

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇANLARDA DENEYSEL BÖBREK İSKEMİ-REPERFÜZYONUNDA
NARİNGİN'İN KASPAZ-3, IL-1 β VE HIF-1 α DÜZEYLERİNE ETKİSİ**

Esra Gülsüm DANIŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Rasim MOĞULKOÇ

KONYA-2022

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇANLARDA DENEYSEL BÖBREK İSKEMİ-REPERFÜZYONUNDA
NARİNGİN'İN KASPAZ-3, IL-1 β VE HIF-1 α DÜZEYLERİNE ETKİSİ**

Esra Gülsüm DANIŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Rasim MOĞULKOÇ

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 22202003 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2022

ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca engin tecrübelerini, bilgisini, görüşlerini benimle paylaşan, anlayışlı yaklaşımıyla bu süreci kolaylaştıran çok değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Rasim MOĞULKOÇ'a

Yüksek Lisans boyunca emeği geçen ve desteğini gördüğüm Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Abdülkerim Kasım BALTACI'ya

Çalışma sırasında ve analizlerde destekte bulunan Arş. Gör. Dr. Derviş DAŞDELEN'e ve Arş. Gör. Gözde ACAR'a, Arş.Gör. Dr. Merve SOLMAZ'a

Hayatımın her aşamasında yanımda olan, desteğini ve sevgisini hiç esirgemeyen, bugünlere gelmemi sabırla ve gururla izleyen anneme, ablama ve sevgili dostlarıma

Ayrıca tez çalışmamızı maddi anlamda destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR	iv
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
1.GİRİŞ.....	1
1.1. İskemi Reperfüzyon (I/R) Hasarı.....	1
1.2. Renal İskemi Reperfüzyon Hasarı.....	2
1.3. Renal İskemi Reperfüzyonunda Antioksidanlar	4
1.4. Renal İskemi Reperfüzyon Hasarı ve HIF-1 α	6
1.5. Apoptoz ve Kaspaz 3	9
1.6. Renal İskemi Reperfüzyon ve IL-1 β	12
1.7. Flavonoidler ve Naringin	14
1.8. İskemi-Reperfüzyon ve Doku Hasarı	16
2.GEREÇ VE YÖNTEM	18
2.1. ELISA Analizleri	19
2.1.1. HIF -1 α Analizi	19
2.1.2. Kaspaz-3 Analizi.....	20
2.1.3. IL-1 β Analizi	21
2.2. Histolojik Değerlendirme	22
2.3. İstatistiksel Analizler.....	22
3.BULGULAR	23
3.1. Korteks HIF-1 α Değerleri.....	23
3.2. Korteks ve Medulla Kaspaz-3 Değerleri	23
3.3. Korteks ve Medulla IL-1 β Değerleri.....	24
3.4. HE Boyama Sonuçları	25
4. TARTIŞMA.....	29
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	36

6. KAYNAKLAR	37
7. EKLER.....	47
EK A: Etik Kurul Onayı.....	47
EK B: Turnitin Raporu.....	48
8. ÖZGEÇMİŞ.....	50



SİMGELER VE KISALTMALAR

ABH:	Akut böbrek hasarı
AKS:	Akut koroner sendrom
Apaf-1:	Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
BUN:	Kan üre nitrojeni
CAT:	Katalaz
CED-3:	C. elegans hücre ölümü anormal-3 geni
CHBP:	Eritropoietin türevli siklik sarmal B yüzey peptidi
DAMP:	Hücre ölümünü başlatan hasarla ilişkili protein
DGF:	Gecikmiş greft fonksiyonu
ECM:	Hücre dışı matriks
EMT:	Epitelyal-mezenkimal geçiş
GPx:	Glutasyon peroksidaz
GSDME:	Gasdermin D
GSH:	Glutasyon
HIF:	Hipoksi ile indüklenebilir faktör
IL:	İnterlökin
IL-1 α :	İnterlökin 1 alfa
IL-1 β :	İnterlölin 1 beta
İQ:	İzokuarsetin
İR:	İskemi reperfüzyon
Mint 3:	Munc18-1-etkileşimli protein 3
mPTP:	Mitokondriyal geçiş gözenekleri
NAR:	Naringin
NF-Kb:	Nükleer faktör kappa beta
NO-:	Nitrik oksit
Nrf2:	Nükleer faktör E 2 ile ilişkili faktör 2
NTS:	Nükleus traktus solitarius
PCD:	Programlanmış hücre ölümü
PHD:	Prolil hidroksilaz
RIRI:	Renal iskemi reperfüzyon hasarı

RNT: Reaktif nitrojen türleri

ROT: Reaktif oksijen türleri

S1P: Sfingosin-1-fosfat

SOD: Süperoksit dismutaz

TEC: Tübüler epitel hücreler

TLR: Toll benzeri reseptörler

TMZ: Trimetazidin

TNF- α : Tümör nekroz faktörü- α



ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Sıçanlarda Deneysel Böbrek İskemi-Reperfüzyonunda Naringin'in Kaspaz-3, IL-1 β ve HIF-1 α Düzeylerine Etkisi

Esra Gülsüm DANIŞ

Fizyoloji (Tıp) Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2022

İskemi reperfüzyon (I/R) sonrası dokularda mikrovasküler fonksiyon bozukluğu gelişir. Mevcut çalışmanın amacı tek taraflı nefrektomi ve böbrek-iskemi reperfüzyonu yapılan sıçanlarda naringin takviyesinin böbrekte kaspaz-3, IL-1 β ve HIF-1 α düzeyleri ile böbrek histolojisine olan etkisini belirlemektir.

Selçuk Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edilen 8-12 haftalık Wistar tipi erkek 40 sıçan üzerinde gerçekleştirildi.

Ratlarda deneysel böbrek iskemi reperfüzyonu ile tek taraflı nefrektomi genel anestezi altında gerçekleştirildi. Deney grupları şu şekilde oluşturuldu.

- 1) Kontrol grubu,
- 2) Sham kontrol + Vehicle grubu.
- 3) Böbrek iskemi-reperfüzyonu (Renal İ+R) + Vehicle grubu
- 4) Renal İ+R + Naringin (50 mg/kg/gün) grubu (3 gün uygulama) grubu
- 5) Renal İ+R + Naringin (100 mg/kg/gün) grubu (3 gün uygulama) grubu.

İskemi reperfüzyon gruplarında sol böbreklerde nefrektomi, sağ böbreklerde ise 45 dakika iskemi ve takiben 72 saat reperfüzyon gerçekleştirildi. Naringin reperfüzyonun hemen başında, 24 saat sonra ve 48 saat sonra intraperitoneal olarak uygulandı. Deneylerin bitiminde genel anestezi altındaki hayvanlarda öncelikle kalpten kan alındıktan sonra servikal dislokasyonla hayvanlar öldürülerek böbrek doku örnekleri alındı. Dokular kaspaz-3, IL-1 β ve HIF-1 α yönünden ve ayrıca histolojik olarak değerlendirildi.

Böbrek dokularında iskemi-reperfüzyon sonucu HIF-1 α azalırken kaspaz-3, IL-1 β artış gösterdi. İ/R aynı zamanda böbrek dokusunda hasar oluşturdu. Ancak naringin takviyesi oluşan bozulmaları belirli oranda düzeltti.

Çalışmanın sonuçları sıçanlarda tek taraflı nefrektomi ve İ/R ile oluşan böbrek hasarında antiinflamatuvar ve antipoptozis mekanizmaları üzerinden koruyucu etkilere sahip olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Böbrek İ/R, HIF-1 α , IL-1 β , kaspaz-3, naringin, sıçan

SUMMARY

REPUBLIC OF TURKEY
SELCUK UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

Effect of Naringin on Caspase-3, IL-1 β , and HIF-1 α Levels in Experimental Kidney Ischemia-Reperfusion in Rats

Esra Gülsüm DANIŞ

Department of Medical Physiology
MASTER THESIS / KONYA-2022

Microvascular dysfunction develops in tissues after ischemia-reperfusion (I/R). The aim of the current study was to determine the effect of naringin supplementation on kidney caspase-3, IL-1 β and HIF-1 α levels and kidney histology in rats undergoing unilateral nephrectomy and kidney-ischemia reperfusion.

The study was carried out on 8-12 weeks old 40 Wistar type male rats obtained from Selçuk University Experimental Animals Research and Application Center and Necmettin Erbakan University Experimental Animals Research and Application Center.

Experimental renal ischemia reperfusion and unilateral nephrectomy were performed under general anesthesia in rats. Experimental groups were formed as follows.

- 1) Control group,
- 2) Sham control + Vehicle group.
- 3) Renal ischemia-reperfusion (Renal I+R) + Vehicle group
- 4) Renal I+R + Naringin (50 mg/kg/day) group (3 days application) group
- 5) Renal I+R + Naringin (100 mg/kg/day) group (3 days application) group.

Nephrectomy in the left kidneys and the ischemia for 45 minutes and reperfusion in the right kidneys followed by 72 hours of reperfusion. Naringin was administered intraperitoneally at the beginning of the reperfusion, 24 hours, and 48 hours later. At the end of the experiments, first of all, blood was taken from the heart in animals under general anesthesia, and then the animals were killed by cervical dislocation and kidney tissue samples were taken. Tissues were evaluated for caspase-3, IL-1 β and HIF-1 α as well as histologically.

As a result of ischemia in kidney tissues, HIF-1 α decreased, while caspase-3, IL-1 β increased. I/R also caused damage to the kidney tissue. However, naringin supplementation corrected the deterioration to a certain extent.

The results of the study show that it may have protective effects in kidney damage due to antiinflammatar and antipoptosis mechanisms caused by unilateral nephrectomy and I/R in rats.

Keywords: Caspase-3, HIF-1 α , IL-1 β , kidney I/R, naringin, rat

1.GİRİŞ

1.1. İskemi Reperfüzyon (I/R) Hasarı

İR hasarı akut koroner sendrom (AKS) akut böbrek hasarı (ABH) dolaşımsal ve vasküler bozukluklarla karakterize birçok sorunun bir arada bulunduğu bir durumdur. Organ transplantasyonlarından ya da çeşitli cerrahi prosedürlerden sonra da meydana gelebilir. İR hücrede ATP seviyelerinde azalma, hücre içi ve mitokondriyal kalsiyum seviyelerinde artma, hücre iyon ve pH seviyesinde değişiklikler, endoplazmik retikulum stresi, reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumu gibi birçok metabolik süreçlerle sonuçlanabilir (Giaccia ve ark 2004, Giordano 2005, Devarajan 2006, Kalogeris ve ark 2016).

İR hasarının patofizyolojisi kapsamlı ve karmaşıktır. İskemide apoptoz, inflamasyon, nekroptoz, mitofaji, oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon ve sinyal yollarının hasarı da söz konusudur (Kalogeris ve ark 2016). İskemi sırasında oksijen kaynağında azalma, aerobik metabolizmadan aneorobik metabolizmaya geçiş sonucunda ATP üretim hızı düşer ve hücrede asidoza neden olan laktat birikmesine neden olur (Eltzschig ve ark 2011). Na^+/K^+ ATPazlar, Na^+/H^+ ve Ca^{2+} -ATPaz pompaları fonksiyonunu yerine getiremez ve bunun sonucunda hiper-ozmolalite, hücre zarları boyunca su taşınmasında bir artış ve hücre sel şişme ile sodyum, hidrojen ve kalsiyum sitoplazmada toplanır (Wu ve ark 2018).

Reperfüzyon sırasında aerobik ATP üretimi için gerekli oksijen ve diğer moleküller organa ulaşır. Hücrede dolaşımda olan H^+ sayesinde hücre pH düzeyi normale döner ancak reperfüzyonun kendisi de hücrede hasar oluşturabilir. Bu ilk defa koroner ligasyondan sonra kalpte reperfüzyonun nekroza yol açtığında durumda görülmüştür (Jennings 1960). Reperfüzyon hasarı iskemi sırasında meydana gelmeyen, dokuya kan akışı sağlandıktan sonra meydana gelen bir olaydır. Hasar tamamen ortadan kalkabilir ya da azaltılabilir (Özden 2019).

Reperfüzyon hasarında oksijenin hızlı artışı ve pH sistein proteazları ve apoptotik yolu aktive ederek sitozolik kalsiyum miktarını artırabilir. Aşırı kalsiyum yüklenmesi de sitokrom C, süksinat, DNA gibi apoptoz ve nekroz yoluyla hücre ölümünü başlatan hasarla ilişkili molekülün (DAMP) salınımına izin veren mitokondriyal geçiş gözeneklerinin (mPTP) açılmasını uyarır (Krysko ve ark 2011, Mills ve ark 2017).

Bu mekanizmaların yanında İ/R hasarı, hasarlı doku ve organlarda epigenetik değişikliklere neden olabilir. Epigenetik değişiklikler, DNA dizilimini değiştirmeden protein komplekslerinin çeşitli özellikleri aracılığı ile gende meydana gelen değişikliklerdir (Khan ve La Thangue 2012). Bunlar, asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, sumilasyon, ubikuitinasyon, karbonilasyon ve glikozilasyonu ile DNA metilasyonu gibi çeşitli post-translasyonel modifikasyonlardır (Nightingale ve ark 2006, Bolden ve ark 2006). I/R' nin tetiklediği epigenetik değişikliklerin anlaşılması gelecekte klinik olarak ilerlemelere katkı sağlayacaktır (Tang ve Zhuang 2019).

Böbrek naklinde klinik olarak ilerleme olmasına rağmen nakil sonrasında bazı hastalarda akut komplikasyonlar meydana gelebilmektedir. Bunların başında gecikmiş greft fonsiyonunun (DGF) ana nedenleri arasında I/R hasarı gelir. DGF, hastanede uzun süreli yatış ve bunun sonucunda ciddi komplikasyonlar ile ciddi sosyal ve ekonomik etkiye sahiptir. I/R hasarı sırasında, oksidatif stres, demir birikimi ve aşırı lipid peroksidasyonu ile karakterize hücre ölümü olan ferroptoz ve hasarlı mitokondrinin otofaji tarafından seçici bir şekilde bozulması olan mitofaji dahil olmak üzere birçok yolu aktive etmede önemli bir rol oynar. Ferroptoz böbrek hasarına neden olurken, mitofaji, reaktif oksijen türlerinin fonksiyonunu kaybetmiş mitokondriden salınımını azaltarak koruyucu bir role sahip olabilir (Granata ve ark 2022).

1.2. Renal İskemi Reperfüzyon Hasarı

Böbrek, özel doku işlevi ve yapısı nedeniyle IRI'ye duyarlı organlardan biridir. Şu anda renal iskemi-reperfüzyon hasarının tedavisi için spesifik ilaçlar bulunmamaktadır. Renal iskemi-reperfüzyon hasarının patogenezinde yer alan birçok sinyal yolu vardır. Genel olarak Ca²⁺ aşırı yüklenmesinin, serbest oksijen radikal salgılanmasının, hücre adezyon molekül aktivasyonunun, kemokin salınımının, lökosit etkileşiminin ve diğer etkileşimlerin doku iltihabına, nekroza, apoptoza ve nihayetinde organ yetmezliğine yol açtığına inanılmaktadır (Kalyanaraman 2013, Shen ve ark 2013, Wang ve ark 2013).

Klinik olarak renal IRI sıklıkla böbrek transplantasyonu, parsiyel nefrektomi ve kalp cerrahisi sürecinde ortaya çıkar. İkinci olarak akut böbrek hasarının ana nedenidir ve mortalite oranı hastanede yatan hastaların %20'sini oluşturmaktadır (Lafrance ve Miller 2013). Bu nedenle renal IRI'yi etkin bir şekilde önlemek ve mortaliteyi azaltmak önemli bir klinik hedef haline gelmiştir. Kısacası, iskemik faz,

glomerüllerin kapiller endotel hücrelerinin disfonksiyonuna ve renal tübüler epitel hücrelerinin nekrozuna neden olur. Daha sonra reperfüzyon fazı, çok miktarda reaktif oksijen türlerinin salınımı ile farklı enzimleri aktive ederek hasarı şiddetlendirir ve her iki fazda da güçlü bir inflamatuvar cevap söz konusudur (Kinsey ve ark 2008). Ek olarak hem doğal hem de adaptif immün yanıtlar, farklı hücre ölümü programlarının yanında IRI' yı da içerir (Malek ve Nematbakhsh 2015).

Renal IR birçok sinyal yolu ile düzenlenir. Renal tübüler epitel hücreleri (TEH), IRI sürecinde önemli bir rol oynar. Onlar IRI'nin uygulayıcısıdır (Smith ve ark 2019). Renal tübüler epitel hücrelerinde IRI ile ilgili üç anahtar sinyal faktörü tanımlanmıştır, bunlar toll benzeri reseptörler (TLR'ler), sfingosin-1-fosfat (S1P) reseptörleri ve hipoksi ile indüklenen faktörlerdir (HIF'ler) (Koch ve ark 2013, Akhtar ve ark 2014, Wu ve Chadban 2014). TEH sinyal yolunun önemli hücre içi ve hücreler arası etkileri vardır, bu da onu IRI tedavisi için güçlü bir etken yapabilir (Yan ve ark 2021).

8 haftalık erkek Sprague Dawley ratlarının kullanıldığı bir çalışmada eksojen sperminin renal iskemi reperfüzyon üzerindeki koruyucu etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada her grupta 5 olmak üzere toplamda 35 hayvan kullanılmıştır. Renal iskemi reperfüzyondan 30 dk önce ve 3 gün sonra sıçanların kuyruk damarlarına farklı dozlarda (2 mL/kg vücut ağırlığı) spermin enjekte edilmiştir. 200 µM'nin altındaki spermin dozlarında sıçanlarda renal iskemi reperfüzyon hasarını azalttığı gözlemlenmiştir. Araştırmanın bulgularına göre sperminin Akt/mTOR/HIF-1 alfa/BNIP3 yolu ile iskemi reperfüzyon hasarını hafiflettiği sonucuna varılmıştır (Yan ve ark 2021).

