

Nekroptozis: Serebral ve Miyokardiyal İskemi/Reperfüzyon Hasarı İçin Terapötik Bir Hedef Midir?

Necroptosis: A Therapeutic Target for Cerebral and Myocardial Ischaemia/Reperfusion Injury?

Zehra YILMAZ¹ ¹Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa, TÜRKİYE

Öz

Programlı bir hücre ölümü olan nekroptozun, iskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarına olan katkısını ve önemini tanımlamak için kapsamlı çalışmalar yürütülmüştür. Bu hücre hasarı süreci, iskemik inme ve miyokard infarktüsünün patofizyolojisinde kritik bir rol oynamaktadır. Reseptörle etkileşen protein kinazları (RIPK1 ve RIPK3) ve karışık soy kinaz alanı benzeri psödokinazı (MLKL) içeren nekroptozun, kanonik sinyal yolunun bileşenlerinin modülasyonunun nöroprotektif ve kardiyoprotektif etkiler ortaya çıkardığı belgelenmiştir. Bu koruyucu etkiler, infarkt boyutunun küçülmesi ve nörolojik defisitlerin, miyokardiyal disfonksiyonun ve olumsuz kardiyak yeniden şekillenmenin hafifletilmesidir. Son zamanlarda, serebral ve miyokardiyal İ/R hasarında nekroptozun RIPK1-RIPK3-MLKL kanonik moleküler sinyalizasyonuna ek olarak, RIPK3'ün kalmodulin bağımlı protein kinaz IIδ (CaMKIIδ), fosfogliserat mutaz 5 (PGAM5), dynamin-related protein 1 (Drp-1), apoptozu indükleyen faktör (AIF), ksantin oksidaz (XO) ve ölümle ilişkili protein (DAXX) gibi aşağı akış molekülleri etkilediği gösterilerek nekroptozun kanonik olmayan yolları da tanımlanmıştır. Bu derlemede serebral ve miyokardiyal İ/R hasarında nekroptozun rolü ve nekroptozu baskılayan farmakolojik ajanların ve genetik modifikasyonların bu hasar üzerine terapötik etkileri ile ilgili *in vitro* ve *in vivo* deneysel modellerden elde edilen kanıtlar özetlenmekte ve tartışılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Serebral, Miyokardiyal, İskemi/reperfüzyon hasarı, Nekroptozis, RIPK1, RIPK3, MLKL

Abstract

Extensive studies have been conducted to define the contribution and significance of necroptosis, a programmed cell death, to ischemia/reperfusion (I/R) injury. This cell damaging process plays a critical role in the pathophysiology of ischemic stroke and myocardial infarction. It has been documented that modulation of components of the canonical signaling pathway of necroptosis involving receptor-interacting protein kinases (RIPK1 and RIPK3) and mixed lineage kinase domain-like pseudokinase (MLKL) elicits neuroprotective and cardioprotective effects. These protective effects are the reduction of infarct size, and alleviation of neurological deficits, myocardial dysfunction, and adverse cardiac remodeling. Recently, in addition to RIPK1-RIPK3-MLKL canonical molecular signaling of necroptosis in cerebral and myocardial I/R injury, non-canonical pathways of necroptosis have been identified by showing that RIPK3 affects downstream molecules such as calmodulin-dependent protein kinase IIδ (CaMKIIδ), phosphoglycerate mutase 5 (PGAM5), dynamin-related protein 1 (Drp-1), apoptosis-inducing factor (AIF), xanthine oxidase and death-associated protein (DAXX). This review summarizes and discusses evidence from *in vitro* and *in vivo* experimental models regarding the role of necroptosis in cerebral and myocardial I/R injury and the therapeutic effects of pharmacological agents and genetic modifications that suppress necroptosis on this injury.

Key Words: Cerebral, Myocardial, Ischemia/reperfusion injury, Necroptosis, RIPK1, RIPK3, MLKL

Sorumlu Yazar/Corresponding Author

Dr. Zehra YILMAZ

Harran Üniversitesi, Osmanbey Kampüsü,
Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim
Dalı, 63300, Haliliye, Şanlıurfa, TÜRKİYE

E-mail: zehrayilmaz@harran.edu.tr

Geliş tarihi / Received: 11.08.2023

Kabul tarihi / Accepted: 28.08.2023

DOI: 10.35440/hutfd.1341349

Giriş

İskemi, doku veya organa giden kan akımının herhangi bir nedene bağlı olarak belirgin bir şekilde azalma veya tamamen kesilmesi sonucunda perfüzyonun bozulmasıdır. İskemik durumda perfüzyonun bozulması dokuda hipoksi, yetersiz beslenme ve dokudan uzaklaştırılmayan metabolik ürünlere bağlı metabolik asidoz gelişimine neden olur. Reperfüzyon ise, kan akımının iskemi sonrasında yeniden sağlanmasıdır. Reperfüzyon, iskemi sürecinin sonlanması ve iskemik hasarın tedavisi için klinik anlamda gereklidir. Bununla birlikte reperfüzyon sağlandıktan sonra, dokuda reaktif oksijen radikallerinin (ROS) arttığı ve lokal inflamasyonun geliştiği gözlenir. Böylece iskemi ile başlayan hasar reperfüzyonla beraber artar ve bu durum iskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarı olarak adlandırılır (1).

İ/R hasarı akut koroner sendromlar, serebral iskemik inme, pulmoner emboli, organ transplantasyonu, organ laserasyonları, testis torsiyon/detorsiyonu, hemorajik şok ve resüsitasyon gibi mortalitesinin yüksek ve/veya morbiditesinin önemli olduğu pek çok klinik durumun patofizyolojisinde yer alır (2–9). Özellikle serebral ve miyokardiyal İ/R hasarı ister gelişmiş ister gelişmekte olan ülkelerde yaşayan insanları etkilemesi; her iki cinsten ve ileri yaş dönemindeki popülasyonda ortaya çıkabilmesi; hayati önem taşıması veya organ fonksiyonunun bozulmasına neden olması ile günümüzde ve gelecekte bilimsel araştırmaların odak noktalarından biri olmaya devam edecektir.

İ/R hasarı karışık birçok patofizyolojik süreci içermektedir. İskemi, mitokondrilerde elektron transport zincirinin disfonksiyonuna ve laktik asit birikimine yol açar. Mitokondrilerde anaerobik metabolizma sonucu azalan adenosin trifosfat (ATP) üretimi, hücre membranında yer alan sodyum-potasyum adenosin trifosfat (Na⁺/K⁺-ATPaz) ve endoplazmik retikulumda yer alan kalsiyum adenosin trifosfat (Ca⁺⁺-ATPaz) pompalarının disfonksiyonuna ve ribozomların ayrılmasına neden olur. Bu pompaların fonksiyonlarının bozulması, iskemik hücrede sodyum, kalsiyum ve hidrojen birikimine ve bu birikime bağlı hiperosmolariteye neden olarak, sitoplazma içerisine su geçişine ve hücrelerin şişmesine neden olur. Hidrojen birikimi hücresel pH'yı düşürerek enzim aktivitesinin bozulmasına ve nükleer kromatinin kümelenmesine yol açar. Ribozomların ayrılması protein sentezini azaltır (10,11). Reperfüzyon aşamasında dokuya oksijen sağlanması, reperfüzyon hasarına neden olan ROS üretimine (12), dokuda lökositlerin toplanmasına ve inflamatuvar immün cevabı içeren sitotoksik mekanizmaların devreye girmesine neden olur (13).

Bu süreçte hücrelerin cevabı, İ/R'nin süresi ve şiddetine bağlı olarak değişebilir (7). İ/R hasarına uğrayan hücreler fonksiyonlarını geçici olarak ya da tamamen kaybedebilir, kendilerini onarabilir/yaşayabilir veya ölüme gidebilir. Kısa süreli miyokard iskemisi sonrası gelişen geçici miyosit kontraktıl disfonksiyonu olan "stunning/sersemleme" ya da uzun süreli iskemiler sonrası perfüzyonun azalmasıyla birlikte miyositlerin canlılığının korunduğu fakat miyokardiyal disfonksiyonun gözlemlendiği "hibernasyon" durumları İ/R hasarına bağlı geçici fonksiyon kayıplarına örnek verilebilir (14). Serebral iskemiyeye bağlı motor fonksiyon kaybı geçici veya kalıcı olabilir. İskemiyi takiben beyin dokusunda, iskemik çekirdek ve penumbra olarak adlandırılan peri-iskemik çekirdek olarak iki farklı alan tanımlanabilir. İskemik çekirdek bölgesindeki nöronlar hızla ölürken; iskemiden daha az etkilenen penumbradaki nöronlar işlevsel olarak baskılanır, ancak yine de yaşayabilirler (15). Uzayan ve/veya şiddetli İ/R hasarında, yukarıda bahsedilen mekanizmaların devreye girmesi ile nekrotik ve apoptotik hücre ölümü gözlenirken (16,17), morfolojik olarak nekroza benzeyen kinaz bağımlı bir programlı ölüm yoluyla olan nekroptozisin de bu hasara katkıda bulunabileceği ileri sürülmektedir (18).

İ/R hasarının patofizyolojisi henüz tam olarak aydınlatılmamıştır ve henüz kesin ve tam olarak etkili bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Beyin ve kalp gibi hayati önemi olan organların İ/R hasar patofizyolojisinde rol aldığı gösterilen yeni yolaklar/reseptörler/proteinler, hasarın önlenmesi veya tedavi edilmesinde yeni hedef noktalarının bulunması ve dolayısıyla yeni ilaçların keşfedilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Bu derlemede, literatürdeki son güncellenen bilgiler ışığında serebral ve miyokardiyal İ/R hasarında nekroptozis mekanizmalarını ve nekroptozisin terapötik hedef olarak potansiyel rolünü özetliyoruz.

Nekroptozis
İlk olarak Degterev ve ark., 2005 yılında yazdıkları bir makalede Fas/ tümör nekrozis faktör (TNF) reseptör ailesinin uyarılması sonucu apoptotik ölüm yolacağını içermeyen yeni bir programlı ölüm çeşidini belirlediklerini rapor etmişler ve bunu nekroptozis olarak tanımlamışlardır. Aynı makalede nekroptozisi inhibe eden nekrostatin-1 (Nec-1) adlı bir molekül bulduklarını, gecikmiş fare iskemik beyin hasarında nekroptozisin katkıda bulunduğunu ve iskemik inme sonrası nöronların korunmasında nekroptozisin yeni bir hedef olabileceğini bildirmişlerdir (18).

