



T.C.

**AMASYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI**

**ADENİNİN İNDÜKLEDİĞİ KRONİK BÖBREK YETMEZLİĞİNDE
ADROPİN VE SPEKSİNİN İNFLAMATUVAR YOLAKLARA
ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİLİZ AVCI

**TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ BURAK YAZGAN**

**İKİNCİ DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ GÜLSÜN MEMİ**

**AMASYA
TEMMUZ 2021**

**T.C.
AMASYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI**

**ADENİNİN İNDÜKLEDİĞİ KRONİK BÖBREK YETMEZLİĞİNDE
ADROPİN VE SPEKSİNİN İNFLAMATUVAR YOLAKLARA
ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

Filiz AVCI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Burak YAZGAN

İkinci Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Gülsün MEMİ

**AMASYA
TEMMUZ 2021**

Filiz AVCI tarafından hazırlanan “**ADENİNİN İNDÜKLEDİĞİ KRONİK BÖBREK YETMEZLİĞİNDE ADROPİN VE SPEKSİNİN İNFLAMATUVAR YOLAKLARA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Amasya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Moleküler Tıp** Anabilim Dalında **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Burak YAZGAN

Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Amasya Üniversitesi

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

Başkan: Prof. Dr. Tuba YILDIRIM

Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Amasya Üniversitesi

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

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Seval MÜSÜROĞLU

Tıbbi Fizyoloji Anabilim Dalı, Adıyaman Üniversitesi

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

Tez Savunma Tarihi: 09/07/2021

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

.....
Prof. Dr. Tuba YILDIRIM
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



Kronik böbrek yetmezliği yařayan tüm insanlara...

ETİK BEYAN

Amasya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

(İmza)

Filiz AVCI

09.07.2021

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, bu tez konusunun belirlenmesinde, yürütülmesinde ve çalışmalarım boyunca beni destekleyerek yönlendiren ve tezimin yazımı sırasında bana zaman ayırarak yardımını esirgemeyen tez danışmanım sayın Dr.Öğr. Üyesi Burak YAZGAN'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca, değerli katkılarını esirgemeyen Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Deneyisel modelin gerçekleştirilmesinde ve tez çalışmalarım sırasında bana yol gösteren ikinci danışmanım Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Dr. Öğr. Üyesi Gülsün MEMİ'ye,

Histopatolojik değerlendirmelerin gerçekleştirilmesindeki katkılarından dolayı Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Ebru TAŞTEKİN'e,

Sağladıkları olanaklardan dolayı Amasya Üniversitesi Merkezi Araştırma Uygulama Laboratuvarı ve Araştırma Merkezi'ne (AUMAULAB), merkez müdürü sayın Doç. Dr. Sevgi MARAKLI'ya ve tüm merkez çalışanlarına,

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan sevgili AİLEM'e

En içten sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması FMB- BAP 19-0387 numaralı proje ile Amasya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi ve 2018/118 numaralı proje ile Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
TABLolar DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
RESİMLER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ÖZET.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Böbreğin Anatomisi.....	3
2.1.1. Nefronların temel işlevi.....	3
2.2. Kronik Böbrek Yetmezliği Tanımı.....	5
2.2.1. Kronik böbrek yetmezliği prevalans ve etiyolojisi.....	6
2.2.2. Kronik böbrek yetmezliği patofizyolojisi.....	7
2.2.3. Kronik böbrek yetmezliği evrelendirme.....	8
2.2.4. Böbrek fonksiyonlarının belirlenmesinde kullanılan parametreler.....	9
2.2.4.1. Kreatinin klirensi.....	9
2.2.4.2. BUN.....	9
2.2.5. Kronik böbrek yetmezliğinde kullanılan biyobelirteçler.....	10
2.3. İnflamasyon.....	12
2.3.1. Kronik böbrek yetmezliğinde inflamasyon.....	12
2.3.2. Sitokinler.....	13
2.3.2.1. İnterlökin-1 β	14
2.3.2.2. İnterlökin- 6.....	14
2.3.2.3. İnterlökin- 10.....	15
2.3.2.4. Tümör nekroz faktör alfa (TNF- α).....	16
2.3.2.5. Transforme edici büyüme faktörü β (TGF- β).....	16
2.3.2.6. C reaktif protein (CRP).....	17
2.3.2.7. İnterlökin-17A.....	17
2.3.2.8. İnterlökin-18.....	17
2.3.2.9. İnterlökin-21.....	18

2.3.2.10. İnterlökin- 33.....	19
2.4. Adropin	20
2.5. Speksin.....	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Gereçler.....	25
3.1.1. Çalışmada kullanılan ekipmanlar	25
3.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler	26
3.1.3. Çözeltiler	28
3.2. Yöntem.....	29
3.2.1. Sıçanlarda böbrek yetmezliği modelinin oluşturulması	29
3.2.2. Böbrek fonksiyon testleri	31
3.2.3. Hematoksileneozin boyama protokolü.....	31
3.2.4. Böbrek dokusundan total RNA izolasyonu ve miktarının belirlenmesi.....	32
3.2.5. Komplementer zincir (cDNA) sentezi	33
3.2.6. Primer bağlanma sıcaklıklarının optimizasyonu	33
3.2.7. Agaroz jel elektroforezi ile PCR ürünlerinin ayrılarak görüntülenmesi	34
3.2.8. Real Time PCR analizi.....	35
3.2.9. İstatistiksel analiz	35
4. BULGULAR.....	37
4.1. Renal Fonksiyonların Değerlendirilmesi	37
4.1.1. 24 Saatlik idrar volümü	37
4.1.2. İdrar kreatinin.....	37
4.1.3. Serum kreatinin	38
4.1.4. BUN	39
4.1.5. Kreatinin klirensi.....	39
4.1.6. İdrar protein.....	40
4.1.7. Protein/Kreatinin oranı	41
4.1.8. Böbrek dokusunun ışık mikroskobu ile incelenmesi	41
4.1.9. Böbrek dokusundan izole edilen total RNA miktarı ve saflık düzeyleri	43
4.1.10. Primer bağlanma sıcaklıklarının optimizasyonu	45
4.1.11. Kontrol geni olarak kullanılan aktin genine ait Cq ve melting curve değerleri ..	47
4.1.12. KBY’de adropin ve speksinin KIM-1 gen ekspresyon düzeylerine etkisi.....	48
4.1.13. KBY’de adropin ve speksinin NGAL gen ekspresyon düzeylerine etkisi	49
4.1.14. KBY’de adropin ve speksinin TIMP-1 gen ekspresyon düzeylerine etkisi	51

4.1.15. KBY’de adropin ve speksinin TNF- α gen ekspresyon düzeylerine etkisi	53
4.1.16. KBY’de adropin ve speksinin IL-1 β gen ekspresyon düzeylerine etkisi.....	54
4.1.17. KBY’de adropin ve speksinin TGF- β gen ekspresyon düzeylerine etkisi	56
4.1.18. KBY’de adropin ve speksinin IL-10 gen ekspresyon düzeylerine etkisi	58
4.1.19. KBY’de adropin ve speksinin IL-17A gen ekspresyon düzeylerine etkisi	60
4.1.20. KBY’de adropin ve speksinin IL-18 gen ekspresyon düzeylerine etkisi	61
4.1.21. KBY’de adropin ve speksinin IL-21 gen ekspresyon düzeylerine etkisi.....	63
4.1.22. KBY’de adropin ve speksinin IL-33 gen ekspresyon düzeylerine etkisi	65
5. TARTIŞMA	67
6. SONUÇ VE ÖNERİ.....	73
7. KAYNAKLAR	74
EKLER	84
EK-1. Etik Kurul Raporu.....	85
ÖZGEÇMİŞ.....	86

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. KBY tanı kriterleri	5
Tablo 2.2. RRT olarak HD'e başlayan hastaların etiyolojik nedenlere göre dağılımı	6
Tablo 3.1. Kullanılan ekipman marka ve kullanım amaçları	25
Tablo 3.2. Deney grupları ve uygulamaları.....	30
Tablo 3.3. cDNA sentezi için kullanılan termal cycler programı	33
Tablo 3.4. Genler için primer dizilimleri	34
Tablo 3.5. Real time PCR amplifikasyon programı	35
Tablo 4.1. Total RNA örneklerinin konsantrasyonları ve A _{260/280} oranları	44



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Böbreğin anatomik yapısı	3
Şekil 2.2. Nefronun yapısı	4
Şekil 2.3. KBY patogenezi	8
Şekil 2.4. KIM-1 proteininin yapısı	11
Şekil 2.5. İnflamasyonun şematik gösterimi	13
Şekil 2.6. IL-6' nın hücrel sinyalizasyon mekanizması	15
Şekil 2.7. IL-18'in hücrel sinyal mekanizması	18
Şekil 2.8. IL 21'in hücreler üzerindeki etkisi	19
Şekil 2.9. IL-33'ün sinyal iletim mekanizması	20
Şekil 2.10. Adropinin eksprese edildiği dokular	21
Şekil 2.11. Adropin peptidinin endotel hücrelerdeki etkisi	22
Şekil 2.12. Speksinin genel fonksiyonları	24
Şekil 4.1. Adenin indüklediği kronik böbrek hasarında 24 Saatlik idrar volümü.	37
Şekil 4.2. Adenin indüklediği kronik böbrek hasarında idrar kreatin düzeyleri.....	38
Şekil 4.3. Adenin indüklediği kronik böbrek hasarında serum kreatin düzeyleri.	38
Şekil 4.4. Adenin indüklediği kronik böbrek hasarında BUN düzeyleri.	39
Şekil 4.5. Adenin indüklediği kronik böbrek hasarında kreatinin klirens düzeyleri.....	39
Şekil 4.6. Adenin indüklediği kronik böbrek hasarında idrar protein düzeyleri.	40
Şekil 4.7. Adenin indüklediği kronik böbrek hasarında protein/kreatin oranı düzeyleri.	41
Şekil 4.8. Adenin indüklediği kronik böbrek hasarında tübüler nekroz indeksi.	43
Şekil 4.9. Aktin genine ait Cq sonuçları	47
Şekil 4.10. Aktin genine ait Melting Curve analiz sonuçları.....	47
Şekil 4.11. Böbrek dokusunda KIM-1 genine ait Cq sonuçları.....	48
Şekil 4.12. KIM-1 genine ait Melting Curve analiz sonuçları.....	48
Şekil 4.13. KBY'de adropin ve speksinin KIM-1 gen ekspresyon düzeylerine etkisi.	49
Şekil 4.14. Böbrek dokusunda NGAL genine ait Cq sonuçları.....	49
Şekil 4.15. NGAL genine ait Melting Curve analiz sonuçları.....	50
Şekil 4.16. KBY'de adropin ve speksinin NGAL gen ekspresyon düzeylerine etkisi.	50
Şekil 4.17. Böbrek dokusunda TIMP-1 genine ait Cq sonuçları	51
Şekil 4.18. TIMP-1 genine ait Melting Curve analiz sonuçları.....	51
Şekil 4.19. KBY'de adropin ve speksinin TIMP-1 gen ekspresyon düzeylerine etkisi.	52

Şekil 4.20. Böbrek dokusunda TNF- α genine ait Cq sonuçları	53
Şekil 4.21. TNF- α genine ait Melting Curve analiz sonuçları	53
Şekil 4.22. KBY’de adropin ve speksinin TNF- α gen ekspresyon düzeylerine etkisi.	54
Şekil 4.23. Böbrek dokusunda IL-1 β genine ait Cq sonuçları	54
Şekil 4.24. IL-1 β genine ait Melting Curve analiz sonuçları	55
Şekil 4.25. KBY’de adropin ve speksinin IL-1 β gen ekspresyon düzeylerine etkisi.	55
Şekil 4.26. Böbrek dokusunda TGF- β genine ait Cq sonuçları	56
Şekil 4.27. TGF- β genine ait Melting Curve analiz sonuçları	56
Şekil 4.28. KBY’de adropin ve speksinin TGF- β gen ekspresyon düzeylerine etkisi.	57
Şekil 4.29. Böbrek dokusunda IL-10 genine ait Cq sonuçları	58
Şekil 4.30. IL-10 genine ait Melting Curve analiz sonuçları	58
Şekil 4.31. KBY’de adropin ve speksinin IL-10 gen ekspresyon düzeylerine etkisi.	59
Şekil 4.32. Böbrek dokusunda IL-17A genine ait Cq sonuçları	60
Şekil 4.33. IL-17A genine ait Melting Curve analiz sonuçları	60
Şekil 4.34. KBY’de adropin ve speksinin IL-17A gen ekspresyon düzeylerine etkisi.	61
Şekil 4.35. Böbrek dokusunda IL-18 genine ait Cq sonuçları	62
Şekil 4.36. IL-18 genine ait Melting Curve analiz sonuçları	62
Şekil 4.37. KBY’de adropin ve speksinin IL-18 gen ekspresyon düzeylerine etkisi.	63
Şekil 4.38. Böbrek dokusunda IL-21 genine ait Cq değerleri sonuçları	63
Şekil 4.39. IL-21 genine ait Melting Curve analiz sonuçları	64
Şekil 4.40. KBY’de adropin ve speksinin IL-21 gen ekspresyon düzeylerine etkisi.	64
Şekil 4.41. Böbrek dokusunda IL-33 genine ait Cq sonuçları	65
Şekil 4.43. KBY’de adropin ve speksinin IL-33 gen ekspresyon düzeylerine etkisi.	66

RESİMLER DİZİNİ

Resim 4.1. Her deney grubunu temsil eden bir sıçan böbreğinin hematoksileneozin boyama sonrası ışık mikroskobu fotoğrafları.....	42
Resim 4.2. TIMP-1 ve NGAL gradiyent PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	45
Resim 4.3. KIM-1 ve TNF- α gradiyent PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	45
Resim 4.4. IL1- β ve IL-18 gradiyent PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	46
Resim 4.5. Aktin, IL-17A, TGF- β ve IL-21 gradiyent PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri.....	46



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklama

A	Alfa
β	Beta
dk	Dakika
rpm	Dakikadaki devir sayısı
gr	Gram
kg	Kilogram
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
mg	Miligram
nm	Nanometre
ng	Nanogram
°C	Santigrat derece
%	Yüzde

Kısaltmalar

Açıklama

BUN	Kan üre azotu
cDNA	Komplementer DNA
CRH	Kortikotropin serbestleştirici hormon
CRPC	Reaktif protein
CTGF	Konnektif doku büyüme faktörü
EDTA	Disodyum etilendiamintetraasetat
ERK1/2	Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz
ENHO	Enerji homeostazi ilişkili gen
ENOS	Endotelial nitrik oksit sentaz

FADD	Tümör nekroz faktörü Fas ile ilişkili ölüm domaini
GFH	Glomerüler filtrasyon hızı
GPR19	G protein reseptör 19
HD	Hemodiyaliz
IFN γ	İnterferon gamma
IgV	İmmüoglobülin değişken alanı
IRAK	IL-1 reseptör ilişkili kinaz
IL-1	İnterlökin 1
IL-4	İnterlökin 4
IL-6	İnterlökin 6
IL-10	İnterlökin 10
IL-12	İnterlökin 12
IL-17A	İnterlökin 17A
IL-18	İnterlökin 18
IL-21	İnterlökin 21
IL-33	İnterlökin 33
JAK	Janus kinaz
JNK	C-Jun-N terminal kinaz
KBY	Kronik böbrek yetmezliği
MAPK	Mitojenle aktifleşen protein kinaz
KIM-1	Böbrek hasar molekülü
MILIBS	Metal iyona bağımlı ligand bağlanma bölgesi
MMP	Matriks metaloproteinaz
K/DOQI	Kronik böbrek hastalığı uygulama kılavuzu
NF- $\kappa\beta$	Nükleer faktör kappa beta
NGAL	Nötrofil jelatinaza bağlı lipokalin
NO	Nitrik oksit
NPQ	Nöropeptit Q
PI3K-AKT	Fosfoditilinozitol 3 fosfat kinaz
PBS	Fosfat tampon solüsyonu
PD	Periton diyaliz
PtdSer	Fosfatidilserin
RRT	Renal replasman tedavisi
RT-PCR	Gerçek zamanlı polimer zincir reaksiyonu

SAP	Serum amiloid P bileşeni
SDBY	Son dönem böbrek yetmezliği
STAT	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü
TAE	Tris-asetik asit-EDTA tamponu
TBE	Tris-borik asit-EDTA tamponu
T2DM	Tip 2 Diabetes mellitus
TGF- β	Dönüştürücü büyüme faktörü – beta
Th	T hücreleri
TIMP1	Doku metallopeptidaz inhibitörü 1
TNF- α	Tümör nekroz faktörü –alfa
TNFR	Tümör nekroz faktör reseptör
TND	Türk nefroloji derneği
Tx	Transplantasyon
VEGFR2	Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptör 2

ÖZET

ADENİNİN İNDÜKLEDİĞİ KRONİK BÖBREK YETMEZLİĞİNDE ADROPİN VE SPEKSİNİN İNFLAMATUVAR YOLAKLARA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Filiz AVCI

Amasya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Yüksek Lisans, Temmuz 2021
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Burak YAZGAN

Kronik böbrek yetmezliği (KBY), glomerüler filtrasyon hızındaki (GFH) azalmanın bir sonucu olarak böbrek fonksiyonlarında kronik ve ilerleyici bir bozulma olarak tanımlanmaktadır. KBY kronik inflamatuvar bir süreçtir. IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-21 ve IL-33 gibi pro-inflamatuvar sitokinler böbrek hasarını artırırken IL-10, IL-13, TGF- β gibi anti-inflamatuvar sitokinler inflamatuvar süreci baskılayarak böbrek hasarını azaltırlar. Speksin, glikoz ve lipid metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynayan bir nöropeptittir. Bunun yanında kardiyorenal fonksiyonların düzenlenmesini de sağlamaktadır. Adropin, glikoz ve lipid metabolizması ile ilişkili birçok yolu düzenleyen bir peptittir. Bu iki peptitin inflamasyon ile ilişkili yolları düzenleyebileceği belirtilmiştir. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda; Adenin ile indüklenen KBY modelinde speksin ve adropin uygulanmasının böbrek hasarı ve inflamatuvar süreç üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. KBY modeli wistar albino sıçanlara adenin solüsyonu verilerek oluşturulmuştur. Renal fonksiyon testleri otoanalizör ile ölçülmüştür. Böbrekteki histopatolojik değişiklikler hematoksilineozin boyama sonrasında ışık mikroskobu ile değerlendirilmiştir. Böbrek dokusunda IL-1 β , IL-10, IL-17A, IL-18, IL-21, IL-33, KIM-1, NGAL, TNF- α , TGF- β , TIMP-1 genlerinin ekspresyonları gerçek zamanlı PCR ile belirlenmiştir. Adenin ile indüklediği KBY grubunda kontrol grubuna kıyasla 24 saatlik idrar hacmi, serum kreatinin, BUN ve idrar protein düzeyleri artmıştır. Bunun yanında renal hasar, TIMP-1 ve IL-33 düzeyleri KBY gelişimi ile artış göstermiştir. Adropin uygulanması 24 saatlik idrar hacmi ve idrar protein düzeylerini KBY grubuna kıyasla azaltmıştır. Bunun yanında renal hasar, NGAL, TIMP-1, IL-17A ve IL-33 düzeyleri adropin uygulanması ile azalmıştır. Benzer olarak, speksin uygulanması 24 saatlik idrar hacmi ve idrar protein düzeylerini KBY grubuna kıyasla azaltmıştır. Bunun yanında KIM-1, TIMP-1 ve IL-33 düzeyleri speksin uygulanması ile azalmıştır. Adropin+speksin uygulanması KBY grubuna kıyasla renal hasar, KIM-1, NGAL, TIMP-1, IL-1 β , IL-17A, IL-18, IL-33, TGF- β ve TNF- α seviyelerini azaltıcı etki göstermiştir. Bizim sonuçlarımız bu peptitlerin inflamasyon ve böbrek hasarında koruyucu etkiye sahip olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Kronik böbrek yetmezliği, İnflamasyon, İnterlökin, Adropin, Speksin

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE EFFECTS OF ADROPIN AND SPEXIN ON INFLAMMATORY PATHWAYS IN ADENINE INDUCED CHRONIC RENAL FAILURE

Filiz AVCI

Amasya University, Institute of Health Sciences
Department of Molecular Medicine, MSc, July/2021
Supervisor: Assist. Prof. Burak YAZGAN

Chronic renal failure (CRF) can be defined as a chronic and progressive loss of kidney function as a result of a reduction in glomerular filtration rate (GFR). CRF is a chronic inflammatory process. Pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6, IL-17A, IL-21 and IL-33 also trigger renal damage, however anti-inflammatory cytokines such as IL-10, IL-13, TGF- β reduce the renal damage by suppressing the inflammatory process. Spexin is a neuropeptide involved in the regulation of glucose and lipid metabolism. In addition, it also regulates cardio-renal function. Adropin is a peptide that regulates many pathways associated with glucose and lipid metabolism. It has been noted that these two peptides can regulate pathways associated with inflammation. In light of this information, our study aims to determine the effects of spexin and adropin administration on kidney damage and inflammatory process in adenine-induced CRF model. The CRF model was created by giving adenine solution to Wistar albino rats. Renal function tests were measured with an autoanalyzer. Histopathological changes in the kidney were evaluated by light microscopy after hematoxyline eosin staining. Expression of IL-1 β , IL-10, IL-17A, IL-18, IL-21, IL-33, KIM-1, NGAL, TNF- α , TGF- β , TIMP-1 genes in kidney tissue were determined by real time PCR. 24-hour urine volume, serum creatinine, BUN, and urine protein levels increased in the adenine-induced CRF group compared to the control group. In addition, renal damage, TIMP-1 and IL-33 levels increased with the development of CRF. Administration of Adropin reduced 24-hour urine volume and urine protein levels compared to the CRF group. In addition, renal damage, NGAL, TIMP-1, IL-17A and IL-33 levels were reduced by administration of adropin. Similarly, administration of spexin reduced 24-hour urine volume and urine protein levels compared to the CRF group. In addition, the levels of KIM-1, TIMP-1 and IL-33 decreased with the application of spexin. Administration of Adropin+spexin showed effect in reducing levels of renal damage, KIM-1, NGAL, TIMP-1, IL-1 β , IL-17A, IL-18, IL-33, TGF- β and TNF- α compared to CRF group. Our results suggest that these peptides may have protective effects on inflammation and kidney damage.

Key Words: Chronic renal failure, Inflammation, Interleukin, Adropin, Spexin

1. GİRİŞ

Böbrekler, insan vücudunun hayati organlarından. Metabolik faaliyetler sonucu oluşan fazla su ile zararlı toksinler böbrekler tarafından filtrelenerek vücuttan atılır. Böbrekle ilgili veya böbrek dışı bir nedene bağlı olarak nefronların ilerleyici, geri dönüşümsüz bir şekilde kaybolması sonucunda sıvı-elektrolit ve asit-baz dengesi bozulmakta ve kronik böbrek yetmezliği (KBY) tablosu ortaya çıkmaktadır.

KBY çok farklı nedenlerle gelişebilmekte yaşa, cinsiyete, ırka ve ülkeye göre değişebilmektedir. Üç aydan uzun süren azotemi, uzun süreli üremik belirti ve bulgular, anemi, hiperfosfatem, hipokalsemi, idrar sedimentinde geniş silendirler ve radyolojik incelemelerde bilateral küçük böbrekler kronik hastalık göstergeleridir [1]. Son dönem böbrek yetmezliği (SDBY)'nin en sık sebepleri, hipertansiyon, diyabet, glomerülonefritler, kronik interstisyel nefrit ve kardiyovasküler hastalıklardır. Ülkemizde görülen en önemli etyolojik faktörler arasında ise; diabetes mellitus, hipertansiyon, kronik glomerulonefrit ve ürolojik hastalıklar gelmektedir [2].

KBY tedavisi yaşam boyu devam eden bir hastalık olması nedeni ile diğer kronik hastalıklarda olduğu gibi hastalık ve tedaviye uyumda bireysel yönetim öne çıkmaktadır. Morbidite ve mortalitenin azaltılmasında, diyet, tuz, sıvı kısıtlamalarına ve ilaç tedavisine hastaların uyum sağlaması önemli görülmektedir. Ancak yapılan çalışmalarda hastaların diyet, sıvı kısıtlamalarına ve ilaç tedavisine istenilen düzeyde uyum sağlayamadıkları belirtilmiştir [1].

Türk Nefroloji Derneği (TND), KBY'yi morbidite ve mortalitesi yüksek olan, yaşam kalitesini olumsuz etkileyen ve büyük ekonomik yük getiren bir durum olduğu için Türkiye'nin büyük sorunu olarak tanımlamıştır. Sağlık Bakanlığı ve Türk Nefroloji Derneği ortak raporuna (2017) göre Türkiye'de 77,311 kronik böbrek yetmezliği hastasının olduğu, bu hastaların 58,635'inin hemodiyaliz (HD), 3346'ının periton diyalizi (PD), 15,330'unun böbrek transplantasyonu (Böbrek Tx) gibi renal replasman tedavisi aldığı ve bu sayının gittikçe arttığı belirtilmiştir [2].

KBY, kronik inflamatuvar bir süreçtir. Bu hastalarda normal popülasyona göre 10 kat daha yüksek serum pro-inflamatuvar protein düzeyleri görülmektedir. SDBY olan hastalarda pro-inflamatuvar sitokinler olan, interlökin 1 (IL-1), interlökin 6 (IL-6) ve tümör nekroz faktör alfa (TNF- α)'nın serum miktarlarının arttığı bilinmektedir. Bunun yanında bazı pozitif akut faz reaktanları olan C reaktif protein (CRP), serum amiloid A, ferritin, fibrinojen ve

haptoglobülin’de böbrek hasarının değerlendirilmesinde kullanılabilir [3]. Serum kreatinin ve kan üre azotu (BUN) renal yetmezlikte kullanılan önemli klinik parametreler olsada son yıllarda nefrotoksisitede kullanılabilecek bazı yeni biyo belirteçlerin olduğu belirtilmektedir. Böbrek yetmezliğinde idrarda miktarlarının değişebileceği bildirilen bazı belirteçler böbrek hasar molekülü-1(KIM-1), sistatin C, doku metallo peptidaz inhibitörü-1 (TIMP-1) ve nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin (NGAL)’dir [4].

Enerji metabolizmasının düzenlenmesinde birçok nöropeptid rol almaktadır. Bunlardan biri de 2007 yılında keşfedilmiş olan speksindir. Speksin; 14 aminoasitten oluşan C12orf29 geni tarafından kodlanan bir peptiddir [5]. Glikoz ve lipit metabolizmasının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır [6]. Balık ve memelilerde yapılan çalışmalarda speksin’in böbrek, beyin, kalp, karaciğer, akciğer, kas, adrenal bez, testis, pankreas ve mide gibi organlarda eksprese edildiği görülmüştür [7]. Speksinin hormonal etki altında böbrek üstü bezlerinde lokal olarak üretildiği, renal fonksiyon için merkezi bir düzenleyici ve böbrek hasarı sonrası steroid üretiminde rolü olduğu düşünülmektedir [6]. Bunun yanında speksinin anti-inflamatuvar etkileri olabileceği belirtilmektedir.

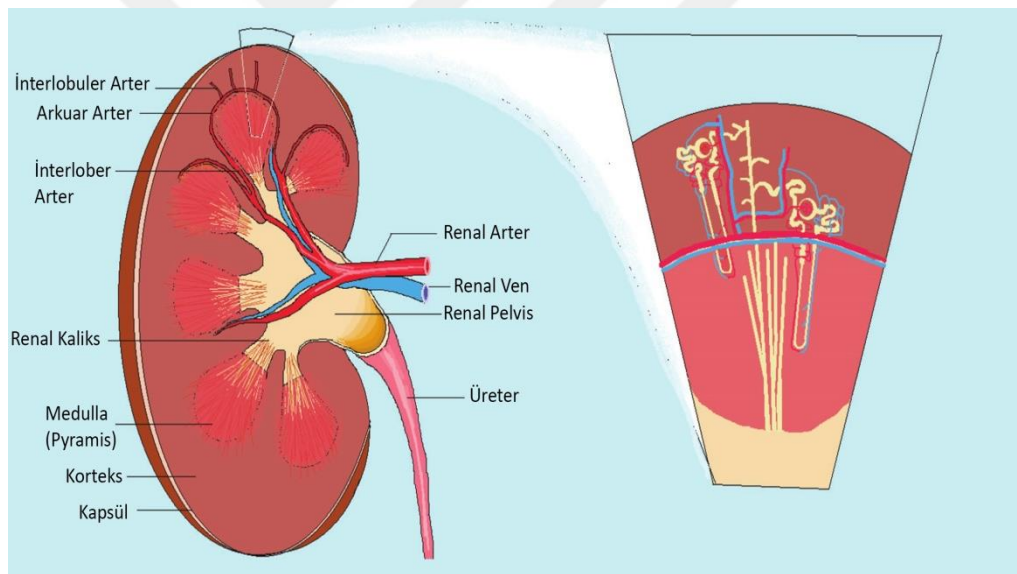
2008 yılında Kumar ve arkadaşları tarafından keşfedilmiş olan adropin, 76 amino asit kalıntısından oluşan 7,927 kDa moleküler ağırlığa sahip, glikoz ve lipit metabolizması ile ilişkili birçok yolu düzenleyen peptid bir hormondur [7,8]. Adropin, böbrek dokusunda glomerül, peritübüller kapiller endotelial hücreler ve peritübüller interstisyel hücreler tarafından lokal olarak eksprese edilir [9]. Bunun yanında endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) genini aktive ederek nitrik oksit (NO) salgılanmasını artırır ve endotelial hasarın azaltılmasını sağlar. Ayrıca bazı çalışmalar bu peptidin anti-inflamatuvar etkilere sahip olabileceğini belirtmektedir. Ancak bu konuda yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır.

Bu çalışmada, adenin ile indüklenen KBY modelinde speksin ve adropin uygulanmasının böbrek hasarı ve inflamatuvar süreç üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Böbreğin Anatomisi

Böbrekler retroperitoneal bölgede bulunan her biri yaklaşık 120-150 gram ağırlığında olup, metabolik faaliyetler sonucu oluşan fazla su ve zararlı toksinleri filtreleyerek idrar oluşturup vücuttan dışarı atan organlardır. Sağ böbrek karaciğerin altına girdiğinden yerleşim olarak sol böbreğe göre daha aşağıdadır. Her böbreğin üzerinde birer adrenal bez bulunur. Böbreğin makroskopik incelemesinde en dışta fibröz bir kapsül, kapsülün altında korteks (kabuk), en içte medulla (öz) bulunur. Kanı süzülme üzere böbreklere taşıyan renal arter ve filtre edilen kanı renal venle tekrar dolaşıma dönmesini sağlayan damarlar vardır. Aynı zamanda her iki böbrekte kanın süzülerek zararlı ve artık ürünlerin atılmasını sağlayan nefron adı verilen küçük birimler bulunur (Şekil 2.1) [1,2].

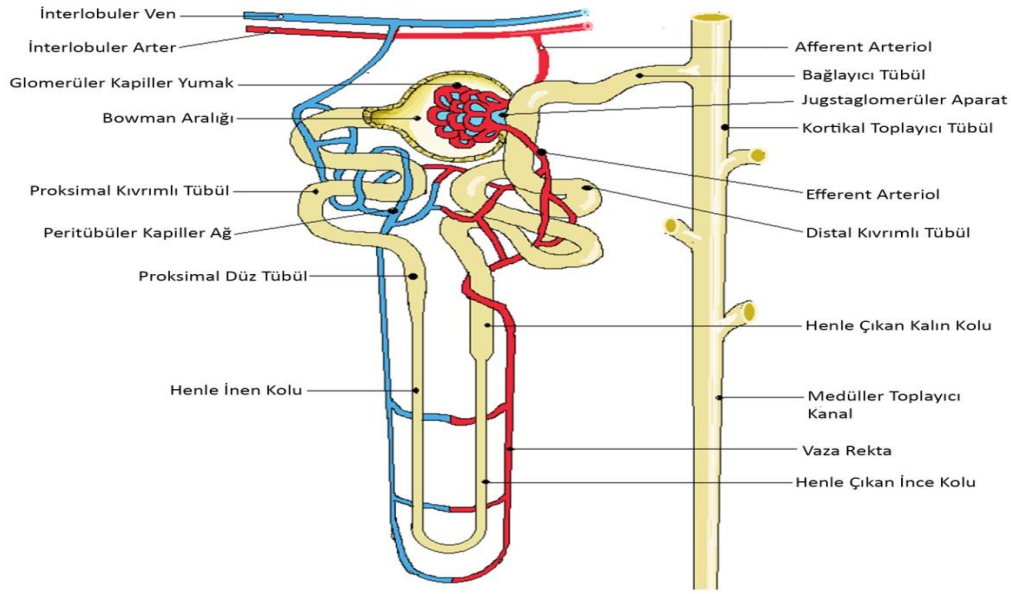


Şekil 2.1. Böbreğin anatomik yapısı [10]

2.1.1. Nefronların temel işlevi

Böbreğin işlevsel olan en küçük birimine 'nefron' adı verilir. İnsanın her iki böbreğinde toplam 1-1,2 milyona yakın sayıda nefron vardır. Nefronların temel işlevi kan plazmasının böbrekten geçerken istenmeyen maddelerden arındırılmasıdır. Bir nefronda; bowman kapsülü, glomerulusa kan getiren afferent (getirici) damar, glomerulden kanı uzaklaştıran efferent (götürücü) damar, glomerulus ve tübülüsler bulunmaktadır. Tübülüsler, proksimal tüp, henle kulpu, distal tüp ve kollektörden (toplayıcı kanal) oluşmaktadır. Her

nefronun proksimal ucunda 'bowman kapsülü' bulunur. Bowman kapsülü, yassı epitelle döşenmiştir ve yarım küre şeklindedir. Bowman kapsülünün içinde bulunan kılcal damar ağına ise 'glomerulus'denir. Kanın süzülme işi burada gerçekleşir. Glomerulus, bowman kapsülü, proksimal tubulus ve distal tubulus böbreğin korteksinde; henle kulpu ve toplayıcı kanallar ise böbreğin medullasında yer almaktadır (Şekil 2. 2). Böbreğin, idrar oluşumu dışında da birçok fonksiyonu vardır [1].