30 vahşi tip C57BL/6 erkek farelerin (10 haftalık, 22-24 g) kullanıldığı bir çalışmada ise izoküresinin (İQ) renal iskemi reperfüzyon (RIRI) hasarı üzerinde etkileri araştırılmıştır. Renal iskemi reperfüzyonu başlatmak için sağ böbreğin çıkarılmasından sonra sol renal pedikül 30 dakikalık klemplenmiş ve ardından 24 saatlik reperfüzyon gerçekleşmiştir. 30 fare rastgele olarak sham grubu, RIRI grubu ve IQ ön tedavisi + RIRI grubu olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. IQ ön tedavisi + RIRI grubundaki farelere intraperitoneal olarak IQ (20 mg/kg) enjekte edilmiştir. Böbrek fonksiyonunu değerlendirmek için serum kreatinin ve kan üre nitrojeni (BUN) kullanılmıştır. RIRI'den sonra BUN, kreatinin, TNF-a, IL-6, malondialdehit ve Bax önemli ölçüde artmış ve süperoksit dismutaz seviyeleri ve Bcl-2/Bax oranı ve Bcl-2

ekspresyonu belirgin şekilde azalmıştır. IQ tedavisi ise bu değişiklikleri tersine çevirmiştir. Sonuç olarak IQ'nun RIRI üzerinde antiapoptotik ve antiinflamuar gibi koruyucu etkilere sahip olabileceği gösterilmiş ve bu yolla da RIRI'yı hafiflettiği bulunmuştur (Liang ve ark 2020).

9-10 haftalık farelerin kullanıldığı bir başka çalışmada da Munc18-1-etkileşimli protein 3 (Mint3)'ün HIF 1 ve NF-kB yoluyla iskemi reperfüzyon üzerindeki etkisi açıklanmaya çalışılmıştır. Munc18-1-etkileşimli protein 3 (Mint3) HIF'leri aktive eden bir moleküldür. Mint3-nakavt ve yavru vahşi tip farelerde tek taraflı iskemi-reperfüzyon hasarından sonra böbrek fibroza tabi tutulmuştur. İskemi süresi 23 dakika ve böbrekler iskemi-reperfüzyondan 24 saat ve 7 gün sonra alınmıştır. Sonuç olarak Mint-3'ün yıkımı tübüler epitel hücrelerde (TEC) apoptozu artırarak tubulointerstisyel fibrozu şiddetlendirmiştir. Mint-3'ün bu etkilerinin HIF yolundan bağımsız olduğu ve bu etkiye NF-kB anti-apoptotik fonksiyonun aracılık ettiği tespit edilmiştir (Nasu ve ark 2019).

1.3. Renal İskemi Reperfüzyonunda Antioksidanlar

Canlılığın devamı için homeostaz olmazsa olmazdır. Serbest radikaller hücreler için toksik bir metabolit olmasına rağmen antioksidanlar serbest radikallerin etkilerini yıkmaya çalışırlar. Antioksidanlar hücrede bıraktığı etkiye göre sınıflandırılabilir. Örneğin endojen-eksojen, doğal-yapay, direkt-indirekt. Endojen antioksidanlara örnek olarak glutatyon peroksidaz, katalaz, glutatyon redüktaz, süperoksit dismutaz, glutatyon verilebilir. Eksojen antioksidanlar ise beta karoten (vitamin A), folik asit (vitamin B9), askorbik asit (vitamin C) gibi maddelerdir (Erol 2020).

Azalmış doku ve organ fonksiyonu ile reaktif oksijen türlerinin (ROT) neden olduğu oksidatif stres birbirleriyle yakından ilişkilidir. Hücre içi redoks homeostazı, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon (GSH) ve katalaz (CAT) gibi antioksidanlar tarafından ROT üretimi ve ROT süpürme arasındaki dengeye bağlıdır. Bu dengedeki bozukluklar hücrelere zarar verir. Aşırı ROT üretimi, DNA, lipidler ve proteinlerde oksidatif hasara neden olur ve çoklu doymamış yağ asidi kalıntılarının peroksidasyonunun bir ürünü olan malondialdehit (MDA) gibi oksidatif stresin yan ürünleri aynı anda birikir (Davalli ve ark 2016, Feng ve ark 2017). ROT ve

oksidatif stres, başta nükleer faktör kappa beta (NF- κ B) yolunu, mitojenle aktive olan protein kinaz yolunu ve fosfatidilinositol 3-kinaz yolunu düzenleyerek çeşitli kemik ve kas hastalıklarında patojenik etkiler gösterir (Morgan ve Liu 2011, Davalli ve ark 2016, Deng ve ark 2019, Min ve ark 2019, Schröder 2019).

Normal fizyolojik koşullar altında, vücut az miktarda reaktif oksijen türü (ROT) üretebilir (Pi ve ark 2010). Serbest radikal süpürücü enzimler ve antioksidanlar, transkripsiyon faktörlerini aktive ederek, fizyolojik aktif maddeleri ve inflamatuvar bağışıklığı düzenleyerek ve fizyolojik önemi olan hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını teşvik ederek oksijen metabolizmasının dengesini korur. Ancak, ROT ile reaktif nitrojen türleri (RNT) seviyeleri ve antioksidan savunma sistemi arasındaki denge sağlanamadığında oksidatif stres ortaya çıkar (Chandel ve ark 2000, Zhang ve ark 2011).

ROT, esas olarak süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit dahil olmak üzere, in vivo oksidatif stresi başlatan ana elemandır. Hücrelerde, mitokondriyal elektron taşıma zinciri ve sitokrom P450 ailesi tarafından çok sayıda ROT üretilir ve ksantin oksidoredüktaz, indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit fosfat oksidaz (NOX), nitrik oksit sentaz ve diğer katalitik enzimler ROT oluşumunu büyük ölçüde etkiler (Sedeek ve ark 2013). RNT; NO, nitrojen oksijen anyonu, nitrozotiyoller ve peroksinitrit dahil olmak üzere NO'nun ROT ile reaksiyonu ile üretilen nitrik oksit (NO-) merkezli türevlerin bir sınıfıdır. Aşırı ROT ve RNT, hücre içi lipidler, nükleik asitler ve proteinlerle reaksiyona girerek lipid peroksidasyonuna, DNA oksidatif hasarına ve hücre içi protein denatürasyonuna yol açarak hücre yapısı ve fonksiyona zarar verebilir (Martinez ve ark 2017). Oksidanlar ayrıca hücre içi sinyal yollarını ve hatta gen ekspresyonunu değiştirmek için sinyal molekülleri olarak da hareket edebilir (Ha ve ark 2002). Ek olarak, oksidatif modifikasyon anormal hücre büyümesini, inflamasyonu ve diğer fizyolojik süreçleri teşvik edebilir (Barnes ve Gorin 2011, Ray ve ark 2012).

Yapılan bir çalışmada serebral iskemide, iskemi uygulanan gruplarda A vitamini verilen sıçanlarda SOD'un değerinin yükseldiği, vitaminin dozu arttıkça CAT seviyesinin arttığı ve MDA miktarının azaldığı görülmüştür (Akbaş 2020).

Renal iskemide iskemi uygulanan gruplarda MDA düzeyinin arttığı, SOD ve CAT düzeyinin azaldığı da rapor edilmiştir. A vitamininin ise bu değerleri normale yakın bir değere çevirip iskemi reperfüzyon hasarını hafiflettiği belirlenmiştir (Özden 2019).

Serbest radikallerin miktarı çevresel etkilere bağılı olarak da artabilir. Doğal olarak hücrede mitokondrial aktivite, hücre bölünmesi gibi yaşamsal faaliyetlerin kontrolünü sağlarlar. Fakat bir yandan da oksidatif stres durumunda hücrenin yapısal elemanlarında geri dönüşü olmayan hasarlar meydana getirebilirler (Erol 2020).

1.4. Renal İskemi Reperfüzyon Hasarı ve HIF-1 α

O₂ homeostazının korunmasında rol oynayan kritik nükleer transkripsiyon faktörleri olan hipoksi ile indüklenebilir faktörler (HIF'ler) ilk olarak 1992 yılında Semenza tarafından keşfedilmiş ve son yıllarda hipoksiye hücre adaptasyondaki önemli rolleri nedeniyle yoğun ilgi görmüştür (Semenza 2004, Choudhry ve Harris 2018). α -alt birimlerinin farklılığına dayanarak, HIF'ler HIF-1, HIF-2 ve HIF-3 olmak üzere üç alt tipe ayrılır. HIF-1 ve HIF-2'nin işlevi şu anda yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Artan bir kanıt, böbrek hasarı sırasında HIF-1'in sadece hipoksi adaptasyonuna aracılık etmekle kalmayıp, aynı zamanda profibrotik değişikliklere katılan inflamasyon, epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) ve hücre dışı matriks (ECM) birikimi ile ilişkili olduğunu bulmaktadır (Agarwal ve Nick 2000, Warnecke ve ark 2004, Schietke ve ark 2010, Moore ve Bellomo 2011). Oksidatif stresin de bu süreçte önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. HIF-2 α , eritropoietin üretiminde baskın bir rol oynar (Higgins ve ark 2008, Zhu ve ark 2020, Hafizi ve ark 2021). Schietke ve ark (2012) ayrıca farelerde distal tübüler hücrelerde HIF-2 α 'nın yapısal transgenik aşırı ekspresyonunun renal fibrozis ile sonuçlandığını tespit etmişlerdir. Ayrıca, yakın tarihli bir çalışma, SIRT1'in HIF-2 α 'yı baskılayarak renal fibrozu hafifletebileceğini göstermiştir. HIF'lerin etkileri hücre tipine ve bağlanmalarıyla bağılı olabilir. HIF-2 α ayrıca renal fibrozis çalışması için bir adaylıkta oluşturabilir (Li ve ark 2021, Pan ve ark 2021). Bununla birlikte, HIF-3 daha az bilinmektedir. Diğer çalışmalar, HIF-3 α 'nın HIF-1'in hedef geni olarak hareket edebileceğini ve HIF-1 ve HIF-2'nin aktivitesini negatif olarak düzenleyebileceğini göstermiştir (Tanaka ve ark 2009).

HIF-1, temel bir heterodimerik sarmal-döngü-sarmal transkripsiyon faktörüdür. Hipoksi, fizyolojik HIF-1 ekspresyonunun ana düzenleme faktörüdür. Ayrıca, HIF-1 α aşırı aktivasyonunun diğer bazı mekanizmalar tarafından da uyandırılabilmesine dikkat etmek önemlidir (Wang ve ark 2011, 2014).

Bir transkripsiyon faktörü olarak, HIF-1 aktivasyonu eritropoietin, vasküler endotel büyüme faktörü, endotelin-1, glukoz taşıyıcıları ve eritropoezi, anjiyogenezi ve enerji metabolizmasını etkileyen diğer bazı hedef genlerin ekspresyonunu düzenleyebilir. Bu sırada hipoksiye ilk adaptasyon sürecini yönetir, doku oksijenasyonunu ve hücre sağkalımını iyileştirir ve bir dereceye kadar bazı zararlı etkileri telafi eder (Agarwal ve Nick 2000, Warnecke ve ark 2004, Moore ve Bellomo 2011). Wang ve ark (2014) HIF-1 α 'nın böbrekte kronik iskeminin neden olduğu aşırı aktivasyonunun, kronik böbrek hasarına aracılık ettiğini gösterdi (Wang ve ark 2014). Kimura ve ark. (2008) ise normal ve VHL nakavt farelerde 5/6 nefrektomi gerçekleştirerek, VHL'si silinmiş farelerin tübüler epitel hücrelerinde HIF-1 ekspresyonunun stabil olduğunu ve interstisyel fibrozisin önemli ölçüde şiddetlendiğini tespit etmişlerdir (Kimura ve ark 2008). Baumann ve ark. (2016) podosit HIF-1 α geninin nakavt edilmesinin glomerüler tip I kollajen birikimini ve glomerüloskleroza önleyebileceğini bulmuştur (Baumann ve ark 2016).

Bu nedenle, HIF, böbrek hasarı sırasında fibrozisin oluşumunu ve gelişimini teşvik ediyor gibi görünmektedir. Genel olarak renal fibroz, inflamasyon, miyofibroblast transformasyonu ve hücre dışı matriks birikimi ile karakterizedir (Thiery ve ark 2009, Liu 2011, Mansour ve ark 2017). Birçok araştırma, HIF-1'in inflamasyonu, EMT'yi, kollajen birikimini ve ECM sertleşmesini tetikleyerek renal fibrozise aracılık etmek için hücre dışı matriksin yeniden şekillenmesini destekleyebileceğini de göstermiştir (Louis ve Hertig 2015, Liu ve ark 2017, Shu ve ark 2019).

HIF-1 tarafından indüklenen apoptoz, IL-1 β ve TNF- α gibi inflamatuvar mediatörleri serbest bırakabilir ve inflamasyonu ve fibrozisi tetiklemek için lokal renal mikro-ortamı değiştirebilir (Scholz ve ark 2013, Sandoel ve Hengartner 2014, Liu ve ark 2019). Dahası, inflamatuvar sitokinlerin HIF-1 α 'yı MAPKp38 ve PI-3K/AKT fosforilasyonu yoluyla yukarı regüle edebildikleri gösterilmiştir (Westra ve ark 2007).

HIF-1 alfa hipoksi, demir şelatörleri veya iki değerlikli katyonlar tarafından stabilize edilir. Normal şartlar altında, HIF-1 alfa demir ve oksijene bağımlı bir enzim ailesi olan prolil hidroksilazlar (PHD'ler) tarafından hidroksillenir (Jewell ve ark 2001). Hidroksillenmiş form, bir HIF-1 alfa/pVHL/ubiquitin ligaz kompleksinin parçası olarak von Hippel-Lindau tümör baskılayıcı proteine (pVHL) bağlanır. Kompleks oluşumu, HIF-1 alfa'nın her yerde bulunmasına ve proteozomal bozulmasına yol açar ve bu süreç HIF-1 alfa konsantrasyonlarını düşük tutar (Ivan ve

ark 2001). Hipoksik durumlarda, prolil hidroksilasyonu baskılanır ve HIF alfa-alt birimi, proteazomal yıkımdan kaçarak çekirdekte translokasyona ve HIF-1 beta ile dimerizasyona izin verir (Jaakkola ve ark 2001). Çekirdek içinde, HIF-1 alfa veya HIF-1 beta ile HIF-2 alfa dimerleri, onkogeneze olduğu kadar normal bir fizyolojik yanıt olarak hücrenin hayatta kalması için adaptasyonda yer alan 100'den fazla gen ürününün ekspresyonunu düzenler (Haase 2006). HIF aktivatörlerinin onkojenik potansiyeline ilişkin bir endişe, böbrek kanserli hastalarda parsiyel nefrektomi sırasında kullanımlarını engelleyebilir. Güven verici bir şekilde, erken in vivo çalışmalar, bu tür ajanların kanserojen potansiyelinin, kanser oranlarında herhangi bir artış olmaksızın teorik kaldığını göstermektedir (Becker ve Jones 2018, Yang ve ark 2018).

Kunming farelerinin kullanıldığı bir çalışmada I/R sonrası HIF-1 α /PROX-1/LVYE-1 eksenini dinamik değişiklikleri gözlemlenmeye çalışılmış ve I/R sonrası tedavi aşamasında böbreğin bazı dokularında aktive olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada fareler I/R'ye maruz bırakılmış ve tedavi aşamasında değişiklikler immünofloresan çift boyama ve konfokal analiz ile tespit edilmiştir. Işık mikroskopunda IHC boyamasıyla saptanan HIF-1 α 'nın böbreğin proksimal tübüllerinde eksprese olduğu ve I/R den sonra PROX-1 ile birlikte bu bölgelerde lokalize olduğu bulunmuştur. PROX-1/LVYE-1'in ise endotel hücrelerinin glomerulusunda lokalize olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak HIF-1 α ekspresyonunun I/R sonrası tübüler hücre ölümünde koruyucu bir role sahip olduğu bulunmuştur (Meng 2018).

Hem wistar ratlarının hem de Tgr 5 geni silinmiş farelerin kullanıldığı bir çalışmada TGR5 geni aktivasyonunun I/R sonrası AQP'lerin azalmış gen ekspresyonunu önleyip önlemediğini araştırılmıştır. TGR5 ile uyumlu LCA (litokolik asit) tedavisi IR den sonra sıçanlarda poliüriyi azaltmıştır. Ayrıca LCA'nın sıçanlarda AQP2'yi azalttığı, NF kb p65 ve IL-1 β 'nin azalmış protein miktarı ile ilişkili HIF 1 α protein ekspresyonunu yukarı regüle ettiği bulunmuştur. Fare gruplarında ise IR den sonra Tgr5 nakavt farelerinin vahşi tip fareler kıyasla daha fazla AQP2 ve HIF-1 α protein miktarını azalttığı, Nf kb p65 ve IL-1 β protein miktarını artırdığı bulunmuştur. LCA ve TGR5 aktivasyonunun HIF-1 α sinyal yolunu aktive ederek IR hasarı olan hayvanlarda AQP2 seviyesini azalttığı gösterilmiştir (Han ve ark 2021).

Wistar ratı kullanılarak yapılan bir çalışmada EGLN inhibitörleri olan sodyum (S)-2-hidroksiglutarat [(S)-2HG] ve süksinik asidin (SA) Wistar sıçanlarında renal IR

hasarına karşı koruyucu etkisinin olup olmadığı değerlendirilmiştir. Doku HIF-1 α seviyesi sham grubuna kıyasla IR grubunda daha da artmıştır. SA'nın koruyucu bir rol üstlendiği gözlenmemiştir ama yüksek dozlarda IR'yi artırdığı bulunmuştur (Cienfuegos-Pecina ve ark 2020).

1.5. Apoptoz ve Kaspaz 3

Apoptozun doku gelişimi, bağışıklık tepkileri (Danial ve Korsmeyer 2004, Sagulenko ve ark 2016) ve homeostaz (Bulut ve Özdemir 2007) sırasında canlı hücrelerde meydana gelen önemli bir hayati biyolojik süreç olduğu on yıldan fazla bilinmektedir. Anti-apoptotik mediatörler, kanser (Pu ve ark 2017) ve otoimmünitede (Wang ve ark 2015) olduğu gibi patolojik durumlarda ortadan kalkabilir ya da felçte (Akpan 2013), nörodejenerasyonda (Wang ve ark 2015), retinal hücre ölümünde (Singh ve Kumar 2016), romatoid artrit (Malysheva ve ark 2016), miyokardiyal ve karaciğer iskemisinde (Sun ve ark 2017, Woolbright ve ark 2017), sepsis (Aziz ve ark 2014), osteoartrit (OA) (Hwang ve Kim 2015) ve astım (Qi ve ark 2017) gibi inflamatuvar hastalıklarda şiddetlenebilir.