Nekroptozis

Nekroptozis TNF, Fas (CD95, Apo-1) ligandlar, interferon, TNF-ilişkili apoptozis-uyaran ligandlar (TRAIL), TNF-ilişkili apoptozisin zayıf uyarıcıları (TWEAK) ve T hücre reseptörlerinin uyarıcıları tarafından indüklenebilir (19,20). Bu uyarıcılardan en çok TNF'ye maruziyet sonrası ortaya çıkan nekroptozis araştırılmıştır. TNF'ye hücrelerin yanıtı karmaşıktır (Şekil 1). Çoğunlukla nükleer faktör kappa B (NF-κB) ve mitojenle aktive olan kinaz (MAPK)'ların aktivasyonuna yol açarak hücrenin hayatta kalmasına, proinflamasyona neden olurken bazı durumlarda apoptozis ve nekroptozise neden olabilir (21). TNF reseptörü 1'in (TNFR1) TNF-α tarafından uyarılması ile aşağı akış molekülleri organize bir şekilde toplanarak kompleks 1'in oluşmasına neden olurlar. Kompleks 1 içerisinde TNFR1, TNFR1 ile ilişkili ölüm alanı (TRADD), TNFR ilişkili faktör 2/5 (TRAF2/5), reseptör-etkileşimli serin/treonin protein kinaz 1 (RIPK1), apoptoz protein 1'in hücresel inhibitörü (cIAP1), cIAP2 ve lineer ubiquitin zincir montaj kompleksi (LUBAC) bulunmaktadır (22). Kompleks 1'de hücre ölümünü uyaran sinyaller ile hayatta kalma sinyalleri arasındaki geçiş kontrol eden bir dizi ubiquitinasyon ve deubikütinasyon reaksiyonları gerçekleşir. Kompleks 1'de yer alan cIAP'lar, RIPK1'i ubiquitinlayarak kompleks 1'in stabilleşmesini sağlar ve kompleks 1a'nın oluşmasını önler. Ayrıca cIAP'lar, dönüştürücü büyüme faktörü-β (TGFβ)-aktive kinaz 1 (TAK1) ve TAK1-bağlayan protein 2 (TAB2) gibi ek faktörlerin toplanmasını sağlar. LUBAC tarafından

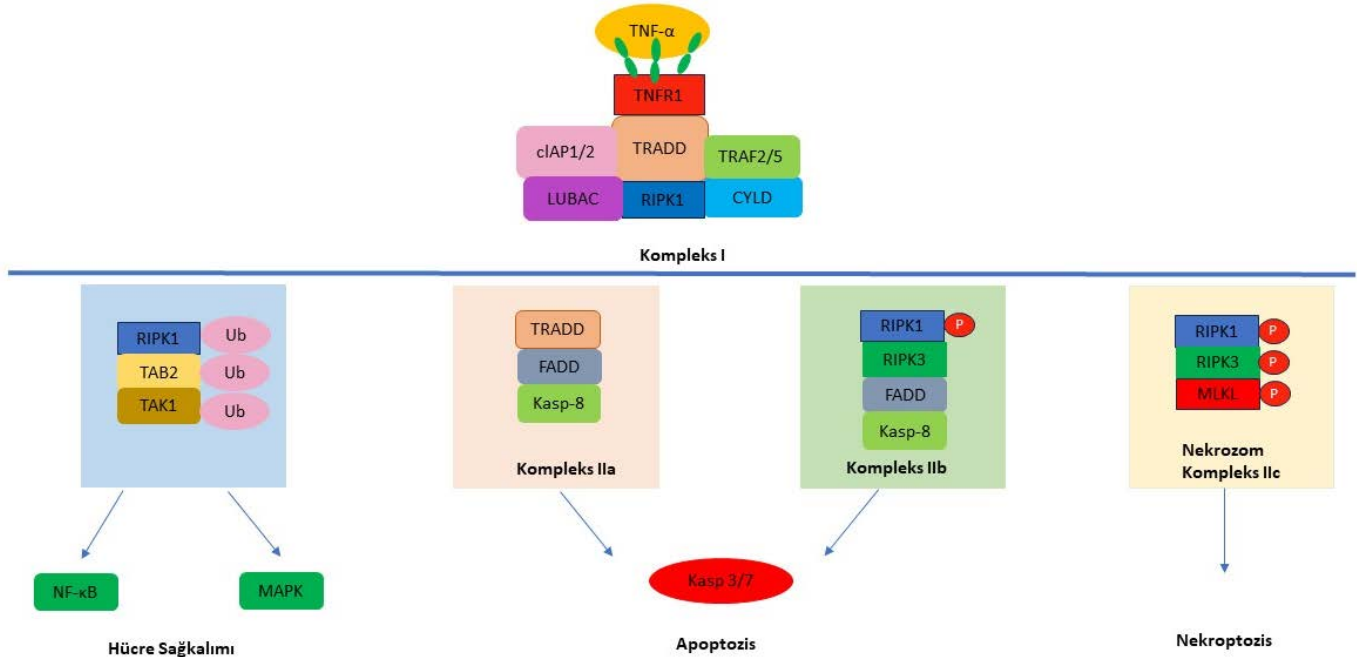
RIPK1'in lineer ubiquitinasyonu ile NF- κ B kinase inhibitörü (IKK) toplanır ve NF- κ B aktive edilir. Kompleks I, NF- κ B ve MAPK'ların aktivasyonuna bağlı anti-apoptotik genlerin up-regülasyonuna böylece hücrenin hayatta kalmasına aracılık eder (23).

Kompleks I'in stabilizasyonunun bozulması, apoptoz ve nekroptoz oluşumunu sağlayan farklı sinyal komplekslerinin kurulmasına aracılık eder. Silindramatozis (CYLD), RIPK1'den poliubiquitin zincirini kaldırarak kompleks I'in stabilizasyonunu bozar ve RIPK1'in TNFR1'den ayrılmasına ve sitozolik ölüm uyarıcı sinyal kompleksinin (DISC) oluşumuna neden olur (24,25). Bu sinyal komplekslerinden kompleks IIa RIPK1-bağımsız apoptozise, kompleks IIb RIPK1-bağımlı apoptozise ve kompleks IIc ise nekroptozise aracılık eder. Kompleks IIa, TRADD, RIPK1, prokaspaz-8 ve FAS-ile ilişkili ölüm domaini (FADD) içerir. Prokaspaz-8 kendini hızla aktive eder ve kaspaz-3 ve kaspaz-7'yi aktive ederek apoptozis gerçekleşir (19,26). Kompleks IIb ise RIPK1, RIPK3, FADD, kaspaz-8 içerir ve RIPK1 aktivitesine bağlı apoptozise neden olur. (24,27). Hücrenin RIPK1 bağımsız veya bağımlı apoptozisin hangisinin kullanılacağına FLICE benzeri inhibitör protein uzun izoformu (Flip_L) düzeyi ve RIPK1 aktivitesi önemlidir. RIPK1-bağımsız apoptozis yüksek düzeyde Flip_L ile inhibe edilirken RIPK1 bağımlı apoptozis RIPK1 inaktivasyonu ile inhibe edilir ve Flip_L düzeyinden etkilenmez (27). RIPK1 inhibitörü Nec-1 tarafından kompleks IIb inhibe edilebilir (28,29). Kompleks IIa'da aktive edilmiş kaspaz-8 tarafından RIPK1, RIPK3 ve CYLD aktiviteleri ortadan kaldırılır ve böylece nekroptozis bloke edilir. Kompleks I,

IIa ve IIb'nin ayrı oluşumları olarak bulunup bulunmadığı ya da kullanılabilirliğe bağlı olarak değişen kompozisyon ile dinamik geçiş durumlarının oluşturulup oluşturulmadığı ve kompleks bileşenlerinin çeviri sonrası değişiklikleri henüz tam açıklık kazanmamıştır (21).

Yeterli RIPK3 ve karışık soy kinaz alanı benzeri psödokinaz (MLKL) ekspresyonu varlığında ya da kaspaz-8 ekspresyonunun azaldığı ya da inhibe edildiği durumlarda nekrozom olarak adlandırılan kompleks IIc oluşur (30). Nekrozom kompleksi, bir seri oto-fosforilasyon aracılığıyla RIPK1 ve RIPK3'ün RIP homotipik etkileşme motif bölgesi yoluyla birleşir ve aktive olan RIPK3, MLKL'yi fosforile eder ve trimerizasyonunu sağlar. MLKL homotrimeri daha sonra plazma zarına translokasyon yapar ve nekroptozis yürütme mekanizmalarından biri olarak işlev gören nekrotik plazma membran permeabilizasyonuna neden olur (31,32). Alternatif olarak, bazı nekroptozis indükleyicileri, doğrudan RIPK3 veya MLKL'yi aktive etmek için RIPK1'i atlayabilir (33).

Nekrozomu oluşturan RIP1-RIP3-MLKL kompleksi, aşağıdaki molekülleri etkileyerek plazma membran permeabilizasyonu, ROS patlaması, sitozolik ATP indirgemesi gibi olayları yürütür (31,32,34). Ayrıca hücresel içeriklerin ve sitokinlerin dışarı atılmasıyla ortaya çıkan hasarla ilişkili moleküler yapılar (DAMP)'ın inflamatuvar etkisi hem doğal hem de uyarılabilir bağışıklık tepkilerini uyarır (24,35).



Şekil 1. Nekroptozun düzenleyici mekanizması (21-30,40). Nekroptoz, ölüm reseptörü sinyal yolağı tarafından indüklenir. TNFR1 ligasyonu TRADD, RIPK1, TRAF2, cIAP1/2 ve LUBAC'tan oluşan kompleks I'in toplanmasını tetikler. RIPK1'in ubiquitinasyonu, NF- κ B yolunu aktive ederek hücre sağkalımını destekler. Belirli bir durumda, RIPK1'in CYLD tarafından deubiquitinasyonu, kompleksin TRADD, FADD ve kaspaz-8'i almasına ve apoptozu aktive eden kompleks IIa'yı oluşturmasına neden olabilir. Kompleks IIb RIPK1, RIPK3, FADD ve pro-kaspaz-8'den oluşur ve RIPK1'e bağlı apoptoz ile sonuçlanır. Hücrenin kompleks IIa ya da kompleks IIb'den hangisini kullanacağına FLICE benzeri inhibitör protein uzun izoformu (Flip_L) düzeyi ve RIPK1 aktivitesi belirler. RIPK1-bağımsız apoptozis Flip_L ile inhibe edilirken RIPK1 bağımlı apoptozis RIPK1 inaktivasyonu ile inhibe edilir. Kaspaz-8'in yokluğunda, RIPK1 ve RIPK3'ün fosforilasyonu, nekrozom olarak adlandırılan pro-nekrotik kompleks içindeki birlikteliklerini stabilize eder. Aktive edilmiş RIPK3, plazma membranına translokasyon yapabilen ve membran permeabilizasyonuna ve nekroptotik hücre ölümüne aracılık eden MLKL'yi fosforile eder. **Kısaltmalar:** TNF α -tümör nekrozis faktör alfa, TNFR1-tümör nekrozis faktör alfa reseptör 1, TRADD-TNF reseptör ilişkili ölüm alanı proteini, RIPK-reseptör etkileşimli protein kinaz, TRAF2- tümör nekrozis faktör reseptör-ilişkili faktör 2, cIAP1/2- apoptoz protein 1'in hücresel inhibitörü 1/2, CYLD-silindramatozis, LUBAC-lineer ubiquitin zincir montaj kompleksi, TAK1-dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF β)-aktive kinaz 1, TAB2-TAK1-bağlayan protein 2, Kasp-kaspaz, MLKL- karışık soy kinaz alanı benzeri psödokinaz.

Nekroptozis inhibisyonu

Nekroptozis, Nec-1 (RIPK1 inhibitörü), GSK-843/-872/-840 (RIPK3 inhibitörü) ve nekrosülfonamid (MLKL inhibitörü) gibi kimyasal bileşikler tarafından farmakolojik olarak inhibe edilebilir (18,34). Nec-1 tarafından RIPK1'in inhibisyonu RIPK1'e bağlı apoptozisi ve nekroptozisi inhibe edebilir (28,29). Nec-1 aynı zamanda potent bir immunomodülatör enzim olan indolamin 2,3-dioksijenazı (IDO) ve ferroptozisi inhibe eder. Nec-1'in daha stabil analogu olan necrostatin-1s (Nec-1s) IDO aktivitesi bulunmayan daha spesifik RIPK1 inhibitörüdür (36). RIPK3 inhibitörü olan GSK'872'nin, nekroptozis ile ilişkili proteinleri ve hipoksi ile indüklenen faktör 1 α 'yı azaltarak iskemik beyin hasarında koruyucu olabileceği gösterilmiştir. RIPK3 inhibitörlerinin kullanılması ya da RIPK3 eksikliği durumlarında kompleks IIb'nin artabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (37,38). RIPK3'ü hedefleyen dabrafenib, asetaminofenle oluşturulan karaciğer hasarında koruyucu etki göstermiştir. Nekrosülfonamid (NSA)'in MLKL aktivasyonunun inhibisyonu yoluyla insan hücrelerinde nekroptozisi inhibe ettiği gösterilmiştir. RIPK1 ve RIPK3'ü inhibe eden GSK'074'ün, Nec-1'den daha potent ve daha az toksik bir inhibitör olduğu bildirilmektedir (39). Bununla beraber, NSA, Nec-1, GSK'872 ve GSK'074 gibi nekroptozis inhibitörlerinin suda zayıf bir şekilde çözülmesi acil durum tedavisinde intravenöz olarak kullanılmalarını zorlaştırmaktadır (40). "Food and Drug Administration" (FDA) tarafından onaylanan ponatinib ve pazopanibin, *in vitro* RIPK1 ve RIPK3 aktivitesini hedefleyerek nekroptozisi inhibe ettiği bildirilmektedir (41). Son zamanlarda NTB451 isimli yeni bir nekroptozis inhibitörü belirlenmiştir. NTB451'in RIPK1 ile etkileşip, RIPK1 ve RIPK3 kompleks oluşumunu inhibe ederek MLKL'nin fosforilasyonunu ve oligomerizasyonunu engellediği bildirilmektedir (42). Bununla birlikte bu ajanların hiçbirini nekroptozisi inhibe etmek için klinik kullanıma girmemiştir.

