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

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Nurettin AYDOĞDU

ANJİOTENSİN II İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL HİPERTANSİYON MODELİNDE NESFATİN 1 VE ADROPİN'İN BÖBREK FONKSİYONLARI İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Muhammed Ali AYDIN

Referans no: 10150524

EDİRNE – 2018

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

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Nurettin AYDOĞDU

ANJİOTENSİN II İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL HİPERTANSİYON MODELİNDE NESFATİN 1 VE ADROPİN'İN BÖBREK FONKSİYONLARI İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Muhammed Ali AYDIN

Destekleyen Kurum: TÜBAP 2017/116

Tez No:

EDİRNE – 2018

TEŞEKKÜR

Fizyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirdiğim yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi birikimi, deneyimiyle bana destek veren ve yönlendiren tez danışman hocam sayın Prof. Dr. Nurettin AYDOĞDU'ya başta olmak üzere; eğitimimde emeği geçen sayın Prof. Dr. Selma Arzu VARDAR'a, Prof. Dr. Levent ÖZTÜRK'e, Dr. Öğr. Üyesi Oktay KAYA'ya, ve Doç. Dr. Ebru TAŞTEKİN'e; çalışmamızı destekleyen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (TÜBAP), çalışmama katılımlarıyla destek sağlayan ekip arkadaşlarıma ve tüm Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1
GENEL BİLGİLER 3
HİPERTANSİYON TANIMI 3
KAN BASINCININ DÜZENLENMESİ 4
RENİN ANJİOTENSİN ALDOSTERON SİSTEMİ 6
NESFATİN 1 8
ADROPİN 9
KLAUDİNLER 9
GEREÇ VE YÖNTEMLER 12
BULGULAR 28
TARTIŞMA 59
SONUÇLAR 65
ÖZET 67
SUMMARY 69
KAYNAKLAR 71
ŞEKİLLER LİSTESİ 79
ÖZGEÇMİŞ 82
EKLER

SİMGE VE KISALTMALAR

ACC : American College of Cardiology

ACE : Angiotensin converting enzyme (Anjiotensin dönüştürücü enzim)

ADH : Antidiüretik hormon

AHA : American Heart Association

ALT : Alanin aminotransferaz

ANG II : Anjiotensin II

AST : Aspartat aminotransferaz

AT1 : Anjiotensin II tip 1

CK : Creatine Kinase (Kreatin kinaz)

CLDN : Claudin (Klaudin)

DKB : Diyastolik kan basıncı

ENaC : Epitelyal sodyum kanal

Enho : Enerji Homeostazisi ile İlişkili Gen

eNOS : Endotelyal nitrik oksit sentaz

FeK : Fraksiyonel potasyum atılımı

FeNa : Fraksiyonel sodyum atılımı

GSH : Glutatyon

HE : Hematoksin-eozin

İR : İskemi reperfüzyon

K^+ : Potasyum

KB : Kan basıncı

KVH : Kardiyovasküler hastalıklar

MAU : Mikroalbuminüri

MDA : Malondialdehitin

Na^+ : Sodyum

NO : Nitrik oksit

NUCB2 : Nükleobindin-2

OKB : Ortalama kan basıncı

RAAS : Renin Anjiotensin Aldosteron Sistemi

SKB : Sistolik kan basıncı

TBA : Tiyobarbitürik asit

GİRİŞ VE AMAÇ

Sistemik arteriyel hipertansiyon, sistemik kan basıncında (KB) fizyolojik olmayan kalıcı artış olarak tanımlanmaktadır (1). Hipertansiyonun, dünya çapında kardiyovasküler hastalıklara (KVH), sakatlıklara ve ölümlere neden olan en önemli önlenebilir risk faktörü olduğu rapor edilmektedir. Dünya genelinde, yaklaşık 1 milyar yetişkin insanı etkilemekte ve yılda 9 milyondan fazla ölüme sebep olmaktadır (2). Birçok genetik, çevresel ve davranışsal faktör hipertansiyon gelişiminde rol oynamaktadır. Hipertansiyon; kalp ve damar hastalıkları, inme ve böbrek hastalıkları için başlıca nedensel risk faktörlerinden biri olarak tanımlanmaktadır. Hipertansiyonu önlemek, tespit etmek, tedavi etmek ve kontrol etmek için nedeninin anlaşılmasına yönelik yoğun çalışmalar devam etmektedir (1).

Renin Anjiotensin Aldosteron Sistemi (RAAS) hücre dışı sıvı dengesinin düzenlenmesinde ve kan basıncının ayarlanmasında önemli rol oynamaktadır. RAAS'ın esas mediatörü olarak görev yapan anjiotensin II'nin (ANG II) kardiyovasküler sistemin düzenlenmesinde önemli fizyolojik rolü vardır. ANG II böbrekler, adrenaller, hipofiz bezi, beyin, damar düz kasları, kalp ve sempatik sinir sistemi gibi geniş bir hedef dokuyu etkilemektedir. ANG II, fizyolojik koşullarda damar tonusu ve kan basıncının düzenlenmesinin yanında; kalp yetmezliği ve hipertansiyonun fizyopatolojisinde önemli rol oynamaktadır (3-5).

Anjiotensin II verilerek oluşturulan deneysel hipertansiyon modeli, preeklampsi, postmenopozal hipertansiyon, vasküler yaşlanma, neovaskülarizasyon

ve vasküler yeniden modellenme gibi patolojik durumları göstermek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (4).

Nesfatin-1, 82 amino asite sahiptir. Anoreksijenik etki gösterir, glikoz homeostazisi ve kardiyovasküler fonksiyonların düzenlenmesinde rol alır. Periferik sinir sisteminde ve beyinde Nükleobindin-2 (NUCB2) proteininden elde edilir (6-9). Beyinde üretilen nesfatin-1, sıçanlarda kan basıncını yükseltmek için melanokortin-3/4 reseptörleri üzerinde etki etmektedir. Periferik nesfatin-1 uygulamasının ise hem sıçanlarda hem de farelerde kan basıncını arttırdığı bildirilmiştir (10-12). Nesfatin-1'in miyokardiyal performansı doğrudan etkilemekte, kalbi iskemi/reperfüzyon hasarına karşı koruduğu ve kardiyovasküler homeostazise katılabileceği kabul edilmektedir (13,14).

Adropin, enerji homeostazisi ile ilişkiyi sürdürmede görevli yeni bir düzenleyici peptittir. Enerji homeostazisi ile ilişkili gen (Enho) tarafından kodlanan 76 amino asitten oluşur. Adropin; karaciğer, beyin, koroner arter ve umbilikal ven gibi birçok dokuda eksprese edilmiştir. Adropinin lipit metabolizmasında ve insülin direncinde kritik bir rol oynadığı ve kardiyovasküler hastalıklar ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (15-17).

Adropinin ve nesfatin-1'in kan basıncını düzenleyen mekanizmalar ile ilişkisi henüz netleşmemiştir. Yoğun araştırmalara rağmen, ANG II kaynaklı oluşan hipertansiyonun mekanizması da halen tam olarak anlaşılamamıştır. Çalışmamızda ANG II verilerek oluşturulan deneysel hipertansiyon modelinde; nesfatin-1 ve adropin düzeylerinin kan basıncı, böbrek fonksiyonları, böbrek hasarı ve klaudin 2 ile ilişkisini araştırmayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

HİPERTANSİYON TANIMI

Kardiyovasküler hastalıklar, dünyadaki ölümlerin bir numaralı sebebi olarak görülmektedir (18). Hipertansiyonda mortalite açısından en yaygın kardiyovasküler bozukluk ve kardiyovasküler hastalıklar için bir numaralı risk faktörü olarak kabul edilmektedir (19). Hipertansiyon 2010 yılında 9,4 milyon ölüme neden olmuştur. Bu sayı dünyada görülen ölümlerin %17,8'ine karşılık gelmektedir. Dünya genelinde yüksek KB'nin inmenin yaklaşık % 54'üne ve iskemik kalp hastalığının % 47'sine sebep olduğu bildirilmiştir. Yüksek gelirli ülkelerde hipertansiyon prevalansı düşerken, düşük ve orta gelirli ülkelerde hipertansiyon prevalansının arttığı rapor edilmektedir (20).

Art arda yapılan en az iki ölçümde sistolik kan basıncının (SKB) ≥ 140 mm Hg ve diyastolik kan basıncının (DKB) ≥ 90 mm Hg olması durumu 2000'li yıllarda hipertansiyon olarak kabul edilmektedir (21). Yetişkinlerde hipertansiyonun saptanması ve değerlendirilmesi için KB düzeyleri Tablo 1'de gösterildiği gibi 2017 American College of Cardiology (ACC)/American Heart Association (AHA) kılavuzuna göre sınıflandırılmıştır (22).

Tablo 1: Kan basıncının sınıflandırılması

Kan Basıncı Düzeyleri			Sınıflandırma Klavuzu
SKB mm Hg		DKB mm Hg	2017 ACC/AHA
< 120	ve	< 80	Normal kan basıncı
120-129	ve	< 80	Yükselmiş kan basıncı
130-139	ya da	80-89	Evre 1 hipertansiyon
≥ 140	ya da	≥ 90	Evre 2 hipertansiyon

KAN BASINCININ DÜZENLENMESİ

Arteriyel kan basıncı özel fonksiyonları olan ve birbiriyle ilgili olarak çalışan birçok sistemle kontrol edilir. Bu sistemler üç gruba ayrılabilir (23).

1) Hızlı olarak etki gösteren basınç kontrol mekanizmaları (Saniyeler veya dakikalar)

2) Orta sürede etki gösteren basınç kontrol mekanizmaları (Dakika veya saatler)

3) Uzun sürede etki gösteren basınç kontrol mekanizmaları (Günler, aylar ve yıllar)

1) Hızlı olarak etki gösteren basınç kontrol mekanizmaları

Arter duvarına yerleşmiş sinir sonları olan baroreseptörler, aort yayında ve karotis sinüsde yoğun olarak bulunur. Baroreseptörler basıncın artması ile gerilerek uyarılırlar ve yüksek frekansta uyarı gönderirler. Karotik sinüsteki baroreseptörler 0–60 mm Hg arasındaki basınç değerlerinde uyarılamaz. 60–180 mm Hg basınç değerlerinde cevap giderek artar. Aortik baroreseptörler 30 mm Hg ve üstündeki basınçlarda uyarılır. Bu uyarılar santral sinir sistemine taşınır, feedback uyarılar otonom sinir sistemi yardımıyla dolaşım sistemine gönderilir ve arter basıncı normal sınırlara iner (23).

Beyin sapının altında bulunan vazomotor merkezde serebral iskemi görülürse vazomotor merkezdeki vazokonstriktör ve kardiyoakselatör nöronlar iskemiye yanıt verirler ve güçlü bir şekilde uyarılırlar. Bu şekilde arter basıncı kalbin pompalayabileceği en yüksek seviyeye çıkarılır. Serebral iskemiye yanıt olarak basıncın artması merkezi sinir sisteminin iskemik yanıtı olarak adlandırılır. Bu

mekanizma arter basıncını 10 dakika içinde 250 mm Hg yükseltecek kadar etkilidir (23).

Karotik sinüs ve aort yayına yerleşmiş karotid ve aortik cisimler bulunur. Bu cisimler kandaki CO_2, O_2 ve pH değişikliklerini algılayan özelleşmiş yapılardır. Bu yapılar kemoreseptör olarak isimlendirilir. Arteryel kandaki PCO_2 yüksek, PO_2 ya da pH'ın düşük olduğu durumlar ile karotid ve aortik cisimlere ulaşan kan akımı azaldığı durumlarda periferal kemoreseptörler uyarılır. Bu durumlarda kemoreseptörler nükleus traktus solitariusa (NTS) daha çok uyarı gönderirler. NTS'ye gelen bu uyarılar güçlü periferal vazokonstriksiyona neden olarak arter basıncını artırırlar. Arter basıncı 80 mm Hg altına düşene kadar cevap oluşmaz. Kemoreseptör refleksler düşük basınçlarda basıncın düşmesini engelleyici rol üstlenirler (24).

2) Orta sürede etki gösteren basınç kontrol mekanizmaları

Renin, böbrek afferent arteriyollerindeki kan basıncının düşmesi, sempatik sistemin aktivasyonu ve makula densa hücrelerinin aktivasyonuna yanıt olarak afferent arteriyol duvarındaki granüler hücrelerden inaktif bir form olarak sentezlenir. Renin anjiotensionojen üzerine enzimatik bir etki ile anjiotensin I serbestleşmesine neden olur. Anjiotensin I tüm damarlarda ve yoğun olarak küçük akciğer damarları endotelinde bulunan anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) tarafından ANG II'ye dönüştürülür. ANG II arteriyollerde güçlü bir daraltıcı etki gösterir. Bir mikrogramı insanda arter basıncında 50 mm Hg veya üzerinde bir artma yapabilir. ANG II'nin en önemli etkisi vücuttaki çoğu arteriyole aynı anda nüfuz ederek toplam perifer direncini artırarak kan basıncını yükseltmesidir. Bu nedenle, arter basıncının düzenlenmesinde ANG II önemli bir rol üstlenir (23).

Kapillerlere sıvı geçişi mekanizması, kapiller basınç düştüğü zaman hücreler arası sıvıdan dolaşıma sıvı geçişi olur. Bu durum kan hacminin artmasını sağlayarak, kan basıncının yükselmesine sebep olur. Tersi durumda ise, kapillerlerde basınç yükselir, sıvı dolaşım sisteminin dışına çıkar ve kan hacminde meydana gelen azalma nedeniyle kan basıncı düşer (23).

3) Uzun sürede etki gösteren basınç kontrol mekanizmaları

Aldosteron, adrenal kortekste anjiotensin II tip 1 (AT1) reseptör yoluyla ANG II tarafından uyarılır. Aldosteron nefronun distal kısımlarında; sodyum ve su geri

emilimini ile potasyum ve magnezyumun sekresyonuna sebep olur, böylece hücre dışı sıvı hacimi ve kan basıncının düzenlenmesinde rol oynar (26).

Antidiüretik hormon (ADH), aynı zamanda arginin vazopressin olarak da adlandırılır. Kan volümü azaldığı ya da doku ozmolaritesinin arttığı zaman hipofiz arka lobundan salınır. Başlıca görevi böbrek su tutulumunu kontrol ederek hücre dışı sıvı hacmini düzenlemektir. Eğer dolaşımdaki miktarı çok yükselmiş ise vazokonstriksiyona da neden olabilir (25).

RENİN ANJİOTENSİN ALDOSTERON SİSTEMİ

Renin anjiotensin aldosteron sistemi, deneklerde çeşitli RAAS blokerlerinin kullanılması ile KB'nin azaldığı gösterilerek kanıtlanmış, belki de vücudun en güçlü hormon sistemidir. RAAS'ın birçok bileşeni olmasına rağmen, KB düzenlenmesi üzerindeki en önemli etkisini, hem kısa süreli hem de uzun süreli arteriyel basınç kontrolüne katılan ANG II aracılığıyla gerçekleştirildiği bildirilmiştir. Anjiotensin II akut kan hacmi azalması, sodyum azalması veya kalp yetmezliği gibi durumlarda KB'yi korumaya yardımcı olan güçlü bir vazokonstriktördür. Bununla birlikte, ANG II'nin KB üzerindeki uzun dönem etkilerini, böbrekler üzerinden sıvı dengesinin düzenlenmesine katkı sağlayarak gösterdiği rapor edilmiştir (27).

Renin anjiotensin aldosteron sisteminin genellikle sodyum tükenmesi, kanama veya kalp yetmezliği gibi, böbreklerin yetersiz kanlanmasına neden olan koşullarda fizyolojik aktivasyonu artar. ANG II'nin yapımının artması, tuz ve su tutulmasına neden olarak böbrek perfüzyonunu düzeltmeye yardımcı olur ve bu da KB'deki azalmayı engellemeye çalışır. Anjiotensin II, aldosteron sekresyonunu uyarması sayesinde, epitelyal transport üzerine doğrudan etkileri ve hemodinamik etkileri ile böbrek sodyum geri emilimini artırarak tuz ve su tutulumuna neden olur (27).

Anjiotensin II'nin efferent arteriolleri daraltması, böbrek kan akımını ve peritübüler kapiler hidrostatik basıncını azaltır ve artmış filtrasyon fraksiyonunun bir sonucu olarak peritübüler kolloid ozmotik basıncı arttırır. Bu değişiklikler tübüler epitelyal hücreler boyunca sıvı geri emilimini artırır. Efferent arteriollerdeki daralma ya da ANG II'nin vaza rektaya doğrudan etkisi ile böbrek medüller kan akımındaki meydana gelen azalmalar da henle kulpunda ve toplama kanallarındaki geri emilimi arttırabilir (28). Çok düşük ANG II konsantrasyonlarında, ANG II doğrudan tübüler

sodyum emilimini uyarır. Proksimal tübüller içinde, ANG II lümen membran üzerindeki Na^+-H^+ değiştiriciyi ve Na^+-K^+-ATPaz aktivitesini uyarır ayrıca bazolateral membran üzerinde sodyum bikarbonat kotransportunu arttırır. Bu etkiler kısmen adenil siklazın inhibisyonu ve artmış fosfolipaz C aktivitesinin aracılık etmesinin bir sonucudur (27-30).

Anjiotensin II ayrıca henle kulpu, makula densa ve nefronun distal segmentlerinde sodyum geri emilimini uyarır. Fizyolojik konsantrasyonlarda ANG II, henle kulpunun çıkan kalın kolunda bikarbonat geri emilimi ile Na^+-K^+-2Cl eş taşıyıcısını uyarır. ANG II, nefronun distal kısımlarındaki H^+-ATPaz aktivitesini artırır ve kortikal toplayıcı kanallarındaki epitelyal sodyum kanal (ENaC) aktivitesini de uyarır (29,30).

Anjiotensin II böbreklerde de güçlü bir vazokonstriktördür, ancak fizyolojik koşullarda esas olarak efferent arteriyollerde daralmaya sebep olur. Bu durumda efferent arteriyollerdeki daralma böbrek perfüzyonunun azalmasına bağlı olarak glomerüler filtrasyon hızındaki azalmanın önlenmesi için tübüloglomerüler geri bildirim ile miyojenik aktivite gibi otoregülatör mekanizmalarla birlikte hareket eder (28,31). Anjiotensin II'nin afferent damarlardaki zayıf daraltıcı etkisi, bu damarların, prostaglandinler ve endotelyal kaynaklı NO gibi mediyatörler tarafından korunmasıyla ilişkilidir. Örneğin nonsteroidal anti-enflamatuar ilaçlar ve kronik vasküler hastalıklar (örn, ateroskleroz) böbreklerin bu mediyatörleri üretme kabiliyetini azaltır, bunun sonucunda ANG II düzeyinin artması, afferent arteriyolleri daraltarak GFR'yi azaltabilir (27). Klinik ve deneysel çalışmalar, RAAS blokerlerinin KB'de diğer antihipertansif ajanlara benzer azalma yapmasının yanı sıra, glomerüler hasarı önlemede diğer antihipertansif ajanlardan daha etkili olduğunu bildirilmiştir. ANG II etkilerinin inhibe edilmesi, efferent arteriyollerde direnci ve arteriyel basıncı azaltarak, glomerüler hidrostatik basıncı düşürür ve glomerüler hiperfiltrasyon hızını azaltır (27,32-34).

Aldosteronun nefronun distal kısımlarındaki esas hücrelerde sodyum geri emilimini sağlayarak basınç natriürezi ve KB düzenlenmesi üzerinde önemli etkileri vardır. Aldosteronun temel etkisi, distal tübül ve toplayıcı kanallardaki esas hücrelerde sodyum geri emilimini ve potasyum salgılanmasını uyarmasıdır. Aldosteron, hücre içi melanakortin reseptörlere (MR) bağlanır ve hedef genler tarafından transkripsiyonu aktive eder. Bu da, bazolateral epitelyal membran

üzerindeki Na^+-K^+-ATPaz pompasının sentezini ve epitelyal zarın luminal tarafındaki sodyum kanalları ile potasyum kanallarının aktivasyonunu artırır. Bu etkiler genomik etkiler olarak adlandırılır ve aldosteron uygulamasından sonra 60-90 dakika sürer (27,35). Aldosteron ayrıca kardiyovasküler ve böbrek sistemlerinde hızlı nongenomik etkiler gösterir. Aldosteron, esas hücrelerdeki sodyum kanalı aktivasyonunu artırıcı etkilerini artırarak Na^+-H^+ değiştirici aktivitesini de artırır (27,35,36).

NESFATİN 1

Nesfatin-1, Oh ve ark (37) tarafından 2006 yılında tanımlanan, 82 amino aside sahip yeni tanımlanmış bir peptittir ve NUCB2 geni tarafından kodlanan nükleobindin 2 (NUCB2) proteininden elde edildiği rapor edilmiştir (38). NUCB2 toplam 396 amino asitten oluşan sıçan, fare ve insan türleri arasında çok yüksek amino asit dizisi benzerliğine sahip bir proteindir. NUCB2 prohormon konvertaz enzim tarafından parçalanarak nesfatin-1 (1-82 amino asit), nesfatin-2 (85-163 amino asit) ve nesfatin-3 (166-396 amino asit) olmak üzere üç farklı ürün oluşturur (39).

Nesfatin-1; ön beyin, arka beyin, beyin sapı, omurilik, adipoz dokular da dahil olmak üzere çeşitli dokulardan eksprese edilir (40). Anoreksijenik bir etkiye sahiptir ve gıda alımını, enerji homeostazisini, su alımını ve vücut ısısını düzenleyen hipotalamik yollarda önemli bir rol oynar (41,42). Ayrıca kardiyovasküler ve hipertansif etkiler gösterdiği bildirilmiştir (43). Glikoz, insülin metabolizması ve iskemi reperfüzyon (İR) ile yakından ilişkilidir. Birçok çalışmada, nesfatin-1'in vücut kitle indeksi, İR, diyabet, hipertansiyon ve polikistik over sendromunda inflamatuar uyarı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (43-46).

Kemirgenlerde ve insanlarda, plazma, sinoviyal sıvı, tükürük ve anne sütü gibi vücut sıvılarında nesfatin-1'in varlığı gösterilmiştir. Yağ dokusu, mide mukozasının endokrin hücreleri, pankreas B-adacık hücreleri, onikiparmak bağırsağı, yemek borusu, karaciğer, ince bağırsak, kolon, testis, yumurtalık, rahim, eklem kıkırdağı, akciğer ve kalp gibi çeşitli çevresel dokular tarafından üretildiği bildirilmiştir (47).

Nesfatin-1'in, kardiyovasküler fonksiyonu düzenlemede kritik rol oynayan merkezi melanokortin sistemi ile etkileşim yoluyla gıda alımını düzenlemesi nedeniyle, ortalama kan basıncını (OKB) değiştirdiği bildirilmektedir (48).

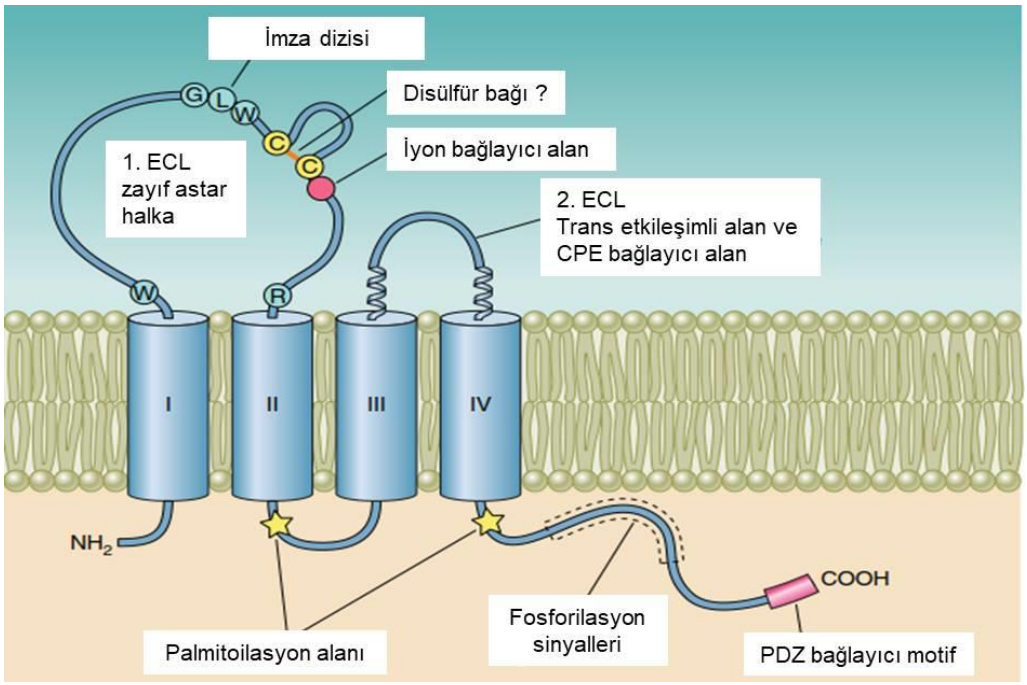
İntravenöz nesfatin-1 uygulamasının nitrik oksit (NO) üretimini inhibe ederek vazokonstriksiyona yol açtığı ve yüksek KB'ye neden olduğu gösterilmiştir. Ayada ve ark. (49) yaptığı bir çalışmada, kronik periferik nesfatin-1'in özellikle kronik kısıtlama stresli sıçanlarda plazma endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) düzeyini azalttığı gösterilmiştir. Nesfatin-1'in uzun süreli etkisinde eNOS aktivitesini azaltarak NO düzeyini azalttığı ve bunun sonucunda vazokonstriksiyona sebep olarak KB'yi yükselttiği rapor edilmektedir (50).

ADROPİN

Yeni keşfedilen peptit hormonu olan adropin, enerji homeostazı ile ilişkili gen (Enho) tarafından kodlanır ve karaciğer ve beyinde bol miktarda eksprese edilir (51). Adropin, insan ve kemirgen türleri arasında tam bir homoloji sergileyen 76 amino asitli bir peptittir. Adropinin özellikle glikoz ve lipit metabolizmasının yanı sıra insülin duyarlılığını düzenleyerek enerji homeostazında önemli bir rol oynadığı rapor edilmektedir (51,52). Literatür bilgilerine göre, adropin endokard, epikardiyum ve miyokardda üretilir (53) ve insan endotel hücrelerinde ekprese edilmektedir. Adropinin endotel fonksiyonlarını düzenlediği, anjiojenik etki ve kalp koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (38,54). Ayrıca adropinin eNOS aktivasyonunu önemli ölçüde artırarak NO düzeyini artırdığı bildirilmektedir. Bu nedenle hipertansiyon fizyopatolojisinde rolü olduğu düşünülmektedir (54,55). Adropinin kardiyovasküler fonksiyonların düzenlenmesindeki etkileri halen bilinmemektedir (38).