Apoptoz, apoptotik kaspazların aktivasyonunun aracılık ettiği programlanmış hücre ölümünün (PCD) inflamatuvar olmayan bir şekli olup ya intrinsik ya da ekstrinsik bir yolla meydana gelebilir (Rogers ve ark 2017).

İntrinsik yol mitokondriyal hasar ile aktive edilir. Daha sonra mitokondriden sitoplazmaya salınan sitokrom c, apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1) ile birleşir ve bir kaspaz-9 öncüsü, kaspaz-9'u aktive eden bir apoptozom oluşturur (Shakeri ve ark 2017). Aktive edilmiş kaspaz-9 daha sonra farklı hücresel endojen substratları parçalayarak hücre ölümüne yol açan prokaspaz 3 / 7'yi böler ve aktive eder.

Ekstrinsik yol, tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ölüm reseptörlerine bağlanması gibi hücre yüzeyi ölüm reseptörleri sinyalleri tarafından aktive edilir, daha sonra bu reseptörlerin oligomerizasyonu apoptoza aracılık etmek için pro-kaspaz 3'ü doğrudan bölen kaspaz-8'in alımına ve aktivasyonuna yol açar (Sun ve ark 2017, Ahmed ve ark 2018, Rogers ve ark 2019). Ek olarak, kaspaz-8, Bcl-2 (B hücreli lenfoma 2) ailesinin bir üyesi olan Bid'yi de parçalayabilir ve mitokondriye göç eden,

yüzeyinde Bax / Bak gözenekleri oluşturan, sitokrom c'yi serbest bırakan ve apoptozu aktive eden kesik bir segment tBid üretebilir. Özetle, aktive edilmiş kaspaz-3, endojen ve eksojen apoptotik yollar tarafından aktive edilen kaspaz kaskadlarının sonunda bulunur ve apoptoz için anahtar bir protein olarak kabul edilir (Kayacan ve ark 2018, Nagata 2018).

Kaspaz ailesi, *C. elegans* hücre ölümü anormal-3 geni (CED-3) ile yüksek oranda homolog olan bir protein ailesidir (Fan ve ark 2005). Kaspazlar başlatıcı kaspazlara (kaspaz-2, -8, -9, -10), uygulayıcı kaspazlara (kaspaz-3, -6, -7) ve enflamatuar kaspazlara (kaspaz-1, -4, -5, -11) ayrılabilir (McIlwain ve ark 2015). Kaspaz aktivitesinin kaybı, tümör ilerlemesinin önemli bir nedenidir. Kaspaz ailesinin bir üyesi olarak, kaspaz-3, Fernandez-Alnemri ve arkadaşları tarafından 1994'te insan Jurkat T lenfositlerinden klonlandı. Başlangıçta 32kD sisteinil aspartata özgü bir proteinazı kodladığı için sistein proteaz proteini, 32kD (CPP32) olarak adlandırılmıştır (Fernandes-Alnemri ve ark 1994). Kaspaz-3, sitozolde inaktif bir proenzim olarak bulunur ve aspartik asit kalıntılarını takiben peptit bağına spesifik olarak parçalamak için C-terminal sistein kalıntısını katalize ederek işlevleri yerine getirir (Yuan ve ark 1993).

Kaspaz ailesinin diğer üyeleriyle karşılaştırıldığında, kaspaz-3 kaspaz kaskadının sonundadır ve apoptozda hem intrinsik hem de ekstrinsik ölüm yolları tarafından aktive edilir. Son yıllarda, kaspaz-3'ün başka bir etkisi bulunmuş olup bu etki, GSDME'nin yukarı akışında yer alması ve piroptozda inflammatuar bir rol oynamasıdır (Wang ve ark 2017). Kaspaz-3'ün diğerlerine kıyasla tümör hücresi ölüm mekanizması üzerinde birden fazla etkiye sahip olduğu sonucuna varılabilir.

Kaspaz-3'ün aktivasyonu, plazma zarının kabarmasına, kromatin yoğunlaşmasına, DNA bölünmesine ve plazma zarının hücre dışı tarafında fosfatidilserinin açığa çıkmasına neden olur (Choudhary ve ark 2015). Kanser tedavisinde birçok kemoterapötik ajanın sitotoksik etkilerini apoptoz indüksiyonu yoluyla tümör hücreleri üzerinde gösterdiği düşünülmektedir. Bununla birlikte, inhibitörlerin neden olduğu kaspaz aktivitesinin olmaması ve hücre sinyal yollarındaki kaspazların değişiklik ve mutasyonları apoptozis oluşumunu engelleyebilir (Ghavami ve ark 2009, Mohamed ve ark 2017). Ayrıca, hücre bölünmesi ve ölüm arasındaki dengesizlik, memeli tümörlerinin promotörlerini ve apoptotik ölüm prosedürlerini yürütme kabiliyetini kaybetmesine neden olacak ve buda, sonuçta tümörlerin sitotoksik ilaçlara dirençli olmasına neden olacaktır (Jan ve Chaudhry 2019). Son

zamanlarda yapılan çalışmalar, ortaya çıkan bir inflamatuvar hücre ölümü modu olarak piroptozun kemoterapinin yan etkilerini ve ilaç direncini daha da azaltma olanağı sağladığını doğrulamıştır (Wang ve ark 2019, Chen ve ark 2020).

Apoptoz sırasında, kaspazlar da dahil olmak üzere birkaç proteolitik enzim ailesi aktive olur. Kaspazlar esas olarak iki sinyal yolu aracılığıyla aktive edilir: i) Eksojen lm reseptörü sinyal yolu ve ii) sırasıyla kaspaz-8 zimojen ve kaspaz-9 zimojeni aktive eden endojen mitokondriyal sinyal yolu. Her iki sinyal yolu da aşağı akış efektör kaspaz-3' aktive ederek apoptoza yol açar (Jan ve Chaudhry 2019). Bu nedenle kaspaz-3, apoptoz sürecindeki bir terminal shear enzimidir. Chatterjee ve arkadaşları (2004) kaspaz inhibitörlerinin renal ABH yanıtını azalttığını bildirmiştir. Aşırı düzeyde reaktif oksijen türleri (ROT), fonksiyonel hücrelerin apoptozunu indükler. ROT, kaspaz-3' aktive etmeyi ve hücre apoptozunu indklemeyi içeren kaspaz kaskadını tetikleyerek doku hasarına neden olur (Xiao ve ark 2013). Ayrıca, renal tübüler epitel hücreleri, nükleer faktör E 2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2)/heme oksijenaz 1 (HO-1) aracılı antioksidatif yanıtı içeren bir antioksidatif savunma sistemine sahiptir (Wu ve ark 2021).

GSDME (Gasdermin D) kaspaz 3 üreten GSDME-N2'nin bölünmesiyle oluşan bir proptotik araçıdır. Bu alışmada GSDME eksikliği olan farelerde ve insan tübüler epitel hücrelerde ABH sırasında GSDME'nin rolü araştırılmıştır. Bu alışmada GSDME'nin bloke edilmesinin ABH'yı ve inflamasyonu azalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca kaspaz 3'n inhibisyonu GSDME-N'in bölünmesini yok ederek sisplatin kaynaklı piroptoz ve böbrek hasarını hafiflettiği de bulunmuştur. GSDME'nin bloke edilmesinin kaspaz 3 düzeylerini baskılamak suretiyle renal iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu bir role sahip olabileceği sonucuna varılmıştır (Xia ve ark 2021).

8-12 haftalık erkek C57BL/6 fareleri üzerinde yapılan bir çalışmada iskemi reperfüzyon hasarı kaynaklı bir durumda apoptoz ve inflamasyonun yürütücü bir enzimi olan kaspaz- 3' hedefleyen siRNA'nın (CASP3siRNA) etkileri araştırılmıştır. CASP3siRNA veya NCsiRNA ameliyattan 2 saat önce 0.03 mg/kg BW dozunda kuyruktaki damardan enjekte edilmiştir. CHBP, reperfüzyondan 15 dakika sonra 24 nmol/kg BW'de intraperitoneal boşluktan verilmiştir. Sonuç olarak CHBP (eritropoietin türevli siklik sarmal B yüzey peptidi) ve CASP3siRNA'nın tek olarak tedavide kullanılması aksine birlikte kullanılması aktif kaspaz 3 ekspresyonunu

azaltmış ve böbrek dokusunda daha da koruyucu etkiler gösterebileceği bulunmuştur (Wu ve ark 2020).

60 yetişkin erkek Sprague-Dawley sıçanı üzerinde yapılan bir çalışmada metanolik stevia özütünün ve egzersizin ya da kombine bir şekilde kullanımının sıçanlarda renal iskemi reperfüzyona etkileri araştırılmıştır. Kaspaz 3 ekspresyonu kontrol grubuna kıyasla tedavi edilen gruplarda önemli ölçüde azaldığı ve stevia özünün kaspaz 3 ve apoptozu azalttığı bulunmuştur. Stevia özünün ve egzersizin birlikte kullanımının renal iskemi reperfüzyon hasarında faydalı etkiler gösterebileceği de varsayılmaktadır. Ancak egzersizin stevia özüne göre etkilerinin daha az olduğu düşünülmektedir (Elsaid ve ark 2019).

1.6. Renal İskemi Reperfüzyon ve IL-1 β

IL-1 α ve IL-1 β , şimdiye kadar on bir üyeden oluşan IL-1 ailesinin kurucu üyelerini oluşturur (Garlanda ve Dinarello 2013). Tüm IL-1 ailesi üyeleri, zimojenler olarak ifade edilir ve çoğu, biyolojik olarak aktif olgun formlar elde etmek için proteazomal bölünme gerektirir. Bunlardan pro-IL-1 β ve pro-IL-18, aktive edilmiş inflamazomlar tarafından parçalandıkları için benzersizdir (Awad ve ark 2018). Bu çoklu protein kompleksleri eksojen ve endojen tehlike sinyallerine yanıt olarak toplanır ve biyoaktif IL-1 β ve IL-18 üreten kaspazların aktivasyonunu indükler. IL-1 β , inflamatuvar sinyallere yanıt olarak çok sayıda farklı immün ve immün olmayan hücre tipi tarafından hızla üretilir ve salınır (Dinarello 2014). Bunun aksine, IL-1 α immün olmayan birçok hücre tipinde yapısal olarak eksprese edilir, ancak esas olarak sitozolde kalır veya hücre nekrozu durumunda salınan hücre yüzeyine bağlı kalır (Rider ve ark 2013).

IL-1 β , bağışıklık reaksiyonlarının bir yükselticisi olarak görev yapar (Dinarello 2014). Oldukça uzun bir süredir, IL-1'in, akut inflamasyonları çözmek için doğuştan gelen etkin bir şekilde başlatılması ve adaptif immün yanıtların şekillendirilmesi için gerekli olduğu geniş çapta kabul görmüştür (Garlanda ve Dinarello 2013). Bununla birlikte, IL-1 β 'nin yararlı bir bağışıklık düzenleyici olarak görülmesi, inflamazomların bileşenlerindeki fonksiyon kazanımı mutasyonlarının, otoimmün olarak katkıda bulunan ve otoinflamatuvar hastalıklara neden olan aşırı IL-1 β üretimine yol açtığı bulgusuyla zorlanmıştır (Dinarello 2014, Cordero ve ark 2018). Ek olarak, kronik

enflamasyon durumunda, sürekli IL-1 β , hem tümör indüksiyonunu hem de daha sonra farklı mekanizmalarla tümör yayılımını destekleyebilir (Garlanda ve Dinarello 2013)

Renal IRI'yi tedavi etmek için önemli bir hedef, toll benzeri reseptörler (TLR'ler), özellikle IRI'nin oluşumundaki temel rolleri için kapsamlı bir şekilde çalışılmış olan TLR2 ve TLR4'tür (Kezic ve ark 2017). Bu çalışmada, *Rhodobacter sphaeroides*'ten (LPS-RS) elde edilen lipopolisakkarit tarafından antagonize edici toll benzeri reseptörlerin (TLR'ler) etkilerinin iskemi/reperfüzyon hasarı (IRI) üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Mevcut araştırmanın sonuçları, LPS-RS'nin IRI grubuna kıyasla interlökin-1 β , interlökin-6, tümör nekroz faktörü α ve 8-izoprostan düzeylerini azalttığını gösterdi. Her iki reseptörün de renal IRI'de aktive olduğu ve nihayetinde interlökin (IL)-1 β , IL-6 ve tümör nekroz faktörü (TNF)- α gibi farklı proinflatuar sitokinlerin salınmasına katıldığı belgelenmiştir (Aal-Aaboda ve ark 2021).

Başka bir çalışmada, p-kumarik asidin (CA) iskemi reperfüzyon (İ/R) hasarı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada tümör nekroz faktörü- ve interlökin-1 β 'nın renal ekspresyonu belirlenmiştir. Araştırmadan elde edilen veriler, p-kumarik asidin Cr, BUN, IL-1 β , TNF- α ve MDA seviyelerini azaltarak ve antioksidan enzim aktivitelerini artırarak böbreği iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Godarzi ve ark 2020).

Wistar sıçanları üzerinde gerçekleştirilen bir araştırma da *Juglans mollis* (JM) metanolik özütü kullanılarak İ/R hasarındaki etkisi araştırılmıştır. İ/R sıçanları, üç proinflatuar sitokin IL-1 β , IL-6 ve TNF- α 'nın yüksek serum düzeylerine sahipken, JM + İ/R sıçanları İ/R sıçanlarına kıyasla, bu üç sitokinin önemli ölçüde daha düşük düzeylerine sahipti. Sonuç olarak JM'nin IR hasarına karşı böbrek dokusu üzerinde yararlı etkiler gösterdiği ve bu etkinin de proinflatuar sitokinlerin (IL-1 β gibi) üretiminde azalma ve oksidatif stres belirteçlerinden kaynaklı olabileceği varsayılmaktadır (Perez-Meseguer ve ark 2019).

Propofolun etkisinin incelendiği bir çalışmada ise sıçanlar, 24 saat boyunca propofol (5 veya 10 mg/kg) ile veya bunlar olmadan İ/R'ye tabi tutulmuştur. Bu çalışmada IR den 24 saat sonra IL-1 β seviyelerinin yükseldiği ancak 5 ve 10 mg/kg propofol ile tedavisi IL-1 β seviyelerinin düştüğü gözlemlenmiştir (Liu ve ark 2021).

1.7. Flavonoidler ve Naringin

Drynariae Rhizoma, Güney Çin'de yaygın olarak dağıtılan yaygın bir bitkidir (Pharmacopoeia 2015). Total Drynariae Rhizoma flavonoidler, ağırlıklı olarak flavonoidleri içeren ve Çin Farmakopesi kalite kontrol standardına dayalı olarak hazırlanan klasik bir Çin bitkisel ilacıdır (Cao ve ark 2017). Total Drynariae Rhizoma flavonoidleri klinikte böbrekleri beslemek, kemikleri güçlendirmek, yaralanmaları iyileştirmek ve ağrıları gidermek için kullanılmıştır (Zhang ve ark 2017). Çalışmalar, Drynariae Rhizoma'dan (TFDR) elde edilen total flavonoidlerin kırık iyileşmesini destekleyebileceğini ve mekanizmanın temel olarak kan dolaşımını iyileştirerek, kan akışı anormalliklerini hafifleterek ve kan pıhtılarını önleyerek tanımlandığını ortaya koymuştur (Liu ve ark 2015). Drynariae Rhizoma, geleneksel Çin tıbbının temel teorisi perspektifinden Alzheimer hastalığının tedavisi ile tutarlı olan, böbreği canlandırmak ve kemikleri güçlendirmek için klasik bir Çin tıbbıdır ve modern farmakoloji, ana bileşeni flavonoidler olan Drynaria fortunei'nin öğrenmeyi ve hafızayı geliştirme işlevine sahip olduğunu göstermektedir (Song ve ark 2016, Wang ve ark 2016).

Naringin, TFDR'de en bol bulunan flavonoidler olarak tüm dokularda geniş bir dağılım gösterir ve az bir miktarı da kan-beyin bariyerini geçer. Diğer dokularla karşılaştırıldığında, sıçanların kalbinde ve beyinde daha az dağılmıştır. Doku-plazma AUC oranı (T/P oranı), ilacın maksimum miktarının bağırsak ve karaciğerde bulunduğunu; bu bulgu, ilaç oral yoldan verildiğinde ve karaciğer ve bağırsakta majör ilk geçiş metabolizmasına sahip olduğunda bekleniyordu (Tsai 2002, Xie ve ark 2005). Ancak yaşlı sıçanlarda daha çok mide, bağırsak ve yumurtalıklara dağılmıştır. Bu sonuç, hipotalamus-hipofiz-yumurtalık eksenini aracılığıyla beyin omurilik sisteminin otonom sinir disfonksiyonunu düzenleyebileceğini ve böylece Alzheimer hastalığında azaltıcı rol oynayabileceğini göstermiştir, ancak daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (Liu ve ark 2018).

Naringenin-7-O-neohesperidoside olarak da bilinen naringin, narenciye meyvelerinde yaygın olarak bulunan bir diyet flavonoid glikozittir (Singh ve ark 2020). Antioksidasyon, anti-inflamasyon ve anti-apoptozisin çoklu biyoaktivitelerini uyguladığı belgelenmiştir (Chen ve ark 2016). Bir dizi prelinik çalışma ve klinik deneme, naringinin nörodejenerasyonu, metabolik sendromu, kardiyovasküler bozuklukları ve solunum hastalıklarını hafifletmedeki faydalarını daha da göstermiştir

(Ahmed ve ark 2019, Raja Kumar ve ark 2019, Heidary Moghaddam ve ark 2020, Zeng ve ark 2020). Aslında, naringin, diyet takviyelerinin üretiminde tipik bir fitofarmasötik olarak giderek daha fazla kullanılmaktadır (Salehi ve ark 2019).