Şekil 2.2. Nefronun yapısı [10]

Böbreğin diğer fonksiyonları:

- Artık ürünlerin dışarı atılması
- Elektrolit ve sıvı dengesinin düzenlenmesi
- Asit - baz dengesinin düzenlenmesi
- Kan basıncının hormonal olarak düzenlenmesi
- Hormonların salgılanması, metabolize edilmesi ve dışarı atılması
- Peptit hormonların yıkımı
- İlaçlar, toksinler ve metabolitlerin detoksifikasyonu ve atılımı

2.2. Kronik Böbrek Yetmezliği Tanımı

Kronik böbrek yetmezliği (KBY) glomerüler filtrasyon hızında (GFH) azalma sonucu böbreğin sıvı-solüt dengesini ayarlama ve metabolik-endokrin fonksiyonlarında kronik ve ilerleyici bozulma hali olarak tanımlanabilir. KBY, kardiyovasküler hastalık ve erken ölüm gibi olumsuz sonuçlara yol açan dünya çapında bir halk sağlığı sorunudur [11].

KBY, çeşitli hastalıklara bağlı olarak nefronların ilerleyici ve geri dönüşümsüz kaybı ile karakterize bir sendromdur. Böbrek yetersizliği olan bir olguda; üç aydan uzun süren azotemi, uzun süreli üremik belirti ve bulgular, renal osteodistrofi belirti ve bulguları, anemi, hiperfosfatemi, hipokalsemi, idrar sedimentinde geniş silendirler ve radyolojik incelemelerde bilateral küçük böbreklerin görülmesi kronik hastalık göstergeleridir [12]. Bu özellikler KBY'yi akut böbrek yetmezliğinden ayırır. KBY'ye neden olan risk faktörleri incelendiğinde; yaş, cinsiyet, ırk, genetik yatkınlık, aile öyküsü, altta yatan hastalıklar (diyabet, hipertansiyon, kardiyovasküler sistem hastalıkları), hareketsiz yaşam tarzı, sigara, alkol gibi kötü alışkanlıklar, düzensiz beslenme, metabolik sendrom ve obezite en fazla sorumlu tutulan faktörlerdir [12,13].

National Kidney Foundation/Kidney Disease Improving Global Outcomes (NKF-KDIGO) çalışmasının 2013 yılında yayımlanan kılavuzunda KBY tanı kriterleri (Tablo 2.1.) verilmiştir [13].

Tablo 2.1. KBY tanı kriterleri

KBY tanı kriterleri (herhangi birinin > 3 ay varlığı)	
Böbrek hasarı belirteçleri (bir ya da daha fazla)	a) Albuminüri (Albumin atılım oranı ≥ 30 mg/24 saat; Albuminkreatin oranı ≥ 30 mg/g [≥ 3 mg/mmol]) b) Böbrek nakli hikayesi GFH c) Tübüler hasara bağlı elektrolit ve diğer bozukluklar d) Histolojik patolojiler e) Görüntüleme ile saptanan yapısal bozukluklar f) İdrar sediment patolojileri
Azalmış Glomerüler Filtrasyon Hızı	GFH < 60 ml/dk/1.73 m ²

2.2.1. Kronik böbrek yetmezliği prevalans ve etiyolojisi

KBY, böbreklerin işlevlerini bozan herhangi bir nedenle ortaya çıkabilir. Türkiye’de genel yetişkin popülasyonundaki KBY oranı %15,7’dir. Diğer bir deyişle her 6 yetişkin kişiden birisinde KBY vardır. Düşük GFH (<60 ml/dk) olan hasta oranı ise %5,1 olup her 20 yetişkinden birisinde kritik düzeyde KBY olduğu saptanmıştır. Gelişmiş ülkelerdeki SDBY prevalansındaki farklılıkların temelinde etnik, ırksal ve genetik farklılıkların yanı sıra diyabet ve hipertansiyon gibi hastalıkların oranlarının değişkenliğinin önemli rolü olduğu düşünülmektedir [14-16]. En sık görülen nedenleri hipertansiyon, enfeksiyonlar, glomerulo nefritler, aterosklerozis ve diabetes mellitustur. Hemodiyaliz hastalarında yapılan bir çalışmaya göre 2017 yılındaki etiyolojik nedenlere göre dağılımı farklılık göstermektedir (Tablo 2.2).

Diabetes mellitus: Genellikle, diyabet kaynaklı böbrek hastalığının ilk belirtisi idrardaki proteindir. Glomerüler filtrasyon bariyeri hasar gördüğünde albüminüri ve proteinüri görülmektedir [1].

Hipertansiyon: Yüksek kan şekeri gibi, yüksek tansiyon da böbreklerdeki kan damarlarına zarar verebilir. Yüksek tansiyonu olan her 5 erişkinden yaklaşık 1’inde KBY vardır [1].

Tablo 2.2. RRT olarak HD'e başlayan hastaların etiyolojik nedenlere göre dağılımı [2].

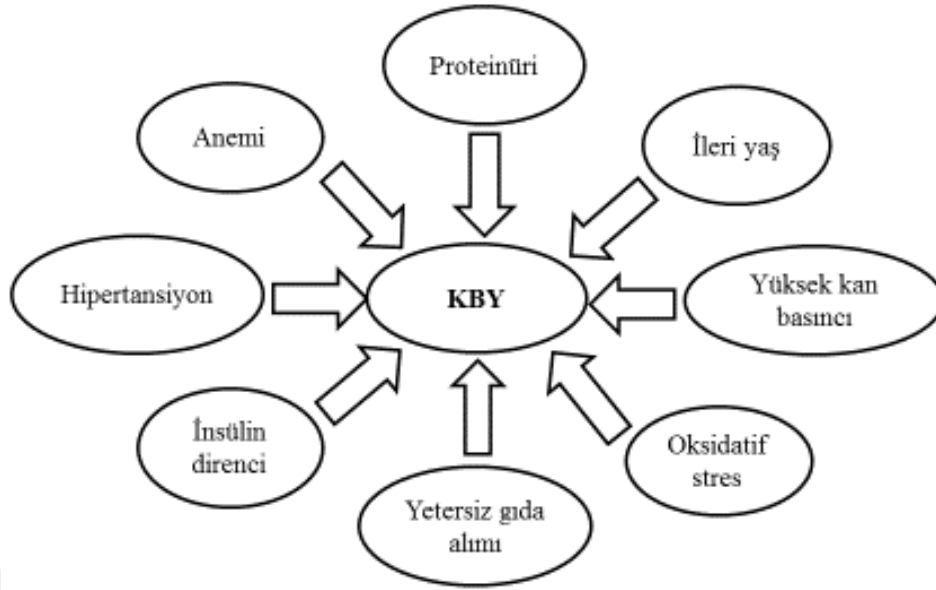
	n	%
Diabetesmellitus	658	38,03
Tip1 DM	41	2,37
Tip2 DM	617	35,66
Hipertansiyon	475	27,46
Glomerülonefrit	104	60,1
Polikistik böbrek hastalıkları	53	3,06
Tübülointerstisyel nefrit	24	1,39
Obstrüktifnefropati	23	1,33
Renalvasküler hastalık	14	0,81
Diğer	121	7,0
Etyolojisi bilinmeyen	258	14,91
Toplam	1730	100,00

Türkiye Kronik Böbrek Hastalığı Prevelansı Araştırması (CREDIT) çalışmasında KBY'nin kadınlarda (%18,4) erkeklere (%12,8) oranla daha fazla görüldüğü, yaşla birlikte riskin belirgin bir şekilde arttığı, kırsal kesimde yaşayanlarda riskin daha fazla olduğu, ayrıca Marmara ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde yaşayanlarda KBY riskinin daha fazla olduğu bildirilmiştir [14]. Kronik böbrek yetmezliğinin en sık görüldüğü ülkeler ise Meksika, Tayvan, Japonya ve ABD'dir. Ülkeler arasında görülme sıklığına bakıldığında Türkiye listedeki ilk 10 ülke arasındadır [17].

2.2.2. Kronik böbrek yetmezliği patofizyolojisi

Kan akımındaki azalma sonrasında oluşan reperfüzyon ile birlikte böbrek dokusunda çeşitli derecelerde hasar oluşmaktadır. Öncelikle böbrek dokusu, dolaşımdaki zararlı maddeye (ilaçlar vs.) maruz kalmış olabilir. İkinci olarak, glomerüler filtrasyon oldukça yüksek transglomerüler basınca (fizyolojik koşullarda bile) bağımlıdır ve bu durum glomerüler kılcal damarları diğer kılcal damar ağlarının aksine hemodinamik hasara karşı savunmasız hale getirir. Brenner ve arkadaşları, glomerüler hipertansiyon ve hiperfiltrasyonu kronik böbrek hastalığının ilerlemesine en büyük katkıda bulunanlar olarak tanımlamaktadır. Üçüncüsü, glomerüler filtrasyon membranı, anyonik makromolekülleri geciktiren bir bariyer görevi gören negatif yüklü moleküllere sahiptir. Bu elektrostatik bariyerdeki bozulma ile birçok glomerüler hasar formunda olduğu gibi, plazma proteinleri glomerüler ultra filtrata geçmeye başlar. Bu nedenle, fonksiyonel bir birim olarak nefron kavramının anlaşılması sadece böbrek fizyolojisi için değil, aynı zamanda böbrek hastalıklarının patofizyolojisi için de önemlidir [18].

Klinik uygulamada böbrek hasarının saptanmasında en yaygın kullanılan gösterge albüminüri veya proteinüri'dir [1]. Proteinüri, direkt tübüler toksisiteye neden olur. Proksimal tübülde aşırı protein reabsorpsiyonu lizozomal işleme kapasitesini aşarak, lizozomal rüptüre yol açabilir ve doğrudan tübüler toksisiteye neden olabilir [18]. Normal koşullarda günlük albümin atılımı 30 mg'ın, protein atılımı ise 150 mg'ın altındadır. Bu durumun üç aydan daha uzun sürmesi böbrek hasarının göstergesi olarak kabul edilir [3]. Klinik uygulamada albüminüri veya proteinüri sabah ilk idrarda albümin / kreatinin veya protein / kreatinin oranı ile basit ve doğruya oldukça yakın bir şekilde belirlenebilir. Bunların yanı sıra yetersiz gıda alımı, kronik inflamasyon, oksidatif stres gibi değişkenlerde KBY patogenezinde rol almaktadır [19]. KBY patogenezinde etkili olan faktörler Şekil 2. 3'te gösterilmiştir [19].



Şekil 2.3. KBY patogenezi [19]

2.2.3. Kronik böbrek yetmezliği evrelendirme

Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (K/DOQI) rehberleri kronik böbrek hastalıklarının GFH'ye göre beş evrede sınıflandırmaktadır:

Evre1: Mikroalbüminüri/proteinüri, hematüri veya histolojik değişikliklerin yansıttığı birkaç böbrek zedelenmesi kanıtı ile normal veya artmış GFH.

Evre 2: GFH'de hafif azalma ile (60-89 ml/dk/1.73 m²) böbrek zedelenmesi.

Evre 3: Orta derecede GFH azalması (30-59 ml/dk). Üre ve kreatin değerlerinde artış.

Evre 4: GFH'de ciddi azalma (15-29 ml/dk).

Evre5: Yaşamı sürdürmek için diyaliz veya böbrek nakli gibi bir renal replasman tedavisinin (RRT) göz önüne alınmasının gerektiği durumdur (GFH<15 ml/dk).

Evre 4 ve 5'te anemi, asidoz, hipokalsemi, hiperfosfatemi ve hiperkalemi gibi klinik durumlar oluşmaktadır [13].

2.2.4. Böbrek fonksiyonlarının belirlenmesinde kullanılan parametreler

2.2.4.1. Kreatinin klirensi

Kreatinin klirensi, GFH hesaplanmasında en sık kullanılan testlerden biridir. Kandaki kreatinin hemen hepsi glomerüllerden süzülerek böbrekler yoluyla atıldığından böbrek fonksiyonlarının iyi bir göstergesidir. Kreatinin klirensi için idrar örneği genellikle 24 saat boyunca toplanır. Ancak daha kısa sürede de (8 saat -12 saat vb.) toplanabilir. Kreatinin klirensi 2 formülle hesaplanabilir [1].

FORMÜL 1. 24 saat idrar toplanarak;

$$\text{Kreatinin klirensi (ml/dakika)} = (U \times V) / (P \times T)$$

U: İdrardaki Kreatinin (mg/dl) P: Plazma ya da kandaki kreatinin (mg/dl)

V: İdrar Hacmi (24 saatte/ml) T: Zaman

FORMÜL 2. Cockcroft-Gault formülü;

Kreatinin klirensi (ml/dakika) =

Hasta erkek ise: $(140 - \text{Yaş}) \times (\text{İdeal kilo}) / (\text{Serum kreatinin (mg/dl)} \times 72)$

Hasta kadın ise: $[(140 - \text{Yaş}) \times (\text{İdeal kilo}) / (\text{Serum kreatinin (mg/dl)} \times 72)] \times 0.85$ [1].

Normal böbrek fonksiyonu olan kişilerde kreatinin klirensi ile GFH yaklaşık %10 ile %20, ilerlemiş böbrek yetmezliği olan kişilerde %50 fazla hesaplanır [1].

2.2.4.2. BUN

Kan üre azotu (BUN) karaciğerde, protein ve amino asit katabolizması tarafından üretilen azotlu son üründür. Böbrek fonksiyonlarını değerlendirmede kullanılan en eski testlerden birisidir ancak tek başına GFH'yi tahmin etmede yetersizdir. Glomerüllerden serbestçe filtre olmasına rağmen, tübüllerden değişik derecelerde (idrar miktarına ve böbrek kan akımına bağlı) geri emilmesi nedeniyle GFH'nin tespit edilmesinde ideal bir belirteç değildir [20].

2.2.5. Kronik böbrek yetmezliğinde kullanılan biyobelirteçler

Genomik, epigenetik ve metabolomik teknolojilerin gelişmesi böbrek hastalıklarında yeni biyobelirteçlerin keşfedilmesine ve ileriki yıllarda klinikte rutin test panellerine eklenmesini sağlayacaktır. Yapılan çalışmalarda özellikle sistatin C, böbrek hasar molekülü-1 (KIM-1), nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin (NGAL) ve matriks metalloproteinaz doku inhibitörü (TIMP-1) gibi moleküllerin böbrek hasarını yansıtmada önemli olabileceğini bildirmektedir.

Sistatin-C

Sistatin-C, moleküler ağırlığı 13 kDa olan, 122 amino asitli nonglikozile bir proteindir. Tüm çekirdekli hücrelerden sentez edilir. Kana salınan bir sistein proteaz inhibitörüdür. GFH'deki en küçük değişikliklere bile yüksek hassasiyet gösterir [21, 22]. Sistatin-C'nin glomerülden serbestçe süzülmesi ve vücut kas kitlesinden etkilenmemesi nedeniyle GFH'nin değerlendirilmesi için kreatininden daha duyarlı bir parametre olduğu bildirilmiştir [22]. Böbrek glomerüllerinden serbestçe süzülür ve proksimal tübüllerde reabsorbe edilir, bu yüzden sistatin C'nin plazma veya serum konsantrasyonları böbrek fonksiyonunun değerlendirilmesi için iyi bir gösterge olabilir [22].

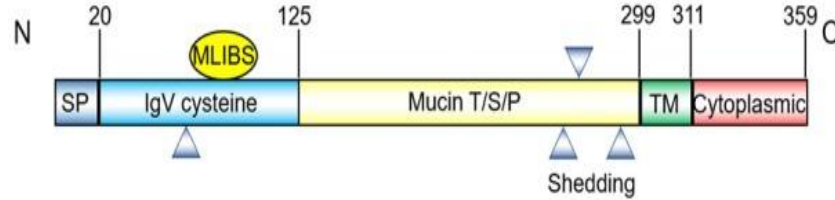
Nötrofil Jelatinaz İlişkili Lipokalin (NGAL)

Son zamanlarda NGAL renal hasarın erken tespitinde en fazla çalışılan biyobelirteçtir. NGAL 178 amino asitli, molekül ağırlığı 25 kDa ağırlığında olan hidrofobik ligandlar (yağ asitleri, retinoidler gibi) taşıyan sitozolik proteinler olan lipokalin süper ailesine ait bir glikoproteindir [23]. NGAL, temel olarak nötrofiller tarafından eksprese edilir, ancak bunun yanında proksimal ve distal tübülü içeren epitelyal hücrelerde inflamasyon durumunda indüklenerek fazla miktarda sentezlenmektedir. Özellikle böbrek hasarında NGAL seviyelerinin önemli miktarda yükseldiği gösterilmiştir [24,25].

Böbrek Hasar Molekülü-1 (KIM1)

İnsan KIM-1 geni kromozom 5p33.3 bulunmaktadır ve 14 ekzon içerir. KIM-1, 39 kDa molekül ağırlığında olan tip I membran glikoproteindir. Normal böbrek dokusunda saptanamayan ancak hasardan sonra farklılaşmamış proksimal tübül epitel hücreleri tarafından yüksek seviyede eksprese edilen bir proteindir. İnsan KIM-1 protein yapısı sinyal peptidi, IgV, müsin benzeri bölge, transmembran ve sitoplazmik alanlardan oluşmaktadır.

KIM-1'in yapısı Şekil 2.4'te gösterilmiştir [26]. IgV alanı, metal iyon bağımlı ligand bağlanma bölgesine (MILIBS) sahiptir. MILIBS, apoptotik hücre zarının dış kısmına fosfatidilserinin (PtdSer) çıkması için PtdSer reseptörü olarak rol oynamaktadır.



Şekil 2.4. KIM-1 proteininin yapısı [26]

KIM-1 molekülünün özellikle kronik böbrek yetmezliği, akut böbrek yetmezliği, polikistik böbrek hastalığı, nefropati, diyabetik nefropati ve böbrek kanseri gibi patolojik birçok durumda önemli oranda arttığı ve böbrek hasarı için duyarlı bir biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir [26, 27].

Metallopeptidaz Doku İnhibitörü-1 (TIMP1)

TIMP-1, X kromozomu üzerinde lokalize olmuş gen tarafından kodlanır ve 184 aminoasit içeren bir polipeptit zincirinden oluşur. Bu proteinin moleküler ağırlığı 28,4 ile 34 kDa arasında değişmektedir. Matriks metaloproteinaz (MMP) aktivitesinin inhibisyonu, proliferasyonun düzenlenmesi ve apoptozun düzenlenmesi dahil olmak üzere geniş bir biyolojik aktiviteye sahiptir. Bu sayede doku hasarında dokunun yeniden düzenlenmesini kontrol altında tutmaktadır. Böbrek hasarında TIMP-1 miktarının önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir. Bunun yanında TIMP-1 artış derecesi ile böbrekte fibrozis derecesinin paralel şekilde değiştiği gösterilmiştir [28].

2.3. İnflamasyon

İnflamasyon, vücudun enfeksiyonlara ve doku hasarına karşı koruyucu tepkisidir [29]. Mikroorganizmaların veya toksinlerin hücelere zarar vermesinin önlenmesi ya da hasar sonucu oluşan ölü dokuların uzaklaştırılması, organizmanın devamlılığı için geliştirilmiş koruyucu yanıttır. Kan damarları ve lökositlerin önemli rol oynadığı karmaşık bir olaydır. İnflamasyon; uyarının özelliğine, oluşan doku hasarına bağlı olarak akut veya kronik olabilir. Akut inflamasyon hızlı başlar, süresi kısadır, önemli özelliği ödem ve lökositlerden zengin doku infiltrasyonudur. Akut inflamasyonda yanıtın yeterli olmadığı durumlarda kronik inflamasyona dönüşebilir. Kronik inflamasyon akut inflamasyon süreci olmadan sessizce başlayabilir [30].

İnflamasyonun sistemik etkileri, inflamatuvar uyarılarla artan sitokinler özellikle akut inflamasyon durumlarında sistemik bulgulara neden olabilir. Bu akut faz yanıtı ateş, akut faz proteinlerinde artış (CRP, fibrinojen, serum amiloid A proteini vs), lökositoz gibi bazı klinik ve patolojik değişiklikleri içermektedir [31].

2.3.1. Kronik böbrek yetmezliğinde inflamasyon

İnflamasyon, KBY'de sonucu tahmin edilen yaygın bir özelliktir. Kronik inflamasyon, hem renal klirensin azalması hem de artmış sitokin üretiminin neden olduğu pro-inflamatuvar sitokinlerin plazma seviyelerinde bir artış olarak tanımlanabilir. CRP, IL-6 ve TNF- α düzeyleri inflamasyonun göstergesi olarak kullanılmaktadır. İnflamatuvar yanıt, sürecin baskılanmasının gerçekleşmediği veya gecikmesi ile dokuda pro-inflamatuvar medyatörlerin IL-1, IL-6, TNF- α birikimine ve doku hasarına neden olmaktadır [32]. Dokuda hasar meydana gelse dahi inflamatuvar süreç devam edebilmektedir. 1990' ların sonlarından bu yana, inflamasyonun ana sitokini olan IL-1'in monosit salınımı yoluyla inflamatuvar süreçte rolü olduğu bilinmektedir. TNF- α , glomerüler mezengiyal hücreler, tübüler epitel hücreleri ve makrofajlar tarafından üretilir. Serbest radikallerin birlikte üretilmeside böbrek hasarını arttıran bir faktördür. Bu da TNF- α seviyeleri ile ilerleyici böbrek hasarı arasında anlamlı ilişki olduğunu göstermektedir. IL-6 ise aktive edilmiş T ve B hücrelerinin farklılaşması ile monosit ve fibroblastlar tarafından üretilen, TNF- α ile birlikte inflamasyonda aracı rol oynayan bir sitokindir [33-35].

İnflamasyon ve oksidatif stresin, böbrek fonksiyonlarında orta derecede bozukluğu olan hastalarda bile erken süreçte artış göstermektedir [32]. KBY'de inflamasyona neden olan diğer etmenler; azalmış glomerüler filtrasyon hızı, artmış pro-inflamatuvar sitokin

üretimi, volüm yüklenmesi, oksidatif stres, karbonil stres, beslenme durumu, üremik toksin, enfeksiyon ve genetik faktörlerdir (Şekil 2.5). Glomerüler hastalıklarda değişken derecede tübülo interstisyel hasar görülür ve bu hasar genellikle tübüllerin filtrelenmemiş proteinlere maruz kalması ve inflamasyon ile ilişkilidir. Tubulo interstisyel inflamatuvar sızıntıların oluşumunda rol oynayan faktörler; proteinüri, immün birikintiler, kemokinler, sitokinler, kalsiyum fosfat, metabolik asidoz, ürik asit, lipidler, hipoksi ve reaktif oksijen türleridir [17, 18].

İNFLAMASYON	
ARTMIŞ İNFLAMATUVAR SİTOKİNLER (IL-1, IL-6, TNF- α vb.)	
→Azalmış glomerüler filtrasyon hızı, →Volüm yüklenmesi, →Karbonil stres, →Enfeksiyon	→Azalmış açıklık veya artmış pro-inflamatuvar sitokin üretimi, →Oksidatif stres, →Genetik ve epigenetik faktörler

Şekil 2.5. İnflamasyonun şematik gösterimi [17]

2.3.2. Sitokinler

Kronik böbrek yetmezliğinin gelişiminde rol oynadığı düşünülen molekül grubundan birisi de sitokinlerdir. Sitokinler doğal ve kazanılmış bağışıklık hücreleri tarafından salgılanan protein yapıda moleküllerdir. İnterlökinler, kemokinler, interferonlar, lenfokinler, tümör nekroz faktörü ve büyüme faktörleri gibi pek çok sitokin türü vardır [35]. Birçok hücre popülasyonu tarafından üretilirler ancak baskın üretici hücreleri yardımcı T hücreleri (Th) ve makrofajlardır. Antijenler ve mikroplara karşı yanıt olarak üretilirler. Farklı sitokin tipleri inflamatuvar sürecin düzenlenmesini sağlamaktadır [36]. Sitokinler, protein yapıda olduklarından hedef hücrenin yüzeyindeki özel membran reseptörlerine bağlanarak etkilerini başlatırlar. Sitokinler birbirlerine karşı antagonist veya bazı durumlarda sinerjik etki gösterebilirler [35].

Sitokinler inflamatuvar aktivitelerine göre pro-inflamatuvar (inflamasyonu teşvik eden) ve anti-inflamatuvar (inflamasyonu bastırıcı) olmak üzere ikiye ayrılır. IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 ve TNF- α pro-inflamatuvar sitokinler olarak bilinirken IL-4, IL-10, IL-13 ve TGF- β gibi moleküller anti-inflamatuvar sitokinler olarak kabul edilir. Pro-inflamatuvar sitokinler (IL-1, IL-6 ve TNF- α) özellikle hepatik CRP üretimini arttırarak inflamatuvar

yanıtı artırmaktadır. Böbrek yetmezliğinin patogenezinde inflamatuvar sürecin önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. Özellikle yapılan çalışmalarda IL-6, IL-1 β ve TNF- α gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin miktarının böbrek yetmezliği ile birlikte artış gösterdiği bildirilmiştir [37].

2.3.2.1. İnterlökin-1 β

IL-1, 1972'de Igal Gery tarafından keşfedilmiştir. 1985 yılında ise IL-1 α ve IL-1 β olmak üzere iki farklı formu tanımlanmıştır. IL-1 β , katabolin olarak da bilinen, molekül ağırlığı 17,5 kDa olan interlökin 1 ailesinin pro-inflamatuvar bir sitokindir [38, 39]. Hedef hücrelerde IL-1 reseptörlerine bağlanarak etki gösterirler [40]. IL-1 β 'nın en önemli etkisi diğer sitokinlerin üretimini arttırmasıdır. IL-1 diğer sitokinlerden IL-18 ve IL-33 ile birlikte Toll benzeri reseptörlere (TLR) ve birçok sitotoksik strese verilen yanıtta da aracılık etmektedir. IL-1 β 'nın özellikle nükleer faktör kapp B (NF-KB), c-Jun-N-terminal kinazları (JNK) ve p38 aktivasyonuna yol açarak hücrel sinyalizasyonunu gerçekleştirmektedir [41].

IL-1 β endotel ve mononükleer hücrelere etki ederek lökositlerin aktivasyonuna yol açan eden kemokinlerin sentezini de arttırmaktadır. Bunun yanında IL-1 β , hipotalamusu da uyararak kortikotropin serbestleştirici hormon (CRH) salınmasına neden olur. CRH'de adrenokortikotropik hormon (ACTH) salınımını sağlayarak adrenal korteksi uyarır ve kortikosteroidlerin salınımını arttırır. Kortikosteroidlerin salınımı TNF- α ve IL-1'in salınımını inhibe eder. Bu in vitro veriler IL-1'in glomerüler inflamasyonun patogenezindeki olası rollerini işaret etmektedir [42].

2.3.2.2. İnterlökin- 6

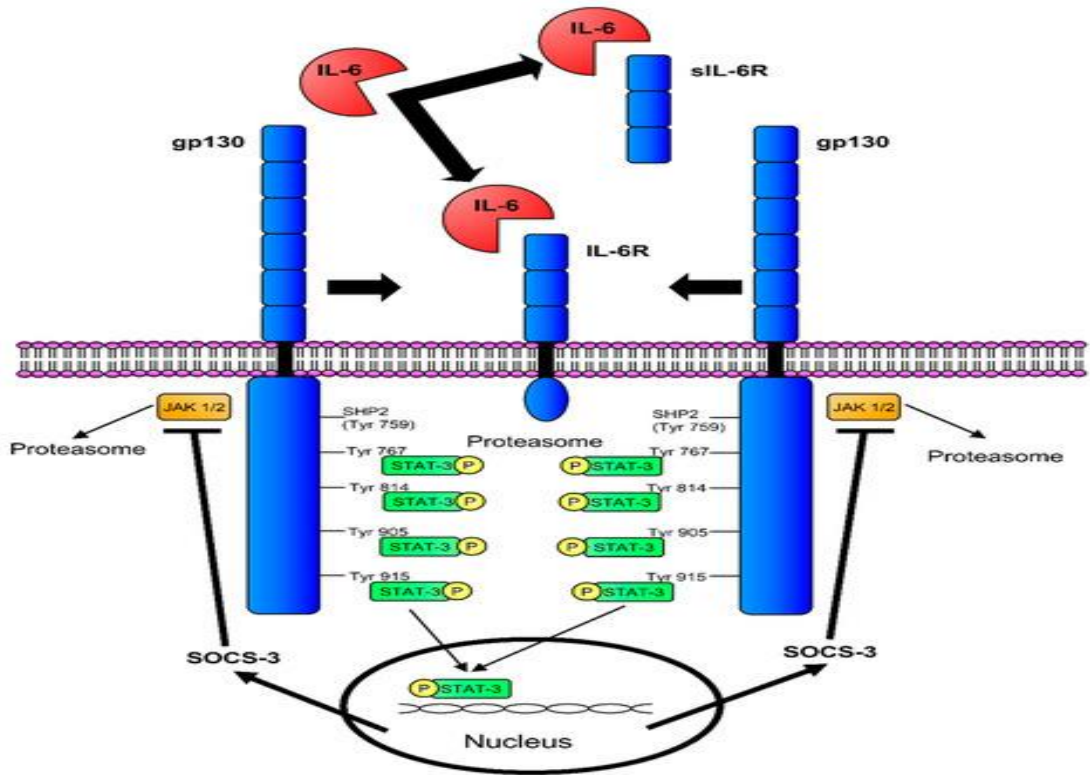
IL-6, 212 amino asitten oluşan ileri glikozilasyona uğramış 21-26 kDa moleküler ağırlığında pro-inflamatuvar bir sitokindir. Aktive olmuş T ve B hücreleri, monosit ve fibroblast hücreleri tarafından üretilmektedir [43].

IL-6, inflamatuvar süreçte hepatik akut faz protein cevabının temel düzenleyicisidir. IL-6 artışı iki ana akut faz proteini olan CRP ve serum amiloid A'nın 1000 kata kadar artmasına neden olabilmektedir. Etkilerini spesifik IL-6 reseptör ve gp130 olarak adlandırılan alt ünitesinden oluşan reseptör kompleksi üzerinden göstererek janus kinaz (JAK) / sinyal iletilci ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) ve mitojen aktif protein kinaz

(MAPK) aktivasyonuna yol açar. IL-6, membrana bağlı IL-6R'ye ya da çözünür IL-6R (soluble IL-6R)'ye bağlanarak hücrel sinyalizasyonu başlatabilir (Şekil 2. 6) [44].

Diyaliz ve diyaliz öncesi hastalarda serum kreatinin düzeyinin, plazma IL-6 seviyesini yansıtmada tek başına belirleyiciliği olduğu gösterilmiş, bunun renal klirens bozukluğuna bağlı olduğu düşünülse de plazma IL-6 düzeyi yüksek olan KBY hastalarında kardiyovasküler ve diğer tüm nedenlere bağlı mortalite oranları yüksek bulunmuştur.

IL-6' nın bu hastalarda mortaliteyi belirlemede CRP, TNF- α ve albüminde daha iyi bir belirteç olduğu ifade edilmiştir [44].



Şekil 2.6. IL-6' nın hücrel sinyalizasyon mekanizması [44]

2.3.2.3. İnterlökin- 10

IL-10 geni 1. kromozomun uzun kolu üzerinde bulunmaktadır [47]. Bu gen, 5 ekzondan oluşmaktadır ve 160 amino asitten oluşan moleküler ağırlığı 22-38 kDa arasında olan IL-10'u kodlamaktadır. IL-10'un biyolojik etkileri, IL-10 reseptör kompleksi aracılığı ile gerçekleşir. Bu kompleks, IL-10 reseptör 1 (IL-10R α) ve IL-10 reseptör 2 (IL-10-R β) olmak üzere iki alt birimden oluşmaktadır. IL-10R, JAK/STAT reseptör ailesine aittir ve bu yolun aktivasyonu ile hücrel etkilerini gösterir. IL-10, makrofajlar ve düzenleyici T

lenfositleri tarafından salınmaktadır. Bu sitokin uyarılmış makrofajları ve dendritik hücreleri bloke ederek anti-inflamatuvar etkileriyle doğal ve edinsel immün sistemin düzenlenmesini sağlamaktadır [46].

2.3.2.4. Tümör nekroz faktör alfa (TNF- α)

Pro-inflamatuvar sitokinlerden biri de moleküler ağırlığı 17 kDa olan TNF- α 'dır [47]. Mononükleer fagositik hücreler, doğal öldürücü hücreler ve T lenfositler tarafından üretilmektedir. TNF süper ailesi, hücrenin hayatta kalması, ölümü ve farklılaşması gibi sinyal yollarını aktive etmektedir. Bu etkilerini tümör nekroz faktör reseptörü (TNFR) aracılığıyla göstermektedir. Tümör nekroz faktörü Fas ile ilişkili ölüm domaini (FADD) ve TNFR ile ilişkili ölüm domaini (TRADD) üzerinden hedef hücrelerin apoptotik ölümüne yol açabilir [48].

2.3.2.5. Transforme edici büyüme faktörü β (TGF- β)

TGF- β , 390 amino asitten oluşan ve moleküler ağırlığı 25 kDa olan bir sitokindir. TGF- β geni 19. kromozomda bulunmaktadır. TGF- β 'nin beş farklı izoformu bulunurken bunlardan TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3 memeli hücrelerinde üretilmektedir. TGF- β 1 makrofajlar da dahil olmak üzere birçok hücre tarafından salgılanmaktadır. Bu sitokin özellikle doku içerisinde kollajen metabolizmasında düzenleyici bir rol oynamaktadır. Bunun yanında T ve B lenfositler, makrofajlar ve doğal öldürücü hücreler üzerinde inhibe edici etki göstererek pro-inflamatuvar sitokinlerin salınımı azaltarak anti-inflamatuvar etki göstermektedir. TGF- β 1 yara iyileşmesi, immüno-regülasyon, anjiyogenez ve kanser patogenezi gibi birçok durumda rol oynamaktadır. Bunun yanında kronik böbrek hastalığında tübüler, glomerüler ve/veya vasküler zedelenme basamaklarında patolojik işleve sahip olup böbrek hasarından sonra farklılaşmış proksimal tübül hücreleri tarafından üretilmektedir. TGF- β 'nin aşırı ekspresyonu renal fibrozis ve inflamasyonda rol alır. TGF- β aktivasyonu özellikle renin-anjiyotensin sistemi olmak üzere birçok hormon ve sitokin sisteminde mediyatördür [49,50]. TGF- β 1 biyolojik etkilerini, Smad2 ve Smad3'ü aktive ederek gösterir. Fibroz durumunda, Smad3'ün aktive olarak hücrelerin apoptoza yönlenebileceği bunun yanında doku arasında kollajen yıkılımının arttığı belirtilmektedir [51].