Nekroptozis ve Serebral İ/R hasarı

İnme, dünya genelinde motor fonksiyon kaybı, nörodavranışsal değişiklikler ve mortaliteye neden olan en önemli sağlık sorunlarından biridir. İskemik inme tüm inmelerin %80'den fazlasını oluşturur (15). Tedavide mekanik trombektomi ve trombolitik ajan kullanılmaktadır. Trombolitik tedavide kullanılan doku plazminojen aktivatörü, dar terapötik penceresi nedeniyle (yaklaşık 4,5-6 saat) inme hastalarının ancak %10'undan azının kullanımı için uygundur (15). Mekanik trombektomi tedavisinin, inme semptomlarının başlangıcından sonra geç süre, infarkt yükü ya da alanına göre uygun şekilde seçilmiş hastalarda uygulanması önerilmektedir (43). Bununla beraber, her iki tedavi şeklinde de reperfüzyonunun sağlanması, iskemik beyin dokusunda serebral İ/R hasarı olarak da bilinen ikincil beyin hasarına neden olabilir (44).

Serebral İ/R hasarı kan beyin bariyerinin (KBB) bozulmasına, inflamasyona ve ATP tükenmesine yol açar. Sıkı bağlantının bozulması nedeniyle KBB'nin artan geçirgenliği, astrositlerin yeniden şekillenmesi ile beyin ödemine ve artmış intrakraniyal basınca (45), mikrogliyal hiperaktivite ve NF κ B aktivasyonu ise serebral inflamasyona neden olur (46). İskemi sırasında mitokondriden ATP üretiminde azalma yanında aşırı ROS üretimi gerçekleşir ve

reperfüzyonda da bu durum devam eder. Böylece bozulmuş serebral kan akışı mitokondriyal disfonksiyona ve oksidatif strese neden olur. İskemiye bağlı oksijen ve glikoz yoksunluğu nöronlarda hızlı bir ATP tükenmesine neden olur (45). Plazma membranları daha sonra depolarizasyona uğrayarak aksonun presinaptik membranında ve somatodendritte voltaja bağlı kalsiyum kanallarının aktivasyonuna ve glutamat salıverilmesine yol açar. Böylece salınan glutamat, N-metil-D-aspartat (NDMA) reseptörlerini aktive eder (47). NMDA reseptörlerinin hiperaktivasyonu potansiyel olarak hücre içi kalsiyum yüklenmesine, ROS oluşumuna, mitokondriyal disfonksiyona ve nekroptozis yoluyla açar (48). Ayrıca hücre içi artan kalsiyum, kalsiyum/kalmodulin bağımlı protein kinaz II α 'nin (CaMKII α) aktivasyonu ile RIPK1'i doğrudan fosforile edebilir (49).

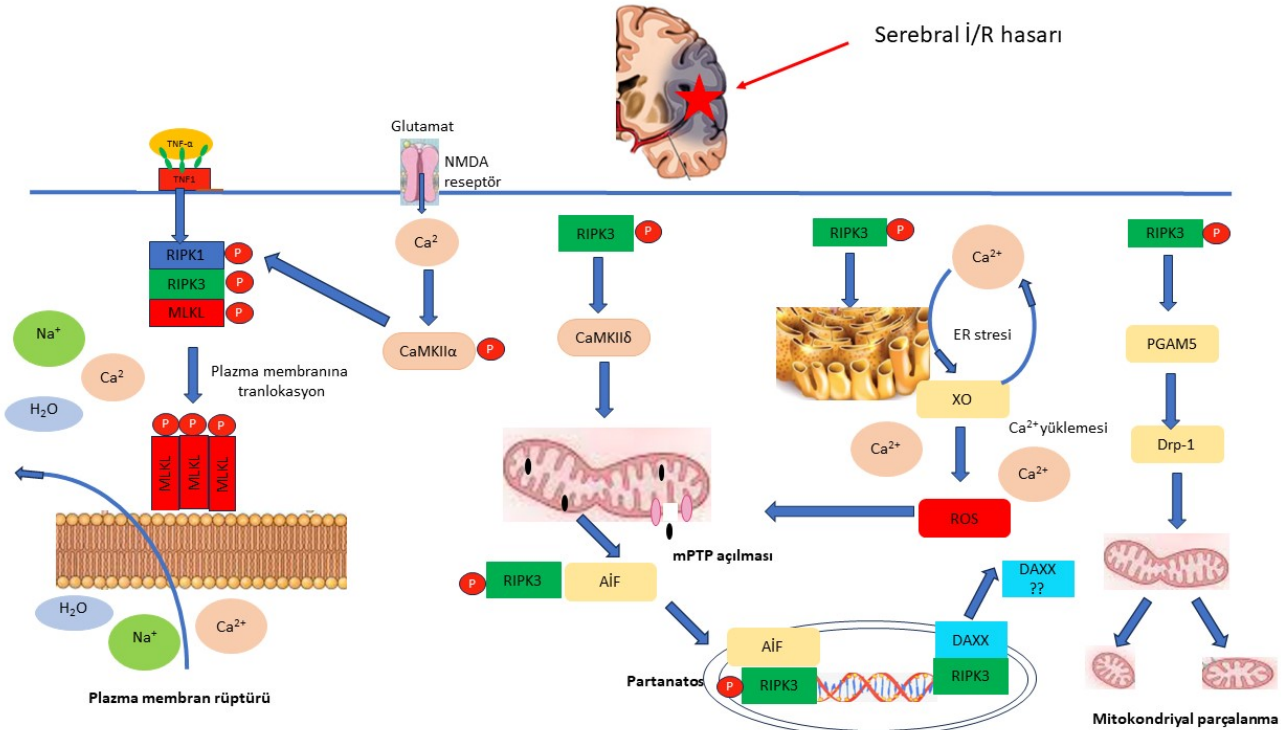
Araştırmacılar serebral İ/R hasarını ve patofizyolojisini *in vivo* veya *in vitro* deneysel modeller üzerinden incelemektedirler. İn-melerin büyük çoğunluğunun nedeni internal karotis arterin veya onun dalı olan orta serebral arterin oklüzyonu olduğu için *in vivo* deneylerde, sıklıkla orta serebral arter oklüzyonu (OSAO) modeli ya da iki taraflı karotis arter oklüzyonu ile yapılan global serebral arter oklüzyonu (GSAO) modeli uygulanmaktadır (50). İn vitro modelde, oksijen ve glukoz düşük (OGD) ortamla oluşturulan hipoksik koşullar iskemik ortamı taklit etmek için kullanılmaktadır (51–53).

Son zamanlarda bu deneysel modellerin kullanıldığı birçok çalışmada, nekrozoma katılan proteinlerin reperfüzyonun erken saatlerinde (ilk 24 saatte) anlamlı olarak yükseldiği (44,51,54–57), 48. saatte (55,58) ve hatta 72. saatte (51) bile anlamlı yüksek bulunduğu gösterilmiştir. Farelerde 1 saat süreli OSAO ile oluşturulan serebral iskemide, iskemiden sonra nöronlarda fosforile (p)-RIPK1 düzeyinde kontrol grubuna göre değişiklik gözlenmezken, reperfüzyonun 1. saatinden itibaren 23. saate kadar artış olduğu ve reperfüzyonun 48. saatinde kontrole geri döndüğü bildirilmiştir (54). Ek olarak, farelerde OSAO modeli ile 1 saat iskemiden sonra 24. saatte peri-infarkt alanda RIPK1, RIPK3, MLKL, p-RIPK1, p-RIPK3 ve p-MLKL düzeyleri sham grubundakilere göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (44). Benzer şekilde sıçanlarda OSAO modeli ile uygulanan 30 dakika iskemiden sonra reperfüzyonun 24. saatinde ipsilateral striatumda p-RIPK1, RIPK3 ve p-MLKL düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. İskemiden 30 dakika önce uygulanan RIPK1 inhibitörü Nec-1'in, infarkt hacmini ve nörolojik defisit ile birlikte p-RIPK1, RIPK3 ve p-MLKL düzeylerini de azalttığı bulunmuştur (59). Sıçanlarda uygulanan OSAO modeli ile 2 saat iskemiden sonra reperfüzyonun 72. saatinde ipsilateral kortekste RIPK1, RIPK3 ve MLKL'nin gen ekspresyonunda ve protein düzeyinde anlamlı artış; in vitro OGD modelinde ise primer kortikal nöronlara uygulanan 1,5 saat anoksi ve 2 saat re-oksijenizasyonun, benzer şekilde her üç belirtecin de gen ekspresyonunda ve protein düzeyinde anlamlı artış oluşturduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada reperfüzyonla birlikte uygulanmaya başlayan Nec-1 tedavisinin (1 mg/kg i.v. 3 gün süreyle günde bir kez) hem nekroptozis belirteçlerinin mRNA ve protein düzeylerini, hem de infarkt hacmini anlamlı olarak inhibe ettiği; bununla birlikte nörolojik ve patolojik skor azaltmakla birlikte anlamlı

etkilemediği bildirilmektedir (51). Bu sonuçlar, nekrozom bileşenlerinin reperfüzyonun ilk 24 saat içerisinde aktifleştiğini göstermekte ve RIPK1 inhibitörü Nec-1'in iskemiyi öncesi uygulamasının tedavide daha etkin olabileceği kanaatini oluşturmaktadır. Serebral iskemiyi sadece nöronlarda değil; aksonları, oligodendriogiaları ve diğer gliyal hücreleri içeren beyaz maddede de hasar geliştirmektedir. Oligodendrosit prekürsör hücreleri (OPC) ve prematür oligodendriogialar, matür olan oligodendriogialara göre iskemiyi daha duyarlıdır. İmmatür oligodendriogiaların iskemiyi daha duyarlı olması, inmeyi takiben gelişen demiyelinizasyonun altında yatan ihtimali bir patofizyolojik mekanizma olabileceğini düşündürmektedir (60). Fare OSAO modelinde ve *in vitro* OPC hücre kültüründe OGD uygulanarak Nec-1'in etkisi araştırılmıştır. Araştırma sonucunda iskemik ortamda subventriküler zon ve korpus kallozum bölgelerinde RIPK1, RIPK3, MLKL ve p-MLKL proteinlerinin arttığı ve Nec-1 tarafından bu proteinlerin ekspresyonlarının azaltıldığı, Nec-1'in anlamlı olarak OPC'lerdeki nekrozu inhibe ettiği, beyaz maddedeki zedelenme ile nörolojik fonksiyonları iyileştirdiği ve OPC'lerin yaşam süresini anlamlı olarak uzattığı bildirilmektedir (52). Bu çalışma RIPK1'in inhibisyonunun İ/R hasarında nöronların yanında oligodendrosit prekürsör hücreleri üzerinde de koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