Metabolik ve boşaltım özellikleri, diyet fitokimyasallarının in vivo davranışını ve etki mekanizmasını anlamak için yararlıdır (Cassidy ve Minihane 2017). Olumlu biyoaktiviteleri sayesinde, naringin çok sayıda metabolizma ve boşaltım çalışmasına dahil olmuştur (Xiong ve ark 2014, Orrego-Lagaron ve ark 2015, Joshi ve ark 2018, Bai ve ark 2020). Önceki çalışmalarda, sıçanlarda naringinin absorpsiyonu, doku dağılımı, metabolizması ve boşaltımı detaylı olarak araştırılmıştır (Liu ve ark 2012, Zeng ve ark 2019, Zeng ve ark 2020). Sonuç olarak naringinin kapsamlı bir şekilde naringenine hidrolize olduğu ve sıçanın idrarında ve plazmada gözlemlenemediği bulunmuştur. Naringenin, apigenin, eriodictyol ve hesperetin glukuronidleri ve sülfatları, sıçan idrarında naringinin birincil metabolitleri olarak belirlenmiştir (Zeng ve ark 2019). Naringinin metabolik özellikleri açık olmasına rağmen, önceki çalışmalarda orijinal metabolitlerinin atılımına ilişkin bilginin azlığından dolayı glukuronidaz ve/veya sülfatazdan sonra elde edilen serbest naringin ve naringenin üzerine odaklanmıştır. Gerçekte naringinden üretilen orijinal metabolitler hakkında şu ana kadar az veri olsa da naringin bitki gıdalarında yaygın olarak bulunduğu göz önüne alındığında, çoklu metabolitlerin atılımını izlemek için uygun bir yöntem geliştirmek mümkündür. Ayrıca bu yöntem bize diğer flavonoidlerin atılımı hakkında kaynak sağlayacaktır (Zeng ve ark 2022).

Bir çalışmada 40 Sprague Dawley ratına tek başına ya da kombine bir şekilde naringin ve trimetazidin verilmiş ve baroreseptör duyarlılığı ve NTS (Nukleus Traktus Solitarius) elektriksel aktivitesi gözlemlenmiştir. Sonuç olarak I/R hasarı ile azalmış baroreseptör duyarlılığı ve azalmış NTS elektriksel aktivitesi arasında bir ilişki olduğuna varılmıştır (Amini ve ark 2021).

40 erkek Sprague-Dawley sıçanının kullanıldığı bir çalışmada IR hasarında naringin (NAR), trimetazidin (TMZ) ve bunların kombinasyonunun böbrekte Nrf-2 ekspresyonuna ve miyokardiyal hasar üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada sıçanların böbrek dokuları H/E boyaması kullanılarak incelenmiş ve tübüllerde nekroz ve kanama görülmüştür. Ancak NAR ve TMZ'nin birlikte kullanıldığı tedavide bu belirtiler azalmıştır. Sıçanlarda bu iki ilaç farklı dozlarda [TMZ (5 mg/kg), NAR (100

mg/kg] uygulanarak oksidan ve antioksidan sistem aktiviteleri incelenmiştir. Sonuç olarak NAR, TMZ ya da bunların birlikte tedavisi antioksidan aktive yoluyla IR hasarını takiben böbrek dokusunda Nrf-2 ekspresyonunu azaltabileceği bulunmuştur (Amini ve ark 2019).

1.8. İskemi-Reperfüzyon ve Doku Hasarı

Histolojik görüntülemelerde IR hasarla tübüler hücrelerde ve glomerülde bozulma değişiklikler görülmüştür. İskemi reperfüzyon uygulanan çalışmada ameliyat öncesi ve sonrası plazma kreatinin seviyesi ölçülmüş ve %91 artış bulunmuştur (Nielsen ve ark 2017).

34 fare üzerinde yapılan çalışmada Böbrek korteksi histolojik görüntülemesi yapılan çalışmada hematoksin ve eozin ile yapılan renklendirmede IR grubunun proksimal ve distal tübülünde şişlik, lümeninde çöküntü, intertübüler alanda artış gözlemlenmiş. Periyodik asit-Schiff (PAS) ile boyama yapılan görüntülemelerde proksimal tübül epitelinin fırçamsı kenarlarında önemli düzeyde küçülme gözlemlenmiştir (Chihanga ve ark 2018).

Sham grubunun normal doku, glomerül, proksimal tübül, toplama kanalları görüntülenmiştir. Renal IR hasarı sonucu nekroz, geniş hemoraji, korteks ve medullada sıkışıklık, kortekste glomerülde büzüşme görüntülenmiştir. Naringin veya trimetazin uygulanan gruplarda nekroz, hemoraji, sıkışıklık (kan birikmesi) azalması görüntülenmiştir. Naringin ve trimetazin birlikte uygulanan grupta farklılık daha az düzeyde bulunmuştur (Amini ve ark 2019).

48 yetişkin erkek sıçanın kullanıldığı bir çalışmada ise postoperatif intraperitoneal adezyonları önlemek adına naringinin (NG) koruyucu ve önleyici bir etkiye sahip olup olamayacağı incelenmiştir. Yüksek doz (80mg/kg) NG alan sıçan grubunda intraperitoneal adhezyon oluşumunda belirgin azalmalar olurken aynı zamanda fibroblast oluşumu, kollajen birikimi, oksidatif stres de azalmıştır. Bu araştırmadan elde edilen bulgular naringinin postoperatif intraperitoneal adezyonun önlenmesinde bir potansiyel ilaç olabileceği sonucuna varabiliriz (Shi ve ark 2022).

Sprague Dawley (SD) ratlarının kullanıldığı bir çalışmada naringinin oksidatif stres, apoptoz ve intervertebral disk üzerine etkileri ve mekanizmaları açıklanmaya

alışılmıştır. Düşük konsantrasyonlu (100 mg/kg) ve yüksek konsantrasyonlu (200 mg/kg) naringin tedavisi annulus fibrozusun gerilmesine bağlı apoptozu, oksidatif stresi, IVDD derecesini azaltmış ve antioksidan aktiviteyi baskılamıştır. Naringin IVDD derecesini azaltmasıyla dejeneratif disk hastalığının önleminde terapötik bir ilaç olabileceği sonucuna varılmıştır (Zhang ve ark 2022).

Histolojik bir görüntülemeye IR hasarından sonra böbreklerin proximal tübüllerinde tübüler dilatasyon, fırçamsı kenarın kaybı ve buna bağlı olarak akut tübüler hasar gözlenmiştir (Liu ve ark 2019).

Başka bir çalışmada ise HE boyaması yapılan böbrek dokularında IR grubunda renal interstisyel kanama, inflamatuvar hücrede şişlik, değişen derecelerde ödem ve nekroz, renal proksimal tübüllerde dökülmeler gözlenmiştir (Shan ve ark 2021).

Naringinin sıçanların renal korteksinde üreterin tek taraflı tıkanmasının neden olduğu renal interstisyel fibröz üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada farklı dozlarda naringin (20, 40 ve 80 mg/kg) HE (Hematoksilen ve eozin) boyaması kullanılarak değerlendirilmiş ve tıkanıklık olan grupta tübüllerin dilate, atrofiye ve nekroza uğradığı görülmüştür. Naringin ile tedavi edilen grupta renal tübüllerin dilate olması veya atrofisi düzelmiştir (Wang ve ark 2021).

Naringinin kardiyak İ/R üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada TUNEL pozitif hücre sayısının, parçalı kaspaz-3 seviyelerinin arttığı ve HE boyamasında İR grubunun bulunduğu dokularda nekroz ve kanamanın olduğu ancak naringin ile tedaviden sonra bu etkilerin azaldığı görülmüştür (Li ve ark 2021).

Mevcut literatürler dikkate alınarak bu çalışmada sıçanlarda tek taraflı nefrektomi ve İ/R uygulamasının HIF-1 α , IL1 β ve kaspaz 3 düzeyleri ile böbrek histoloji üzerine olan etkisi araştırılmıştır.

2.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma için Selçuk Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi ve Necmettin Erbakan Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen ve 2021-51 sayılı Etik Kurul Onayı alınmış olan çalışmadaki 8-12 haftalık Wistar tipi 40 erkek sıçanın böbrek dokuları kullanılmıştır (Etik Kurul No: 2022-2). Ratlar çalışmadan 1 hafta öncesinden başlayarak standart bir diyetle ve istenildiği kadar su ile beslenmiştir. Ortam koşullarının 12/12 saatlik aydınlık karanlık döngüsü ve $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ortalama sıcaklık değerleri sağlanmıştır. Ratlarda deneysel böbrek iskemi reperfüzyonu genel anestezi altında ve tek taraflı nefrektomi sonrasında oluşturulmuştur. Deney grupları şu şekilde oluşturulmuştur:

1-Kontrol Grubu (n=6): Kontrol grubundaki ratlara cerrahi hiçbir işlem uygulanmadı.

2-Sham Grubu (n=7): Sol böbrek nefrektomi yapıldı. Sağ böbrek lokalize edildi ve serum çözeltisi intraperitoneal olarak uygulandı. 24 saat sonrasında ve 48 saat sonrasında da naringin çözücüsü %10 DMSO, serum fizyolojik 1 ml intraperitoneal olarak uygulandı.

3-Renal İskemi-Reperfüzyon Grubu (n=9): Sol böbreklerde nefrektomi sonrasında sağ böbrekte 45 dakikalık iskemi sonrasında 72 saatlik reperfüzyon uygulandı. Reperfüzyonun hemen başında, 24 saat sonrasında ve 48 saat sonrasında naringin çözücüsü %10 DMSO, serum fizyolojik 1 ml intraperitoneal olarak uygulandı.

4-Renal İskemi-Reperfüzyon + Naringin (50 mg/kg/gün) Grubu (n=9): Sol böbreklerde nefrektomi sonrasında sağ böbrekte 45 dakikalık iskemi sonrasında 72 saatlik reperfüzyon uygulandı. Naringin (50 mg/kg/gün) reperfüzyonun hemen başında, 24 saat sonrasında ve 48 saat sonrasında intraperitoneal olarak uygulandı.

5- Renal İskemi-Reperfüzyon + Naringin (100 mg/kg/gün) Grubu (n=9): Sol böbreklerde nefrektomi sonrasında sağ böbrekte 45 dakikalık iskemi sonrasında 72 saatlik reperfüzyon uygulandı. Naringin (100 mg/kg/gün) reperfüzyonun hemen başında, 24 saat sonrasında ve 48 saat sonrasında intraperitoneal olarak uygulandı.

2.1. ELISA Analizleri

2.1.1. HIF -1 α Analizi

Elabscience E-EL-R0513 katalog nolu ELISA kiti kullanıldı. BMG LABTECH (Almanya) marka ELISA cihazı ile okuma işlemi yapıldı. Bu ELISA kiti Sandwich – ELISA prensibini kullanır. Bu kitteki mikro ELISA plakası sıçanın HIF-1 α 'sına özgü bir antikora önceden kaplanmıştır. Numuneler mikro ELISA plaka kuyularına eklendi ve ona özgü olan antikorla birleştirildi. Sıçan HIF-1 α ve Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP)'e özgü bir saptama antikoru ard arda mikro plaka kuyularına eklendi ve inkübe edildi. Sadece HIF-1 α , saptama antikoru ve HRP mavi görünür fakat durdurma solüsyonunun eklenmesiyle renk sarıya döndü. Optik yoğunluk (OD) 450 nm $\pm$ 2 nm dalga boyunda ölçülür. Sıçan HIF-1 α 'sı numunelerin OD'sini standart eğriyle karşılaştırarak hesaplandı.

Test Prensibi aşağıdaki gibidir:

1)Kuyucuklara her dilüsyonda 100 μ L standart veya numune eklendi. 37°C'de 90 dakika inkübe edildi.

2)Hemen hemen her kuyuya 100 μ L Biotinylated Detection Ab çalışma solüsyonu eklendi. 37°C'de 1 saat inkübe edildi.

3)Her kuyucuğa 350 μ L yıkama tamponu eklendi. 1 dakika beklendikten sonra 3 kez aspire edilip yıkandı.

4)Her kuyucuğa 100 μ L HRP konjugat solüsyonu eklendi. 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Yine yıkama tamponu ile bu sefer 5 kez aspire edilip yıkandı.

5)Her kuyucuğa 90 μ L substrat reaktifi eklendi. 37°C'de 15 dakika inkübe edildi.

6)Her kuyucuğa 50 μ L durdurma solüsyonu eklendi.

7) 450 nm'ye ayarlanmış Mikroplaka okuyucu ile her bir kuyunun OD'si belirlendi.

2.1.2. Kaspaz-3 Analizi

Elabscience E-EL-R0160 katalog nolu ELISA kiti kullanıldı. BMG LABTECH (Almanya) marka ELISA cihazı ile okuma işlemi yapıldı. Bu ELISA kiti Sandwich – ELISA prensibini kullanır. Bu kitteki mikro ELISA plakası sıçanın kaspaz-3'üne özgü bir antikorla önceden kaplanmıştı. Numuneler mikro ELISA plaka kuyularına eklendi ve ona özgü olan antikorla birleştirildi. Sıçan kaspaz-3 ve Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP)'e özgü bir saptama antikoru ard arda mikro plaka kuyularına eklendi ve inkübe edildi. Sadece kaspaz-3, saptama antikoru ve HRP mavi görünür fakat durdurma solüsyonunun eklenmesiyle renk sarıya döndü. Optik yoğunluk (OD) 450 nm $\pm$ 2 nm dalga boyunda ölçülür. Sıçan kaspaz-3'ü numunelerin OD'sini standart eğriyle karşılaştırarak hesaplandı.

Test Prensibi aşağıdaki gibidir:

1)Kuyucuklara her dilüsyonda 100 μ L standart veya numune eklendi. 37°C'de 90 dakika inkübe edildi.

2)Hemen hemen her kuyuya 100 μ L Biotinylated Detection Ab çalışma solüsyonu eklendi. 37°C'de 1 saat inkübe edildi.

3)Her kuyucuğa 350 μ L yıkama tamponu eklendi. 1 dakika beklendikten sonra 3 kez aspire edilip yıkandı.

4)Her kuyucuğa 100 μ L HRP konjugat solüsyonu eklendi. 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Yine yıkama tamponu ile bu sefer 5 kez aspire edilip yıkandı.

5)Her kuyucuğa 90 μ L substrat reaktifi eklendi. 37°C'de 15 dakika inkübe edildi.

6)Her kuyucuğa 50 μ L durdurma solüsyonu eklendi.

7)450 nm'ye ayarlanmış Mikroplaka okuyucu ile her bir kuyunun OD'si belirlendi.

2.1.3. IL-1 β Analizi

Elabscience E-EL-R0012 katalog nolu ELISA kiti kullanıldı. BMG LABTECH (Almanya) marka ELISA cihazı ile okuma işlemi yapıldı. Bu ELISA kiti Sandwich – ELISA prensibini kullanır. Bu kitteki mikro ELISA plakası sıçanın IL-1 β 'sına özgü bir antikora önceden kaplanmıştı. Numuneler mikro ELISA plaka kuyularına eklendi ve ona özgü olan antikora birleştirildi. Sıçan IL-1 β ve Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP)'e özgü bir saptama antikoru ard arda mikro plaka kuyularına eklendi ve inkübe edildi. Sadece IL-1 β , saptama antikoru ve HRP mavi görünür fakat durdurma solüsyonunun eklenmesiyle renk sarıya döndü. Optik yoğunluk (OD) 450 nm $\pm$ 2 nm dalga boyunda ölçülür. Sıçan IL-1 β 'sı numunelerin OD'sini standart eğriyle karşılaştırarak hesaplandı.

Test Prensibi aşağıdaki gibidir:

1)Kuyucuklara her dilüsyonda 100 μ L standart veya numune eklendi. 37°C'de 90 dakika inkübe edildi.

2)Hemen hemen her kuyuya 100 μ L Biotinylated Detection Ab çalışma solüsyonu eklendi. 37°C'de 1 saat inkübe edildi.

3)Her kuyucuğa 350 μ L yıkama tamponu eklendi. 1 dakika beklendikten sonra 3 kez aspire edilip yıkandı.

4)Her kuyucuğa 100 μ L HRP konjugat solüsyonu eklendi. 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Yine yıkama tamponu ile bu sefer 5 kez aspire edilip yıkandı.

5)Her kuyucuğa 90 μ L substrat reaktifi eklendi. 37°C'de 15 dakika inkübe edildi.

6)Her kuyucuğa 50 μ L durdurma solüsyonu eklendi.

7)450 nm'ye ayarlanmış Mikroplaka okuyucu ile her bir kuyunun OD'si belirlendi.

2.2. Histolojik Değerlendirme

Dokular %10 formaldehit solüsyonu içinde, fiksatif/doku oranı 10/1 olacak şekilde, 24 saat +4°C’de fikse edildi. Doku takibi için akarsuda 1 gece yıkandı. %50-60-70-80-90’lık alkollerde sırasıyla 30’ar dk, %96’lık ve %100 lük alkolde 45’er dakika, alkol+ksilende (1/1) 20 dakika, 1. ksilende 1 saat, 2. ksilende 1,5 saat, 57°C ksilen+parafinde (1/1) 20 dakika, 57°C parafinde de 15 dakika bekletildi. Parafine gömüldü. Mikrotom ile 5µm kalınlığında kesitler polilizinli lamalar üzerine alındı.

Hematoksilen-Eosin boyama yapıldı. Doku preparatları reperfüzyon için 1 gece 57°C’de bırakıldı. 30’ar dakika 2 kez ksilende bekletildi. Azalan konsantrasyonda alkol serilerinden geçirildi. Akan su altında 5 dakika yıkandı. 15 dk Harris Hematoksilen boyası ile boyandı. Akan su altında 5 dakika yıkandı. Asit alkole batırılıp çıkarıldı. Akan su altında 5 dakika yıkandı. Eozin boyası ile 2-3 dk boyandı. Akan su altında 5 dakika yıkandı. Artan konsantrasyonlardaki alkol serilerinden geçirildi. Doku üzerine 1 damla entellan damlatılarak lamel üzerine kapatıldı. Preparatlar Olympus BX51 Trinocular mikroskopta incelenerek DP72 kamera ile 40x büyütmede görüntüler kaydedildi. Histolojik hasar, grup dağılımına kör olarak ve hayvan araştırmalarında böbrek dokusu hasarı için özel olarak tasarlanmış EGTI skorlama sistemi kullanılarak değerlendirildi (Khalid ve ark 2016).