2.3.2.6. C reaktif protein (CRP)

CRP, serum amiloid P bileşeni (SAP) ile birlikte pentraksin ailesine ait bir plazma proteindir. Moleküler ağırlığı 106 kDa olan ve 206 aminoasit içeren bir pozitif akut faz reaktanıdır [52]. İnflamasyon ve doku nekrozu ile bağlantılı olarak CRP konsantrasyonunda önemli ölçüde arttığı ve hücre hasarının bulunduğu alanlarda biriktiği de gösterilmiştir [53]. CRP düzeylerinin, ağır KBY (GFH<30 ml/dk) hastalarında hafif ve orta KBY (GFH 30 ile 90 ml/dk arasında) hastalarına kıyasla daha yüksek olduğu belirtilmiştir [54].

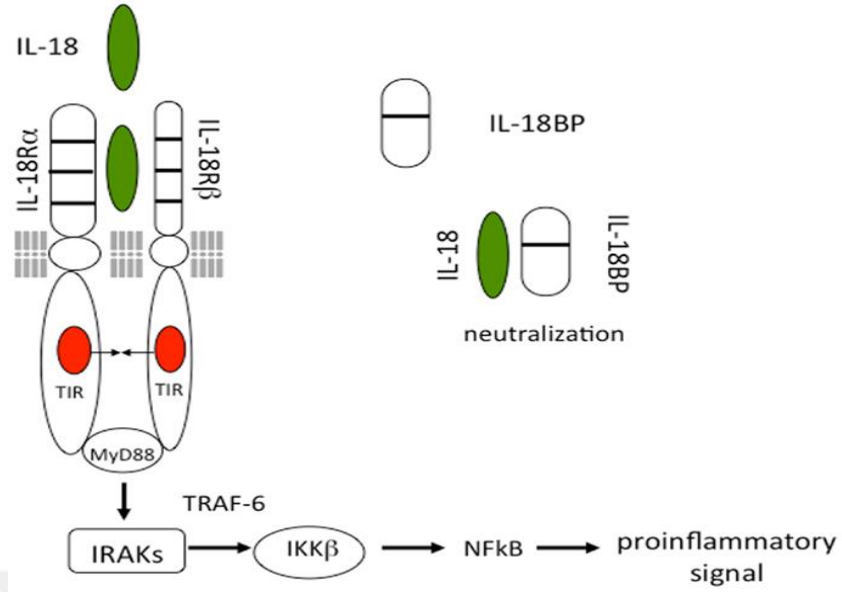
2.3.2.7. İnterlökin-17A

IL-17A, 155 aminoasitten oluşan ve moleküler ağırlığı 35 kDa olan pro-inflamatuvar bir sitokindir. IL-17A, büyük ölçüde bellek T lenfositleri tarafından üretildiği gibi doğuştan gelen bağışıklığı ve konakçı savunmasını da uyarır [55]. IL-17; IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 α , TNF- α ve TGF- β 2 gibi birçok inflamatuvar mediyatörün üretimini arttırmaktadır [56]. IL-17, tip I hücre yüzeyi reseptörü IL-17R üzerinden hedef hücrelerde etkisini göstermektedir. IL-17A'nın, hipertansiyon ve böbrek hastalığı dahil olmak üzere immün ve kronik inflamatuvar hastalıklarda umut verici bir sitokin olduğu belirtilmektedir [57,58].

2.3.2.8. İnterlökin-18

IL-1 ailesinin bir üyesi olan IL-18, 193 amino asitten oluşan ve moleküler ağırlığı 18 kDa olan pro-inflamatuvar bir sitokindir. Bu sitokini kodlayan gen 11. kromozomda bulunmaktadır. Makrofajlar, monositler, proksimal tübüler epitel hücreler, dendritik hücreler ve keratonositler de dahil olmak üzere çeşitli hücreler tarafından sentezlenmektedir. IL-18 özellikle TNF- α , IL-1 β , IL-8 ve IFN- γ üretimini uyararak pro-inflamatuvar süreci desteklemektedir [59, 60].

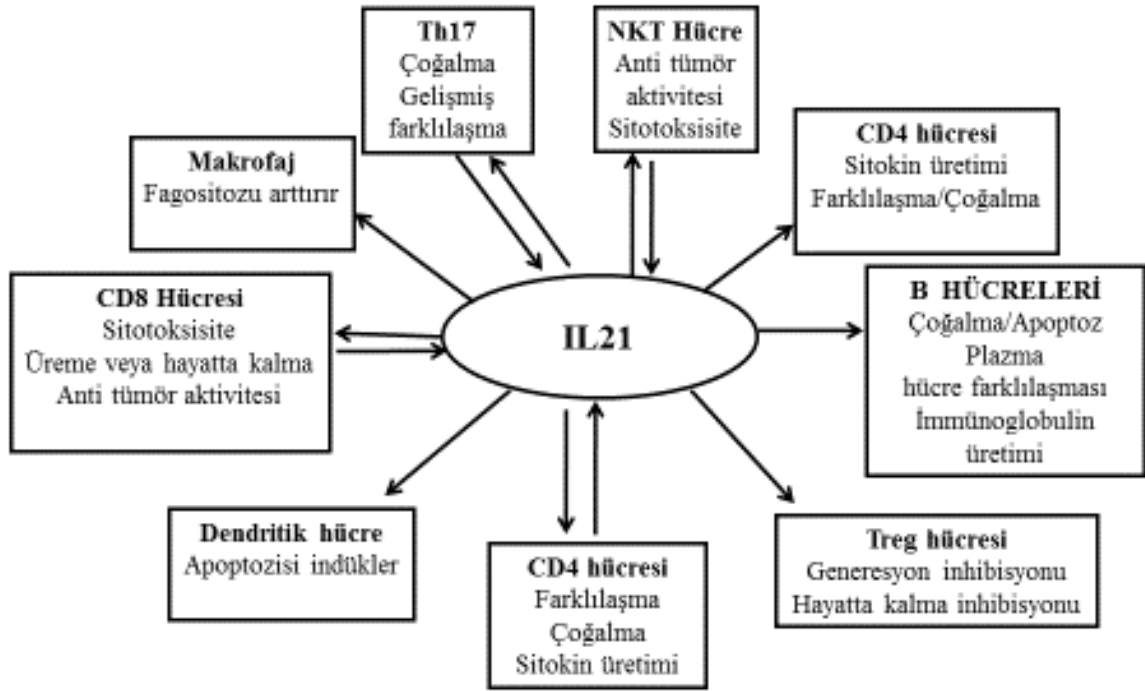
IL-18, bu etkilerini IL-18R'e bağlanarak gerçekleştirir. IL-18R' nin aktivasyonu, sırasıyla IL-1 reseptör ile ilişkili kinaz (IRAK) sinyal yolunu aktifleştirerek pro-inflamatuvar genlerin aktivasyonunu sağlamaktadır (Şekil 2.7). Böbrek hasarı olan hastaların idrar, doku ve serumlarında IL-18 düzeylerinin arttığı bildirilmiştir [60, 61].



Şekil 2.7. IL-18'in hüresel sinyal mekanizması [61]

2.3.2.9. İnterlökin-21

IL-21, 131 amino asitten oluşan ve 15 kDa ağırlığında olan pro-inflamatuvar bir sitokindir. Th17 ve Th2 hücreleri tarafından önemli oranda üretilmektedir [62]. Hedef hücrelerdeki etkilerini IL-21 reseptörü üzerinden göstermektedir. IL-21 (IL-21R), T ve B lenfositler, makrofajlar, dendritik hücreler ve keratinositlerde bulunmaktadır [63]. Ligand ile bağlanma JAK/STAT aktivasyonuna yol açarak dendritik hücrelerin maturasyonu, doğal öldürücü hücrelerin etkinliğinin artırılması, T hücrelerin aktivasyonu ve farklılaşmaları, B lenfositlerin aktivasyonu ve antikor izotip değişimleri gibi etkilere aracılık etmektedir (Şekil 2. 8) [64, 65].



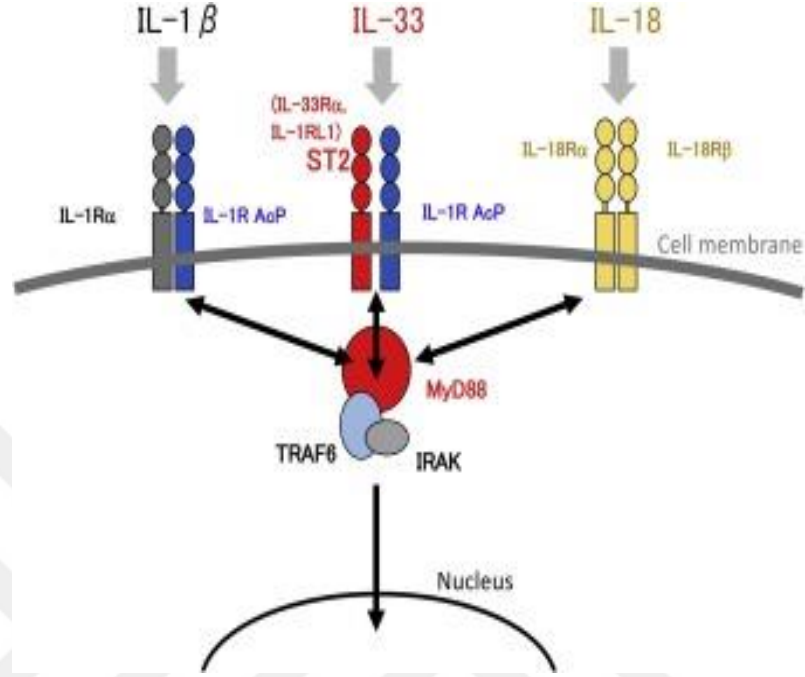
Şekil 2.8. IL 21'in hücreler üzerindeki etkisi [65]

2.3.2.10. İnterlökin- 33

IL-33 geni 9. (9p24.1) kromozomda yer almaktadır. İnsan IL-33'ü, 270 aminoasitten oluşmaktadır ve moleküler ağırlığı 30 kDa olan bir pro-inflamatuvar sitokindir [66]. Doku hasarında gelişen nekrotik hücre ölümü ve mekanik hasar varlığında IL-33 ekspresyonu artarak hücre dışı boşluğa salınır ve inflamatuvar yanıtı başlatır [67]. IL-33 mide, akciğer, kalp, tonsilla, deri ve tükürük bezleri gibi birçok dokuda tespit edilmiştir. IL-33 endotel hücreleri, düz kas hücreleri, epitelyum hücreleri, fibroblastlar, adipositler, dendritik hücreler ve aktive makrofajlardan eksprese edilmektedir. IL-33 özellikle IL-1, IL-6, IL-13 ve TNF- α gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin salınımını arttırmaktadır [68, 69].

IL-33R1 sinyal iletimi IL-1R ve IL-18R gibi diğer IL-1 reseptör ailesi üyeleri tarafından paylaşılan adaptör molekülleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. Artmış serbest yağ asitleri, oksidatif stres ve inflamasyon gibi faktörlerin sebep olduğu doku hasarı hücre nekrozuna ve biyolojik olarak aktif IL-33 salınımına yol açabilmektedir [70]. IL-33, IL-1 sitokin ailesinin bir üyesidir. Bu yüzden IL-33'ün hücre içi sinyalizasyonu, IL-1'e benzerdir. IL-33 NF-KB ve MAPK'lerin (p38, JNK ve ERK) aktivasyonuna yol açarak inflamatuvar süreci desteklemektedir.

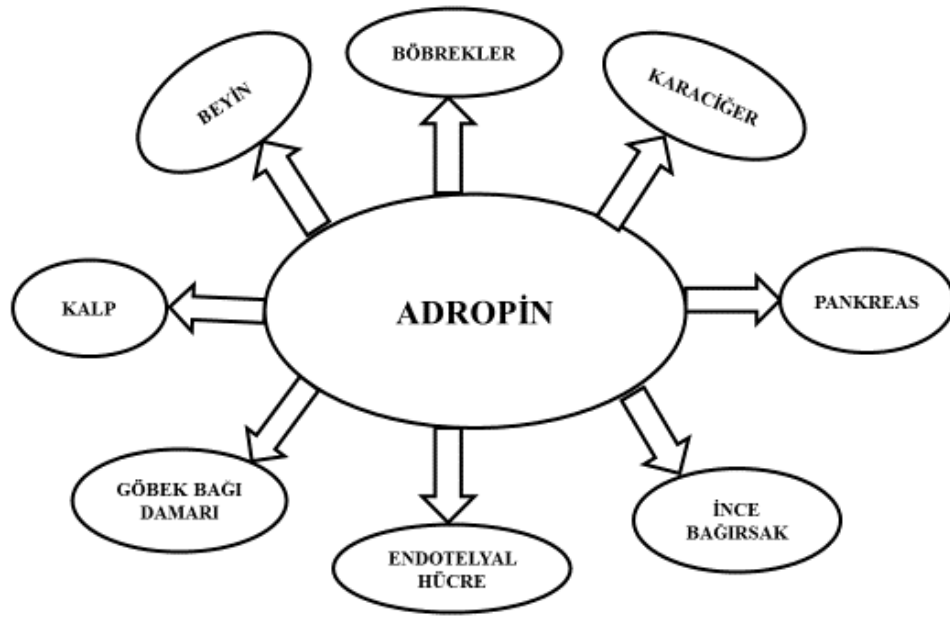
Akut ve kronik böbrek hastalıklarında özellikle IL-33 sitokininin üretiminin artarak renal fibrozis gelişimini teşvik ettiği gösterilmiştir (Şekil 2.9) [70, 71].



Şekil 2.9. IL-33'ün sinyal iletim mekanizması [71]

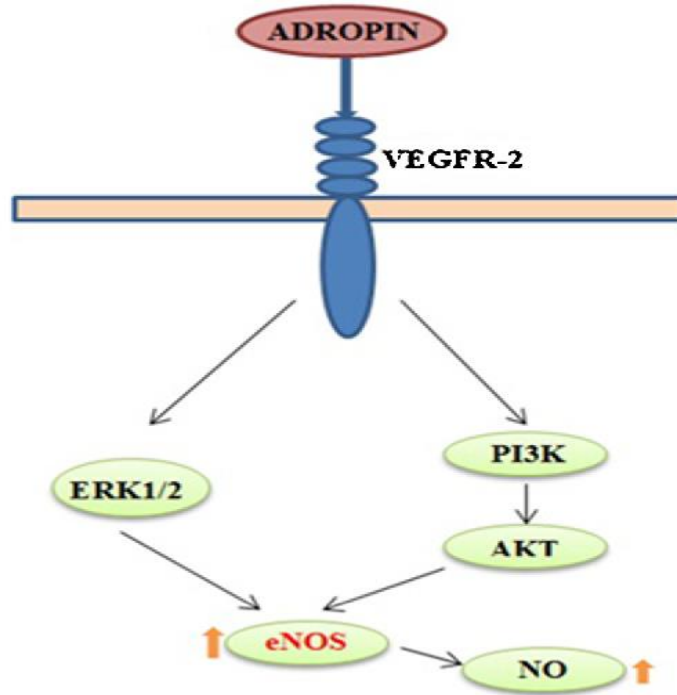
2.4. Adropin

Adropin, ilk olarak 2008 yılında Kumar ve arkadaşları tarafından tanımlanmış peptid yapılı bir hormondur. Olgun adropin 76 amino asitten oluşmaktadır ve 7,927 kDa molekül ağırlığındadır. Bu peptid beyin, kalp, karaciğer, böbrek ve gastrointestinal sistem olmak üzere birçok dokuda üretilmektedir (Şekil 2.10) [72, 73, 74].



Şekil 2.10. Adropinin eksprese edildiği dokular [75].

9. kromozomda bulunan enerji homeostazi ilişkili gen (Enho) bölgesinden kodlanan bu peptid hedef dokularda G protein reseptör 19 (GPR19) aktivasyonuna yol açarak enerji balansı, protein, lipid ve karbonhidrat metabolizmasının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır [75,78]. Adropin Fosfatidilinozitol 3 fosfat kinaz (P13K-AKT) ve ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz 1/2 (ERK1/2) yollarını aktive ederek endotelial eNOS ve NOS miktarını arttırarak endotel hücreler üzerinde koruyucu etki göstermektedir (Şekil 2.11.) [74, 76].



Şekil 2.11. Adropin peptidinin endotel hücrelerdeki etkisi [76]

Farelerde yapılan deneylerde adropinin sistemik uygulamasının glukoz intoleransını ve insülin direncini azalttığı, intramuskuler enjeksiyonun eNOS ve vasküler endotelial büyüme faktörü 2 (VEGFR2) seviyeleri ile birlikte neovaskülerizasyonu artırdığı gösterilmiştir. Bunun yanında adropinin düz kas hücre proliferasyonunu, apoptozis ve inflamasyonu inhibe ettiği bildirilmiştir. Ayrıca düşük adropin düzeylerinin kardiyak X sendromunun gelişiminde etkili olduğu belirtilmektedir. Özellikle birçok çalışma düşük adropin seviyelerinin kardiyovasküler hastalıklar, KBY, diyabet ve diyabetik nefropati gibi hastalıkların patogenezinde etkili olduğunu göstermektedir Adropinin özellikle aterogenez ve kardiyovasküler hastalıklarda da koruyucu etkisinin olduğu düşünülmektedir [76, 77].

Topuz ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada endotel disfonksiyonu olan diyabetik hastalarda serum adropin seviyesinin endotel disfonksiyon olmayan diyabetik hastalara göre önemli düzeyde düşük olduğunu göstermişlerdir. Bu sonuç adropinin kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde koruyucu bir etkiye sahip olabileceğini göstermektedir [79].

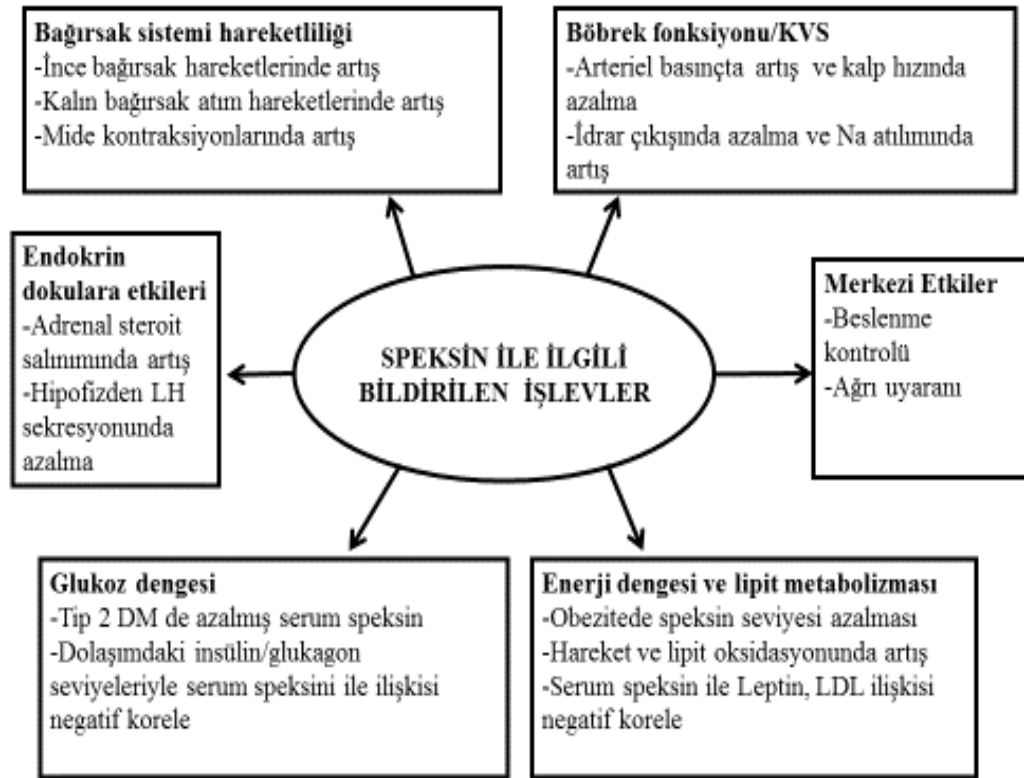
2.5. Speksin

Speksin ilk olarak 2007 yılında tanımlanmış nöropeptid Q (NPQ) olarak da adlandırılan bir peptittir. İnsanda 12. kromozomun 39. kolunda bulunan gen bölgesi 6 ekzon-5 introndan oluşur ve 116 amino asitten oluşan pre-propeptiti kodlar. Aktif speksin 14 amino asitten oluşmaktadır ve moleküler ağırlığı 1,6 kDa'dur [80, 81]. Speksin adrenal bezler, serebral korteks, retina, mide, böbrek, pankreas, plasenta, yumurtalıklar ve hipotalamus olmak üzere birçok dokuda eksprese edilmektedir [80]. Speksin hedef hücrelerde etkilerini Galanin 2 ve 3 (GALR2/3) reseptörlerini aktive ederek göstermektedir [82].

Speksinin metabolizma üzerine etkisine dair bulunan sınırlı bilgiler bu peptidin enerji dengesi, yağ asidi alımı, glukoz ve lipit metabolizmasının modülasyonunu sağladığı hakkında ipuçları vermektedir. Bunun yanında yapılan çalışmalar, speksinin intestinal düz kas hücrelerinin kasılmasını uyararak bağırsak hareketliliğini artırmak, adrenokortikal hücre proliferasyonunu inhibe etmek, ağrı duyarlılığını azaltmak, renal/kardiyovasküler fonksiyonları düzenlemek, iştah kontrolü, üreme ve gastrointestinal fonksiyonu düzenlenmek gibi olası etkilere sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Speksinin organizma üzerindeki metabolik etkilerine daha detaylı bakıldığında, genetik manipülasyon yoluyla speksin geni silinen zebra balıklarının normal olanlara göre iştah ve yem tüketiminin arttığı, serum glukoz, trigliserit ve kolesterol düzeylerinin yükseldiği, aynı balıklara speksin enjeksiyonunun ise bu olumsuz etkileri pozitif anlamda düzenlediği bildirilmiştir [83-86].

Yapılan çalışmalar birçok hastalığın patogenezinde speksin hormonunun miktarında önemli değişiklikler olduğunu göstermektedir. Fruktoz ile deneysel obezite modeli oluşturulan farelerin epididimal adipoz dokusunda TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi pro-inflamatuvar sitokin düzeylerinin on haftalık speksin enjeksiyonu sonrasında obezite grubuna oranla önemli oranda azalış gösterdiği bildirilmiştir [87]. Benzer şekilde yüksek yağlı diyetle böbrek hasarı oluşturulmuş sıçanlarda speksin enjeksiyonunun böbrek dokusunda NF-KB düzeylerini azalttığı ve bu azalmanın GALR2 üzerinden gerçekleştiği belirtilmiştir [88].

Bu bulgular, metabolik fonksiyon bozukluğu ile karakterize inflamatuvar koşulların iyileştirilmesinde speksinin terapötik bir ajan olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Şekil 2. 12) [89].



Şekil 2.12. Speksinin genel fonksiyonları [89]

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Çalışmada kullanılan ekipmanlar

Çalışmada kullanılan ekipmanların model ve kullanım amaçları Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Kullanılan ekipman marka ve kullanım amaçları

Ekipman Türü	Marka	Kullanım Amacı
Hassas Terazi	OHAUS/AdventurePRO AV264C	Doku ve kimyasal maddelerin tartılması
Homojenizatör	IKA T25D digital Ultra Turrax rpmx1000	Dokuların parçalanması
Vortex	IKA Vortex 4 digital rpmx3000	Karıştırma işlemleri
Pipet takımı	Thermo pipet/10-200-1000 µl	Örneklerin ve kimyasal maddelerin pipetlenmesi
Spektrofotometre (µ Drop)	Thermo Scientific Multiskan GO	İzole edilen total RNA'ların miktar tayini ve kalitelerinin belirlenmesi
Santrifüj cihazı	Hermle/Z216MK	Çöktürme işlemlerinin gerçekleştirilmesi
Real Time PCR	Thermo Scientific Pikoreal 96	Gen ifadesinin belirlenmesi
Termal Cyclus	Thermo Scientific Thermal cyclus	Primerlerin sıcaklık optimizasyonlarının yapılması
Mini Santrifüj	IKA Mini G Santrifüj	Çöktürme işlemlerinin gerçekleştirilmesi
UV Görüntüleme Cihazı	FUSION FX5 VILBER LOURMAT	Agarozjel görüntülerinin incelenmesi
Çalkalayıcı	IKA KS 260 Basic	Çalkama işlemlerinde

Derin dondurucu(-20°C)	Vestel	Doku ve kitlerin saklanması
Derin dondurucu (-80°C)	Thermo Scientific	Doku ve kitlerin saklanması
Saf su cihazı	Millipore Direct.Q8 UV	Saf su elde etme
Çeker ocak		Boyama işlemlerinin yapılmasında
Buz makinası	Hoshizaki	Dokuların parçalanmasında
Etüv	Memmert	İnkübasyon işlemlerinde
Biyokimya otoanalizörü	Architect 16000 Abbot	Biyokimyasal parametrelerin ölçülmesinde
Elektroforez sistemi ve güç kaynağı	Thermo	Agarozjel elektroforezi ile PCR örneklerinin ayrılmasında
Mikrotom	Leica	Dokulardan kesit alınmasında
Mikroskop	Leica	Histolojik değerlendirmelerin yapılmasında
Blok ısıtıcı		İnkübasyon işlemlerinin yapılmasında
Otoklav	HMC Hiramaya	Sterilizasyon işlemlerinin yapılmasında
pH metre	Thermo	Tamponların pH'nın ayarlanmasında
Buzdolabı (+4 °C)	Vestel	Tamponların saklanması

3.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler

1. Adeninhemi sülfat (SigmaAldrich)
2. Adropin (Phoenix pharmaceuticals) Katalog no: 032-35
3. Agaroz (Prona)
4. Borik asit (SigmaAldrich)
5. cDNA sentez kiti: Maxima First StrandcDNAsynthesis kit for RT-qPCRwithdsDNase K1671(ThermoScientific)

6. DNA marker 1000 bp (Fermantas)
7. Di sodyum hidrojen fosfat (SigmaAldrich)
8. EDTA (SigmaAldrich)
9. Etanol (Merck)
10. Etidyum Bromür (Merck)
11. Eozin (SigmaAldrich)
12. Formaldehit (Merck)
13. Glasiyel asetik asit (Merck)
14. Hematoksilen (SigmaAldrich)
15. İdrar toplama kabı (BD)
16. Karboksi metil selüloz (SigmaAldrich)
17. Ksilen (Merck)
18. Lam (İSOLAB)
19. Lamel (İSOLAB)
20. 2β Merkaptotanol (Merck)
21. Neşter (PlusMED)
22. Nitril Eldiven (Eco)
23. Parafilm (İSOLAB)
24. Parafin (SigmaAldrich)
25. Real Time PCR kiti: Maxima SYBR Green Master Mix (2X) (ThermoScientific)
K0221
26. Serum tüpü (BD)
27. Sodyum di hidrojen fosfat (Merck)
28. Sodyum klorür (Merck)
29. Speksin (PolyPeptide) Katalog no:SC1547
30. Total RNA izolasyon kiti: GeneJET RNA purification kit K0731 (ThermoScientific)
31. Tris(SigmaAldrich)

3.1.3. Çözeltiler

0,5 M Disodyum etilendiamintetraasetat (EDTA)

18,61 g etilendiamintetraasetat tartılarak beher içine alındı ve 50 mL ddH₂O eklendikten sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla çözünmesi sağlandı. pH'ı sodyum hidroksit ile 8,0'e ayarlandı ve bir balon jøjeye alınan çözelti ddH₂O ile 100 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti otoklavlanarak sterilize edildi.

10 mM Sodyum dihidrojen fosfat

0,78 g sodyum dihidrojen fosfat tartılarak balon jøjeye alındı. Üzerine 100 mL ddH₂O ilave edildikten sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözünmesi sağlandı. ddH₂O ile 500 mL'ye tamamlandı.

10 mM Disodyum hidrojen fosfat

1,79 g disodyum hidrojen fosfat tartılarak balon jøjeye alındı. Üzerine 100 mL ddH₂O ilave edildikten sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla çözünmesi sağlandı ve ddH₂O ile 500 mL'ye tamamlandı.

10 mM Fosfat tampon solüsyonu (PBS-phospatbuffersaline)

10 mM disodyum hidrojen fosfat üzerine 10mM sodyum dihidrojen fosfat pH'sı 7,4'e gelene kadar eklendi. Çözeltinin her 100 mL'si için 0,9 g NaCl eklendi. Hazırlanan çözelti otoklavlanarak sterilize edildi.

Tris-glasiyal asetik asit-etilen diamin tetra asetat (TAE) tamponu (x50)

24,2 g Tris baz balon jøjeye alındı üzerine 50 mL ddH₂O eklendikten sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla çözünmesi sağlandı. Üzerine 5,71 mL glasiyal asetik asit ve 1,85 g etilen diamintetra asetat (EDTA) eklendi. ddH₂O ile 100 mL'ye tamamlandı.

%2,4'lük Agaroz jelin hazırlanması

2,4 g agaroz tartılarak erlene alındı. Üzerine 100 mL 1X TAE çözeltisi eklenerek, mikrodalga fırın yardımıyla çözünmesi sağlandı. Daha sonra küvete dökülerek tarak yerleştirildi ve jel soğumaya bırakıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Sıçanlarda böbrek yetmezliği modelinin oluşturulması

Deney hayvanları prosedürü, Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Biriminde standart koşullar olan 23 ± 1 °C oda sıcaklığı, %60 nem oranı, 12 saat aydınlık/karanlık laboratuvar ortamında sürdürülmüştür. Hayvanlara uygulanan yöntemlerin etik kurallara uygunluğu Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından 28/12/2016 tarihi ve TUHADYEK-2016/52 numarası ile onaylanmıştır.

Çalışmada ağırlıkları 200-250 gr olan 25 adet Wistar albino erkek sıçan (Sprague Dawley) kullanılmıştır. Sıçanlar kontrol grubu ve KBY grubu olmak üzere iki ana gruba ayrıldıktan sonra KBY kendi içinde kontrol, adropin, speksin ve adropin+speksin olarak dört gruba ayrılmıştır. KBY grubundaki sıçanlara günde 1 defa 600 mg/kg/gün olacak şekilde 10 gün süreyle adenin süspansiyonu (%5 Karboksi metil selüloz solüsyonu içinde 100 mg/mL adeninhemi sülfat, oral gavaj) uygulanarak kronik böbrek yetmezliği oluşturulmuştur. Adenin 6-aminopurin deneysel kronik böbrek yetmezliği modeli oluşturmak için kullanılabilen bir kimyasaldır. Sıçanlarda oral olarak kullanıldığında 2,8- dihidroksi adenine metabolize olur ve tübüllerde kristaller halinde çökerek KBY'ye sebep olduğu gösterilmiştir. KBY oluşturulmasını takiben adropin (2,1 µg/kg, haftada 5 gün/ 4 hafta) ve/veya speksin (35 µg/kg, haftada 5 gün/ 4 hafta) enjeksiyonları 4 hafta boyunca uygulanmıştır. Kontrol grubundaki hayvanlara diğer gruplara uygulama yapıldığı süreçte kafeslerin temizliği yapılarak ellenmeleri sağlanmış ve serum fizyolojik uygulanmıştır (haftada 5 gün/4 hafta) (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Deney grupları ve uygulamaları

Deney Grupları		n	Uygulamalar
Kontrol grubu		5	Deney süresince deney gruplarıyla aynı ortamda tutulmuş ve serum fizyolojik uygulanmıştır (haftada 5 gün/4 hafta).
KBY Grupları	KBY Grubu	5	Adenin süspansiyonu (600 mg/kg/gün, 10 gün, p.o) ile KBY oluşturulmuş ve sonrasında serum fizyolojik uygulanmıştır (haftada 5 gün/4 hafta).
	KBY+Adropin Grubu	5	Adenin süspansiyonu (600 mg /kg/ gün, 10 gün, p.o) ile KBY oluşturulmuş, adropin (2,1 µg/kg, haftada 5 gün / 4 hafta) enjeksiyonları uygulanmıştır.
	KBY+Speksin Grubu	5	Adenin süspansiyonu (600 mg/kg/gün, 10 gün, p.o) ile KBY oluşturulmuş, speksin (35 µg/kg, haftada 5 gün/4 hafta) enjeksiyonları uygulanmıştır.
	KBY+Adropin+Speksin	5	Adenin süspansiyonu (600 mg/kg/ gün, 10 gün, p.o) ile KBY oluşturulmuş, adropin (2,1 µg/ kg, haftada 5 gün/4 hafta) vespeksin (35 µg/kg, haftada 5 gün / 4 hafta) enjeksiyonları uygulanmıştır.

Tedavi sürecinin sonunda metabolik kafeste 24 saatlik idrar örnekleri toplanmıştır. Deney sonunda sıçanlar ketamin 100 mg/kg/i.p ve ksilazin 12,5 mg/kg/i.p anestezisi altında kardiyak exanguinasyon ile sakrifiye edilerek böbrek dokusu ve kan örnekleri alınmıştır. Kan örnekleri biyokimyasal analizlerin yapılması için kuru tüpe alınmış ve 2000 rpm'de santrifüjlenerek serumları ayrılmıştır. Böbrek dokusunun bir kısmı bistüri yardımıyla

kesilerek histolojik değerlendirmeler için %10 tamponlanmış formaldehit içine alınmıştır. Kalan böbrek dokusu fosfat buffer ile yıkandıktan sonra total RNA izolasyonu için öncelikle sıvı azot üzerine alınarak hemen -80°C derin dondurucuya kaldırılmıştır.

3.2.2. Böbrek fonksiyon testleri

Sıçanlardan adeninhemi sülfat uygulamasını takiben tedavilerin 4. haftası sonunda 24 saatlik idrar ve kan örnekleri toplanmıştır. İdrar örneklerinden protein ve kreatinin ölçümü ile alınan kan örneklerinden rutin analizler olan kreatinin ve BUN değerleri biyokimya otoanalizörü ile ölçülmüştür (Architect C16000 Abbott). Protein/kreatinin oranı ve kreatinin klirensi değerleri ise hesaplanmıştır.