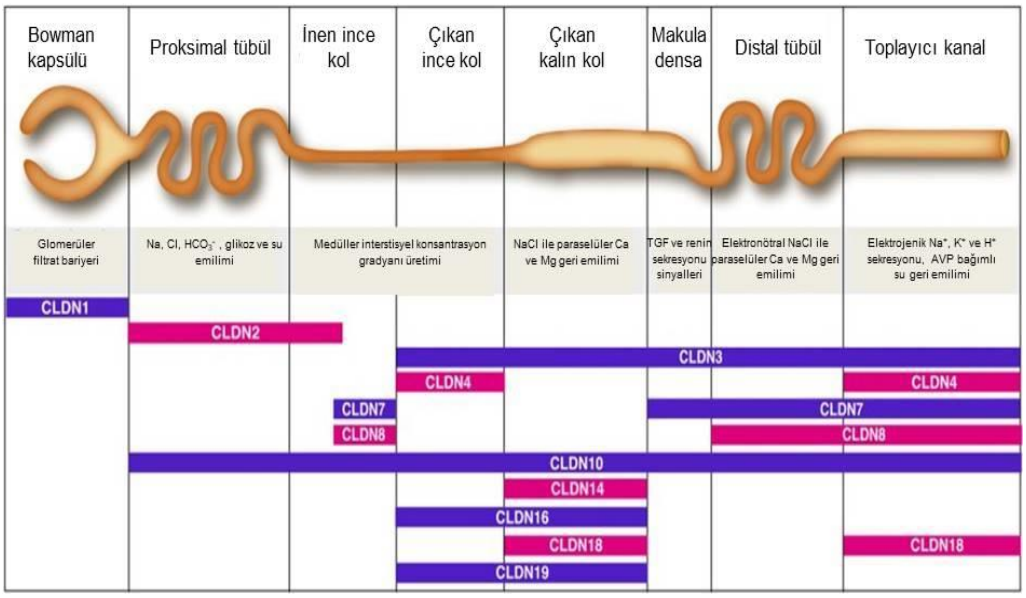
KLAUDİNLER

Klaudinler (CLDN), iyon ve suyun parasellüler geçişinde rol oynayan transmembran proteinlerdir (56). İlk olarak 1998 yılında Japon araştırmacılar Furuse ve ark. (57) tarafından bulunmuştur. İnsanda CLDN'ler 21-34 kilodalton (kDa) ağırlığında olup, 207 ila 305 amino asit içerir. CLDN'ler Şekil 1'de gösterildiği gibi 4 transmembran alana, iki hücre dışı halkaya (ECL 1–ECL 2) sitoplazmik bölgede amino ve karboksi terminal alana sahiptir. CLDN ailesinin en az 27 üyesi tanımlanmıştır. Bu proteinler genellikle epitelyal ve endotelyal hücreler tarafından eksprese edilir. Ekspresyonları diğer sıkı bağlantı proteinlerinden farklı olarak doku ve hücre tipine göre çeşitlilik gösterir (56,58,59).



Şekil 1. Klaudin (CLDN) protein modeli (59)

Üzerinde çalışılmış CLDN tiplerinin çoğunluğu böbrekte eksprese edilir. CLDN'lerin özel kombinasyonlarının, her nefron segmentinde önemli paraselüler geçirgenlik özelliklerini belirlediğine inanılmaktadır. Böbrekte bulunan CLDN'lerin farklı fonksiyonları ve lokalizasyonları vardır. Örneğin, yüksek iletken katyon gözenekleri oluşturan CLDN 2, proksimal tübül ve Henle'nin inen ince kolunda eksprese edilir. CLDN 2 proksimal tübüldeki paraselüler Na^+ geri emiliminden sorumludur. Aksine, CLDN 4 ve CLDN 8 esas olarak katyon bariyerleri olarak işlev görürler ve genel olarak nefronun distal kısımlarında eksprese edilir. CLDN 10'un; CLDN 10a ve CLDN 10b olmak üzere iki çeşidi vardır. Bu iki CLDN farklı hücre dışı alanlara ve farklı fonksiyonel özelliklere sahiptir. Anyon seçici olan CLDN 10a, korteksteki nefron tübülleri içinde daha yoğun bulunurken, katyon seçici CLDN 10b medullada daha fazla bulunur. Böbrek tübülü boyunca CLDN lokalizayonu Şekil 2'de verilmiştir (60).



Şekil 2. Böbrek tübülündeki klaudin (CLDN) lokalizayonu

CLDN 2, böbreğin proksimal tübülü ve bağırsak kriptaları dahil olmak üzere epitelyal dokularda yüksek oranda eksprese edilir. Epitelyal hücre dizilerinde aşırı eksprese edildiğinde, katyona geçirgen paraselüler gözenek gibi davranır. Böbrekte, farelerde CLDN 2'nin bloke edilmesi, proksimal tübül S2 segmentlerinin Na^+ iletkenliğinde bir azalmaya sebep olmuş ve Na^+ ve suyun geri emilmesinde azalmaya yol açtığı bildirilmiştir. Bir başka çalışmada CLDN 2'nin bloke edilmesi ile hiperkalsiüri gözlenmiştir. Bu sonuçlar CLDN 2'nin Na^+, Ca^{2+} geri emilimini sağladığını ve suyun emilmesine katkıda bulunduğunu düşündürmektedir (59).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamızda T.Ü Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Birimi'nde standart laboratuvar koşullarında (22±1ºC ısıda, %50-60 nem oranı, 12 saat gece–12 saat gündüz ışık periyodu olan ortamda) yetiştirilen sağlıklı 240-260 gram ağırlığında 16 adet Spraque-Dawley türü erkek sıçan kullanılmıştır.

Gruplar randomize olarak 8'er adet sıçandan oluşacak şekilde 2 gruba ayrıldı.

Kontrol grubu: Ozmotik mini pompalara (1 µl/saat, Alzet 2001 model) ANG II çözücüsü (0,01 N asetik asit serum fizyolojik (SF) içerisinde) konuldu. Ozmotik mini pompalar steril tüplere alınarak salınım noktaları yukarıda olacak şekilde SF içerisinde 37°C etüvde, implantasyon zamanına kadar 12 saat bekletildi. Sıçanlar cerrahi işlem yapılmadan önce 10 mg/kg rompun ve 50 mg/kg ketamin anestezisi uygulandı. İki skapulanın arası traş edildi ve batikon ile cerrahi bölge temizlendi ardından orta noktasına insizyon yapıldı ve ozmotik mini pompalar yerleştirilerek dikildi. Dikişler atıldıktan sonra sıçanlara sırasıyla önce batikon ardından % 5 lidokain içeren anestol sürüldü. Sıçanlar anestezinin etkisinden çıkana kadar 37°C ısıtılmış masada bekletildi. Kontrol grubu deney protokolü Şekil 3'de gösterilmiştir.



Şekil 3. Kontrol grubu deney protokolü

Hipertansiyon grubu: Ozmotik mini pompalarına (1 µl /saat Alzet model 2001) 0,01 N asetik asitte çözülen ANG II konuldu. Ozmotik mini pompalar steril tüplere alınarak salınım noktaları yukarıda olacak şekilde SF içerisinde 37°C etüvde, implantasyon zamanına kadar 12 saat bekletildi. Sıçanlar cerrahi işlem yapılmadan önce 10 mg/kg rompun ve 50 mg/kg ketamin anestezisi uygulandı. İki skapulanın arası traş edildi ve batikon ile cerrahi bölge temizlendi ardından orta noktasına insizyon yapıldı ve ozmotik mini pompalar yerleştirilerek dikildi. Dikişler atıldıktan sonra sıçanlara sırasıyla önce batikon ardından % 5 lidokain içeren anestol sürüldü. Sıçanlar anestezinin etkisinden çıkana kadar 37°C ısıtılmış masada bekletildi. Sıçanlara 7 gün boyunca 0,7 mg/kg/gün dozunda ANG II salınımı yapması sağlandı. Hipertansiyon grubu deney protokolü Şekil 4'de gösterilmiştir.



Şekil 4. Hipertansiyon grubu deney protokolü

Her iki grup için 8:50-9:00 saatleri arasında kilo ölçümü ve deneyin 1. gün, 3. gün, 5. gün ve 7. günlerinde saat 9:00-11:30 arasında tail cuff pletismografisi yöntemiyle kuyruktan kan basıncı ölçümü yapıldı. Tüm hayvanlar için deneyin son günü 24 saatlik idrarları toplandıktan sonra; 10 mg/kg rompun ve 50 mg/kg ketamin anestezisi altında kanları ve her iki böreği alınarak eksanguinasyon yöntemiyle ötenazi uygulandı. Böbrekler uzunlamasına ikiye bölünerek sağ böbreğin bir yarısı patolojik inceleme için % 10'luk formalin solüsyonuna konuldu. Diğer parçalar buzlu 0,01 M fosfat tamponu ile yıkandıktan sonra kurutma kâğıdı ile kurutulup tüplere alınarak sıvı azot içerisine konuldu ve cerrahi işlemin sonuna kadar bekletildi. Tüm işlemlerin ardından numuneler –80°C'de analizler yapılıncaya kadar saklandı. Kan örnekleri tüplere alınarak oda sıcaklığında 2 saat bekletildikten sonra soğutmalı santrifüj ile +4°C'de 1000 g'de 15 dk, idrar örnekleri +4°C'de 1000 g'de 20 dk santrifüj edildikten sonra laboratuvar çalışmaları yapılıncaya kadar -80°C'de saklandı.

Kullanılan Cihazlar

Kan basıncı ölçüm cihazı	: MAY NIBP250, Türkiye
Soğutmalı santrifüj	: MPW 350R, Polonya
Derin dondurucu	: Thermo Elektron Corporation, USA
Hassas terazi	: Mettler Toledo, AB204-S, İsviçre
Vorteks	: Heidolp, Almanya
Elisa Yıkama Cihazı	: Biotek, USA
Elisa Okuyucu	: Biotek, USA
Spektrofotometre	: Spectronic Unicam Helios α, İngiltere
Su banyosu	: Nickel Clifton Elektro LTD, İngiltere
Otomatik pipetler	: Biohit Proline, Finlandiya, Mettler Toledo, İsviçre
pH metre	: InoLab, Level 1, Almanya
Manyetik karıştırıcı	: Biosan, Letonya
Homojenizatör	: Polytron Kinematica AG, İsviçre
Otoanalizör	: Kanelab Prime 60i, Finlandiya
Distile su cihazı	: Millipore, Fransa

Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Val^5 anjiotensin II	: Sigma, Amerika
Tiyobarbitürik asit	: Sigma, Almanya
Sülfanilamid	: Sigma, Almanya
DTNB	: Sigma, Almanya
NaCl	: Sigma, Almanya
NND	: Sigma, Almanya
$CuSO_4$	: Panreac, İspanya
EDTA	: Merck, Almanya
Piridin	: Merck, Almanya
Sodyum dodesil sülfat	: Merck, Almanya
NaOH	: Merck, Almanya
KH_2PO_4	: Merck, Almanya
Na_2HPO_4	: Merck, Almanya
Glisin	: Merck, Almanya
KCl	: Merck, Almanya
HCl	: Merck, Almanya
Asetik asit	: Merck, Almanya
Na_2CO_3	: Riedel de Haen, Almanya
Butanol	: Riedel de Haen, Almanya
Etanol	: Riedel de Haen, Almanya
Ozmotik mini pompa	: Alzet Katalog no: AP 2001
Rat AD(Adropin) Elisa Kit	: Katalog No: E-EL-R2566
Rat Ang 2 (Angiotensin 2) Elisa Kit	: Elabscience katolog no E-EL-R1430
Rat MAU (Microalbuminuria) Elisa Kit	: Elabscience katolog no E-EL-R0025
Rat Nesfatin-1 Elisa Kit	: Elabscience katalog no: E-EL-R2514
Anti-CLDN2 / Claudin 2 Antibody	: Lifespan katalog no:LS-C353134

Kan Basıncı Ölçümleri

Bilinci yerinde olan sıçanların sistolik kan basıncı, diyastolik kan basıncı ve kalp hızı ölçümleri kuyruktan indirekt olarak tail-cuff pletismografi yöntemi ile yapıldı. Ölçümler için sıçanlar önce restrainera yerleştirildi. Restrainera alınan sıçanların kuyruğuna cihazın kaf ve sensörü yerleştirildi ve 15-20 dakika kuyruk arter dilatasyonu sağlanıp, ölçüm için düzenli sinyaller alınana kadar ısıtma kabininde

ısıtıldı. Ölçümler sessiz ve sakin laboratuvar ortamında yapıldı. Ölçüm yapabilmek için sıçanların sakin ve hareketsiz olması gerektiğinden dolayı ölçüm boyunca sıçanlar sürekli gözlendi. Gözlem süresince sinyallerin düzenli ve deneğin sakin olduğu anlarda ölçüm alınarak deftere kaydedildi. Her ölçümden sonra 1 dakika beklendi. Her bir sıçan için 5 adet düzgün kan basıncı ve kalp hızı ölçüm değerleri bilgisayara kaydedildi. Daha sonra her bir sıçan için, sıçanların 5 ölçüm değerinden en büyük ve en küçük değerler çıkarılarak geriye kalan 3 değerin ortalamaları alındı. Deney boyunca kan basıncı ve nabız ölçüm işlemleri aynı çalışmacı tarafından gerçekleştirildi. Ortalama kan basıncı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$OKB = DKB + \frac{(SKB - DKB)}{3}$$

OKB: Ortalama kan basıncı

SKB: Sistolik kan basıncı

DKB: Diyastolik kan basıncı

Biyokimyasal Çalışmalar

Serum örnekleri oda ısısında 2 saat süre ile bekletildikten sonra 1000 g 15 dk +4°C'de santrifüj edilmiş, idrar örnekleri deneyin son günü 24 saatlik idrarları toplanıp 1000 g 20 dk +4°C'de santrifüj edilerek elde edilmiştir. Serum; üre, kreatinin, sodyum (Na^+), potasyum (K^+), kreatin kinaz (CK), alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST); idrar; kreatinin, Na^+, K^+ ve protein düzeyleri Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkez Laboratuvarı'nda bulunan otoanalizör ile ölçüldü.

Kreatinin klirensi standart klirens formülüne göre hesaplandı (61).

$$\text{Kreatinin klirensi (ml/dk)} = \frac{\text{İdrar kreatinin (mg/dl)} \times \text{Günlük idrar hacmi}}{\text{Serum kreatinin (mg/dl)} \times 1440}$$

Fraksiyonel sodyum atılımı (FeNa) % aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{FeNa (\%)} = \frac{\text{İdrar Na (mmol/L)} \times \text{Serum kreatinin (mg/dl)}}{\text{İdrar kreatinin (mg/dl)} \times \text{Serum Na (mmol/L)}} \times 100$$

Fraksiyonel potasyum atılımı (FeK) % olarak hesaplandı.

$$FeK\ (\%) = \frac{\text{İdrar K (mmol/L)} \times \text{Serum kreatinin (mg/dl)}}{\text{İdrar kreatinin (mg/dl)} \times \text{Serum K (mmol/L)}} \times 100$$

Doku Örneklerinin Homojenizasyonu

Tüm gruplardan elde edilen böbrek dokuları çalışma yapılıncaya kadar -80 °C'de saklandı. malondialdehitin (MDA) ve glutatyon (GSH) düzeyleri için 0.15 M KCl solüsyonu, NO düzeyleri için 0.01 M PBS (pH 7.2) tamponu %10'luk (w:v) olacak şekilde hazırlandı. Tüpler buz üzerinde tutularak homojenizatör ile homojenize edilerek hazırlanan homojenatlar 1500 g 15 dk +4°C'de santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi. Elisa çalışmalarında kullanılan doku homojenatları ise 0.01 M PBS (pH 7.2) tamponu ile %10'luk (w:v) olacak şekilde hazırlanarak 5000 g 5 dk +4°C'de santrifüj edilerek hazırlandı.

Malondialdehit Miktar Tayini

Lipit peroksidasyonunun bir belirteci olan MDA'nın sıcak ve asidik ortamda tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girmesi neticesinde ortaya çıkan pembe renk spektrofotometrik yöntemle ölçüldü (62,63).

Çözeltiler

1. %8.1'lik Sodyum dodesil sülfat (SDS)
2. %20'lik Asetik asit (NaOH ile pH 3.5 olarak ayarlandı)
3. %0.8'lik Titobarbitürik asit (TBA)
4. N-Bütanol/Piridin (15:1)

Deneyin yapılışı: 0.2 ml doku homojenatı; 0.2 ml %8.1'lik SDS, 1.5 ml %20'lik asetik asit, 1.5 ml %0.8'lik TBA ve 0.6 ml distile su ile karıştırıldı. Karışım 1 saat süre ile 95 °C'deki sıcak su banyosunda tutuldu. Musluk suyu altında soğutulduktan sonra üzerine 1 ml distile su ve 5 ml butanol/piridin eklenerek 1 dABHka vorteksle karıştırıldı. Organik fazın ayrılması için 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda ayıraç körüne karşı absorbanslar okundu.

Sonuçların hesaplanması;

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

A : Absorbans

Vt : Total reaksiyon hacmi

10^9: Molün nanomole çevrilmesi

Vs : Total reaksiyon içindeki numune sayısı

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

L : Küvet çapı

10^3 : Litrenin mililitreye çevrilmesi

Sonuçlar MDA nmol/mg protein olarak ifade edildi.

Glutatyon Düzeyinin Ölçümü

Ellman ayıracı ile doku homojenatlarındaki serbest sülfidril gruplarının oluşturduğu rengin spektrofotometrik olarak saptanması glutatyon düzeyinin belirlenmesi için kullanıldı (62, 63).

Çözeltiler

1. Proteinsizleştirme çözeltisi: 120 g NaCl, 6.68 g metafosforik asit ve 0.8 g sodyum-EDTA atrtıldı ve 400 ml distile suda çözüldü.
2. 0.3 M Disodyum fosfat (Na_2HPO_4),
3. 1 mM Ellman ayıracı: 4 mg 5.5-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit, DNTB), 10 ml %1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözüldü.

Deneyin yapılışı: 0.25 ml doku homojenatı üzerine 0.75 ml 0.15 M KCl ve 1.5 ml proteinsizleştirme çözeltisi eklendi. Bu karışım 20 dk 3000 rpm'de santrifüj edildi. 0.5 ml süpernatant üzerine 2 ml 0.3 M disodyum sülfat ve 0.5 ml ellman ayıracı eklendi. Spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda ayıraç körüne karşı absorbanslar okundu. Ekstinksiyon katsayısı (∑01.36 104 M^{-1} cm^{-1}) kullanılarak GSH düzeyleri hesaplandı. Sonuçlar GSH/mg protein olarak bildirildi.

Nitrat ve Nitrit Tayini

Nitrat ve nitrit tayini Cartos ve Wakid yöntemi kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü (64).

Çözeltiler

Kadmiyum granülleri: 0.1 mol H_2SO_4 içinde saklandığı sürece 9 ay stabildir.

Glisin-NaOH buffer: 7.5 g glisin bir miktar distile suda çözüldü. 2 mol NaOH çözeltisi ile pH'sı 9.7'ye ayarlandı. Bu çözelti 1 ay 0-8 ˚C'de stabildir.

Sülfanilamid: 5 g sulfanilamid 3 mol sıcak HCl içinde çözülür ve daha sonra soğumaya bırakıldı. 1 yıl oda sıcaklığında stabil kalabilir.

N-naphthylethylene diamine (NNDA): 50 g NNDA 250 ml distile su içinde çözüldü. 2 ay 0-8 ˚C'de stabildir.

Çinko sülfat (ZnSO4): 75 mM; 10.8 g alınıp 500 ml'ye tamamlandı.

Bakır sülfat ($CuSO_4$): 5 mM; 250 mg alınıp 200 ml'ye tamamlandı.

Sodyum hidroksit (NaOH): 55 mM; 1.1 g alınıp 500 ml ye tamamlandı.

Standartlar: $NaNO_2$ standardı 10 mM'lik sodyum tetra borat çözeltisi içinde hazırlandı (69 mg $NaNO_2$, 380 mg borat ($Na_2B_4O_7.10H_2O$) 100 ml içinde çözüldü).

KNO_3 standardı: 102 mg potasyum nitrat alınıp 10 mM'lik 100 ml sodyum tetra borat içinde çözüldü.

Deneyin yapılışı:

Deproteinizasyon: Test tüpüne 0.5 ml distile su, 2 ml $ZnSO_4$, 2.5 ml NaOH ilave edilip 10 dakika oda ısısında beklettikten sonra 4000 g'de 20 dakika santrifüj edildi.

Kadmiyum granüllerinin aktivasyonu: Granüller 3 defa distile su ile yıkanır. 1-2 dakika içinde $CuSO_4$ içinde çalkalanarak bekletilip, 3 defa da glisin-NaOH ile yıkanıp 10 dakika içinde kullanılmak üzere kurutma kağıdı ile kurutuldu.

Sonucun hesaplanması: KNO_3'ün 10 milimolarlık çözeltisinden 1; 5; 10; 25; 50; 75; 100; 200 milimolarlık seri dilisyonlar hazırlandı ve numunelere uygulanan tüm işlemler standartlara da uygulandı. Tüm tüplere 1 ml glisin-NaOH tamponu konuldu. 1'er ml deproteinize numunelerden ve standartlardan alındı. 2.5 g tartılan ve aktivasyon işleminden geçirilen kadmiyumlardan tüm tüplerin üzerine konuldu. 90 dakika oda ısısında karıştırılarak beklendi.

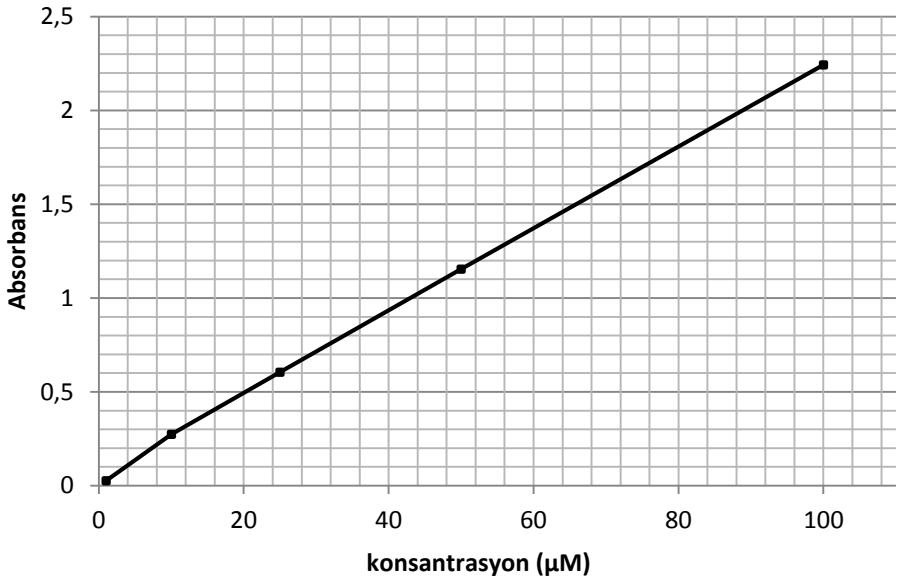
Nitrit Ölçümü

Bu tüplerden 90 dk'lık süre sonunda 2'şer ml alınarak üzerine 1 ml sülfanilamid ve 1 ml N-napthiletilen diamin (NNDA) ilave edildi. Karıştırıldı ve 45 dakika beklendikten sonra 545 nm'de okuma yapıldı.

Direkt nitrit ölçümü: $NaNO_2$ standartları 1; 5; 10; 25; 50; 75; 100; 200 milimolarlık seri dilisyonlar hazırlandı ve deproteinize numunelerden kadmiyum ile reaksiyona sokmadan direkt olarak 2'şer ml alınarak ayrı tüplere konuldu. Üzerine 1 ml sülfanilamid ve 1 ml NNDA eklendi. 45 dakika sonra 545 nm'de okuma yapıldı (Şekil 5).

Nitrat Aktivitesinin Hesaplanması

Nitrit değerleri bulunan nitrat değerlerinden çıkarıldıktan sonra sulandırma faktörü olan 20 ile çarpılıp yine nitrat standardından elde edilen faktör ile çarptıktan sonra çıkan sonuç µmol/mg protein olarak hesaplandı.



Şekil 5. NO standart çalışması regresyon grafiği

Böbrek Doku Protein Düzeyinin Ölçülmesi

Doku protein düzeyleri, alkali bakır tartarat ayıracının peptid bağları ile kompleks yapması prensibine dayanan Lowry yöntemi ile saptandı (65). Her 7 yada 8 amino asit artığı 1 bakır atomunu bağlar. Fenol ayıracı; bakır ile muamele edilmiş karışıma ilave edildiğinde mavi-mor renk oluşur. Oluşan renk 660 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Çözeltiler:

Fenol ayıracı: 2 N folin ayıracından 2,5 ml alınarak distile su ile 45 ml'ye tamamlanır. Bu ayıraç her kullanım için taze hazırlanmalıdır.

Alkali bakır ayıracı: 10 g Na_2CO_3, 0.25 g Na-K Tartarat, 0.05 g $CuSO_4$; ayrı ayrı tartılarak 0.5 N NaOH içinde balon jojede çözülür ve çözelti 0.5 N NaOH ile 100 ml'ye tamamlanır. Bu çözelti 4ºC'de 1 ay saklanabilir.

Albumin standardının hazırlanması: %5 mg'lık albumin standardı hazırlamak için mevcut 5 g/dl' lik albumin standardı kullanılmıştır. Albumin solüsyonundan 0.1 ml alınarak ve distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak %5 mg'lık albumin standardı elde

edilmiş olur. Deneyde kullanılacak standart protein konsantrasyonu %2 mg olarak belirlendiğinden, stok protein standardı sulandırılarak istenilen konsantrasyon elde edildi.

Deneysel İşlemler: Doku süpernatantları 1/20 oranında serum fizyolojik ile sulandırılıp vorteks yardımı ile iyice karıştırılarak protein ölçümü için elverişli hale getirildi. Numaralandırılmış deney, kör ve standart tüpleri hazırlandı. Deney tüpüne 1/50 oranında sulandırılmış olan süpernatanttan 0.5 ml standart tüpüne %2'lik standarttan 0.5 ml ve kör tüpüne de 0.5 ml distile su konuldu. Ardından her tüpe 0.5 ml alkali bakır ayıracı ilave edildi. Tüpler vortekslenerek iyice karışmaları sağlandı. 10 dakika oda ısısında bekletildikten sonra her tüpe 2 ml fenol ayıracı eklendi ve tekrar vortekslendi. 30 dakika 37ºC'lik su banyosunda bekletildikten sonra; tüplerin köre karşı absorbansları 660 nm. dalga boyunda spektrofotometre ile okundu.