2.3. İstatistiksel Analizler

Bulguların istatistiksel açıdan yorumlanması SPSS 22.0 bilgisayar paket programı ile yapıldı, bütün parametrelerin aritmetik ortalamaları ve standart hataları belirlendi. Verilerin homojenliğinin belirlenmesi amacıyla “Shapiro-Wilk” testi yapıldı. Verilerin normal dağılımında gruplar arasındaki farkın tespitinde “Tek yönlü varyans analizi (ANOVA)” testi, farklılıklarının hangi gruptan kaynaklandığının belirlenmesi amacıyla çoklu karşılaştırma testlerinden olan “Duncan” testi kullanıldı. $P < 0,05$ düzeyindeki farklılıklar anlamlı olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Korteks HIF-1 α Değerleri

Böbrek korteks HIF-1 α değerleri Çizelge 1’de verilmiştir. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında en düşük değer I/R grubunda görülürken diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Böylece I/R’ye bağlı olarak azalmış olan HIF-1 α seviyelerinin Nar 50 ve NAR 100 uygulaması ile tekrar kontrol değerlerine yaklaştığı belirlenmiştir ($P<0.001$, Çizelge 1).

Çizelge 1: Deney Gruplarının Korteks HIF-1 α Değerleri

Gruplar	Korteks HIF-1 α (ng/g doku)
Kontrol Grubu	6.34 $\pm$ 2.17 b
Sham Grubu	6.51 $\pm$ 1.14 b
İskemi Reperfüzyon (IR) Grubu	1.66 $\pm$ 1.18 a
Naringin (50 mg/kg/gün) + IR Grubu	3.12 $\pm$ 1.85 b
Naringin (100 mg/kg/gün) + IR Grubu	2.71 $\pm$ 1.28 c

*Sütunlardaki farklı harfler istatistik önemi göstermektedir. İskemi Reperfüzyon Korteks HIF-1 α seviyelerini önemli şekilde baskılamıştır ($P<0.001$).

3.2. Korteks ve Medulla Kaspaz-3 Değerleri

Böbrek korteks ve medulla dokusundaki kaspaz 3 seviyeleri incelendiğinde her iki dokuda da en yüksek değerler I/R gruplarında görülmüştür. Artan kaspaz seviyeleri her iki dozdaki naringin uygulaması ile azalırken azalma oranı böbrek medullasında daha belirgin olarak ortaya çıkmıştır ($P<0.001$, Çizelge 2). Böylece her iki dokuda da iskemi-reperfüzyonla artan kaspaz değerleri önemli şekilde azalma göstermiştir.

Çizelge 2: Deney Gruplarının Korteks ve Medulla Kaspaz-3 Değerleri

Gruplar	Korteks Kaspaz-3 (ng/g doku)	Medulla Kaspaz-3 (ng/g doku)
Kontrol Grubu	94.45 ± 30.08 c	112.77 ± 26.32 b
Sham Grubu	102.46 ± 41.14 c	124.50 ± 13.09 b
İskemi Reperfüzyon(IR) Grubu	162.94 ± 42.98 a	225.20 ± 11.28 a
Naringin (50 mg/kg/gün) + IR Grubu	144.20 ± 47.88 bc	84.99 ± 30.06 c
Naringin (100 mg/kg/gün) + IR Grubu	102.74 ± 54.02 c	89.92 ± 28.79 c

*Sütunlardaki farklı harfler istatistik önemi göstermektedir. İskemi Reperfüzyon korteks ve medullada kaspaz-3 seviyelerini önemli şekilde artırmıştır ($P<0.001$).

3.3. Korteks ve Medulla IL-1 β Değerleri

Böbrek dokusu medulla ve korteks bölgelerindeki IL-1 β seviyeleri incelendiğinde bu parametrenin her iki böbrek dokusunda da iskemi-reperfüzyonla birlikte çok önemli şekilde artış gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak 50 ve 100 mg dozlarında yapılan naringin takviyesinin artan IL-1 β oranlarını önemli şekilde azalttığı belirlenmiştir. Hatta böbrek medulla dokusundaki IL-1 β 100 mg doz uygulaması ile en düşük değerlerin elde edilmesini sağlamıştır ($P<0.001$; Çizelge 3).

Çizelge 3: Deney Gruplarının Korteks ve Medulla IL-1 β Değerleri

Gruplar	Korteks IL-1 β (ng/g doku)	Medulla IL-1 β (ng/g doku)
Kontrol Grubu	9.47 ± 4.26 b	7.45 ± 4.20 b
Sham Grubu	9.44 ± 3.56 b	7.41 ± 3.99 b
İskemi Reperfüzyon(IR) Grubu	15.46 ± 4.21 a	18.99 ± 5.70 a
Naringin (50 mg/kg/gün) + IR Grubu	9.99 ± 3.97 b	3.93 ± 1.27 c
Naringin (100 mg/kg/gün) + IR Grubu	5.88 ± 2.38 c	3.75 ± 1.12 c

*Sütunlardaki farklı harfler istatistik önemi göstermektedir. İskemi Reperfüzyon korteks ve medullada IL-1 β seviyelerini önemli şekilde artırmıştır ($P<0.001$).

3.4. HE Boyama Sonuçları

Çizelge 4: Deney Gruplarının Böbrek Dokusu HE Boyama Skorları

Gruplar	HE Boyama
Kontrol Grubu	0.00 ± 0.00 c
Sham Grubu	0.00 ± 0.00 c
İskemi Reperfüzyon(IR) Grubu	7.50 ± 1.22 a
Naringin (50 mg/kg/gün) + IR Grubu	5.33 ± 1.50 b
Naringin (100 mg/kg/gün) + IR Grubu	5.50 ± 1.04 b

*Sütunlardaki farklı harfler istatistik önemi göstermektedir. İskemi Reperfüzyon böbrek dokusunda yapısal bozulmaya neden olurken Nar 50 ve 100 uygulaması oluşan hasarı belirli oranda iyileştirmiştir (P<0.001).

Tüm grupların skorlamaları tabloda gösterilmiştir. Kontrol ve sham grupları, renal korteksin normal histolojik görünümüne sahipti. Tübüler hücrelerin fırça sınırlarının sağlam olduğu ve bazal membranda kalınlaşma olmadığı görüldü. Enflamasyon veya nekroz mevcut değildi (Tübüler skor 0). Endotel hücrelerinde şişme veya bozulma yoktu (Endotel skoru 0). İnce düzgün duvarlı Bowman kapsülü ve retraksiyonu olmayan sağlam glomeruluslar gözlemlendi (Glomeruler skor 0). İnterstisyel dokuda hasar görülmedi (İnterstisyel skor 0).

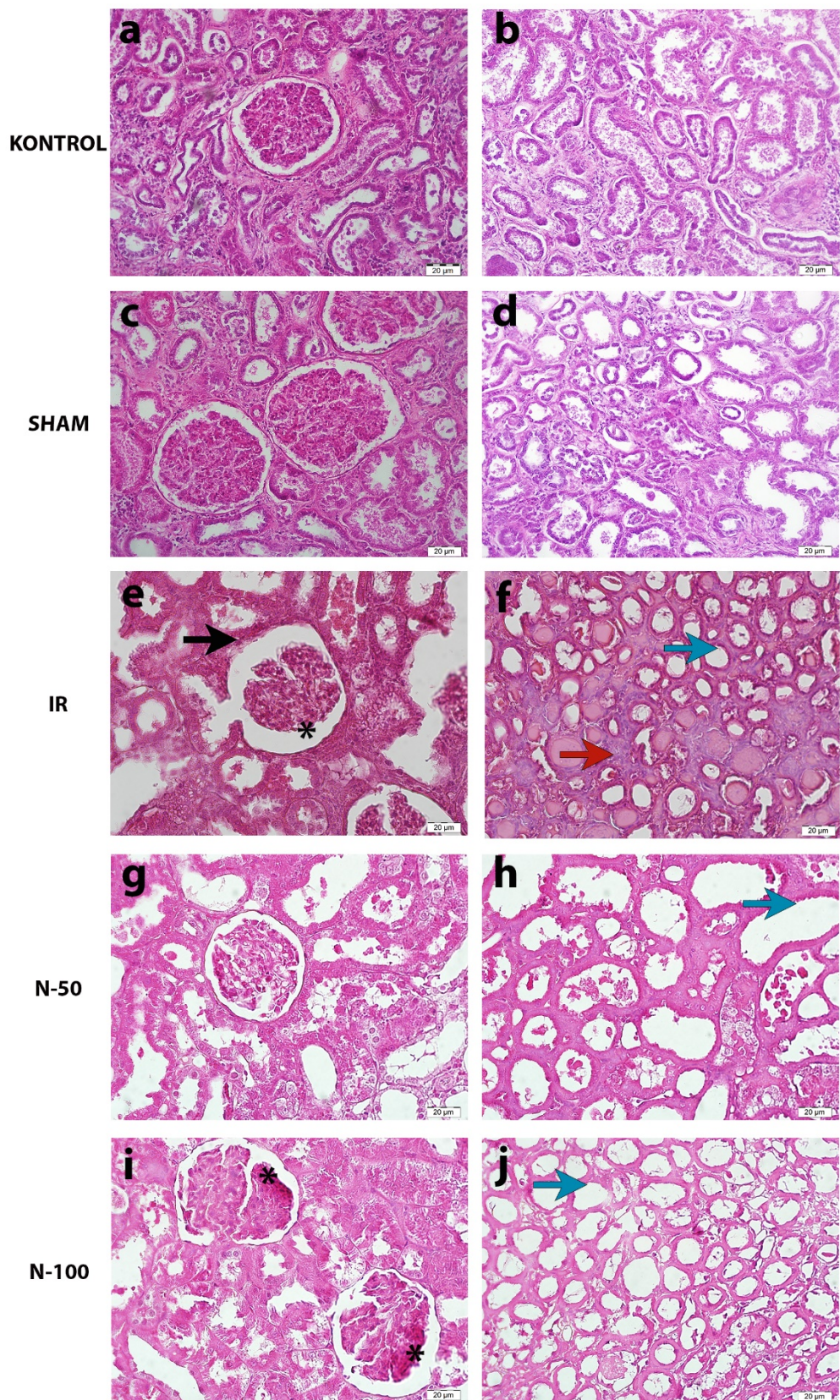
İskemi Reperfüzyon grubunda, genel olarak tübüler hücrelerin %25'inden fazlasında, nekroz bulguları olmaksızın fırça kenarda kayıp ve tübüler hücrelerin bazal membranında kalınlaşma gözlemlenmiştir (ortalama tübüler skor 2). Endotelyal hücrelerde kayıp gözlenmedi ancak bozulmalar ve endotel şişmesi mevcuttu (ortalama endotel skoru 2). Preparatların çoğunda Bowman kapsülünde kalınlaşma ve glomerül korpüskülünün retraksiyonu mevcuttur (ortalama glomeruler skor 2). İnterstisyel kompartmanda: nekroz, inflamasyonu ve kanama görülmektedir (ortalama interstisyel skor 3).

N-50 grubunda, fırçası kenarda kayıp ve tübüler hücrelerin bazal membranında kalınlaşma görüldü (ortalama tübüler skor 2). Endotelyal hücrelerde kayıp veya bozulmalar olmamakla birlikte endotel şişmesi gözlemlendi (ortalama endotel skoru 1). Preparatların çoğunda Bowman kapsülünde kalınlaşma mevcuttu

(ortalama glomeruler skor 1). İnterstisyel kompartmanda: inflamasyonu ve kanama bulunmakla birlikte bu bulgular dokunun %25'inden daha azında görüldü (ortalama interstisyel skor 1).

N-100 grubunda, bulgular büyük oranda N-50 grubuyla benzerlik gösteriyordu. Fırçamsı kenarda kayıp ve tübüler hücrelerin bazal membranında kalınlaşma (ortalama tübüler skor 2) ile endotel hücrelerinde şişme gözlemlendi (ortalama endotel skoru 1). Preparatların çoğunda Bowman kapsülünde kalınlaşma mevcuttu, ayrıca bazı preparatlarda glomerül korpüskülünde retraksiyon gözlemlendi (ortalama glomeruler skor 2). İnterstisyel kompartmanda: inflamasyonu ve kanama bulunmakla birlikte bu bulgular dokunun %25'inden daha azında görüldü (ortalama interstisyel skor 1).

Skorlamalar dikkate alındığında İR grubunda iskemi reperfüzyon hasarına bağlı olarak dokuda belirgin bozulmalar meydana gelirken çalışma gruplarında morfolojinin bir miktar daha korunduğu gözlemlendi. Ancak farklı dozlar arasında belirgin bir fark tespit edilemedi.



Şekil 3.4. **Şekil a-b'**de kontrol grubunda ve **c-d'**de sham grubunda normal renal histoloji gözlenmektedir. **Şekil e-f'**de İR grubundaki doku hasarı görülmektedir. **Şekil e'**de bowman kapsülünde kalınlaşma (siyah ok), Glomerüler korpüskülde retraksiyon (*) gösterilmiştir. **Şekil f'**de tübüllerde fırçamsı kenar kaybı (mavi ok) ve interstisyel dokuda infiltrasyon (kırmızı ok) gösterilmiştir. **Şekil g-h'**de N-50 grubundaki doku hasarı görülmektedir. **Şekil g'**de nispeten korunmuş glomerül görülmektedir. **Şekil h'**de tübüllerde fırçamsı kenar kaybı (mavi ok) gösterilmiştir. İnterstisyel dokuda infiltrasyon görülmemektedir. **Şekil i-j'**de N-100 grubundaki doku hasarı görülmektedir. **Şekil i'**de Glomerüler korpüskülde retraksiyon (*) gösterilmiştir. **Şekil j'**de tübüllerde fırçamsı kenar kaybı (mavi ok) gösterilmiştir. İnterstisyel dokuda infiltrasyon görülmemektedir.



4. TARTIŞMA

Çalışmamızdan elde edilen bulgulara genel olarak bakıldığında sıçanlarda tek taraflı nefrektomiye takiben yapılan böbrek-iskemi reperfüzyonu sonucu böbrek dokusunda HIF-1 α seviyeleri belirgin şekilde baskılanırken, IL-1 β ve kaspaz-3 seviyeleri önemli şekilde artmış ancak uygulanan tedavi oluşan değişiklikleri tekrar belirgin şekilde düzeltmiştir. Aynı zamanda I/R sonucu böbrek dokusunda meydana gelen histopatolojik değişimlerde aynı tedavi ile ilgili dokuda iyileşmelere yol açmıştır.

Araştırmamızda ilk incelenen parametre HIF-1 α 'dır. HIF-1 α hipoksiye karşı dokunun hücrel adaptasyonundaki rolü nedeniyle önemli bir transkripsiyon faktörüdür. HIF-1 α , temel bir heterodimerik sarmal-döngü-sarmal transkripsiyon faktörüdür. Hipoksi, fizyolojik HIF-1 α ekspresyonunun ana düzenleme faktörüdür. Ayrıca, HIF-1 α aşırı aktivasyonunun diğer bazı mekanizmalar tarafından da uyarılabileceğine dikkat etmek önemlidir (Wang ve ark 2011, 2014). Böbrek hasarı sırasında değişen HIF-1 α 'nın sadece hipoksi adaptasyonuna aracılık etmekle kalmayıp, aynı zamanda profibrotik değişikliklere katılan inflamasyon, epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) ve hücre dışı matriks (ECM) birikimi ile ilişkili olduğunda rapor edilmiştir (Agarwal ve Nick 2000, Warnecke ve ark 2004, Schietke ve ark 2010, Moore ve Bellomo 2011). HIF'lerin etkileri hücre tipine ve bağlanmalarıyla bağlı olabilir. HIF-2 α ayrıca renal fibrozis çalışması için bir adaylıkta oluşturabilir (Li ve ark 2021, Pan ve ark 2021). Bununla birlikte, HIF-3 daha az bilinmektedir. Diğer çalışmalar, HIF-3 α 'nın HIF-1'in hedef geni olarak hareket edebileceğini ve HIF-1 ve HIF-2'nin aktivitesini negatif olarak düzenleyebileceğini göstermiştir (Tanaka ve ark 2009). Bizim çalışmamızda deneysel böbrek iskemisi sonucu bu parametre belirgin şekilde baskılanmıştır. Ancak 50 ve 100 mg/kg dozda naringin takviyesi (3 gün) bu değeri tekrar yükseltmiştir.

Wang ve ark (2014) gerçekleştirmiş olduğu çalışmada HIF-1 α 'nın böbrekte kronik iskeminin neden olduğu aşırı aktivasyonunun, kronik böbrek hasarına aracılık ettiği belirlenmiştir (Wang ve ark 2014). Kimura ve ark. (2008) ise normal ve VHL nakavt farelerde 5/6 nefrektomi gerçekleştirerek, VHL'si silinmiş farelerin tübüler epitel hücrelerinde HIF-1 ekspresyonunun stabil olduğunu ve interstisyel fibrozisin önemli ölçüde şiddetlendiğini tespit etmişlerdir (Kimura ve ark 2008). Baumann ve

ark (2016) podosit HIF-1 α geninin nakavt edilmesinin glomerüler tip I kollajen birikimini ve glomerüloskleroza önleyebileceğini bulmuştur (Baumann ve ark 2016).

Kunming farelerinin kullanıldığı bir çalışmada I/R sonrası HIF-1 α /PROX-1/LVYE-1 ekseninde dinamik değişiklikleri gözlemlenmeye çalışılmış ve I/R sonrası tedavi aşamasında böbreğin bazı dokularında aktive olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada fareler I/R'ye maruz bırakılmış ve tedavi aşamasında değişiklikler tespit edilmiştir. HIF-1 α 'nın böbreğin proksimal tübüllerinde eksprese olduğu ve I/R den sonra PROX-1 ile birlikte bu bölgelerde lokalize olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak HIF-1 α ekspresyonunun I/R sonrası tübüler hücre ölümünde koruyucu bir role sahip olduğu bulunmuştur (Meng 2018).