3.2.3. Hematoksileneozin boyama protokolü

Böbrek doku örnekleri %10 tamponlanmış formalin içinde 4 saat tespit edildikten sonra yükselen alkol serilerinden geçirilerek suları alındı. Daha sonra 30'ar dakika 2 kere ksilenle muamele edildikten sonra 1 gece 60 °C'de erimiş parafin içinde bekletildi ve daha sonra parafine gömüldü. Mikrotom (Leica) yardımıyla 5 µm kalınlığında kesitler alındı ve deparafinizasyon işlemi için 30 dk 60°C' lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 20 dk (etüvde), diğer ikisi 10'ar dakikalık üç farklı periyotta ksilene tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için 2 değişim absölu alkol ve %96'dan %70'e azalan alkol serilerinden geçirilerek, kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 10 dakika hematoksilen ile boyandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akan suda yıkanan kesitler, 2 dakika eozin ile boyandı. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri absölu alkolden geçirilen kesitler, şeffaflaştırma amacıyla 20 dakikax3 değişim ksilende tutulduktan sonra entellan ile kapatılarak ışık mikroskopunda (Leica) incelendi. Tübüler nekroz gelişimi histopatolojik olarak değerlendirilerek Grade 0-5 olarak skorlanmıştır. Grade 1 tübüler nekrozun <%10, Grade 2 tübüler nekrozun %10-25, Grade 3 tübüler nekrozun %25-50, Grade 4 tübüler nekrozun %50-75 ve Grade 5 tübüler nekrozun %75'den fazla olduğu durumlar olarak skorlanmıştır.

3.2.4. Böbrek dokusundan total RNA izolasyonu ve miktarının belirlenmesi

Total RNA izolasyonu Thermo Scientific GeneJET RNA Purification kit kullanılarak kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Böbrek doku örneklerinden yaklaşık olarak 300 mg örnek tartılarak steril bir tüp içerisine alınmıştır.

Protokole göre;

Tüplere alınan örnekler üzerine lizis buffer eklenerek homojenizatör yardımıyla 60 sn x 25000 rpm'de homojenizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

1. 10 µl proteinaz K, 590 µl TE buffer hazırlanarak tüplere pipetlendi ve 5sn vorteksledikten sonra 37 °C'de 10 dk inkübasyona bırakıldı.
2. Lizat mikrosantrifüj tüpüne alındı. 10 dk/12000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant yeni bir 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne alındı.
3. 450 µl etanol eklendi ve pipetaj ile iyice karıştırıldı.
4. Bir toplama tüpüne yerleştirilmiş olan Genejet RNA saflaştırma kolonuna 700 µl lizat aktarıldı. Kolon ≥ 12000 x rpm'de 1 dk santrifüjlendi. Kolon temiz 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
5. 700 µl wash buffer 1 eklendi ve kolonu ≥ 12000 x rpm'de 1 dk santrifüjlendi. Tüp dibindeki elüsyon atıldı ve kolon tüpe yerleştirildi.
6. 600 µl wash buffer 2 eklendi ve kolon ≥ 12000 x rpm'de 1 dk santrifüjlendi. Tüp dibindeki elüsyon atıldı ve kolon tüpe yerleştirildi.
7. Ardından 250 µl wash buffer 2 (etanollü) eklendi ve kolonu ≥ 12000 x rpm'de 1 dk santrifüjlendi. Tüp dibindeki elüsyon atıldı ve kolon temiz 1,5 ml'lik tüpe yerleştirildi.
8. Genejet RNA kolonunun membran merkezine 50 µl nükleaz içermeyen su (steril su) eklendi ve ≥ 12000 x rpm'de 1 dk santrifüjlenerek tüpün dibinde total RNA içeren elüsyon elde edildi.
9. Elde edilen total RNA'ların µDrop spektrofotometre (Thermo Multiscan Go) kullanılarak 260 nm'de absorbans değerleri okunmuş ve konsantrasyonları ölçülmüştür. Ayrıca örneklerdeki $A_{260/280}$ oranları ölçülerek RNA'ların saflıkları belirlenmiştir. Aşağıda verilen formülasyona göre total RNA konsantrasyonları hesaplanmıştır.

$$\text{RNA konsantrasyonu } (\mu\text{g/mL}) = \text{sulandırma katsayısı} \times A_{260} \times 40$$

Total RNA örnekleri komplementer zincir sentezi yapılarına kadar $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

3.2.5. Komplementer zincir (cDNA) sentezi

Total RNA'lardan cDNA sentezi Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Protokole göre;

1.Total RNA örnekleri 100 ng olacak şekilde uygun hacimde PCR tüpüne pipetlendi. Üzerine oligodT 18 primerden 1 μl eklenerek total hacim 12 μl olacak şekilde nükleaz içermeyen su ile tamamlanmıştır. Tüpler Thermal cycler'a konularak 5 dk 65°C 'de bekletilmiştir.

2.5X Reaksiyon tamponun'dan 4 μL , RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ μL)'den 1 μL , 10 mM dNTP karışımından 2 μL ve RevertAid M-MuLV RT (200 U/ μL) enziminden 1 μL eklenmiştir. Toplam hacim 20 μL olacak şekilde örnekler pipet ile yavaşça karıştırılmıştır. Sonrasında tüpler Thermal cycler'a konularak Tablo 3. 3' deki program çalıştırılmıştır.

Tablo 3.3. cDNA sentezi için kullanılan termal cycler programı

Sıcaklık	Zaman
25 $^{\circ}\text{C}$	10 dakika
50 $^{\circ}\text{C}$	30 dakika
85 $^{\circ}\text{C}$	5 dakika

Sentezlenen cDNA'lar, Real Time PCR analizine kadar -20°C derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

3.2.6. Primer bağlanma sıcaklıklarının optimizasyonu

Primer bağlanma sıcaklıklarının optimizasyonu için DreamTaq master mix PCR kiti (Thermo) kullanıldı. Kit içerisindeki protokole göre aşağıdaki oranlarda mix hazırlandı ve termal cycler'da gradiyent PCR işlemi $51-63\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 derece aralıklarla gerçekleştirildi.

Dream Taq	10 µl
Forwerd primer	0,5 µl
Revers primer	0,5 µl
cDNA	2 µl
Nükleaz free water	+ 7 µl
	20 µl

PCR çalışmalarında kullanılan Aktin, IL-1 β , IL-10, IL-17-A, IL-18, IL21, IL-33, KIM-1, NGAL, TNF- α , TIMP-1, ve TGF- β genlerine özgü primer dizileri NCBI primerblast programı (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) kullanılarak tasarlanmış ve hedef genler için spesifikliği doğrulanmıştır. Bu genler ile ilgili primer dizileri Tablo 3.4.'te gösterilmiştir.

Tablo 3.4. Genler için primer dizilimleri

Gen	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Ürün uzunluğu	T _a (°C)
β -Aktin	CTGTGTGGATTGGTGGCTCT	CAGCTCAGTAACAGTCCGCC	135 bp	62
IL-1 β	GACTTCACCATGGAACCCGT	CAGGGAGGGAAACACACGTT	200 bp	61
IL-10	CCTGGTAGAAGTGATGCCCC	GATGCCGGGTGGTTCAATTT	281 bp	53
IL-17A	TCCTCTATTGTCCGCCATGC	ATTTGTATCCCCTCTGCGCC	194 bp	53
IL-18	CTGTATCCCAGGGTGCAGTTT	CTGGGCCAAGAGGAAGTGATT	155 bp	63
IL-21	GCACGAAGCTTTTGCCTGTT	GGCATTAGCCATGTGCCTC	152 bp	55
IL-33	AGCGTTTGTCTGCATCAGTTG	CTCGTAGTAACGGAGTAGCACC	187 bp	55
KIM-1	TTTGGATCTGTACCCAGTGCT	GGCCAGCCCTCTAATGGTAA	211 bp	61
NGAL	CAAGTGGCCGACACTGACTA	CATTGGTCGGTGGGAACAGA	200 bp	57
TGF- β 1	GACTCTCCACCTGCAAGACC	GGAAGTGGCGAGCCTTAGTTT	100 bp	55
TIMP-1	AGACACGCTAGAGATACCACG	CCAGGTCCGAGTTGCAGAAA	142 bp	61
TNF- α	AGAACTCAGCGAGGACACCA	TCTGCCAGTCCACATCTCG	200 bp	63

3.2.7. Agaroz jel elektroforezi ile PCR ürünlerinin ayrılarak görüntülenmesi

Hazırlanan %2,4'lük agaroz jel üzerine donduktan sonra 100-150 ml jeli geçecek kadar TAE tamponu eklendi. Örnekler ve markera 6X loadingdye boya eklendi. 15 µl marker ve 20µl örnek kuyulara yüklendi. 100 V'da 60 dakika elektroforez yapıldı. Sonrasında jel nükleik asit boyasıyla (etidyum bromür) 20 dakika boyandı. Thermo Fusion FX5 görüntüleme cihazında UV ışık altında bantların analizi yapıldı.

3.2.8. Real Time PCR analizi

Sentezlenen cDNA örneklerinden Real Time PCR analizi Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x) (Thermoscientific, K0221) kit kullanılarak yapılmıştır. 0,2 ml'lik PCR tüplerine Sybr Green Master Mix 5 µl, Forward primer 0,5 µl, Reverse primer 0,5 µl, nükleaz free su 3µl ve cDNA 1 µl olacak şekilde pipetlendi. Örnekler pipet ile karıştırılarak 10µl'lik karışım cihaza uygun 96'lık plate kuyularına konuldu. Plate Real Time PCR cihazına (Piko Real Thermo) yerleştirilerek Tablo 3.5' deki program kuruldu.

Tablo 3.5. Real Time PCR amplifikasyon programı

Reaksiyon Basamağı	Sıcaklık	Süre	Döngü
Başlangıç Denatürasyonu	95 °C	10 dakika	1
Denatürasyon	95 °C	15 saniye	} 40
Primer Bağlanması (Bağlanma ısısı)	51-63 °C	} 30 saniye	
Primer Uzaması	72 °C	30 saniye	
Final Uzaması	72 °C	10 dakika	

Analiz sonrasında elde edilen C_q (Cycle quantification) değerleri kullanılarak Livac yöntemine göre ΔCT , $\Delta\Delta CT$ ve nispi kat değişimi (fold change) hesaplanmıştır. Bu hesaplama yapılırken housekeeping gen olarak Aktin geni kullanılmıştır. Bu yöntemle göre aşağıdaki formülasyonlar kullanılmıştır;

$$\Delta CT = Ct (\text{Hedef gen}) - Ct (\beta\text{-Aktin geni})$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta Ct (\text{Kontrol grubu}) - \Delta Ct (\text{Tedavi grubu})$$

Gen ifadelerinin artış veya azalışı $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin hesaplanmasıyla kat değişimi olarak hesaplanmıştır. Bunun dışında cihazdan alınan erime eğrisi (melt curve) analiz sonuçları ile primerlerin gen için olan özgünlüğü gösterilmiştir.

3.2.9. İstatistiksel analiz

Bu çalışmanın istatistiksel analizleri GraphPad Prism 6.0 programı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel değerlendirmelerde gruplar arası farklılıklar Anova Testi ve Post-

Hoc Test olarak Mann WhitneyU testi kullanılmıştır. 0.05'ten küçük "p" değerleri anlamlı olarak kabul edilmiştir. Veriler ortalama ve standart sapma olarak ifade edilmiştir.

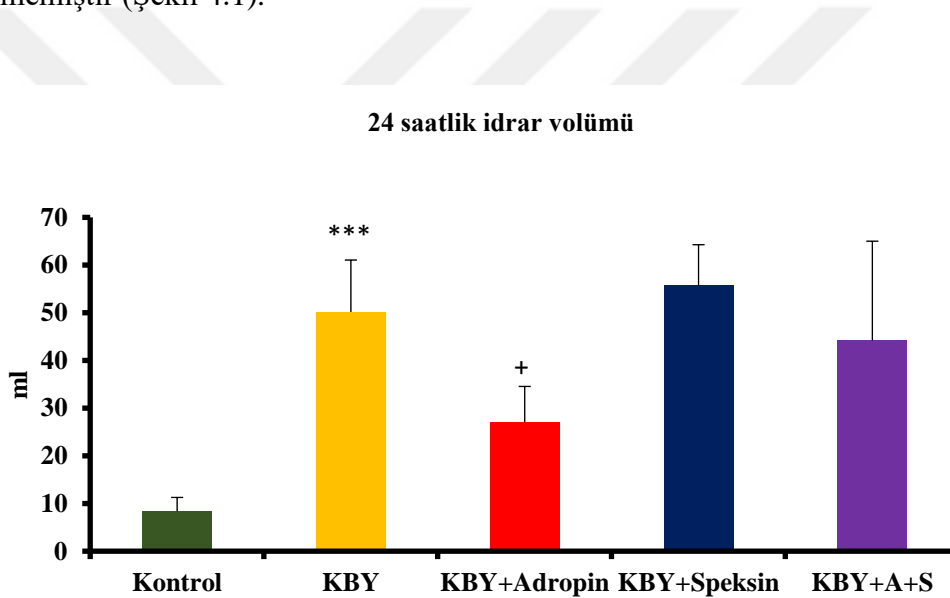


4. BULGULAR

4.1. Renal Fonksiyonların Değerlendirilmesi

4.1.1. 24 Saatlik idrar volümü

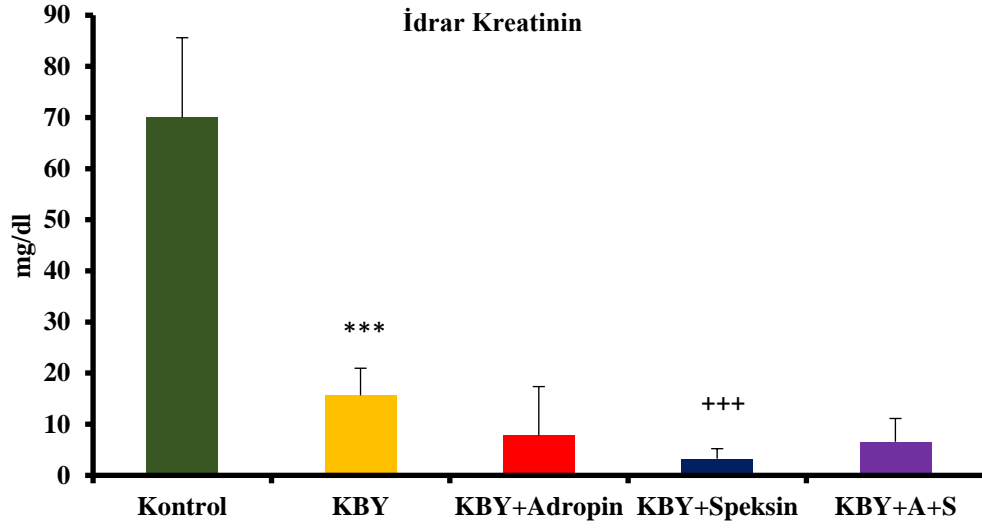
Kontrol ve KBY grubu karşılaştırıldığında KBY grubunda 24 saatlik idrar volümünün önemli düzeyde artış gösterdiği bulunmuştur ($p<0,001$). Bunun yanında KBY grubu ile KBY+Adropin grubu karşılaştırıldığında 24 saatlik idrar volümünün önemli oranda azaldığı gözlenmiştir ($p<0,05$). Ancak KBY grubu ile KBY + Speksin ve KBY + Adropin+Speksin grupları karşılaştırıldığında 24 saatlik idrar volümünde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Adeninindüklediği kronik böbrek hasarında 24 Saatlik idrar volümü. Kontrol grubu ve KBY grubu kıyaslandığında $***p<0,001$, KBY grubu ve KBY+Adropin grubu kıyaslandığında ise $+p<0,05$, ortalama \pm standart sapma, $n=5$.

4.1.2. İdrar kreatinin

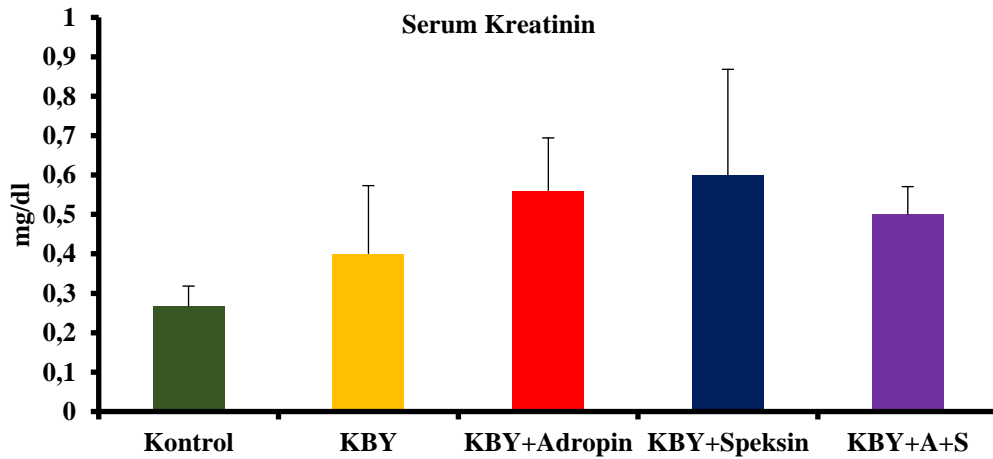
Kontrol ve KBY grubu karşılaştırıldığında KBY grubunda idrar kreatinin değerinde anlamlı derecede azalma görülmüştür ($p<0,001$). KBY grubu ile KBY+Speksin grubu karşılaştırıldığında kreatinin miktarlarının önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir ($p<0,001$). KBY grubu ile KBY+Adropin ve KBY+Speksin+Adropin grupları karşılaştırıldığında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4. 2).



Şekil 4.2. Adeninindüklediği kronik böbrek hasarında idrar kreatin düzeyleri. Kontrol grubu ve KBY grubu kıyaslandığında $***p<0,001$, KBY grubu ve KBY+Speksin grubu kıyaslandığında ise $+++p<0,001$, ortalama \pm standart sapma, $n=5$.

4.1.3. Serum kreatinin

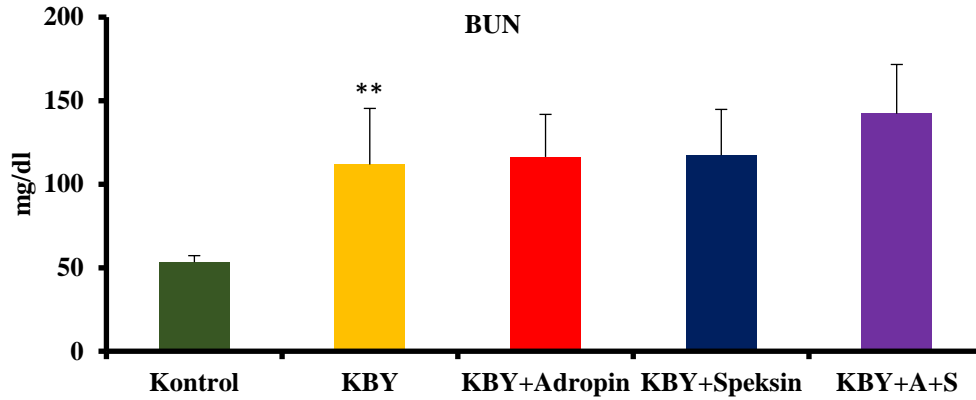
Kontrol ve KBY grubu karşılaştırıldığında serum kreatinin miktarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Benzer olarak KBY grubu ile KBY+Adropin, KBY+Speksin ve KBY+Adropin+Speksin grubu karşılaştırıldığında serum kreatinin miktarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4. 3).



Şekil 4.3. Adeninindüklediği kronik böbrek hasarında serum kreatinin düzeyleri. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır, $p>0,05$, ortalama \pm standart sapma, $n=5$.

4.1.4. BUN

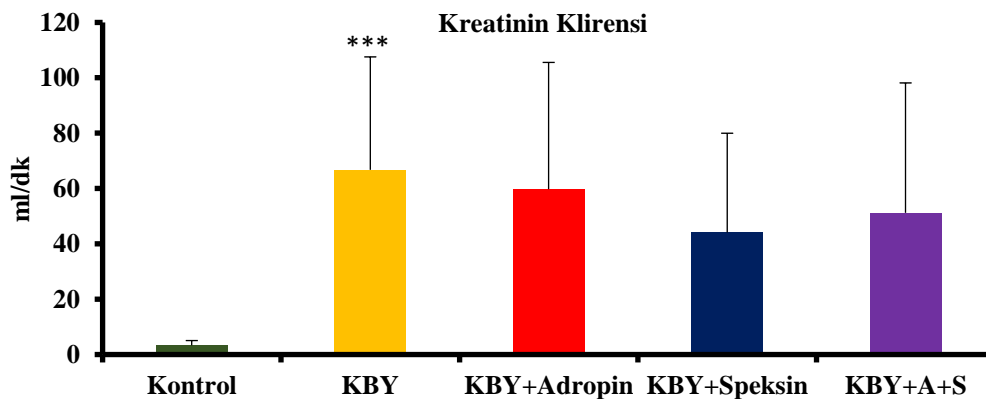
Kontrol ve KBY grubu karşılaştırıldığında KBY grubunda BUN miktarının anlamlı bir şekilde artış gösterdiği bulunmuştur ($p<0,01$). Ancak KBY grubu ile KBY+Adropin, KBY+Speksinve KBY+Adropin+Speksin arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4. 4).



Şekil 4.4. Adeninindüklediği kronik böbrek hasarında BUN düzeyleri. Kontrol grubu ve KBY grubu kıyaslandığında $**p<0,01$, ortalama \pm standart sapma, $n=5$.

4.1.5. Kreatinin klirensi

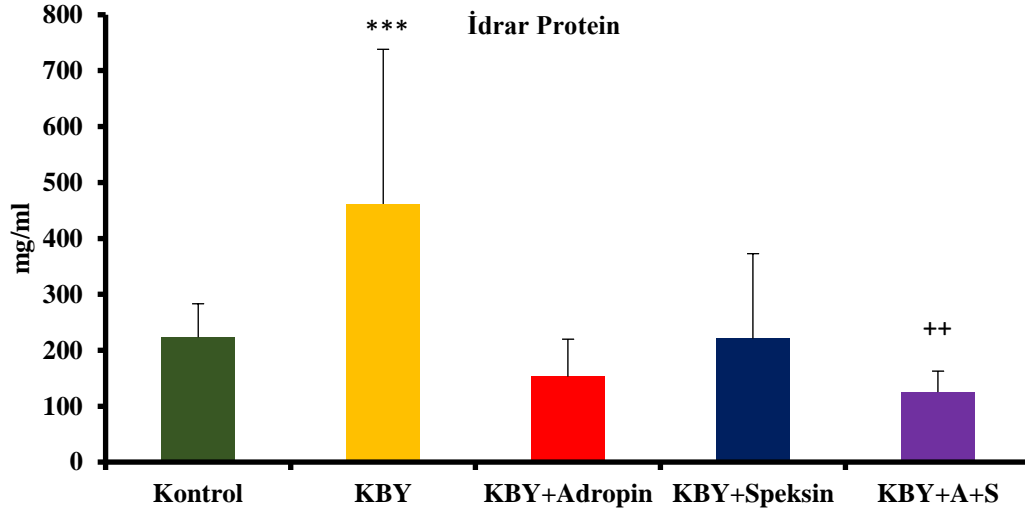
Kontrol ve KBY grubu karşılaştırıldığında KBY grubunda kreatinin klirensi önemli oranda artış göstermiştir ($p<0,001$). Ancak KBY grubu ile KBY+Adropin, KBY+Speksin ve KBY+Adropin+Speksin grupları karşılaştırıldığında KBY' ye oranla kreatinin klirensinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4. 5).



Şekil 4.5. Adeninindüklediği kronik böbrek hasarında kreatinin klirens düzeyleri. Kontrol grubu ve KBY grubu kıyaslandığında $***p<0,001$, ortalama \pm standart sapma, $n=5$.

4.1.6. İdrar protein

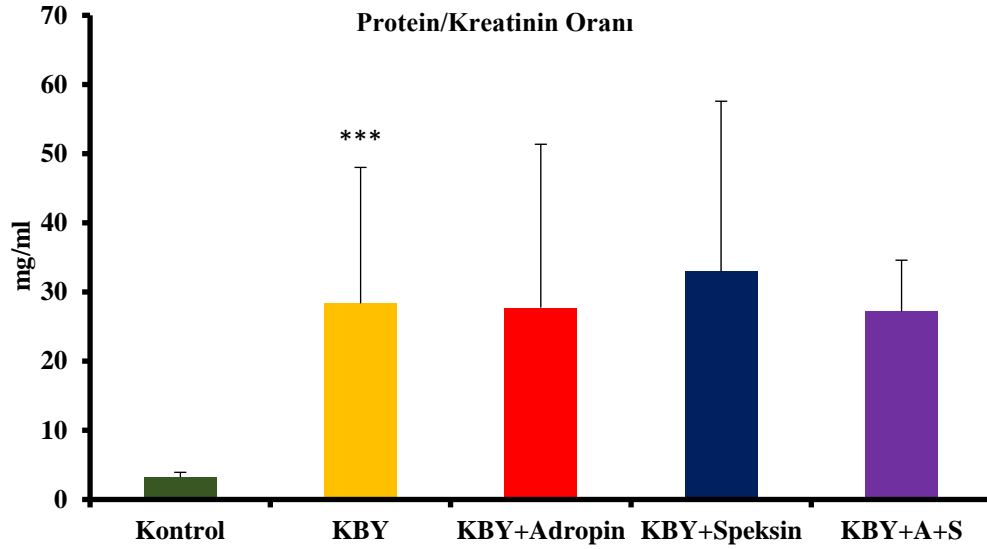
Kontrol ve KBY grubu karşılaştırıldığında KBY grubunda idrar protein miktarı önemli düzeyde artış göstermiştir ($p<0,001$). Bunun yanında KBY grubu ile KBY+Adropin ve KBY+Speksin grubu karşılaştırıldığında anlamlı bir fark gözlenmezken, KBY ve KBY+Adropin+Speksin grupları karşılaştırıldığında idrar protein miktarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı bulunmuştur ($p<0,01$) (Şekil 4. 6).



Şekil 4.6. Adeninindüklediği kronik böbrek hasarında idrar protein düzeyleri. Kontrol grubu ve KBY grubu kıyaslandığında $***p<0,001$, KBY grubu ve KBY+Adropin+Speksin grubu kıyaslandığında ise $++p<0,01$, ortalama \pm standart sapma, $n=5$.

4.1.7. Protein/Kreatinin oranı

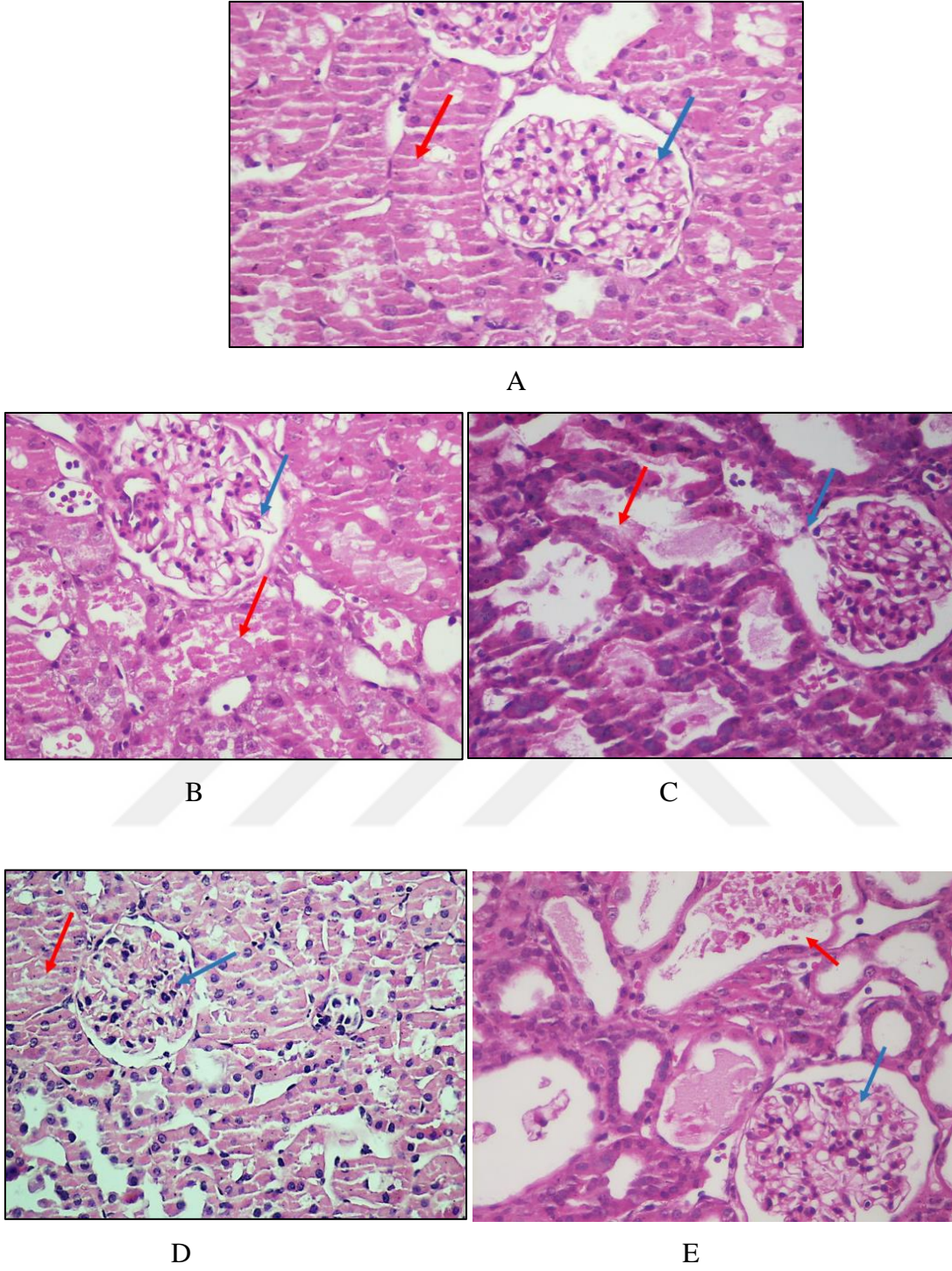
KBY grubunda Protein/kreatinin oranı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde artış göstermiştir ($p<0,001$). Ancak KBY grubu ile KBY+Adropin, KBY+ Speksin ve KBY+Adropin+Speksin grubu karşılaştırıldığında KBY'ye oranla protein/kreatinin oranında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Adeninindüklediği kronik böbrek hasarında protein/kreatin oranı düzeyleri. Kontrol grubu ve KBY grubu kıyaslandığında *** $p<0,001$, ortalama \pm standart sapma, $n=5$.

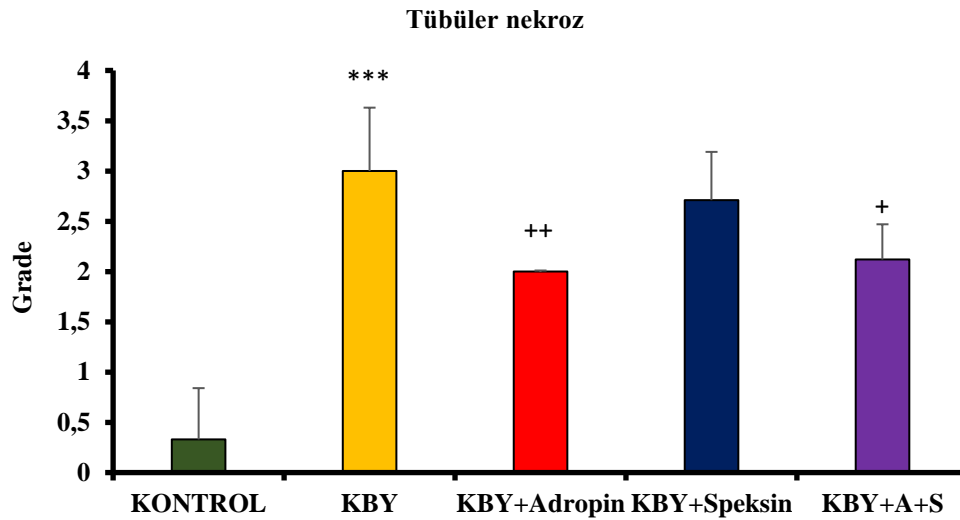
4.1.8. Böbrek dokusunun ışık mikroskobu ile incelenmesi

Kontrol grubundaki sıçanların böbrekleri hematoksileneozin boyama ile incelendiğinde herhangi bir patolojik değişikliğin olmadığı normal glomerüler yapılar ve uniform tübüler yapı gözlemlendi. KBY grubuna bakıldığında ise glomeruler şişkinlik, glomerüler hipertrofi, tübüler dilatasyon ve tübüler nekroz gibi patolojik değişiklikler gözlenmiştir (Resim 4.1).



Resim 4.1. Her deney grubunu temsil eden bir sıçan böbreğinin hematoksileneozin boyama sonrası ışık mikroskobu fotoğrafları. Kontrol (A), KBY (B), KBY+Adropin (C), KBY+Speksin (D) ve KBY+Adropin+Speksin (E), (x200), (Kırmızı ok: Glomerüler alan, Mavi ok: Tübüler nekroz).

Bunun yanında kantitatif olarak hesaplanan tübüler nekroz indeksi özellikle KBY’de önemli düzeyde artış göstermiştir ($p<0,001$) (Şekil 4.8). Bunun yanında özellikle adropin ve adropin+speksin uygulanmasının tübüler nekrozu KBY grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı gözlenmiştir.



Şekil 4.8. Adeninindüklediği kronik böbrek hasarında tübüler nekroz indeksi. Kontrol grubu ve KBY grubu kıyaslandığında $***p<0,001$, KBY grubu ile KBY+Adropin ve KBY+Adropin+Speksin grupları kıyaslandığında ise $++p<0,01$ ve $+p<0,05$, ortalama \pm standart sapma, $n=5$.