Protein Düzeyinin Hesaplanması

Protein değerlerinin hesaplanması için aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$\text{Protein miktarı (\% mg protein)} = \frac{\text{Deney absorbansı} \times 20 \times 2 \times 2}{0.042}$$

20: Süpernatantın serum fizyolojik ile sulandırılma katsayısı

2: Süpernatantın 1 ml' ye tamamlanma katsayısı

2: Protein standardının konsantrasyonu

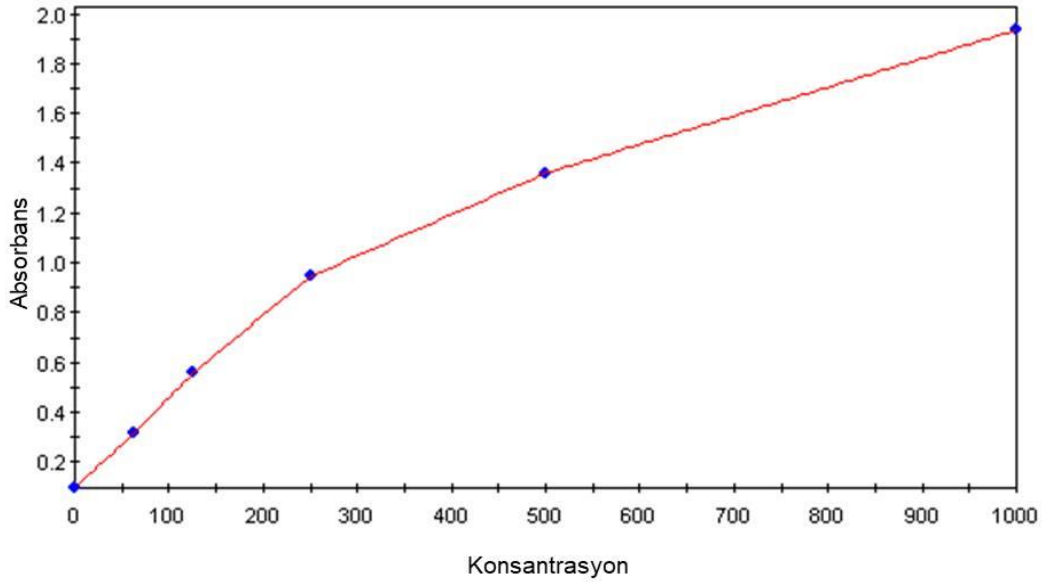
0.042: Standart proteinin absorbansı

Protein miktarı (% mg protein) = Deney Absorbansı x 1904,76 olarak formüle edildi. Elde edilen % mg protein, 100 ml'deki protein değeridir. Sonuç 100'e bölünerek protein miktarı mg/ml olarak hesaplandı.

Nesfatin-1 ölçümü

Serum, idrar ve böbrek homojenat örneklerinde yapılan nesfatin-1 ölçümleri Elabscience Rat NES1 (Nesfatin 1) ELISA Kit (Katalog No: E-EL-R2514) ticari test kiti kullanılarak yapıldı. Deneysel çalışmalar yapılıncaya kadar -80°C'de saklanan örnekler ve kullanılacak çözeltiler oda ısısına getirildi. Kit prosedüründe belirtilen örnek ve standartlar hazırlanarak ilgili kuyucuklara 100 µL pipetlendi. Nazikçe karıştırıldıktan sonra 37°C'de 90 dk etüvde bekletildi. Bu sürenin sonunda etüvden çıkarılan plaka içeriği dikkatli bir şekilde boşaltılarak, prosedüründe belirtildiği gibi

100 kat dilüe edilen biotinlenmiş antikor 100 µL hacminde örnek ve standartlar olmak üzere tüm kuyucuklara pipetlendi, nazikçe karıştırıldıktan sonra 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Ardından laboratuvarımızda bulunan otomatik plaka yıkama cihazı ile kitte belirtilen koşullarda 3 kez yıkama yapıldı. Prosedürde belirtildiği gibi 100 kat dilüe edilen HRP-Konjugat antikoru her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde pipetlenerek, nazikçe karıştırıldıktan sonra 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Ardından otomatik plaka temizleyici ile kitte belirtilen koşullarda 5 kez yıkama yapıldı. Yıkamanın ardından 90 µL substrat solüsyonu pipetlenerek, nazikçe karıştırıldıktan sonra 37°C'de 15 dk inkübe edildi. İnkübasyonun ardından her kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu pipetlenerek reaksiyon durduruldu ve 450 nm'de elisa reader cihazında absorbans okumaları yapıldı. Çalışmanın standart regresyon grafiği Şekil 6'da verilmiştir.

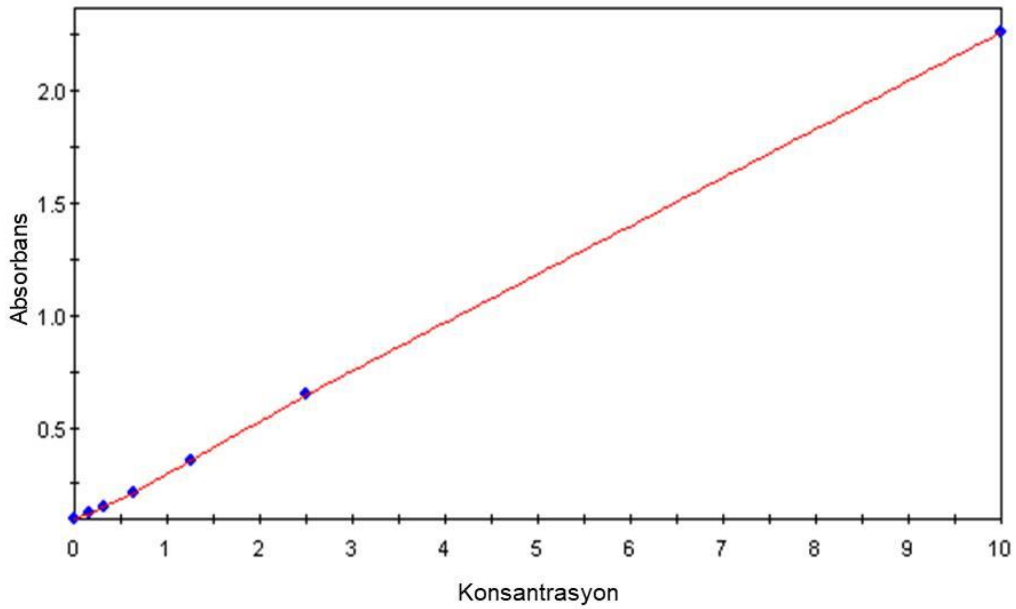


Şekil 6. Nesfatin-1 standart çalışması regresyon grafiği

Adropin ölçümü

Serum, idrar ve böbrek homojenat örneklerinde yapılan nesfatin-1 ölçümleri Elabscience Rat AD (Adropin) ELISA Kit (Katalog No: E-EL-R2566) ticari test kiti kullanılarak yapıldı. Deneysel çalışmalar yapılıncaya kadar -80°C'de saklanan örnekler ve kullanılacak çözeltiler oda ısısına getirildi. Kit prosedüründe belirtilen örnek ve standartlar hazırlanarak ilgili kuyucuklara 100 µL pipetlendi. Nazikçe karıştırıldıktan sonra 37°C'de 90 dk etüvde bekletildi. Bu sürenin sonunda etüvden çıkarılan plaka içeriği dikkatli bir şekilde boşaltılarak, prosedüründe belirtildiği gibi

100 kat dilüe edilen biotinlenmiş antikor 100 µL hacminde örnek ve standartlar olmak üzere tüm kuyucuklara pipetlendi, nazikçe karıştırıldıktan sonra 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Ardından laboratuvarımızda bulunan otomatik plaka yıkama cihazı ile kitte belirtilen koşullarda 3 kez yıkama yapıldı. Prosedürde belirtildiği gibi 100 kat dilüe edilen HRP-Konjugat antikoru her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde pipetlenerek, nazikçe karıştırıldıktan sonra 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Ardından otomatik plaka temizleyici ile kitte belirtilen koşullarda 5 kez yıkama yapıldı. Yıkamanın ardından 90 µL substrat solüsyonu pipetlenerek, nazikçe karıştırıldıktan sonra 37°C'de 15 dk inkübe edildi. İnkübasyonun ardından her kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu pipetlenerek reaksiyon durduruldu ve 450 nm'de elisa reader cihazında absorbans okumaları yapıldı. Çalışmanın standart regresyon grafiği Şekil 7'de verilmiştir.

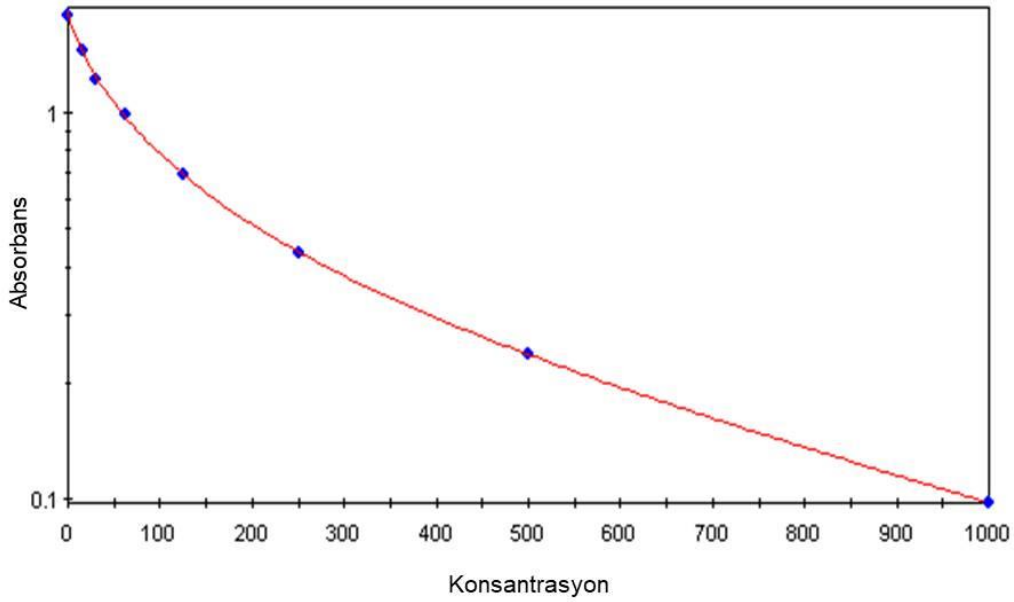


Şekil 7. Adropin standart çalışması regresyon grafiği

Anjiotensin II Ölçümü

Serum, idrar ve böbrek homojenat örneklerinde yapılan nesfatin-1 ölçümleri Elabscience Rat Ang-II (Angiotensin II) ELISA Kit (Katalog No: E-EL-R1430) ticari test kiti kullanılarak yapıldı. Deneysel çalışmalar yapılıncaya kadar -80°C'de saklanan örnekler ve kullanılacak çözeltiler oda ısısına getirildi. Kit prosedüründe belirtilen örnek ve standartlar hazırlanarak ilgili kuyucuklara 50 µL pipetlendi. Nazikçe karıştırıldıktan sonra 37°C'de 45 dk etüvde bekletildi. Bu sürenin sonunda etüvden çıkarılan plaka içeriği dikkatli bir şekilde boşaltılarak, prosedüründe belirtildiği gibi

100 kat dilüe edilen biotinlenmiş antikor 100 µL hacminde örnek ve standartlar olmak üzere tüm kuyucuklara pipetlendi, nazikçe karıştırıldıktan sonra 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Ardından laboratuvarımızda bulunan otomatik plaka yıkama cihazı ile kitte belirtilen koşullarda 3 kez yıkama yapıldı. Prosedürde belirtildiği gibi 100 kat dilüe edilen HRP-Konjugat antikoru her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde pipetlenerek, nazikçe karıştırıldıktan sonra 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Ardından otomatik plaka temizleyici ile kitte belirtilen koşullarda 5 kez yıkama yapıldı. Yıkamanın ardından 90 µL substrat solüsyonu pipetlenerek, nazikçe karıştırıldıktan sonra 37°C'de 15 dk inkübe edildi. İnkübasyonun ardından her kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu pipetlenerek reaksiyon durduruldu ve 450 nm'de elisa reader cihazında absorbans okumaları yapıldı. Çalışmanın standart regresyon grafiği Şekil 8'de verilmiştir.

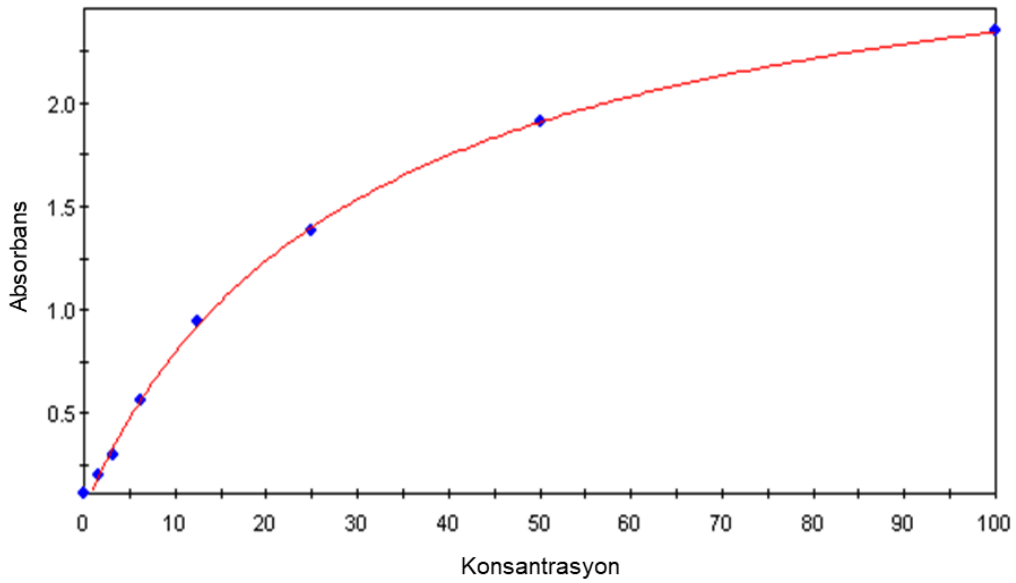


Şekil 8. Anjiotensin II standart çalışması regresyon grafiği

Mikroalbuminüri (MAU) Ölçümü

Serum, idrar ve böbrek homojenat örneklerinde yapılan nesfatin-1 ölçümleri Elabscience Rat MAU (Microalbuminuria) ELISA Kit (Katalog No: E-EL-R0025) ticari test kiti kullanılarak yapıldı. Deneysel çalışmalar yapılıncaya kadar -80°C'de saklanan örnekler ve kullanılacak çözeltiler oda ısısına getirildi. Kit prosedüründe belirtilen örnek ve standartlar hazırlanarak ilgili kuyucuklara 100 µL pipetlendi. Nazikçe karıştırıldıktan sonra 37°C'de 90 dk etüvde bekletildi. Bu sürenin sonunda etüvden çıkarılan plaka içeriği dikkatli bir şekilde boşaltılarak, prosedüründe

belirtildiği gibi 100 kat dilüe edilen biotinlenmiş antikor 100 µL hacminde örnek ve standartlar olmak üzere tüm kuyucuklara pipetlendi, nazikçe karıştırıldıktan sonra 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Ardından laboratuvarımızda bulunan otomatik plaka yıkama cihazı ile kitte belirtilen koşullarda 3 kez yıkama yapıldı. Prosedürde belirtildiği gibi 100 kat dilüe edilen HRP-Konjugat antikoru her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde pipetlenerek, nazikçe karıştırıldıktan sonra 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Ardından otomatik plaka temizleyici ile kitte belirtilen koşullarda 5 kez yıkama yapıldı. Yıkamanın ardından 90 µL substrat solüsyonu pipetlenerek, nazikçe karıştırıldıktan sonra 37°C'de 15 dk inkübe edildi. İnkübasyonun ardından her kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu pipetlenerek reaksiyon durduruldu ve 450 nm'de elisa reader cihazında absorbans okumaları yapıldı. Çalışmanın standart regresyon grafiği Şekil 9'da verilmiştir.



Şekil 9. Mikroalbuminüri (MAU) standart çalışması regresyon grafiği

Histolojik Çalışmalar

Işık mikroskobik inceleme: Sagital olarak ikiye bölünen sağ böbrek dokularının birer yarısı %10'luk tamponlu formalin solüsyonunda 24 saat boyunca fikse edildi. Dokular parafin bloklara gömülerek, 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Bu kesitler ışık mikroskobunda patolojik değerlendirme için hematoksilen-eozin (HE) ile boyandı. Renal hasarın derecesini değerlendirmek için semikantitatif bir skala ile

skorlama yapıldı. Renal hasarın derecesi; tübüler hücre nekrozu, sitoplazmik vakuol oluşumu, tübüler dilatasyon değerlendirilerek belirlendi. Skala değerlendirmesi:

0: Normal böbrek

1: Minimal hasar (%0-5 tutulum)

2: Hafif dereceli hasar

3: Orta dereceli hasar (%25-75 tutulum)

4: Şiddetli hasar (%75-100 tutulum) olarak değerlendirilmiştir.

Ek olarak kast gözlenen tübüller % cinsinden ifade edildi. Toplayıcı kanalların olmadığı alanlarda sayım yapılması göz önünde bulundurularak sadece proksimal ve distal tübüllerin bulunduğu alanlarda sayım yapılmıştır.

İmmünohistokimyasal çalışmalar: Bu çalışmada aranacak proteine karşı geliştirilmiş işaretli poliklonal ya da monoklonal antikorlar kullanıldı. Tüm gruplardaki %10'luk formoline fikse edilen parafine gömülü doku bloklarından 2 mikronluk kesitler alınarak, poly-L-lysine (PLL) ile kaplanmış lamlara alındı. 37 °C'lik etüvde bir gece bekletildi. İki kez 15 dakikalık sürelerle ksilol ile deparafinize edildi. Kesitler saf alkolden başlayarak %90-80-70'lik alkollerden geçirildikten sonra distile su ile yıkandı. Böylece deparafinizasyon işlemi tamamlanmış oldu. Kesitler daha sonra tampon solüsyon içinde mikrodalga fırında 4 kez 5 dk kaynatıldı ve oda ısısında 20 dk soğumaya bırakıldı. Bu işlemden sonra distile su ile yıkanan kesitler tris-buffer solüsyonuna atıldı. Endojen peroksit kaynaklı non-spesifik zemin boyamasını azaltmak için %3'lük hidrojen peroksit ile 20 dk muamele edildi. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra tekrar tris-buffer solüsyonuna atıldı. Non-spesifik zemin boyanmasını önlemek için 5 dk oda ısısında Ultra V-Blok (protein blokajı) uygulaması yapıldı. Daha sonra "Claudin 2 Antibody (C-Terminus)" antikoru ile 30 dk inkübe edildi. Tris-buffer ile 3 kez yıkanan kesitler biotinyalated sekonder antikorlar ile 20dk, enzim işaretli streptavidin ile 20 dk inkübe edildi. Tris-buffer'e alınan kesitler amino-etilkarbazol (AEC) kromojen'de 20'şer dk tutuldu. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra Mayer's Hematoksilen ile 3 dk inkübe edilerek zıt boyama yapıldı. Kesitler su ile bolca yıkandıktan sonra aqueous-mount jel ile kapatıldı. Her bir olgu için hazırlanan kesitler ışık mikroskobunda incelendi. İmmün boyamanın spesifikliğinin kontrolünde, pozitif kontrol amacıyla antikor üretici firma verilerine uygun olarak sıçan böbrek kesitleri kullanıldı. Olgular sitoplazmik boyamanın yoğunluğu açısından değerlendirildi. Boyanma yoğunluğu, doku kesitlerinde sitoplazmik boyanma gösteren

hücrelerin kromojen ile boyanma yoğunluğunu yansıtmakta olup, hiç boyanma gözlenmeyen olgularda 0, hafif boyanan olgularda +1, orta yoğunlukta boyanan olgularda +2, kuvvetli boyanan olgularda +3 olarak skorlandı.

İstatistiksel Analiz

Çalışmamızda elde edilen bulgular ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. Gruplar arası farklılığı karşılaştırmada Mann-Whitney U testi kullanıldı. $p<0.05$ istatistiksel anlamlılık sınır değeri olarak kabul edildi. Korelasyon analizi için Spearman rho testi kullanıldı. Korelasyon değerlerinin yorumlanmasında; 0-(±0.25) çok zayıf veya hiçbir korelasyon yok, ±(0.25-0.50) zayıf korelasyon, ±(0.50-0.75) orta düzeyli korelasyon, ve >±0.75 yüksek korelasyon, olarak değerlendirildi. İstatistiksel analizlerde SPSS 20.0 (Lisans No: 10240642) paket programı kullanıldı.

BULGULAR

Çalışmamızda 16 adet 240-260 gram ağırlığında Spraque-Dawley türü erkek sıçanlar kullanıldı. Her grupta 8'er adet sıçan olacak şekilde kontrol ve hipertansiyon olmak üzere 2 adet gruba ayrıldı. Deneyin son günü 24 saatlik idrarları toplanan sıçanlara anestezi verilerek kan ve doku örnekleri alındı. Gruplarda herhangi bir ölüm görülmezken, hipertansiyon grubunun 6 numaralı hayvanında deneyin son günü bacaklarda felç gözlendi.

Kan Basıncı Bulguları

Her iki grup için SKB, DKB, OKB ve nabız değerleri 0. gün, 1. gün, 3. gün 5. gün ve 7. günlerde tail-cuff pletismografi yöntemi ile ölçüldü. Gruplara ait kan basıncının ve nabız sayısının ortalama (ORT)±standart sapma (SD) değerleri ile Mann-Whitney U testinin istatistiksel sonuçları Tablo 2-5'de gösterildi.

Tablo 2. Grupların sistolik kan basıncı (mm Hg) bulguları

Ölçüm Günleri	KONTROL GRUBU	HİPERTANSİYON GRUBU	p değeri
	ORT+SD	ORT+SD	
0. GÜN	130,80±2,06	127,41±2,94	=0,053
1. GÜN	130,38±5,02	151,71±11,46	<0,001
3. GÜN	132,41±3,08	166,85±22,60	=0,002
5. GÜN	131,99±2,97	199,66±21,72	<0,001
7. GÜN	131,99±4,44	208,26±21,30	=0,001

Tablo 3. Grupların diyastolik kan basıncı (mm Hg) bulguları

Ölçüm Günleri	KONTROL GRUBU	HİPERTANSİYON GRUBU	p değeri
	ORT+SD	ORT+SD	
0. GÜN	107,73±4,20	104,79±5,36	=0,302
1. GÜN	94,79±6,18	125,75±12,50	<0,001
3. GÜN	97,99±7,31	140,05±19,65	=0,001
5. GÜN	102,28±7,50	172,15±17,27	<0,001
7. GÜN	97,70±10,65	181,36±17,56	=0,001

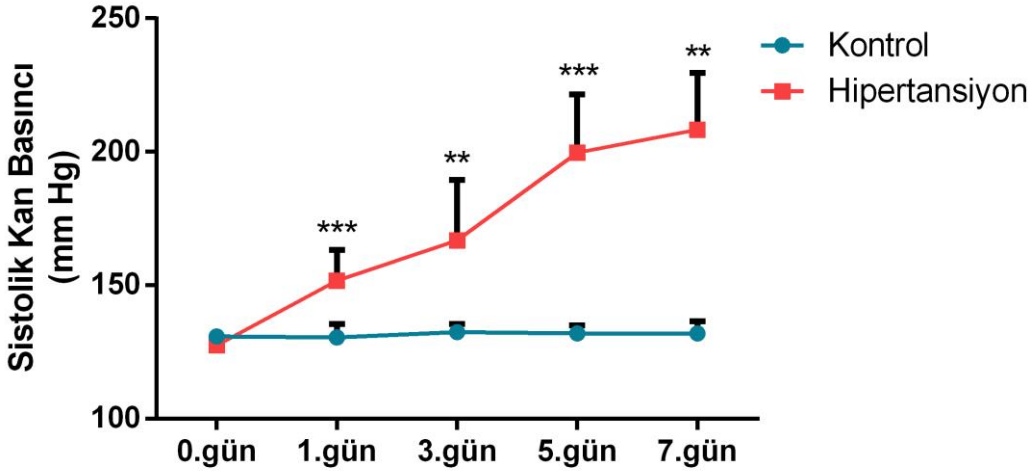
Tablo 4. Grupların ortalama kan basıncı (mm Hg) bulguları

Ölçüm Günleri	KONTROL GRUBU	HİPERTANSİYON GRUBU	p değeri
	ORT+SD	ORT+SD	
0. GÜN	115,42±2,50	112,33±3,98	=0,121
1. GÜN	106,65±4,63	134,40±11,52	<0,001
3. GÜN	109,47±5,44	148,98±20,23	=0,002
5. GÜN	112,18±5,20	181,32±18,12	<0,001
7. GÜN	109,13±7,53	190,32±18,23	=0,001

Tablo 5. Grupların nabız sayısı (atım/dk) bulguları

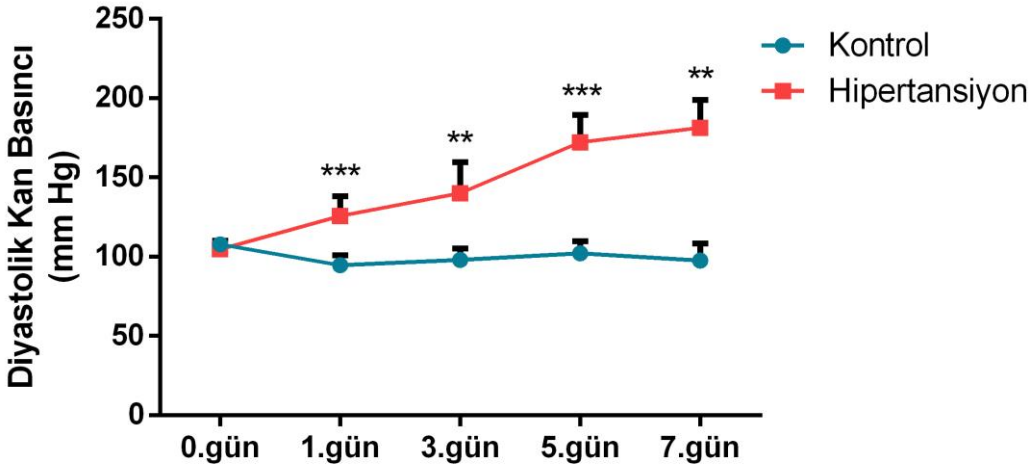
Ölçüm Günleri	KONTROL GRUBU	HİPERTANSİYON GRUBU	p değeri
	ORT+SD	ORT+SD	
0. GÜN	377,08±31,39	392,08±19,21	=0,245
1. GÜN	378,34±29,17	369,38±32,21	=0,563
3. GÜN	383,48±33,42	359,27±44,66	=0,208
5. GÜN	375,12±12,06	383,87±51,76	=0,462
7. GÜN	392,68±25,39	411,77±89,71	=0,298

Kontrol grubuna göre hipertansiyon grubunda SKB değerleri 0. gün ölçümleri karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0,05$); 1.gün ($p<0,001$), 3.gün ($p<0,01$), 5.gün ($p<0,001$) ve 7.gün ($p<0,01$) ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı. SKB değerleri Şekil 10'da gösterildi.



Şekil 10. Gruplar arası sistolik kan basıncı değerlerinin karşılaştırılması (**p< 0,01; ***p< 0,001)

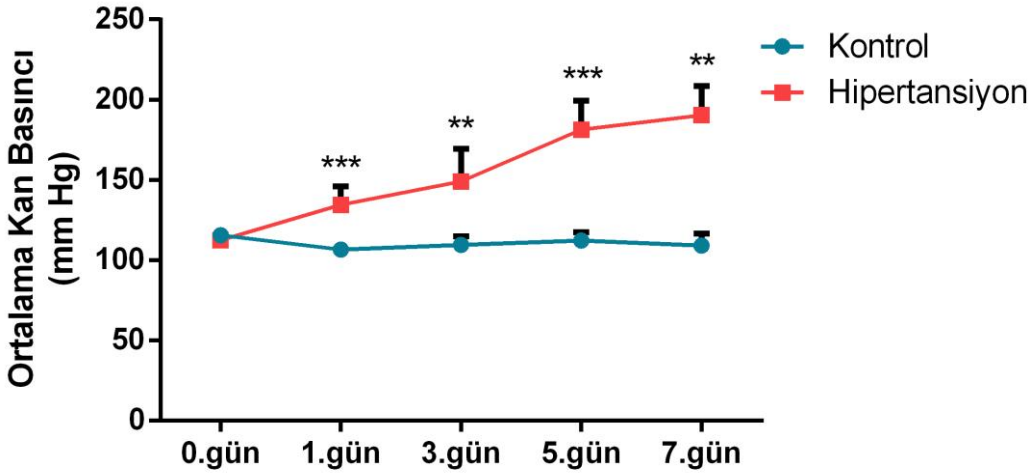
Kontrol grubuna göre hipertansiyon grubunda DKB değerleri 0. gün ölçümleri karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi (p>0,05); 1.gün (p<0,001), 3.gün (p<0,01), 5.gün (p<0,001) ve 7.gün (p<0,01) ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı. DKB değerleri Şekil 11'de gösterildi.