Hem wistar ratlarının hem de Tgr 5 geni silinmiş farelerin kullanıldığı bir çalışmada IR den sonra Tgr5 nakavt farelerinin vahşi tip fareler kıyasla daha fazla AQP2 ve HIF-1 α protein miktarını azalttığı, Nf-Kb p65 ve IL-1 β protein miktarını artırdığı bulunmuştur. LCA ve TGR5 aktivasyonunun HIF-1 α sinyal yolunu aktive ederek IR hasarı olan hayvanlarda AQP2 seviyesini azalttığı gösterilmiştir (Han ve ark 2021). Wistar ratları üzerinde yapılan bir çalışmada ise renal doku HIF-1 α seviyesi sham grubuna kıyasla IR grubunda artış göstermiştir (Cienfuegos-Pecina ve ark 2020).

Ancak Yan ve ark. (2021) gerçekleştirdiği bir çalışmada spermidin takviyesinin iskemi-reperfüzyonda HIF-1 seviyelerini artırarak böbrek renal tübüllerindeki apoptozisi baskılamak suretiyle böbrekte koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir. Benzer şekilde Li ve ark. (2020) yapmış olduğu bir araştırmada da dexmedetomidine takviyesinin iskemi-reperfüzyona maruz kalan böbrek dokusunda HIF-1 seviyelerini artırarak PI3K/Akt aracılığıyla oluşan inflamasyonu baskıladığını tespit etmişlerdir. Sodium (S)-2-hydroxyglutarate da iskemi reperfüzyonda oluşan hasarı HIF seviyelerini stabilize etmek suretiyle baskılamıştır (Eduardo Cienfuegos-Pecina ve ark 2020).

Özellikle hipoksi ile indüklenebilir faktörün (HIF) (HIF-1, 2, 3 dahil) böbrek hastalığında aktive olduğu ve hipoksiye karşı koruyucu yanıtta önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Böbrek hastalıklarında HIF-1 α 'nın kritik özelliği koruyucudur (Huixia Liu ve ark 2022). Yine Barakat ve ark'nın (2022) çalışmasında da HIF-1 düzeylerinin up-regüle edilmesinin böbrekte oluşan yapısal hasar ve fonksiyonel yetmezliğe karşı koruyucu etkilere sahip olduğu belirlenmiştir.

Yukarıdaki çalışmalara bakıldığında bazı araştırmalarda iskemi-reperfüzyon sonucu HIF-1 seviyelerinin arttığı rapor edilse de genel olarak bu parametrenin İ/R ile baskılandığı ve bu baskılanmanın önlenmesi ve HIF-1 seviyelerinin normalleşmesi ile böbrek dokusunda oluşan hasarın düzeldiği görülmektedir. Araştırmamızda iskemi-repezfüzyon ile baskılanmış olan böbrek korteks dokusu HIF-1 α seviyeleri naringin takviyesi ile düzelmiştir. Daha önce naringin ve böbrek İ/R'da doğrudan HIF-1 α ile ilişkisini araştıran bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak naringenin etkisinin incelendiği araştırmalarda genel olarak lipid peroksidasyon ve yangısal süreçleri baskılayarak bu dokuda iyileşme sağladığının gösterilmiş olması bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

Gerçekleştirmiş olduğumuz deneysel çalışmada böbrek korteks ve medulla dokusunda apoptotik yollar önemli bir artışa neden olan kaspaz-3 seviyeleri de incelenerek bu parametrenin uyguladığımız deneysel model ve yaptığımız tedaviden nasıl etkilendiğini inceledik. Apoptotik parametre olan kaspaz-3 seviyeleri iskemi reperfüzyon sonucu her iki dokuda da önemli şekilde artarken Nar 50 ve NAR 100 uygulaması artan kaspaz 3 aktivitesini belirgin şekilde baskılamıştır.

Daha önce yapılan araştırmalarda farklı flavonol/flavonoid türlerinin deneysel böbrek iskemi-reperfüzyon modellerinde apoptozise olan etkileri incelenmiştir. Böbrek iskemi/reperfüzyonun da naringenin etkisinin incelendiği bir araştırmada 50 mg/kg dozda 3 günlük gavaj yoluyla uygulamanın kaspaz-3 seviyelerini önemli şekilde baskıladığı rapor edilmiştir (Banghua Zhang ve ark. 2022).

Başka bir flavonoid olan quersetinin yine 50 mg/kg dozda uygulaması da kaspaz-3 içeriği ve aktivitesinde önemli bir baskılanmaya yol açmıştır (Shaimaa S El-Sayed ve ar. 2021). Anisodamine iskemi reperfüzyonla olan renal yaralanmayı kaspaz-3 dâhil antiapoptik ajanları baskılayarak önlemiştir (Shu Zhang ve ark. 2021).

Wang ve ark (2020) gerçekleştirdiği çalışmada üzüm çekirdeği proantosianin B2 ön tedavisinin Nrf-2 ve HO-1 ekspresyonu up-regule ve cleaved-caspase-3'ü ise down regüle ederek tübül hücre hasarını önemli şekilde baskıladığı tespit edilmiştir. Hesperidin tedavisi de renal iskemi-reperfüzyon hasarının azaltılmasında kaspaz-3 aktivitesinin azaltılmasıyla gerçekleştiği belirlenmiştir (Meng ve ark 2020). Luteolin ön tedavisi Bcl-2 kaspaz-3 tanımlanmasını önemli şekilde baskılayarak renal hastalıkta inflamasyon ve apoptozisi önlemiştir (Yan Liu ve ark 2017).

Araştırmamıza benzer şekilde yapılan bir araştırmada naringin ve trimetazidin tek başına ve kombine tedavisinin kaspaz-3 oranını önemli şekilde baskıladığı görülmüştür (Negin Amini ve ark. 2019). Konuyla ilgili yapılan bu çalışmada 45 dakikalık iskemi ve 4 saatlik reperfüzyon gerçekleştirmiş ve naringin 100 mg/kg dozda uygulanmıştır. Gerçekleştirmiş olduğumuz çalışmada 30 dakikalık iskemi ve 72 saatlik reperfüzyon uygulaması ve iki farklı dozda naringin takviyesi (50/100 mg/kg) yapılmıştır. Her iki dozdaki naringin takviyesi de özellikle böbrek medullasında artmış olan kaspaz-3 aktivitesini önemli şekilde baskılayarak kontrol değerlerinden bile daha düşük seviyelerin elde edilmesini sağlamıştır. Elde etmiş olduğumuz naringin takviyesi ile baskılanmış kaspaz-3 aktivitesi dolayısıyla azalmış apoptozis yukarıda farklı çalışmalardan elde edilen değişik flavonoid türlerinin antiapoptotik etkisiyle ortaya konulmuş olan bulgulara benzer sonuçların elde edilmesini sağlamıştır.

Çalışmamızda incelemiş olduğumuz parametrelerden bir diğeri de IL-1 β idi. Bu madde iskemi reperfüzyona bağlı olarak belirgin şekilde arterken NAR 50 ve 100 uygulaması artan bu sitokin seviyelerini belirgin şekilde baskılamıştır.

IL-1 β , inflamatuvar sinyallere yanıt olarak çok sayıda farklı immün ve immün olmayan hücre tipi tarafından hızla üretilir ve salgınır (Dinarello 2014). Bunun aksine, IL-1 α immün olmayan birçok hücre tipinde yapısal olarak eksprese edilir, ancak esas olarak sitozolde kalır veya hücre nekrozu durumunda salınan hücre yüzeyine bağlı kalır (Rider ve ark 2013).

Renal IRI'yi tedavi etmek için önemli bir hedef, toll benzeri reseptörler (TLR'ler), özellikle IRI'nin oluşumundaki temel rolleri için kapsamlı bir şekilde çalışılmış olan TLR2 ve TLR4'tür (Kezic ve ark 2017). Bu çalışmada, Rhodobacter sphaeroides'ten (LPS-RS) elde edilen lipopolisakkarit tarafından antagonize edici toll benzeri reseptörlerin (TLR'ler) etkilerinin iskemi/reperfüzyon hasarı (IRI) üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Mevcut araştırmanın sonuçları, LPS-RS'nin IRI grubuna kıyasla interlökin-1 β , düzeylerini azalttığını gösterdi. Her iki reseptörün de renal IRI'de aktive olduğu ve nihayetinde interlökin (IL)-1 β , IL-6 ve tümör nekroz faktörü (TNF)- α gibi farklı proinflamatuvar sitokinlerin salgınmasına katıldığı belgelenmiştir (Aal-Aaboda ve ark 2021).

Başka bir çalışmada, p-kumarik asidin (CA) iskemi reperfüzyon (İ/R) hasarı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada tümör nekroz faktörü- ve interlökin-1 β 'nın renal ekspresyonu belirlenmiştir. Araştırmadan elde edilen veriler, p-kumarik asidin IL-1 β , TNF- α antioksidan enzim aktivitelerini artırarak böbreği iskemi-

reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Godarzi ve ark 2020).

Wistar sıçanları üzerinde gerçekleştirilen bir araştırma da *Juglans mollis* (JM) metanolik özütü kullanılarak İ/R hasarındaki etkisi araştırılmıştır. JM'nin IR hasarına karşı böbrek dokusu üzerinde yararlı etkiler gösterdiği ve bu etkinin de proinflatuar sitokinlerin (IL-1 β gibi) üretiminde azalmadan kaynaklı olabileceği varsayılmaktadır (Perez-Meseguer ve ark 2019).

Propofolun etkisinin incelendiği bir çalışmada ise sıçanlar, 24 saat boyunca propofol (5 veya 10 mg/kg) ile veya bunlar olmadan I/R'ye tabi tutulmuştur. Bu çalışmada IR den 24 saat sonra IL-1 β seviyelerinin yükseldiği ancak 5 ve 10 mg/kg propofol ile tedavisi IL-1 β seviyelerinin düştüğü gözlemlenmiştir (Liu ve ark 2021).

Naringenin-7-O-neohesperidoside olarak da bilinen Naringin, narenciye meyvelerinde yaygın olarak bulunan bir diyet flavonoid glikozittir (Singh ve ark 2020). Antioksidasyon, anti-inflamasyon ve anti-apoptozisin çoklu biyoaktivitelerini uyguladığı belgelenmiştir (Chen ve ark 2016). Bir dizi prelinik çalışma ve klinik deneme, naringinin nörodejenerasyonu, metabolik sendromu, kardiyovasküler bozuklukları ve solunum hastalıklarını hafifletmedeki faydaları gösterilmiştir (Ahmed ve ark 2019, Raja Kumar ve ark 2019, Heidary Moghaddam ve ark 2020, Zeng ve ark 2020). Aslında, naringin, diyet takviyelerinin üretiminde tipik bir fitofarmasötik olarak giderek daha fazla kullanılmaktadır (Salehi ve ark 2019).

Bir çalışmada 40 Sprague Dawley ratına tek başına ya da kombine bir şekilde naringin ve trimetazidin verilmiş ve baroreseptör duyarlılığı ve NTS (Nukleus Traktus Solitarius) elektriksel aktivitesi gözlemlenmiştir. Sonuç olarak I/R hasarı ile azalmış baroreseptör duyarlılığı ve azalmış NTS elektriksel aktivitesi arasında bir ilişki olduğuna varılmıştır (Amini ve ark 2021).

Gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise 40 erkek Sprague-Dawley sıçanının kullanıldığı bir çalışmada IR hasarında naringin (NAR), trimetazidin (TMZ) ve bunların kombinasyonunun böbrekte Nrf-2 ekspresyonuna ve miyokardiyal hasar üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada sıçanların böbrek dokuları tübüllerinde nekroz ve kanama görülmüştür. Ancak NAR ve TMZ nin birlikte kullanıldığı tedavide bu belirtiler azalmıştır. Sıçanlarda bu iki ilaç farklı dozlarda [TMZ (5 mg/kg), NAR (100 mg/kg)] uygulanarak oksidan ve antioksidan sistem aktiviteleri incelenmiştir.

Sonuç olarak NAR, TMZ ya da bunların birlikte tedavisi antioksidan aktive yoluyla IR hasarını takiben böbrek dokusunda Nrf-2 ekspresyonunu azaltabileceği bulunmuştur (Amini ve ark 2019).

Çalışmamızda İ/R'ye bağlı olarak artan IL-1 beta değerleri yukarıdaki benzer deneysel çalışmalardan elde edilen verilerle benzerlik göstermektedir. Ancak İ/R sonrası tek başına NAR uygulaması ile artan IL-1 beta seviyelerinin baskılanması kullanılan tedavi dozunun oluşan inflamatuvar durumu önemli şekilde baskıladığını föstermektedir.

Deneysel araştırmamız içerisinde aynı zamanda böbrek dokusundaki histopatolojik değişimlerde incelenmiştir. Elde edilen bulgular böbrek iskemi-reperfüzyonuyla hücre hasar skorunda önemli bir artış olurken her iki dozdaki naringin takviyesinin histolojik bozulmayı önemli şekilde düzelttiğini göstermiştir.

Daha önce yapılan bir araştırmada IR hasarla tübüler hücrelerde ve glomerülde bozulma değişiklikler görülmüştür (Nielsen ve ark 2017).

Başka bir deneysel araştırmada ise iskemi reperfüzyonun farelerde proksimal ve distal tübülünde şişlik, lümeninde çöküntü, intertübüler alanda artış gözlemlenmiştir. Periyodik asit-Schiff (PAS) ile boyama yapılan görüntülemelerde proksimal tübül epitelinin fırçamsı kenarlarında önemli düzeyde küçülme görülmüştür (Chihanga ve ark 2018).

Renal IR hasarı sonucu nekroz, geniş hemoraji, korteks ve medullada sıkışıklık, kortekste glomerülde büzüşme görüntülenmiştir. Naringin veya trimetazin uygulanan gruplarda nekroz, hemoraji, sıkışıklık (kan birikmesi) azalması görüntülenmiştir. Naringin ve trimetazin birlikte uygulanan grupta farklılık daha az düzeyde bulunmuştur (Amini ve ark 2019). Bizim elde etmiş olduğumuz histopatolojik verilerde yukarıda elde edilen bulgulara paralellik göstermektedir.

48 yetişkin erkek sıçanın kullanıldığı bir çalışmada ise postoperatif intraperitoneal adezyonları önlemek adına naringinin (NG) koruyucu ve önleyici bir etkiye sahip olup olmayacağı incelenmiştir. Yüksek doz (80mg/kg) NG alan sıçan grubunda intraperitoneal adhezyon oluşumunda belirgin azalmalar olurken aynı zamanda fibroblast oluşumu, kollajen birikimi, oksidatif stres de azalmıştır. Bu araştırmadan elde edilen bulgular naringinin postoperatif intraperitoneal adezyonun önlenmesinde bir potansiyel ilaç olabileceği sonucuna varılmıştır (Shi ve ark 2022).

Sprague Dawley (SD) ratlarının kullanıldığı bir çalışmada naringinin oksidatif stres, apoptoz ve intervertebral disk üzerine etkileri ve mekanizmaları açıklanmaya çalışılmıştır. Düşük konsantrasyonlu (100 mg/kg) ve yüksek konsantrasyonlu (200 mg/kg) naringin tedavisi annulus fibrozusun gerilmesine bağlı apoptozu, oksidatif stresi, IVDD derecesini azaltmış ve antioksidan aktiviteyi baskılamıştır. Naringin IVDD derecesini azaltmasıyla dejeneratif disk hastalığının önleminde terapötik bir ilaç olabileceği sonucuna ulaşılmıştır (Zhang ve ark 2022).

Başka bir çalışmada HE boyaması yapılan böbrek dokularında IR grubunda renal interstisyel kanama, inflamatuvar hücrede şişlik, değişen derecelerde ödem ve nekroz, renal proksimal tübüllerde dökülmeler gözlenmiştir (Shan ve ark 2021). Histolojik bir görüntülemeye IR hasarından sonra böbreklerin proximal tübüllerinde tübüler dilatasyon, fırçamsı kenarın kaybı ve buna bağlı olarak akut tübüler hasar gözlenmiştir (Liu ve ark 2019).

Naringinin sıçanların renal korteksinde üreterin tek taraflı tıkanmasının neden olduğu renal interstisyel fibröz üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada farklı dozlarda naringin (20, 40 ve 80 mg/kg) kullanılarak değerlendirilmiş ve tıkanıklık olan grupta tübüllerin dilate, atrofiye ve nekroza uğradığı görülmüştür. Naringin ile tedavi edilen grupta renal tübüllerin dilate olması veya atrofisi düzelmiştir (Wang ve ark 2021).

Naringinin kardiyak İ/R üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada TUNEL pozitif hücre sayısının, parçalı kaspaz-3 seviyelerinin arttığı ve HE boyamasında İR grubunun bulunduğu dokularda nekroz ve kanamanın olduğu ancak naringin ile tedaviden sonra bu etkilerin azaldığı görülmüştür (Li ve ark 2021).

Bizim çalışmamızda elde etmiş olduğumuz naringin tedavisine bağlı böbrek histolojisindeki iyileşmeler yukarıda elde edilen bulgularla benzerlik göstermektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmanın sonuçları sıçanlarda deneysel börek iskemi reperfüzyonunda apoptozis göstergesi olarak kaspaz-3 ve inflamatuvar gösterge olarak IL-1 β seviyeleri önemli bir şekilde artarken HIF-1 α seviyelerinin önemli bir şekilde baskılandığını göstermektedir. Deneysel böbrek iskemi reperfüzyonuna bağlı olarak böbrek dokusunda yapısal bozulma gerçekleştiğini ortaya koymuştur.

Ancak bir flavonoid türü olan Naringinin iki farklı dozda (50/100 mg/kg) uygulanmasının dokudaki inflamasyonu ve apoptotik aktiviteyi önemli şekilde önlediği tespit edilmiştir.