4.1.9. Böbrek dokusundan izole edilen total RNA miktarı ve saflık düzeyleri

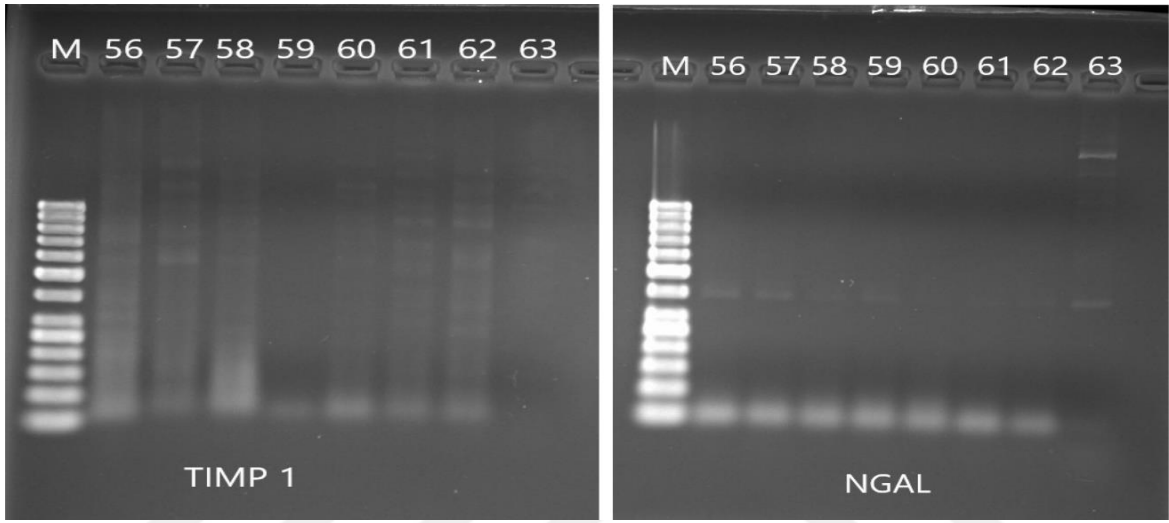
Böbrek dokusundan izole edilen total RNA miktarı ve saflık düzeyleri μ Drop kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen total RNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflık düzeylerini gösteren $A_{260/280}$ oranları Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Total RNA örneklerinin konsantrasyonları ve A_{260/280} oranları

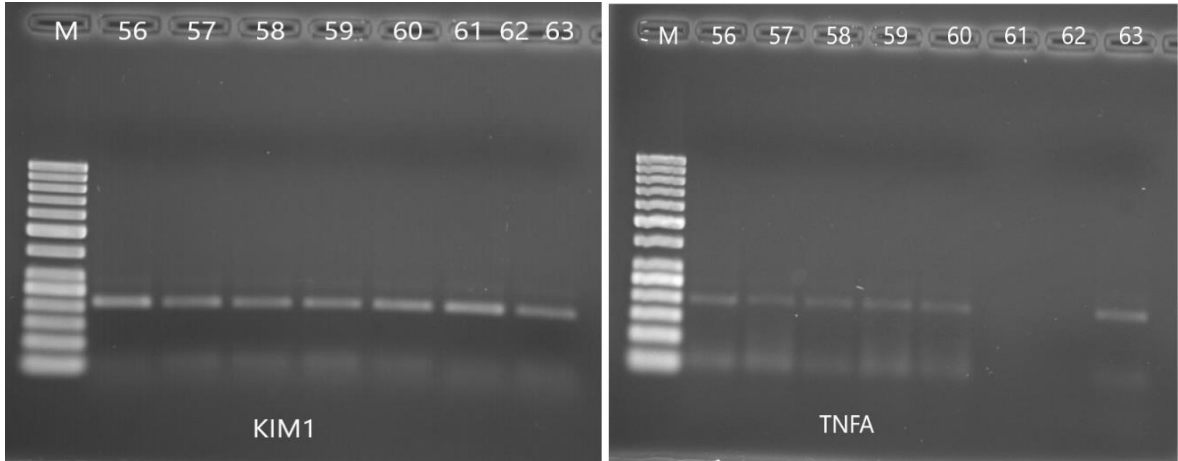
	Total RNA (ng/μl)	A 260/280
Kontrol 1	226,4	1,94
Kontrol 2	95,69	1,905
Kontrol 3	31,76	1,935
Kontrol 4	188,1	1,92
Kontrol 5	124,3	1,868
KBY1	468,7	1,85
KBY2	145,3	1,89
KBY3	129,3	1,956
KBY4	117,3	1,924
KBY5	218,3	1,977
Speksin1	42,5	2,1
Speksin 2	250	1,979
Speksin 3	140,6	2
Speksin 4	167,4	1,98
Speksin 5	173	1,956
Adropin 1	87,53	1,93
Adropin 2	160,2	1,871
Adropin 3	146	1,876
Adropin 4	163,1	1,854
Adropin 5	24,86	2,069
Adropin+Speksin1	39,53	1,973
Adropin+ Speksin2	239,5	1,98
Adropin+Speksin3	139,2	1,975
Adropin+Speksin 4	66,98	1,996
Adropin+Speksin5	222,3	1,886

4.1.10. Primer bağlanma sıcaklıklarının optimizasyonu

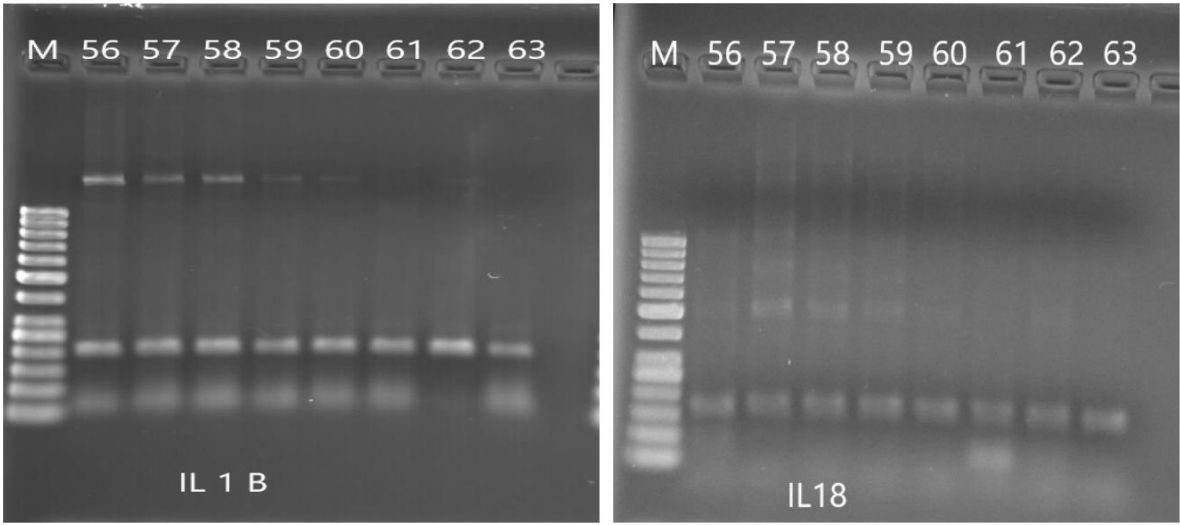
Her gen için ayrı ayrı hazırlanan reaksiyonlar 51-63 °C arasında gradiyent PCR yapıldı ve sonrasında agaroz jel elektroforezi ile bu ürünler ayrıldı. Etidyum bromür boyası ile boyanan jeller U.V ışık altında görüntüleme cihazında değerlendirilerek en uygun sıcaklıklar seçildi. Genlere ait gradiyent PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri Resim 4.2- Resim 4.5'te gösterilmiştir.



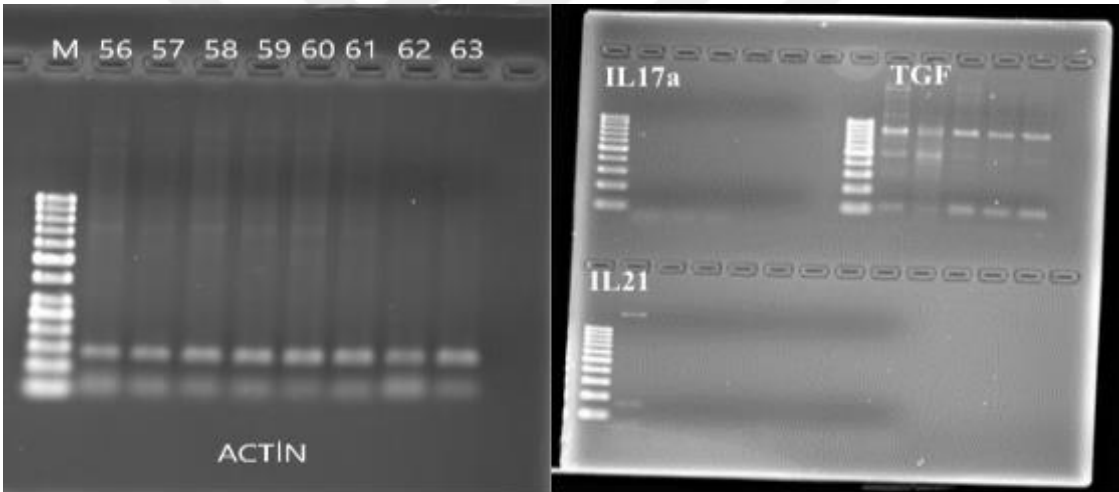
Resim 4.2. TIMP-1 ve NGAL gradiyent PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü



Resim 4.3. KIM-1 ve TNF- α gradiyent PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü



Resim 4.4. IL1- β ve IL-18 gradiyent PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü



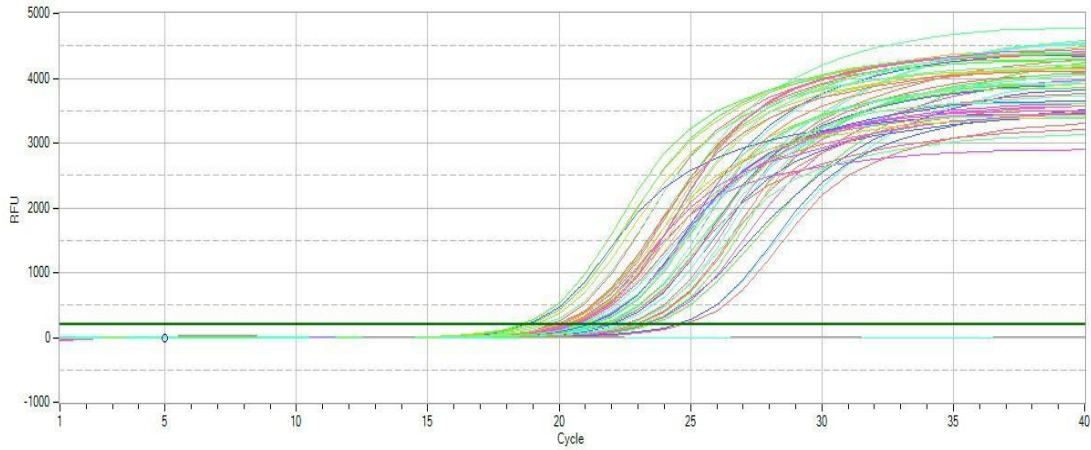
Resim 4.5. Aktin, IL-17A, TGF- β ve IL-21 gradiyent PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri

Elektroforez sonunda primer bağlanma sıcaklıkları için;

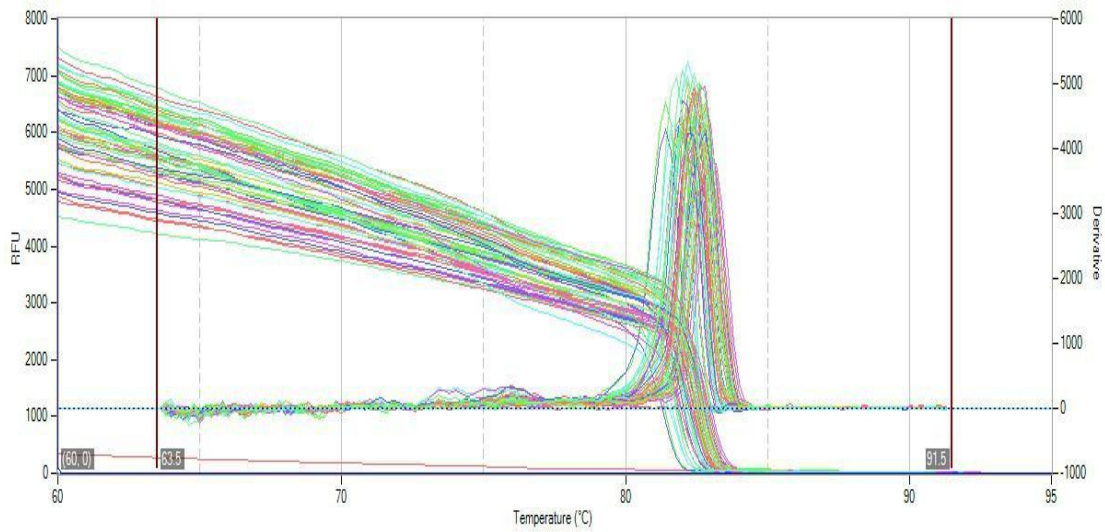
Aktin 62°C, KIM-1 61°C, TIMP-1 61°C, NGAL 57°C, IL1- β 61°C, TNF-a 63 °C, TGF- β 55°C, IL-17A 53°C, IL-18 63 °C, IL-21 55°C ve IL-33 55 °C olarak belirlenerek Real Time PCR programları kuruldu.

4.1.11. Kontrol geni olarak kullanılan aktin genine ait Cq ve melting curve değerleri

Diğer genlerin relative kantifikasyon değerlerinin kat değişimi olarak hesaplanabilmesi için aktin genine ait Cq değerleri her örnek için ölçülmüştür. Nonspesifik bantların varlığı melt curve ile belirlenmiştir (Şekil 4. 9 ve Şekil 4. 10).



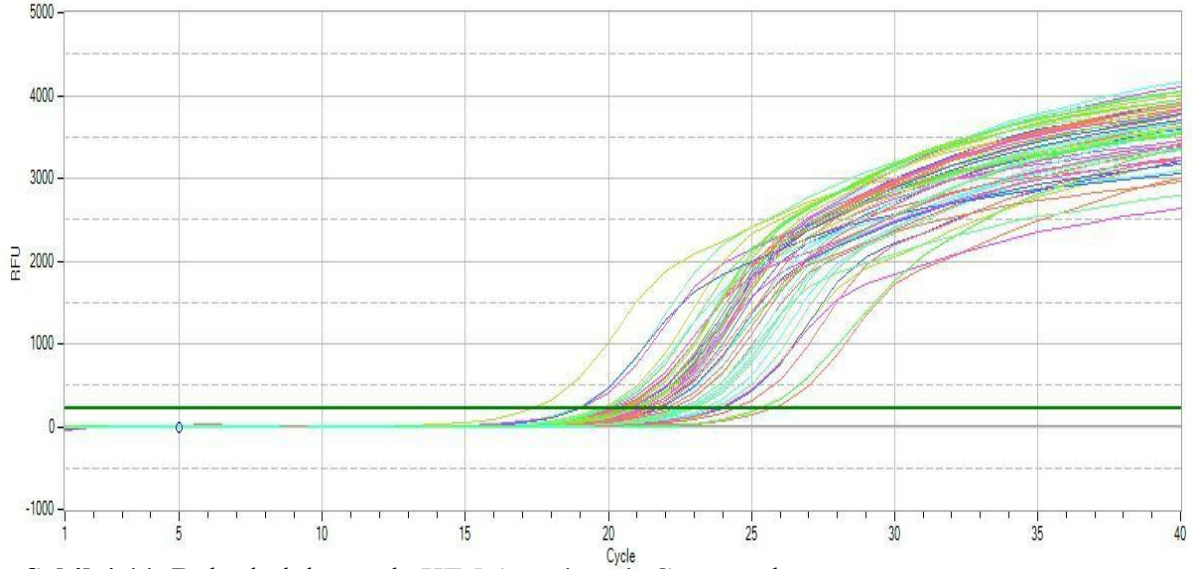
Şekil 4.9. Aktin genine ait Cq sonuçları



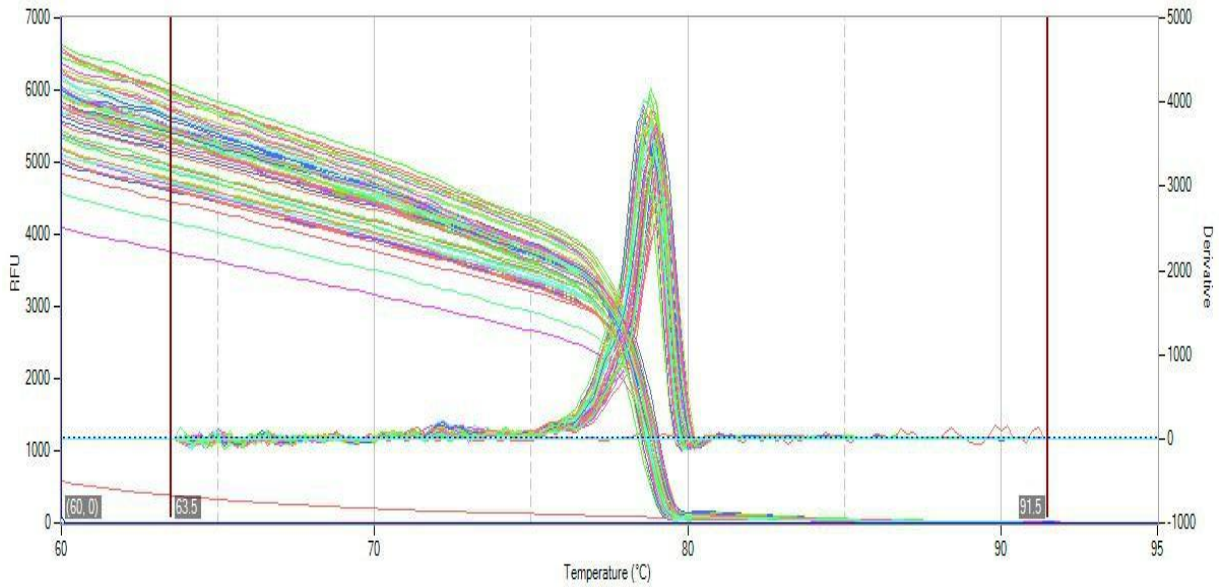
Şekil 4.10. Aktin genine ait Melting Curve analiz sonuçları

4.1.12. KBY’de adropin ve speksinin KIM-1 gen ekspresyon düzeylerine etkisi

Böbrek dokusunda KIM-1 gen ekspresyon düzeyleri Real Time PCR ile belirlenmiştir. Örneklere göre Cq değerleri ve melt curve grafiği Şekil 4. 11 ve Şekil 4. 12’ de gösterilmiştir.

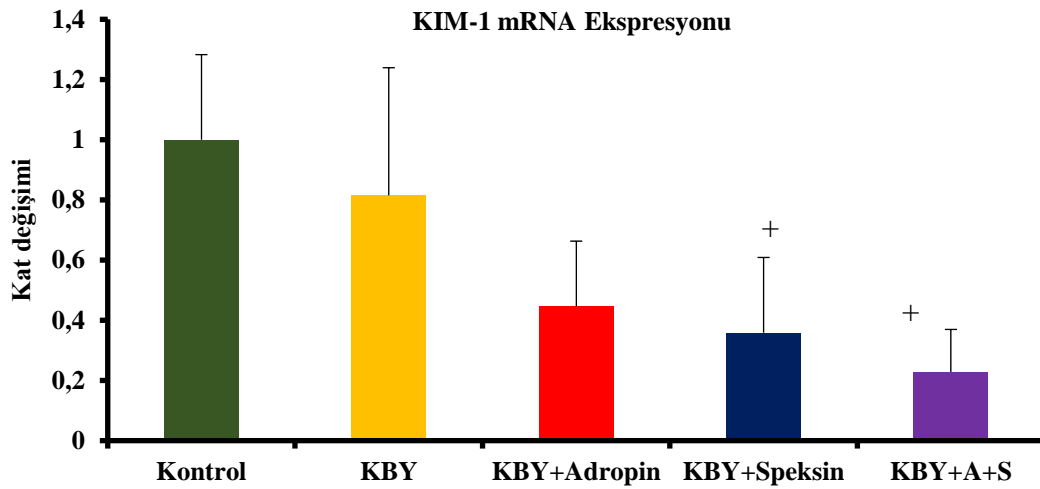


Şekil 4.11. Böbrek dokusunda KIM-1 genine ait Cq sonuçları



Şekil 4.12. KIM-1 genine ait Melting Curve analiz sonuçları

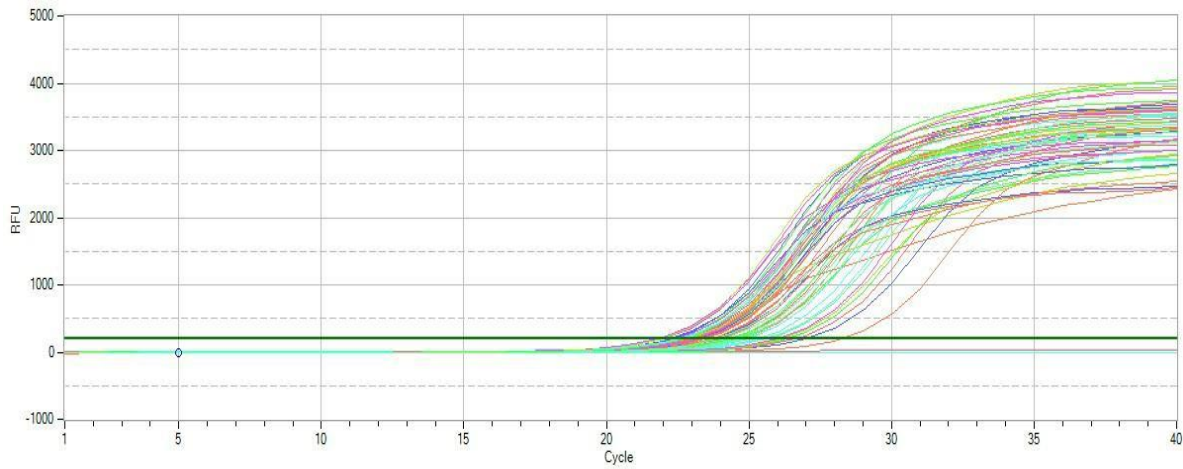
Kontrol ve KBY grubu karşılaştırıldığında KIM-1 gen ekspresyonunda anlamlı bir fark gözlenmemiştir. KBY grubu ile KBY+Speksin grubu karşılaştırıldığında KIM1 mRNA ekspresyonunun yarı yarıya azaldığı ve KBY+Adropin+Speksin grubu karşılaştırıldığında ise %75 oranında azaldığı gözlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil4. 13).



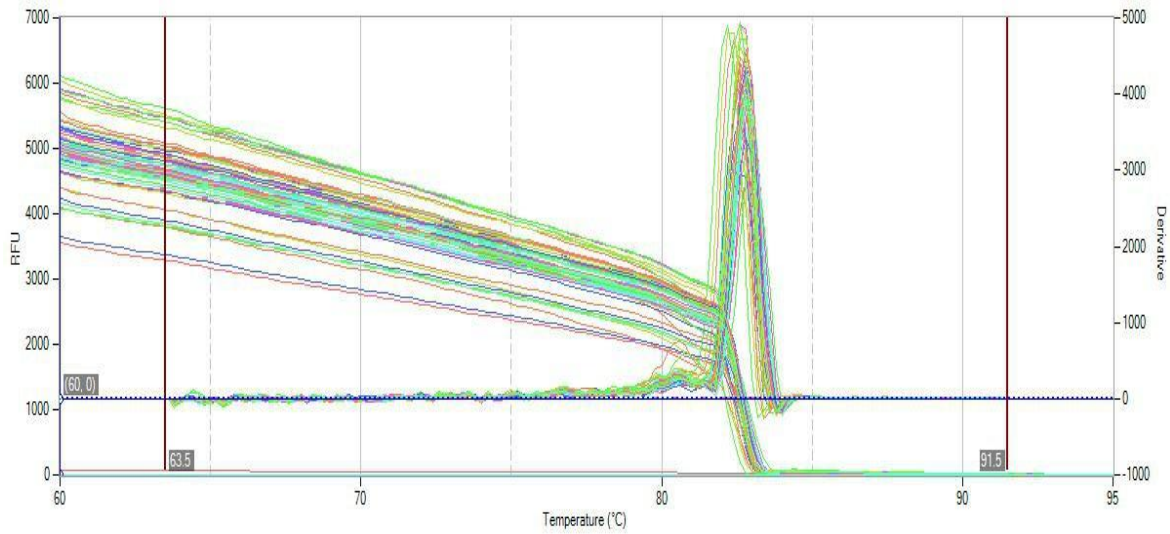
Şekil 4.13. KBY’de adropin ve speksinin KIM-1 gen ekspresyon düzeylerine etkisi. KBY grubu ile KBY+Speksin ve KBY+Adropin+Speksin grubu kıyaslandığında $+p<0,05$, ortalama \pm standart sapma, $n=5$.

4.1.13. KBY’de adropin ve speksinin NGAL gen ekspresyon düzeylerine etkisi

Böbrek dokusunda NGAL gen ekspresyon düzeyleri Real Time PCR ile belirlenmiştir. Örneklere göre Cq değerleri ve melt curve grafiği Şekil 4. 14 ve Şekil 4. 15’te gösterilmiştir.

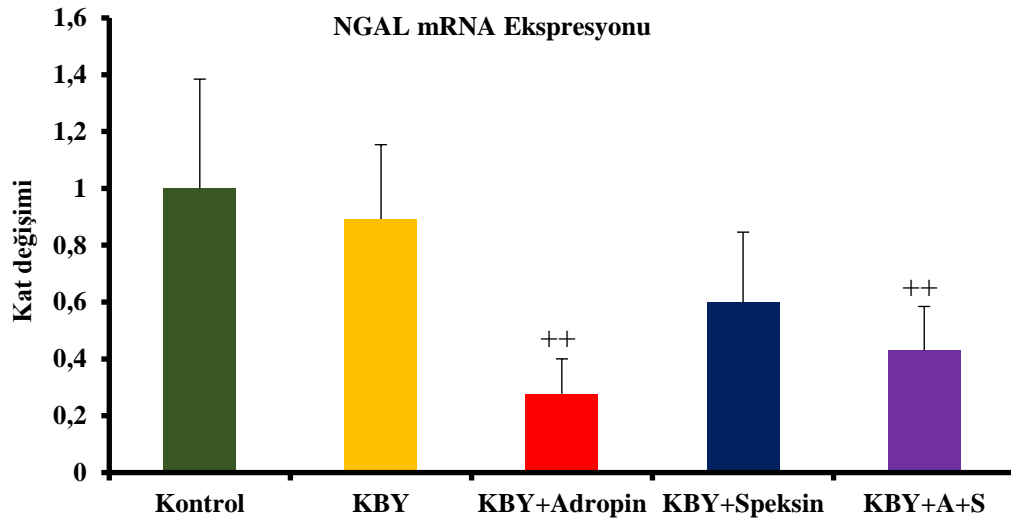


Şekil 4.14. Böbrek dokusunda NGAL genine ait Cq sonuçları



Şekil 4.15. NGAL genine ait Melting Curve analiz sonuçları

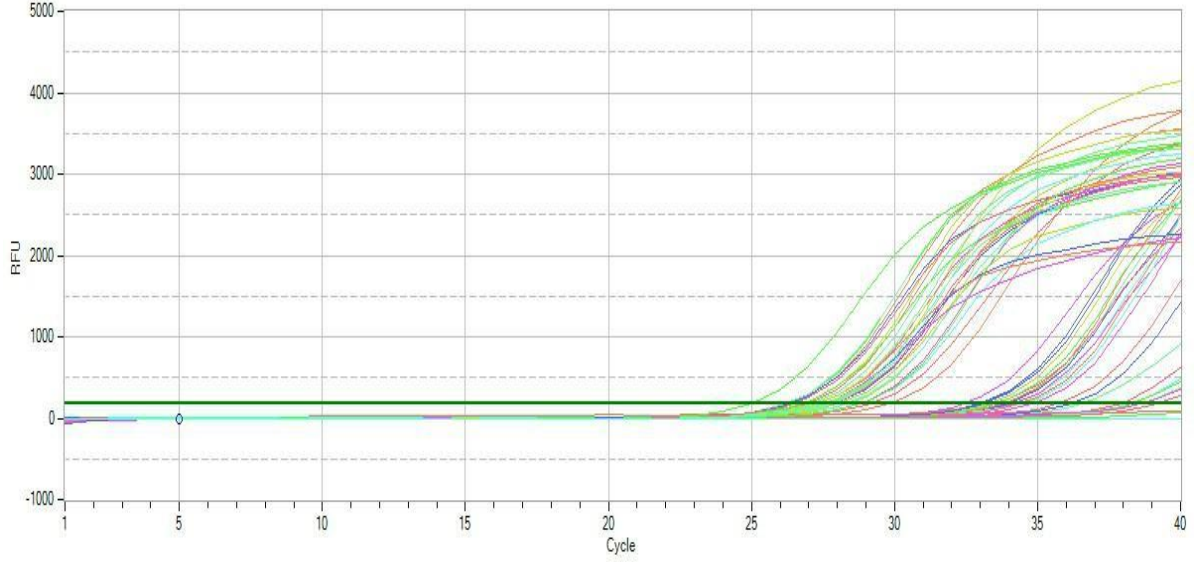
Kontrol ve KBY grubu karşılaştırıldığında NGAL gen ekspresyonunda anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Ancak KBY grubu ile KBY+Adropin grubu karşılaştırıldığında NGAL mRNA ekspresyonunun yaklaşık %75 ve KBY+Adropin+Speksin grubu karşılaştırıldığında ise yarı yarıya bir azalma olduğu gözlenmiştir ($p \leq 0,01$) (Şekil 4.16).



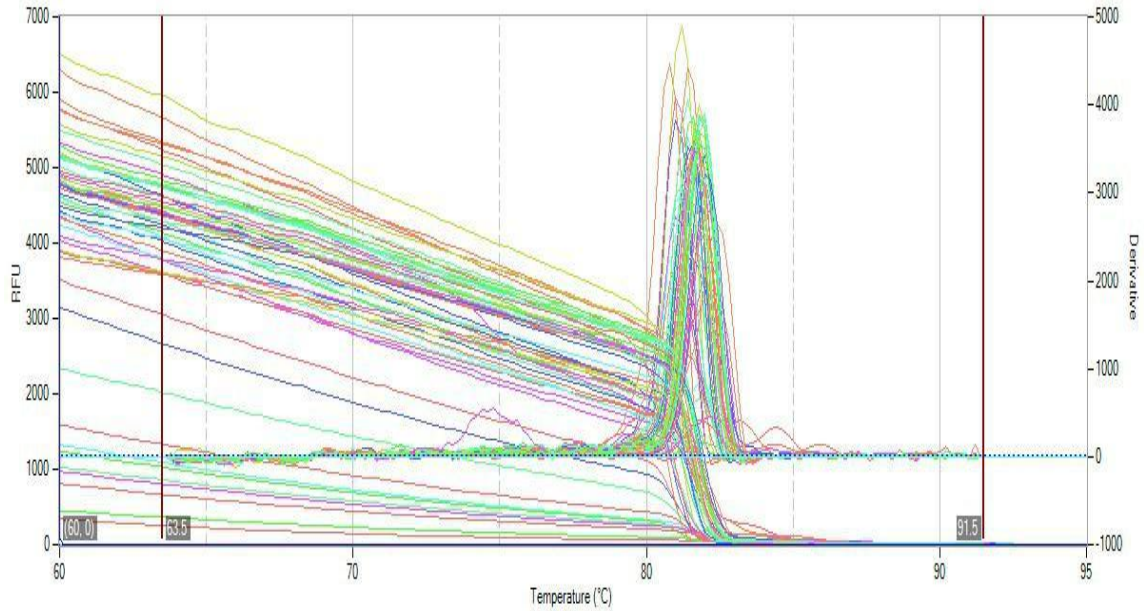
Şekil 4.16. KBY'deadropin ve speksinin NGAL gen ekspresyon düzeylerine etkisi. KBY grubu ile KBY+Adropin ve KBY+Adropin+Speksin grubu kıyaslandığında $++p < 0,01$, ortalama \pm standart sapma, $n=5$.

4.1.14. KBY’de adropin ve speksinin TIMP-1 gen ekspresyon düzeylerine etkisi

Böbrek dokusunda TIMP-1 gen ekspresyon düzeyleri Real Time PCR ile belirlenmiştir. Örneklere göre Cq değerleri ve melt curve grafiği Şekil 4.17 ve Şekil 4.18’de gösterilmiştir.