Şekil 11. Gruplar arası diyastolik kan basıncı değerlerinin karşılaştırılması (**p< 0,01; ***p< 0,001)

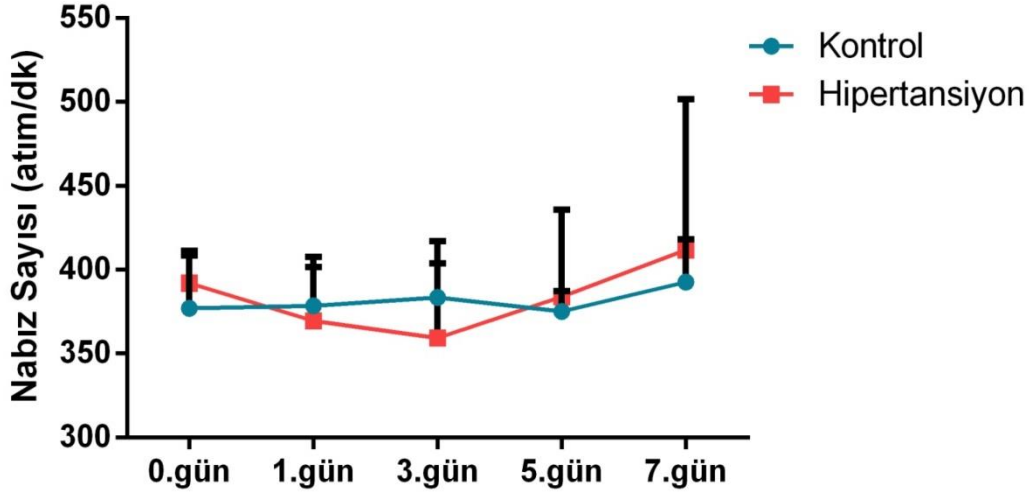
Kontrol grubuna göre hipertansiyon grubunda OKB değerleri 0. gün ölçümleri karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi

(p>0,05); 1.gün (p<0,001), 3.gün (p<0,01), 5.gün (p<0,001) ve 7.gün (p<0,01) ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı. OKB değerleri Şekil 12'de gösterildi.



Şekil 12. Gruplar arası ortalama kan basıncı değerlerinin karşılaştırılması
(**p< 0,01; ***p< 0,001)

İki grubunda nabız sayıları tüm ölçüm günleri için karşılaştırıldığı istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi (p>0,05). Nabız sayısı değerleri Şekil 13'de gösterildi.



Şekil 13. Gruplar arası nabız sayısı değerlerinin karşılaştırılması

Biyokimyasal Bulgular

Gruplara ait serum sodyum, potasyum, Üre, Kreatinin, CK, ALT, AST, NO, adropin, nesfatin-1 ve ANG II; böbrek MDA, GSH, NO, adropin, nesfatin-1, ANG II; idrar kreatinin, total protein, sodyum, potasyum, NO, adropin, nesfatin-1, ANG II, MAU, fraksiyonel sodyum atılımı, fraksiyonel potasyum atılımı, kreatinin klirensi ve idrar hacmi değişkenlerine ait verilerin, ortalama (ORT)±standart sapma (SD) sonuçları ve istatistiksel değerlendirilmeleri Tablo 6-8'de gösterilmiştir.

Tablo 6. Grupların serum değişkenlerine ait bulgular

PARAMETRELER	KONTROL GRUBU	HİPERTANSİYON GRUBU	p değeri
	ORT+SD	ORT+SD	
Na^+ (mmol/L)	129,63±9,74	130,63±8,58	=0,916
K^+ (mmol/L)	4,75±0,35	3,76±0,55	=0,002
Üre (mg/dl)	38,38±3,07	67,00±22,37	<0,001
Kreatinin (mg/dl)	0,24±0,05	0,33±0,07	=0,020
CK (U/L)	1277,63±324,36	1376,13±531,81	=0,753
ALT (U/L)	50,25±7,15	50,00±9,29	=0,713
AST (U/L)	182,25±26,92	210,50±51,71	=0,345
NO (µmol/L)	6,26±0,81	8,91±2,50	=0,014
Adropin (ng/ml)	0,13±0,09	0,19±0,09	=0,208
Nesfatin-1 (pg/ml)	34,58±23,70	33,04±18,69	=0,916
ANG II (pg/ml)	96,12±14,95	92,29±21,30	=0,600

ALT: Alanin aminotransferaz; **AST:** Aspartat aminotranferaz; **CK:** Kreatin kinaz; **ANG II:** Anjiotensin II; **Na^+:** Sodyum; **K^+:** Potasyum; **NO:** Nitrik oksit

Tablo 7. Grupların böbrek değişkenlerine ait bulgular

PARAMETRELER	KONTROL GRUBU	HİPERTANSİYON GRUBU	p değeri
	ORT+SD	ORT+SD	
MDA (µmol/mg protein)	2,92±0,60	3,79±0,94	=0,016
GSH (µmol/mg protein)	29,97±1,96	32,29±3,74	=0,115
NO (µmol/mg protein)	2,34±1,06	1,74±0,51	=0,141
Adropin (ng/mg protein)	0,54±0,05	0,58±0,06	=0,401
Nesfatin-1 (pg/mg protein)	104,60±13,65	95,75±14,22	=0,345
ANG II (pg/mg protein)	0,74±0,26	0,72±0,41	=0,753

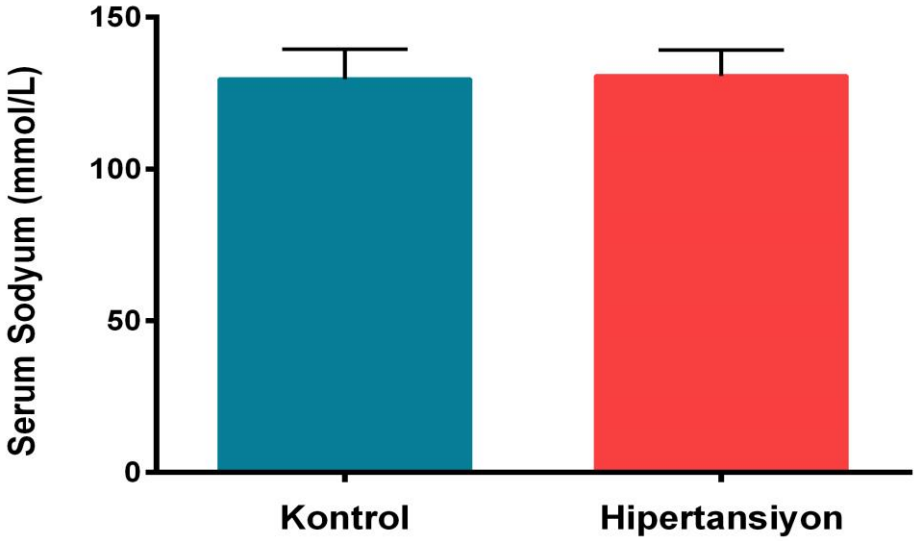
MDA: Malondialdehit; **GSH:** Glutatyon; **NO:** Nitrik oksit; **ANG II:** Anjiotensin II

Tablo 8. Grupların idrar değişkenlerine ait bulgular

PARAMETRELER	KONTROL GRUBU	HİPERTANSİYON GRUBU	p değeri
	ORT+SD	ORT+SD	
Kreatinin (mg/dl)	75,68±11,38	34,14±20,08	=0,001
Total Protein (mg/dl)	183,49±33,15	214,51±152,21	=0,401
Na^+ (mmol/L)	232,38±30,28	102,38±65,51	=0,003
K^+ (mmol/L)	389,13±53,69	167,25±103,66	=0,002
NO (µmol/L)	368,98±60,95	109,75±77,46	=0,001
Adropin (ng/ml)	0,89±0,67	1,88±2,65	=0,462
Nesfatin-1 (pg/ml)	36,29±27,48	55,52±58,76	=0,674
ANG II (pg/ml)	989,19±50,66	646,35±236,93	=0,006
MAU (µg/ml)	31,07±26,36	34,71±34,10	=1,000
Fraksiyonel Sodyum Atılımı (%)	0,57±0,15	0,76±0,28	=0,172
Fraksiyonel Potasyum Atılımı (%)	25,94±6,45	41,52±13,39	=0,009
Kreatinin Klirensi (ml/dk)	2,56±0,53	1,47±0,59	=0,006
İdrar Hacmi (ml/24 saat)	11,38±2,07	22,50±7,99	=0,002

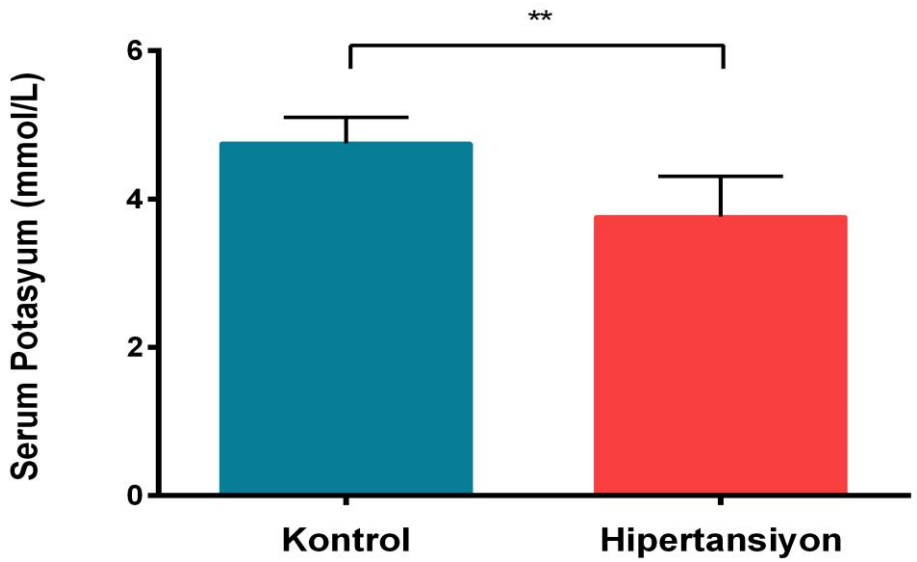
ALT: Alanin aminotransferaz; **AST:** Aspartat aminotranferaz; **MAU:** Mikroalbüminüri; **ANG II:** Anjiotensin II; **Na^+:** Sodyum; **K^+:** Potasyum; **NO:** Nitrik oksit

Gruplar arası serum sodyum düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 14'de gösterildi. Gruplar arası serum sodyum düzeyleri incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi (p>0,05).



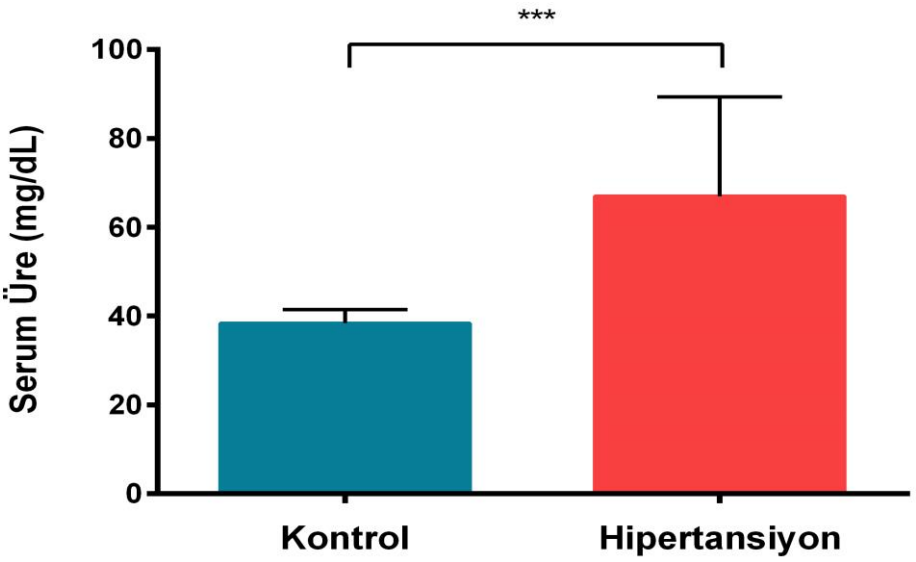
Şekil 14. Gruplar arası serum sodyum düzeylerinin karşılaştırılması

Gruplar arası serum potasyum düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 15'de gösterildi. Gruplar arası serum potasyum düzeyleri karşılaştırıldığında, hipertansiyon grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlendi ($p<0,01$).



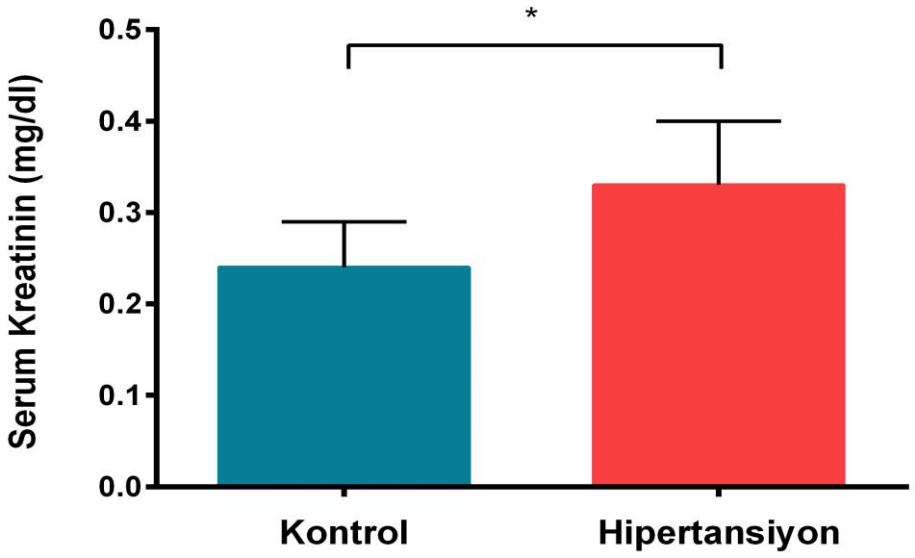
Şekil 15. Gruplar arası serum potasyum düzeylerinin karşılaştırılması (**$p< 0,01$).

Gruplar arası serum üre düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 16'de gösterildi. Gruplar arası serum üre düzeyleri karşılaştırıldığında, hipertansiyon grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı (p<0,001).



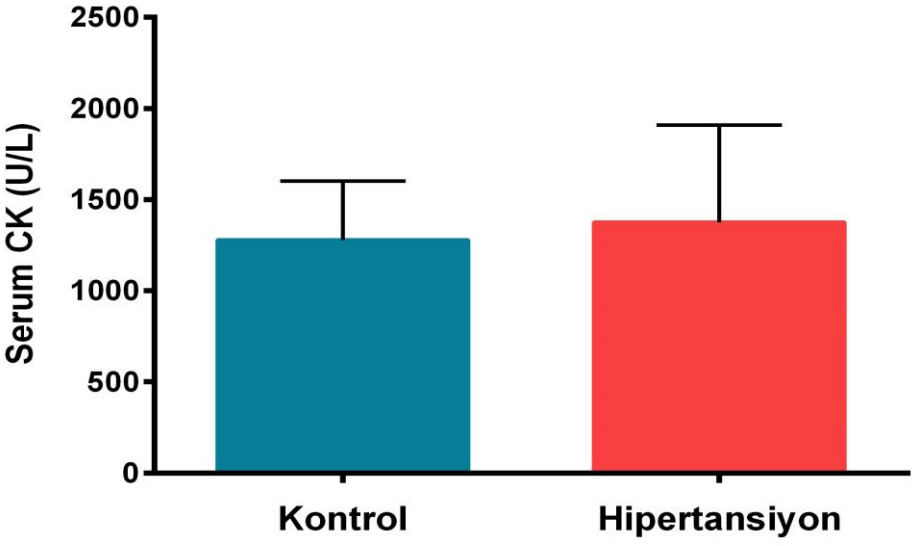
Şekil 16. Gruplar arası serum üre düzeylerinin karşılaştırılması (***p< 0,001).

Gruplar arası serum kreatinin düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 17'de gösterildi. Gruplar arası serum kreatinin düzeyleri karşılaştırıldığında, hipertansiyon grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı (p<0,05).



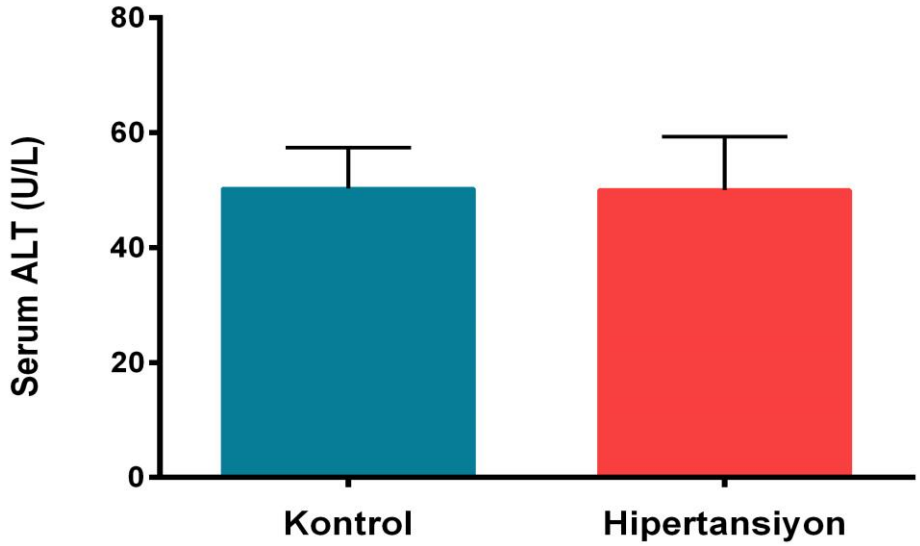
Şekil 17. Gruplar arası serum kreatinin düzeylerinin karşılaştırılması (*p< 0,05).

Gruplar arası serum kreatin kinaz (CK) düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 18'de gösterildi. Gruplar arası serum CK düzeyleri incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi (p>0,05).



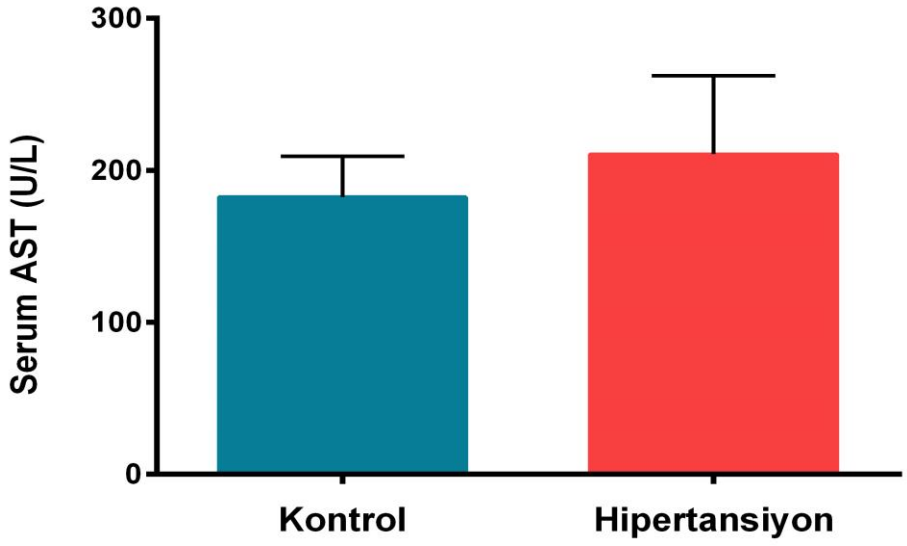
Şekil 18. Gruplar arası serum CK düzeylerinin karşılaştırılması

Gruplar arası serum ALT düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 19'da gösterildi. Gruplar arası serum ALT düzeyleri incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi (p>0,05).



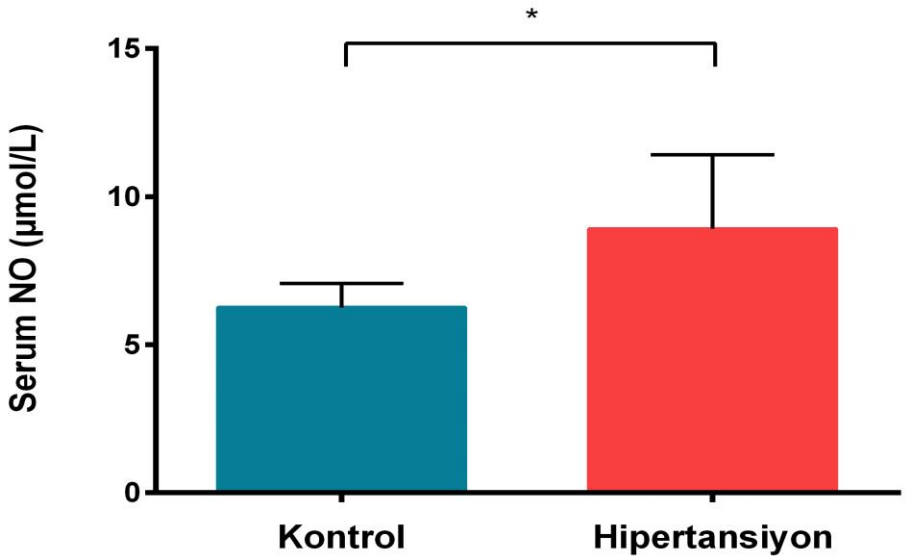
Şekil 19. Gruplar arası serum ALT düzeylerinin karşılaştırılması

Gruplar arası serum AST düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 20'de gösterildi. Gruplar arası serum AST düzeyleri incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi (p>0,05).



Şekil 20. Gruplar arası serum AST düzeylerinin karşılaştırılması

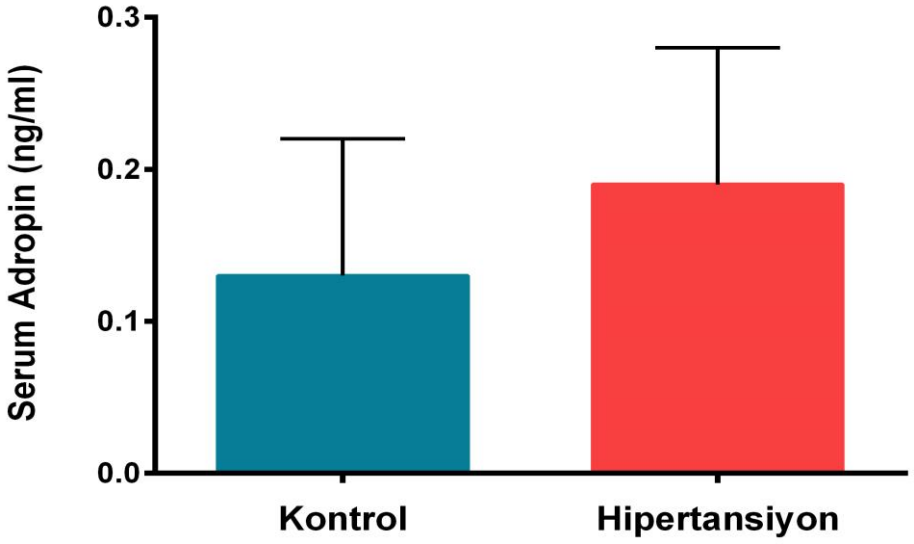
Gruplar arası serum NO düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 21'de gösterildi. Gruplar arası serum NO düzeyleri karşılaştırıldığında, hipertansiyon grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı (p<0,05).



Şekil 21. Gruplar arası serum NO düzeylerinin karşılaştırılması

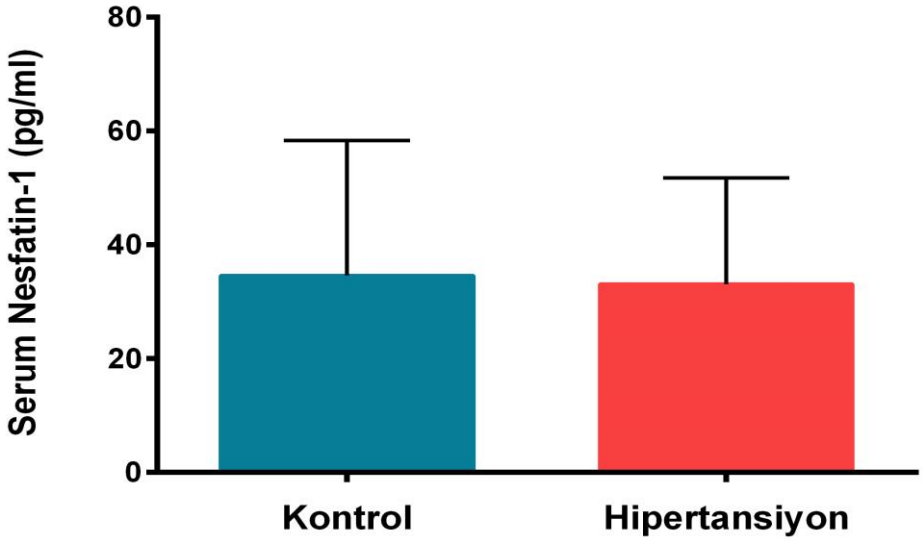
(*p< 0,05)

Gruplar arası serum adropin düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 22'de gösterildi. Gruplar arası serum adropin düzeyleri incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi (p>0,05).



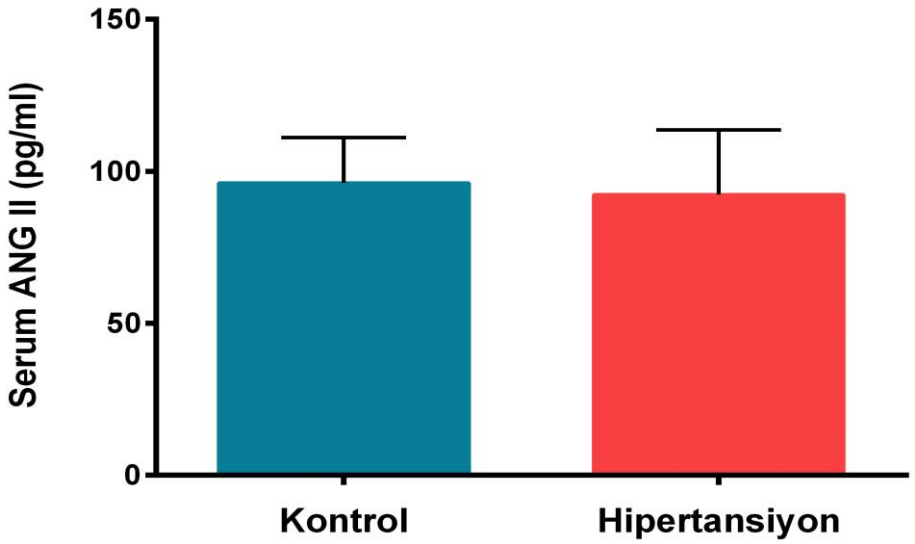
Şekil 22. Gruplar arası serum adropin düzeylerinin karşılaştırılması

Gruplar arası serum nesfatin-1 düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 23'de gösterildi. Gruplar arası serum nesfatin-1 düzeyleri incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi (p>0,05).