Gelecekte yapılacak olan çalışmalarda farklı deneysel İ/R modellerinde ve kullanılacak farklı dozlardaki uygulamalara bağlı olarak mekanizmaların daha detaylı şekilde ortaya konulmasının konunun daha iyi bir şekilde anlaşılmasını sağlamış olacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Aal-Aaboda M, 2021. Effect of Lipopolysaccharide from *Rhodobacter sphaeroides* on Inflammatory Pathway and Oxidative Stress in Renal Ischemia/Reperfusion Injury in Male Rats. *Archives of Razi Institute*, 76, 4, 1013.
- Agarwal A, Nick HS, 2000. Renal response to tissue injury: lessons from heme oxygenase-1 gene ablation and expression. *Journal of the American Society of Nephrology*, 11,5, 965-973.
- Ahmed FF, Abd El-Hafeez AA, Abbas SH, Abdelhamid D, Abdel-Aziz M, 2018. New 1, 2, 4-triazole-Chalcone hybrids induce Caspase-3 dependent apoptosis in A549 human lung adenocarcinoma cells. *European journal of medicinal chemistry*, 151, 705-722.
- Ahmed S, Khan H, Aschner M, Hasan MM, Hassan ST, 2019. Therapeutic potential of naringin in neurological disorders. *Food and Chemical Toxicology*, 132, 110646.
- Akbaş Y, 2020. Sıçanlarda A. Carotis Communis' in iskemi/reperfüzyon modelinde retinol'ün antioksidan sistem ve beyin üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi.
- Akhtar MZ, Sutherland AI, Huang H, Ploeg RJ, Pugh CW, 2014. The role of hypoxia-inducible factors in organ donation and transplantation: the current perspective and future opportunities. *American Journal of Transplantation*, 14, 7, 1481-1487.
- Akpan NE, 2013. The intrinsic caspase death pathway in stroke neurodegeneration. *Columbia University*.
- Amini N, Sarkaki A, Dianat M, Mard SA, Ahangarpour A, Badavi M, 2021. Naringin and Trimetazidine Improve Baroreflex Sensitivity and Nucleus Tractus Solitarius Electrical Activity in Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 117, 290-297.
- Awad F, Assrawi E, Louvrier C, Jumeau C, Georgin-Lavialle S, Grateau G, Amselem S, Giurgea I, Karabina SA, 2018. Inflammasome biology, molecular pathology and therapeutic implications. *Pharmacology & therapeutics*, 187, 133-149.
- Aziz M, Jacob A, Wang P, 2014. Revisiting caspases in sepsis. *Cell Death & Disease*, 5, 11, e1526-e1526.
- Bai Y, Peng W, Yang C, Zou W, Liu M, Wu H, Fan L, Li P, Zeng X, Su W, 2020. Pharmacokinetics and metabolism of naringin and active metabolite naringenin in rats, dogs, humans, and the differences between species. *Frontiers in pharmacology*, 11, 364.
- Barnes JL, Gorin Y, 2011. Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD (P) H oxidases. *Kidney international*, 79, 9, 944-956.
- Baumann B, Hayashida T, Liang X, Schnaper HW, 2016. Hypoxia-inducible factor-1 α promotes glomerulosclerosis and regulates COL1A2 expression through interactions with Smad3. *Kidney international*, 90, 4, 797-808.
- Becker KA, Jones JJ, 2018. An emerging treatment alternative for anemia in chronic kidney disease patients: a review of daprodustat. *Advances in therapy*, 35, 1, 5-11.
- Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW, 2006. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 769-784.
- Bulut S, Özdemir BH, 2007. Apoptosis and expression of caspase-3 in cyclosporin-induced gingival overgrowth. *Journal of periodontology*, 78, 12, 2364-2368.
- Cao H, Tuo L, Tuo Y, Xia Z, Fu R, Liu Y, Quan Y, Liu J, Yu Z, Xiang M, 2017. Immune and metabolic regulation mechanism of dangguiliuhuang decoction against insulin resistance and hepatic steatosis. *Frontiers in pharmacology*, 8, 445.
- Cassidy A, Minihane AM, 2017. The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. *The American journal of clinical nutrition*, 105, 1, 10-22.
- Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, Schumacker PT, 2000. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize

hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 33, 25130-25138.

Chatterjee PK, Todorovic Z, Sivarajah A, Mota-Filipe H, Brown PA, Stewart KN, Cuzzocrea S, Thiernemann C, 2004. Differential effects of caspase inhibitors on the renal dysfunction and injury caused by ischemia–reperfusion of the rat kidney. *European journal of pharmacology*, 503, 1-3, 173-183.

Chavez R, Fraser DJ, Bowen T, Jenkins RH, Nesargikar P, Pino-Chavez G, Khalid U, 2016. Kidney ischaemia reperfusion injury in the rat: the EGTI scoring system as a valid and reliable tool for histological assessment. *Journal of Histology and Histopathology*, 3.

Chen R, Qi QL, Wang MT, Li QY, 2016. Therapeutic potential of naringin: an overview. *Pharmaceutical biology*, 54, 12, 3203-3210.

Chen Z, Xu G, Wu D, Wu S, Gong L, Li Z, Luo G, Hu J, Chen C, Jiang Z, Li X, 2020. Lobaplatin induces pyroptosis through regulating cIAP1/2, Ripoptosome and ROS in nasopharyngeal carcinoma. *Biochemical Pharmacology*, 177, 114023.

Choudhary GS, Al-Harbi S, Almasan A, 2015. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis. In *Apoptosis and Cancer* (pp. 1-9). Humana Press, New York, NY.

Choudhry H, Harris AL, 2018. Advances in hypoxia-inducible factor biology. *Cell metabolism*, 27, 2, 281-298.

Cienfuegos-Pecina E, Ibarra-Rivera TR, Saucedo AL, Ramírez-Martínez LA, Esquivel-Figueroa D, Domínguez-Vázquez I, Alcántara-Solano KJ, Moreno-Peña DP, Alarcon-Galvan G, Rodríguez-Rodríguez DR, Torres-González L, Muñoz-Espinosa LE, Pérez-Rodríguez E, Cordero-Pérez P, 2020. Effect of sodium (S)-2-hydroxyglutarate in male, and succinic acid in female Wistar rats against renal ischemia-reperfusion injury, suggesting a role of the HIF-1 pathway. *PeerJ*, 8, e9438.

Cienfuegos-Pecina E, Ibarra-Rivera TR, Saucedo AL, Ramírez-Martínez LA, Esquivel-Figueroa D, Domínguez-Vázquez I, Alcántara-Solano KJ, Moreno-Peña DP, Alarcon-Galvan G, Rodríguez-Rodríguez DR, Torres-González L, Muñoz-Espinosa LE, Pérez-Rodríguez E, Cordero-Pérez P, 2020. Effect of sodium (S)-2-hydroxyglutarate in male, and succinic acid in female Wistar rats against renal ischemia-reperfusion injury, suggesting a role of the HIF-1 pathway. *PeerJ*, 8, e9438.

Cordero MD, Alcocer-Gómez E, Ryffel B, 2018. Gain of function mutation and inflammasome driven diseases in human and mouse models. *Journal of autoimmunity*, 91, 13-22.

Danial NN, Korsmeyer SJ, 2004. Cell death: critical control points. *Cell*, 116, 2, 205-219.

Davalli P, Mitic T, Caporali A, Lauriola A, D'Arca D, 2016. ROS, cell senescence, and novel molecular mechanisms in aging and age-related diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.

Deng S, Dai G, Chen S, Nie Z, Zhou J, Fang H, Peng H, 2019. Dexamethasone induces osteoblast apoptosis through ROS-PI3K/AKT/GSK3 β signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 110, 602-608.

Devarajan P, 2006. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17, 1503–1520.

Dinareello CA, 2014. An expanding role for interleukin-1 blockade from gout to cancer. *Molecular medicine*, 20, 1, S43-S58.

Elsaid FH, Khalil AA, Ibrahim EM, Mansour A, Hussein AM, 2019. Effects of exercise and stevia on renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria*, 18, 3.

Eltzschig HK, Eckle T, 2011. Ischemia and reperfusion from mechanism to translation. *Nature medicine*, 17, 11, 1391-1401.

- Erol HS, 2020. İnflamasyon ve serbest radikaller. Sağlık Bilimleri Alanında, 71.
- Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J, 2005. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 37, 11, 719-727.
- Feng C, Yang M, Lan M, Liu C, Zhang Y, Huang B, Liu H, Zhou Y, 2017. ROS: crucial intermediators in the pathogenesis of intervertebral disc degeneration. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017.
- Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES, 1994. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 49, 30761-30764.
- Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A, 2013. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*, 39, 6, 1003-1018.
- Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, Yeganeh B, Xiao W, Eshraghi M, Bus CJ, Kadkhoda K, Wiechec E, Halayko AJ, Los M, 2009. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *Journal of medical genetics*, 46, 8, 497-510.
- Giaccia AJ, Simon MC, Johnson R, 2004. The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease. *Genes Dev.* 18, 2183-2194.
- Giordano FJ, 2005. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J. Clin. Invest.* 115, 500-508.
- Godarzi SM, Gorji AV, Gholizadeh B, Mard SA, Mansouri E, 2020. Antioxidant effect of p-coumaric acid on interleukin 1- β and tumor necrosis factor- α in rats with renal ischemic reperfusion. *Nefrologia*, 40, 3, 311-319.
- Granata S, Votrico V, Spadaccino F, Catalano V, Netti GS, Ranieri E, Stallone G, Zaza, G, 2022. Oxidative Stress and Ischemia/Reperfusion Injury in Kidney Transplantation: Focus on Ferroptosis,
- Ha H, Yu MR, Choi YJ, Kitamura M, Lee HB, 2002. Role of high glucose-induced nuclear factor- κ B activation in monocyte chemoattractant protein-1 expression by mesangial cells. *Journal of the American Society of Nephrology*, 13, 4, 894-902.
- Haase VH, 2006. Hypoxia-inducible factors in the kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 291, 2, F271-F281.
- Hafizi R, Imeri F, Wenger RH, Huwiler A, 2021. S1P Stimulates Erythropoietin Production in Mouse Renal Interstitial Fibroblasts by S1P1 and S1P3 Receptor Activation and HIF-2 α Stabilization. *International journal of molecular sciences*, 22, 17, 9467.
- Han M, Li S, Xie H, Liu Q, Wang A, Hu S, Zhao X, Kong Y, Wang W, Li C, 2021. Activation of TGR5 restores AQP2 expression via the HIF pathway in renal ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 320, 3, F308-F321.
- Higgins DF, Kimura K, Iwano M, Haase VH, 2008. Hypoxia-inducible factor signaling in the development of tissue fibrosis. *Cell cycle*, 7, 9, 1128-1132.
- Hwang HS, Kim HA, 2015. Chondrocyte apoptosis in the pathogenesis of osteoarthritis. *International journal of molecular sciences*, 16, 11, 26035-26054.
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane W, Kaelin Jr WG, 2001. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science*, 292, 5516, 464-468.
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CF, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, 2001. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, 292, 5516, 468-472.
- Jan R, 2019. Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 9, 2, 205.

- Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, Bauer C, Wenger RH, Gassmann M, 2001. Induction of HIF-1 α in response to hypoxia is instantaneous. *The FASEB Journal*, 15, 7, 1312-1314.
- Jiang M, Qi L, Li L, Li Y, 2020. The caspase-3/GSDME signal pathway as a switch between apoptosis and pyroptosis in cancer. *Cell death discovery*, 6, 1, 1-11.
- Joshi R, Kulkarni YA, Wairkar S, 2018. Pharmacokinetic, pharmacodynamic and formulations aspects of Naringenin: An update. *Life sciences*, 215, 43-56.
- Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ, 2012. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 298, 229–317.
- Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ, 2016. Ischemia/reperfusion. *Compr. Physiol.* 7, 113–170.
- Kalyanaraman B, 2013. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox biology*, 1, 1, 244-257.
- Kayacan S, Sener LT, Melikoglu G, Kultur S, Albeniz I, Ozturk M, 2018. Induction of apoptosis by *Centaurea nerimaniae* extract in HeLa and MDA-MB-231 cells by a caspase-3 pathway. *Biotechnic & Histochemistry*, 93, 5, 311-319.
- Kezić A, Stajic N, Thaïss F, 2017. Innate immune response in kidney ischemia/reperfusion injury: potential target for therapy. *Journal of immunology research*, 2017.
- Khan O, La Thangue NB, 2012. HDAC inhibitors in cancer biology: emerging mechanisms and clinical applications. *Immunol. Cell Biol.* 90, 85–94.
- Kinsey GR, Li L, Okusa MD, 2008. Inflammation in acute kidney injury. *Nephron Experimental Nephrology*, 109, 4, e102-e107.
- Koch A, Pfeilschifter J, Huwiler A, 2013. Sphingosine 1-phosphate in renal diseases. *Cellular physiology and biochemistry*, 31, 6, 745-760.
- Korkmaz A, Kolankaya D, 2013. Inhibiting inducible nitric oxide synthase with rutin reduces renal ischemia/reperfusion injury. *Canadian Journal of Surgery*, 56, 1, 6.
- Krysko DV, Agostinis P, Krysko O, Garg AD, Bachert C, Lambrecht BN, Vandenabeele P, 2011. Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. *Trends Immunol.* 32, 157–164.
- Lafrance JP, Miller DR, 2010. Acute kidney injury associates with increased long-term mortality. *Journal of the American Society of Nephrology*, 21, 2, 345-352.
- Li BY, Liu Y, Li ZH, An XL, Xiao SS, Liu GK, Zhang J, 2020. Dexmedetomidine promotes the recovery of renal function and reduces the inflammatory level in renal ischemia-reperfusion injury rats through PI3K/Akt/HIF-1 α signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 24, 23, 12400-12407.
- Li F, Zhan Z, Qian J, Cao C, Yao W, Wang N, 2021. Naringin attenuates rat myocardial ischemia/reperfusion injury via PI3K/Akt pathway-mediated inhibition of apoptosis, oxidative stress and autophagy. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 22, 2, 1-8.
- Li P, Liu Y, Qin X, Chen K, Wang R, Yuan L, Chen X, Hao C, Huang X, 2021. SIRT1 attenuates renal fibrosis by repressing HIF-2 α . *Cell Death Discovery*, 7, 1, 1-10.
- Liu H, Li Y, Xiong J, 2022. The Role of Hypoxia-Inducible Factor-1 Alpha in Renal Disease. *Molecules*, 27, 21, 7318.
- Liu H, Wang L, Weng X, Chen H, Du Y, Diao C, Chen Z, Liu X, 2019. Inhibition of Brd4 alleviates renal ischemia/reperfusion injury-induced apoptosis and endoplasmic reticulum stress by blocking FoxO4-mediated oxidative stress. *Redox biology*, 24, 101195.
- Liu L, Zhang P, Bai M, He L, Zhang L, Liu T, Yang Z, Duan M, Liu M, Liu B, Du R, Qian Q, Sun S, 2019. p53 upregulated by HIF-1 α promotes hypoxia-induced G2/M arrest and renal fibrosis in vitro and in vivo. *Journal of Molecular Cell Biology*, 11, 5, 371-382.

- Liu M, Ning X, Li R, Yang Z, Yang X, Sun S, Qian Q, 2017. Signalling pathways involved in hypoxia-induced renal fibrosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21, 7, 1248-1259.
- Liu M, Zou W, Yang C, Peng W, Su W, 2012. Metabolism and excretion studies of oral administered naringin, a putative antitussive, in rats and dogs. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 33, 3, 123-134.
- Liu T, Cao H, Ji Y, Pei Y, Yu Z, Quan Y, Xiang M, 2015. Interaction of dendritic cells and T lymphocytes for the therapeutic effect of Dangguiliuhuang decoction to autoimmune diabetes. *Scientific reports*, 5, 1, 1-15.
- Liu X, Chen W, Tu Y, Hou H, Huang X, Chen X, Guo Z, Bai G, Chen W, 2018. The abnormal functional connectivity between the hypothalamus and the temporal gyrus underlying depression in Alzheimer's disease patients. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10, 37.
- Liu Y, 2011. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nature Reviews Nephrology*, 7, 12, 684-696.
- Liu Z, Meng Y, Miao Y, Yu L, Yu Q, 2021. Propofol reduces renal ischemia/reperfusion-induced acute lung injury by stimulating sirtuin 1 and inhibiting pyroptosis. *Aging (Albany NY)*, 13, 1, 865.
- Louis K, Hertig A, 2015. How tubular epithelial cells dictate the rate of renal fibrogenesis ? *World Journal of Nephrology*, 4, 3, 367.
- Malek M, Nematbakhsh M, 2015. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. *Journal of renal injury prevention*, 4, 2, 20.
- Malysheva IE, Topchieva LV, Barysheva OY, Kurbatova IV, Vasykova OA, Vezikova NN, Marusenko IM, Nemova NN, 2016. The level of cytokines and expression of caspase genes in rheumatoid arthritis. In *Doklady Biochemistry and Biophysics* (Vol. 468, No. 1, pp. 226-228). Pleiades Publishing.
- Mansour SG, Puthumana J, Coca SG, Gentry M, Parikh CR, 2017. Biomarkers for the detection of renal fibrosis and prediction of renal outcomes: a systematic review. *BMC nephrology*, 18, 1, 1-13.
- Martinez-Useros J, Li W, Cabeza-Morales M, Garcia-Foncillas J, 2017. Oxidative stress: a new target for pancreatic cancer prognosis and treatment. *Journal of clinical medicine*, 6, 3, 29.
- McIlwain DR, Berger T, Mak TW, 2015. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7, 4.
- Meng F, 2018. A novel role of HIF-1 α /PROX-1/LYVE-1 axis on tissue regeneration after renal ischaemia/reperfusion in mice. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 125, 4, 321-331.
- Mills EL, Kelly B, O'Neill LAJ, 2017. Mitochondria are the powerhouses of immunity. *Nat. Immunol.* 2017, 18, 488-498.
- Min Z, Yangchun L, Yuquan W, Changying Z, 2019. Quercetin inhibition of myocardial fibrosis through regulating MAPK signaling pathway via ROS. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 32.
- Moghaddam RH, Samimi Z, Moradi SZ, Little PJ, Xu S, Farzaei MH, 2020. Naringenin and naringin in cardiovascular disease prevention: A preclinical review. *European Journal of Pharmacology*, 887, 173535.
- Mohamed MS, Bishr MK, Almutairi FM, Ali AG, 2017. Inhibitors of apoptosis: clinical implications in cancer. *Apoptosis*, 22, 12, 1487-1509.
- Moore E, Bellomo R, 2011. Erythropoietin (EPO) in acute kidney injury. *Annals of intensive care*, 1, 1, 1-10.
- Morgan MJ, Liu ZG, 2011. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell research*, 21, 1, 103-115.