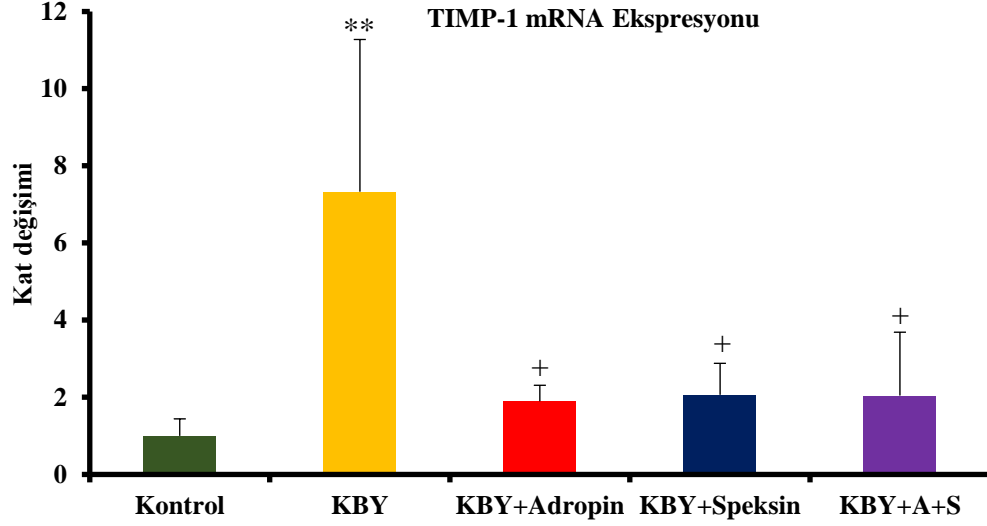


Şekil 4.17. Böbrek dokusunda TIMP-1 genine ait Cq sonuçları



Şekil 4.18. TIMP-1 genine ait Melting Curve analiz sonuçları

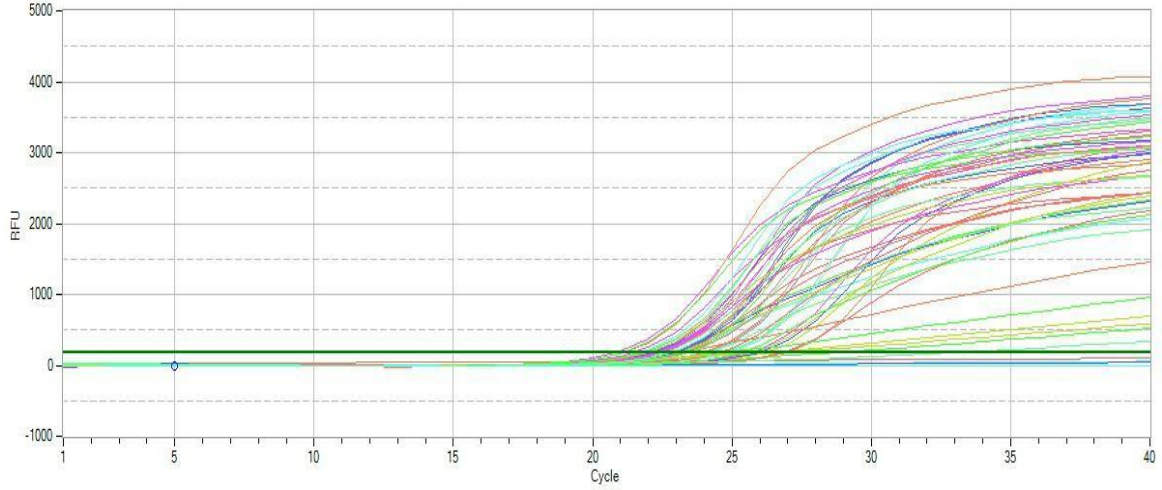
Kontrol ve KBY grubu karşılaştırıldığında KBY grubunda TIMP-1 mRNA ekspresyonunun yaklaşık olarak 6,5 kat artış gösterdiği bulunmuştur ($p < 0,01$). Bunun yanında KBY grubu ile KBY+Adropin, KBY+Speksin ve KBY+Adropin+Speksin grupları karşılaştırıldığında TIMP-1 mRNA ekspresyonunun önemli oranda azaldığı gözlenmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4.19).



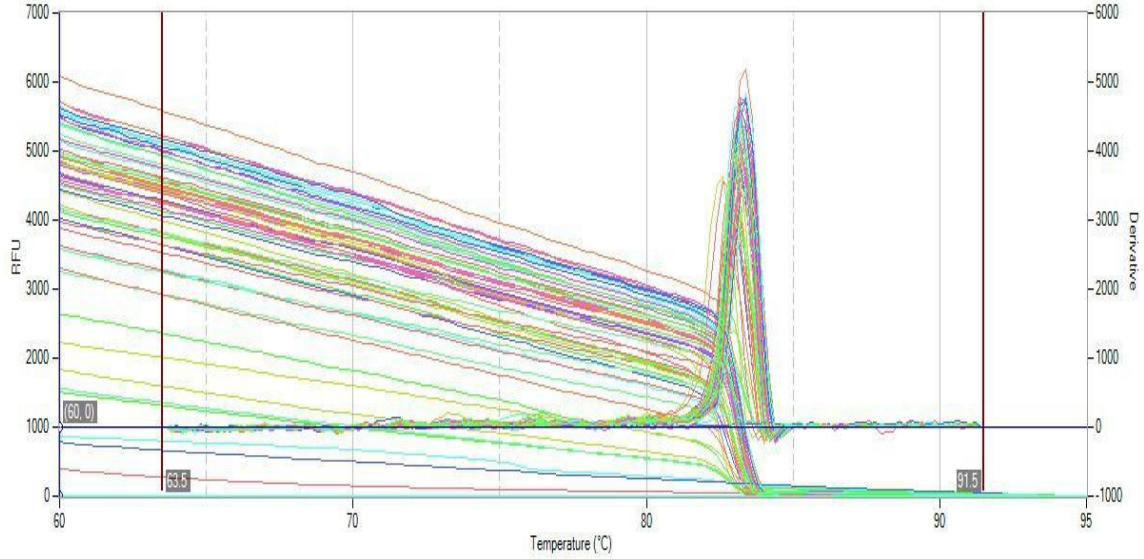
Şekil 4.19. KBY’de adropin ve speksinin TIMP-1 gen ekspresyon düzeylerine etkisi. Kontrol grubu ve KBY grubu kıyaslandığında $**p < 0,01$, KBY grubu ile KBY+Adropin, KBY+Speksin ve KBY+Adropin+Speksin grupları kıyaslandığında ise $+p < 0,05$, ortalama \pm standart sapma, $n=5$.

4.1.15. KBY'de adropin ve speksinin TNF- α gen ekspresyon düzeylerine etkisi

Böbrek dokusunda TNF- α gen ekspresyon düzeyleri Real Time PCR ile belirlenmiştir. Örneklere göre Cq değerleri ve melt curve grafiği Şekil 4. 20 ve Şekil 4. 21'de gösterilmiştir.

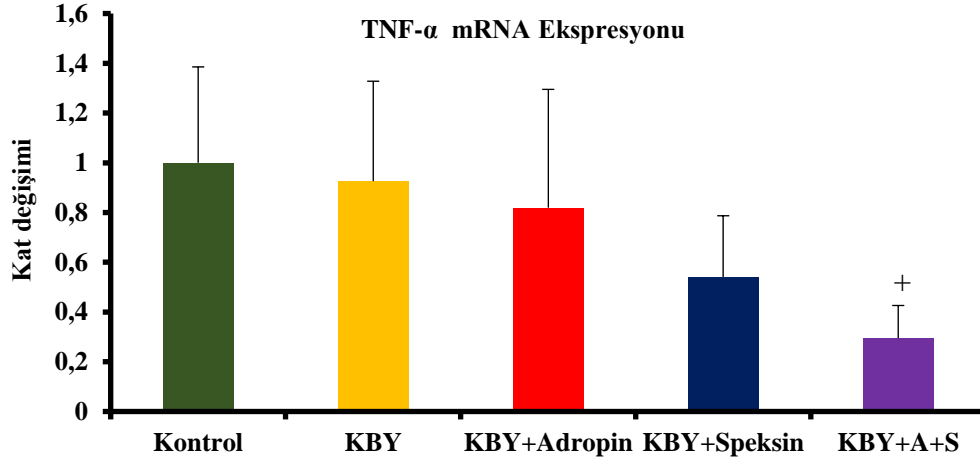


Şekil 4.20. Böbrek dokusunda TNF- α genine ait Cq sonuçları



Şekil 4.21. TNF- α genine ait Melting Curve analiz sonuçları

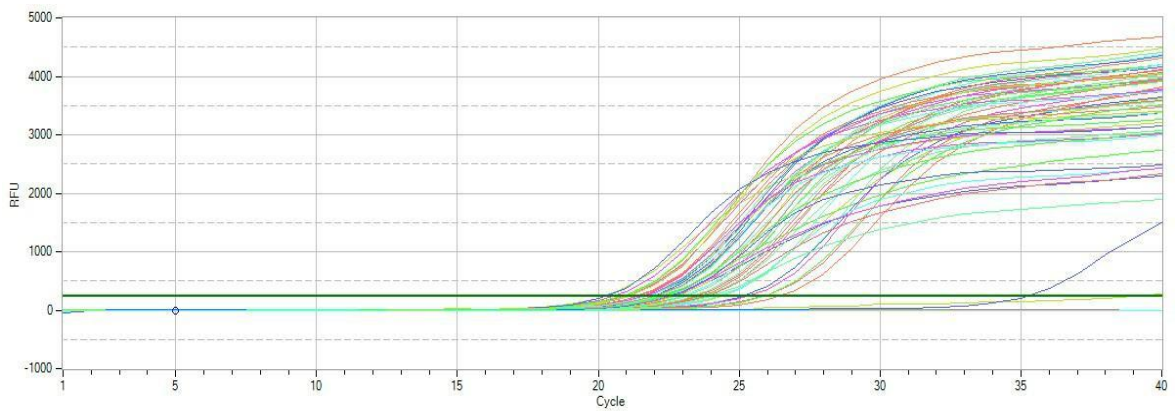
Kontrol ve KBY grubu karşılaştırıldığında TNF- α mRNA ekspresyonlarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bunun yanında KBY grubu ile KBY+Adropin ve KBY+Speksin grubu karşılaştırıldığında TNF- α mRNA ekspresyonlarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Ancak KBY grubu ile KBY +Adropin+Speksin grubu karşılaştırıldığında TNF- α mRNA ekspresyonunun % 60 oranında azaldığı gözlenmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4.22).



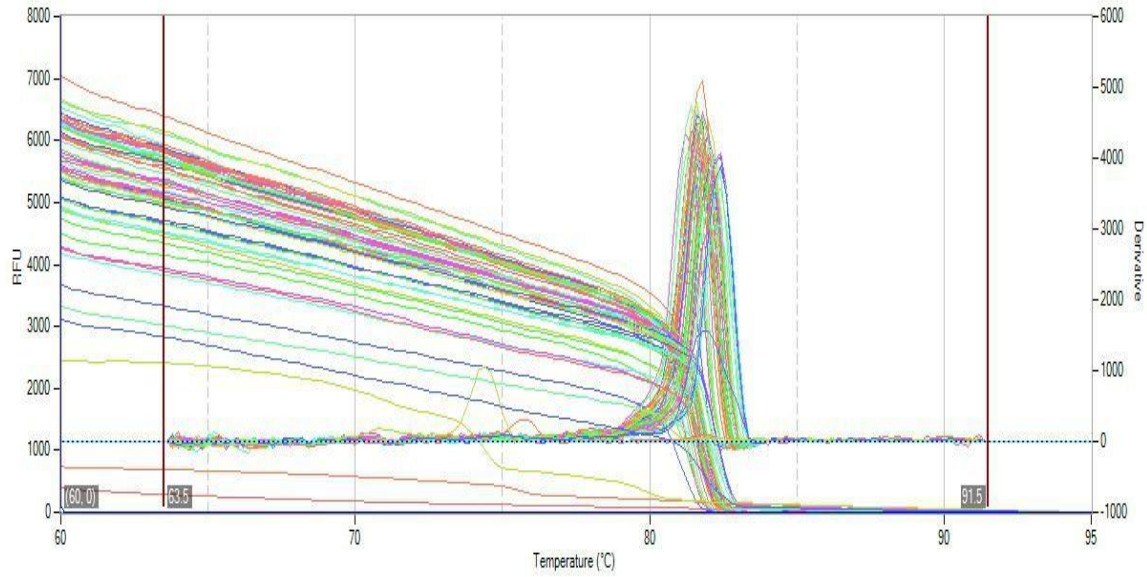
Şekil 4.22. KBY’de adropin ve speksinin TNF- α gen ekspresyon düzeylerine etkisi. KBY grubu ile KBY+Adropin+Speksin grupları kıyaslandığında $+p < 0,05$, ortalama \pm standart sapma, $n=5$.

4.1.16. KBY’de adropin ve speksinin IL-1 β gen ekspresyon düzeylerine etkisi

Böbrek dokusunda IL-1 β gen ekspresyon düzeyleri Real Time PCR ile belirlenmiştir. Örneklere göre Cq değerleri ve melt curve grafiği Şekil 4.23 ve Şekil 4.24’te gösterilmiştir.

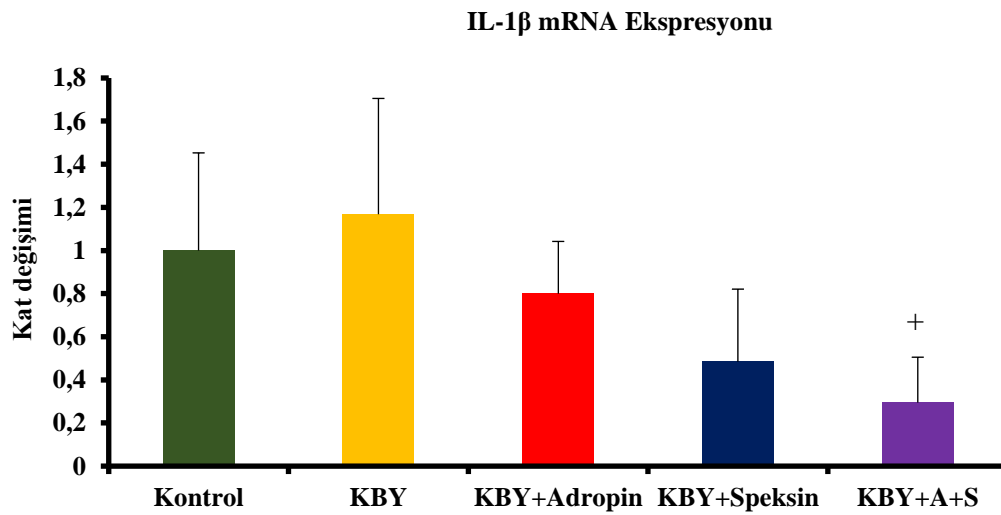


Şekil 4.23. Böbrek dokusunda IL-1 β genine ait Cq sonuçları



Şekil 4.24. IL-1 β genine ait Melting Curve analiz sonuçları

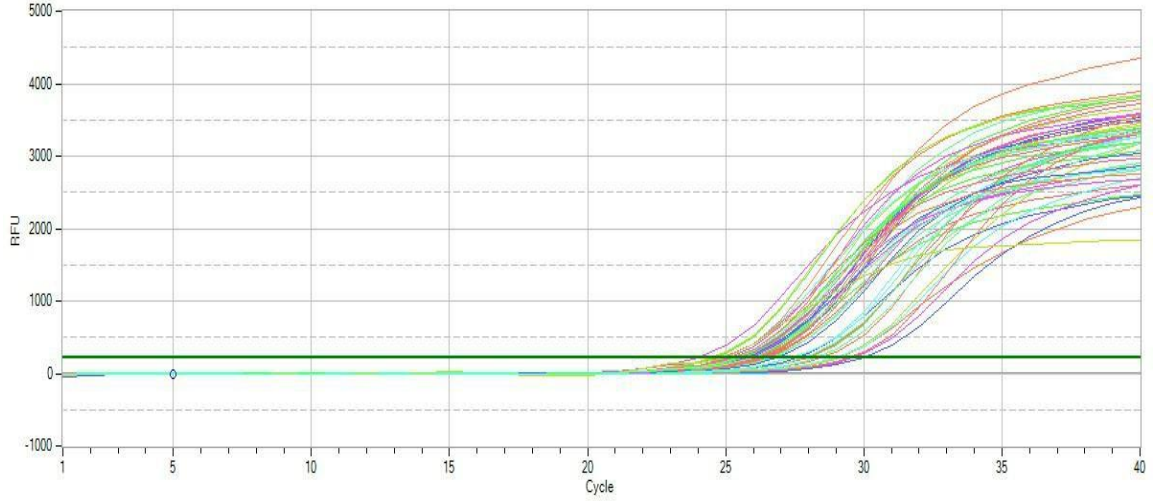
Kontrol ve KBY grubu karşılaştırıldığında KBY grubunda IL-1 β mRNA ekspresyonlarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bunun yanında KBY grubu ile KBY+Adropin ve KBY+Speksin grubu karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ancak KBY grubu ile KBY+Adropin+Speksin grubu karşılaştırıldığında ise IL-1 β mRNA ekspresyonunun yaklaşık %75 oranında azaldığı gözlenmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4. 25).



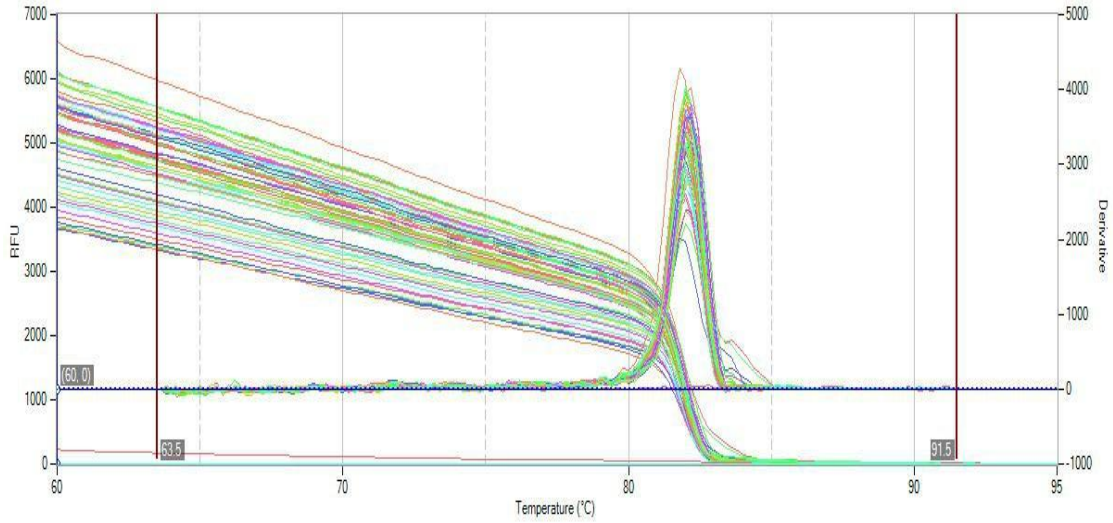
Şekil 4.25. KBY’de adropin ve speksinin IL-1 β gen ekspresyon düzeylerine etkisi. KBY grubu ile KBY+Adropin+Speksin grupları kıyaslandığında $+p < 0,05$, ortalama \pm standart sapma, $n=5$.

4.1.17. KBY’de adropin ve speksinin TGF- β gen ekspresyon düzeylerine etkisi

Böbrek dokusunda TGF- β gen ekspresyon düzeyleri Real Time PCR ile belirlenmiştir. Örneklere göre Cq değerleri ve melt curve grafiği Şekil 4. 26 ve Şekil 4. 27’de gösterilmiştir.

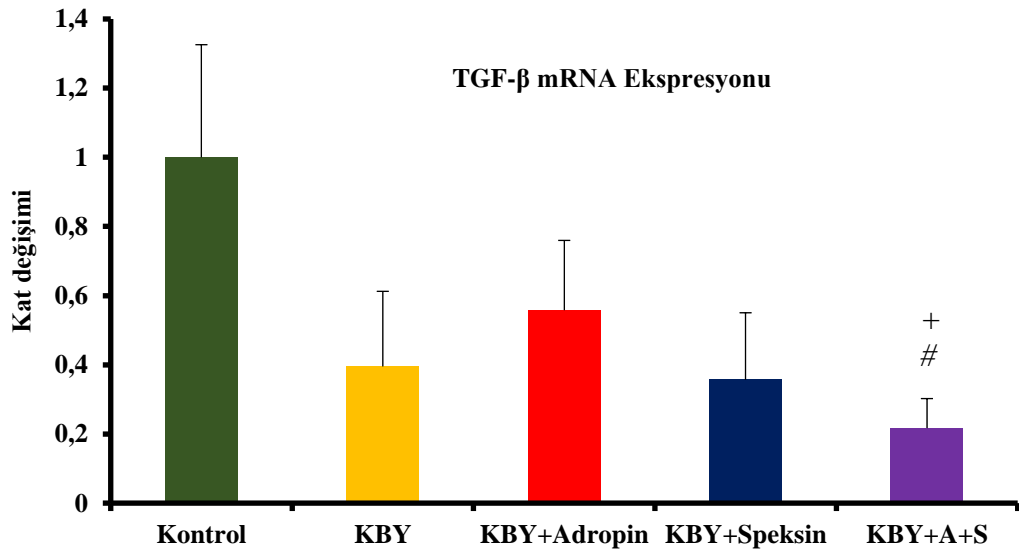


Şekil 4.26. Böbrek dokusunda TGF- β genine ait Cq sonuçları



Şekil 4.27. TGF- β genine ait Melting Curve analiz sonuçları

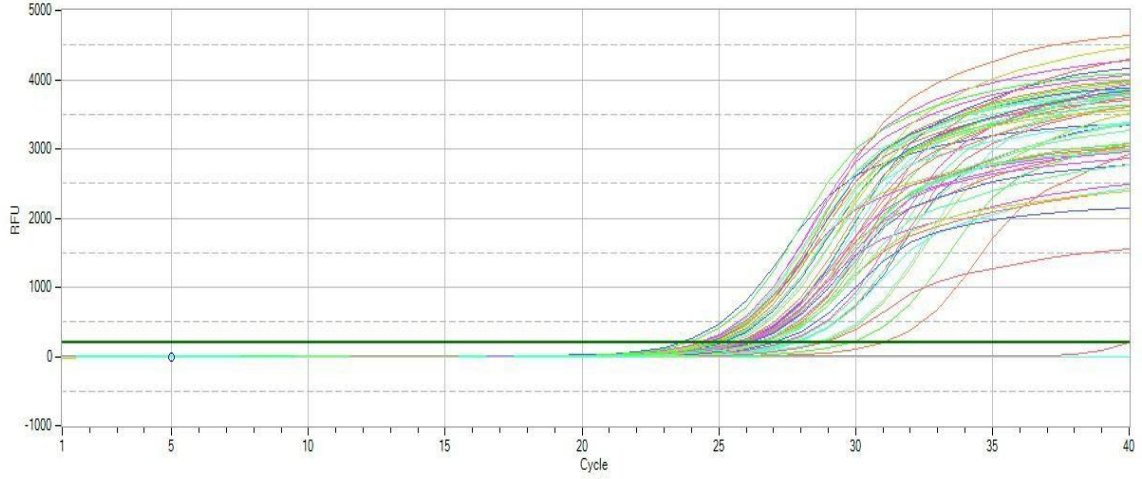
Kontrol ve KBY grubu karşılaştırıldığında KBY grubunda TGF- β mRNA ekspresyonunda anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Benzer olarak KBY grubu ile KBY+Adropin ve KBY+Speksin grubu karşılaştırıldığında da anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Ancak KBY grubu ile KBY+Adropin+Speksin grubu karşılaştırıldığında TGF- β mRNA ekspresyonlarında anlamlı bir azalış gözlenmiştir ($p < 0,05$). Bunun yanında KBY+Adropin ve KBY+Adropin+Speksin grubu karşılaştırıldığında da TGF- β mRNA ekspresyonunun yaklaşık yarı yarıya azaldığı gözlenmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4. 28).



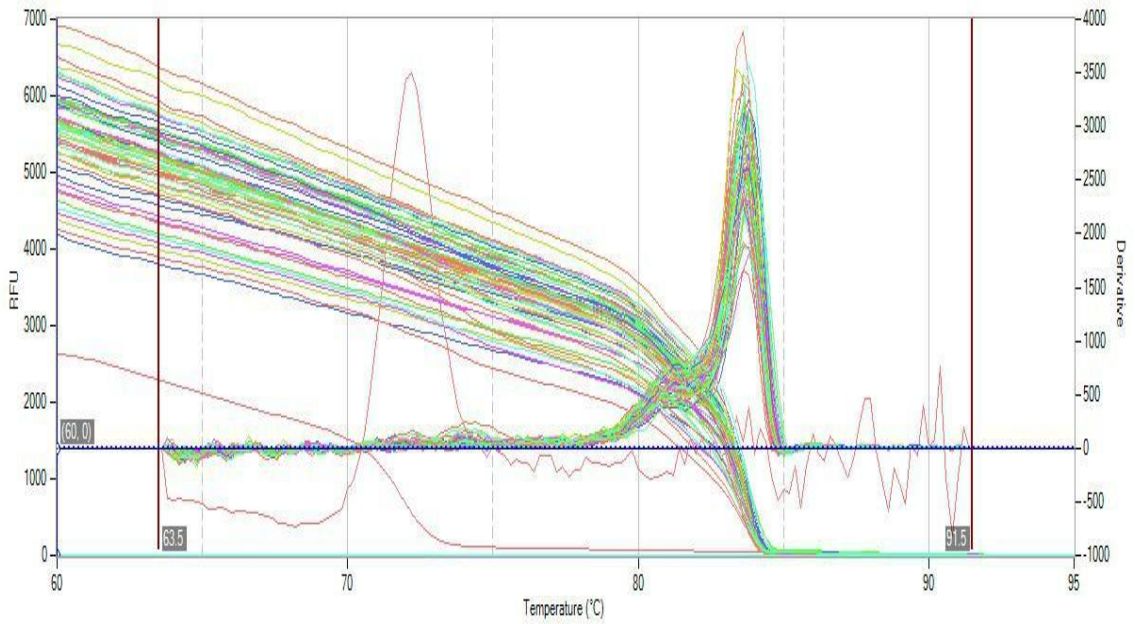
Şekil 4.28. KBY’de adropin ve speksinin TGF- β gen ekspresyon düzeylerine etkisi. KBY grubu ile KBY+Adropin+Speksin grupları kıyaslandığında $+p < 0,05$, KBY + Adropin ile KBY+Adropin+Speksin grupları kıyaslandığında $\#p < 0,05$, ortalama \pm standart sapma, $n=5$.

4.1.18. KBY’de adropin ve speksinin IL-10 gen ekspresyon düzeylerine etkisi

Böbrek dokusunda IL-10 gen ekspresyon düzeyleri Real Time PCR ile belirlenmiştir. Örneklere göre Cq değerleri ve melt curve grafiği Şekil 4.29 ve Şekil 4.30’da gösterilmiştir.

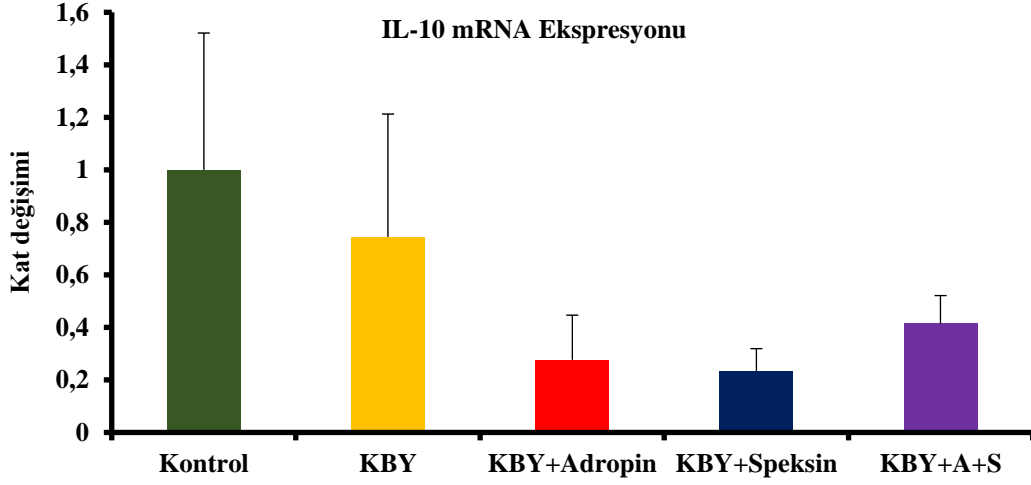


Şekil 4.29. Böbrek dokusunda IL-10 genine ait Cq sonuçları



Şekil 4.30. IL-10 genine ait Melting Curve analiz sonuçları

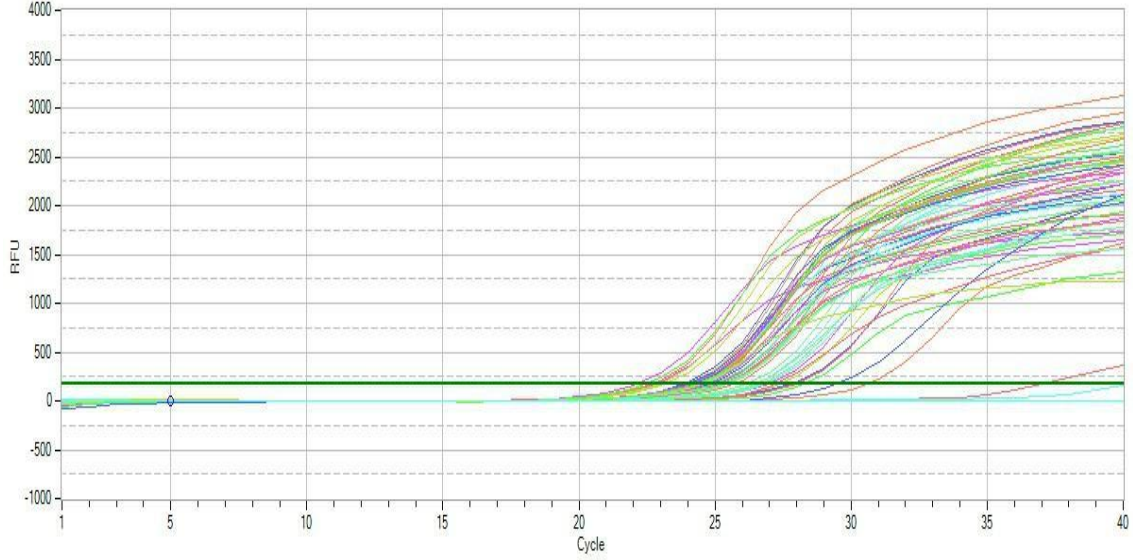
Kontrol ve KBY grubu karşılaştırıldığında IL-10 mRNA ekspresyonlarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. KBY grubu ile KBY+Adropin, KBY+Speksin ve KBY+ Adropin + Speksin grupları karşılaştırıldığında IL-10 mRNA ekspresyonlarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4. 31).



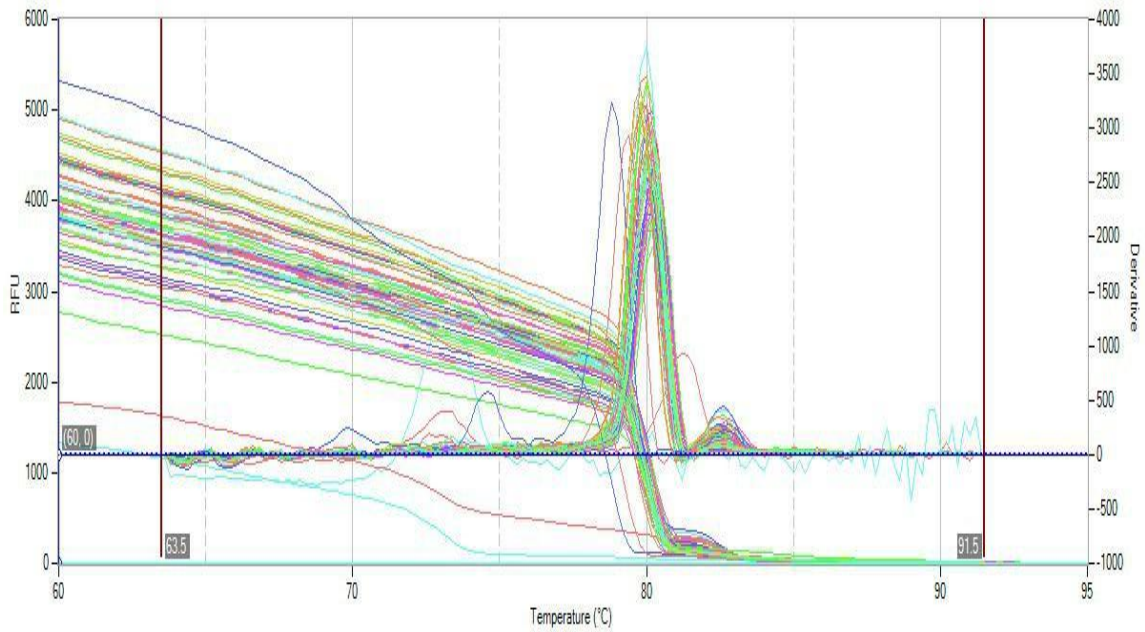
Şekil 4.31. KBY’de adropin ve speksinin IL-10 gen ekspresyon düzeylerine etkisi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır, $p > 0,05$, ortalama \pm standart sapma, $n=5$.

4.1.19. KBY'de adropin ve speksinin IL-17A gen ekspresyon düzeylerine etkisi

Böbrek dokusunda IL-17A gen ekspresyon düzeyleri Real Time PCR ile belirlenmiştir. Örneklere göre Cq değerleri ve melt curve grafiği Şekil 4. 32 ve Şekil 4. 33'de gösterilmiştir.

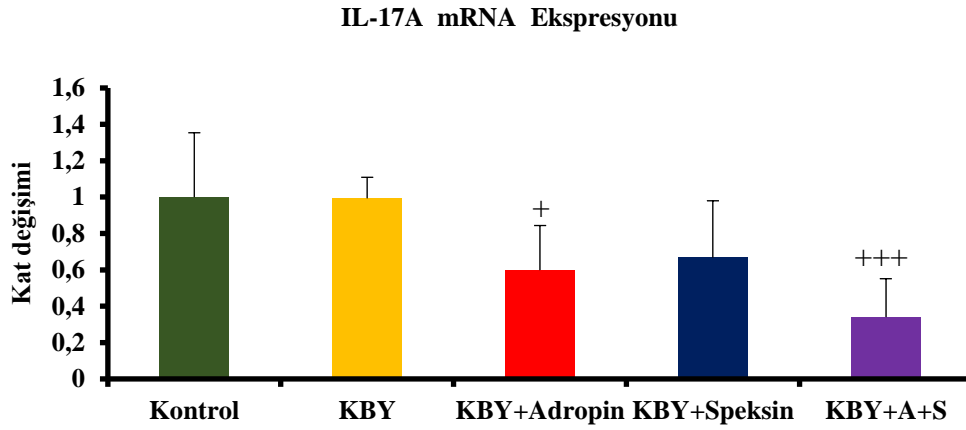


Şekil 4.32. Böbrek dokusunda IL-17A genine ait Cq sonuçları



Şekil 4.33. IL-17A genine ait Melting Curve analiz sonuçları

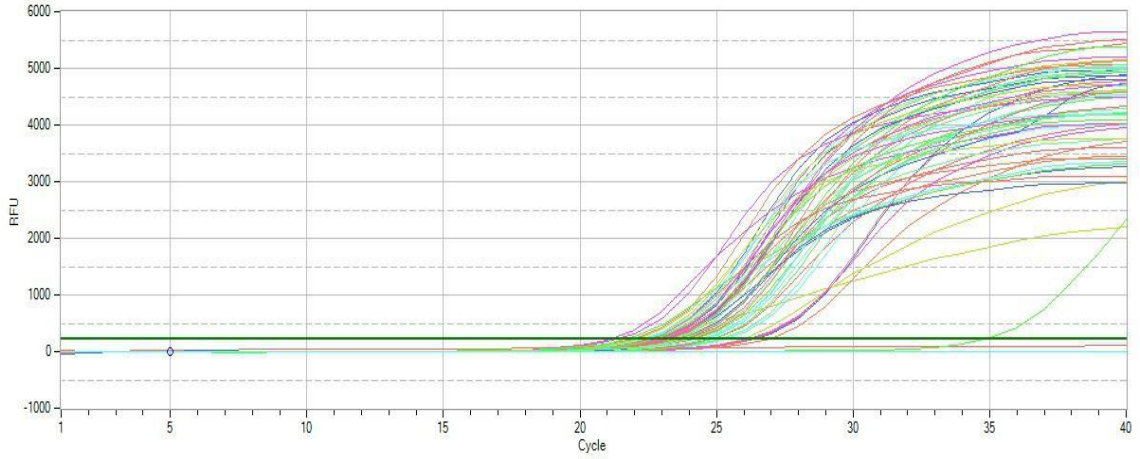
Kontrol ve KBY grubu karşılaştırıldığında IL-17A mRNA ekspresyonlarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Benzer olarak KBY grubu ile KBY+Speksin grubu karşılaştırıldığında IL-17A mRNA ekspresyonlarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Ancak KBY grubu ile KBY+Adropin grubu karşılaştırıldığında %40 oranında ($p < 0,05$) ve KBY grubu ile KBY+Adropin+Speksin grubu karşılaştırıldığında ise IL-17A mRNA ekspresyonlarının yaklaşık %65 civarında azaldığı gözlenmiştir ($p < 0,001$) (Şekil 4. 34).



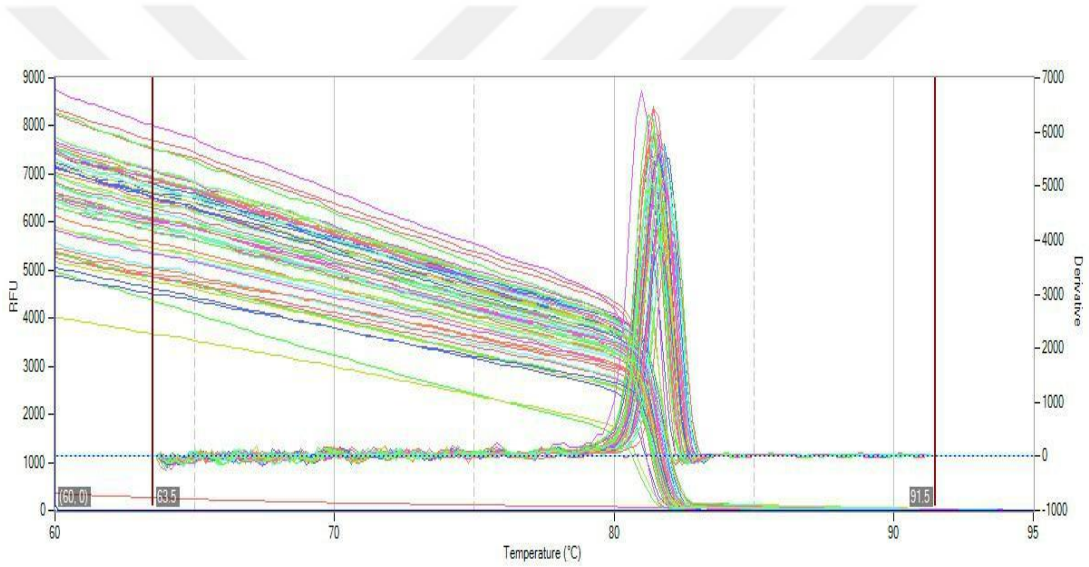
Şekil 4.34. KBY’de adropin ve speksin IL-17A gen ekspresyon düzeylerine etkisi. KBY grubu ile KBY+Adropin ve KBY+Adropin+Speksin grupları kıyaslandığında $+p < 0,05$ ve $+++p < 0,001$, ortalama \pm standart sapma, $n=5$.

4.1.20. KBY’de adropin ve speksinin IL-18 gen ekspresyon düzeylerine etkisi

Böbrek dokusunda IL-18 gen ekspresyon düzeyleri Real Time PCR ile belirlenmiştir. Örneklere göre Cq değerleri ve melt curve grafiği Şekil 4. 35 ve Şekil 4. 36’da gösterilmiştir.

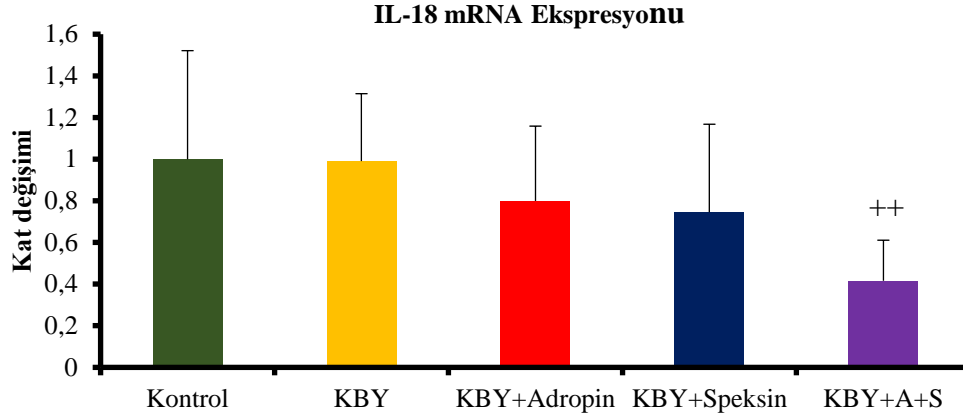


Şekil 4.35. Böbrek dokusunda IL-18 genine ait Cq sonuçları



Şekil 4.36. IL-18 genine ait Melting Curve analiz sonuçları

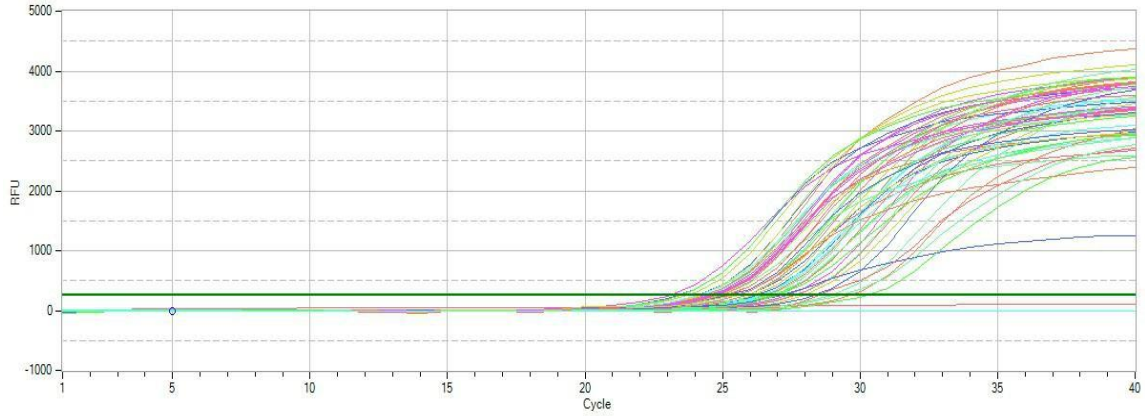
Kontrol ve KBY grubu karşılaştırıldığında IL-18 mRNA ekspresyonlarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Benzer olarak KBY grubu ile KBY+Speksin ve KBY+Adropin grubu karşılaştırıldığında IL-18 mRNA ekspresyonlarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Ancak KBY grubu ile KBY+Adropin+Speksin grubu karşılaştırıldığında ise IL-18 mRNA ekspresyonunun %50 oranında anlamlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir ($p < 0,01$) (Şekil 4.37).



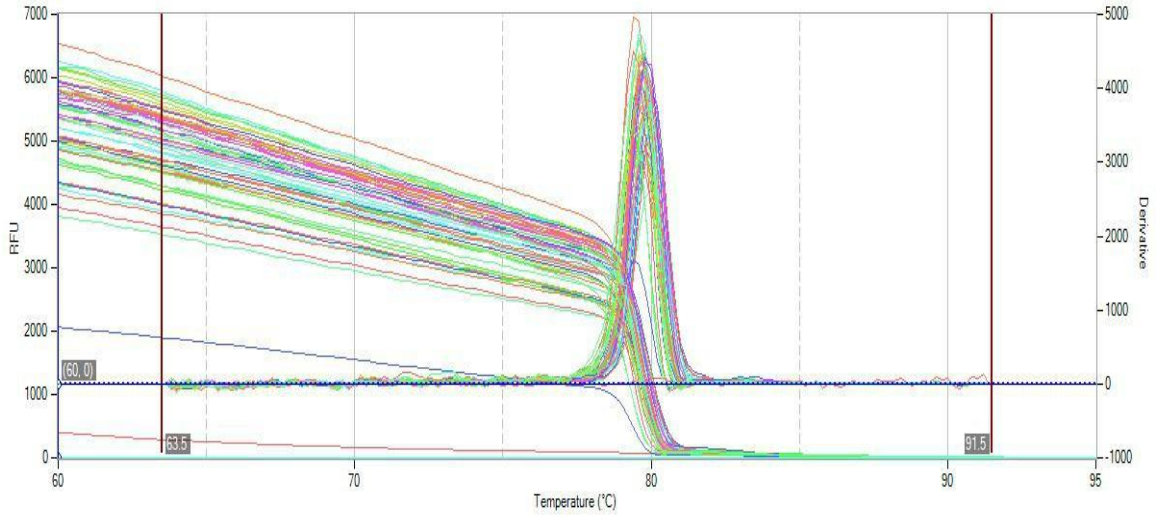
Şekil 4.37. KBY’de adropin ve speksin IL-18 gen ekspresyon düzeylerine etkisi. KBY grubu ile KBY+Adropin+Speksin grupları kıyaslandığında ++ $p < 0,01$, ortalama \pm standart sapma, n=5.

4.1.21. KBY’de adropin ve speksinin IL-21 gen ekspresyon düzeylerine etkisi

Böbrek dokusunda IL-21 gen ekspresyon düzeyleri Real Time PCR ile belirlenmiştir. Örneklere göre Cq değerleri ve melt curve grafiği Şekil 4. 38 ve Şekil 4. 39’da gösterilmiştir.

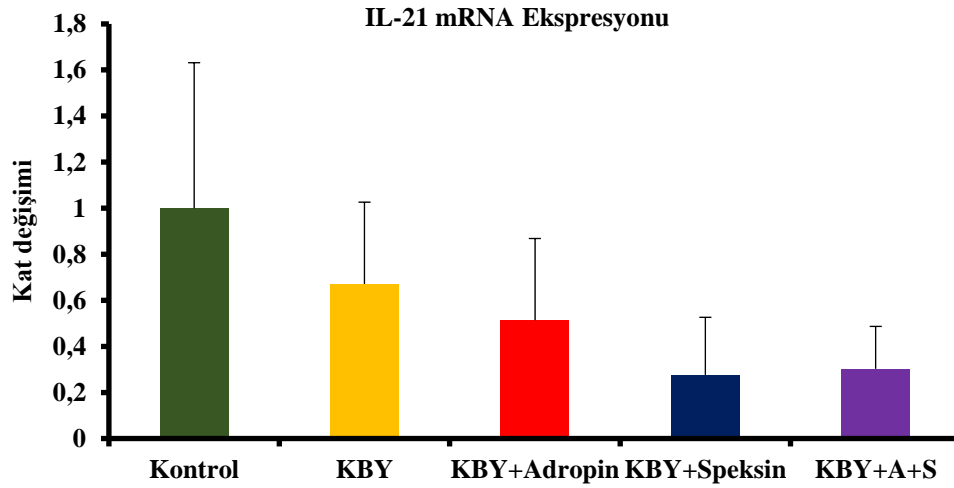


Şekil 4.38. Böbrek dokusunda IL-21 genine ait Cq değerleri sonuçları



Şekil 4.39. IL-21 genine ait Melting Curve analiz sonuçları

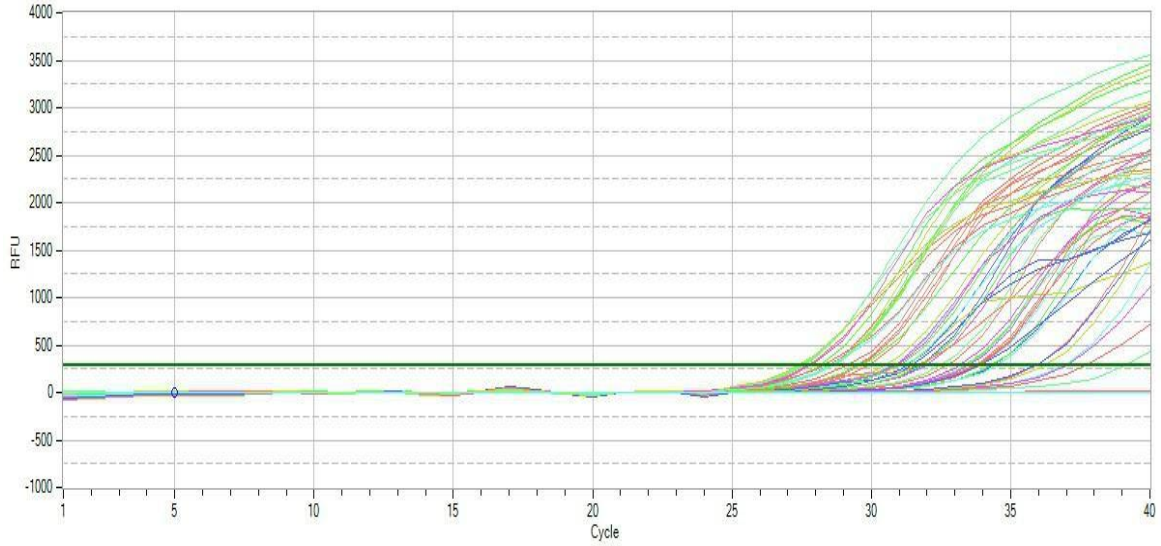
Kontrol ve KBY grubu karşılaştırıldığında IL-21 mRNA ekspresyonlarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Benzer olarak KBY grubu ile KBY+Adropin, KBY+Speksin ve KBY+Adropin+Speksin grupları karşılaştırıldığında IL-21 mRNA ekspresyonlarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4. 40).



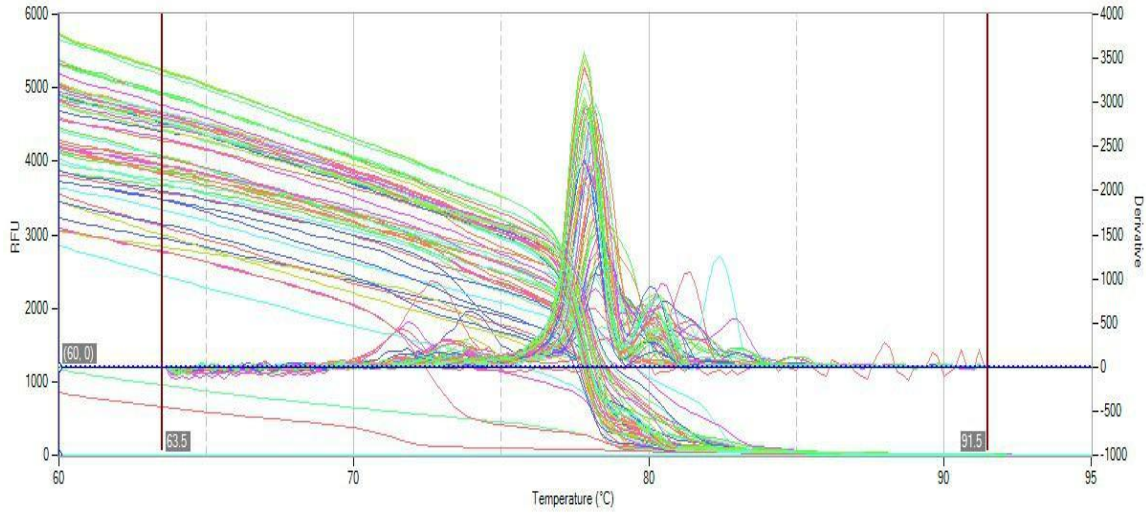
Şekil 4.40. KBY’de adropin ve speksinin IL-21 gen ekspresyon düzeylerine etkisi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır, $p>0,05$, ortalama \pm standart sapma, $n=5$.

4.1.22. KBY’de adropin ve speksinin IL-33 gen ekspresyon düzeylerine etkisi

Böbrek dokusunda IL-33 gen ekspresyon düzeyleri Real Time PCR ile belirlenmiştir. Örneklere göre Cq değerleri ve melt curve grafiği Şekil 4. 41 ve Şekil 4. 42’de gösterilmiştir.



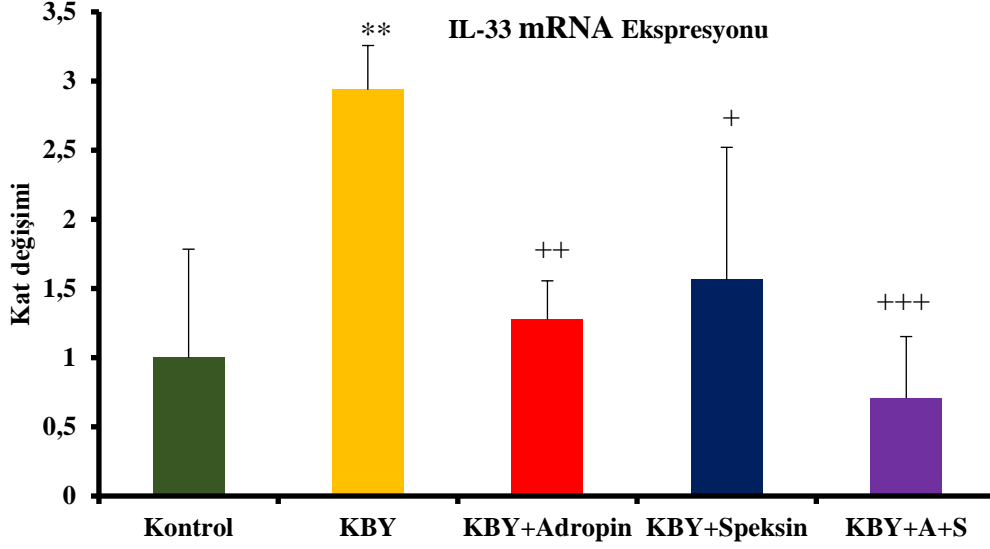
Şekil 4.41. Böbrek dokusunda IL-33 genine ait Cq sonuçları



Şekil 4.42. IL-33 genine ait Melting Curve analiz sonuçları

Kontrol ve KBY grubu karşılaştırıldığında KBY grubunda IL-33 mRNA ekspresyonunun anlamlı bir şekilde yaklaşık olarak 3 kat artış gösterdiği bulunmuştur ($p < 0,01$). Ancak KBY grubu ile KBY+Adropin grubu karşılaştırıldığında %60 ($p < 0,01$), KBY+Speksin grubu ile karşılaştırıldığında %50 ($p < 0,05$) ve KBY+Adropin+Speksin grubu

ile karşılaştırıldığında IL-33 mRNA ekspresyonunun yaklaşık olarak %75 oranında azaldığı gözlenmiştir ($p < 0,001$) (Şekil 4.43).



Şekil 4.43. KBY’de adropin ve speksinin IL-33 gen ekspresyon düzeylerine etkisi. Kontrol grubu ve KBY grubu kıyaslandığında $**p < 0,01$, KBY grubu ile KBY +Adropin, KBY+Speksin ve KBY+Adropin+Speksin grubu kıyaslandığında ise $+p < 0,05$, $++p < 0,01$ ve $+++p < 0,001$, ortalama \pm standart sapma, $n=5$.

5. TARTIŞMA

Kronik böbrek yetmezliği GFH'de azalma sonucu böbreğin sıvı-solüt dengesini ayarlama ve metabolik-endokrin fonksiyonlarında kronik ve ilerleyici bozulma hali olarak tanımlanabilir. Kronik böbrek yetmezliği, kardiyovasküler hastalık ve erken ölüm gibi olumsuz sonuçlara yol açan dünya çapında bir halk sağlığı sorunudur [11]. Türk Nefroloji Derneği (TND), KBY'yi morbidite ve mortalitesi yüksek olan, yaşam kalitesini olumsuz etkileyen ve büyük ekonomik yük getiren bir durum olduğu için Türkiye'nin büyük sorunu olarak tanımlamıştır. Sağlık Bakanlığı ve Türk Nefroloji Derneği ortak raporuna (2017) göre Türkiye'de 77,311 kronik böbrek yetmezliği hastasının olduğu, bu hastaların 58,635'inin hemodiyaliz (HD), 3346'sının periton diyalizi (PD), 15,330'unun böbrek transplantasyon (Böbrek Tx) gibi renal replasman tedavisi aldığı ve bu sayının gittikçe arttığı belirtilmiştir [2]. Renal hasarın saptanmasında en yaygın kullanılan gösterge albüminüri veya proteinüri'dir [1]. Proteinüri, direkt tübüler toksisiteye neden olmaktadır. Proksimal tübülde aşırı protein reabsorpsiyonu lizozomal işleme kapasitesini aşarak, lizozomal rüptüre yol açabilir ve doğrudan tübüler toksisiteye neden olabilir [18]. Oluşan toksisite glomeruloskleroz, tübüler nekroz ve tübüler dilatasyon gibi durumlara sebep olabilmektedir. Normal koşullarda günlük albümin atılımı 30 mg'ın, protein atılımı ise 150 mg'ın altındadır. Bu durumun üç aydan daha uzun sürmesi böbrek hasarının göstergesi olarak kabul edilir [3]. Klinik uygulamada albüminüri veya proteinüri, sabah ilk idrarda albümin/kreatinin veya protein/kreatinin oranı ile basit ve doğruya oldukça yakın bir şekilde belirlenebilir. Bunun yanında 24 saatlik idrar hacmi ve BUN miktarında böbrek hasarı hakkında fikir vermektedir.

Çalışmamızda, sıçanlarda adenin ile indüklenen kronik böbrek yetmezliği modelinde böbrek hasarının inflamatuvar gen ekspresyonları üzerine nasıl etki ettiği, speksin ve adropin peptitlerinin bu etki üzerindeki rolünün araştırılması planlanmıştır. Sıçanlara adenin uygulanması sonrasında renal fonksiyon testleri otoanalizör ile ölçülerek KBY gelişimi değerlendirilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında KBY grubunda 24 saatlik idrar hacminin 6 kat, BUN miktarının 2,5 kat, kreatinin klirensinin 20 kat, idrar proteininin 2 kat ve protein/kreatinin oranının 9 kat arttığı gözlenmiştir. Bunun yanında idrar kreatinin miktarının KBY grubunda önemli oranda azaldığı gözlenirken serum kreatinin seviyelerinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Rutinde kullanılan renal fonksiyon testlerin yanında sistatin c, KIM-1, NGAL ve TIMP-1 gibi biyobelirteçlerin renal hasar hakkında fikir verebileceği belirtilmektedir.

Takaharu ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada, KIM-1 proteininin böbrek hasarında insan ve kemirgen epitelyum hücrelerinde eksprese edildiğini, KIM-1'in aracılık ettiği apoptotik hücrelerin fagositozunu sağladığı ve KIM-1 seviyelerinin böbrek hasarında arttığını belirtmişlerdir [90]. Yapılan başka bir çalışmada Musial ve Zwolińska, TIMP-1 konsantrasyonlarının evre 2-3 KBY olan çocuklarda değişmeden kaldığını, ancak evre 4-5 KBY olan çocuklarda ise TIMP-1 seviyesinin kontrol grubuna göre önemli oranda arttığını göstermişlerdir [91]. Bunun yanında diğer belirteç olan NGAL'de KBY gelişimi ile artış göstermektedir. Devarajan yaptığı çalışmada NGAL seviyelerinin KBY hastalarında kontrol grubuna kıyasla önemli derecede arttığını göstermiş ve NGAL'in böbrek hasarını yansıtan önemli bir belirteç olduğunu bildirmiştir [92].

Çalışmamızda, adenin uygulanması sonrasında böbrek dokusunda oluşan histopatolojik değişimler hematoksilen-eozin boyama sonrasında ışık mikroskopisi ile değerlendirilmiştir. Kontrol grubundaki sıçanların böbrekleri hematoksilen-eozin boyama ile incelendiğinde herhangi bir patolojik değişikliğin olmadığı normal glomerüler yapılar ve uniform tübüller gözlenirken KBY grubunda glomerüler şişkinlik, glomerüler hipertrofi, tübüller dilatasyon ve tübüller nekroz gibi patolojik değişiklikler gözlenmiştir. Bunun yanında kantitatif olarak hesaplanan tübüller nekroz indeksinin KBY grubunda kontrol grubuna göre önemli düzeyde artış gösterdiği bulunmuştur. Böbrekteki patolojik değerlendirmenin doğrulanması için böbrek hasar belirteçleri olan KIM-1, NGAL ve TIMP-1 mRNA ekspresyonları real time PCR ile ölçülmüştür. Kontrol grubu ile KBY grubu karşılaştırıldığında KIM-1 ve NGAL mRNA ekspresyonlarında anlamlı bir değişim gözlenmezken, TIMP-1 mRNA ekspresyonunun KBY grubunda 7 katlık bir artış gösterdiği bulunmuştur. Bu sonuçlar adenin uygulanmasının böbrek dokusu üzerinde hasara sebep olarak KBY gelişimini indüklediğini göstermektedir.

İnflamasyon, KBY'de sonucu tahmin edilen yaygın bir özelliktir. KBY sürecinde kronik inflamasyon, hem renal klirensin azalması hem de artmış sitokin üretiminin neden olduğu pro-inflamatuvar sitokinlerin plazma seviyelerinde bir artış olarak tanımlanabilir. CRP, IL-1, IL-6 ve TNF- α düzeyleri inflamasyonun göstergesi olarak sıkça kullanılmaktadır. İnflamatuvar yanıt, sürecin baskılanmasının gerçekleşmediği veya gecikmesi ile dokuda pro-inflamatuvar mediyatörlerin IL-1, IL-6, TNF- α birikimine ve doku hasarına neden olmaktadır [32]. Bu süreçte IL-4, IL-10 ve TGF- β gibi anti-inflamatuvar sitokinlerin ise azaldığı düşünülmektedir [37]. Yapılan çalışmalarda kronik böbrek yetmezliği modelinde IL-10 eksikliğinin böbrekte inflamasyonu ve fibroz gelişimini

şiddetlendirdiğini, ortamda IL-10'un artmasının ise inflamasyonun baskılanarak böbrek fonksiyonları üzerine iyileştirici etkiye sahip olduğu bildirilmiştir [93]. Bunun aksine Gauer ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada kronik böbrek hastalığı veya nefrotik sendromu olan insanlarda IL-18 seviyesinin önemli düzeyde arttığını göstermişlerdir [94]. Benzer olarak Homsı ve arkadaşları kronik böbrek hastalığı olan kişilerde IL-1 β ve IL-18 seviyelerinin sağlıklı kişilere kıyasla önemli oranda arttığını bulmuşlardır [95]. Ayrıca Pawlak ve arkadaşları, hemodiyaliz hastalarında IL-21 konsantrasyonlarında anlamlı bir değişim gözlemezken, IL-6 ve TNF- α miktarlarının kontrol grubuna kıyasla önemli derecede yüksek olduğunu bulmuşlardır [96]. Bir diğer sitokin olan IL-17 üzerine yapılan bir çalışmada, böbrek hasarında glomerüllerde ve tübülo interstitiumda çok sayıda IL-17 eksprese eden IL-17 (+) hücre tespit etmişlerdir ve IL-17 seviyelerinin böbrek hasarıyla birlikte artış gösterdiğini belirtmişlerdir [97]. Bunun yanında Güngör ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada, KBY'li hastalarda IL-33 seviyesinin kontrol grubuna göre kıyasla daha yüksek olduğunu göstermişlerdir [98].

Çalışmamızda, KBY gelişiminin belirlenmesinden sonra inflamatuvar süreçle ilişkili genler olan IL-1 β , IL-10, IL-17-A, IL-18, IL-21, IL-33, TNF- α ve TGF- β 'nin mRNA ekspresyonları real time PCR ile ölçülmüştür. Kontrol grubu ile KBY grubu karşılaştırıldığında IL-1 β , IL-10, IL-17-A, IL-18, IL-21, TNF- α ve TGF- β mRNA ekspresyonlarında anlamlı bir değişim gözlenmezken, IL-33 mRNA ekspresyonunun KBY grubunda yaklaşık olarak 3 kat arttığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar özellikle adeninin indüklediği KBY gelişiminin renal fibrozda önemli bir rol oynayan IL-33 üzerinden gerçekleşebileceğini göstermektedir.

Kumar ve arkadaşları tarafından 2008 yılında tanımlanan adropin beyin, kalp, karaciğer, böbrek ve gastrointestinal sistem gibi birçok dokuda üretilen bir peptittir ve bu peptid ENHO geni tarafından kodlanmaktadır [72]. Bu peptit hedef dokularda GPR19 aktivasyonuna yol açarak enerji balansı, protein, lipid ve karbonhidrat metabolizmasının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır [73-75]. Özellikle birçok çalışma düşük adropin seviyelerinin kardiyovasküler hastalıklar, KBY, diyabet ve diyabetik nefropati gibi hastalıkların patogeneğinde etkili olduğunu göstermektedir. Adropinin özellikle aterogenez ve kardiyovasküler hastalıklarda da koruyucu etkisinin olduğu düşünülmektedir [76, 77]. Adropinin işlevleri üzerine yapılan çalışmalar genellikle metabolik bozukluklar ve kardiyovasküler hastalıklar üzerinde yoğunlaşmıştır [72]. Özellikle adropin VEGFR2 ve PI3K/AKT ve ERK 1/2 aktivasyonuna yol açmaktadır. Bu sayede adropin eNOS'un

ekspresyonunu arttırarak kariyovasküler sistemin korunmasını sağlamaktadır [99]. Yapılan bazı çalışmalarda, adropin seviyeleri ile BUN ve serum kreatin seviyeleri negatif korelasyon gösterirken GFH ile pozitif korelasyon göstermektedir [100, 101]. Bunun yanında adropin inflamatuvar yanıtı etkilediği belirtilmektedir, ancak bu konuda sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Satove arkadaşları yapmış oldukları çalışmada adropin tedavisinin insan umbilikal ven endotel hücrelerinde TNF- α 'nın aktive ettiği THP1 monosit adezyonunu baskılayarak anti-inflamatuvar bir etki gösterdiğini bulmuşlardır [102]. Yapılan başka bir çalışmada İbrahim ve arkadaşları diyabetik nefropatirat modelinde serum adropin seviyelerinin inflamatuvar markerlar olan IL-6 ve TNF- α ile negatif korelasyona sahip olduğunu göstermişlerdir [103]. Benzer olarak Gao ve arkadaşları AdrKO farelerde oluşturulan adropin yoksunluğunun IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-33 ve TNF- α gibi sitokinlerin üretimini arttırmaya sebep olduğunu göstermişlerdir [104].

Çalışmamızda, KBY sürecinde adropin uygulanmasının böbrek hasarı ve inflamatuvar genleri nasıl etkilediği değerlendirilmiştir. 4 hafta boyunca adropin uygulanması sonucunda KBY grubuna göre 24 saatlik idrar hacminin önemli oranda azaldığı gözlenmiştir. Ancak diğer renal fonksiyon testleri olan BUN, idrar kreatinin, serum kreatinin, kreatinin klirensi, idrar proteini ve protein/kreatinin oranında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir. Böbrek dokusunda patolojik değişiklikler incelendiğinde adropin uygulanmasının tübüler nekroz indeksini KBY grubuna kıyasla önemli düzeyde azalttığı bulunmuştur. Bunun yanında böbrek hasar belirteçlerinden NGAL ve TIPM-1 gen ekspresyon düzeyleri KBY grubuna kıyasla önemli oranda azalırken, KIM-1 gen ekspresyonunda anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bu sonuçlar adropin uygulanmasının böbrek hasarında koruyucu bir role sahip olduğunu işaret etmektedir. Böbrek hasarındaki koruyucu etkinin inflamatuvar süreç ile ilişkisi değerlendirildiğinde IL-17A ve IL-33 gen ekspresyonlarının KBY grubuna kıyasla adropin uygulanmasıyla önemli oranda azaldığı gözlenirken, diğer inflamatuvar genler olan IL-1 β , IL-10, IL-18, IL-21, TNF- α ve TGF- β seviyelerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.