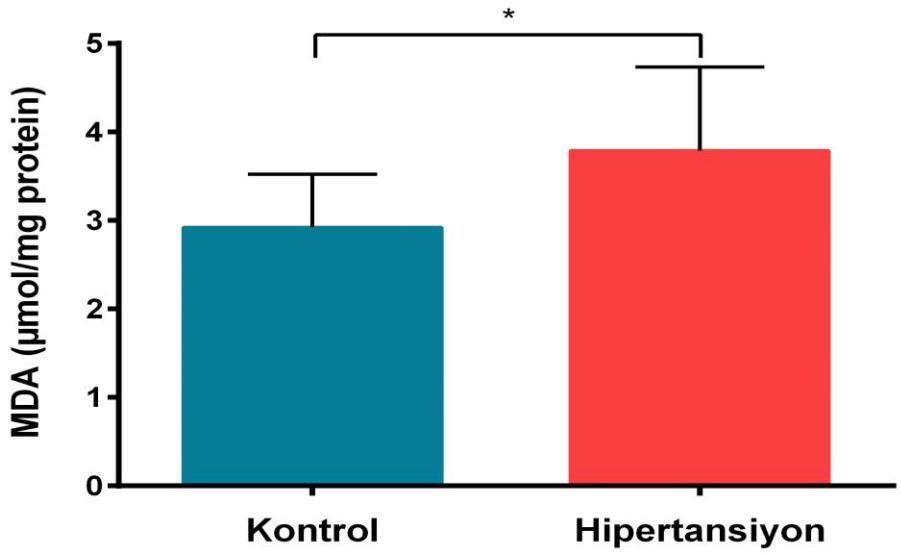
Şekil 23. Gruplar arası serum nesfatin-1 düzeylerinin karşılaştırılması

Gruplar arası serum ANG II düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 24'de gösterildi. Gruplar arası serum ANG II düzeyleri incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi (p>0,05).



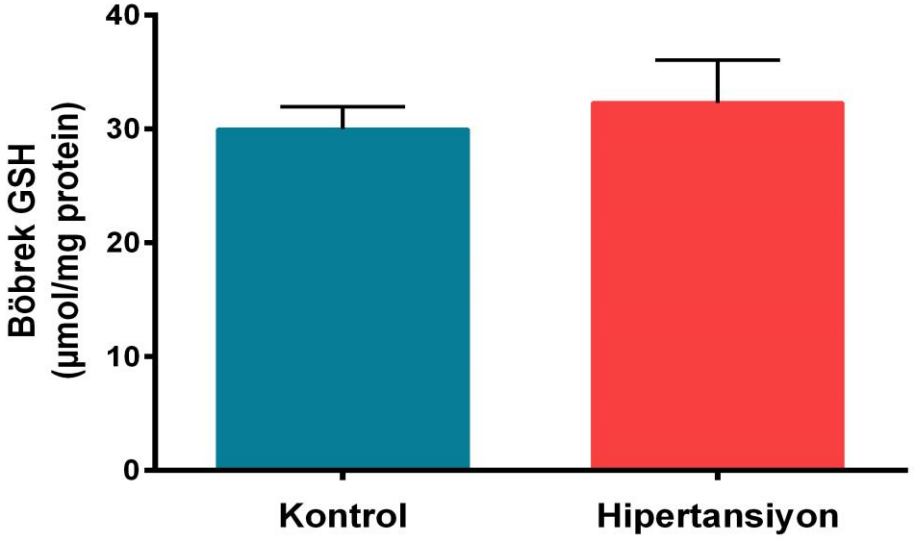
Şekil 24. Gruplar arası serum ANG II düzeylerinin karşılaştırılması

Gruplar arası böbrek MDA düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 25'de gösterildi. Gruplar arası böbrek MDA düzeyleri karşılaştırıldığında, hipertansiyon grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı (p<0,05).



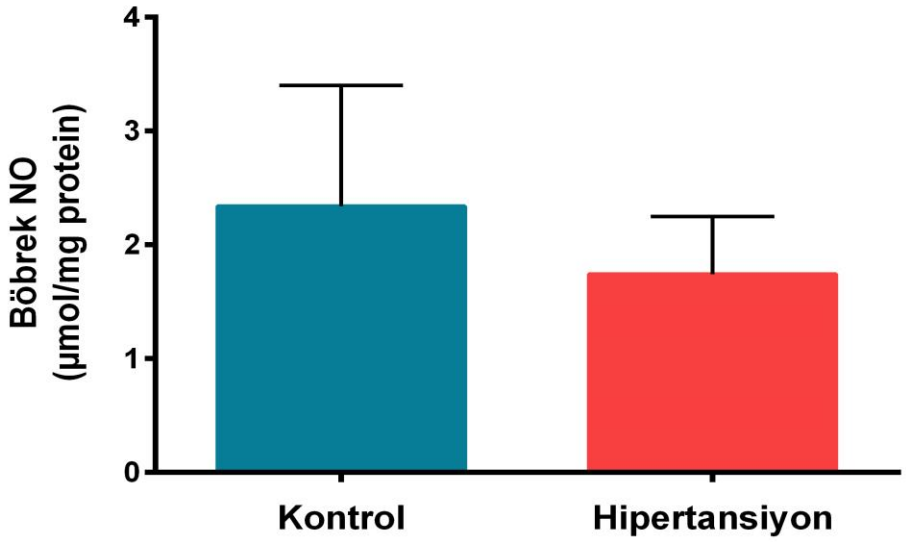
Şekil 25. Gruplar arası böbrek MDA düzeylerinin karşılaştırılması (*p< 0,05).

Gruplar arası böbrek GSH düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 26'da gösterildi. Gruplar arası böbrek GSH düzeyleri karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi (p>0,05).



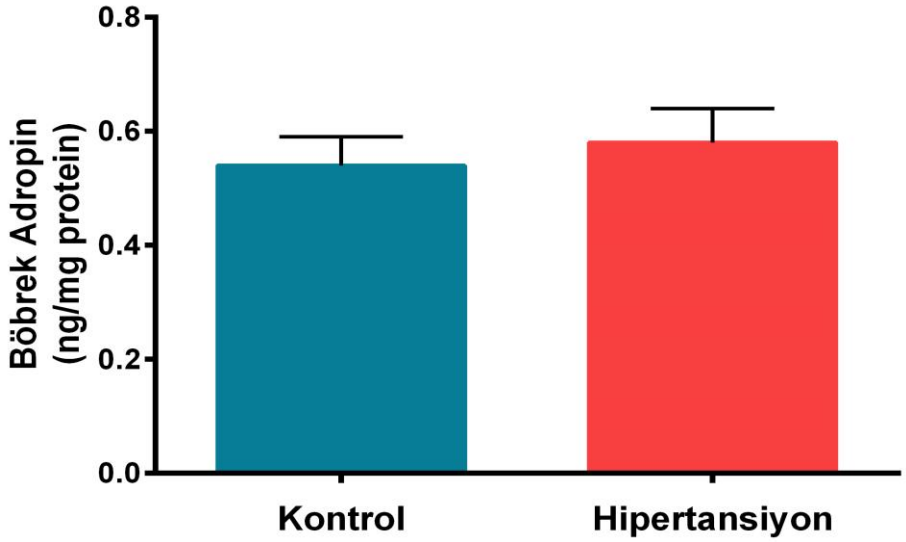
Şekil 26. Gruplar arası böbrek GSH düzeylerinin karşılaştırılması

Gruplar arası böbrek NO düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 27'de gösterildi. Gruplar arası böbrek NO düzeyleri karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi (p>0,05).



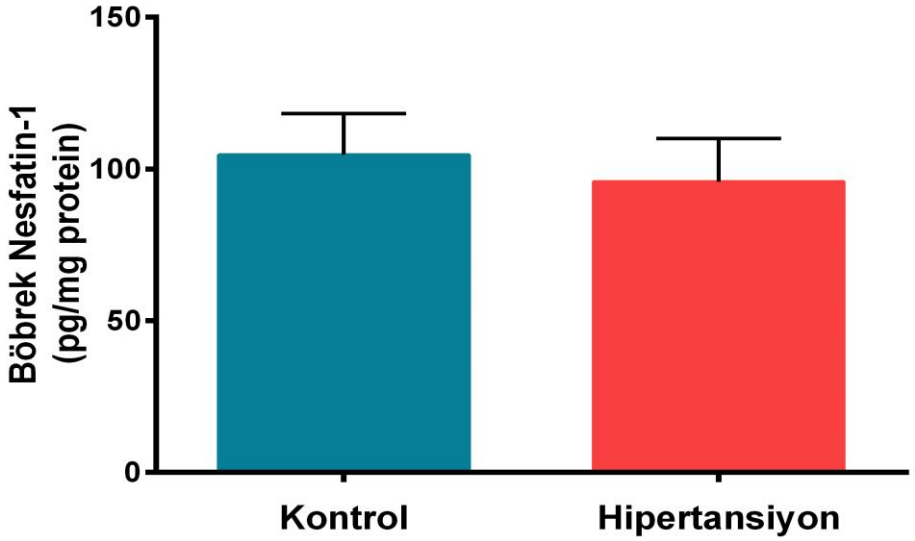
Şekil 27. Gruplar arası böbrek NO düzeylerinin karşılaştırılması

Gruplar arası böbrek adropin düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 28'de gösterildi. Gruplar arası böbrek adropin düzeyleri incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi (p>0,05).



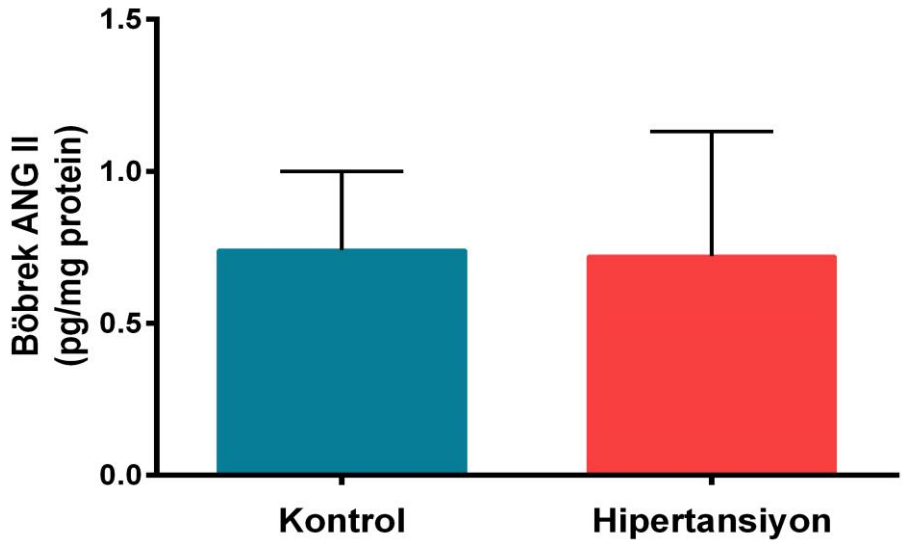
Şekil 28. Gruplar arası böbrek adropin düzeylerinin karşılaştırılması

Gruplar arası böbrek nesfatin-1 düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 29'da gösterildi. Gruplar arası böbrek nesfatin-1 düzeyleri incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi (p>0,05).



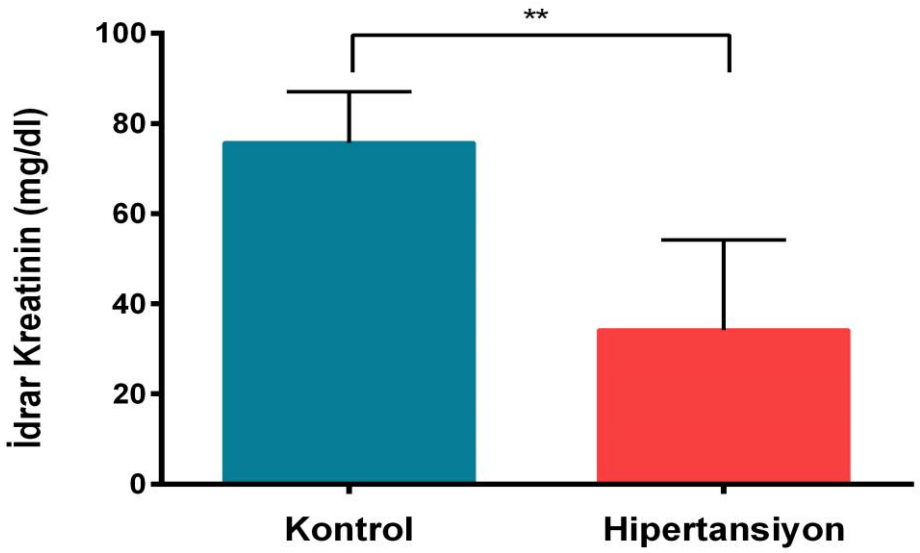
Şekil 29. Gruplar arası böbrek nesfatin-1 düzeylerinin karşılaştırılması.

Gruplar arası böbrek ANG II düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 30'da gösterildi. Gruplar arası böbrek ANG II düzeyleri incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi (p>0,05).



Şekil 30. Gruplar arası böbrek ANG II düzeylerinin karşılaştırılması

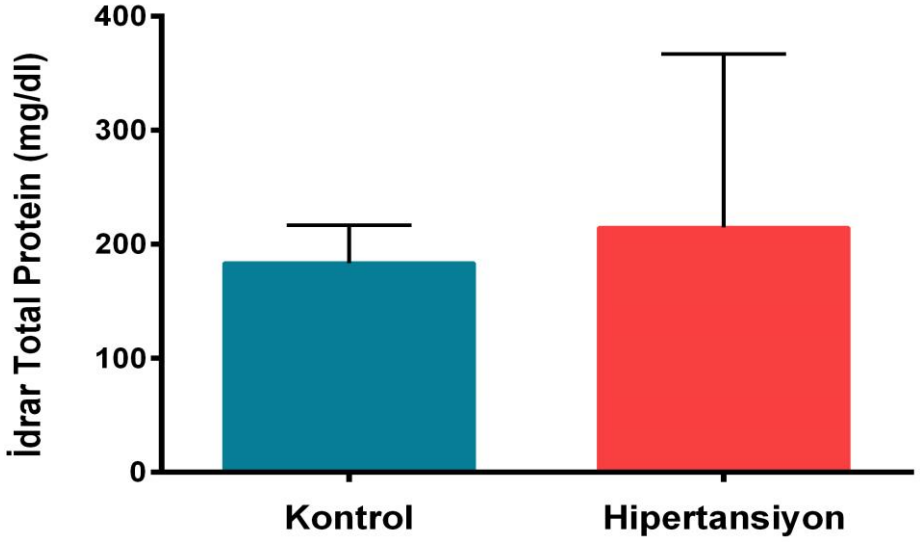
Gruplar arası idrar kreatinin düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 31'da gösterildi. Gruplar arası idrar kreatinin düzeyleri karşılaştırıldığında, hipertansiyon grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlendi (p<0,01).



Şekil 31. Gruplar arası idrar kreatinin düzeylerinin karşılaştırılması

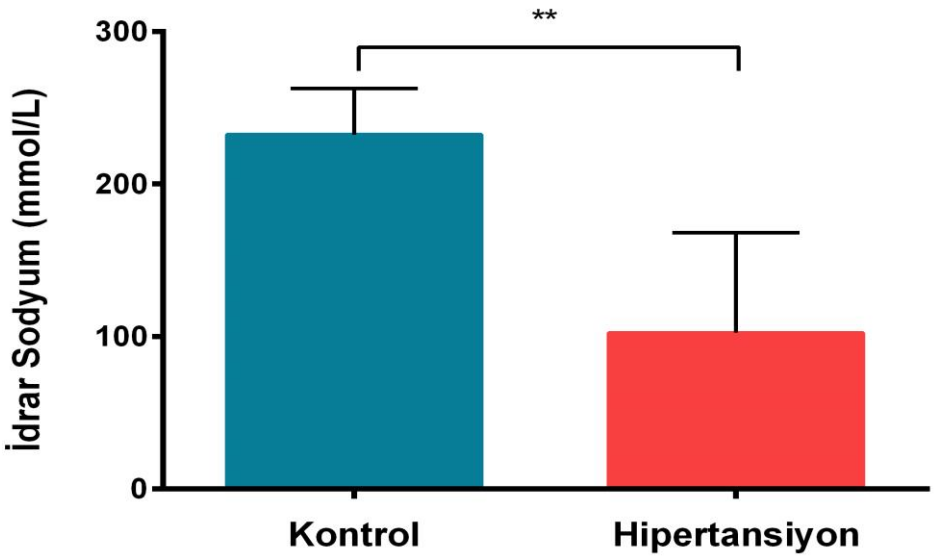
(**p< 0,01)

Gruplar arası idrar total protein düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 32'de gösterildi. Gruplar arası idrar total protein düzeyleri incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi (p>0,05).



Şekil 32. Gruplar arası idrar total protein düzeylerinin karşılaştırılması

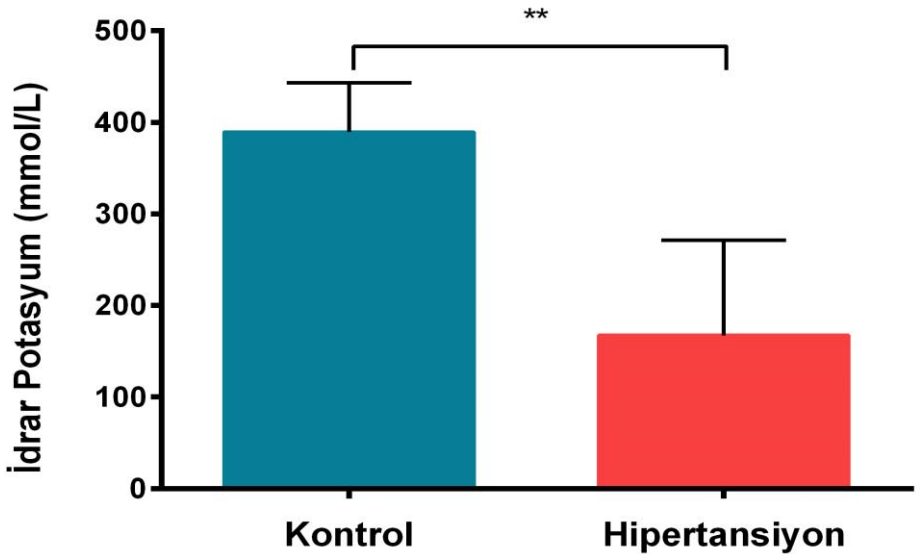
Gruplar arası idrar sodyum düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 33'de gösterildi. Gruplar arası idrar sodyum düzeyleri karşılaştırıldığında, hipertansiyon grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlendi (p<0,01).



Şekil 33. Gruplar arası idrar sodyum düzeylerinin karşılaştırılması

(**p< 0,01)

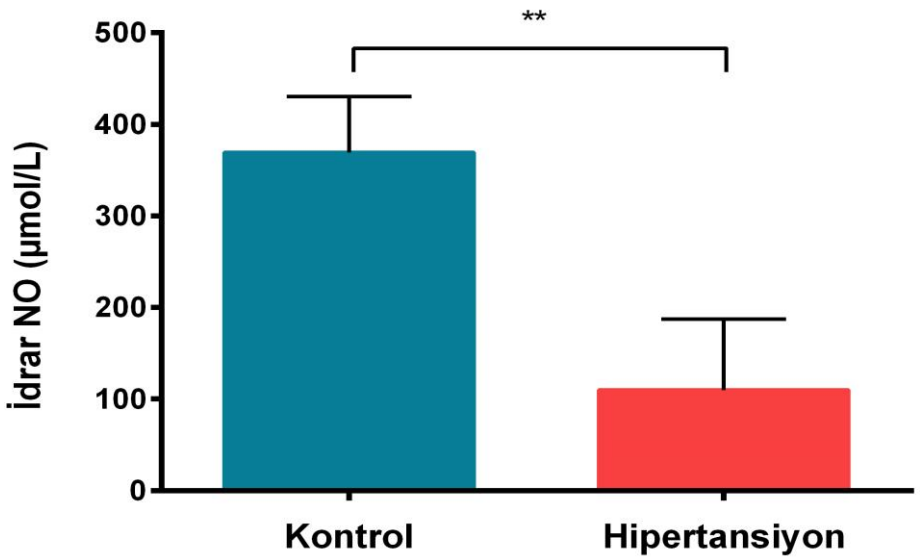
Gruplar arası idrar potasyum düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 34'de gösterildi. Gruplar arası idrar potasyum düzeyleri karşılaştırıldığında, hipertansiyon grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlendi (p<0,01).



Şekil 34. Gruplar arası idrar potasyum düzeylerinin karşılaştırılması

(**p< 0,01)

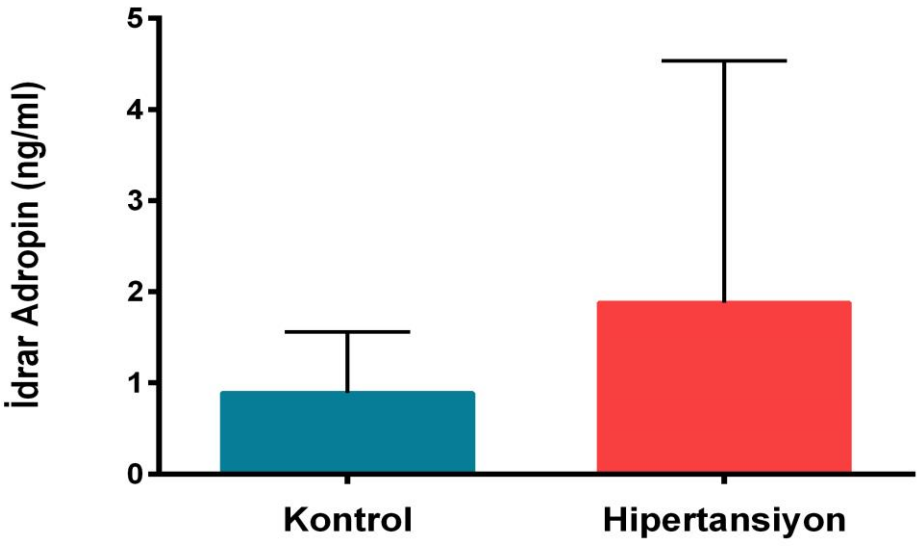
Gruplar arası idrar NO düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 35'de gösterildi. Gruplar arası idrar NO düzeyleri karşılaştırıldığında, hipertansiyon grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlendi (p<0,01).



Şekil 35. Gruplar arası idrar NO düzeylerinin karşılaştırılması

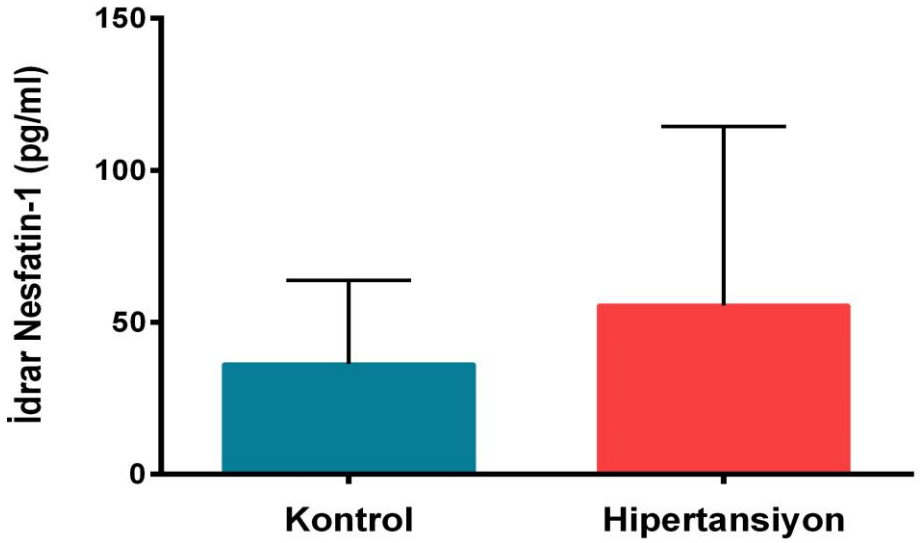
(**p< 0,01)

Gruplar arası idrar adropin düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 36'da gösterildi. Gruplar arası idrar adropin düzeyleri incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi (p>0,05).



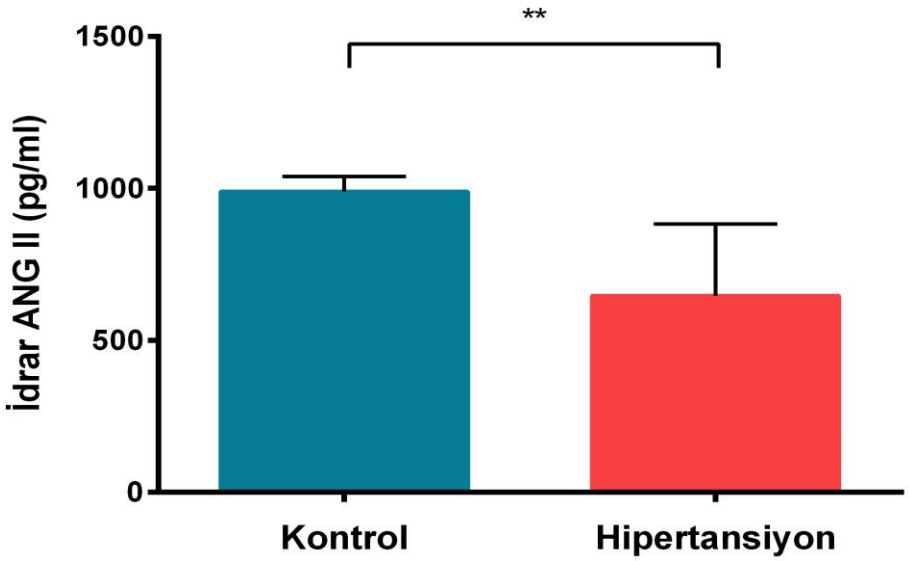
Şekil 36. Gruplar arası idrar adropin düzeylerinin karşılaştırılması

Gruplar arası idrar nesfatin-1 düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 37'da gösterildi. Gruplar arası idrar nesfatin-1 düzeyleri incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi (p>0,05).