- Mostafa SM, Aly AA, Bräse S, Nieger M, Abdelhafez SMN, Abdelzaher WY, Abdelhafez ESM, 2022. Synthesis, Characterization, and In Vivo Study of Some Novel 3, 4, 5-Trimethoxybenzylidene-hydrazinecarbothioamides and Thiadiazoles as Anti-Apoptotic Caspase-3 Inhibitors. *Molecules*, 27, 7, 2266.
- Nagata S, 2018. Apoptosis and clearance of apoptotic cells. *Annu Rev Immunol*, 36, 1, 489-517.
- Nangaku M, Rosenberger C, Heyman SN, Eckardt KU, 2013. Regulation of hypoxia-inducible factor in kidney disease. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 40, 2, 148-157.
- Nightingale KP, O'Neill LP, Turner BM, 2006. Histone modifications: signalling receptors and potential elements of a heritable epigenetic code. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16, 125–136.
- Orrego-Lagarón N, Martínez-Huélamo M, Vallverdú-Queralt A, Lamuela-Raventos RM, Escribano-Ferrer E, 2015. High gastrointestinal permeability and local metabolism of naringenin: influence of antibiotic treatment on absorption and metabolism. *British Journal of Nutrition*, 114, 2, 169-180.
- Pan SY, Tsai PZ, Chou YH, Chang YT, Chang FC, Chiu YL, Chiang WC, Hsu T, Chen YM, Chu TS, Lin SL, 2021. Kidney pericyte hypoxia-inducible factor regulates erythropoiesis but not kidney fibrosis. *Kidney International*, 99, 6, 1354-1368.
- Perez-Meseguer J, Torres-González L, Gutiérrez-González JA, Alarcón-Galván G, Zapata-Chavira H, Waksman-de Torres N, Moreno-Peña DP, Muñoz-Espinosa LE, Cordero-Pérez P, 2019. Anti-inflammatory and nephroprotective activity of *Juglans mollis* against renal ischemia–reperfusion damage in a Wistar rat model. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19, 1, 1-9.
- Pharmacopoeia C, 2010. Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China.
- Pi J, Zhang Q, Fu J, Woods CG, Hou Y, Corkey BE, Collins S, Andersen ME, 2010. ROS signaling, oxidative stress and Nrf2 in pancreatic beta-cell function. *Toxicology and applied pharmacology*, 244, 1, 77-83.
- Pu X, Storr SJ, Zhang Y, Rakha EA, Green AR, Ellis IO, Martin SG, 2017. Caspase-3 and caspase-8 expression in breast cancer: caspase-3 is associated with survival. *Apoptosis*, 22, 3, 357-368.
- Qi X, Gurung P, Malireddi RS, Karmaus PW, Sharma D, Vogel P, Chi H, Green DR, Kanneganti TD, 2017. Critical role of caspase-8-mediated IL-1 signaling in promoting Th2 responses during asthma pathogenesis. *Mucosal immunology*, 10, 1, 128-138.
- Raja Kumar S, Mohd Ramli ES, Abdul Nasir NA, Ismail NHM, Mohd Fahami NA, 2019. Preventive effect of naringin on metabolic syndrome and its mechanism of action: A systematic review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019.
- Ray PD, Huang BW, Tsuji Y, 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling*, 24, 5, 981-990.
- Rider P, Carmi Y, Voronov E, Apte RN, 2013. Interleukin-1 α . In *Seminars in immunology* (Vol. 25, No. 6, pp. 430-438). Academic Press.
- Rogers C, Erkes DA, Nardone A, Aplin AE, Fernandes-Alnemri T, Alnemri E. S, 2019. Gasdermin pores permeabilize mitochondria to augment caspase-3 activation during apoptosis and inflammasome activation. *Nature communications*, 10, 1, 1-17.
- Rogers C, Fernandes-Alnemri T, Mayes L, Alnemri D, Cingolani G, Alnemri ES, 2017. Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death. *Nature communications*, 8, 1, 1-14.
- Sagulenko V, Lawlor KE, Vince JE, 2016. New insights into the regulation of innate immunity by caspase-8. *Arthritis Research & Therapy*, 18, 1, 1-3.

Salehi B, Fokou PVT, Sharifi-Rad M, Zucca P, Pezzani R, Martins N, Sharifi-Rad J, 2019. The therapeutic potential of naringenin: a review of clinical trials. *Pharmaceutics*, 12, 1, 11.

Schietke R, Warnecke C, Wacker I, Schödel J, Mole DR, Campean V, Amann K, Goppelt-Strube M, Behrens J, Eckardt KU, Wiesener MS, 2010. The lysyl oxidases LOX and LOXL2 are necessary and sufficient to repress E-cadherin in hypoxia: insights into cellular transformation processes mediated by HIF-1. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 9, 6658-6669.

Schietke RE, Hackenbeck T, Tran M, Günther R, Klanke B, Warnecke CL, Knaup KX, Shukla D, Rosenberger C, Koesters R, Bachmann S, Betz P, Schley G, Schödel J, Willam C, Winkler T, Amann K, Eckardt KU, Maxwell P, Wiesener MS, 2012. Renal tubular HIF-2 α expression requires VHL inactivation and causes fibrosis and cysts. *PloS one*, 7, 1, e31034.

Scholz CC, Cavadas MA, Tambuwala MM, Hams E, Rodríguez J, Kriegsheim AV, Cotter P, Bruning U, Fallon PG, Cheong A, Cummins EP Taylor CT, 2013. Regulation of IL-1 β -induced NF- κ B by hydroxylases links key hypoxic and inflammatory signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 46, 18490-18495.

Schröder K, 2019. NADPH oxidases in bone homeostasis and osteoporosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 132, 67-72.

Sedeek M, Nasrallah R, Touyz RM, Hébert RL, 2013. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and the kidney: friend and foe. *Journal of the American Society of Nephrology*, 24, 10, 1512-1518.

Semenza GL, 2004. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology*, 19, 4, 176-182.

Sendoel A, Hengartner MO, 2014. Apoptotic cell death under hypoxia. *Physiology*, 29, 3, 168-176.

Shakeri R, Kheirollahi A, Davoodi J, 2017. Apaf-1: Regulation and function in cell death. *Biochimie*, 135, 111-125.

Shan Y, Chen D, Hu B, Xu G, Li W, Jin Y, Jin X, Jin L, 2021. Allicin ameliorates renal ischemia/reperfusion injury via inhibition of oxidative stress and inflammation in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 142, 112077.

Shen H, Kreisel D, Goldstein DR, 2013. Processes of sterile inflammation. *The Journal of Immunology*, 191, 6, 2857-2863.

Shi X, Wu Y, Li E, Zhang L, Ma Y, Wei G, Li X, Wang S, 2022. The Inhibitory Effects of Naringin in a Rat Model of Postoperative Intraperitoneal Adhesion Formation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022.

Shu S, Wang Y, Zheng M, Liu Z, Cai J, Tang C, Dong Z, 2019. Hypoxia and hypoxia-inducible factors in kidney injury and repair. *Cells*, 8, 3, 207.

Singh B, Singh JP, Kaur A, Singh N, 2020. Phenolic composition, antioxidant potential and health benefits of citrus peel. *Food Research International*, 132, 109114.

Singh PK, Kumar A, 2016. Mitochondria mediates caspase-dependent and independent retinal cell death in *Staphylococcus aureus* endophthalmitis. *Cell Death Discovery*, 2, 1, 1-11.

Smith SF, Hosgood SA, Nicholson ML, 2019. Ischemia-reperfusion injury in renal transplantation: 3 key signaling pathways in tubular epithelial cells. *Kidney international*, 95, 1, 50-56.

Song SH, Zhai YK, Li CQ, Yu Q, Lu Y, Zhang Y, Hua WP, Wang ZZ, Shang P, 2016. Effects of total flavonoids from *Drynariae Rhizoma* prevent bone loss in vivo and in vitro. *Bone reports*, 5, 262-273.

Sun C, Liu H, Guo J, Yu Y, Yang D, He F, Du Z, 2017. MicroRNA-98 negatively regulates myocardial infarction-induced apoptosis by down-regulating Fas and caspase-3. *Scientific reports*, 7, 1, 1-11.

Sun DK, Wang L, Zhang P, 2017. Antitumor effects of chrysanthemin in PC-3 human prostate cancer cells are mediated via apoptosis induction, caspase signalling pathway and loss of mitochondrial membrane potential. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 14,4, 54-61.

Tanaka T, Wiesener M, Bernhardt W, Eckardt KU, Warnecke C, 2009. The human HIF (hypoxia-inducible factor)-3 α gene is a HIF-1 target gene and may modulate hypoxic gene induction. *Biochemical Journal*, 424, 1, 143-151.

Tang J, Zhuang S, 2019. Histone acetylation and DNA methylation in ischemia/reperfusion injury. *Clinical Science*, 133, 4, 597-609.

Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA, 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *cell*, 139, 5, 871-890.

Tsai TH, 2002. Determination of naringin in rat blood, brain, liver, and bile using microdialysis and its interaction with cyclosporin a, a p-glycoprotein modulator. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50, 23, 6669-6674.

Wang CC, Li H, Zhang M, Li XL, Yue LT, Zhang P, Zhao Y, Wang S, Duan RN, Li YB, Duan RS, 2015. Caspase-1 inhibitor ameliorates experimental autoimmune myasthenia gravis by innate dendritic cell IL-1-IL-17 pathway. *Journal of Neuroinflammation*, 12, 1, 1-11.

Wang L, Li K, Lin X, Yao Z, Wang S, Xiong X, Ning Z, Wang J, Xu X, Jiang Y, Liu D, Chen Y, Zhang D, Zhang H, 2019. Metformin induces human esophageal carcinoma cell pyroptosis by targeting the miR-497/PELP1 axis. *Cancer Letters*, 450, 22-31.

Wang R, Wu G, Dai T, Lang Y, Chi Z, Yang S, Dong D, 2021. Naringin attenuates renal interstitial fibrosis by regulating the TGF- β /Smad signaling pathway and inflammation. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 21, 1, 1-1.

Wang W, Li H, Yu J, Hong M, Zhou J, Zhu L, Wang Y, Luo M, Xia Z, Yang ZJ, Tang T, Ren P, Huang X, Wang J, 2016. Protective effects of Chinese herbal medicine *Rhizoma drynariae* in rats after traumatic brain injury and identification of active compound. *Molecular Neurobiology*, 53, 7, 4809-4820.

Wang WX, Zhao ZR, Bai Y, Li YX, Gao XN, Zhang S, Sun YB, 2022. Sevoflurane preconditioning prevents acute renal injury caused by ischemia-reperfusion in mice via activation of the Nrf2 signaling pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 23, 4, 1-11.

Wang XJ, Cao Q, Zhang Y, Su XD, 2015. Activation and regulation of caspase-6 and its role in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 55, 1, 553-572.

Wang Y, Gao W, Shi X, Ding J, Liu W, He H, Wang K, Shao F, 2017. Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin. *Nature*, 547, 7661, 99-103.

Wang Y, He J, Pei X, Zhao W, 2013. Systematic review and meta-analysis of mesenchymal stem/stromal cells therapy for impaired renal function in small animal models. *Nephrology*, 18, 3, 201-208.

Wang Z, Tang L, Zhu Q, Yi F, Zhang F, Li PL, Li N, 2011. Hypoxia-inducible factor-1 α contributes to the profibrotic action of angiotensin II in renal medullary interstitial cells. *Kidney international*, 79, 3, 300-310.

Wang Z, Zhu Q, Li PL, Dhaduk R, Zhang F, Gehr TW, Li N, 2014. Silencing of hypoxia-inducible factor-1 α gene attenuates chronic ischemic renal injury in two-kidney, one-clip rats. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 306, 10, F1236-F1242.

Wang ZS, Zhou HH, Han Q, Guo YL, Li ZY, 2020. Effects of grape seed proanthocyanidin B2 pretreatment on oxidative stress and renal tubular epithelial cell apoptosis after renal ischemia reperfusion in mice. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 35.

Warnecke C, Zaborowska Z, Kurreck J, Erdmann VA, Frei U, Wiesener M, Eckardt KU, 2004. Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α (EPAS-

1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2 α target gene in Hep3B and Kelly cells. *The FASEB Journal*, 18(12), 1462-1464.

Westra J, Brouwer E, Bos R, Posthumus MD, Doornbos-Van Der Meer B, Kallenberg CG, Limburg PC, 2007. Regulation of cytokine-induced HIF-1 α expression in rheumatoid synovial fibroblasts. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1108, 1, 340-348.

Woolbright BL, Ding WX, Jaeschke H, 2017. Caspase inhibitors for the treatment of liver disease: friend or foe?. *Expert review of gastroenterology & hepatology*, 11, 5, 397-399.

Wu H, Chadban SJ, 2014. Roles of Toll-like receptors in transplantation. *Current opinion in organ transplantation*, 19, 1, 1-7.

Wu MY, Yiang GT, Liao WT, Tsai AP, Cheng YL, Cheng PW, Li CY, Li CJ, 2018. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cell. Physiol. Biochem*. 46, 1650–1667.

Wu TJ, Hsieh YJ, Lu CW, Lee CJ, Hsu BG, 2021. Linagliptin protects against endotoxin-induced acute kidney injury in rats by decreasing inflammatory cytokines and reactive oxygen species. *International journal of molecular sciences*, 22, 20, 11190.

Wu Y, Chen W, Zhang Y, Liu A, Yang C, Wang H, Zhu T, Fan Y, Yang B, 2020. Potent therapy and transcriptional profile of combined erythropoietin-derived peptide cyclic helix B surface peptide and caspase-3 siRNA against kidney ischemia/reperfusion injury in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 375, 1, 92-103.

Xia W, Li Y, Wu M, Jin Q, Wang Q, Li S, Huang S, Zhang A, Zhang Y, Jia Z, 2021. Gasdermin E deficiency attenuates acute kidney injury by inhibiting pyroptosis and inflammation. *Cell death & disease*, 12, 2, 1-15.

Xiao Z, Shan J, Li C, Luo L, Lu J, Li S, Long D, Li Y, 2013. Mechanisms of cyclosporine-induced renal cell apoptosis: a systematic review. *American journal of nephrology*, 37, 1, 30-40.

Xie Y, Deng W, Hong Z, 2000. Study on drug-time process of osteopractic aurantiin in rhizoma drynariae. *Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology*.

Xiong X, Jiang J, Duan J, Xie Y, Wang J, Zhai S, 2014. Development and Validation of a Sensitive Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Method for the Determination of Naringin and Its Metabolite, Naringenin, in Human Plasma. *Journal of Chromatographic Science*, 52, 7, 654-660.

Yan BO, Min SJ, Xu B, Zhang C, Pei J, Zhang W, Luo GH, 2021. The protective effects of exogenous spermine on renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Translational Andrology and Urology*, 10, 5, 2051.

Yang Y, Yu X, Zhang Y, Ding G, Zhu C, Huang S, Jia Z, Zhang A, 2018. Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitor roxadustat (FG-4592) protects against cisplatin-induced acute kidney injury. *Clinical Science*, 132, 7, 825-838.

Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR, 1993. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *Cell*, 75, 4, 641-652.

Zeng X, Su W, Liu B, Chai L, Shi R, Yao H, 2020. A review on the pharmacokinetic properties of naringin and its therapeutic efficacies in respiratory diseases. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 20, 4, 286-293.

Zeng X, Su W, Zheng Y, He Y, He Y, Rao H, Peng W, Yao H, 2019. Pharmacokinetics, tissue distribution, metabolism, and excretion of naringin in aged rats. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 34.

Zeng X, Yao H, Zheng Y, He Y, He Y, Rao H, Li P, Su W, 2020. Tissue distribution of naringin and derived metabolites in rats after a single oral administration. *Journal of Chromatography B*, 1136, 121846.

Zeng X, Zheng Y, He Y, Peng W, Su W, 2022. A Rapid LC-MS/MS Method for Simultaneous Determination of Ten Flavonoid Metabolites of Naringin in Rat Urine and Its Application to an Excretion Study. *Foods*, 11, 3, 316.

Zhang H, Xu R, Wang Z, 2021. Contribution of oxidative stress to HIF-1-mediated profibrotic changes during the kidney damage. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021.

Zhang H, Zhang HM, Wu LP, Tan DX, Kamat A, Li YQ, Katz MS, Abboud HE, Reiter RJ, Zhang BX, 2011. Impaired mitochondrial complex III and melatonin responsive reactive oxygen species generation in kidney mitochondria of db/db mice. *Journal of pineal research*, 51, 3, 338-344.

Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, Brohi K, Itagaki K., Hauser CJ, 2010. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 2010, 464, 104–107.

Zhang Y, Jiang J, Shen H, Chai Y, Wei X, Xie Y, 2017. Total flavonoids from *Rhizoma Drynariae* (Gusuibu) for treating osteoporotic fractures: implication in clinical practice. *Drug Design, Development and Therapy*, 11, 1881.

Zhang YH, Shangguan WJ, Zhao ZJ, Zhou FC, Liu HT, Liang ZH, Song J, Shao J, 2022. Naringin Inhibits Apoptosis Induced by Cyclic Stretch in Rat Annular Cells and Partially Attenuates Disc Degeneration by Inhibiting the ROS/NF- κ B Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022.

Zhao H, Jiang N, Han Y, Yang M, Gao P, Xiong X, Xiong S, Zeng L, Xiao Y, Wei L, Li L, Li C, Yang J, Tang C, Xiao L, Liu F, Liu Y, Sun L, 2020. Aristolochic acid induces renal fibrosis by arresting proximal tubular cells in G2/M phase mediated by HIF-1 α . *The FASEB Journal*, 34, 9, 12599-12614.

Zhu S, Wu L, Zhang J, Miao Y, Zhao Y, Zeng M, Li D, Wu H, 2020. Collagen hydrolysate corrects anemia in chronic kidney disease via anti-inflammatory renoprotection and HIF-2 α -Dependent erythropoietin and hepcidin regulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68, 42, 11726-11734.