RIPK3, serebral İ/R hasarında nekroptozisin hem kanonik hem de kanonik olmayan yollarında yer alır (Şekil 2). RIPK3, MLKL ve mitokondriyal protein fosfatase (PGAM5) gibi substratları RIPK1-RIPK3 kompleksine toplayabilir. RIPK3'ün ROS üretimi, kalsiyum yüklenmesi, mitokondriyal permeabilite geçiş poru (mPTP) açılmasına neden olduğu bilinmekle birlikte hala aşağı akış nekroz

yolları tam olarak bilinmemektedir (61). Sıçanlarda GSAO modelinde 20 dakika iskemi sonrası hipokampal CA1 nöron ölümü ile artmış RIPK3 ekspresyonunun ve nükleer translokasyonunun reperfüzyondan 12 saat sonra başladığı ve 48. saatte pik yaptığı ve bu sürecin, önemli bir enerji substratı olan NAD⁺ miktarında azalmaya ve programlı nekrozisin geç evresinde lizozomlardan salınan katepsin B düzeyinde artışa yol açtığı gösterilmiştir. Ek olarak, iskemiden 1 saat önce intraserebroventriküler (icv) uygulanan 1µg Nec-1 tedavisinin; RIPK3'ün up-regülasyonunu ve nükleer translokasyonunu, katepsin B düzeyindeki artışı ve nöron ölümünü azalttığı ve NAD⁺ miktarında artış yaptığı bildirilmiştir (55). Bir başka GSAO modelinde 15 dakika süren iskemiden 1 saat önce icv uygulanan Nec-1'in sıçanlarda hipokampal CA1 bölgesindeki nöronların ölüm oranını anlamlı azalttığı, lokomotif yeteneği koruduğu, anksiyete davranışını hafiflettiği ve bilişsel yeteneği geliştirdiği belirtilmektedir. Nec-1 ön tedavisinin bu koruyucu etkilerle birlikte RIPK1-RIPK3 etkileşimini, RIPK3 aktivasyonunu, ölümle ilişkili protein (DAXX)-RIPK3 etkileşimini ve DAXX'ın nükleustan sitoplazmaya translokasyonunu baskıladığı raporlanmaktadır (62). DAXX, transkripsiyonel düzenleme sağlayan bir çekirdek proteindir. Hücre dinlenme durumunda DAXX'ın nükleusta iken iskemik stres durumunda sitoplazmaya geçtiği ve RIPK3'ün yeni bir substratı olarak pronekrotik komplekse katıldığı ifade edilmektedir (63). RIPK3'ün apoptozu indükleyen faktör (AİF) ile etkileşime girerek sitoplazmadan çekirdeğe translokasyon yapabildiği ve böylece DNA bozulmasını teşvik ettiği ve nöronal nekroza yol açtığı bildirilmektedir (64,65). Bu çalışmalar İ/R hasarında RIPK3'ün DAXX ve AİF gibi substratlar üzerinden de nöronal nekroza katkıda bulunacağını göstermektedir.



Şekil 2. Serebral iskemiyi/reperfüzyon hasarı koşullarında kanonik (RIPK1-RIPK3-MLKL) ve kanonik olmayan yollar aracılığıyla nekroptotik hücre hasarını gösteren moleküler olayların şematik gösterimi (44,47-49,61,62,64,65). **Kısaltmalar:** İ/R-iskemi/reperfüzyon, ROS-reaktif oksijen türleri, RIP3-reseptörle etkileşen protein kinaz 3, mPTP-mitokondriyal permeabilite geçiş poru, MLKL-karışık soy kinaz alanı benzeri psödokinaz, PGAM5-fosfogliserat mutaz 3, Drp-1-dynamin ilişkili protein 1, ER-endoplazmik retikulum, XO-ksantin oksidaz, CaMKIIδ-Ca/kalmodulin bağımlı protein kinaz IIδ, AİF-apoptoz indükleyen faktör, DAXX-ölümle ilişkili protein, NMDA- N-metil-D-aspartat.

MLKL proteini nekroptotik hücre ölümünde kritik bir rol oynayan proteindir. OSAO uygulanan farelerde 30 dakika iskemi sonrası reperfüzyonun 12. saatinde MLKL protein düzeyinin anlamlı olarak arttığı ve 48. saatte pike ulaştığı, iskemiden 30 dakika önce icv uygulanan MLKL inhibitörü NSA'nın (1µmol/kg) infarkt hacmini ve nörolojik defisiti anlamlı azalttığı raporlanmaktadır. NSA, RNA transkripsiyonunu etkilemeksizin ubiquitinasyon proteazom yolu aracılığıyla MLKL seviyelerini düşürmektedir. NSA'nın iskemi sonrası reperfüzyonun 4. saatinde uygulanması ile infarkt hacmi azalırken 6. saatte uygulanması ile infarkt hacminin azalmadığı bildirilmektedir. Bu da NSA'nın iskemi sonrası tedavide nispeten dar bir terapötik bir pencereye sahip olduğunu göstermektedir (58).

Nekroptozis inhibitörlerinin etkileri, serebral İ/R sonrası genellikle ilk 24 saat ya da 7 gün içerisinde değerlendirilmiştir. Sıçan OSAO modelinde yeni bir Nec-1 analogu olan 5-(30, 50-dimetihoxybenzal)-2-thio-imidazole-4-ketone (DTIO)'nun etkileri, serebral infarktın hem akut evresinde (24 saat iskemi) hem de kronik evresinde (90 dakika iskemi/28 gün reperfüzyon) araştırılmıştır. DTIO'nun serebral infarktın akut evresindeki etkisini değerlendirmek için ilaç iskemisinin 3. saatinde 10 mg/kg iv tek doz, kronik evresindeki etkisi için reperfüzyonun ilk günü 10 mg/kg iv, sonrasında 27 gün boyunca günde 1 kez aynı dozda ip verilerek çoklu doz uygulanmıştır. DTIO'nun akut evrede infarkt hacmini ve nörolojik defisitleri azalttığı; kronik evrede beyin atrofisini azalttığı ve nörolojik fonksiyonların iyileşmesini artırdığı bildirilmektedir. Araştırmacılar DTIO'nun (10 µM,) OGD (12 saat anoksi) ve OGD-R (6 saat anoksi/24 saat reoksijenizasyon) uygulanan astrosit ve nöron hücrelerinde nekrotik hücre ölümünü, LDH ve inflamatuvar sitokin düzeylerini ve glial skar oluşumunu azalttığını raporlamışlardır. DTIO'nun farmakolojik etkilerinin RIPK1'e bağlanarak, RIPK1'in fosforilasyonunu inhibe ederek ve RIPK1-RIPK3'ün etkileşimini azaltarak gerçekleştirdiğini bildirmişlerdir (66). Bu çalışma nekroptozisin RIPK1 inhibitörünün kronik uygulanması ile baskılanmasının, serebral infarktın kronik evresinde hem nöronlarda hem de astrositlerde koruyucu etkisinin olabileceğini göstermesi açısından önemlidir.

Nekrozoma ait bileşenlerin genetik modifikasyonlarının, serebral infarkta bağlı infarkt hacmi ve nörolojik defisitleri azaltabileceği bildirilmektedir (54,66–68). RIPK1 kinazın D138N mutasyonu, serebrovasküler endotel hücrelerde nekroptozisi, nöronlarda hem nekroptozu hem de RIPK1-bağımlı apoptozisi bloke etmekte; nöroinflamasyonu ve iskemik infarktı azaltmaktadır (54). OSAO modelinde "short hairpin RNA" (shRNA), RIPK1 transkripsiyonunun (RIPK1 knockdown) infarkt hacmini ve nörolojik defisiti azalttığını, OGD ve OGD-R uygulanan astrositlerde de proinflamatuvar sitokinlerin salınımını azalttığını raporlamışlardır (66). RIPK3 "small interfering RNA" (siRNA) ve MLKL siRNA tedavisi anlamlı olarak RIPK3 ve MLKL'nin ekspresyonunu, RIPK1-RIPK3-MLKL etkileşimini ve OGD sonrası nöronal ölümü anlamlı olarak azaltmıştır (68). Çok fonksiyonlu bir protein olan progranulinin fare beyininde aşırı ekspresyonunun serebral İ/R hasarında gelişen beyin infarkt hacmini ve nörolojik defisitleri, p-RIPK1/RIPK1, p-RIPK3/RIPK3 ve p-MLKL/MLKL'nin ekspresyonlarını azaltarak nekroptozisi inhibe edip gerçekleştirdiğini bildirmişlerdir (67).

Serebral İ/R uygulanan *in vivo* ve *in vitro* modelde apoptozis inhibitörü humanin ile nekroptozis inhibitörü Nec-1'in kombine uygulanmasının sinerjistik etki sağladığı; her iki ajanın tek başına uygulanmasına göre infarkt alanında ve nörolojik defisitte daha anlamlı bir azalma yaptığı rapor edilmektedir (53). Yakın zamanda piroptoz, apoptoz ve nekroptozun multimerik bir protein kompleksi olan PANoptozom'da birlikte hareket ettiğini gösteren bulaşıcı hastalıklar çalışmalarında, Malireddi ve ark.'ları PANoptoz kavramını geliştirmişlerdir. PANoptoz kavramında üç ölüm yolağının da aynı anda düzenlendiği savlanır (69). PANoptozun serebral İ/R hasarında var olup olmadığını test etmek için deneysel serebral İ/R'yi araştıran makaleleri bibliyometrik ve veri madenciliği yöntemleri kullanarak değerlendiren bir çalışmada, değerlendirme sonucunda PANoptosis'in iskemik beyin hasarında gözlemlendiği ifade edilmektedir (70). Benzer şekilde, OSAO modeli uygulanan fareler ve kontrollerinin beyin dokusunda apoptoz, piroptoz ve nekroptoz ile ilgili genleri transkriptomik olarak analize eden bir çalışma sonuçları da deneysel serebral İ/R hasarında PANoptozis'in varlığını desteklemektedir (71). Bu çalışmalar, serebral İ/R fizyopatolojisinde nekroptozisi de içeren PANoptozisin de yer alabileceğini düşündürmektedir.

Nekroptozis ve Miyokardiyal İ/R hasarı

Koroner kalp hastalığı (KKH) dünya genelinde ölüm ve morbidite nedenleri arasında ilk sırada yer almaktadır. KKH'den kaynaklanan akut miyokard infarktüsü, kardiyomyosit ölümünün, ventriküler yeniden şekillenmenin ve nihayetinde kalp yetmezliğinin primer sebeplerinden biridir. Günümüzde, akut miyokardiyal hasarı azaltmada trombolitik tedavi, perkütan koroner müdahaleler ve koroner arter baypas greftleme gibi miyokardiyal reperfüzyon stratejileri uygulanır. Bununla birlikte kan akışının yeniden sağlanması, bazen kardiyomyosit ölümüne neden olarak miyokardiyal İ/R hasarını oluşturur (72). Kalp hastalıklarının tanı ve tedavisindeki gelişmelere rağmen, insan sağlığına yönelik oldukça ciddi tehlikeler içermesi ve uzun vadede de sorun olmaya devam etmesi nedeniyle miyokardiyal İ/R hasarının anlaşılması ve daha etkili terapötik ilaçların geliştirilmesi önem arz etmektedir.

Kalbin hem gevşeme hem de kasılma için sabit bir enerji kaynağına ihtiyacı vardır ve bu da genellikle ATP olarak mitokondri tarafından sağlanır (73). Miyokardiyal iskemide enerji kıtlığı ve ATP tükenmesi söz konusu olduğundan mitokondriyal fonksiyon önemli bir faktör olarak kabul edilir (74). Miyokardiyal iskemi sırasında anaerobik glikoliz en baskın metabolizma yoludur, bu da laktat ve H⁺ birikimine yol açar ve ardından hücre içi asidozla sonuçlanır (75). ATP tükenmesi ve pH'nın düşüşü nedeniyle Na⁺/H⁺ ve Na⁺/HCO₃⁻ deşitiricilerinde aktivasyon (76) ve Na⁺/K⁺-ATPaz pompasında inhibisyon (77) meydana gelerek hücre içi Na⁺ birikimi oluşur (74). Hücre içerisinde Na⁺ artışı, sarkolemmal Na⁺/Ca²⁺ deşitiricisini aktive ederek hücre içi ve mitokondriyal Ca²⁺ un aşırı yüklenmesine neden olur (78,79). İskemi sırasında, mitokondriyal Ca²⁺ un aşırı yüklenmesi, oksidatif stres, fizyolojik pH'nın restorasyonu ve ATP tükenmesine yanıt olarak reperfüzyonda miyokardiyal mitokondriyal permeabilite geçiş poru (mPTP) açılır. Mitokondriyal PTP'nin açılması mi-

tokondriyal membran potansiyelini çökertir ve oksidatif fosforilasyonu bozarak ATP tükenmesine ve hücre ölümüne neden olur (80). İskemi ve reperfüzyon sırasında H⁺ ve Ca²⁺ birikimi ve mitokondriyal membran potansiyelinin bozulması gibi hücre içi değişiklikler, ROS oluşumuna yol açar. ROS birikimi ve ardından proinflamatuvar yolların aktivasyonu İ/R hasarında önemli bir rol oynamaktadır (81). Reaktif oksijen ara ürünleri, stres yanıt yollarını aktive etmenin yanı sıra hücre DNA, protein ve lipitlere doğrudan zarar verir. Bu spesifik olmayan hasar, TNF-α üretimiyle sonuçlanan sitokin aracılı bir kaskad başlatır (82). Aşırı TNF-α ekspresyonu ve ardından kardiyomyosit TNFR1 uyarımı, kasılma disfonksiyonu, hipertrofi, fibroz ve hücre ölümünü indükler (83). Ayrıca miyokardiyal İ/R, lokal olarak salınan DAMP tarafından NLRP3 (NACHT-, LRR- ve pirin alanı içeren 3) inflamazomunun başlatılması ve tetiklenmesiyle karakterize edilen steril bir yaralanma ve inflamatuvar yanıtı neden olur. İnflamazomlar, interlökin-1 beta (IL-1 β), IL-18 üretimi ve salgılanmasına neden olurlar. Toll benzeri reseptörler tehlike sinyalleri yoluyla uyarılır ve sonunda NF-κB aktivasyonu yoluyla daha fazla pro-inflamatuvar sitokin ve kemokin salgılanmasını uyarır (84).