Şekil 37. Gruplar arası idrar nesfatin-1 düzeylerinin karşılaştırılması

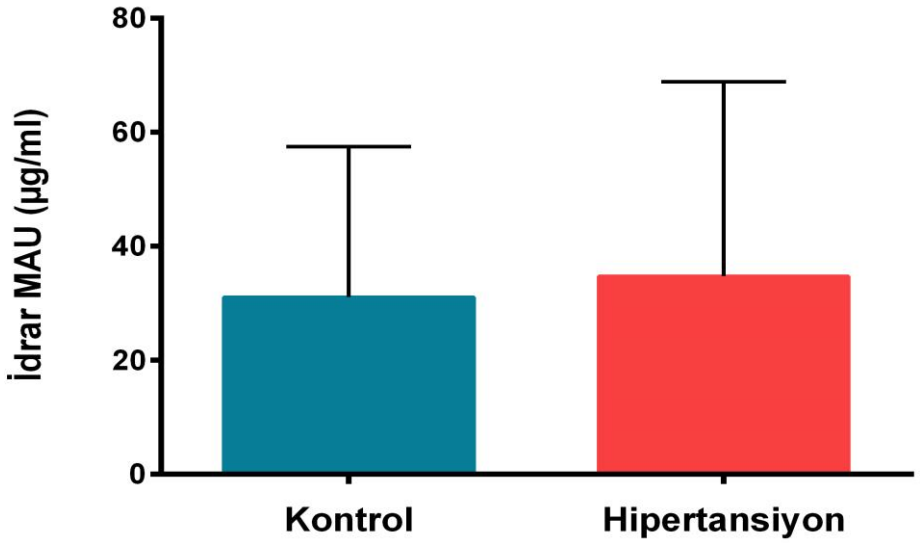
Gruplar arası idrar ANG II düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 38'de gösterildi. Gruplar arası idrar ANG II düzeyleri karşılaştırıldığında, hipertansiyon grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlendi (p<0,01).



Şekil 38. Gruplar arası idrar ANG II düzeylerinin karşılaştırılması

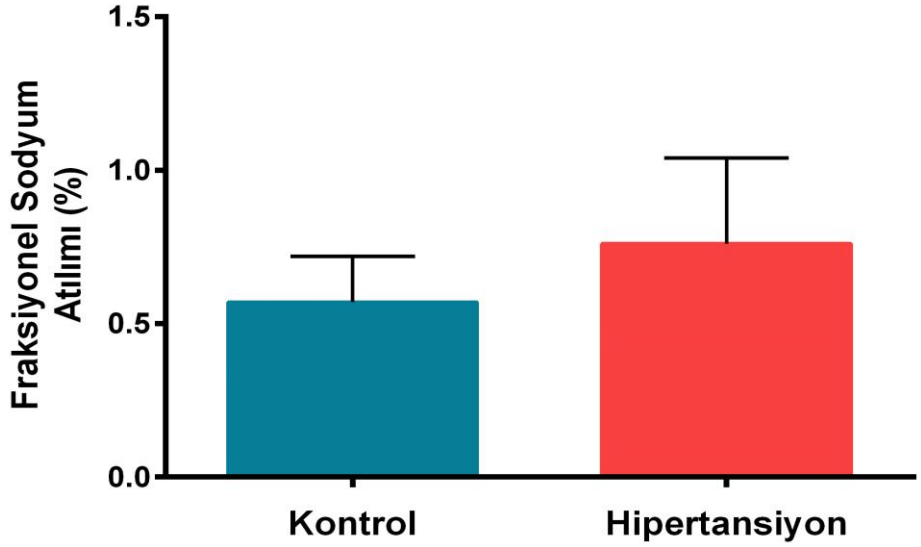
(**p< 0,01)

Gruplar arası idrar MAU düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 39'da gösterildi. Gruplar arası idrar MAU düzeyleri incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi (p>0,05).



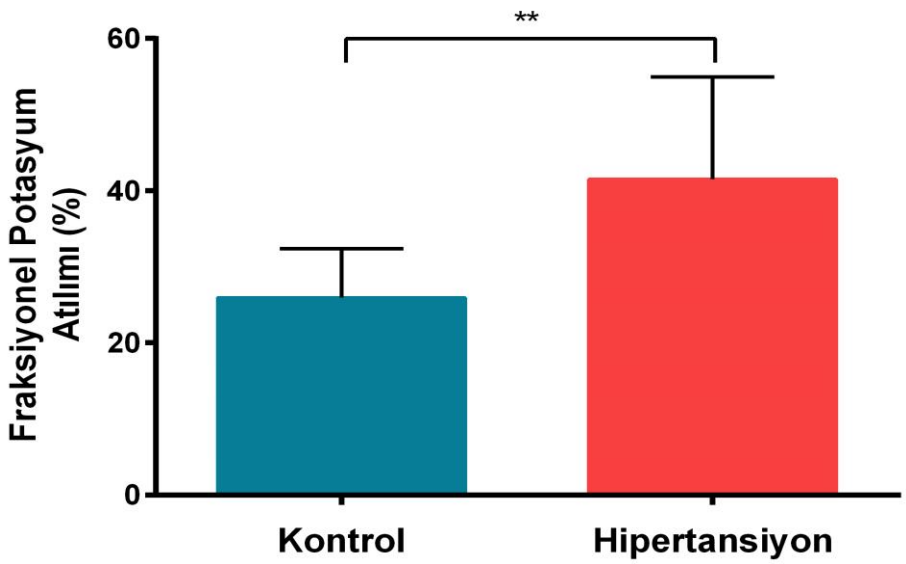
Şekil 39. Gruplar arası idrar MAU düzeylerinin karşılaştırılması

Gruplar arası fraksiyonel sodyum atılımı düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 40'da gösterildi. Gruplar arası fraksiyonel sodyum atılımı düzeyleri incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi (p>0,05).



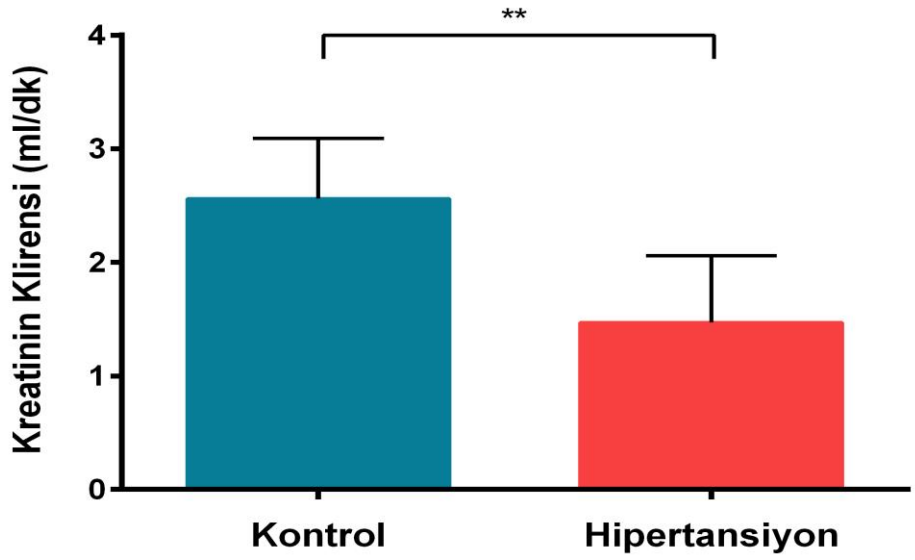
Şekil 40. Gruplar arası fraksiyonel sodyum atılımı düzeylerinin karşılaştırılması

Gruplar arası fraksiyonel potasyum atılımı düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 41'de gösterildi. Gruplar arası fraksiyonel potasyum atılımı düzeyleri karşılaştırıldığında, hipertansiyon grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı (p<0,01).



Şekil 41. Gruplar arası fraksiyonel potasyum atılımı düzeylerinin karşılaştırılması (**p< 0,01)

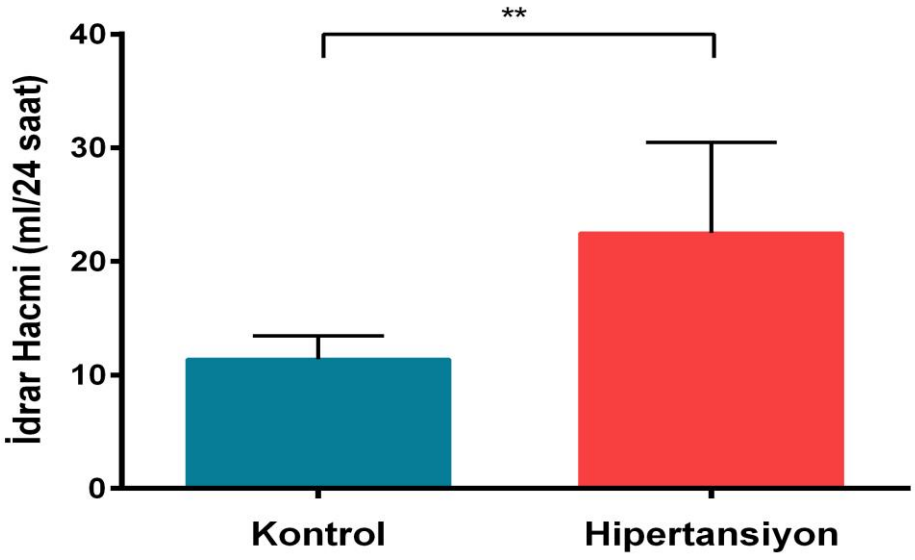
Gruplar arası kreatinin klirensi düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 42'de gösterildi. Gruplar arası kreatinin klirensi düzeyleri karşılaştırıldığında, hipertansiyon grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlendi (p<0,01).



Şekil 42. Gruplar arası kreatinin klirensi düzeylerinin karşılaştırılması

(**p< 0,01)

Gruplar arası idrar hacmi düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 43'de gösterildi. Gruplar arası idrar hacmi düzeyleri karşılaştırıldığında, hipertansiyon grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı (p<0,01).



Şekil 43. Gruplar arası idrar hacmi düzeylerinin karşılaştırılması

(**p< 0,01)

NESFATİN-1 VE ADROPİN DÜZEYLERİ İLE BÖBREK FONKSİYON PARAMETRELERİ ARASINDA KORELASYON

Serum nesfatin-1 ve adropin düzeyleri ile böbrek fonksiyon parametreleri arasında korelasyon görülmedi. Böbrek adropin düzeyi ile kreatinin klirensi arasında negatif yönde zayıf korelasyon (r= -0,341) gözlenirken istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0,05). Böbrek adropin düzeyi ile FeK arasında istatistiksel olarak anlamlı olmayan (p>0,05) pozitif yönde zayıf korelasyon gözlendi (r= 0,359). Böbrek nesfatin-1 düzeyi ile FeK atılımı arasında negatif yönde zayıf korelasyon (r=-0,265) izlenirken istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0,05). İdrar nesfatin-1 düzeyi ile FeNa arasında istatistiksel olarak anlamlı olmayan (p>0,05), negatif yönde zayıf korelasyon gözlendi (r=-0,391). Diğer böbrek, idrar adropin ve nesfatin-1 düzeylerinin böbrek fonksiyon parametreleri arasında anlamlı bir korelasyon saptanmadı. Korelasyon sonuçları Tablo 9'da gösterildi.

Tablo 9. Nesfatin-1 ve adropin parametreleri ile böbrek fonksiyon parametreleri arasındaki korelasyon bulguları

Parametreler	Kreatinin Klirensi ml/dk		FeNa%		FeK%	
	r	p	r	p	r	p
Serum Adropin ng/ml	-0,250	0,350	0,171	0,528	0,185	0,492
Serum Nesfatin-1 pg/ml	-0,156	0,564	-0,150	0,579	0,121	0,656
Böbrek Adropin ng/mg protein	-0,341	0,196	-0,029	0,914	0,359	0,172
Böbrek Nesfatin-1 pg/mg protein	0,235	0,380	-0,091	0,737	-0,265	0,322
İdrar Adropin ng/ml	-0,085	0,753	-0,232	0,387	-0,026	0,922
İdrar Nesfatin-1 pg/ml	-0,165	0,542	-0,391	0,134	-0,009	0,974

Histopatolojik Sonuçlar

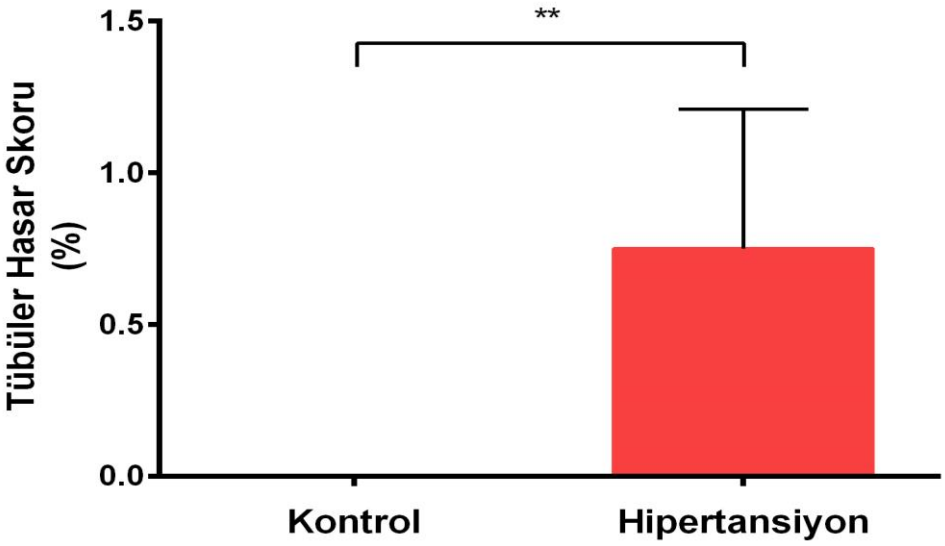
Işık Mikroskobik İnceleme

Çalışmamızda sıçanların böbrek kesitlerinin histopatolojik incelemesi, % kast değerleri ve böbrek hasar dereceleri 100 alanda tarama yapılarak belirlendi. Kast değerleri 0 ila 4 arasında skorlanarak hesaplanırken; glomerüloskleroz ve peritübüler fibrozis değerleri pozitif alanların yüzdesi olarak hesaplandı. Kontrol ve hipertansiyon grubu için hesaplanan bu değerler Tablo 10'da gösterildi.

Tablo 10. Grupların histopatolojik sonuçlarına ait bulgular

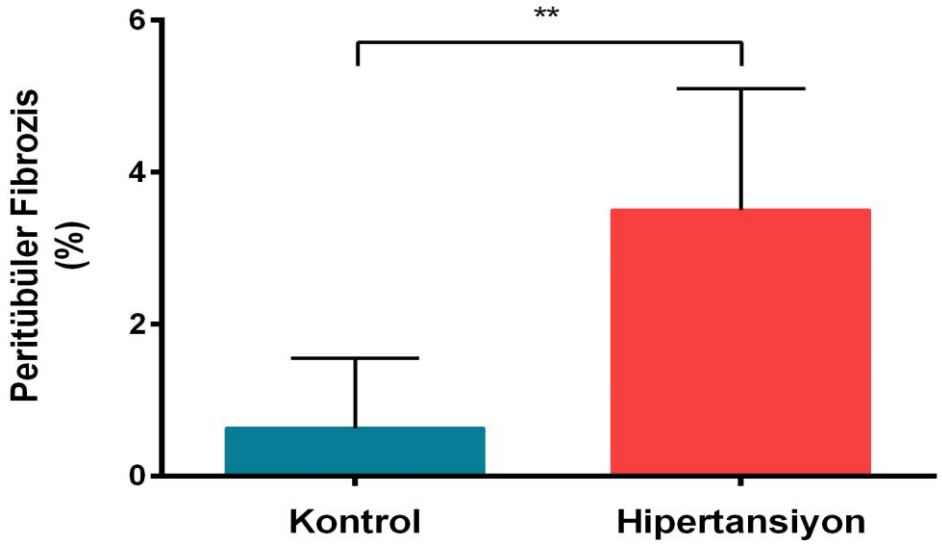
PARAMETRELER	KONTROL GRUBU		HİPERTANSİYON GRUBU		p değeri
	ORT+SD		ORT+SD		
Tübüler Hasar Skoru (%)	0,00	0,00	0,75	0,46	=0,003
Peritübüler Fibrozis (%)	0,63	0,92	3,50	1,60	=0,002
Glomerüloskleroz Skoru (%)	0,13	0,35	12,50	4,63	<0,001
Kast (%)	0,13	0,35	1,50	0,53	<0,001

Hipertansiyon grubunda kontrol grubuna kıyasla tübüler hasar skoru (p=0,003), peritübüler fibrozis (p=0,002), glomerüloskleroz skoru (p<0,001) ve kast (p<0,001) değerlendirmelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı. Grupların histopatolojik sonuçlarına ait grafikler Şekil 44-47'da gösterildi.



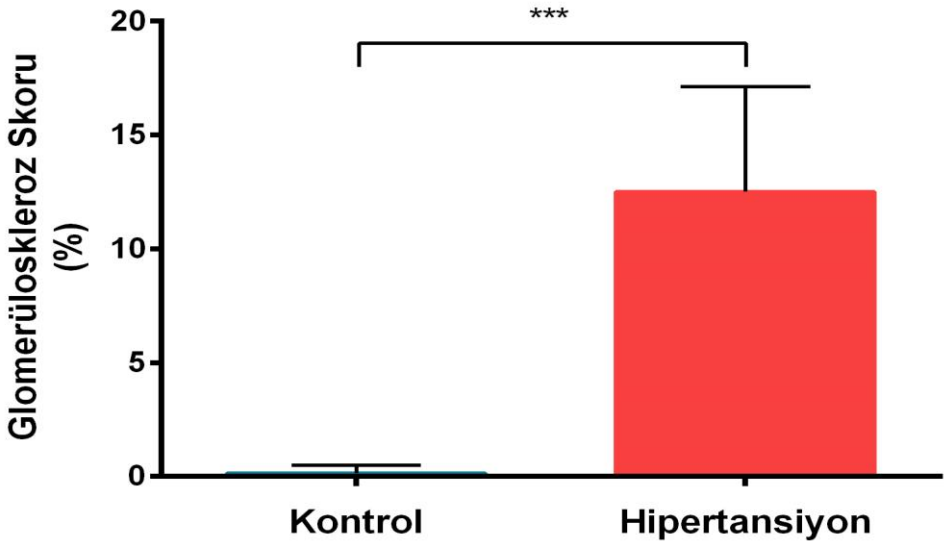
Şekil 44. Gruplar arası tübüler hasar skoru karşılaştırılması

(**p< 0,01).



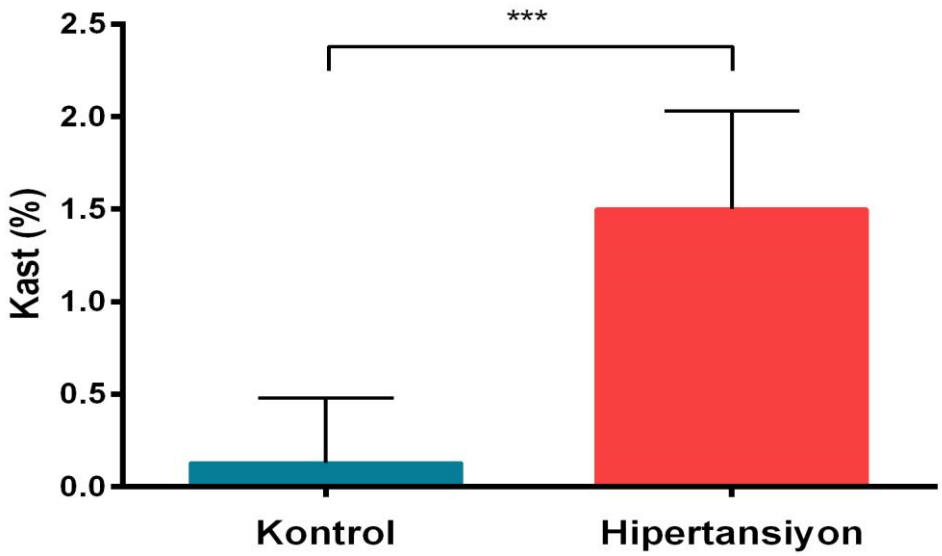
Şekil 45. Gruplar arası peritübüler fibrozis karşılaştırılması

(**p< 0,01)



Şekil 46. Gruplar arası glomerüloskleroz skoru karşılaştırılması

(***p< 0,001)

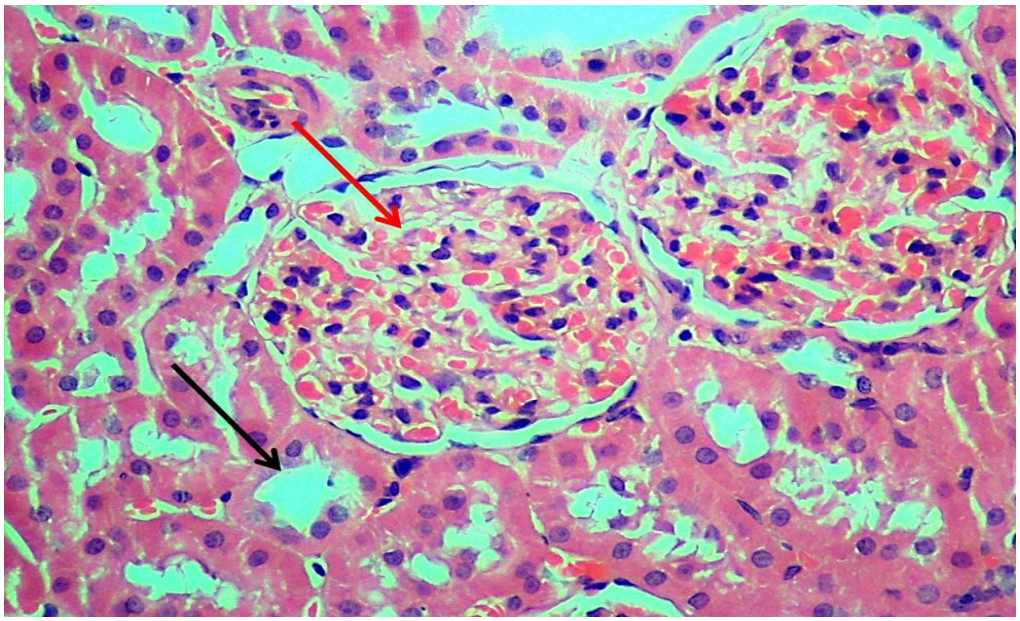


Şekil 47. Gruplar arası kast karşılaştırılması

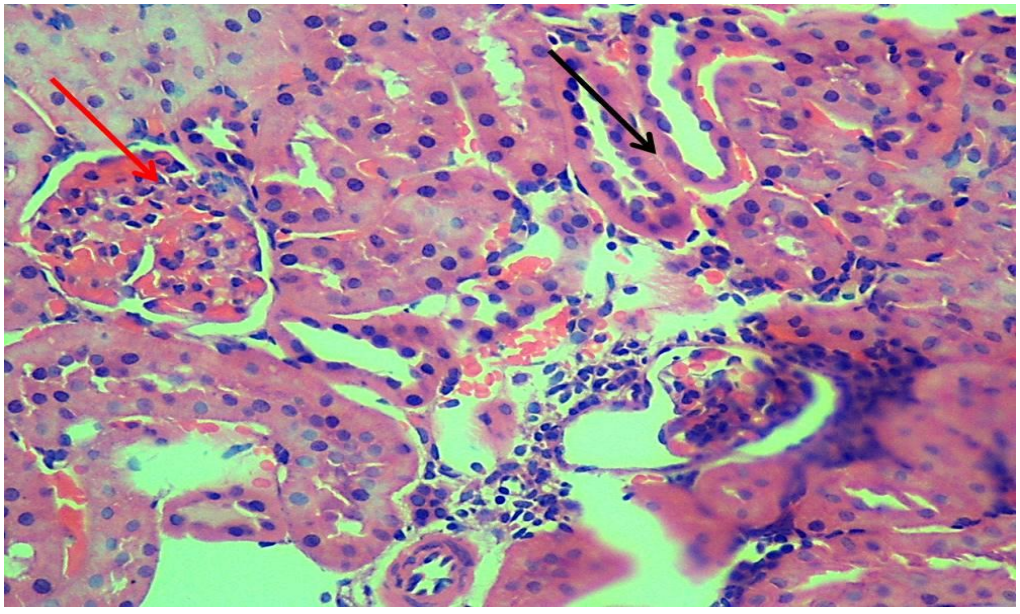
(***p< 0,001)

Sıçan böbreklerine ait hematoksilen-eozin boyalı böbrek kesitleri ışık mikroskobu altında incelendiğinde, kontrol grubundaki mikroskobik kesitte proksimal tübül ve glomerüllerin düzenli yapıda olduğu izlendi, herhangi nekroz veya kast oluşumu rastlanmadı (Şekil 48). Mikroskobik incelemelerde siyah ok, proksimal tübülü; kırmızı ok ile gösterilen kısım glomerülleri göstermektedir. Hipertansiyon

grubundaki mikroskobik kesitlerde glomerüllerde kapiller konjesyon ve hafif dereceli skleroz kırmızı ok ile gösterildi; siyah ok ile gösterilen peritübüler fibrozis ve kast miktarında istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu saptandı (Şekil 49).



Şekil 48. Kontrol grubunun hematoksilen-eozin ile boyanmış böbrek kesiti (HEx400)



Şekil 49.Hipertansiyon grubunun hematoksilen-eozin ile boyanmış böbrek kesiti (HEx400)

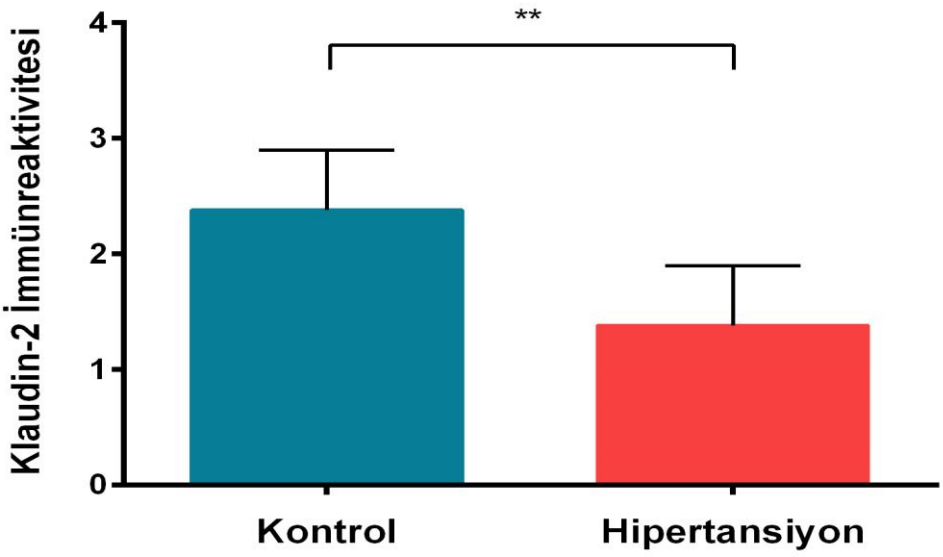
Böbrek Dokusunda Klaudin-2 İmmünreaktivitesi

Sıçanların böbrek kesitleri immünohistokimyasal olarak CLDN-2 antikoru ile boyandı ve ışık mikroskobunda değerlendirildi. İmmünohistokimyasal değerlendirmeler hedef hücrelerin boyanmasının yoğunluğuna göre yapıldı ve sonuçlar Tablo 11 gösterildi.

