolism in mouse myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 386: 463-6
79. Lin MT, Beal MF. 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443: 787-95

80. Aygok GA, Marmarou A, Fatouros P, Kettenmann B, Bullock RM. 2008. Assessment of mitochondrial impairment and cerebral blood flow in severe brain injured patients. *Acta Neurochir Suppl*102: 57-61
81. Huang SF, Tsai YA, Wu SB, Wei YH, Tsai PY, Chuang TY. 2012. Effects of intravascular laser irradiation of blood in mitochondria dysfunction and oxidative stress in adults with chronic spinal cord injury. *Photomed Laser Surg*30: 579-86
82. Braunwald E, Kloner RA. 1985. Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *The Journal of clinical investigation*76: 1713-9
83. Bolanos JP, Moro MA, Lizasoain I, Almeida A. 2009. Mitochondria and reactive oxygen and nitrogen species in neurological disorders and stroke: Therapeutic implications. *Adv Drug Deliv Rev*61: 1299-315
84. Singbartl K, Joannidis M. Short-term effects of acute kidney injury. *Crit Care Clin.* 2015;31(4):751–62.
85. Lewington AJ, Cerda J, Mehta RL. Raising awareness of acute kidney injury: a global perspective of a silent killer. *Kidney Int.* 2013;84(3):457–67.
86. Mehta RL, Cerda J, Burdmann EA, et al. International Society of Nephrology's 0by25 initiative for acute kidney injury (zero preventable deaths by 2025): a human rights case for nephrology. *Lancet.* 2015;385:2616–43.
87. Ishimoto, Y. & Inagi, R. Mitochondria: a therapeutic target in acute kidney injury. *Nephrol. Dial. Transplant.* 31, 1062–1069 (2016)
88. Hsu RK et al. Temporal changes in incidence of dialysis-requiring AKI. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(1):37-42.
89. Hsu CY et al. Community-based incidence of acute renal failure. *Kidney Int.* 2007;72(2):208-12.
90. Lewington AJ et al. Raising awareness of acute kidney injury: a global perspective of a silent killer. *Kidney Int.* 2013;84(3):457-67.
91. Susantitaphong P et al. World incidence of AKI: a meta-analysis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2013;8(9):1482-93.

- 92.Chertow GM et al. Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(11):3365-70
- 93.Bonventre JV. Pathophysiology of acute kidney injury: roles of potential inhibitors of inflammation. *Contrib Nephrol* 2007;156: 39-46.
- 94.Sharfuddin AA, Molitoris BA. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol* 2011;7: 189-200.
- 95.Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest* 2011;121:4210-21.
- 96.Bonventre JV. Pathophysiology of AKI: injury and normal and abnormal repair. *Contrib Nephrol* 2010;165:9-17
- 97.Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, et al. Acute renal failure: definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the second international consensus conference of the acute dialysis quality initiative (ADQI) group. *Crit Care*. 2004;8:R204–12
- 98.Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, et al. Acute kidney injury network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care*. 2007;11:R31.
- 99.Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group. KDIGO clinical practice guideline for acute kidney injury. *Kidney Int*. 2012;2: 1–138
- 100.Friedrichs JO, Adhikari N, Herridge MS, Beyene J. Meta-analysis: Low dose dopamine increases output but does not prevent renal dysfunction or death. *Ann Intern Med* 2005; 142: 510-24
- 101.Hammerman MR. Potential role of growth factors in prophylaxis and treatment of acute renal failure, *Kidney Int*. 1998;53(64): 19-22
- 102.Conger J. Prophylaxis and treatment of acute renal failure by vasoactive agents. The facts and myths. , *Kidney Int*. 1998;53(64): 23-26
- 103.Epstein M. Calcium antagonist and the kidney. Implication for renal protectio