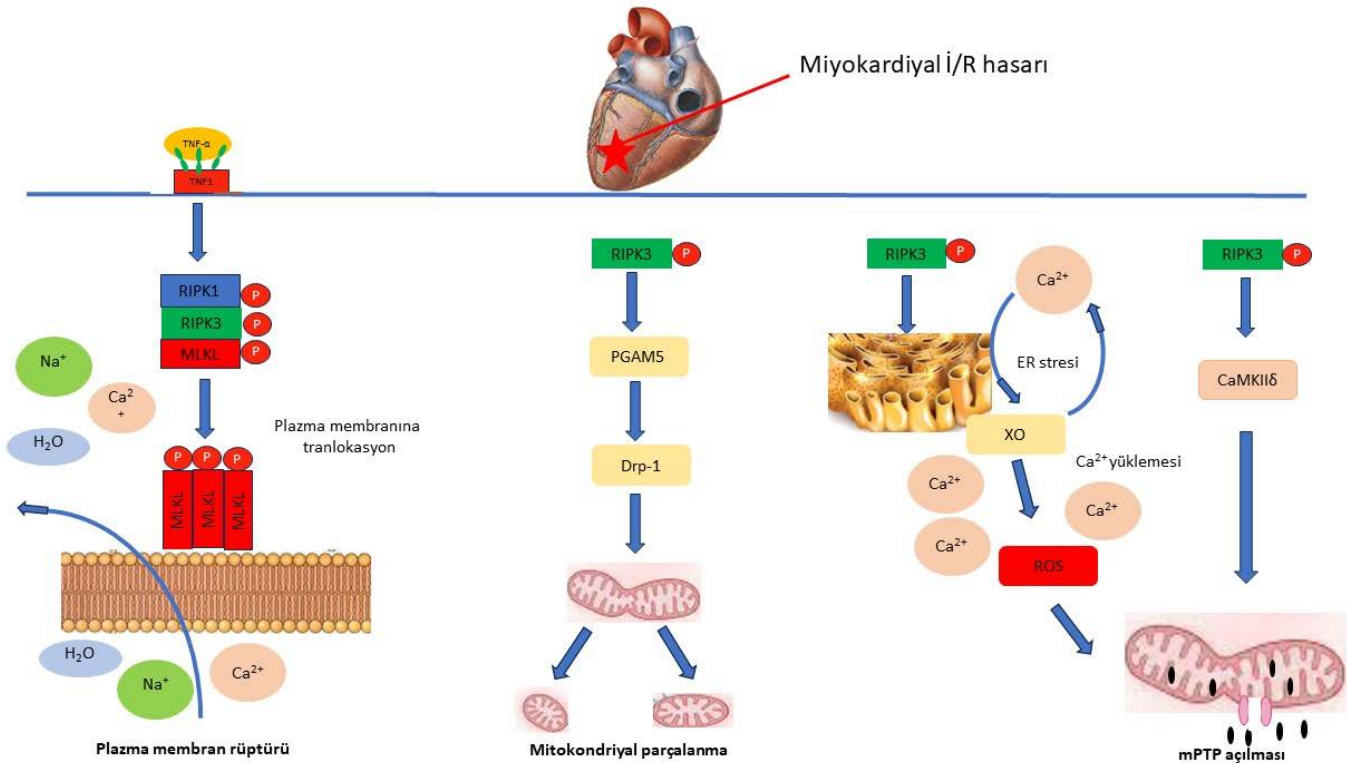
Miyokardiyal İ/R hasarında nekroptotik hücre ölümünün yer aldığı son çalışmalarla gösterilmiştir (85–89). RIPK1, RIPK3 ve MLKL dahil olmak üzere nekroptozla ilişkili proteinlerin ekspresyon seviyelerinin *in vivo* ve *in vitro* miyokard İ/R modellerinde arttığı (85–89) ve RIPK1 inhibitörü Nec-1 ile tedavinin de koruyucu etkiler gösterdiği bildirilmektedir (88,89). Fare koroner arter ligasyonu ile 30 dakika iskemi/2 saat reperfüzyon uygulanan miyokard dokusunda ve 4 saat hipoksi/4 saat reoksijenizasyon uygulanan H9c2 kardiyomyosit hücrelerinde RIPK1, RIPK3 ve p-MLKL/MLKL'nin anlamlı olarak arttığı bildirilmektedir (85). Sıçan koroner arterine uygulanan 30 dakika oklüzyonu takiben reperfüzyonun 1. ve 24. saatinde p-RIPK1, RIPK3 ve p-MLKL'nin protein ekspresyonu anlamlı yükselmektedir (86). Benzer şekilde sıçan koroner arter ligasyonu ile 1 saat iskemi/3 saat reperfüzyon uygulanan miyokard dokusunda ve 10 saat hipoksi/4 saat reoksijenizasyon uygulanan H9c2 kardiyomyosit hücrelerinde RIPK1, p-RIPK1, RIPK3, p-RIPK3, MLKL ve pMLKL'nin anlamlı arttığı bildirilmektedir (87). RIPK1 inhibitörü Nec-1'in İ/R hasarı üzerindeki etkileri Langendorff perfüze kalp (35 dakika global iskemi/35 dakika reperfüzyon) ve *in vivo* sol ön inen arter oklüzyonu modeli (30 dakika iskemi/2 saat reperfüzyon) uygulanarak farelerde incelenmiştir. Nec-1 *in vivo* modelde reperfüzyon başlangıcı ile eş zamanlı olarak farelere 1,65 mg/kg, ip ve *in vitro* modelde reperfüzyon sırasında perfüzatta 30 µM olacak şekilde uygulanmıştır. Nec-1'in her iki modelde de infarkt alanını azaltarak koruyucu etkisi olduğu gözlenmiştir (88). Domuzlarda sol sirkümfleks arterin 75 dakika oklüzyon/24 saat reperfüzyon ile oluşturulan İ/R modelinde, reperfüzyondan 10 dakika önce iv uygulanan Nec-1'in (3,3 mg/kg) azalan sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunu (EF) ve sol ventrikül duvar kalınlığını artırarak ve laktat dehidrojenazın (LDH)/kreatin kinazın-MB izoenzim fraksiyonu (CK-MB) ile ölçülen infarkt alanını azaltarak koruyucu etki gösterdiği raporlanmıştır (89). MLKL inhibitörü NSA'nın (10 mg/kg ip), sıçan kardiyak arrest modelinde resüsitasyon sonrası miyokardiyal disfonksiyonu, nörolojik disfonksiyonu ve sağkalımı

iyileştirdiği bildirilmektedir (90). Miyokardiyal İ/R hasarında TNF-α ile indüklenen RIPK1, RIPK3 ve MLKL fosforilasyonunun, TAK1 fosforilasyonu ile negatif korelasyon gösterdiği ve TAK1 fosforilasyonunun inhibisyonunun nekroptozun artmasına yol açtığı bildirilmektedir. TAK1 fosforilasyonunu önemli ölçüde artıran ginsenosid Rg2 tedavisinin (50 mg/kg iv reperfüzyondan 5 dakika önce), RIPK1/RIPK3 kompleksini inhibe ederek ve TAK1'in RIPK1'e bağlanmasını artırarak sıçanlarda 30 dakika iskemi/4 saat reperfüzyon ile indüklenen miyokard nekroptozunu azalttığı gösterilmiştir (91). Bu çalışmalar miyokardiyal İ/R hasarında RIPK1, RIPK3 ve MLKL'nin direkt inhibisyonu veya nekroptotik bileşenler üzerine düzenleme sağlayan hücre içi diğer proteinlerin aktivasyonu/inhibisyonu yolu ile koruyucu etkiler sağlanabileceğini göstermektedir.

Çeşitli mikroRNA'ların (miR'lerin) kardiyak İ/R ortamında nekroptozu düzenlediği belgelenmektedir (92–95). miR-873, RIPK1/RIPK3'ün transkripsiyonunu ve RIPK1/RIPK3 aracılı nekrotik hücre ölümünü baskılamaktadır (92). miR-223'ün aşırı ekspresyonunun ise RIPK1 ve RIPK3 ile birlikte TNFR1, ölüm reseptörü 6 (DR6), IKKα, NOD-benzeri pirin bölgesi içeren reseptör ailesi 3 (NLRP3) ve infarkt alanını azalttığı bildirilmektedir (93). Bir diğer çalışmada miR-325-3p'nin aşırı ekspresyonunun RIPK1, RIPK3 ve p-MLKL'nin ekspresyonunu azaltırken aynı zamanda LDH ve CK düzeyleri ile sol ventrikül diyastol sonu çapı (LVEDD) ve sol ventrikül sistol sonu çapını (LVESD) azalttığı, sol ventrikül EF'sini ve fraksiyonel kısalmasını (FS) artırdığı, infarkt alanını ve kardiyak hasarın derecesini azalttığı gösterilmiştir (94). Bununla birlikte bazı miRNA'lar yukarıda bahsedilenlerin aksine nekroptozu artırmaktadırlar. miR103/107, oksidatif stresi ve nekrozom bileşenlerini artırmakta ve bu miR'nin uzun kodlamayan RNA (lncRNA) H19 tarafından inhibisyonu ile nekroptoz da azaltılmaktadır (95). Yeni bir tek sarmallı kodlamayan RNA türü olan dairesel RNA'lar (circRNA'lar) miyokardiyal İ/R hasarı da dahil olmak üzere çeşitli kardiyovasküler hastalıklarda farklı şekilde eksprese edilir. Kardiyak nekroptozla ilişkili bir circRNA (CNEACR) olan mmu_circ_000338 seviyesinin hipoksi/reoksijenasyona maruz bırakılan kardiyomyositlerde ve İ/R uygulanan fare kalplerinde azaldığı, CNEACR'nin aşırı ekspresyonunun, *in vitro* modelde kardiyomyosit ölümünün nekrotik formunu hafiflettiği ve *in vivo* miyokardiyal nekrozu baskıladığı, buna miyokardiyal enfarktüs boyutunda belirgin bir azalma ve kardiyak fonksiyonda iyileşme eşlik ettiği bildirilmektedir. CNEACR, sitoplazmadaki histon deasetilaza (HDAC7) doğrudan bağlanır ve onun nükleer girişini engeller. Bu durum promotör bölgesine bağlanarak RIPK3 genini baskılayabilen forkhead box protein A2 (FOXA2) transkripsiyonunun HDAC7'ye bağlı baskılanmasının zayıflamasına yol açar. Ayrıca, FOXA2'nin CNEACR aracılı yukarı regülasyonu, kardiyomyositlerin RIPK3'e bağlı nekrotik/nekroptik ölümünü engeller (96). Bu araştırmaların sonuçları miyokardiyal İ/R ile indüklenen nekroptozisde miR'ların ve circRNA'ların İ/R hasarını iyileştirmede potansiyel hedef olabileceğini ortaya koymaktadır. RIPK3'ün, RIPK1 ve MLKL'den bağımsız olarak miyokardiyal İ/R sürecinde kardiyomyositlerin nekroptozunun düzenlenmesinde rol oynayabileceği bildirilmektedir (Şekil 3) (97–101). Kültüre

H9c2 hücrelerinde hipoksi/reoksijenasyon, RIPK3'e bağımlı mitokondriyal parçalanmaya ve nekrotik temelli ölüme neden olmaktadır; bu süreçte RIPK3 mitokondriye yer değiştirmekte ve mitokondri bölünmesinde rol alan dynaminle ilişkili protein-1 (Drp1) ile etkileşerek onu aktive etmekte, aynı zamanda ROS'u artırmakta ve mitokondriyal membran potansiyelini azaltmaktadır (97). Langendorff düzenliğinde sıçan kalplerine 30 dakika iskemi/10 dakika reperfüzyon uygulanarak erken dönem reperfüzyonda RIPK3'ün etkisi, inhibitörü olan GSK'872 kullanılarak LDH salınımı, sol ventrikül diyastolik basıncı (LVDP), kalp hızı, mitokondriyal şişme gibi parametreler üzerinden değerlendirilmiştir. Oluşturulan kardiyak İ/R hasarında nekroptozisin kanonik RIPK1-RIPK3-MLKL yolu ve kanonik olmayan CaMKIIδ-mPTP, PGAM5-Drp1 ve JNK-BNIP3 (c-Jun N terminal kinaz-BCL2-etkileşim protein 3) yollarının katkısının olmadığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde erken İ/R hasarının NLRP3 inflamazom sinyalini de içermediğini ve RIPK3 inhibisyonunun plazma membran rüptürünü ve ksantin oksidaz (XO)/manganez süperoksit dismutazı modüle ederek gecikmiş mPTP açılmasını önlediğini göstermişlerdir. Erken reperfüzyon hasarında RIPK3'ün nekroptotik hücre ölümü gelişmeden ROS üretimi ve

mitokondriyal aktiviteleri düzenleyerek hasar oluşumuna katkıda bulunduğunu ileri sürmüşlerdir (98). Bir iyon kanalı olan CaMKIIδ'nin RIPK3'ün bir substratı olduğu; RIPK3 ile uyarılan CaMKIIδ'nin, mPTP'nin açılmasına ve nekroptozise neden olduğu gösterilmektedir. RIPK3 eksikliğini (RIPK3^{-/-}) ve CaMKII inhibitörü KN-93'ün, farelerde miyokardiyal nekroptozisi iyileştirdiği bildirilmektedir (99). Langendorff perfüze sıçan kalplerinde KN-93 tedavisinin 30 dakika global iskemi/40 dakika reperfüzyonla oluşan RIPK1, kaspaz-8, kaspaz-9 ve sitokrom-c'nin artmış ekspresyonları ile kardiyak kontraktıl disfonksiyonunu azalttığı raporlanmıştır (100). Fare kalplerine 45 dakika iskemi/24 saat reperfüzyon uygulanmasına bağlı gelişen RIPK3 ekspresyonundaki artışın, hücre içi Ca²⁺ yükselmesi ve XO ekspresyonunun artışına neden olan endoplazmik retikulum (ER) stresine yol açtığını ve artan ROS üretiminin de mPTP açılmasına neden olduğu bildirilmektedir. RIPK3 eksikliğini (RIPK3^{-/-}) ER stresini azalttığı ve hücre içi [Ca²⁺] yüklenmesi-XO-ROS-mPTP yolunun baskılanmasına neden olduğunu ileri sürülmektedir (101). Bu çalışmalar RIPK3'ün iyi bilinen substratı MLKL haricinde Drp-1 ve CaMKIIδ gibi substratları olduğunu ve RIPK3'ün İ/R hasarında kanonik RIPK1-RIPK3-MLKL yolu dışında farklı yollar üzerinden de katkısı olabileceğini göstermektedir.



Şekil 3. Miyokardiyal iskemi/reperfüzyon hasarı koşulları altında kanonik (RIPK1-RIPK3-MLKL) ve kanonik olmayan yollar aracılığıyla nekroptotik hücre hasarını gösteren moleküler olayların şematik gösterimi (85-89,97-101). **Kısaltmalar:** İ/R-iskemi/reperfüzyon, ROS-reaktif oksijen türleri, RIP3-reseptörle etkileşen protein kinaz 3, mPTP-mitokondriyal permeabilite geçiş poru, MLKL-karışık soy kinaz alanı benzeri psödokinaz, PGAM5-fosfogliserat mutaz 3, Drp-1-dynamin ilişkili protein 1, ER-endoplazmik retikulum, XO-ksantin oksidaz, CaMKIIδ-Ca/kalmodulin bağımlı protein kinaz IIδ.

Miyokard infarktüsü sonrası gelişen kronik kalp yetmezliğine RIPK1/RIPK3/MLKL yolağının aktivasyonunun neden olabileceği ileri sürülmektedir (99,102,103). Sıçanlarda koronar arter ligasyonu ile oluşturulan miyokardiyal infarktüs sonrası 2. ve 8. haftalarda RIPK1, p-RIPK1, RIPK3, p-RIPK3, MLKL, pMLKL'nin anlamlı olarak yükseldiği; LVEDD, LVESD ve fibrotik alanın sham grubuna göre daha fazla olduğu bildirilmektedir (102). Farelerde kalıcı sol ön inen koroner arter ligasyonu sonrasında RIPK3'ün kardiyak ekspresyonunun arttığı; RIP3 (RIP3^{-/-}) eksikliği olan farelerde, deneysel infarktüstün 30 gün sonra manyetik rezonans görüntüleme çalışmalarında önemli ölçüde daha iyi bir EF, daha az hipertrofi ile inflamatuvar yanıt ve ROS'ta azalmanın eşlik ettiği görülmektedir (103). RIPK3 eksikliği (RIPK3^{-/-}), farelerde uygulanan 30 dakika iskemi/4 saat reperfüzyon sonrasında gelişen LDH yüksekliğini ve infarkt alanını azaltmış; reperfüzyonun 8. haftasında gelişen artmış fibrozis alanı, kalp/vücut ağırlığı oranını ve sistolde sol ventrikül iç çapını (LVIDs), azalan EF ve FS'yi iyileştirmiş ve hayatta kalmayı arttırmıştır (99). İnsan ve farelerdeki erken evre aterosklerotik lezyonlarda yaygın bir şekilde RIPK1'in eksprese edildiği, RIPK1 antisens oligonükleotidlerin lezyon alanlarını ve plazma inflamatuvar sitokinlerin (IL-1 α , IL-17A) düzeyini azalttığı; RIPK1'in genetik susturulmasının makrofajlarda inflamatuvar genleri (NF- κ B, TNF α , IL-1 α) azalttığı ve endotel hücrelerde NF- κ B'nin nükleusa translokasyonunu önlediği bildirilmektedir. Araştırmacılar RIPK1'in, NF- κ B yolağını aktive ederek ve inflamatuvar sitokinlerin salınımını artırarak aterosklerozisdeki inflamasyonda merkezi rol oynadıklarını ve yüksek riskli koroner arter hastalığı olanlarda inflamasyonu azaltmada önemli bir terapötik hedef olacağını ileri sürmektedirler (104). Bu araştırmalar nekroptozun, hem iskemi oluşumuna neden olan aterosklerozis patolojisinde yer aldığını hem de iskemi sonrası yeniden şekillenmeyi modüle edebileceğini göstermektedir.

Kardiyak İ/R hasarında birçok ölüm yolağının eş zamanlı ortaya çıkabileceği bu yolların inhibisyonunun kombine tedavi ile tek başına tedaviye göre daha etkili olduğu deneysel çalışmalarda bildirilmektedir (105,106). İzole perfüze kobay kalplerinde 30 dakika iskemi/4 saat reperfüzyon uygulanmasında, apoptozis inhibitörü Z-VAD (0,1 μ M) ile nekroptozis (10 μ M) inhibitörü Nec-1'in kombine uygulanmasının sinerjistik etki sağladığı; her iki ajanın tek başına uygulanmasına göre infarkt alanında daha fazla bir azalma, daha yüksek sol ventrikül gelişim basıncı ve daha düşük sol ventrikül diyastol sonu basıncı sağladığı rapor edilmiştir (105). Benzer şekilde ferroptozis inhibitörü deferoxamin (200 μ M- 100 mg/kg ip) ve nekroptozis inhibitörü ponatinibin (0,5 μ M- 10 mg/kg ip) kombine kullanımının ajanların tek başına kullanımına göre, H9c2 kardiyomiyosit hücrelerde (10 saat hipoksi/4 saat reoksijenizasyon) ve *in vivo* sıçan kalplerinde (1 saat iskemi/3 saat reperfüzyon) gelişen İ/R hasarında LDH ve CK düzeyi ile infarkt alanını daha fazla azalttığı bildirilmektedir (106). Yukarıdaki çalışmalardan farklı olarak kombine tedavi yerine tek başına kullanılan MLKL inhibitörü NSA'nın (10 mg/kg ip), sıçan kardiyak arrest modelinde resüsitasyon sonrası miyokardiyal disfonksiyonu, nörolojik disfonksiyonu ve sağkalımı iyileştirmesinde hem piroptozu hem de nekroptozu baskılanmasının katkısı olduğu bildirilmektedir (90).

Sonuç

Bu çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda serebral İ/R hasarında nekroptozis belirteçlerinin özellikle reperfüzyonun ilk 24 saati içerisinde anlamlı olarak yükseldiği, RIPK1 inhibisyonunun nekroptozis ve apoptozisi azaltırken, RIPK3 ve MLKL'nin baskılanmasının nekroptozisi azalttığı anlaşılmaktadır. Nekrozom bileşenlerinin farmakolojik ilaçlarla veya genetik modifikasyonlarla baskılanmasının deneysel modellerde serebral infarkt hacmini ve nörolojik defisitleri azaltarak koruyucu etki sağladığı görülmektedir. Çalışmaların bulguları, RIPK1 inhibitörünün akut serebral İ/R hasarı tedavisinde iskemi öncesi uygulanmasının reperfüzyon sonrasında uygulamaya göre daha iyi sonuç verebileceği ve RIPK1 inhibitörünün reperfüzyonla beraber kronik uygulanmaya başlanmasının serebral İ/R hasarının kronik evresinde de koruyucu etkiye sahip olabileceği yönündedir. Serebral İ/R hasarında nekroptozis, apoptozis ve piroptozisi içeren PANoptozisin varlığını destekleyen veriler bulunmaktadır.

Miyokardiyal İ/R hasarında *in vivo* ve *in vitro* deneylerde nekroptozis belirteçlerinin reperfüzyonun ilk 24 saati içinde anlamlı olarak yükseldiği gözlenmektedir. Miyokardiyal İ/R hasarının tedavisi için kullanılan Nec-1, NSA gibi nekrozom bileşenlerinin inhibitörleri ve kodlamayan RNA'lardan bazı miR'ler ve circRNA'lar infarkt alanı, LDH ve CK-MB düzeylerini azaltarak ve sol ventrikül fonksiyonlarını iyileştirerek koruyucu etki göstermektedir. Miyokardiyal İ/R sürecinde RIPK1-RIPK3-MLKL kanonik yolağı haricinde de RIPK3'ün kardiyomiyositlerin nekroptozunun düzenlenmesinde rol oynayabileceği anlaşılmaktadır. Nekroptozun, hem iskemi oluşumuna neden olan aterosklerozis patolojisinde yer aldığı hem de iskemi sonrası yeniden şekillenmeyi modüle ettiği gözlenmektedir. Bu sonuçlar miyokardiyal iskemiye önlemeyi ve kalp yetmezliği gibi iskeminin olumsuz sonuçlarını sınırlamayı amaçlayan gelecekteki tedaviler için nekrozom bileşenlerinin çekiçi bir hedef olabileceklerini düşündürmektedir. Miyokardiyal İ/R hasarında nekroptozisin apoptozis, ferroptozis ve piroptozis gibi diğer ölüm yolları ile birlikte bulunduğu ve bu ölüm yollarına özgü kombine tedavilerin etkili olabileceği gözlenmektedir.