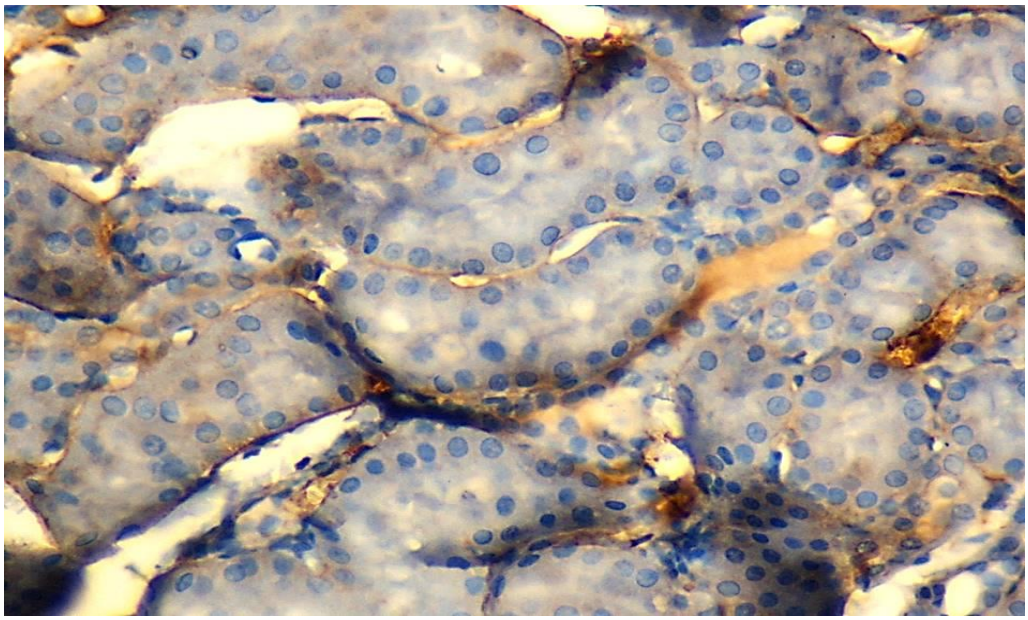
Tablo 11. Grupların klaudin-2 (CLDN-2) immünreaktivitesine ait bulgular

PARAMETRELER	KONTROL GRUBU		HİPERTANSİYON GRUBU		p değeri
	ORT+SD		ORT+SD		
Klaudin-2	2,38	0,52	1,38	0,52	0,005

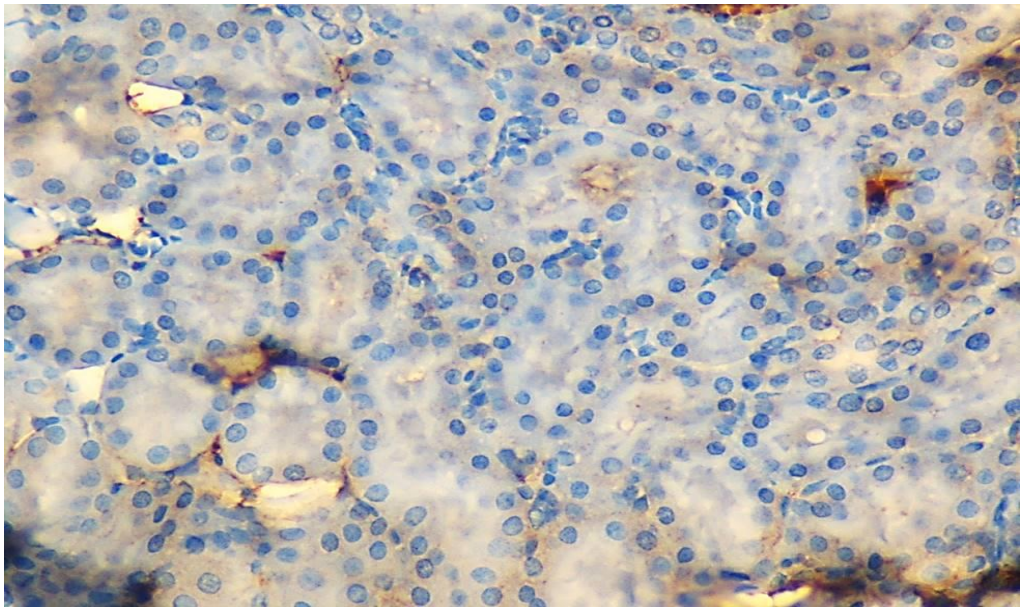
Hipertansiyon grubu böbrek kesitlerinin proksimal tübül bazal membranlarının CLDN-2 düzeylerinde, kontrol grubuna kıyasla boyanma yoğunluğunda istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlendi (**p< 0,01). Grupların CLDN-2 immünreaktivitesine ait grafik ve resimler Şekil 50-52'de gösterildi.



Şekil 50. Gruplar arası klaudin-2 (CLDN-2) immünreaktivitesi karşılaştırılması (**p< 0,01)



Şekil 51.Kontrol grubu klaudin-2 (CLDN-2) immünreaktivitesi (X400)



Şekil 52.Hipertansiyon grubu klaudin-2 (CLDN-2) immünreaktivitesi (X400)

TARTIŞMA

Hipertansiyonun dünya genelinde kardiyovasküler hastalıklar nedeniyle görülen 17 milyon ölümün yaklaşık olarak yarısını oluşturduğu ve dünyada 25 yaşın üstündeki yetişkinlerin yaklaşık %40'nın hipertansiyon hastası olduğu rapor edilmektedir. Yapılan araştırmalarda hipertansiyonun 2011-2015 yılları arasındaki maliyetinin 3,76 trilyon dolar olduğu tahmin edilmektedir (66). İnsanlar üzerinde hipertansiyonun nedenlerini ve sonuçlarını araştıran çalışmalar etik kaygılar sebebiyle yapılamamaktadır. Bu nedenle çeşitli deneysel hipertansiyon modelleri kullanılmaktadır. Araştırmamızda kullandığımız hipertansiyon modeli, ozmotik mini pompa yardımı ile ANG II 0,7 mg/kg/gün dozunda 7 gün süreyle verilerek oluşturuldu (67,68). ANG II, AT1 ve AT2 reseptörlerine bağlanarak etkisini gösterir (69). Böbreklerde ANG II'nin glomerüler hidrostatik basıncı ve sodyum geri emilimini artırarak periferik arterlerde AT1 reseptörü aracılığıyla oluşturduğu vazokonstriktör etki nedeniyle arteriyel hipertansiyon oluşumuna sebep olduğu bildirilmiştir (69,70).

Çalışmamızda kullandığımız ANG II ile uyarılan hipertansiyon modelinde sıçanlarda non-invazif bir yöntem olan tail cuff pletismografisi yöntemi ile deneyin 1. gün, 3. gün, 5. gün ve 7. günlerinde kuyruktan kan basıncı ölçümü yapıldı. Deneyin 1. gününden itibaren sistolik kan basıncı, diyastolik kan basıncı ve ortalama kan basıncı değerlerinin hipertansiyon grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı saptandı. Aizawa ve ark. (67)'nın mevcut çalışmamızla aynı doz ve süre ile ANG II vererek yaptıkları çalışmalarında

bizim sonuçlara benzer şekilde sistolik kan basıncı ve diyastolik kan basıncı değerlerinde 1. günden itibaren hipertansiyon grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda nabız sayısı ölçümleri arasında anlamlı farklılık görülmemesine rağmen Aizawa ve ark. (67) birinci günden itibaren kontrol grubuna kıyasla hipertansiyon grubunda anlamlı bir artış olduğunu rapor etmişlerdir. Ishizaka ve ark (68)'nın aynı doz ve süreyle yaptıkları çalışmalarında SKB değerlerinin çalışmamız ile uyumlu olarak 1. günden itibaren istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu bildirilmiştir. Diğer taraftan Saito ve ark. (71)'nın aynı doz ve sürede yaptıkları çalışmalarında 7. gün SKB'nin çalışmamız sonuçları ile benzer şekilde arttığı görüldü. Literatür incelendiğinde aynı doz ve süre olarak benzer çalışmalarda genellikle nabız sayısının verilmediği görüldü. Ueda ve ark. (72) tarafından 2 mg/kg/gün dozunda iki hafta süres ile ANG II verilmesinin nabız sayısında istatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşturmadığı bildirilmiştir. Bu çalışmada ANG II dozu yüksek ve süre fazla olmasına rağmen nabız ölçüm sonuçları ile çalışmamız sonuçları benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızda hipertansiyon grubunda glomerüler fonksiyon bozukluğunun bir göstergesi olan serum üre ve kreatinin düzeylerinde artış kreatinin klirensi düzeylerinde ise istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü. Çalışmamız ile benzer doz ve sürede ANG II verilen Aizawa ve ark. (67) çalışmalarında da serum üre ve kreatinin düzeylerinin arttığı bildirilmiştir ayrıca glomerüler filtrasyon hızının bir göstergesi olan kreatinin klirensinin de çalışmamızda olduğu gibi azaldığı rapor edilmiştir. Çalışmamızda hipertansiyon grubu sıçanlarda serum üre ve kreatinin düzeylerindeki artış ile kreatinin klirensinde görülen azalma glomerüler fonksiyonun bozulduğunu göstermektedir.

Ayrıca hipertansiyon grubunda böbreklerde tübüler işlev bozukluğunun bir göstergesi olan fraksiyonel sodyum atılımında görülen artış anlamlı değildi. Hipertansiyon grubunda idrar hacmindeki artışa rağmen glomerüler filtrasyon hızında yani kreatinin klirensinde azalma görüldü buna karşın fraksiyonel sodyum atılımında anlamlı değişiklik olmaması tübüler mekanizmalar sonucu olabilir. Tübüler fonksiyonun diğer bir belirteci olan fraksiyonel potasyum atılımında ise anlamlı düzeyde bir artış saptandı. Diğer taraftan serum sodyum düzeylerinde anlamlı farklılık görülmemesine rağmen potasyum düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı görüldü. Gordish ve ark (73) tarafından 80 µl/gün dozunda ANG

II'nin 4 hafta boyunca verilmesinin 1. haftadan itibaren kan basıncını anlamlı düzeyde artırdığı bildirilmiştir. Bu çalışmada fraksiyonel sodyum atılımında anlamlı farklılık olmadığı bildirilmiştir. Bu sonuç süre ve doz farklılığına rağmen bizim sonuçlarımız ile uyumludur. Ancak aynı çalışmadaki kreatinin klirensi sonuçları bizim sonuçlarımızdan farklı olarak anlamlı değildi. Li ve ark. (74) tarafından 40 ng/dk dozunda 2 hafta boyunca ANG II verilmesinin SKB ve fraksiyonel sodyum atılımını artırdığını, fraksiyonel potasyum atılımında ise anlamlı farklılık oluşturmadığını rapor etmiştir. Bu sonuçların sonuçlarımızdan farklı olmasının verilen ANG II dozu ve süresindeki farklılık sebebiyle olduğu düşünüldü. Serum potasyum düzeyindeki anlamlı azalma ile fraksiyonel potasyum atılımındaki anlamlı düzeyde artış ANG II infüzyonu nedeniyle artan aldosteron düzeyi sonucu olabilir. Serum CK, ALT ve AST düzeyleri de kontrol grubu ile kıyaslandığında hipertansiyon grubunda anlamlı farklılık oluşmadığı saptandı. ALT başlıca karaciğerde üretilmesine rağmen; AST kalp, böbrek ve kas dokularından kaynaklanmaktadır. Yükselmiş olan ALT düzeylerinin karaciğer hasarı ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (75). Diğer taraftan ALT düzeylerinde anlamlı farklılık oluşmaması karaciğer hasarının oluşmadığını düşündürmektedir. Böbrek tübül hücrelerinde bulunan AST enziminde görülen anlamlı olmayan artış tübüler hasar derecesinin belirlenmesinde bir parametre olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

NO böbreklerde kan akımının ve tübüler fonksiyonların düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca NO'nun afferent ve efferent arteriyoldeki direnci azaltarak GFR'yi azalttığı ve proksimal tübüllerde Na-K-ATPaz aktivitesini azaltarak sodyum geri emiliminin de azalmasına neden olduğu bildirilmektedir (76). Çalışmamızda hipertansiyon grubunda serum NO düzeyinde görülen artış bu grupta kreatinin klirensinin azalmasının bir nedeni olabilir. Diğer taraftan hipertansiyon grubunda görülen idrar NO düzeyindeki azalma da GFR hızının azalması sonucu olabilir. Sasser ve ark (77) tarafından 400 ng/dk dozunda ANG II'nin 6 hafta boyunca verilmesinin OKB'yi arttırdığı böbrek ve idrar NO atılımını anlamlı düzeyde azalttığı bildirilmiştir. Bu çalışmada idrar NO atılımının mevcut çalışma sonuçlarımızla uyumlu olduğu ancak böbrek korteksi NO düzeylerinin bizim çalışmamızın sonuçlarıyla paralellik göstermediği görüldü. Bu çalışmada görülen böbrek NO düzeyindeki anlamlı azalma ANG II verilme süresi ve dozunun farklılığı ile NO düzeyinin böbrekte sadece kortekste incelenmesi sonucu olabilir.

Birçok çalışmada oksidatif stresin hipertansiyon gelişiminde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Oksidatif stresin NO oksidasyonu ve inaktivasyonunun artırılması yoluyla hipertansiyona neden olabileceği rapor edilmektedir (78,79). Bu çalışmamızda endojen güçlü bir antioksidan olan böbrek glutatyon düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü. Fizyolojik koşullar altında normal metabolizma süreçlerinde üretilen serbest radikaller antioksidan savunma sistemi ile etkisiz hale getirilirler. Bununla birlikte patolojik koşullarda artmış serbest radikal oluşumu veya antioksidan kapasitenin azalması oksidatif strese neden olur. Serbest radikaller lipit peroksidasyonuna, DNA hasarına ve protein modifikasyonuna sebep olarak hücre hasarı oluştururlar (80-82). Çalışmamızda lipit peroksidasyonun son ürünü olan ve oksidatif stresin bir göstergesi olan MDA düzeylerinin hipertansiyon grubunda anlamlı düzeyde arttığı saptandı.

Renin anjiotensin aldosteron sistemi sıvı elektrolit dengesi ve kan basıncının düzenlenmesinde anahtar rol oynamaktadır. ANG II, AT1 reseptörüne bağlanarak damar düz kaslarında daralmaya sebep olur ve Na^+ geri emilimini artırarak kan basıncının yükselmesinde aktif rol oynamaktadır. Ayrıca ANG II aldosteron salınımına sebep olarak nefron toplayıcı kanallarınında esas hücreleri etkileyerek Na geri emilimini daha da arttırmaktadır. Anjiotensin II böbrek doku hasarı ve hipertansiyonun fizyopatolojisinde önemli rol oynamaktadır (83). Birçok çalışmada RAAS aktivitesindeki artışın proteinüri ve böbrek hasarının gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (84,85). Çalışmamızda serum ve böbrek ANG II düzeyleri arasındaki farklılık anlamlı olmamasına rağmen idrar ANG II düzeylerinin hipertansiyon grubunda anlamlı olarak azaldığı görüldü. Birçok çalışmada hipertansiyon sonucu proteinüri görülmesine rağmen çalışmamızda MAU düzeyleri gruplar arasında anlamlı farklılık görülmedi. Ayrıca total protein düzeylerindeki artış da anlamlı değildi.

ANG II vazokonstriktör etki, sodyum geri emiliminde artış, böbreklerde fibrozis, hücre proliferasyonu ve inflamasyon gelişiminde AT1 reseptörleri aracılığıyla önemli rol oynamaktadır (86). Çalışmamızda böbreklerin histopatolojik değerlendirilmesinde peritübüler fibrozis, glomerüler skleroz ve kast miktarında anlamlı düzeyde artış saptandı. Bu artışın ANG II infüzyonu ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (87) ve sonuçlarımız ile mevcut literatür sonuçlarının uyumluluk gösterdiği görüldü.

Klaudin-2 proksimal tübüllerde sodyum, klor ve su geri emilimde önemli rol oynamaktadır. Klaudin-2'ler yüksek düzeyde proksimal tübülde eksprese edilirler.

Çalışmamızda CLDN-2 immünreaktivitesinin hipertansiyon grubunda kontrol grubuna göre azaldığı saptandı. CLDN-2 inhibe edilen farelerde idrar hacmi ve idrar ozmolaritesinde artış görüldüğü rapor edilmiştir (59,88). Çalışmamızın sonuçları idrar hacmi artışının CLDN-2 ekspresyonundaki azalmanın bir sonucu olabileceğini düşündürmektedir. Yatabe ve ark. (89) tarafından 8 hafta boyunca %8 NaCl diyeti uyguladığı wistar-kyoto sıçanlarda CLDN-2 mRNA düzeylerinde artma olmasına rağmen CLDN-2'nin western blot protein düzeylerinde ve böbrek korteksindeki CLDN-2 immünreaktivitesinde azalma olduğu rapor edilmiştir. CLDN-2 immünreaktivitesindeki azalma mevcut çalışmamızdaki sonuçlarla uyumluluk göstermektedir.

Nesfatin-1'in erkek sıçanların lateral serebroventrikülü içine merkezi olarak enjeksiyonunun, OKB'yi doza bağlı bir şekilde arttırdığı bildirilmiştir. Erkek Sprague Dawley sıçanlarında melanokortin 3/4 reseptör antagonisti SHU9119'un uygulanmasının, nesfatin-1'in arteriyel basıncı artırma yeteneğini inhibe ettiği gösterilmiştir ve bu durum nesfatin-1'in hipertansif etkisinin, fonksiyonel merkezinin melanokortin 3/4 reseptörlerine bağlı olduğu rapor edilmiştir (48). Ayrıca, OKB'de nesfatin-1 kaynaklı artışlara aracılık eden kortikotropin salgılatıcı hormon ve oksitosin reseptörü üreten nöronları içeren bir nöronal yolla etki ettiği gösterilmiştir (90). Sıçanlarda, nesfatin-1'in kronik periferik infüzyonunun kan basıncında artışa neden olduğu (49) ve yüksek nesfatinin-1 düzeyine uzun süreli maruz kalmanın hipertansiyona neden olduğu rapor edilmiştir. Sıçanlara 7 gün boyunca 0,7 mg/kg/gün dozunda ANG II vererek oluşturduğumuz deneysel hipertansiyon modelinde sistolik kan basıncı, diyastolik kan basıncı ve ortalama kan basıncı 1. günden itibaren anlamlı bir şekilde artmasına rağmen, kontrol ve hipertansiyon gruplarımız arasında serum, böbrek, idrar nesfatin-1 seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Akcilar ve ark. (91) DOCA-tuzu ile hipertansiyon oluşturdukları deneysel hipertansiyon modelinde; hipertansiyon grubunda kontrol grubuna kıyasla plazma nesfatin-1 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı artış olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda nesfatin-1 düzeylerinin anlamlı olmaması deneysel hipertansiyon modelimizin farklı fizyopatolojik mekanizmalara sahip olmasından kaynaklanabilir.

Beyinde ve karaciğerde yeni keşfedilen bir peptit hormon olan adropinin, enerji homeostazisi üzerine etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (92). Çalışmamızın sonuçları

hipertansiyon grubunda kontrol grubuna göre serum adropin seviyelerinde artış göstermesine rağmen istatistiksel olarak anlamlılık gözlenmedi. Böbrek adropin ve idrar adropin düzeylerinde de benzer şekilde gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı. Gu ve ark. (93) tarafından 123 katılımcı üzerinde yapmış oldukları klinik çalışmada hipertansiyonlu kişilerde normotansif kişilere kıyasla plazma adropin seviyeleri anlamlı derecede düşük bulunmuş ve azalmış plazma adropin seviyesinin kan basıncıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Celik ve ark. (94) yapmış oldukları çalışmada ise hipertansiyon grubu hastaların kontrol grubuna göre serum adropin seviyesinin istatistiksel olarak daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

Nesfatin-1, adropin ve CLDN-2'nin kan basıncını düzenleyen mekanizmalarla ilişkisini incelemek amacıyla yapılan çalışmamızda; hipertansiyon grubunda CLDN-2 immünreaktivitesindeki azalma ile gruplar arasında anlamlı farklılık olmayan nesfatin-1 ve adropin düzeylerinin böbrek fonksiyonları ve böbrek hasarı ile ilişkisini araştırmak amacıyla farklı doz ve sürelerde ANG II verilerek moleküler düzeyde incelenmesi gerektiği düşüncesindeyiz. Ayrıca farklı dozlarda nesfatin-1 ve adropin verilerek böbrek kan akımı, böbrek hasarı ve oksidatif stres hasar derecesini gösteren parametreler ile NO metabolizmasının incelendiği daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğu düşüncesindeyiz.

SONUÇLAR

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yaptığımız çalışmamızda ANG II ile oluşturulan hipertansiyon modelinde alınan örneklerin böbrek dokusunda; NO, glutatyon, MDA, nesfatin 1, adropin, anjiotensin II; serum NO, nesfatin 1, adropin, üre, kreatinin, Na^+, K^+, NO, CK, alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), anjiotensin II; idrar kreatinin, Na^+, K^+, mikroalbuminüri (MAU), anjiotensin II ve protein düzeyleri ölçüldü. Ayrıca böbrek dokusu histopatolojik olarak hematoksilen-eozin boya ile immünohistokimyasal olarak incelendi ve CLDN-2 immünreaktivitesine bakıldı.

Hipertansiyon grubunda kontrol grubuna göre SKB, DKB ve OKB değerleri 1. gün, 3. gün, 5. gün ve 7. gün ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır. 7. gün ölçümlerinde kontrol grubu SKB değeri 131,99±4,44 mm Hg, DKB değeri 97,70±10,65 mm Hg iken hipertansiyon grubunda SKB değeri 208,26±21,30 mm Hg, DKB değeri 181,36±17,56 mm Hg'ye kadar yükselmiştir. Bu veriler ANG II ile oluşturulan hipertansiyon modelinin oluştuğunu göstermektedir. Araştırmamız sonucunda serum üre, kreatinin, NO; böbrek MDA; idrar fraksiyonel potasyum atılımı ve idrar hacminde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artma gözlendi. Ayrıca kontrol grubuna kıyasla hipertansiyon grubunda serum potasyum; idrar kreatinin, sodyum, potasyum, NO, anjiotensin II ve kreatinin klirensi düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlendi. Histopatolojik sonuçlarda hipertansiyon grubu böbrek kesitlerinde hafif tübüler hasar, glomerüllerde sklerozis, peritübüler fibrozis ve

kast miktarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı. CLDN-2'nin immünreaktivitesinde hipertansiyon grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü.

Farklı doz ve sürelerde ANG II verilerek nesfatin-1 ve adropin düzeyleri ile böbrek fonksiyonları ve böbrek hasarı arasındaki ilişkinin moleküler düzeyde araştırılması gerektiği düşüncesindeyiz. Ayrıca eksojen farklı dozlarda nesfatin-1 ve adropinin verilerek böbrek kan akımı, böbrek hasarı ve oksidatif stres hasar derecesini gösteren parametreler ile NO metabolizmasının incelendiği daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğu düşüncesindeyiz.

ÖZET

Hipertansiyon kalp ve damar hastalıkları, inme, kalp yetmezliği ve böbrek hastalıkları gibi birçok hastalığın fizyopatolojisinde önemli rol oynamaktadır. Enerji homeostazı ve metabolizmasında rol oynayan adropin ve nesfatin-1'in kan basıncını düzenleyen mekanizmalar ile ilişkisi henüz netleşmemiştir. Çalışmamızda deneysel hipertansiyon modelinde; nesfatin-1 ve adropin düzeylerinin kan basıncı, böbrek fonksiyonları, böbrek hasarı ve klaudin-2 ile ilişkisini araştırmayı amaçladık.

Çalışmamızda 240-260 gram ağırlığında erkek Spraque Dawley türü sıçan Kontrol ve hipertansiyon olmak üzere iki gruba ayrıldı. Ozmotik mini pompalar deri altına yerleştirildi. Hipertansiyon grubu sıçanlara 0,7 mg/kg/gün dozunda 7 gün boyunca anjiotensin II verildi. Deneyin 1. gün, 3.gün, 5. gün ve 7. günlerinde her iki grup için tail cuff pletismografisi yöntemiyle kuyruktan kan basıncı ölçümü yapıldı. 24 saatlik idrarları toplandıktan sonra, anestezi altında kan ve doku örnekleri alınarak ötenazi uygulandı.

Hipertansiyon grubunda: Sistolik kan basıncı, diyastolik kan basıncı, ortalama kan basıncı; serum üre, kreatinin, NO; böbrek MDA; idrar fraksiyonel potasyum atılımı ve idrar hacminde istatistiksel olarak anlamlı artma saptandı ($p<0,05$). Hipertansiyon grubunda serum potasyum, idrar kreatinin, sodyum, NO, anjiotensin II, kreatinin klirensi ve CLDN-2 immünreaktivitesi düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü ($p<0,05$). Nesfatin-1 ve adropin düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).

Farklı deneysel hipertansiyon modellerinde, farklı doz ve sürelerde nesfatin-1 ve adropinin etkilerini inceleyen yeni çalışmalara ihtiyaç duyulduğu düşüncesindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Hipertansiyon, adropin, nesfatin-1, klaudin-2, anjiotensin 2.

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN NESFATIN 1 AND ADROPIN IN RENAL FUNCTION IN THE MODEL OF EXPERIMENTAL HYPERTENSION INDUCED BY ANGIOTENSIN II

SUMMARY

Hypertension plays an important role in the physiopathology of many diseases such as cardiovascular diseases, stroke, heart failure and kidney diseases. The role of adropin and nesfatin-1 in regulating blood pressure, which play a role in energy homeostasis and metabolism, has not yet been clarified. In this study, investigation of effects of nesfatin-1 and adropin on blood pressure, renal function, kidney damage and claudin-2 were aimed in a hypertension model.

In our study, male Spraque Dawley rats weighing 240-260 grams were divided into two groups, control and hypertension. Osmotic mini pumps were placed under the skin. The hypertension group received angiotensin II for 7 days at a dose of 0.7 mg/kg/day. On the 1st, 3rd, 5th, and 7th days of the experiment, blood pressure measurements were made by tail cuff plethysmography for all groups. After 24-hour urine collection, blood and tissue samples were taken under anesthesia and rat were euthanized.

In hypertension group: Systolic blood pressure, diastolic blood pressure, mean blood pressure; serum urea, creatinine and NO concentrations; kidney MDA levels; urinary fractional potassium excretion and urine volume were found to be statistically

significant (P<0.05). There was a statistically significant decrease in the levels of serum potassium, urine creatinine, sodium, NO, angiotensin II, creatinine clearance and CLDN-2 immunoreactivity in the hypertensive group (P<0.05). Nesfatin-1 and adropine levels were not statistically significant (P> 0.05).

It has been concluded that new studies which examine the effects of nesfatin-1 and adropin at different doses and durations in different experimental hypertension models are required.

Keywords: Hypertension, adropin, nesfatin-1, claudin-2, angiotensin 2.

KAYNAKLAR

1. Donald M, Lloyd-Jones. General population and global cardiovascular risk prediction. Bakris GL, Sorrentino MJ (Eds). Hypertension a companion to braunwald's heart disease. third ed. Philadelphia, PA 19103-2899: Elsevier; 2018. 1-13 p.

2. Noubiap JJ, Essouma M, Bigna JJ, Jingi AM, Aminde LN, Nansseu JR. Prevalence of elevated blood pressure in children and adolescents in Africa: a systematic review and meta-analysis. Lancet Public Health. 2017;2(8):e375-e86.

3. Itoh H, Mukoyama M, Pratt RE, Gibbons GH, Dzau VJ. Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. J Clin Invest. 1993;91(5):2268-74.