104. Chang YL, Lee HJ, Liu ST, et al. (2011). Different roles of p53 in the regulation of DNA damage caused by 1,2 heteroannelated anthraquinones and doxorubicin. *Int J Biochem Cell Biol* 43: 1720–8.
105. Machado NG, Baldeiras I, Pereira GC, et al. (2010). Sub-chronic administration of doxorubicin to Wistar rats results in oxidative stress and unaltered apoptotic signaling in the lung. *Chem Biol Interact* 188:478–86.
106. Thippeswamy AH, Shirodkar A, Koti BC, et al. (2011). Protective role of *Phyllanthus niruri* extract in doxorubicin-induced myocardial toxicity in rats. *Indian J Pharmacol* 43: 31–5.
107. P. K. Singal, C. M. R. Deally, and L. E. Weinberg, "Subcellular effects of adriamycin in the heart: a concise review," *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 19, no. 8, pp. 817–828, 1987
108. L. L. Liu, Q. X. Li, L. Xia, J. Li, and L. Shao, "Differential effects of dihydropyridine calcium antagonists on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats," *Toxicology*, vol. 231, no. 1, pp. 81–90, 2007.
109. F. H. Wapstra, H. Van Goor, P. E. De Jong, G. Navis, and D. De Zeeuw, "Dose of doxorubicin determines severity of renal damage and responsiveness to ACE-inhibition in experimental International Journal of Cell Biology 9 nephrosis," *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, vol. 41, no. 2-3, pp. 69–73, 1999
110. Dziêgiel P, Suder E, Surowiak P, Jethon Z, Rabczynski J, Januszewska L, Sopol M, Zabel M: Role of exogenous melatonin in reducing the nephrotoxic effect of daunorubicin and doxorubicin in the rat. *J Pineal Res*, 2002, 33, 95–100.
111. Hahn H, Park YS, Ha IS, Cheong HI, Choi Y: Age-related differences in adriamycin-induced nephropathy. *Pediatr Nephrol*, 2004, 19, 761–766.
112. Liu LL, Li QX, Xia L, Li J, Shao L: Differential effects of dihydropyridine calcium antagonists on doxorubicin, 2008, 60, 742–749 induced nephrotoxicity in rats. *Toxicology*, 2007, 231, 81–90.

- 113.A. Karaman, E. Fadillioglu, E. Turkmen, E. Tas, and Z.Yilmaz, "Protective effects of leflunomide against ischemiareperfusion injury of the rat liver," *Pediatric Surgery International*, vol. 22, no. 5, pp. 428–434, 2006
114. McCully JD, Wakiyama H, Hsieh Y-J, Jones M, Levitsky S (2004) Differential contribution of necrosis and apoptosis in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286:H1923–1935
115. Chang JC, Wu SL, Liu KH, Chen YH, Chuang CS, Cheng FC, Su HL, Wei YH, Kuo SJ, Liu CS (2016) Allogeneic/xenogeneic transplantation of peptidelabeled mitochondria in Parkinson's disease: restoration of mitochondria functions and attenuation of 6-hydroxydopamine–induced neurotoxicity. *Transl Res* 170:40–56
- 116.Lin HC, Liu SY, Lai HS, Lai IR (2013) Isolated mitochondria infusion mitigates ischemia-reperfusion injury of the liver in rats. *Shock* 39:304–310
117. Y. M. Cho, H. W. Jeong, J. H. Sohn, D. B. Seo, W. G. Kim, and S. J. Lee, "Mesenchymal stem cells transfer mitochondria to 18 Stem Cells International the cells with virtually no mitochondrial function but not with pathogenic mtDNA mutations," *PLoS One*, vol. 7, no. 3, article e32778, 2012.
118. C. H. Davis, K. Y. Kim, E. A. Bushong et al., "Transcellular degradation of axonal mitochondria," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 111, no. 26, pp. 9633– 9638, 2014.
119. T. Ahmad, S. Mukherjee, B. Pattnaik et al., "Miro1 regulates intercellular mitochondrial transport & enhances mesenchymal stem cell rescue efficacy," *The EMBO Journal*, vol. 33, no. 9, pp. 994–1010, 2014.
120. A. Rustom, R. Saffrich, I. Markovic, P. Walther, and H.-H. Gerdes, "Nanotubular highways for intercellular organelle transport," *Science*, vol. 303, no. 5660, pp. 1007–1010, 2004.
121. J. L. Spees, S. D. Olson, M. J. Whitney, and D. J. Prockop, "Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 5, pp. 1283–1288, 2006.

122. M. N. Islam, S. R. Das, M. T. Emin et al., "Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury," *Nature Medicine*, vol. 18, no. 5, pp. 759–765, 2012.
123. M. V. Jackson, T. J. Morrison, D. F. Doherty et al., "Mitochondrial transfer via tunneling nanotubes is an important mechanism by which mesenchymal stem cells enhance macrophage phagocytosis in the in vitro and in vivo models of ARDS," *Stem Cells*, vol. 34, no. 8, pp. 2210– 2223, 2016.
124. A. Fierabracci, A. Del Fattore, R. Luciano, M. Muraca, A. Teti, and M. Muraca, "Recent advances in mesenchymal stem cell 22 Stem Cells International immunomodulation: the role of microvesicles," *Cell Transplantation*, vol. 24, no. 2, pp. 133–149, 2015.
125. P. J. Quesenberry, J. Aliotta, M. C. Deregibus, and G. Camussi, "Role of extracellular RNA-carrying vesicles in cell differentiation and reprogramming," *Stem Cell Research & Therapy*, vol. 6, no. 1, 2015
126. J. P. G. Sluijter, V. Verhage, J. C. Deddens, F. van den Akker, and P. A. Doevendans, "Microvesicles and exosomes for intracardiac communication," *Cardiovascular Research*, vol. 102, no. 2, pp. 302–311, 2014.
127. D. Torralba, F. Baixauli, and F. Sánchez-Madrid, "Mitochondria know no boundaries: mechanisms and functions of intercellular mitochondrial transfer," *Frontiers in Cell and Development Biology*, vol. 4, p. 107, 2016.1
128. M. A. Clark and J. W. Shay, "Mitochondrial transformation of mammalian cells," *Nature*, vol. 295, no. 5850, pp. 605–607, 1982.
129. A. Caicedo, V. Fritz, J. M. Brondello et al., "MitoCeption as a new tool to assess the effects of mesenchymal stem/stromal cell mitochondria on cancer cell metabolism and function," *Scientific Reports*, vol. 5, p. 9073, 2015.
130. T. Kitani, D. Kami, S. Matoba, and S. Gojo, "Internalization of isolated functional mitochondria: involvement of macropinocytosis," *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 18, no. 8, pp. 1694–1703, 2014

131. M. P. King and G. Attardi, "Injection of mitochondria into human cells leads to a rapid replacement of the endogenous mitochondrial DNA," *Cell*, vol. 52, no. 6, pp. 811–819, 1988
132. T.-H. Wu, E. Sagullo, D. Case et al., "Mitochondrial transfer by photothermal nanoblade restores metabolite profile in mammalian cells," *Cell Metabolism*, vol. 23, no. 5, pp. 921– 929, 2016
133. C. A. Pacak, J. M. Preble, H. Kondo et al., "Actin-dependent mitochondrial internalization in cardiomyocytes: evidence for rescue of mitochondrial function," *Biology Open*, vol. 4, no. 5, pp. 622–626, 2015.
134. Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar. 1, Ankara: Türkiye Bilimler Akademisi, 2009.
135. NIH Stem Cell Information Home Page. Erişim: <http://stemcells.nih.gov/index>, 2011. Erişim tarihi:10.09.2011.
136. Odorico J, Zhang S, Pedersen R. Human embryonic stem cells. 1st. Ed., New York: Garland Science/BIOS Scientific Publishers, 2005, 81-97.
137. Barry FP, Murphy JM [2004]. Mesenchymal Stem Cells: Clinical applications and biological characterization. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36: 568-584.
138. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR [1999]. Multilineage potential of adult mesenchymal stem cells, *Science*, 284: 143-147.
139. Csaki C, Matis U, Mobasher A, Ye H (2007): Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cell: a biochemical, morphological and ultrastructural study. *Histochem Cell Biol*, 128: 507-20
140. Kim JW, Lee JH, Lyoo YS, Jung DI, Park HM (2013) The effects of topical mesenchymal stem cell transplantation in canine experimental cutaneous wounds. *Vet Dermatol*, 24: 242-253.

141. Pasquinelli G, Tazzari P, Ricci F, Vaselli C, Buzzi M, Conte R (2007): Ultrastructural Characteristics of Human Mesenchymal Stromal (Stem) Cells Derived from Bone Marrow and Term Placenta. *Ultrastructural Pathology*, 31: 23-31.
142. Tabbara, I. A., Zimmerman, K., Morgan, C., & Nahleh, Z. (2002). Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: complications and results. *Archives of Internal Medicine*, 162, 1558–1566
143. Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S. M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M., Leri, A., & Anversa, P. (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 410, 701–705.
144. Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C. D., Buzney, E. A., Khan, M. K., Flint, A. F., Kunkel, L. M., & Mulligan, R. C. (1999). Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*, 401, 390–394.
145. J. Y. Shin, H. J. Park, H. N. Kim et al., “Mesenchymal stem cells enhance autophagy and increase beta-amyloid clearance in Alzheimer disease models,” *Autophagy*, vol. 10, no. 1, pp. 32–44, 2014.
146. William EE. Clinical pharmacology of cancer chemotherapy in children, anthracyclines. Saunders. *Pediatr Clin North Am. Clinical Pharmacology* 1989; 36:1206-1209.
147. Muggia FM, Green MD. New anthracycline antitumor antibiotics. *Crit Rev Oncol Hematol* 1991; 11: 43-64.
148. Hideg K, Kálai T. Novel antioxidants in anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol* 2007; 7: 160-164.
149. Ueno, M. et al. Doxorubicin induces apoptosis by activation of caspase-3 in cultured cardiomyocytes in vitro and rat cardiac ventricles in vivo. *J Pharmacol Sci* 101, 151–158 (2006).
150. A. K. El-Sheikh, M. A. Morsy, M. M. Mahmoud, R. A. Rifaai, and A. M. Abdelrahman, “Effect of coenzyme-Q10 on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats,” *Advances in Pharmacological Sciences*, vol. 2012, Article ID 981461, 8 pages, 2012.).

151. Mordente A, Meucci E, Martorana GE, Giardina B, Minotti G. Human heart cytosolic reductases and anthracycline cardiotoxicity. *IUBMB Life* 2001; 52: 83-88.
152. Oz E, Ilhan MN. (2006). Effects of melatonin in reducing the toxic effects of doxorubicin. *Mol Cell Biochem* 286: 11–15.
153. Marwa M. M. Refaie, Entesar F. Amin, Nashwa F. El-Tahawy, and Aly M. Abdelrahman 2015 Possible Protective Effect of Diacerein on Doxorubicin-Induced Nephrotoxicity in Rats
154. Summya Rashid*, Nemat Ali*, Sana Nafees, Shiekh Tanveer Ahmad, Wani Arjumand, Syed Kazim Hasan, and Sarwat Sultana (2013) Alleviation of doxorubicin-induced nephrotoxicity and hepatotoxicity by chrysin in Wistar rats, *Informa Healthcare USA, Inc.* DOI: 10.3109/15376516.2012.759306
155. Kalaiselvi P, Pragasam V, Chinnikrishnan S, et al. (2005) Counteracting adriamycin-induced oxidative stress by administration of N-acetyl cysteine and vitamin E. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 43: 834–840.
156. Damodara RV, Saayi KG, Padmavathi P. (2007). Effect of *Emblica officinalis* against alcohol-induced biochemical changes in plasma and red blood cells of rats. *African J Biochem Res* 6:101–5.
157. Bray, T. M. & Taylor, C. G. (1993). Tissue glutathione, nutrition, and oxidative stress. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 71, 74675 1.
158. Rade Injac, Marija Boskovic, Martina Perse, Eva Koprivec-Furlan, Anton Cerar, Aleksandar Djordjevic, Borut Strukelj Acute doxorubicin nephrotoxicity in rats with malignant neoplasm can be successfully treated with fullerol C60(OH)₂₄ via suppression of oxidative stress, *Pharmacological Reports*, 2008, 60, 742–749 ISSN 1734-1140
159. Zhang J, Clark JR, Herman EH, Ferrans VJ. Doxorubicin-induced apoptosis in spontaneously hypertensive rats: differential effects in heart, kidney and intestine, and inhibition by ICRF-187. *J Mol Cell Cardiol.* 1996; 28: 1931-143.
160. Okuda S, Oh Y, Tsuruda H, Onoyama K, Fujimi S, Fujishima M: Adriamycin-induced nephropathy as a model of chronic progressive glomerular disease. *Kidney Int* 29:502—510, 1986

161. Mohan M, Kamble S, Gadhi P, Kasture S. (2010). Protective effect of Solanum torvum on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol* 4: 436–40
162. El-Shitany NA, El-Haggar S, El-desoky K. (2008). Silymarin prevents adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol* 46:2422–8.
163. Jeansson M, Bjorck K, Tenstad O, Haraldsson B. Adriamycin alters glomerular endothelium to induce proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 114-22.
164. Swerdlow RH, Khan SM. 2004. A "mitochondrial cascade hypothesis" for sporadic Alzheimer's disease. *Med Hypotheses* 63: 8-20
165. Lin MT, Beal MF. 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443: 787-95
166. Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, Kang D, Suematsu N, et al. 2001. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ Res* 88: 529-35
167. Sullivan PG, Krishnamurthy S, Patel SP, Pandya JD, Rabchevsky AG. 2007. Temporal characterization of mitochondrial bioenergetics after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 24: 991-9
168. Singh IN, Sullivan PG, Deng Y, Mbye LH, Hall ED. 2006. Time course of posttraumatic mitochondrial oxidative damage and dysfunction in a Mouse model of focal traumatic brain injury: implications for neuroprotective therapy. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 26: 1407-18
169. A. Fierabracci, A. Del Fattore, R. Luciano, M. Muraca, A. Teti, and M. Muraca, "Recent advances in mesenchymal stem cell 22 Stem Cells International immunomodulation: the role of microvesicles," *Cell Transplantation*, vol. 24, no. 2, pp. 133–149, 2015.

- 170.Y.-C. Yi, M.-J. Chen, J. Y.-P. Ho, H.-F. Guu, and E. S.-C. Ho, "Mitochondria transfer can enhance the murine embryo development," *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, vol.24,no. 10, pp. 445–449, 2007.
- 171.K. Takeda, M. Tasai, S. Akagi et al., "Microinjection of serumstarved mitochondria derived from somatic cells affects parthenogenetic development of bovine and murine oocytes," *Mitochondrion*, vol. 10, no. 2, pp. 137–142, 2010
- 172.P. Amato, M. Tachibana, M. Sparman, and S. Mitalipov, "Three-parent in vitro fertilization: gene replacement for the prevention of inherited mitochondrial diseases," *Fertility and Sterility*, vol. 101, no. 1, pp. 31–35, 2014.
- 173.J. L. Spees, S. D. Olson, M. J. Whitney, and D. J. Prockop, "Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 5,pp. 1283–1288, 2006
- 174.E. Katrangi, G. D'Souza, S. V. Boddapati et al., "Xenogenic transfer of isolated murine mitochondria into human p0 cells can improve respiratory function," *Rejuvenation Research*, vol. 10, no. 4, pp. 561–570, 2007.
- 175.J.-C. Chang, K. H. Liu, Y. C. Li et al., "Functional recovery of human cells harbouring the mitochondrial DNA mutation MERRF A8344G via peptide-mediated mitochondrial delivery," *Neurosignals*, vol. 21, no. 3-4, pp. 160–173, 2013.
- 176.J.-C. Chang, S. L. Wu, K. H. Liu et al., "Allogeneic/xenogeneic transplantation of peptide-labeled mitochondria in Parkinson's disease: restoration of mitochondria functions and attenuation of 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity," *Translational Research*, vol. 170, pp. 40–56, 2016, e3
- 177.J. D. McCully, D. B. Cowan, C. A. Pacak, I. K. Toumpoulis, H. Dayalan, and S. Levitsky, "Injection of isolated mitochondria during early reperfusion for cardioprotection," *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, vol. 296, no. 1, pp. H94–H105, 2009
- 178.E. Katrangi, G. D'Souza, S. V. Boddapati et al., "Xenogenic transfer of isolated murine mitochondria into human p0 cells can improve respiratory function," *Rejuvenation Research*, vol. 10, no. 4, pp. 561–570, 2007.

- 179.T. Kitani, D. Kami, S. Matoba, and S. Gojo, "Internalization of isolated functional mitochondria: involvement of macropinocytosis," *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 18, no. 8, pp. 1694–1703, 2014.
- 180.Lin HC, Liu SY, Lai HS, Lai IR (2013) Isolated mitochondria infusion mitigates ischemia-reperfusion injury of the liver in rats. *Shock* 39: 304–310
- 181.Emani, S.M., Piekarski, B.L., Harrild, D., del Nido, P.J., McCully, J.D., 2017. Autologous mitochondria transplantation for ventricular dysfunction following myocardial ischemia-reperfusion injury. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtcvs.2017.02.018> (inpress)
- 182.A. Masuzawa, K. M. Black, C. A. Pacak et al., "Transplantation of autologously derived mitochondria protects the heart from ischemia-reperfusion injury," *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, vol. 304, no. 7, pp. H966–H982, 2013
183. Y. Nakamura and H. Arakawa, 2017. Discovery of MIEAP-regulated mitochondrial quality control as a new function of tumor suppressor p53. *Cancer Sci.* 2017 May; 108(5): 809–817. Published online 2017 May 5. doi: 10.1111/cas.13208