Sonuç olarak elimizde bulunan kanıtlar, serebral ve miyokardiyal İ/R hasarının patogeneğinde nekroptozun yer aldığını; RIPK1, RIPK3 ve MLKL'nin İ/R'ye bağlı hasarda terapötik hedef olabileceğini gözler önüne sermektedir. Kanıtlar, her iki organın İ/R hasarının patogeneğinde nekroptozun meydana gelen en erken hücre ölümü şekli olabileceğini düşündürmekle birlikte nekroptozisin tek başına değil diğer ölüm yollarıyla birlikte eş zamanlı olabileceğini de desteklemektedir. Bu nedenle, nekroptozu hedef alan farmakolojik ve genetik müdahaleler, serebral ve miyokardiyal hasarın derecesini sınırlamada tek başına ya da diğer ölüm yolağı inhibitörleri ile kombine tedavide potansiyel koruyucu/tedavi edici stratejiler olarak düşünülebilir. Nekroptozun altında yatan mekanizmaları ve diğer hücre ölüm türleri ile etkileşimlerini tam olarak anlamak için kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Nekrozom bileşenlerinin aşağı akış mekanizmalarının aydınlatılması hedefe yönelik daha etkili/spesifik tedaviler için önemli gözükmektedir.

Etik onam: Derleme yazısı olmasından dolayı etik kurula gerek duyulmamıştır

Yazar Katkıları:

Konsept: Z.Y.

Literatür Tarama: Z.Y.

Tasarım: Z.Y.

Veri toplama: Z.Y.

Analiz ve yorum: Z.Y.

Makale yazımı: Z.Y.

Eleştirel incelenmesi: Z.Y.

Çıkar Çatışması: Yazarlar arasında çıkar çatışması yoktur.

Finansal Destek: Bu çalışma için herhangi bir kurum ve kuruluşun finansal destek alınmamıştır.

Kaynaklar

- Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nat Med.* 2011;17(11):10.1038/nm.2507.
- Ojha N, Dharmoon AS. Myocardial Infarction. İçinde: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [a.yer 2022]. Erişim adresi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537076/>
- Kumar A, Cannon CP. Acute coronary syndromes: diagnosis and management, part I. *Mayo Clin Proc.* 2009;84(10):917-38.
- DeSai C, Hays Shapshak A. Cerebral Ischemia. İçinde: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [a.yer 2022]. Erişim adresi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560510/>
- Mandalaneni K, Rayi A, Jillella DV. Stroke Reperfusion Injury. İçinde: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [a.yer 2022]. Erişim adresi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564350/>
- Kosieradzki M, Rowiński W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. *Transplant Proc.* Aralık 2008;40(10):3279-88.
- İkhlaz M, Atherton NS. Vascular Reperfusion Injury. İçinde: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [a.yer 2022]. Erişim adresi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562210/>
- Kurcer Z, Hekimoglu A, Aral F, Baba F, Sahna E. Effect of melatonin on epididymal sperm quality after testicular ischemia/reperfusion in rats. *Fertil Steril.* 2010;93(5):1545-9.
- Kurcer Z, Oguz E, Ozbilge H, Baba F, Aksoy N, Celik H, et al. Melatonin protects from ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats: this effect is not mediated by proinflammatory cytokines. *J Pineal Res.* 2007;43(2):172-8.
- Lutz J, Thürmel K, Heemann U. Anti-inflammatory treatment strategies for ischemia/reperfusion injury in transplantation. *J Inflamm Lond Engl.* 2010;7:27.
- Wu MY, Yang GT, Liao WT, Tsai APY, Cheng YL, Cheng PW, et al. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol.* 2018;46(4):1650-67.
- Lefer DJ, Granger DN. Oxidative stress and cardiac disease. *Am J Med.* 2000;109(4):315-23.
- Boros P, Bromberg JS. New cellular and molecular immune pathways in ischemia/reperfusion injury. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2006;6(4):652-8.
- Özdemir S, Başoğlu T, Demir H, Durmuş Altun G, Özdemir E, Şen F, et al. Guidelines for Myocardial Viability Imaging with F-18 FDG. *Nucl Med Semin.* 2020;6(2):171-83.
- Zhang Q, Jia M, Wang Y, Wang Q, Wu J. Cell Death Mechanisms in Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury. *Neurochem Res.* 2022;47(12):3525-42.
- Gottlieb RA. Cell death pathways in acute ischemia/reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2011;16(3-4):233-8.
- Lopez-Neblina F, Toledo AH, Toledo-Pereyra LH. Molecular biology of

- apoptosis in ischemia and reperfusion. *J Investig Surg Off J Acad Surg Res.* 2005;18(6):335-50.
- Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol.* 2005;1(2):112-9.
 - Berghe TV, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H, Vandenabeele P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(2):135-47.
 - Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, et al. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol.* 2000;1(6):489-95.
 - Conrad M, Angeli JPF, Vandenabeele P, Stockwell BR. Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;15(5):348-66.
 - Walczak H. TNF and ubiquitin at the crossroads of gene activation, cell death, inflammation, and cancer. *Immunol Rev.* 2011;244(1):9-28.
 - Takaesu G, Surabhi RM, Park KJ, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Gaynor RB. TAK1 is critical for IκappaB kinase-mediated activation of the NF-kappaB pathway. *J Mol Biol.* 2003;326(1):105-15.
 - Guo X, Chen Y, Liu Q. Necroptosis in heart disease: Molecular mechanisms and therapeutic implications. *J Mol Cell Cardiol.* 2022;169:74-83.
 - Moquin DM, McQuade T, Chan FKM. CYLD Deubiquitinates RIP1 in the TNFα-Induced Necrosome to Facilitate Kinase Activation and Programmed Necrosis. *PLOS ONE.* 2013;8(10):e76841.
 - Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature.* 1997;388(6638):190-5.
 - Wang L, Du F, Wang X. TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell.* 2008;133(4):693-703.
 - Chen X, Wu JX, You XJ, Zhu HW, Wei JL, Xu MY. Cold ischemia-induced autophagy in rat lung tissue. *Mol Med Rep.* 2015;11(4):2513-9.
 - Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, et al. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell.* 2009;137(6):1112-23.
 - Oberst A, Dillon CP, Weinlich R, McCormick LL, Fitzgerald P, Pop C, et al. Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. *Nature.* 2011;471(7338):363-7.
 - Cai Z, Jitkaew S, Zhao J, Chiang HC, Choksi S, Liu J, et al. Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nat Cell Biol.* 2014;16(1):55-65.
 - Chen X, Li W, Ren J, Huang D, He WT, Song Y, et al. Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death. *Cell Res.* 2014;24(1):105-21.
 - Wang H, Sun L, Su L, Rizo J, Liu L, Wang LF, et al. Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3. *Mol Cell.* 2014;54(1):133-46.
 - Jouan-Lanhouet S, Riquet F, Duprez L, Vanden Berghe T, Takahashi N, Vandenabeele P. Necroptosis, in vivo detection in experimental disease models. *Semin Cell Dev Biol.* 2014;35:2-13.
 - Chan FKM, Luz NF, Moriwaki K. Programmed necrosis in the cross talk of cell death and inflammation. *Annu Rev Immunol.* 2015;33:79-106.
 - Takahashi N, Duprez L, Grootjans S, Cauwels A, Nerinckx W, DuHadaway JB, et al. Necrostatin-1 analogues: critical issues on the specificity, activity and in vivo use in experimental disease models. *Cell Death Dis.* 2012;3(11):e437.
 - Newton K, Dugger DL, Wickliffe KE, Kapoor N, de Almagro MC, Vucic D, et al. Activity of protein kinase RIPK3 determines whether cells die by necroptosis or apoptosis. *Science.* 2014;343(6177):1357-60.
 - Mandal P, Berger SB, Pillay S, Moriwaki K, Huang C, Guo H, et al. RIP3 induces apoptosis independent of pronecrotic kinase activity. *Mol Cell.* 2014;56(4):481-95.
 - Zhou T, Wang Q, Phan N, Ren J, Yang H, Feldman CC, et al. Identification of a novel class of RIP1/RIP3 dual inhibitors that impede cell death

- and inflammation in mouse abdominal aortic aneurysm models. *Cell Death Dis.* 2019;10(3):1-15.
40. Maslov LN, Popov SV, Naryzhnaya NV, Mukhomedzyanov AV, Kurbatov BK, Derkach IA, et al. The regulation of necroptosis and perspectives for the development of new drugs preventing ischemic/reperfusion of cardiac injury. *Apoptosis.* 2022;27(9):697-719.
 41. Fauster A, Rebsamen M, Huber KVM, Bigenzahn JW, Stukalov A, Lardeau CH, et al. A cellular screen identifies ponatinib and pazopanib as inhibitors of necroptosis. *Cell Death Dis.* 2015;6(5):e1767.
 42. In EJ, Lee Y, Koppula S, Kim TY, Han JH, Lee KH, et al. Identification and Characterization of NTB451 as a Potential Inhibitor of Necroptosis. *Molecules.* 2018;23(11):2884.
 43. Jadhav AP, Desai SM, Jovin TG. Indications for Mechanical Thrombectomy for Acute Ischemic Stroke: Current Guidelines and Beyond. *Neurology.* 2021;97(20 Supplement 2):S126-36.
 44. Yao D, Zhang S, Hu Z, Luo H, Mao C, Fan Y, et al. CHIP ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury by attenuating necroptosis and inflammation. *Aging.* 2021;13(23):25564-77.
 45. Rodrigo R, Fernández-Gajardo R, Gutiérrez R, Matamala JM, Carrasco R, Miranda-Merchak A, et al. Oxidative stress and pathophysiology of ischemic stroke: novel therapeutic opportunities. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2013;12(5):698-714.
 46. Surinkaew P, Sawaddiruk P, Apaijai N, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Role of microglia under cardiac and cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury. *Metab Brain Dis.* 2018;33(4):1019-30.
 47. Vacher H, Mohapatra DP, Trimmer JS. Localization and targeting of voltage-dependent ion channels in mammalian central neurons. *Physiol Rev.* 2008;88(4):1407-47.
 48. Vieira M, Fernandes J, Carreto L, Anuncibay-Soto B, Santos M, Han J, et al. Ischemic insults induce necroptotic cell death in hippocampal neurons through the up-regulation of endogenous RIP3. *Neurobiol Dis.* 2014;68:26-36.
 49. Zhan L, Lu Z, Zhu X, Xu W, Li L, Li X, et al. Hypoxic preconditioning attenuates necroptotic neuronal death induced by global cerebral ischemia via Drp1-dependent signaling pathway mediated by CaMKII α inactivation in adult rats. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2019;33(1):1313-29.
 50. Akçay G. Cerebral Ischemia Model Created by Transient Middle Cerebral Artery Occlusion. *Turk Bull Hyg Exp Biol.* 2021;78(2):205-18.
 51. Li W, Gou X, Xu D, Zhou L, Li F, Ye A, et al. Therapeutic effects of JILX001 on neuronal necroptosis after cerebral ischemia-reperfusion in rats. *Exp Brain Res.* 2022;240(12):3167-82.
 52. Chen Y, Zhang L, Yu H, Song K, Shi J, Chen L, et al. Necrostatin-1 Improves Long-term Functional Recovery Through Protecting Oligodendrocyte Precursor Cells After Transient Focal Cerebral Ischemia in Mice. *Neuroscience.* 2018;371:229-41.
 53. Xu X, Chua KW, Chua CC, Liu CF, Hamdy RC, Chua BHL. Synergistic protective effects of humanin and necrostatin-1 on hypoxia and ischemia/reperfusion injury. *Brain Res.* 2010;1355:189-94.
 54. Naito MG, Xu D, Amin P, Lee J, Wang H, Li W, et al. Sequential activation of necroptosis and apoptosis cooperates to mediate vascular and neural pathology in stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(9):4959-70.
 55. Yin B, Xu Y, Wei RL, He F, Luo BY, Wang JY. Inhibition of receptor-interacting protein 3 upregulation and nuclear translocation involved in Necrostatin-1 protection against hippocampal neuronal programmed necrosis induced by ischemia/reperfusion injury. *Brain Res.* 2015;1609:63-71.
 56. Deng XX, Li SS, Sun FY. Necrostatin-1 Prevents Necroptosis in Brains after Ischemic Stroke via Inhibition of RIPK1-Mediated RIPK3/MLKL Signaling. *Aging Dis.* 2019;10(4):807-17.
 57. Zhou Y, Zhou B, Tu H, Tang Y, Xu C, Chen Y, et al. The degradation of mixed lineage kinase domain-like protein promotes neuroprotection after ischemic brain injury. *Oncotarget.* 2017;8(40):68393-401.
 58. Zhou Y, Zhou B, Tu H, Tang Y, Xu C, Chen Y, et al. The degradation of mixed lineage kinase domain-like protein promotes neuroprotection after ischemic brain injury. *Oncotarget.* 2017;8(40):68393-401.
 59. Deng XX, Li SS, Sun FY. Necrostatin-1 Prevents Necroptosis in Brains after Ischemic Stroke via Inhibition of RIPK1-Mediated RIPK3/MLKL Signaling. *Aging Dis.* 2019;10(4):807-17.
 60. Deng YP, Sun Y, Hu L, Li ZH, Xu QM, Pei YL, et al. Chondroitin sulfate proteoglycans impede myelination by oligodendrocytes after perinatal white matter injury. *Exp Neurol.* 2015;269:213-23.
 61. Wang Z, Jiang H, Chen S, Du F, Wang X. The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways. *Cell.* 2012;148(1-2):228-43.
 62. Yang R, Hu K, Chen J, Zhu S, Li L, Lu H, et al. Necrostatin-1 protects hippocampal neurons against ischemia/reperfusion injury via the RIP3/DAXX signaling pathway in rats. *Neurosci Lett.* 2017;651:207-15.
 63. Jung YS, Kim HY, Lee YJ, Kim E. Subcellular localization of Daxx determines its opposing functions in ischemic cell death. *FEBS Lett.* 2007;581(5):843-52.
 64. Hu W, Wu X, Yu D, Zhao L, Zhu X, Li X, et al. Regulation of JNK signaling pathway and RIPK3/AIF in necroptosis-mediated global cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Exp Neurol.* 2020;331:113374.
 65. Xu Y, Wang J, Song X, Qu L, Wei R, He F, et al. RIP3 induces ischemic neuronal DNA degradation and programmed necrosis in rat via AIF. *Sci Rep.* 2016;6:29362.
 66. Li W, Liu J, Chen JR, Zhu YM, Gao X, Ni Y, et al. Neuroprotective Effects of DTIO, A Novel Analog of Nec-1, in Acute and Chronic Stages After Ischemic Stroke. *Neuroscience.* 2018;390:12-29.
 67. Li X, Cheng S, Hu H, Zhang X, Xu J, Wang R, et al. Progranulin protects against cerebral ischemia-reperfusion (I/R) injury by inhibiting necroptosis and oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;521(3):569-76.
 68. Qu Y, Shi J, Tang Y, Zhao F, Li S, Meng J, et al. MLKL inhibition attenuates hypoxia-ischemia induced neuronal damage in developing brain. *Exp Neurol.* 2016;279:223-31.
 69. Malireddi RKS, Kesavardhana S, Kanneganti TD. ZBP1 and TAK1: Master Regulators of NLRP3 Inflammasome/Pyroptosis, Apoptosis, and Necroptosis (PAN-optosis). *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:406.
 70. Yan WT, Yang YD, Hu XM, Ning WY, Liao LS, Lu S, et al. Do pyroptosis, apoptosis, and necroptosis (PANoptosis) exist in cerebral ischemia? Evidence from cell and rodent studies. *Neural Regen Res.* 2022;17(8):1761-8.
 71. Shu J, Yang L, Wei W, Zhang L. Identification of programmed cell death-related gene signature and associated regulatory axis in cerebral ischemia/reperfusion injury. *Front Genet [internet].* 2022 [a.yer 2023];13. Erişim adresi: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2022.934154>
 72. Zhu H, Sun A. Programmed necrosis in heart disease: Molecular mechanisms and clinical implications. *J Mol Cell Cardiol.* 2018;116:125-34.
 73. Halestrap AP, Richardson AP. The mitochondrial permeability transition: a current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;78:129-41.
 74. Xia Z, Li H, Irwin MG. Myocardial ischaemia reperfusion injury: the challenge of translating ischaemic and anaesthetic protection from animal models to humans. *Br J Anaesth.* 2016;117 Suppl 2:ii44-62.
 75. Buja LM. Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol Off J Soc Cardiovasc Pathol.* 2005;14(4):170-5.
 76. Tani M, Neely JR. Role of intracellular Na⁺ in Ca²⁺ overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of H⁺-Na⁺ and Na⁺-Ca²⁺ exchange. *Circ Res.* 1989;65(4):1045-56.
 77. Ibáñez B, Heusch G, Ovize M, Van de Werf F. Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol.* 2015;65(14):1454-71.
 78. Chen S, Li S. The Na⁺/Ca²⁺ exchanger in cardiac ischemia/reperfusion injury. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res.* 2012;18(11):RA161-165.
 79. Fieni F, Johnson DE, Hudmon A, Kirichok Y. Mitochondrial Ca²⁺ Uniporter and CaMKII in heart. *Nature.* 2014;513(7519):E1-2.

80. Yu J, Wu J, Xie P, Maimaitili Y, Wang J, Xia Z, et al. Sevoflurane post-conditioning attenuates cardiomyocyte hypoxia/reoxygenation injury via restoring mitochondrial morphology. *PeerJ*. 2016;4:e2659.
81. Cadenas S, Aragonés J, Landázuri MO. Mitochondrial reprogramming through cardiac oxygen sensors in ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res*. 2010;88(2):219-28.
82. Cain BS, Meldrum DR, Dinarello CA, Meng X, Joo KS, Banerjee A, et al. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta synergistically depress human myocardial function. *Crit Care Med*. 1999;27(7):1309-18.
83. Kleinbongard P, Schulz R, Heusch G. TNF α in myocardial ischemia/reperfusion, remodeling and heart failure. *Heart Fail Rev*. 2011;16(1):49-69.
84. Toldo S, Mauro AG, Cutter Z, Abbate A. Inflammasome, pyroptosis, and cytokines in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol*. 2018;315(6):H1553-68.
85. Tian H, Xiong Y, Xia Z. Resveratrol ameliorates myocardial ischemia/reperfusion induced necroptosis through inhibition of the Hippo pathway. *J Bioenerg Biomembr*. 2023;55(1):59-69.
86. Birnbaum Y, Ye R, Chen H, Carlsson L, Whatling C, Fjellström O, et al. Recombinant Apyrase (AZD3366) Against Myocardial Reperfusion Injury. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2022;
87. Chen H, Tang LJ, Tu H, Zhou YJ, Li NS, Luo XJ, et al. Arctiin protects rat heart against ischemia/reperfusion injury via a mechanism involving reduction of necroptosis. *Eur J Pharmacol*. 2020;875:173053.
88. Smith CCT, Davidson SM, Lim SY, Simpkin JC, Hothersall JS, Yellon DM. Necrostatin: a potentially novel cardioprotective agent? *Cardiovasc Drugs Ther*. 2007;21(4):227-33.
89. Koudstaal S, Oerlemans MIFJ, Van der Spoel TIG, Janssen AWF, Hoefler IE, Doevendans PA, et al. Necrostatin-1 alleviates reperfusion injury following acute myocardial infarction in pigs. *Eur J Clin Invest*. 2015;45(2):150-9.
90. He F, Zheng G, Hu J, Ge W, Ji X, Bradley JL, et al. Necrosulfonamide improves post-resuscitation myocardial dysfunction via inhibiting pyroptosis and necroptosis in a rat model of cardiac arrest. *Eur J Pharmacol*. 2022;926:175037.
91. Li Y, Hao H, Yu H, Yu L, Ma H, Zhang H. Ginsenoside Rg2 Ameliorates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Regulating TAK1 to Inhibit Necroptosis. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9:824657.
92. Wang K, Liu F, Liu CY, An T, Zhang J, Zhou LY, et al. The long noncoding RNA NRF regulates programmed necrosis and myocardial injury during ischemia and reperfusion by targeting miR-873. *Cell Death Differ*. 2016;23(8):1394-405.
93. Qin D, Wang X, Li Y, Yang L, Wang R, Peng J, et al. MicroRNA-223-5p and -3p Cooperatively Suppress Necroptosis in Ischemic/Reperfused Hearts. *J Biol Chem*. 2016;291(38):20247-59.
94. Zhang DY, Wang BJ, Ma M, Yu K, Zhang Q, Zhang XW. MicroRNA-325-3p protects the heart after myocardial infarction by inhibiting RIPK3 and programmed necrosis in mice. *BMC Mol Biol*. 2019;20(1):17.
95. Wang JX, Zhang XJ, Li Q, Wang K, Wang Y, Jiao JQ, et al. MicroRNA-103/107 Regulate Programmed Necrosis and Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury Through Targeting FADD. *Circ Res*. 2015;117(4):352-63.
96. Gao XQ, Liu CY, Zhang YH, Wang YH, Zhou LY, Li XM, et al. The circRNA CNEACR regulates necroptosis of cardiomyocytes through Foxa2 suppression. *Cell Death Differ*. 2022;29(3):527-39.
97. Hou H, Wang Y, Li Q, Li Z, Teng Y, Li J, et al. The role of RIP3 in cardiomyocyte necrosis induced by mitochondrial damage of myocardial ischemia-reperfusion. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2018;50(11):1131-40.
98. Horvath C, Young M, Jarabíková I, Kindernay L, Ferenczyová K, Ravingerová T, et al. Inhibition of Cardiac RIP3 Mitigates Early Reperfusion Injury and Calcium-Induced Mitochondrial Swelling without Altering Necroptotic Signalling. *Int J Mol Sci*. 2021;22(15):7983.
99. Zhang T, Zhang Y, Cui M, Jin L, Wang Y, Lv F, et al. CaMKII is a RIP3 substrate mediating ischemia- and oxidative stress-induced myocardial necroptosis. *Nat Med*. 2016;22(2):175-82.
100. Szobi A, Rajtik T, Carnicka S, Ravingerová T, Adameová A. Mitigation of postischemic cardiac contractile dysfunction by CaMKII inhibition: effects on programmed necrotic and apoptotic cell death. *Mol Cell Biochem*. 2014;388(1):269-76.
101. Zhu P, Hu S, Jin Q, Li D, Tian F, Toan S, et al. Ripk3 promotes ER stress-induced necroptosis in cardiac IR injury: A mechanism involving calcium overload/XO/ROS/mPTP pathway. *Redox Biol*. 2018;16:157-68.
102. Marunouchi T, Ito T, Onda S, Kyo L, Takahashi K, Uchida M, et al. Effects of 17-AAG on the RIP1/RIP3/MLKL pathway during the development of heart failure following myocardial infarction in rats. *J Pharmacol Sci*. 2021;147(2):192-9.
103. Luedde M, Lutz M, Carter N, Sosna J, Jacoby C, Vucur M, et al. RIP3, a kinase promoting necroptotic cell death, mediates adverse remodeling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2014;103(2):206-16.
104. Karunakaran D, Nguyen MA, Geoffrion M, Vreeken D, Lister Z, Cheng HS, et al. RIPK1 Expression Associates With Inflammation in Early Atherosclerosis in Humans and Can Be Therapeutically Silenced to Reduce NF- κ B Activation and Atherogenesis in Mice. *Circulation*. 2021;143(2):163-77.
105. Koshinuma S, Miyamae M, Kaneda K, Kotani J, Figueredo VM. Combination of necroptosis and apoptosis inhibition enhances cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Anesth*. 2014;28(2):235-41.
106. Tu H, Zhou YJ, Tang LJ, Xiong XM, Zhang XJ, Ali Sheikh MS, et al. Combination of ponatinib with deferoxamine synergistically mitigates ischemic heart injury via simultaneous prevention of necroptosis and ferroptosis. *Eur J Pharmacol*. 2021;898:173999.