Enerji homeostazında rol oynadığı düşünülen ve Nöropeptid Q olarak da bilinen speksin 14 amino asitten oluşan bir nöropeptiddir. Speksin adrenal bezler, serebral korteks, retina, mide, böbrek, pankreas, plasenta, yumurtalıklar ve hipotalamus olmak üzere birçok dokuda eksprese edilmektedir [80]. Speksin hedef hücrelerde etkilerini Galanin 2 ve 3 (GALR2/3) reseptörlerini aktive ederek göstermektedir [82]. Speksin peptidi enerji dengesi, yağ asidi alımı, glukoz ve lipit metabolizmasının modülasyonunu sağlamaktadır [82]. Bunun

yanında yapılan çalışmalar, speksinin intestinal düz kas hücrelerinin kasılmasını uyararak bağırsak hareketliliğini artırmak, adrenokortikal hücre proliferasyonunu inhibe etmek, ağrı duyarlılığını azaltmak, renal/kardiyovasküler fonksiyonları düzenlemek, iştah kontrolü, üreme ve gastrointestinal fonksiyonunu düzenlenmek gibi olası etkilere sahip olduğunu ortaya koymaktadır [83-86]. Yapılan çalışmalar birçok hastalığın patogenezinde speksin hormonunun miktarında önemli değişiklikler olduğunu göstermektedir. Gu ve arkadaşları speksinin tip 2 diyabet hastalarında glukoz ve lipit metabolizmasında önemli bir role sahip olabileceğini ileri sürmüştür [105]. Speksinin hem KBY hem de inflamasyon üzerine olan etkileriyle ilgili literatürde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Toll ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada speksinin intra serebro ventriküler olarak uygulanmasının idrar oluşumunu azalttığını ve böbrek hasarında koruyucu olabileceğini belirtmişlerdir [85]. Fruktoz ile oluşturulan obezite modelinde farelerin epididimal adipoz dokusunda TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi pro-inflamatuvar sitokin düzeylerinin on haftalık speksin enjeksiyonu sonrasında obezite grubuna oranla önemli oranda azalış gösterdiği bildirilmiştir [87]. Benzer şekilde yüksek yağlı diyetle böbrek hasarı oluşturulmuş sıçanlarda speksin enjeksiyonunun böbrek dokusunda NF-KB düzeylerini azalttığı ve bu azalmanın GALR2 üzerinden gerçekleştiği belirtilmiştir [88]. Kumar ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada obezite gelişiminde speksin miktarının azalarak IL-6 ile negatif korelasyona sahip olduğunu göstermiştir [106]. Başka bir çalışmada benzer olarak obezite gelişiminde speksin seviyelerinin azaldığı ve inflamatuvar bir belirteç olan hs-CRP ile negatif korelasyona sahip olduğu gösterilmiştir [107]. Behrooz ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada obez çocuklarda IL-10, IL-1 β ve hs-CRP seviyelerinin speksin düzeyleri yakından ilişkili olduğunu belirtmişlerdir [108].

Çalışmamızda, KBY sürecinde speksin uygulanmasının böbrek hasarı ve inflamatuvar genleri nasıl etkilediği değerlendirilmiştir. 4 hafta boyunca speksin uygulanması sonucunda KBY grubuna göre idrar kreatinin miktarının önemli oranda azaldığı gözlenmiştir. Ancak diğer renal fonksiyon testleri olan 24 saatlik idrar hacmi, BUN, serum kreatinin, kreatinin klirensi, idrar proteini ve protein/kreatinin oranında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Böbrek dokusunda patolojik değişiklikler incelendiğinde speksin uygulanmasının tübüler nekroz indeksinde KBY grubuna kıyasla anlamlı bir farka neden olmadığı bulunmuştur. Bununla beraber böbrek hasar belirteçleri değerlendirildiğinde KIM-1 ve TIMP-1 gen ekspresyon düzeylerinin KBY grubuna kıyasla önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur, ancak NGAL gen ekspresyonunda KBY grubuna kıyasla anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu sonuçlar

speksinin renal hasarda koruyucu etkilerinin olabileceğine işaret etmektedir. Böbrek hasarındaki koruyucu etkinin inflamatuvar süreç ile ilişkisi değerlendirildiğinde IL-17A ve IL-33 gen ekspresyonlarının KBY grubuna kıyasla speksin uygulanmasıyla önemli oranda azaldığı gözlenirken, diğer inflamatuvar genler olan IL-1 β , IL-10, IL-18, IL-21, TNF- α ve TGF- β seviyelerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.

Buna ek olarak bu iki peptidin KBY sürecinde kombine olarak uygulanmasının böbrek hasarı ve inflamatuvar genleri nasıl etkilediği değerlendirilmiştir. 4 hafta boyunca kombine olarak adropin+speksin uygulanmasının KBY grubuna göre idrar kreatinin ve idrar protein miktarlarının önemli oranda azaldığı gözlenmiştir. Böbrek dokusunda patolojik değişiklikler incelendiğinde adropin+speksin uygulanmasının tübüler nekroz indeksini KBY grubuna kıyasla önemli düzeyde azalttığı bulunmuştur. Bunun yanında böbrek hasar belirteçleri değerlendirildiğinde KIM-1, NGAL ve TIMP-1 gen ekspresyonlarının KBY grubuna kıyasla adropin+speksin uygulanmasıyla önemli oranda azaldığı bulunmuştur. Bu sonuçlar adropin+speksin uygulanmasının renal hasarda koruyucu bir role sahip olduğunu göstermektedir. Böbrek hasarındaki koruyucu etkinin inflamatuvar süreç ile ilişkisi değerlendirildiğinde IL-1 β , IL-17-A, IL-18, IL-33, TNF- α ve TGF- β gen ekspresyonlarının KBY grubuna kıyasla adropin+speksin uygulanmasıyla önemli oranda azaldığı gözlenirken, diğer inflamatuvar genler olan IL-10 ve IL-21 seviyelerinde anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu sonuçlar özellikle adropin ve speksin peptitlerinin kombine olarak uygulandığında önemli düzeyde anti inflamatuvar etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİ

Yapmış olduğumuz çalışmada elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda; Böbrek yetmezliği gelişimi ile artış gösteren hasar genleri ve tübüler hasar, adropin ve speksin peptitlerinin uygulanması ile azalmıştır. Bunun yanında KBY gelişimi ile artan pro-inflamatuvar gen ekspresyonları adropin ve speksin uygulanması ile azalmıştır. Bu bulgular adropin ve speksin peptitlerinin anti-inflamatuvar etkileriyle kronik böbrek yetmezliği sürecinde böbrek hasarına karşı koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermektedir.



KAYNAKLAR

1. Yürügen, B., Gökdoğan, F. ve Nural N. (2015). *Diyaliz Teknikerleri için Diyaliz El Kitabı*. İstanbul: Akademisyen Yayınevi.
2. Türk Nefroloji Derneği, (2017). Yıllık Rapor.
3. Tamura, M. K., Tam, K., Vittinghoff, E., Raj, D., Sozio, S. M., Rosas, S. E., Makos, G., Lora, C., He, J., Go, A.S. and Hsu, C. Y. (2017). Inflammatory Markers and Risk for Cognitive Decline in Chronic Kidney Disease. *Kidney International Reports*, 2(2), 192-200.
4. Won, A. J., Kim, S., Kim, Y. G., Kim, K. B., Choi, W. S., Kacew, S., Kim, K.S., Jung, J.H., Lee, B.M., Kim, S. and Kim, H. S. (2016). Discovery of Urinary Metabolomic Biomarkers for Early Detection of Acute Kidney Injury. *Molecular Biosystems*, 12(1), 133-144.
5. Walewski, J. L., Ge, F., Lobdell IV, H., Levin, N., Schwartz, G. J., Vasselli, J. R., Pomp, A., Dakin, G. and Berk, P. D. (2014). Spexin is a Novel Human Peptide that Reduces Adipocyte Uptake of Long Chain Fatty Acids and Causes Weight Loss in Rodents with Diet-Induced Obesity. *Obesity*, 22(7), 1643-1652.
6. Ma, A., Bai, J., He, M. and Wong A. O. L. (2018). Spexin as a Neuro Endocrine Signal with Emerging Functions. *General and Comparative Endocrinology*, 265, 90-96.
7. Porzionato, A., Rucinski, M., Macchi, V., Stecco, C., Malendowicz, L. K. and De Caro, R. (2010). Spexin Expression in Normal Rat Tissues. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 58(9), 825–837.
8. Kumar, K. G., Trevaskis, J. L., Lam, D. D., Sutton, G. M., Koza, R. A., Chouljenko, V. N., Kousoulas, K. G., Rogers, P. M., Kesterson, R. A., Thearle, M., Ferrante, A. W., Jr, Mynatt, R. L., Burris, T. P., Dong, J. Z., Halem, H. A., Culler, M. D., Heisler, L. K., Stephens, J. M., and Butler, A. A. (2008). Identification of Adropin as a Secreted Factor Linking Dietary Macronutrient Intake with Energy Homeostasis and Lipid Metabolism. *Cell Metabolism*, 8(6), 468–481.
9. Aydin, S. and Kuloglu, T. (2014). Immuno Histochemical Expressions of Adropin and Inducible Nitricoxide Synthase in Renal Tissues of Rats with Streptozotocin-Induced Experimental Diabetes. *Biotechnic and Histochemistry*, 89, 104–110.
10. Arınsoy, T., Güngör, Ö. ve Koçyiğit İ. (2017). *Böbrek Fizyopatolojisi Kitabı*. Türkiye: Reaktif.
11. Akpolat, T., Utaş, C. ve Süleymanlar G. (2011). *Nefroloji El Kitabı, Kronik Böbrek Yetmezliği*. İstanbul: Güzel Sanatlar Matbaası, 273–305.
12. Prigent, A. (2013). Monitoring Renal Function and Limitations of Renal Function Tests. *Seminars in Nuclear Medicine*, 38(1), 32–46.

13. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease, (3),1.
14. Süleymanlar, G. (2010). Türkiye Kronik Böbrek Hastalığı Prevelansı Araştırması, Chronic Renal Disease in Turkey CREDIT.
15. Levey, A. S., Coresh, J., Balk, E., Kausz, A. T., Levin, A., Steffes, M. W., Hogg, R. J., Perrone, R. D., Lau, J. and Eknoyan, G. (2003). National Kidney Foundation. National Kidney Foundation Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification. *Annals of Internal Medicine*, 139(2), 137–147.
16. Tanrıverdi, M. S., Karadağ, A. ve Hatipoğlu, E. Ş. (2010). Kronik Böbrek Yetmezliği. *Konuralp Tıp Dergisi*, 2(2),27-32.
17. Süleymanlar, G., Utaş, C., Arınsoy, T., Ateş K., Altun, B., Altıparmak, M., Ecdar, T., Yılmaz, M., Çamsarı, T., Başçı, A. and Serdengeçti, K. (2010). A Population-Based Survey of Chronic Renal Disease in Turkey the CREDIT Study. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 26(6), 1862-1871.
18. Matovinović, M. S. (2009). 1. Pathophysiology and Classification of Kidney Diseases. *EJIFC*, 20(1), 2-11.
19. McClellan, W. M. and Flanders, W. D. (2003). Risk Factors for Progressive Chronic Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology, JASN*, 14(7-2), 65–70.
20. Yeniçerioglu, Y., Güngör, Ö. ve Arıcı, M. (2019). *Nefroloji Kitabı*. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri Ltd. Şti.
21. Randers, E. and Erlandsen, E. J. (1999). Serum Cystatin C as an Endogenous Marker of the Renal Function--A Review. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 37(4), 389–395.
22. Erdoğan, M. B., Demirpençe, Ö. ve Yıldırım, M. (2016). Kardiyovasküler Cerrahi Sonrası Gelişen Akut Böbrek Yetmezliğinin Tanısında Kullanılan Erken Dönem Belirteçler. *Acı Badem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 1,14-19.
23. Kjeldsen, L., Johnsen, A. H., Sengeløv, H. and Borregaard, N. (1993). Isolation and primary Structure of NGAL, a Novel Protein Associated with Human Neutrophil Gelatinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(14), 10425–10432.
24. Mori, K. and Nakao, K. (2007). Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as the Real-Time Indicator of Active Kidney Damage. *Kidney International*, 71(10), 967–970.
25. Hvidberg, V., Jacobsen, C., Strong, R. K., Cowland, J. B, Moestrup, S. K. and Borregaard, N. (2005). The Endocytic Receptor Megalin Binds the Iron Transporting Neutrophil-Gelatinase-Associated Lipocalin with High Affinity and Mediates Its Cellular Uptake. *FEBS Letter*, 579(3), 773–777.

26. Song, J., Yu, J., Prayog, G. W., Weidong C., Wu, Y., Jia, Z. and Zhang, A. (2019). Understanding Kidney Injury Molecule 1: A Novel Immune Factor in Kidney Pathophysiology. *American Journal of Translational Research*, 11(3), 1219–1229.
27. Joseph, V. B. (2009). Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): A Urinary Biomarker and Much More Nephrology Dialysis Transplantation. *European Renal Association*, 24(11), 3265–3268.
28. Hornebeck, W., Lambert, E., Petitfrère, E. and Bernard, P. (2005). Beneficial and Detrimental Influences of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP-1) in Tumor Progression. *Biochimie*, 87(3-4), 377-83.
29. Zhang, H., and Sun, S. C. (2015). NF-KB in Inflammation and Renal Diseases. *Cell and Bioscience*, 5, 63.
30. Şentürk, N. (2013). Kütanöz İnflamasyon. *Türkderm*, 47(1), 28-36.
31. Cheung, W. W., Paik, K. H. and Mak, R. H. (2010). Inflammation and Cachexia in Chronic Kidney Disease. *Pediatric Nephrology*, 25(4), 711–724.
32. Pecoits-Filho, R., Sylvestre, L. C. and Stenvinkel, P. (2005). Chronic Kidney Disease and Inflammation in Pediatric Patients: From Bench to Play ground. *Pediatric Nephrology*, 20(6),714-20.
33. Amdur, R. L., Feldman, H. I., Gupta, J., Yang, W., Kanetsky, P., Shlipak, M., Rahman, M., Lash, J. P., Townsend, R. R., Ojo, A., Roy-Chaudhury, A., Go, A. S., Joffe, M., He, J., Balakrishnan, V. S., Kimmel, P. L., Kusek, J. W. and Raj, D. S. (2016). Inflammation and Progression of CKD: The CRIC Study. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 11(9), 1546–1556.
34. Mihai, S., Codrici, E., Popescu, I. D., Enciu, A., Albuiescu, L., Necula, L. G., Cristina, M., Anton, G. and Tanase, C. (2018). Inflammation-Related Mechanisms in Chronic Kidney Disease Prediction, Progression and Outcome. *Journal of Immunology Research*, 2018, 2180373.
35. Akdoğan, M. ve Yöntem, M. (2018). Sitokinler. *Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi*, 3(1), 36-45.
36. Abbas, A., Lichtman, A. H. and Pober, J. S. (2000). Cytokine in Cellular and Molecular Immunology. *Philadelphia*, 4(7), 235-269.
37. Zhang, J. M. and An, J. (2007). Cytokines, Inflammation and Pain. *International Anesthesiology Clinics*, 45(2), 27–37.
38. Graves, D. T. and Cochran, D. (2003). The Contribution of Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor to Periodontal Tissue Destruction. *Journal of Periodontology*, 74(3), 391–401.

39. Çakmak, H. ve Marakoğlu, İ. (2015). İnterlökin 1 ve Periodontal Hastalık Patogenezindeki Rolü. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 2002(2).
40. Dinarello, C. A. and Savage, N. (1989). Interleukin-1 and Its Receptor. *Critical Reviews in Immunology*, 9(1), 1–20.
41. Weber, A., Wasiliew, P. and Kracht, M. (2010). Interleukin-1 (IL-1) Pathway. *Science Signaling*, 19(3), 105.
42. Agelaki, S., Tsatsanis, C., Gravanis, A. and Margioris, A. N. (2002). Corticotropin-Releasing Hormone Augments Proinflammatory Cytokine Production from Macrophages in Vitro and in Lipopolysaccharide-Induced Endotoxin Shock in Mice. *Infection and Immunity*, 70(11), 6068–6074.
43. Sellner, J., Sitte, H. H. and Rommer, P. S. (2021). Targeting Interleukin-6 to Treat Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders: Implications from Immunology. The Fc γ Pathway and Clinical Experience. *Drug Discovery Today*, S1359-6446(21)00154-9.
44. Magno, A. L., Herat, L. Y., Carnagarin, R., Schlaich, M. P. and Matthews, V. B. (2019). Current Knowledge of IL-6 Cytokine Family Members in Acute and Chronic Kidney Disease. *Biomedicine*, 7(1), 19.
45. Verma, R., Balakrishnan, L., Sharma, K., Khan, A. A., Advani, J., Gowda, H., Tripathy, S. P., Suar, M., Pandey, A., Gandotra, S., Prasad, T. S. and Shankar, S. (2016). A Network Map of Interleukin-10 Signaling Pathway. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 10(1), 61–67.
46. Ji, J. D., Kim, H. J., Rho, Y. H., Choi, S. J., Lee, Y. H., Cheon, H. J., Sohn, J. and Song, G. G. (2005). Inhibition of IL-10 Induced STAT3 Activation by 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂. *Rheumatology*, 44(8), 983–988.
47. Tomas, P. S., Pennington, D. W., Schreck, R. E., Levine, T. M. and Lazarus, S. C. (1996). Authentic 17 Kda Tumour Necrosis Factor Alpha is Synthesized and Released by Canine Mast Cells and Up-Regulated by Stem Cell Factor. *Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 26(6), 710–718.
48. Holbrook, J., Lara-Reyna, S., Jarosz-Griffiths, H. and McDermott, M. (2019). Tumour Necrosis Factor Signalling in Health and Disease. *F1000Research*, 8, 1000.
49. Clark, D. A. and Coker, R. (1998). Transforming Growth Factor-Beta (TGF-Beta). *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 30(3), 293–298.
50. López-Hernández, F. J. and López-Novoa, J. M. (2012). Role of TGF- β in Chronic Kidney Disease: An Integration of Tubular, Glomerular and Vascular Effects. *Cell and Tissue Research*, 347(1), 141-154.
51. Lan, H. Y. and Chung, A. C. (2012). TGF- β /Smad Signaling in Kidney Disease. *Seminars in Nephrology*, 32(3), 236–243.

52. Pepys, M. B. And Hirschfield, G. M. (2003). C-reactive Protein: A Critical Update. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(12), 1805–1812.
53. Gewurz, H., Mold, C., Siegel, J. and Fiedel, B. (1982). C-reactive Protein and the Acute Phase Response. *Advances in Internal Medicine*, 27, 345–372.
54. Schwedler, B. S., Guderian, F., Dämmrich, J., Potempa, L. A. and Wanner, C. (2003). Tubular Staining of Modified C-Reactive Protein in Diabetic Chronic Kidney Disease, *Nephrology Dialysis Transplantation*, 18(11), 2300–2307.
55. Kolls, J. K. and Lindén, A. (2004). Interleukin-17 Family Members and Inflammation. *Immunity*, 21(4), 467-76.
56. Khan, D. and Ansar Ahmed, S. (2015). Regulation of IL-17 in Autoimmune Diseases by Transcriptional Factors and Micrnas. *Frontiers in Genetics*, 14(6), 236.
57. Cortvrindt, C., Speeckaert, R., Moerman, A., Delanghe, J. R. and Speeckaert, M. M. (2017). The Role of Interleukin-17A in the Pathogenesis of Kidney Diseases. *Pathology*, 49(3),247-258.
58. Orejudo, M., Rodrigues-Diez, R. R., Rodrigues-Diez, R., Garcia-Redondo, A., Santos-Sánchez, L., Rández-Garbayo, J., Cannata-Ortiz, P., Ramos, A. M., Ortiz, A., Selgas, R., Mezzano, S., Lavozy, C. and Ruiz-Ortega, M. (2019). Interleukin 17A Participates in Renal Inflammation Associated to Experimental and Human Hypertension. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1015.
59. Gracie, J. A., Robertson, S. E. and McInnes, I. B. (2003). Interleukin-18. *Journal of Leukocyte Biology*, 73(2), 213–224.
60. Yaribeygi, H., Stephen, L., Sahebkar, A. (2019). Interleukin-18 and Diabetic Nephropathy: A Review. *Journal of Cellular Physiology*, 234(5), 5674–5682.
61. Dinarello, C. A., Novick, D., Kim, S. and Kaplanski, G. (2013). Interleukin-18 and IL-18 Binding Protein. *Frontiers in Immunology*, 8(4), 289.
62. Di Carlo, E., Comes, A., Orengo, A. M., Rosso, O., Meazza, R., Musiani, P., Colombo, M. P. and Ferrini, S. (2004). IL-21 Induces Tumor Rejection by Specific CTL and IFN-Gamma-Dependent CXC Chemokines in Syngeneic Mice. *The Journal of Immunology*, 172(3), 1540-7.
63. Akdis, M., Burgler, S., Cramer, R., Eiwegger, T., Fujita, H., Gomez, E., Klunker, S., Meyer, N., Mahony, L., Palomares, O., Rhyner, C., Quaked, N., Schaffartzik, A., Veen, W. V., Zeller, S., Zimmermann, M. and Akdis, C. A. (2011). Interleukins, from 1 to 37 and Interferon- γ : Receptors, Functions and Roles in Diseases *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(3), 701–21.e270.
64. Habib, T., Senadheera, S., Weinberg, K. and Kaushansky, K. (2002). The Common Gamma Chain (Gamma C) is a Required Signaling Component of the IL-21 Receptor

- and Supports IL-21-Induced Cell Proliferation Via JAK3. *Biochemistry*, 41(27), 8725–8731.
65. Skak, K., Kragh, M., Hausman, D., Smyth, M. J., and Sivakumar, P. V. (2008). Interleukin 21: Combination Strategies for Cancer Therapy. *Drug Discovery*, 7(3), 231–240.
 66. Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T. K., Zurawski, G., Moshrefi, M., Qin, J., Li, X., Gorman, D. M., Bazan, J.F. and Kastelein, R. A. (2005). IL-33, an Interleukin-1-Like Cytokine that Signals Via the IL-1 Receptor-Related Protein ST2 and Induces T Helper Type 2-Associated Cytokines. *Immunity*, 23(5), 479-490.
 67. Mitchell, P. D., Salter, B. M., Oliveria, J. P., El-Gammal, A., Tworek, D., Smith, S. G., Sehmi, R., Gauvreau, G. M., and O Apos Byrne, P. M. (2018). IL-33 and Its Receptor ST2 After Inhaled Allergen Challenge in Allergic Asthmatics. *International Archives of Allergy and Immunology*, 176(2), 133–142.
 68. Moussion, C., Ortega, N. and Girard, J. P. (2008). The IL-1-Like Cytokine IL-33 is Constitutively Expressed in the Nucleus of Endothelial Cells and Epithelial Cells In Vivo: A Novel 'Alarmin'?. *Plos One*, 3(10), 3331.
 69. Smithgall, M. D., Comeau, M. R., Yoon, B. R., Kaufman, D., Armitage, R. and Smith, D. E. (2008). IL33 Amplifies Both Th1- and Th2-Type Responses Through Its Activity on Human Basophils, Allergen-Reactive Th2 Cells, Inkand NK Cells. *International Immunology*, 20(8), 1019–1030.
 70. Miller, A. M. (2011). Role of IL-33 in Inflammation and Disease. *Miller Journal of Inflammation*, 8(1), 22.
 71. Imai, Y. (2019). Interleukin-33 in Atopic Dermatitis. *Journal of Dermatological Science*, 96(1), 2–7.
 72. Kumar, K. G., Trevaskis, J. L., Lam, D. D., Sutton, G. M., Koza, R. A., Chouljenko, V. N., Kousoulas, K. G., Rogers, P. M., Kesterson, R. A., Thearle, M., Ferrante, A. W., Mynatt, R. L., Burris, T. P., Dong, J. Z., Halem, H. A., Culler, M. D., Heisler, L. K., Stephens, J.M. and Butler, A. A. (2008). Identification of Adropin as A Secreted Factor Linking Dietary Macronutrient Intake with Energy Homeostasis and Lipid Metabolism. *Cell Metabolism*, 8(6), 468–481.
 73. Zhao, L. P., Xu, W. T., Wang, L., You, T., Chan, S. P., Zhao, X. and Yang, X. J. (2015). Serum Adropin Level in Patients with Stable Coronary Artery Disease. *Heart, Lung and Circulation*, 24(10), 975–979.
 74. Li, L., Xie, W., Zheng, X. L., Yin, W. D. and Tang, C. K. (2016). A Novel Peptide Adropin in Cardiovascular Diseases. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 453, 107–113.

75. Marczuk, N., Cecerska-H. E., Jesionowska, A. and Dolegowska, B. (2016). Adropin-Physiological and Pathophysiological Role. *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej (Online)*, 70(0), 981–988.
76. Niepolski, L. and Grzegorzewska, A. E. (2016). Salusins and Adropin: New Peptides Potentially Involved in Lipid Metabolism and Atherosclerosis. *Advances in Medical Sciences*, 61(2), 282–287.
77. Kuloglu, T. and Aydin, S. (2014). Immunohistochemical Expressions of Adropin and Inducible Nitric Oxide Synthase in Renal Tissues of Rats with Streptozotocin-Induced Experimental Diabetes. *Biotechnic and Histochemistry: Official Publication of the Biological Stain Commission*, 89(2), 104–110.
78. Zhang, S., Chen, Q., Lin, X., Chen, M. and Liu, Q. (2020). A Review of Adropin as the Medium of Dialogue Between Energy Regulation and Immune Regulation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 3947806.
79. Topuz, M., Celik, A., Aslantas, T., Demir, A. K., Aydin, S. and Aydin, S. (2013). Plasma Adropin Levels Predict Endothelial Dysfunction Like Flow-Mediated Dilatation in Patients with Type 2 Diabetes. *Journal of Investigative Medicine: The Official Publication of the American Federation for Clinical Research*, 61(8), 1161–1164.
80. Mirabeau, O., Perlas, E., Severini, C., Audero, E., Gascuel, O., Possenti, R., Birney, E., Rosenthal, N. and Gross, C. (2007). Identification of Novel Peptide Hormones in the Human Proteome by Hidden Markov Model Screening. *Genome Research*, 17(3), 320–327.
81. Wong, M. K., Sze, K. H., Chen, T., Cho, C. K., Law, H. C., Chu, I. K. and Wong, A. O. (2013). Goldfish Spexin: Solution Structure and Novel Function as a Satiety Factor in Feeding Control. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 305(3), 348–366.
82. Walewski, J. L., Ge, F., Lobdell, I. V., H., Levin, N., Schwartz, G. J., Vasselli, J. R., Pomp, A., Dakin, G. and Berk, P. D. (2014). Spexin is a Novel Human Peptide that Reduces Adipocyte Uptake of Long Chain Fatty Acids and Causes Weight Loss in Rodents with Diet-Induced Obesity. *Obesity*, 22(7), 1643-1652.
83. Rucinski, M., Porzionato, A., Ziolkowska, A., Szyszka, M., Macchi, V., De Caro, R. and Malendowicz, L. K. (2010). Expression of the Spexin Gene in the Rat Adrenal Gland and Evidences Suggesting that Spexin Inhibits Adrenocortical Cell Proliferation. *Peptides*, 31, 676–682.
84. Liu, Y., Sun, L., Zheng, L., Su, M., Liu, H., Wei, Y., Li, D., Wang, Y., Dai, C., Gong, Y., Zhao, C. and Li, Y. (2020). Spexin Protects Cardiomyocytes from Hypoxia Induced Metabolic and Mitochondrial Dysfunction. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 393(1), 25–33.
85. Toll, L., Khroyan, T. V., Sonmez, K., Ozawa, A., Lindberg, I., McLaughlin, J. P., Eans, S.O., Shahien, A. A. and Kapusta, D. R. (2012). Peptides Derived from the Prohormone

- Pro NPQ/spexin are Potent Central Modulators of Cardiovascular and Renal Function and Nociception. *The FASEB Journal*, 26(2), 947-954.
86. Kim, E., Jeong, I., Chung, A. Y., Kim, S., Kwon, S. H., Seong, J. Y. and Park, H. C. (2019). Distribution and Neuronal Circuit of Spexin 1/2 Neurons in the Zebrafish CNS. *Scientific Reports*, 9(1), 5025.
 87. Gambaro, S. E., Zubiría, M. G., Giordano, A. P., Portales, A. E., Alzamendi, A., Rumbo, M. and Giovambattista, A. (2020). Spexin Improves Adipose Tissue Inflammation and Macrophage Recruitment in Obese Mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1865(7), 158700.
 88. El-Saka, M. H., Abo El Gheit, R. E., El Saadany, A., Alghazaly, G. M., Marea, K. E. and Madi, N. M. (2021). Effect of Spexin on Renal Dysfunction in Experimentally Obese Rats: Potential Mitigating Mechanisms Via Galanin Receptor-2. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 1-10.
 89. Ma, A., Bai, J., He, M. and Wong, A. O L. (2018). Spexin as a Neuroendocrine Signal with Emerging Functions. *General and Comparative Endocrinology*, 265, 90–96.
 90. Ichimura, T., Asseldonk, E. J., Humphreys, B. D., Gunaratnam, L., Duffield, J. S. and Bonventre, J. V. (2008). Kidney Injury Molecule-1 is a Phosphatidylserine Receptor that Confers a Phagocytic Phenotype on Epithelial Cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(5), 1657–1668.
 91. Musiał, K. and Zwolińska, D. (2011). Matrix Metalloproteinases (MMP-2,9) and Their Tissue Inhibitors (TIMP-1,2) as Novel Markers of Stress Response and Atherogenesis in Children with Chronic Kidney Disease (CKD) on Conservative Treatment. *Cell Stress And Chaperones*, 16, 97–103.
 92. Devarajan, P. (2008). Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL): A New Marker of Kidney Disease. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. Supplementum*, 241, 89–94.
 93. Jin, Y., Liu, R., Xie, J., Xiong, H., He, J. C. and Chen, N. (2013). Interleukin-10 Deficiency Aggravates Kidney Inflammation and Fibrosis in the Unilateral Ureteral Obstruction Mouse Model. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 93(7), 801–811.
 94. Gauer, S., Sichler, O., Obermuller, N., Holzmann, Y., Kiss, E., Sobkowiak, E., Pfeilschifter, J., Geiger, H., Muhl, H. and Hauser, I. A. (2007). IL-18 is Expressed in the Intercalated Cell of Human Kidney. *Kidney International*, 72(9), 1081–1087.
 95. Homsí, E., Janino, P. and De Faria, J. B. (2006). Role of Caspases on Cell Death, Inflammation and Cell Cycle in Glycerol-Induced Acute Renal Failure. *Kidney International*, 69(8), 1385-1392.
 96. Pawlak, K., Mysliwiec, M. and Pawlak, D. (2011). Interleukin-21 in Hemodialyzed Patients: Association with the Etiology of Chronic Kidney Disease and the

- Seropositivity Against Hepatitis C Virus Infection. *Clinical Biochemistry*, 44(17–18), 1416-1420.
97. Velden, J., Paust, H. J., Hoxha, E., Turner, J. E., Steinmetz, O. M., Wolf, G., Jabs, W. J., Ozcan, F., Beige, J., Heering, P.J., Schröder, S., Kneißler, U., Disteldorf, E., Mittrücker, H. W., Stahl, R. A., Helmchen, U. and Panzer, U. (2012). Renal IL-17 Expression in Human ANCA-Associated Glomerulonephritis. *Renal Physiology*, 302(12), 1663–1673.
 98. Gungor, O., Unal, H. U., Guclu, A., Gezer, M., Eyileten, T., Guzel, F. B., Altunoren, O., Erken, E., Oguz, Y., Kocyigit, I. And Yilmaz, M. I. (2017). IL-33 and ST2 Levels in Chronic Kidney Disease: Associations with Inflammation, Vascular Abnormalities, Cardiovascular Events and Survival. *Plos One*, 12(6), 0178939.
 99. Lovren, F., Pan, Y., Quan, A., Singh, K. K., Shukla, P. C., Gupta, M., Al-Omran M., Teoh, H. and Verma, S. (2010). Adropin is a Novel Regulator of Endothelial Function. *Circulation*, 122(11), 185-192.
 100. Hu, W. and Chen, L. (2016). Association of Serum Adropin Concentrations with Diabetic Nephropathy. *Mediators of Inflammation*, 2016, 6038261.
 101. Li, B., Tian, X., Guo, S., Zhang, M., Li, J., Zhai, N., Wang, H. and Zhang, Y. (2020). Pentraxin-3 and Adropin as Inflammatory Markers of Early Renal Damage in Type 2 Diabetes Patients. *International Urology and Nephrology*, 52(11), 2145-252.
 102. Sato, K., Yamashita, T., Shirai, R., Shibata, K., Okano, T., Yamaguchi, M., Mori, Y., Hirano, T. and Watanabe, T. (2018). Adropin Contributesto Anti-Atherosclerosis by Suppressing Monocyte-Endothelial Cell Adhesion and Smooth Muscle Cell Proliferation. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5), 1293.
 103. Ibrahim, E. M. and Moursi, M. M. S. (2018). Serum Adropin Level and Kidney Functions in Type-II Diabetic Rat Model with and with Out Pioglitazone Treatment. *Al-Azhar Medical Journal*, 47, 109-128.
 104. Gao, F., Fang, J., Chen, F., Wang, C., Chen, S., Zhang, S., Lv, X., Zhang, J., He, Q., Weng, S., Liu, Q. and Lin, X. H. (2016). Enho Mutations Causing Low Adropin: A Possible Pathomechanism of MPO-ANCA Associated Lung Injury. *EBioMedicine*, 9, 324–335.
 105. Gu, X., Li, H., Zhu, X., Gu, H., Chen, J., Wang, L., Harding, P. and Xu, W. (2015). Inverse Correlation Betweenplasma Adropin and ET-1 Levels in Essentialhy Pertension: A Cross-Sectional Study. *A Cross-Sectional Study. Medicine*, 94(40), 1712.
 106. Kumar, S., Hossain, J., Nader, N., Aguirre, R., Sriram, S. and Balagopal P. B. (2016). Decreased Circulating Levels of Spexin in Obese Children. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 101(7), 2931-2936.

107. Kumar, S., Hossain, M., Javed, A., Kullo, I. J. and Balagopal, P. B. (2018). Relationship of Circulating Spexin with Markers of Cardiovascular Disease: A Pilot Study in Adolescents with Obesity. *Pediatric Obesity*, 13(6), 374-380.
108. Behrooz, M., Vaghef-Mehrabany, E. and Ostadrahimi, A. (2020). Different Spexin Level in Obese vs Normal Weight Children and Its Relationship with Obesity Related Risk Factors. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 30(4), 674-682.





EKLER

EK-1. Etik Kurul Raporu

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

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI**Oturum Sayısı: 2016/13****Karar Tarihi: 28.12.2016****KARAR NO: 2016.13.02**

Yürütücülüğünü Amasya Üniversitesi Merkezi Araştırma Uygulama Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi öğretim elemanı Uzm. Dr. Burak YAZGAN'ın yaptığı, TÜHADYEK-2016/52 protokol nolu "Kronik böbrek yetmezliğinde adropin ve spexinin koruyucu etkilerinin ve sinyal yollarındaki hedeflerinin transkriptom analizi ile belirlenmesi" başlıklı çalışma görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri yerel etik kurulu yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.