4. Temiz Resitoglu M, Guden D, Firat S. Experimental Models Used in Hypertension Research2016. 35-43 p.

5. Micili SC, Ergür BU, Özoğul C, Sarioğlu S, Bağriyanik A, Tuğyan K, et al. Deneysel Hipertansiyon ve Diyabet Modeli Oluşturulan Sıçanlarda Böbreğin İmmunohistokimyasal Olarak İncelenmesi. DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi. 2012;26(2):91-101.

6. Darambazar G, Nakata M, Okada T, Wang L, Li E, Shinozaki A, et al. Paraventricular NUCB2/nesfatin-1 is directly targeted by leptin and mediates its anorexigenic effect. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2015;456(4):913-8.

7. Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, Okada S, Adachi S, Inoue K, et al. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. Nature. 2006;443:709.

8. Su Y, Zhang J, Tang Y, Bi F, Liu J-N. The novel function of nesfatin-1: Anti-hyperglycemia. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2010;391(1):1039-42.

9. Yosten GL, Samson WK. Cardiovascular and antidipsogenic effects of nesfatin-1. Curr Pharm Des. 2013;19(39):6973-5

10. Mimee A, Smith PM, Ferguson AV. Nesfatin-1 influences the excitability of neurons in the nucleus of the solitary tract and regulates cardiovascular function. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 2012;302(11):R1297-R304.

11. Yosten GLC, Samson WK. Nesfatin-1 exerts cardiovascular actions in brain: possible interaction with the central melanocortin system. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 2009;297(2):R330-R6.

12. Osaki A, Shimizu H. Peripheral administration of nesfatin-1 increases blood pressure in mice. Hypertension Research. 2013;37:185.

13. Zhang JR, Lu QB, Feng WB, Wang HP, Tang ZH, Cheng H, et al. Nesfatin-1 promotes VSMC migration and neointimal hyperplasia by upregulating matrix metalloproteinases and downregulating PPARgamma. Biomed Pharmacother. 2018;102:711-7.

14. Pei YH, Chen J, Xie L, Cai XM, Yang RH, Wang X, et al. Hydroxytyrosol Protects against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury through a PI3K/Akt-Dependent Mechanism. Mediators Inflamm. 2016;2016:1232103.

15. Goetze JP, Albrethsen J. Adropin: a new regulatory peptide in cardiovascular endocrinology. Regulatory peptides. 2014;190-191:41-2.

16. Chen M, Ouyang F, Zhou S. Adropin as a novel energy factor likely has the ability to regulate blood pressure. Medical Hypotheses. 2015;85(2):234.

17. Ganesh-Kumar K, Zhang J, Gao S, Rossi J, McGuinness Owen P, Halem Heather H, et al. Adropin Deficiency Is Associated With Increased Adiposity and Insulin Resistance. Obesity. 2012;20(7):1394-402.

18. Mendis S, Lindholm LH, Mancia G, Whitworth J, Alderman M, Lim S, et al. World Health Organization (WHO) and International Society of Hypertension (ISH) risk prediction charts: assessment of cardiovascular risk for prevention and control of cardiovascular disease in low and middle-income countries. J Hypertens. 2007;25(8):1578-82.

19. Sarki AM, Nduka CU, Stranges S, Kandala NB, Uthman OA. Prevalence of Hypertension in Low- and Middle-Income Countries: A Systematic Review and Meta-Analysis. Medicine (Baltimore). 2015;94(50):e1959.

20. Rubinstein AL, Irazola VE, Calandrelli M, Chen CS, Gutierrez L, Lanas F, et al. Prevalence, Awareness, Treatment, and Control of Hypertension in the Southern Cone of Latin America. Am J Hypertens. 2016;29(12):1343-52.

21. Carretero OA, Oparil S. Essential hypertension. Part I: definition and etiology. Circulation. 2000;101(3):329-35.

22. Muntner P, Carey RM, Gidding S, Jones DW, Taler SJ, Wright JT, Jr., et al. Potential U.S. Population Impact of the 2017 American College of Cardiology/American Heart Association High Blood Pressure Guideline. Circulation. 2017.

23. Guyton AC Hall JE. Tıbbi Fizyoloji. In: Yeğen BÇ, editor. istanbul: Nobel Tip Kitabevleri; 2013. 201-28 p.

24. Rhoades RA, Bell DR. Tıbbi Fizyoloji Klinik Tıbbın Temelleri. 1 ed2017. 317-25 p.

25. Preston RR, Wilson TE, İşoğlu-Alkaç Ü, Ermutlu MN, Yılmaz B. Fizyoloji: Lippincott görsel anlatımlı çalışma kitapları: Nobel Tıp Kitabevleri; 2014. 232-44 p.

26. Spat A, Hunyady L. Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. Physiol Rev. 2004;84(2):489-539.

27. Hall JE, Granger JP, do Carmo JM, da Silva AA, Dubinion J, George E, et al. Hypertension: physiology and pathophysiology. Compr Physiol. 2012;2(4):2393-442.

28. Hall JE. Control of sodium excretion by angiotensin II: intrarenal mechanisms and blood pressure regulation. Am J Physiol. 1986;250(6 Pt 2):R960-72.

29. Hall JE, Brands MW, Henegar JR. Angiotensin II and long-term arterial pressure regulation: the overriding dominance of the kidney. J Am Soc Nephrol. 1999;10 Suppl 12:S258-65.

30. Hall JE GJ. Regulation of fluid and electrolyte balance in hypertension: Role of hormones and peptides. In: Battegay EJ LG, Bakris GL, editor: Taylor & Francis; 2005.

31. Hall JE, Guyton AC, Brands MW. Pressure-volume regulation in hypertension. Kidney Int Suppl. 1996;55:S35-41.

32. Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, et al. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. N Engl J Med. 2001;345(12):861-9.

33. Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. N Engl J Med. 1993;329(20):1456-62.

34. Parving HH, Hommel E, Smidt UM. Protection of kidney function and decrease in albuminuria by captopril in insulin dependent diabetics with nephropathy. BMJ. 1988;297(6656):1086-91.

35. Fuller PJ, Young MJ. Mechanisms of mineralocorticoid action. Hypertension. 2005;46(6):1227-35.

36. Funder JW. Reconsidering the roles of the mineralocorticoid receptor. Hypertension. 2009;53(2):286-90.

37. Oh IS, Shimizu H, Satoh T, Okada S, Adachi S, Inoue K, et al. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. Nature. 2006;443(7112):709-12.

38. Yosten GLC, Stein LM, Samson WK. Novel small peptide hormones. In: Schisler JC, Lang CH, Willis MS, editors. Endocrinology of the Heart in Health and Disease Integrated, Cellular, and Molecular Endocrinology of the Heart. Academic Press ed. London EC2Y 5AS, United Kingdom2016. 115-25 p.

39. Garcia-Galiano D, Navarro VM, Gaytan F, Tena-Sempere M. Expanding roles of NUCB2/nesfatin-1 in neuroendocrine regulation. J Mol Endocrinol. 2010;45(5):281-90.

40. Stengel A, Mori M, Tache Y. The role of nesfatin-1 in the regulation of food intake and body weight: recent developments and future endeavors. Obes Rev. 2013;14(11):859-70.

41. Yosten GL, Redlinger L, Samson WK. Evidence for a role of endogenous nesfatin-1 in the control of water drinking. J Neuroendocrinol. 2012;24(7):1078-84.

42. Konczol K, Pinter O, Ferenczi S, Varga J, Kovacs K, Palkovits M, et al. Nesfatin-1 exerts long-term effect on food intake and body temperature. Int J Obes (Lond). 2012;36(12):1514-21.

43. Yosten GL, Samson WK. The anorexigenic and hypertensive effects of nesfatin-1 are reversed by pretreatment with an oxytocin receptor antagonist. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2010;298(6):R1642-7.

44. Sahin FK, Sahin SB, Ural UM, Cure MC, Senturk S, Tekin YB, et al. Nesfatin-1 and Vitamin D levels may be associated with systolic and diastolic blood pressure values and hearth rate in polycystic ovary syndrome. Bosn J Basic Med Sci. 2015;15(3):57-63.

45. Su Y, Zhang J, Tang Y, Bi F, Liu JN. The novel function of nesfatin-1: anti-hyperglycemia. Biochem Biophys Res Commun. 2010;391(1):1039-42.

46. Ademoglu EN, Gorar S, Carlioglu A, Yazici H, Dellal FD, Berberoglu Z, et al. Plasma nesfatin-1 levels are increased in patients with polycystic ovary syndrome. J Endocrinol Invest. 2014;37(8):715-9.

47. Feijoo-Bandin S, Rodriguez-Penas D, Garcia-Rua V, Mosquera-Leal A, Gonzalez-Juanatey JR, Lago F. Nesfatin-1: a new energy-regulating peptide with pleiotropic functions. Implications at cardiovascular level. Endocrine. 2016;52(1):11-29.

48. Yosten GL, Samson WK. Nesfatin-1 exerts cardiovascular actions in brain: possible interaction with the central melanocortin system. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2009;297(2):R330-6.

49. Ayada C, Turgut G, Turgut S, Guclu Z. The effect of chronic peripheral nesfatin-1 application on blood pressure in normal and chronic restraint stressed rats: related with circulating level of blood pressure regulators. Gen Physiol Biophys. 2015;34(1):81-8.

50. Ayada C, Toru U, Korkut Y. Nesfatin-1 and its effects on different systems. Hippokratia. 2015;19(1):4-10.

51. Kumar KG, Trevaskis JL, Lam DD, Sutton GM, Koza RA, Chouljenko VN, et al. Identification of adropin as a secreted factor linking dietary macronutrient intake with energy homeostasis and lipid metabolism. Cell Metab. 2008;8(6):468-81.

52. Ganesh Kumar K, Zhang J, Gao S, Rossi J, McGuinness OP, Halem HH, et al. Adropin deficiency is associated with increased adiposity and insulin resistance. Obesity (Silver Spring). 2012;20(7):1394-402.

53. Aydin S, Kuloglu T, Aydin S, Eren MN, Yilmaz M, Kalayci M, et al. Expression of adropin in rat brain, cerebellum, kidneys, heart, liver, and pancreas in streptozotocin-induced diabetes. Mol Cell Biochem. 2013;380(1-2):73-81.

54. Lovren F, Pan Y, Quan A, Singh KK, Shukla PC, Gupta M, et al. Adropin is a novel regulator of endothelial function. Circulation. 2010;122(11 Suppl):S185-92.

55. Li L, Xie W, Zheng XL, Yin WD, Tang CK. A novel peptide adropin in cardiovascular diseases. Clin Chim Acta. 2016;453:107-13.

56. Hou J, Rajagopal M, Yu AS. Claudins and the kidney. Annu Rev Physiol. 2013;75:479-501.

57. Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. J Cell Biol. 1998;143(2):391-401.

58. Muto S. Physiological roles of claudins in kidney tubule paracellular transport. Am J Physiol Renal Physiol. 2017;312(1):F9-F24.

59. Gunzel D, Yu AS. Claudins and the modulation of tight junction permeability. Physiol Rev. 2013;93(2):525-69.

60. Yu AS. Claudins and the kidney. J Am Soc Nephrol. 2015;26(1):11-9.

61. Datta D, Foley RJ, Wu R, Grady J, Scalise P. Renal Function, Weaning, and Survival in Patients With Ventilator-Dependent Respiratory Failure. J Intensive Care Med. 2017:885066617696849.

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

63. Devi GS, Prasad MH, Saraswathi I, Raghu D, Rao DN, Reddy PP. Free radicals antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different types of leukemias. Clin Chim Acta. 2000;293(1-2):53-62.

64. Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. Clin Chem. 1990;36(8 Pt 1):1440-3.

65. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193(1):265-75.

66. Caligiuri SP, Edel AL, Aliani M, Pierce GN. Flaxseed for hypertension: implications for blood pressure regulation. Curr Hypertens Rep. 2014;16(12):499.

67. Aizawa T, Ishizaka N, Taguchi J, Nagai R, Mori I, Tang SS, et al. Heme oxygenase-1 is upregulated in the kidney of angiotensin II-induced hypertensive rats: possible role in renoprotection. Hypertension. 2000;35(3):800-6.

68. Ishizaka N, de Leon H, Laursen JB, Fukui T, Wilcox JN, De Keulenaer G, et al. Angiotensin II-induced hypertension increases heme oxygenase-1 expression in rat aorta. Circulation. 1997;96(6):1923-9.

69. Fan X, Liu K, Cui W, Huang J, Wang W, Gao Y. Novel mechanism of intrarenal angiotensin II-induced sodium/proton exchanger 3 expression by losartan in spontaneously hypertensive rats. Mol Med Rep. 2014;10(5):2483-8.

70. Fransen P, Van Hove CE, Leloup AJ, Schrijvers DM, De Meyer GR, De Keulenaer GW. Effect of angiotensin II-induced arterial hypertension on the voltage-dependent contractions of mouse arteries. Pflugers Arch. 2016;468(2):257-67.

71. Saito K, Ishizaka N, Hara M, Matsuzaki G, Sata M, Mori I, et al. Lipid accumulation and transforming growth factor-beta upregulation in the kidneys of rats administered angiotensin II. Hypertension. 2005;46(5):1180-5.

72. Sumitomo-Ueda Y, Aihara K, Ise T, Yoshida S, Ikeda Y, Uemoto R, et al. Heparin cofactor II protects against angiotensin II-induced cardiac remodeling via attenuation of oxidative stress in mice. Hypertension. 2010;56(3):430-6.

73. Gordish KL, Beierwaltes WH. Chronic resveratrol reverses a mild angiotensin II-induced pressor effect in a rat model. Integr Blood Press Control. 2016;9:23-31.

74. Li XC, Navar LG, Shao Y, Zhuo JL. Genetic deletion of AT1a receptors attenuates intracellular accumulation of ANG II in the kidney of AT1a receptor-deficient mice. Am J Physiol Renal Physiol. 2007;293(2):F586-93.

75. Seth MK, Hussain ME, Pasha S, Fahim M. Effects of a novel ACE inhibitor, 3-(3-thienyl)-l-alanyl-ornithyl-proline, on endothelial vasodilation and hepatotoxicity in l-NAME-induced hypertensive rats. Drug Des Devel Ther. 2016;10:1533-42.

76. Srisawat U, Kongrat S, Muanprasat C, Chatsudthipong V. Losartan and Sodium Nitroprusside Effectively Protect against Renal Impairments after Ischemia and Reperfusion in Rats. Biol Pharm Bull. 2015;38(5):753-62.

77. Sasser JM, Cunningham MW, Jr., Baylis C. Serelaxin reduces oxidative stress and asymmetric dimethylarginine in angiotensin II-induced hypertension. Am J Physiol Renal Physiol. 2014;307(12):F1355-62.

78. Vaziri ND, Wang XQ, Oveisi F, Rad B. Induction of oxidative stress by glutathione depletion causes severe hypertension in normal rats. Hypertension. 2000;36(1):142-6.

79. Giani JF, Janjulia T, Kamat N, Seth DM, Blackwell WL, Shah KH, et al. Renal angiotensin-converting enzyme is essential for the hypertension induced by nitric oxide synthesis inhibition. J Am Soc Nephrol. 2014;25(12):2752-63.

80. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. Physiol Rev. 1994;74(1):139-62.

81. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90(17):7915-22.

82. Brondani LA, Boelter G, Assmann TS, Leitao CB, Canani LH, Crispim D. Irisin-encoding gene (FNDC5) variant is associated with changes in blood pressure and lipid profile in type 2 diabetic women but not in men. Metabolism. 2015;64(9):952-7.

83. Osinska AN, Begier-Krasinska B, Rzymski P, Krasinska A, Tykarski A, Krasinski Z. The influence of adding tomato extract and acetylsalicylic acid to hypotensive therapy on the daily blood pressure profiles of patients with arterial hypertension and high cardiovascular risk. Kardiochir Torakochirurgia Pol. 2017;14(4):245-52.

84. Hermida RC, Ayala DE, Calvo C, Lopez JE. Aspirin administered at bedtime, but not on awakening, has an effect on ambulatory blood pressure in hypertensive patients. J Am Coll Cardiol. 2005;46(6):975-83.

85. Magen E, Viskoper JR, Mishal J, Priluk R, London D, Yosefy C. Effects of low-dose aspirin on blood pressure and endothelial function of treated hypertensive hypercholesterolaemic subjects. J Hum Hypertens. 2005;19(9):667-73.

86. Shim KY, Eom YW, Kim MY, Kang SH, Baik SK. Role of the renin-angiotensin system in hepatic fibrosis and portal hypertension. Korean J Intern Med. 2018;33(3):453-61.

87. Osmond DA, Zhang S, Pollock JS, Yamamoto T, De Miguel C, Inscho EW. Clopidogrel preserves whole kidney autoregulatory behavior in ANG II-induced hypertension. Am J Physiol Renal Physiol. 2014;306(6):F619-28.

88. Muto S, Hata M, Taniguchi J, Tsuruoka S, Moriwaki K, Saitou M, et al. Claudin-2-deficient mice are defective in the leaky and cation-selective paracellular permeability properties of renal proximal tubules. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(17):8011-6.

89. Yatabe MS, Yatabe J, Takano K, Murakami Y, Sakuta R, Abe S, et al. Effects of a high-sodium diet on renal tubule Ca2+ transporter and claudin expression in Wistar-Kyoto rats. BMC Nephrol. 2012;13:160.

90. Yosten GL, Samson WK. Neural circuitry underlying the central hypertensive action of nesfatin-1: melanocortins, corticotropin-releasing hormone, and oxytocin. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2014;306(10):R722-7.

91. Akcilar R, Ayada C, Turgut G, Turgut S. Supplementation of apelin increase plasma levels of nesfatin-1 in normal and DOCA-salt hypertensive rats. Bratisl Lek Listy. 2015;116(2):104-8.

92. Yang F, Zhou L, Qian X, Wang D, He WJ, Tang ZW, et al. Adropin Is a Key Mediator of Hypoxia Induced Anti-Dipsogenic Effects via TRPV4-CamKK-AMPK Signaling in the Circumventricular Organs of Rats. Front Mol Neurosci. 2017;10:105.

93. Gu X, Li H, Zhu X, Gu H, Chen J, Wang L, et al. Inverse Correlation Between Plasma Adropin and ET-1 Levels in Essential Hypertension: A Cross-Sectional Study. Medicine (Baltimore). 2015;94(40):e1712.

94. Celik HT, Akkaya N, Erdamar H, Gok S, Kazanci F, Demircelik B, et al. The Effects of Valsartan and Amlodipine on the Levels of Irisin, Adropin, and Perilipin. Clin Lab. 2015;61(12):1889-95.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Tablo 1: Kan basıncının sınıflandırılması 4

Tablo 2. Grupların sistolik kan basıncı (mm Hg) bulguları 29

Tablo 3. Grupların diyastolik kan basıncı (mm Hg) bulguları 29

Tablo 4. Grupların ortalama kan basıncı (mm Hg) bulguları 30

Tablo 5. Grupların nabız sayısı (atım/dk) bulguları 30

Tablo 6. Grupların serum değişkenlerine ait bulgular 33

Tablo 7. Grupların böbrek değişkenlerine ait bulgular 34

Tablo 8. Grupların idrar değişkenlerine ait bulgular 35

Tablo 9. Nesfatin-1 ve adropin parametreleri ile böbrek fonksiyon parametreleri arasındaki korelasyon bulguları 52

Tablo 10. Grupların histopatolojik sonuçlarına ait bulgular 53

Tablo 11. Grupların klaudin-2 (CLDN-2) immünreaktivitesine ait bulgular 57

Şekil 1. Klaudin (CLDN) protein modeli 10
Şekil 2. Böbrek tübülündeki klaudin (CLDN) lokalizayonu 11
Şekil 3. Kontrol grubu deney protokolü 13
Şekil 4. Hipertansiyon grubu deney protokolü 13
Şekil 5. NO standart çalışması regresyon grafiği 20
Şekil 6. Nesfatin-1 standart çalışması regresyon grafiği 22
Şekil 7. Adropin standart çalışması regresyon grafiği 23
Şekil 8. Anjiotensin II standart çalışması regresyon grafiği 24
Şekil 9. Mikroalbuminüri (MAU) standart çalışması regresyon grafiği 25
Şekil 10. Gruplar arası sistolik kan basıncı değerlerinin karşılaştırılması 31
Şekil 11. Gruplar arası diyastolik kan basıncı değerlerinin karşılaştırılması 31
Şekil 12. Gruplar arası ortalama kan basıncı değerlerinin karşılaştırılması 32
Şekil 13. Gruplar arası nabız sayısı değerlerinin karşılaştırılması. 32
Şekil 14. Gruplar arası serum sodyum düzeylerinin karşılaştırılması 36
Şekil 15. Gruplar arası serum potasyum düzeylerinin karşılaştırılması 36
Şekil 16. Gruplar arası serum üre düzeylerinin karşılaştırılması 37
Şekil 17. Gruplar arası serum kreatinin düzeylerinin karşılaştırılması 38
Şekil 18. Gruplar arası serum CK düzeylerinin karşılaştırılması 38
Şekil 19. Gruplar arası serum ALT düzeylerinin karşılaştırılması 39
Şekil 20. Gruplar arası serum AST düzeylerinin karşılaştırılması 39
Şekil 21. Gruplar arası serum NO düzeylerinin karşılaştırılması 40
Şekil 22. Gruplar arası serum adropin düzeylerinin karşılaştırılması 40
Şekil 23. Gruplar arası serum nesfatin-1 düzeylerinin karşılaştırılması 41
Şekil 24. Gruplar arası serum ANG II düzeylerinin karşılaştırılması 41
Şekil 25. Gruplar arası böbrek MDA düzeylerinin karşılaştırılması 42
Şekil 26. Gruplar arası böbrek GSH düzeylerinin karşılaştırılması 42
Şekil 27. Gruplar arası böbrek NO düzeylerinin karşılaştırılması 43
Şekil 28. Gruplar arası böbrek adropin düzeylerinin karşılaştırılması 43
Şekil 29. Gruplar arası böbrek nesfatin-1 düzeylerinin karşılaştırılması 44
Şekil 30. Gruplar arası böbrek ANG II düzeylerinin karşılaştırılması 44
Şekil 31. Gruplar arası idrar kreatinin düzeylerinin karşılaştırılması 45
Şekil 32. Gruplar arası idrar total protein düzeylerinin karşılaştırılması 45
Şekil 33. Gruplar arası idrar sodyum düzeylerinin karşılaştırılması 46

Şekil 34. Gruplar arası idrar potasyum düzeylerinin karşılaştırılması 46
Şekil 35. Gruplar arası idrar NO düzeylerinin karşılaştırılması 47
Şekil 36. Gruplar arası idrar adropin düzeylerinin karşılaştırılması 47
Şekil 37. Gruplar arası idrar nesfatin-1 düzeylerinin karşılaştırılması 48
Şekil 38. Gruplar arası idrar ANG II düzeylerinin karşılaştırılması 48
Şekil 39. Gruplar arası idrar MAU düzeylerinin karşılaştırılması 49
Şekil 40. Gruplar arası fraksiyonel sodyum atılımı düzeylerinin karşılaştırılması 49
Şekil 41. Gruplar arası fraksiyonel potasyum atılımı düzeylerinin karşılaştırılması 50
Şekil 42. Gruplar arası kreatinin klirensi düzeylerinin karşılaştırılması 51
Şekil 43. Gruplar arası idrar hacmi düzeylerinin karşılaştırılması 51
Şekil 44. Gruplar arası tübüler hasar skoru karşılaştırılması 54
Şekil 45. Gruplar arası peritübüler fibrozis karşılaştırılması 54
Şekil 46. Gruplar arası glomerüloskleroz skoru karşılaştırılması 55
Şekil 47. Gruplar arası kast karşılaştırılması 55
Şekil 48. Kontrol grubunun hematoksilen-eozin ile boyanmış böbrek kesiti (HEx400) 56
Şekil 49.Hipertansiyon grubunun hematoksilen-eozin ile boyanmış böbrek kesiti (HEx400) 56
Şekil 50. Gruplar arası klaudin-2 (CLDN-2) immünreaktivitesi karşılaştırılması 57
Şekil 51.Kontrol grubu klaudin-2 (CLDN-2) immünreaktivitesi (X400) 58
Şekil 52.Hipertansiyon grubu klaudin-2 (CLDN-2) immünreaktivitesi (X400) 58

ÖZGEÇMİŞ

1993 yılında Elazığ'da doğdum. Lise eğitimimi 2011 yılında Turgut Özal Anadolu Lisesi'nde tamamladım. Lisans eğitimimi 2012-2016 yılları arasında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesinde Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Bölümü'nde tamamladım. 2016 yılında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladım. Tübitak 1001 projesinde Kasım 2016-Mart 2018 tarihleri arasında bursiyer olarak görev aldım.

Poster: Nihayet Kandemir, Nurettin Aydogdu, Ebru Tastekin, Assel Kudaibergenova, Muhammed Ali Aydin. Investigation of the Effects of Lycopene on Experimentally Hypertension-induced Rats. Acta Physiol 2017, 221 (suppl 714) OC07 (Eylül 2017).

Poster: Assel Kudaibergenova, Nurettin Aydogdu, Nihayet Kandemir, Muhammed Ali Aydin. Investigation of Kisspeptin Role in Experimental Kidney Ischemia/Reperfusion Injury. Acta Physiol 2017, 221 (suppl 714) PC088 (Eylül 2017).

Poster: Muhammed Ali Aydin, Nurettin Aydogdu, Ebru Tastekin, Nihayet Kandemir, Ozlem Yalçinkaya Yavuz, Assel Kudaibergenova. Investigation of the relation of nesfatin-1 and adropin with blood pressure in experimental hypertension model. 3Rd Internatıonal Congress Of Turkısh Neuroendocrınology Socıety Abstract Book PC-006. Malatya, 2018.

Poster: Nur Gulce Iskan, Begum Soyleyici, Nihayet Kandemir, Muhammed Ali Aydin, Assel Kudaibergenova, Nurettin Aydogdu. Investigation of adropin levels in experimental myoglobinuric acute kidney injury. 3Rd Internatıonal Congress Of Turkısh Neuroendocrınology Socıety Abstract Book PC-004. Malatya, 2018.

Ödül: İnönü Üniversite'sinde 29 Haziran-1 Temmuz 2018 tarihleri arasında düzenlenen 3Rd Internatıonal Congress Of Turkısh Neuroendocrınology Socıety'de "Investigation of the relation of nesfatin-1 and adropin with blood pressure in experimental hypertension model" isimli poster ile en iyi poster ödülü, 2018.

EKLER

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: 2017/05 **Karar Tarihi: 31.05.2017**

KARAR NO: 2017.05.03

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Nurettin AYDOĞDU'nun yaptığı, Muhammed Ali AYDIN'ın Yüksek Lisans tezi olarak planlanan TÜHADYEK-2017/16 protokol nolu "**Anjiotensin II ile oluşturulan deneysel hipertansiyon modelinde nesfatin 1 ve adropin'in böbrek fonksiyonları ile ilişkisinin araştırılması**'' 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.

Prof. Dr. Enis ULUÇAM
Başkan
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐evet ☐ hayır

Vet. Hekim Ziya ÇUKUR
Vet. Hek. Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Yrd. Doç. Dr. Beytullah ÖZKAN
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒yok
Toplantı Katılım: ☒ evet ☐ hayır

Doç. Dr. Y. Atakan SEZER
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Doç. Dr. Tevfik AKTOZ
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒yok
Toplantı Katılım: ☒ evet ☐ hayır

Doç. Dr. Hakan GÜRKAN
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐evet ☐ hayır

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

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

Osman GÜLTEKİN
Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır