T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TİP 2 DİYABET HASTALARINDA C-PEPTİD'İN NEFROPATİ KRİTERLERİ, AGE, TGF-ß1 VE HGF İLE İLİŞKİLERİNİN İNCELENMESİ

ELİF BEGÜM İLTER GARCİA MORENO

DANIŞMAN
PROF. DR. GÜLDEN BURÇAK

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI

Bu çalışma 26/06/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyokimya Anabilim Dalı, Biyokimya Tezli Yüksek Lisans Programı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ

Prof.Dr. Gülden BURÇAK
İstanbul Okan Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Prof.Dr. Hafize UZUN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Prof.Dr. Zeynep Gülnur ANDİCAN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Elif Begüm İlter Garcia Moreno



İTHAF

Hayatını bilime adamış, tüm emekçi bilim kadınlarına ve kızıma ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez sınavı döneminde manevi desteğini esirgemeyen İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Hafize UZUN'a, yüksek lisans tezi çalışmamda bana Anabilim dalının tüm olanaklarını sunan önceki Anabilim Dalı Başkanı'mız Sayın Prof. Dr. Dildar KONUKOĞLU'na, bir önceki Anabilim Dalı Başkanı'mız Sayın Prof. Dr. Hüseyin SÖNMEZ'e ve Yüksek Lisans eğitimimde emeği geçen tüm saygıdeğer hocalarıma,

Eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, desteğini ve koruyup kollayan anaç tavrını her zaman hissettiğim, azmini, çalışkanlığını ve kendini bilime adamışlığını örnek aldığım, tezimin bu noktaya gelmesinde büyük bir özveriyle benden yardımlarını esirgemeyen, öğrencisi olmaktan onur duyduğum danışmanım, değerli hocam, Sayın Prof. Dr. Gülden BURÇAK'a,

Tez çalışmamdaki bilimsel katkıları, öğrenciliğim süresince gösterdiği sevgi ve desteği için Sayın Prof. Dr. Gülnur ANDİCAN'a,

Tez çalışmamın hasta temini süresince bana her türlü destek ve laboratuvar imkanı sağlayan başta Dr. Suat Hayri KÜÇÜK, Doç Dr. Dede ŞİT olmak üzere ve emeği geçen tüm Bağcılar Eğitim Araştırma Hastanesi çalışanlarına, özellikle de Sn. Dr. Emel Sağlam GÖKMEN, Sn. Sultan YURTSEVER ve Sn. Dr. Bennur ESEN'e,

Laboratuvar çalışmalarıma olanak sağlayan İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Fikret Biyal Merkez Biyokimya Laboratuvarı'na

Birlikte zevkli bir eğitim süreci geçirdiğimiz, iyi ve kötü günleri paylaştığım, bilimsel ve manevi anlamda çok şey öğrendiğim, tek tek isimlerini kalbimde sevgiyle taşıdığım tüm yüksek lisans, doktora ve uzmanlık öğrencisi arkadaşlarıma,

Yeteneğini bana bu projede destek olmak için kullanan, bebeklikten bugüne hep yanımda olan Sn. Funda ZİNGİ'ye,

Benim Cerrahpaşa'da böyle bir yolculuğa çıkmama vesile olan, hayatımın 19 yıllık acı tatlı tüm anılarına şahitlik eden, her zaman yanımda olan Sn. Miray AKSOY'a,

Hayatım her aşamasında olduğu gibi bu zorlu yolculukta da yine elimden tutup beni yalnız bırakmadıkları, gösterdikleri sonsuz sevgi, anlayış ve destek için sevgili anne ve babama, canım kardeşime, değerli eşime ve sabrından ötürü biricik kızıma,

İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimine tez projemi desteklediği için ve teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 30890

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİİ
TABLOLAR LİSTESİ X
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... XİV
ÖZET XX
ABSTRACT ..... XXİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 5
2.1. C-Peptid 5
2.1.1. C-peptidin hücre membranları ile etkileşimi ve etki mekanizması 7
2.1.2. C-peptid'in damar koruyucu etkileri 11
2.1.3. C-peptid'in kan hücreleri ve mikrovasküler kan akımı üzerine etkileri 12
2.1.4. Diyabette C-peptid ve böbrek fonksiyonları 14
2.1.5. Tip 2 Diyabet ve C-peptid 18
2.2. Diabetes Mellitus 21
2.2.1. Diabetes Mellitus'un Etyolojik Sınıflandırılması ve Kriterleri (Care, 2014; Care, 2019) 22
2.2.2. Tip 1 Diabetes Mellitus 23
2.2.3. Tip 2 Diabetes Mellitus 24
2.2.4. Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları 25
2.3. Diyabetik Nefropati 26
2.3.1. Diyabetik Nefropati Patogenezinde Rol Alan Biyokimyasal Mekanizmalar 30
2.3.1.1. Poliol Yolu Aktivasyonu 30
2.3.1.2. İleri Glikasyon 32
2.3.1.2.1. Proteinlerin İleri Glikasyon Son Ürünleri ile Modifikasyonları 32

2.3.1.2.2. AGE'ler ile modifiye proteinlerin metabolizmaları 35
2.3.1.2.3. AGE-Reseptörleri (RAGE) 37
2.3.1.2.4. AGE'ler ile modifiye proteinler ve serbest AGE ürünlerinin fizyopatolojik önemleri 40
2.3.1.2.5. İleri Glikasyon ve Diyabetik Nefropati 44
2.3.1.2.6. Kronik Böbrek Hastalığında AGE'ler ve Ateroskleroz 48
2.3.1.3. Protein Kinaz C (PKC) Aktivasyonu 51
2.3.1.4. Heksozamin Yolu Aktivasyonu 52
2.3.1.5. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ile Hiperglisemide İndüklenen Sinyal İleti Olayları Arasındaki İlişkiler 53
2.4. Dönüştürücü Büyüme Faktörü (TGF-β1) Aktivasyonu 57
2.4.1. Epitelyal Mezenkimal Transisyon (EMT) ve Diyabetik Nefropati 61
2.4.2. Diyabetik Nefropatide Tedavi Hedefi olarak TGF-β1 63
2.5. G- Proteinler, Hücre Siklusu Proteinleri ve Diyabetik Nefropati 65
2.6. Diyabetik Nefropati Patogenezinde İntraglomerüler Hipertansiyon 68
2.7. Diyabetik Nefropatide Tübülointerstisyel Hasar Mekanizmaları 72
2.8. Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF) 74
2.8.1. HGF ve TGFβ-1 76
2.8.2. AGE'lerin otofajik klirensleri ve HGF 80
2.8.3. Kronik Böbrek Hastalığı ve Antienflamatuvar HGF Etkisi 80
3. GEREÇ VE YÖNTEM 82
3.1. Gereçler 83
ANALİZ KİTLERİ 83
3.2. Yöntemler 83
3.2.1. TGF-β1 analizi 83
3.2.2. HGF analizi 86
3.2.3. AGE analizi 90
3.2.4. eGFR Hesaplama Yöntemi 93
3.2.5. İstatistiksel Analiz Yöntemi 93
4. BULGULAR 94
4.1. Korelasyon Bulguları 106

5. TARTIŞMA 117
KAYNAKLAR 123
FORMLAR (HASTA ONAM FORMU) 133
ETİK KURUL KARARI 136
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 137
ÖZGEÇMİŞ 139

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1. Çeşitli hücrelerde C-peptid ile uyarılan sinyal molekülleri 9
Tablo 4.1 Kontrol Grubuna Ait Demografik Özellikler 97
Tablo 4.2 Diabetes Mellitus Grubuna Ait Demografik Özellikler 97
Tablo 4.3 Mikroalbüminürili Diyabetik Nefropati Grubuna Ait Demografik Özellikler 98
Tablo 4.4 Makroalbüminürili Diyabetik Nefropati Grubuna Ait Demografik Özellikler 98
Tablo 4.5 Kontrol Grubunda Saptanan Biyokimyasal Parametrelerin Ortalama ± Standart Sapma Değerleri 99
Tablo 4.6 Diabetes Mellitus Grubunda Saptanan Biyokimyasal Parametrelerin Ortalama ± Standart Sapma Değerleri 100
Tablo 4.7 Mikroalbüminürili Diyabetik Nefropati Grubunda Saptanan Biyokimyasal Parametrelerin Ortalama ± Standart Sapma Değerleri 101
Tablo 4.8 Makroalbüminürili Diyabetik Nefropati Grubunda Saptanan Biyokimyasal Parametrelerin Ortalama ± Standart Sapma Değerleri 102
Tablo 4.9 İstatistiksel Karşılaştırma Bulguları-(I) 103
Tablo 4.10 İstatistiksel Karşılaştırma Bulguları-(II) 104

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1. İnsan proinsülinin doğrusal yapısı 5
Şekil 2.2: C-peptidin, boğmaca toksinine toksinine hassas G-protein-bağlı reseptör aktivasyonu ve PLC ve PI 3-K enzim aktivitelerini uyarması ile ilişkili olduğu düşünülen hücresel etkileri 10
Şekil 2.3: C-Peptid'in kan akımı üzerindeki etkileri 13
Şekil 2.4: C-peptid'in glomerülüsta, proksimal tübülüs, Henle kulbu, distal tübülüs ve toplayıcı kanallardaki koruyucu etkileri 17
Şekil 2.5: İnsülin direnci olan ve tip 2 diyabeti olan bireylerde C-peptidin aterogenezin başlangıç evresindeki rolü 19
Şekil 2.6: Diyabetik nefropatinin evreleri 27
Şekil 2.7: Diyabetik nefropatinin glomerüler ve tübüler bulguları 29
Şekil 2.8: Diyabetik komplikasyonların patogenezinde yer alan faktörler 29
Şekil 2.9: Aldoz redüktaz ve poliol yolu 31
Şekil 2.10: İntraselüler dikarbonil bileşiklerinden AGE oluşumu 33
Şekil 2.11: Başlıca AGE Bileşikleri 34
Şekil 2.12: AGE'lerin metabolizmaları; turnover ve çeşitli vücut kompartmanlarındaki konsantrasyonlarını etkileyen faktörler 36
Şekil 2.13: AGE reseptör (RAGE) yapısı ve başlıca varyantları 40
Şekil 2.14: AGE'lerin matriks metalloproteinaz aktiviteleri üzerine etkileri 41
Şekil 2.15: İntraselüler dikarbonil bileşiklerinden AGE'lerin oluşum yolları 42
Şekil 2.16: AGE'lerin etkileri 43
Şekil 2.17: AGE oluşumu ve uyarılan hücre içi olayları 45
Şekil 2.18: Karbonil ara ürünleri ve diyabet veya üremideki akıbetleri 47
Şekil 2.19: AGE-RAGE aksının diyabetik nefropatideki patofizyolojik rolü 48
Şekil 2.20: AGE-RAGE etkileşimi ve GLUT aracılığı ile hücre içine aşırı miktarda glukoz girişi ile gelişen olaylar 51
Şekil 2.21: Heksozamin yolu 53
Şekil 2.22: Hiperglisemi ile mitekondride indüklenen aşırı süperoksid oluşumunun dört hiperglisemik hasar mekanizmasını uyarması 54

Şekil 2.23: Hiperglisemi ile mitekondride indüklenen aşırı süperoksid oluşumunun neden olduğu PARP aktivasyonu, GADPH modifikasyonu ve hiperglisemik hasar mekanizması 55
Şekil 2.24: Sitozolde ve mitokondride ROS oluşumu ile sonuçlanan olaylar 56
Şekil 2.25: TGF-β1 ve BMP-7 (kemik morfogenik protein) ile uyarılan sinyal mekanizmaları 59
Şekil 2.26: AGE ile Ang II'nin reseptörleri ile etkileşimleri sonucunda ROS oluşumu, PKC, Rap1 ve RhoGTPazların aktivasyonu 66
Şekil 2.27: Glukoz ve AGE'ler tarafından renin-angiotensin sisteminin lokal glomerüler aktivasyonu 69
Şekil 2.28: Glukoz ve AGE'ler tarafından renin-angiotensin sisteminin sistemik aktivasyonu 70
Şekil 2.29: böbrek hücrelerinde yüksek glukoz konsantrasyonlarına maruziyete bağlı olan ve diyabetik nefropati ile sonuçlanan gen ekspresyon değişiklikleri ve hücresel bozukluklar 72
Şekil 2.30: Böbrek hücrelerinde HGF sinyal yolları 75
Şekil 2.31: Renal fibrozun HGF tarafından inhibisyonuna yol açan hücresel mekanizmalar 78
Şekil 3.1: TGF-β1 standart kalibrasyon eğrisi 86
Şekil 3.2: HGF standart kalibrasyon eğrisi 89
Şekil 3.3: Serumda AGE analizinde kullanılan standart grafik 92
Şekil 3.4: İdrarda AGE analizinde kullanılan standart grafik 92
Şekil 4.1: Çalışma Gruplarında; Kreatinin, Mikroalbüminüri ve eGFR Ortalama ± Standart Sapma Değerleri 105
Şekil 4.2: Çalışma Gruplarında; AGE serum ve AGE idrar Ortalama ± Standart Sapma Değerleri 105
Şekil 4.3: DM Grubunda Mikroalbüminüri – Kreatinin değerleri arasındaki ilişki 109
Şekil 4.4: DN Grubunda Mikroalbüminüri – Kreatinin değerleri arasındaki ilişki 109
Şekil 4.5: DM Grubunda Mikroalbüminüri – eGFR değerleri arasındaki ilişki 110
Şekil 4.6: Makroalbüminürili DN Grubunda Mikroalbüminüri – eGFR değerleri arasındaki ilişki 110
Şekil 4.6: DM Grubunda; Total protein ve albümin değerlerinin C-peptid ve insülin değerleri ile aralarındaki ilişkiler 111

Şekil 4.8: Mikroalbüminürili DN Grubunda C peptid - Kreatinin değerleri arasındaki ilişki 112
Şekil 4.9: DM Grubunda C peptid'in eGFR ve ürik asit değerleri arasındaki ilişki..... 113
Şekil 4.10: DN Grubunda AGE idrar ile AGE serum değerleri arasındaki ilişki 114
Şekil 4.11: Mikroalbüminürili DN Grubu HGF- insülin, AGE serum ve AGE idrar değerleri arasındaki ilişki 115
Şekil 4.12: DM Grubunda AGE idrar ile AKŞ, HbA1c ve insülin değerleri arasındaki ilişki 116

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

Aβ : Amiloid beta peptid
ACE : Anjiyotensin dönüştürücü enzim
ADA : Amerikan diyabet derneği
ADP : Adenozin difosfat
AGE : İleri glikasyon son ürünleri
AGE-R1 : OST-48
ALT : Alanin transaminaz
AP-1 : Aktivatör protein-1
AR : Aldoz redüktaz
AST : Aspartat transaminaz
AT : Anjiyotensin
ATF2 : Aktif transkripsiyon faktörü
ATP : Adenozin-5'-trifosfat
BH_4 : Tetrahidrobiopterin
BMP : Kemik morfogenik proteini
C-peptid : Bağlayıcı peptit
CBP : CREB proteinine bağlanan protein
CDK : Siklin bağımlı kinaz
CDI : CDK inhibitörleri
CEL : N^{ε}-Karboksietil lizin
CML : N^{ε}-Karboksimetil lizin
COX : Siklooksijenaz
CuZnSOD : CuZn süperoksit dismutaz
cRAGE : Cleaved rage
CRP : C-reaktif protein
CTGF : Bağ dokusu büyüme faktörü
DAG : Diaçilgliserol
DCCT : Diyabet kontrol ve komplikasyon faktörü
3DG : 3-Deoksiglukozon
DHA : Dokosahekzaenoik asit
DHAP : Dihidroksiaseton fosfat

DKA : Diyabetik ketoasidoz
DN : Diyabetik nefropati
dnRAGE : Baskın-negatif RAGE
DM : Diabetes mellitus
ECM : Hücre dışı sıvı
ELİSA : Enzimle bağlanmış immünosorbent analizi
Elk-1 : ETS-benzeri transkripsiyon faktörü 1
EMT : Epiteliyal- mezenkimal transformasyon
eNOS : Endotelyal nitrik oksit sentaz
EPA : Eikosapentaenoik asit
EPO : Eritropoetin
ERK : Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz
esRAGE : Endojen sekretuar RAGE/RAGE-v1
GADPH : Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz
GAP : GTPaz aktive edici protein
GBM : Glomerüler bazal membran
GDM : Gestasyonel diabetes mellitus
GDP : Guanozin difosfat
GEF : Guanin nükleotit değiştirici faktör
GFAT : Fruktoz-6 fosfat-aminotransferaz
GFR : Glomerüler filtrasyon hızı
GLUT : Glukoz taşıyıcısı
GOLD : Glioksal lizin dimer
Grb2 : Büyüme faktörü reseptörü bağlayıcı protein 2
GS : Glikojen sentaz
GSK3 : Glikojen sentaz kinaz 3
GTP : Guanozin-5'-trifosfat
GTPaz : Guanozin-5'-trifosfataz
H_2O_2 : Hidrojen peroksit
HbA1c : Hemoglobin A_{1c} / Glikohemoglobin
HDL : Yüksek dansiteli lipoprotein
HGF : Hepatosit büyüme faktörü
HIF-1 : Hipoksiyle indüklenen faktör-1

HLA : İnsan spesifik antijeni
HNF : Hepatik nüklear faktör
HMGB1 : Yüksek mobiliteli grup proteinleri
HPLC : Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HRP : Yaban turpu peroksidaz
ICAM-1 : Hücre içi bağlayıcı protein-1
IDNT : Diyabetik nefropati irbesartan çalışması
IFG : Bozulmuş açlık glukozu
IGF-1 : İnsülin büyüme ve faktörü 1
IGT : Bozulmuş glukoz toleransı
IKK : IκB Kinaz kompleksi
IL-1β : İnterlökin-1β
IL-6 : İnterlökin-6
IP_3 : İnozitol trifosfat
IRS : İnsülin reseptör substratı
JAK/STAT : Janus kinase ve sinyal ileticisi ve aktivatör
JNK : c-Jun N-terminal kinases
KBH : Kronik böbrek hastalığı
LDL : Düşük dansiteli lipoprotein
LA : Linoleik asit
LAP : Latansla ilişkili peptit
α-LNA : α-Linolenik asit
LOX : Lipooksijenaz
LOX-1 : Lectin-like oxidized LDL receptor-1
LT : Lökotrien
LXR : Karaciğer X reseptörü
MAPK : Mitojenle aktive edilmiş protein kinaz
MCP-1 : Monosit kemotaktik protein-1
MEK : Mitojenle active edilmiş protein kinaz
MIS : Müllerian inhibitor madde
MG : Metilglioksal
MG-H1 : Metilglioksal türevi hidroimidazolon
MHC III : Major doku uygunluk kompleksi III

MMP : Matriks metalloproteinaz
MnSOD : Manganez süperoksit dismutaz
MOLD : Metil glioksal lizin dimer
mRNA : Haberci ribonükleik asit
miRNA : Mikro RNA
MSR : Makrofaj çöpçü protein
MS : Kütle spektrometrisi
NADPH : Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NF-kappa B : Nükleer faktör kappa B
NGSP : National glikohemoglobin standardizasyon programı
NO : Nitrik oksit
NOS : Nitrik oksit sentaz
NRK-529 : Sıçan tübüler epitel hücre soyu
NRP-1 : Neuropilin-1
NtRAGE : N truncated RAGE
$OH^{\bullet}$: Hidroksil radikali
$O_2^{\bullet -}$: Süperoksit anyon radikali
$ONOO^{\bullet -}$: Peroksinitrit anyon radikali
OGTT : Oral glukoz tolerans testi
OST-48 : Oligosakkarit transferaz-48
PDGF : Trombosit türevli büyüme faktörü
PG : Prostaglandin
PAİ-1 : Plazminojen aktivatör inhibitörü-1
PDK1 : 3-Phosphoinositide-bağımlı kinaz 1
PLC : Fosfolipaz C
PI-3K : Fosfatidil inozitol - 3-kinaz
PİP2 : Fosfatidil inozitol - 4,5-bisfosfat
PİP3 : Fosfatidil inozitol - 3,4,5-trifosfat
PKB : Protein kinaz B
PKC : Protein kinaz C
PPAR-γ : Peroksizom proliferatör aktivatör reseptör gamma
Raf : Fibrosarkom protein kinaz

RAGE : AGE reseptörü
RAS : Renin-angiyotensin sistemi
Ras : Sıçan sarkoma protein subfamilya
Rap1 : Ras-proximate-1
RCO : Reaktif karbonil bileşikleri
RNS : Reaktif nitrojen türleri
ROS : Reaktif oksijen türleri
RXR : Retinoid X receptor
SDBY : Son dönem böbrek yetmezliği
SH2 : Src Homoloji-2
SGK1 : Serum ve glukokortikoid ile indüklenebilir kinaz1
Smad : Deka penta plejiğe karşı dirençli küçük proteinler
sRAGE : Çözünür RAGE
Ser : Serin
SGLT : Sodyum bağımlı glukoz transport protein
SREBP-1c : Sterol düzenleyici eleman bağlayıcı protein-1c
Sos : "Son of Sevenless" proteini
SRF : Serum yanıt faktörü
STZ : Streptozotosin
SYA : Serbest yağ asitleri
TF : Doku faktörü
TGF-β : Dönüştürücü büyüme faktörü-beta
TGIF : Dönüştürücü büyüme-etkileşim faktörü
TIMP-1 : Matriks metalloproteinaz doku inhibitörü-1
TMB : Tübüler bazal membran
TNF-α : Tümör nekroz faktörü-alfa
Thr : Treonin
Tyr : Tirozin
TMB : 3,3',5,5'-tetra metil benzidin
TX : Tromboksan
UCP-1 : Uncoupling protein 1
UDP : Üridin difosfat
UKPDS : Birleşik Krallık prospektif diyabet çalışması

VCAM-1 : Vasküler hücre yapışma molekülü 1
VEGF : Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VKİ : Vücut kütle indeksi
YA : Yağ asidi
ZnT : Çinko Taşıyıcı Protein
ZO-1 : Zona ocludens protein-1
α-SMA : α-Düz kas aktini

ÖZET

GARCİA MORENO İLTER, E. (2019) **Tip 2 Diyabet Hastalarında C-peptid'in Nefropati Kriterleri, AGE, TGF-ß1 ve HGF ile İlişkilerinin İncelenmesi.** İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyokimya ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Anahtar Kelimeler: Diyabetik Nefropati, C-peptid, AGE, TGF-Beta, HGF

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 30890

Diyabetes Mellitus (DM), kronik hiperglisemi, hipertansiyon, dislipidemi, mikroalbuminüri ve enflamasyon ile karakterize, metabolik bir hastalıktır. İnsülinin salgılanması ve/veya etkinliğinde bozukluk olan tip 2 diyabette vardır. Bu tez çalışmasında tip 2 diyabette C-peptidin, ileri glikasyon son ürünleri (AGE), dönüştürücü büyüme faktörü-beta 1 (TGF-β1) ve hepatosit büyüme faktörü (HGF) ile ilişkilerinin nefropati kriterleri eşliğinde incelenmesi amaçlanmıştır. 40-65 yaş aralığında yer alan 17 mikroalbüminürili, 20 makroalbüminürili ve 21 nefropatisiz tip 2 diyabet hastası ve 19 sağlıklı bireyden alınan açlık kan örneklerinde glukoz, HbA1c, insülin, C-peptid, kreatinin, AGE, TGF-β1 ve HGF ölçülmüş, kan örneklerine paralel olarak alınan idrar örneklerinde ilgili ölçümler yapılarak glomerüler filtrasyon hızı, AGE klirensi, mikroalbüminüri ve total protein konsantrasyonları saptandı. Hasta ve kontrol gruplarından elde edilen örneklerden AGE, TGF-β1 ve HGF ELISA metodu ile tayin edildi. Çalışmamızda nefropatisiz tip 2 diyabetli grupta (DM grubu) glisemik kontrol bozuldukça AGE oluşumunun ve idrar ile atılımının arttığı saptandı. Diyabetik nefropatili grupta (DN grubu), serumda ve idrarda ölçülen AGE değerleri arasında pozitif korelasyon saptandı. DM ve DN gruplarında serumda HGF konsantrasyonunun arttığı, serum HGF ve insülin konsantrasyonları arasında pozitif korelasyon bulunduğu, renoprotektif olduğu öne sürülen HGF'nin AGE klirensini arttırdığı gösterildi. DM grubunda C-peptid'in glomerüler hiperfiltrasyona karşı koruyucu olduğu, proteinüriyi azalttığı ve TGF-β1 artışının ürik asit klirensinde azalmaya yol açtığı öne sürüldü. DM grubunda ürik asidin insülin salgılatıcı etkisi insülinin ise antiürikozürik etkisi olduğu görüldü. Bulgularımız, literatür bilgileri ile birlikte değerlendirildiğinde C-peptid'in proksimal tübülüs hücrelerinde olasılıkla insülin ile birlikte, AGE klirensini arttırarak TGF-β1 ile uyarılan fibrozu (EMT) ortadan kaldırma olasılığı olduğu düşünülmektedir. Bulgularımızı destekleyecek daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

ABSTRACT

GARCİA MORENO İLTER E. (2019) **Investigation of the relationship between C-peptide and Criteria of Nephropathy, AGE, TGF-ß1, HGF in Type 2 Diabetic Patients.** İstanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Biochemistry Department, Post Graduate Thesis. Istanbul.

Key Words: Diabetic Nephropathy, C-peptide, AGE, TGF-Beta, HGF

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No.30890

Diabetes Mellitus (DM) is a metabolic disease characterized by chronic hyperglycemia, hypertension, dyslipidemia, microalbuminuria and inflammation. Type 2 diabetes is the most common form of diabetes characterized by mainly decreased of secretion and /or activity its action. The aim of this study was to investigate in type 2 diabetic patients the relationship between C-peptide and criteria of nephropathy, advanced glycation end products (AGE), transforming growth factor beta 1 (TGF-ß1), hepatocyte growth factor (HGF). Glucose, HbA1c, insulin, C-peptide, creatinine, AGE, TGF-β1 and HGF were measured in fasting blood samples taken from the 17 microalbuminuric, 20 macroalbuminuric and 21 type 2 diabetic patients without nephropaty and 19 healthy individuals the ages raniging in the range from 40 to 65 years. The urine samples glomerular filtration rate, AGE clearance, microalbuminuria and total protein concentrations were determined by making related measurements. AGE, TGF-β1 and HGF parameters were determined by ELISA method from the samples obtained from the patients and the control group. In our study, it is found that AGE formation and its excretion with urine increase in organisms in general when glycemic control deteriorates in type 2 diabetic (without nephropaty) patients (DM group). In diabetic nephropathy (DN) group, there is a positive correlation determined between the measured AGE values of serum and urine. In DM group and DN group it is showed that HGF concentration in the serum was increased, positive correlation between serum HGF and insulin concentrations is located, HGF increases the clearance of AGE which is known to be renoprotective. In the DM group it is suggested that C-peptide is protective against glomerular hyperfiltration, it reduce reduce proteinuria and increased TGF-β1 decreases clearance of uric acid. In the DM group, insulin releasing effect of uric acid and anti-uricosuric effect of insulin were observed. In our findings when considered with the literature; C-peptide possibly with insulin, is considered to be likely to eliminate the TGF-β1-induced fibrosis (EMT) in the proximal tubule cells by increasing the clearance of AGE. However, further studies are needed.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes mellitus, kronik hiperglisemi, hipertansiyon, dislipidemi, mikroalbuminüri ve enflamasyon ile karakterize, metabolik bir hastalıktır (Sourris ve ark 2010). Hiperglisemiye neden olan faktörler, insülin sekresyonunda azalma ve/veya insülin direncine bağlı olarak glukoz kullanımında azalma ve glukoz üretiminde artıştır. Tip 1 DM, insülin yetersizliğine yol açan otoimmün beta hücre yıkımı sonucu gelişir; hastalarda insülin eksikliği ve ketoza yatkınlık vardır. Tip 2 DM ise, değişik derecelerde insülin direnci yanında bozulmuş insülin sekresyonu ve glukoz üretiminde artış ile karakterize heterojen bir hastalıktır. Kronik hipergliseminin sonucu olarak her iki diyabet tipinde de makrovasküler komplikasyonlar (koroner arter hastalığı, periferik vasküler hastalık, serebrovasküler hastalık) ve mikrovasküler komplikasyonlar (retinopati, nöropati, nefropati) gelişir (Powers 2012 pp.2968-3003). Diyabetik nefropati, diyabetik hastaların %20-40'ını etkileyen ve diyabetle ilişkili morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenidir. Diyabetik nefropati, gelişmiş ülkelerde son dönem böbrek yetmezliğinin (SDBY) en sık nedenidir (Sourris ve ark. 2010) (Powers 2012 pp.2968-3003).

İnsülinin A ve B zincirlerinin doğru katlanma ile disülfid bağ oluşturmalarını sağlayan ve sentez sırasında molekülden ayrılan ve insülin ile ekimolar oranlarda kana salgılanan C-peptid beta hücre fonksiyonunun belirteci olarak kullanılmaktadır. Biyolojik olarak inert olduğu kabul edilen C-peptidin son yıllarda endokrin benzeri aktivite gösteren, sinyal özellikli bir peptid olduğu bildirilmiştir (Hills ve ark. 2010a) (Brunskill 2012 pp. 31-43). Çeşitli dokularda varlığı gösterilen C-peptid reseptörlerinin özellikle proksimal tübülus epitel hücrelerinde yoğun olduğu açıklanmıştır. C-peptid'in tirozin fosfataz inhibisyonu ve doğrudan insülin reseptör substrat-1 otofosforilasyonunu aktive ederek insülinomimetik etki gösterdiği açıklanmıştır. Sağlıklı bireylerde hiçbir belirgin etkisi olmayan C-peptidin tip 1 diyabette ve deneysel modellerde endotel fonksiyonu ve mikrovasküler kan akımı üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir. C-peptidin mikrovasküler komplikasyonları azaltabildiğini gösteren araştırma sayısı giderek artmaktadır (Hills ve ark. 2010a; 2010b; Wahren 2016; Marren 2019). Rezidüel C-peptid varlığının tip 1 diyabette mikrovasküler komplikasyon gelişme sürecini yavaşlattığı öne sürülmüştür. C-peptidin tip 1 diyabette glomerüler hiperfiltrasyon,

mikroalbuminüri, mezangial genişleme ve endotelyal NOS aktivitesini azalttığı, nefropati oluşumunu ve ilerlemesini engellediği saptanmıştır (Sourris ve ark. 2010).

Bu tez çalışmasında C-peptidin, tip 2 diyabet hastalarının önemli bir çoğunluğunda (%25-40) görülen nefropati ile (Sourris ve ark. 2010) ilişkisinin değerlendirilmesi düşünülmüştür. Bugüne dek yapılan araştırmalar diyabetik nefropatide ileri glikasyon son ürünlerinin (AGE) önemli rol oynadıklarını göstermektedir (Peng ve ark. 2011; Rhee 2018). AGE'ler heterojen yapılı makromoleküllerdir. Fizyolojik koşullarda proteinlerin, lipidlerin, nükleik asitlerin serbest amino grupları ile indirgeyici şekerlerin veya reaktif dikarbonil bileşiklerinin non-enzimatik etkileşimleri ile başlayan ve aralarında oksidasyon, dehidratasyon, yeniden düzenlenme ve polimerizasyonun da yer aldığı bir dizi tepkime sonucunda oluşurlar (Kanwar ve ark. 2008). Hiperglisemide, karbonil stres ve oksidatif stres koşullarında ileri glikasyon artar (Sourris ve Forbes 2012). Hücre içi ve hücre dışı proteinlerin yapılarını modifiye eden AGE'ler bu proteinlerin fonksiyonlarını da etkiler (Singh ve ark. 2001). Hiperglisemide, glukoz girişinin insüline bağımlı olmadığı, intrasellüler hiperglisemi görülen retina, böbrek ve sinir gibi dokularda hücre içi proteinleri bu modifikasyona uğramaktadır. Ekstrasellüler matrikste AGE'ler ile modifiye proteinlerin varlığı, matriks komponentleri arasındaki ilişkilerin ve matriks bütünlüğünün bozulmasına yol açar. AGE birikimi ile ECM anormal derecede genişler (Singh ve ark. 2001). Ekstraselüller ortamda oluşan AGE'ler reseptörleri olan RAGE'ler ve diğer bağlayıcı proteinler ile etkileşime girerek ve ROS oluşumunu arttırarak, enflamasyonun da dahil olduğu çeşitli hücre içi olayları (PKC, MAPK ve NF-κB aktivasyonları) başlatırlar. Bu yolla TGF-β1 gibi büyüme faktörlerinin ve ECM proteinlerinin sentezleri artar, proteoglikanların sentezi azalır. Bu değişiklikler damar hücrelerinde yapısal bozukluklara neden olur ve kapiller geçirgenlik artar. AGE-RAGE etkileşiminin önlenmesi ile ECM-vasküler anormallikler kısmen tersine çevrilebilir (Kanwar ve ark. 2008).

Fizyolojik koşullarda, AGE'ler ile modifiye plazma proteinleri ve diğer proteinlerin yıkımları sonucunda oluşan serbest AGE'ler ve AGE-peptidler sistemik dolaşımda bulunur (Kanková 2008). Bu bileşikler karaciğerin nonparenkimal endotel hücreleri ve Kupffer hücreleri tarafından makrofaj çöpçü reseptör (MSR) aracılığı ile endositoz yoluyla alınırlar (Peng ve ark. 2011). Otofajik-lizozomal yıkım sonucunda

salınan küçük, çözünür AGE-peptidler böbrekler tarafından vücuttan atılırlar (Singh ve ark. 2001; Peng ve ark. 2011). İnsulinin karaciğerde endotel hücreleri ve makrofaj çöpçü reseptör (MSR) ekspresyonunu arttırarak AGE alımını arttırdığı in vitro olarak gösterilmiştir. (Peng ve ark. 2011) İnsülinin bu etkisinin fosfatidil inozitol 3-kinaz (PI3-kinaz) inhibitörü olan wortmannin tarafından baskılandığı gösterilmiştir (Singh ve ark. 2001). AGE klirensinde insülinin etkisine aracılık eden PI3-kinaz enziminin C-peptid tarafından da kullanıldığı bilinmektedir (Hills ve ark. 2010a). Serbest AGE'ler ve AGE'ler ile modifiye peptid ve proteinler böbrek glomerüllerinde filtrasyona uğradıktan sonra proksimal tübülüs epitel hücreleri tarafından reabsorbe edilerek yıkılır ve idrarla atılırlar. Fizyolojik koşullarda AGE eliminasyonunun etkili olması, glomerüler filtrasyon hızının normal olmasına bağlıdır. Renal AGE klirensindeki bozukluk, vücutta AGE birikimine yol açmaktadır. Sistemik dolaşımdan uzaklaştırılamayan AGE'lerin böbrekteki birikimlerinin artması ile böbrek fonksiyonları daha da bozulmaktadır (Goh ve Cooper 2008). AGE'lerin özellikle endotel, tübüler epitel ve mezenkimal hücrelerde ve podositlerde özgün reseptörleri ile etkileşimleri, proenflamatuvar ve prosklerotik sitokinlerin aktifleşmesine neden olmaktadır (Daroux ve ark. 2010). AGE metabolizmasında önemli fonksiyonu olan proksimal tübülüs epitel hücrelerinin kaybı ve hücrelerarası alanda fibrotik doku oluşumunda (epitelyal – mezenkimal transformasyon, atrofi) anahtar rol oynayan TGF-β1'in sentezini intra-renal AGE birikiminin uyardığı gösterilmiştir (Burns ve ark. 2006; Kanwar ve ark. 2008). C-peptidin, TGF-β1'in profibrotik etkilerini antagonize etme eğiliminde olduğu bildirilmiştir. AGE klirensinde insülinin etkisine aracılık eden PI3-kinaz enziminin C-peptid tarafından da kullanıldığı bilinmektedir (Hills ve ark. 2010a). C-peptidin, AGE klirensini arttırmak yolu ile TGF-β1'in profibrotik etkilerini antagonize edebileceği ve diyabetik nefropati üzerine olumlu etkilerinin olabileceği düşünülebilir.

Son araştırmalarda; karaciğerin non-parenkimal hücrelerinde sentezlenen hepatosit büyüme faktörü (HGF), kronik hasar sonrası oluşan doku fibrozunu önleyici ve terapötik potansiyeli olan önemli bir antifibrotik sitokin olarak ortaya çıkmıştır (Yang ve ark. 2005). HGF'nin böbrek dahil birçok organda dokulardaki fibrotik lezyonları inhibe etme yeteneği kanıtlanmış , HGF proteini ya da HGF gen uygulamaları ile çeşitli nedenlerle ortaya çıkan kronik böbrek hastalıklarında ilerleyici fonksiyonel kayıpların önlenebildiği ortaya çıkmıştır (Hills ve Squires, 2011; Kim ve ark. 2018). Diğer taraftan,

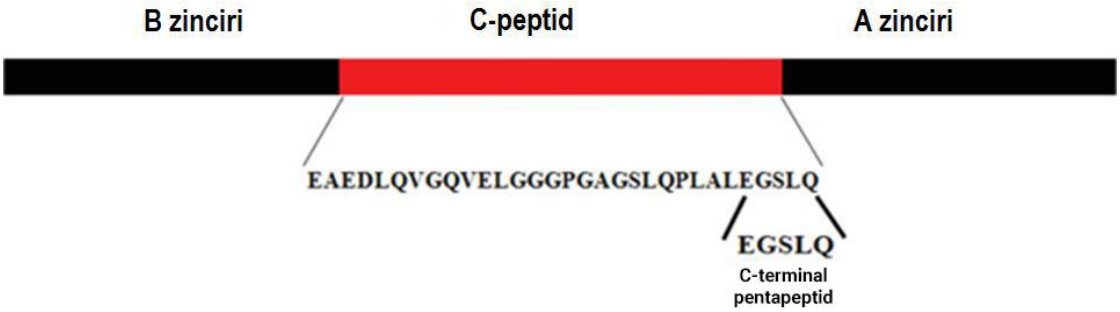
HGF sinyal yolunun antikorlar ile bloke edilmesi sonucunda renal fibroz ve renal disfonksiyonun ilerlemesinin hızlandığı saptanmıştır (Zhenga ve ark. 2018). HGF uygulaması ile TGF-β1 ekspresyonunda belirgin inhibisyon olduğu öne sürülmüştür. C-peptid'in retinoik asit ve HGF ile ilişkili sinyal yollarını aktive ederek TGF-β1'i antagonize ettiği ve proksimal tübülüs hücrelerinde TGF-β1 ile uyarılan fibrozu (EMT) ortadan kaldırdığı sürülmüştür (Hills ve Squires, 2011). Diğer taraftan, TGF-β1'in de renal mezenkim ve endotel hücreleri dahil olmak üzere birçok hücre tipinde HGF ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Yang ve ark. 2005). Ayrıca yine son çalışmalarda, HGF'nin AGE'lerin otofajik-lizozomal klirensini kolaylaştırdığı açıklanmıştır (Peng ve ark. 2011; Ding ve Choi 2015). HGF'nin serumdaki konsantrasyonu ile HbA1c arasında negatif korelasyon bulunduğu saptanmış ve diyabette lokal HGF konsantrasyonundaki azalmanın organ disfonksiyonunu başlattığı öne sürülmüştür (Peng ve ark. 2011).

Bu bilgiler doğrultusunda, bu tez çalışmasında C-peptidin, tip 2 diyabette AGE, TGF-β1 ve HGF ile ilişkilerinin nefropati kriterleri eşliğinde incelenmesi amaçlanmıştır. 40-65 yaş aralığında yer alan 20 mikroalbüminürili, 20 makroalbüminürili ve 25 nefropatisiz tip 2 diyabet hastası ve 25 sağlıklı bireyin açlık kan örneklerinde glukoz, HbA1c, insülin, C-peptid, kreatinin, AGE, TGF-β1 ve HGF ölçülecektir. Kan örneklerine paralel olarak alınacak idrar örneklerinde ilgili ölçümler yapılarak glomerüler filtrasyon hızı, AGE klirensi, mikroalbüminüri ve total protein konsantrasyonları saptanacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. C-Peptid

İnsülin, iki disülfid bağı ile bağlanmış A ve B polipeptid zincirlerinden oluşan 51 amino asitli, küçük (5.800 Da) bir proteindir. Pankreasın β hücrelerinde, preproinsülin adı verilen ve amino ucunda endoplazmik retikuluma geçişi yönlendiren bir sinyal dizisine sahip, tek zincirli, inaktif bir öncül olarak sentezlenir (9.000 Da). 23 amino asitlik sinyal dizisinin proteolitik olarak ayrılması ve üç adet disülfid bağının oluşumu ve molekülün katlanması ile proinsülin meydana gelir. Golgi aygıtına taşınan proinsülin molekülü burada proteolize uğrar ve salgı granülleri içine paketlenir; paketlenme 30-40 dakika içinde olur. Granüller, sitoplazma içinde plazma membranına doğru taşınırken olgunlaşır (Kunt ve ark. 1999a; Granner 2003 pp.434-456) ile proinsülin salgı granüllerinde depolanır. Salgılanma uyarıldığında, proinsülin yapısındaki A ve B polipeptid zincirlerini bağlayan C-peptid (connecting peptide) bağlanma bölgelerinde yer alan Arg31-Arg32 ve Lys64-Arg65 peptid bağlarının özgün endopeptidazlar tarafından koparılmasıyla uzaklaştırılır ve aktif insülin oluşur (Medawala ve ark. 2009). C-peptid proinsülinden ayrıldığında, B-zincirinin açıkta kalan karboksi-terminali insülin reseptörü ile etkileşim için uygun konformasyonu kazanır. Proinsülin molekülü ve bileşenlerinin doğrusal yapısı şekilde görülmektedir ((Granner 2003 pp.434-456; Henle 2007; Hills ve Brunskill 2009b), (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. İnsan proinsülinin doğrusal yapısı (Hills ve Brunskill 2009b)

Proinsulin ve insülin granüllerde çinko iyonlarını bağlayarak hekzamerik yapı kazanır. Monomerik insülin molekülleri, B zincirlerinin C-terminal uç bölgeleri arasındaki ilişkiler ile nonkovalent dimerizasyona uğrarlar. Daha sonra üç insülin dimeri Zn^{2+} varlığında birleşerek hekzamerleri oluşturur. Bu olayın gerçekleşmesi için granül

içi pH'ın yaklaşık olarak 5 olması gerekmektedir (Medawala ve ark. 2009). Beta hücre granüllerinde mevcut ZnT-8 taşıyıcı proteinleri granüldeki Zn^{2+} iyon konsantrasyonunun milimolar düzeylere erişmesini sağlamaktadır. Proteoliz ile proinsülinin %95 kadarı insüline çevrildiğinden granüllere karakteristik morfolojik nitelik kazandıran insüline ait hekzamerik kristallerdir. C-peptid kristal yapı oluşturmaz; NMR ve X ışınları kristalografisi ile yapılan çalışmalar, C-peptidde ikincil yapının minimal düzeyde olduğu ve üçüncül yapının olmadığını ortaya koymuştur. C-peptid yapısında lizin, histidin, arginin gibi bazik amino asitler yoktur, dört glutamik asit ve bir adet aspartik asit bulunmaktadır. Bu amino asitler C-peptidin etkinliğinde anahtar rol oynamaktadır (Medawala ve ark 2009), (Granner 2003).

İnsülin salgılanması uyarıldığında, olgun granüller plazma membranı ile kaynaşır ve içeriklerini hucre dışı sıvıya ekzositoz ile boşaltırlar. Kan dolaşımına insülin ile birlikte ekimolar oranda C-peptid salgılanır (Hills, ve ark. 2010a). Az miktarda da proinsülin salgılanır. Salgılanma sırasında Zn^{2+} iyonları da serbestleşir. Proinsülin ile insülin moleküllerinin çözünürlük özellikleri ve izoelektrik noktaları aynıdır. Proinsülinin insülin reseptörleriyle ilişkiye girmesini yapıdaki C-peptid büyük ölçüde kısıtlar; proinsülinin insülin reseptörüne bağlanma affinitesi, insülin affinitesinin ancak %3'ü kadardır. İnsülin biyoetkinliğinin %5'inden azını gösterebilen proinsülin insulin antiserumu ile kuvvetli çapraz tepkime verdiğinden radioimmunoassay ile ölçülen insülin biyoetkinliği hatalı yüksek saptanmış olabilmektedir. Kan dolaşımına insülinle ekimolar oranda salgılanan ve karaciğerden ilk geçişinde kandan uzaklaştırılmayan C-peptid, salgılanan insülin miktarının en çok kabul gören ölçütüdür. C-peptid ölçümü, rezidüel insülin salgısının ölçümüne olanak sağlar. C-peptid'in dolaşımdaki yarı ömrü reseptör aracılı endositoz ile alınıp metabolize edilen insülinden 1/10 oranında daha uzundur (yaklaşık 30 dakika). C-peptidin degradasyonu ve/veya atılımında rol oynayan mekanizmalar hakkında pek fazla bilgi mevcut değildir. Dokular pinositoz ile C-peptidi alıp besin maddesi olarak kullanabilmektedir. İzole doku çalışmalarında C-peptidin çoğunlukla dokuya insülinden daha hızlı bağlandığı gözlemlenmiştir (Granner 2003).

Yapılan çalışmalar, pH 5'te oluşan hekzamerik insülin yapısının ayrışması için pH'ın fizyolojik pH'a doğru kaymasının gerekli olduğunu göstermektedir. pH'ın yükselmesine bağlı olarak C-peptid yapısındaki glutamik asit ve aspartik asit kalıntıları deprotonize olarak iyonize duruma geçmekte ve C-peptid'in Zn^{2+} bağlama yeteneği

artmaktadır; bunun sonucunda insülin heksamerlerinin ayrışması kolaylaşmaktadır. C-peptidin insülin hekzamerlerini monomerlere ayrıştırma yeteneğine sahip olduğunu gösteren çalışmalar vardır. In vitro çalışmalarda, pH 5'te C-peptid varlığında monomerik insülin oranının yaklaşık %10-20 artış gösterdiği saptanmıştır. Tip 1 diyabetli hastalara deri altına insülin ve C-peptidin birlikte verilmesinin 10 ila 60 dakika içinde plazmadaki insülin konsantrasyonunu yaklaşık iki katına ulaştırdığı saptanmıştır. (Hills ve Brunskill 2009b).

C-peptid yapısının türler arasında farklılık göstermesi ve konsensus dizilimin olmaması nedeni ile uzun yıllar boyunca fizyolojik etkisinin olmadığına ve fonksiyonunu insülin biyosentezi sırasında yaptığına inanıldı (Hills ve Brunskill 2009a). Klinik önemi residüel insülin salgısının ölçütü olmakla sınırlı kaldı. Yapılan araştırmalar insülin biyosentezinin inaktif bir yan ürünü olarak bilinen C-peptidin biyolojik aktivite gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Son on beş yılda C-peptidin hücre membranlarına spesifik olarak bağlandığı, çeşitli sinyal mekanizmalarını uyardığı, çeşitli fizyolojik etkileri olduğu ve diyabetik komplikasyonlarda koruyucu role sahip olduğu gösterilmiştir (Hills ve ark. 2009). Bu bulgular, C-peptidin hormon benzeri bir madde olduğunu ve diyabette tedavi edici ajan olarak kullanılabileceğini düşündürmüştür (Haidet ve ark. 2011 pp 111-127).

2.1.1. C-peptidin hücre membranları ile etkileşimi ve etki mekanizması

İlk olarak Flatt ve ark. pankreas adacık β-hücrelerine C-peptid'in bağlandığını ve bağlı C-peptid'in özgün biçimde uzaklaştırılabildiğini göstermişlerdir. Daha sonra Ido ve ark. çeşitli C-peptid türevleri uyguladıkları diyabetik sıçanlarda sinirsel ve vasküler fonksiyonlarda iyileşme saptamışlar fakat C-peptid'in reseptöre stereospesifik bağlanmadığını öne sürmüşlerdir. Sıçan böbrek tübulus segmentlerinde sıçan C-peptidi EVARQ C-terminal pentapeptidinin (27-31) intakt C-peptid etkisini göstererek Na^+K^+-ATPaz aktivitesini uyardığı ve molekülün geri kalanının tamamen inaktif olduğu saptanmıştır. İnsan C-peptid'indeki ekivalan EGSLQ pentapeptidin bu aktivitenin %75'ini gösterdiği saptanmıştır. Bu pentapeptidin 1. ve 5. pozisyonlarındaki glutamat ve glutamin kalıntıları memeli organizmalarda genellikle korunduğu, iyi tanımlanmış benzer C-terminal dizinlerin gastrin ve kolesistokinin gibi hormonlarda da mevcut olduğu bildirilmiştir. C-peptidin etkinliği için 3,11 ve 27. pozisyonlardaki glutamik asit

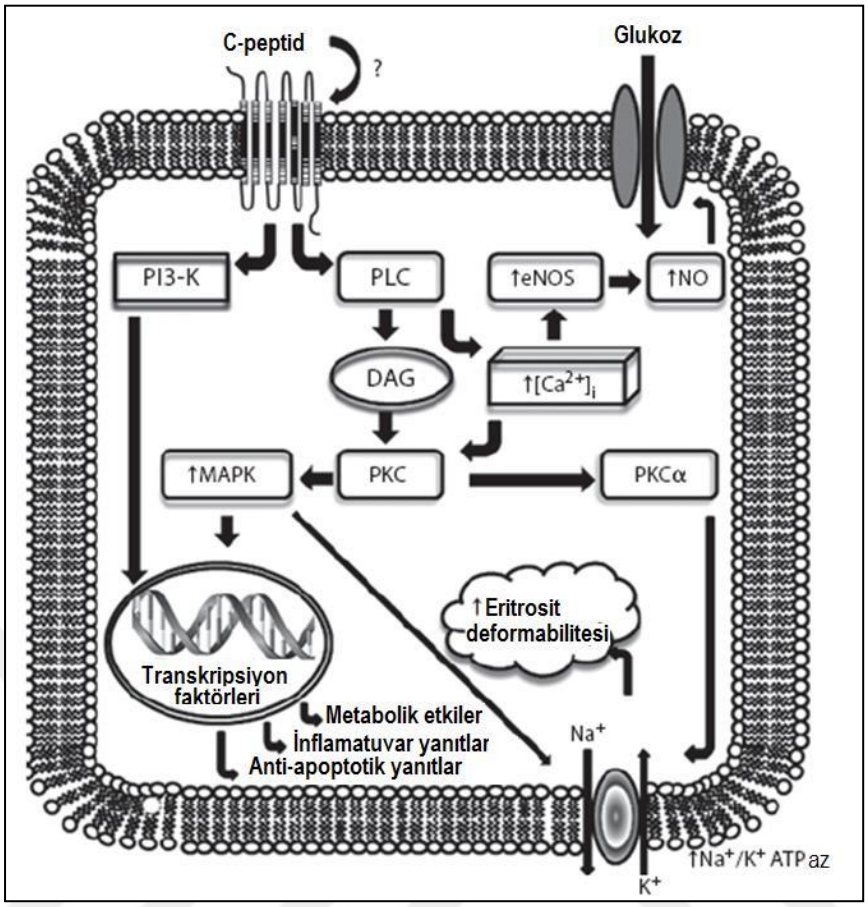
kalıntılarının ve N-terminal segmentteki heliks yapıyı olanaklı kılan amino asitlerin önemli olduğu açıklanmıştır (Hills ve Brunskill 2009b).

Fluoresans korelasyon mikroskopi yöntemi kullanılarak femto litreden daha küçük hacımlarda fluorofor işaretli tek bir C-peptid molekülünün insan hücre membranlarına yüksek affinite ile ve spesifik olarak bağlandığı ve etkileşime girdiği gösterilmiştir. Maksimum düzeyde bağlanmanın (1000-1500 / hücre) böbrek tübulus hücrelerinde olduğu gösterilmiştir. Bağlama bölgelerinin 0,3 nmol/L C-peptid varlığında yarı doygun, 0,9 nmol/L konsantrasyonda ise tam doygun olduğu belirlenmiştir. İntakt C-peptid veya C-terminal peptid'in aşırı miktarlarda eklenmesi ile bağlı C-peptidin uzaklaştırılabildiği fakat, ikinci yapısı bozulmuş C-peptid, ve insülin, IGF-I, IGF-II gibi peptidleri ile uzaklaştırılamadığı saptanmıştır. Önceden boğmaca toksini ile muamelenin C-peptid'in bağlanmasını inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu bulgular G-protein-kenetli reseptörlerin varlığını, C-peptid'in C-terminal pentapeptid aracılığı ile reseptörlerine bağlandığını ve klasik ligand-reseptör etkileşiminde olduğu gibi fizyolojik konsantrasyonlarda (0,9 nmol/L) reseptörlerin doygun durumda olduğunu göstermektedir. Bu durumda normal pankreatik β-hücre fonksiyonları varlığında reseptörler C-peptid ile tam doygun olduğundan eksojen C-peptid'e yanıt alınamayacaktır. Sağlıklı bireylere C-peptid verildiğinde bu nedenle yanıt alınamamaktadır (Hills ve Brunskill 2009b).

Eritrosit, endotel, fibroblast, kas, böbrek tübulus, sinir ve CD4+T hücrelerinde C-peptidin hangi sinyal mekanizmalarını kullandığı gösterilmiştir (Tablo2.1).

Tablo 2.1. Çeşitli hücrelerde C-peptid ile uyarılan sinyal molekülleri (Hills ve Brunskill 2009a)

	Böbrek Tübülüs Hücresi	**Kas Hücresi**	**Fibroblast**	**Endotel**	**Eritrosit**	**Nöroblastoma**	**CD4 T hücresi**	**Sinir Hücresi**
Na^+K^+-ATPaz	+				+			+
Glukoz Transportu					+			
↑$[Ca^{2+}]$	+			+				
PKC	+		+					
NO salınımı		+		+				
ERK	+	+	+	+				
p38MAPK				+				
JNK	+							
PLC	+							
p90RSK		+						
GSK		+						
PI3K	+	+		+		+	+	
RhoGTPaz	+						+	
LIM kinaz							+	
Smadlar	+							
CREB				+				
$NF_\kappa B$	+		+			+		
$PRAR_\gamma$	+							



Şekil 2.2: C-peptidin, boğmaca toksinine hassas G-protein-bağlı reseptör aktivasyonu ve PLC ve PI 3-K enzim aktivitelerini uyarması ile ilişkili olduğu düşünülen hücresel etkileri (Hills, ve ark. 2010a)

C-peptid ile aktivasyona bağlı olarak fosfolipaz C (PLC) ve fosfatidilinozitol 3-kinaz (PI3K) uyarılmaktadır. PLC, Ca^{2+} i ve DAG artışına neden olmaktadır. Ca^{2+} i artışı eNOS aktivasyonuna; Ca^{2+} i ve DAG artışı çeşitli PKC izoformlarının aktivasyonuna yol açmaktadır. Hücre membranına translokasyonu uyarılan PKCα Na^+K^+-ATPaz aktivitesini arttırmaktadır. PKC aktivasyonu ve Rho proteininin membrana translokasyonu mitoz, metabolizma, hücre canlılığı, gen ekspresyonu ve apoptoz da dahil olmak üzere birçok hücresel olayı düzenleyen MAPK enziminin aktivasyonuna neden olmaktadır. MAPK Na^+K^+-ATPaz ve çeşitli transkripsiyon faktörlerinin (PPARγ, NF-κB, CREB/ATF1/2) aktivitelerini arttırmaktadır. MAPK ile birlikte PI3K enziminin de etkisi ile ekspresyonları artan transkripsiyon faktörleri aracılığı ile apoptoz azalmakta, eNOS ve CD36 düzeyleri artmaktadır. C-peptidin nükleolusa çok süratle alındığı ve histonlara bağlanarak histon asetilasyonunu

hızlandırdığı, ribozomal RNA transkripsiyonunu arttırdığı saptanmıştır (Hills, ve ark. 2010a), (Şekil 2.2).

C-peptid hücreleri G-proteinine bağlanma sonucunda uyarılmaktadır. C-peptid'in hücreye internalizasyon ile alınarak da etkilerini gösterdiği öne sürülmüştür. C-peptid'in ayrıca, protein tirozin fosfataz inhibisyonu yolu ile ve insülin reseptörlerine bağlanmadan insülin reseptör substrat-1 (IRS-1) molekülünün otofosforilasyon ile aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Bhatt ve ark. 2013). Spesfik etki mekanizmalarının tanımlanması ve diyabetik komplikasyonlarda C-peptid'in rolünün ve etki mekanizmasının tanımlanabilmesi C-peptid reseptörlerinin idantifikasyonunu gerektirmektedir. Henüz C-peptid reseptörlerinin gen klonlama ve proteomik çalışmalarla idantifikasyonu başarılamamıştır (Hills ve Brunskill 2009b).

C-peptid'in biyolojik rolünün araştırıldığı birçok çalışma yapılmıştır. Daha çok insülin ile birlikte C-peptid eksikliğinin olduğu tip 1 diyabette yapılmış olan bu çalışmalar, nöropati, nefropati, vasküler disfonksiyonlar ve enflamasyon varlığında C-peptid'in çeşitli doku ve hücrelerde koruyucu rol oynadığını göstermiştir. Gelecekteki araştırmalar, diyabetin sadece bir insülin eksikliği hastalığı mı, yoksa insülin ve C-peptid'in her ikisinin de yoksunluğundan kaynaklanan bir hastalık mı olduğunu ortaya koyacaktır .

2.1.2. C-peptid'in damar koruyucu etkileri

Diyabette yapılan in vivo çalışmalar C-peptid'in kas dokusunda hem kan akımını ve hem de oksijen alımını arttırdığını göstermiştir. Bu etkilere aracılık eden olay NO sentezinde anahtar rol oynayan eNOS enziminin transkripsiyonundaki artıştır. C-peptid'in sıçan aorta endotel hücrelerinde MAPK aktivasyonu ile, sığır aorta endotel hücrelerinde ise $[Ca^{2+}]i$ artışı ve ERK-1/2 aktivasyonu ile eNOS transkripsiyonunu ve PLC ve PI3K aktivitelerini uyarması ile ilişkili olduğu düşünülen hücresel etkileri uyararak NO oluşumunu arttırdığı saptanmıştır. Tip 1 diyabet hastalarının C-peptid'e verdikleri vazodilatasyon yanıtı ile bu mekanizmalar ilişkilendirilmiştir. Endotel ile ilgili mikrovasküler komplikasyonlarda yararlı rol oynayan NO'in yukarıda da açıklanmış olduğu gibi DN'deki rolü farklıdır, diyabetik böbrekte indüklenmiş olan eNOS aktivitesini C-peptid azaltmaktadır (Hills, ve ark. 2010a).

DCCT kapsamında yapılan retrospektif analiz sonucunda tip 1 diyabet hastalarında rezidüel C-peptid salgılanmasının diyabetik nefropati ve retinopati

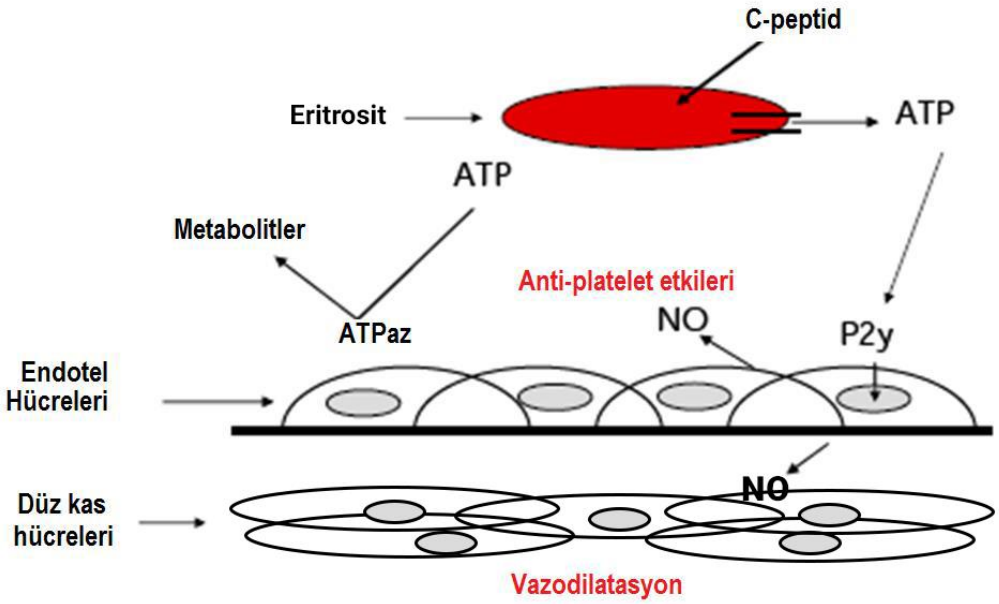
görülme sıklığını azalttığı gösterilmiştir. İtalyada yapılan kohort çalışmada tip 1 diyabetli hastalarda β-hücre fonksiyonu ile mikrovasküler komplikasyonlar arasında anlamlı bir ilişki bulunurken, makrovasküler komplikasyonlar ile hiçbir ilişki bulunmadığı ortaya çıkmıştır (Kim ve ark 2012).

Damar hücrelerinde apoptoz, dünya çapında en sık ölüm nedeni olarak bilinen kardiyovasküler hastalıklara yol açan aterosklerozun patogenez ve progresyonu ile yakından ilişkilidir. Diyabette, endotel hücrelerinin hiperglisemiye maruz kalmaları, apoptozu tetikleyerek vasküler disfonksiyona yol açmaktadır. Diyabette damar endotel hücreleri ile birlikte retinal perisit ve renal podositlerde de apoptoz artmaktadır. Hiperglisemide, endotel hücre apoptozunda ROS kritik rol oynar. Diyabette damar ve böbrekte sitozolik ROS üretiminin ana kaynağı PKC aktivasyonu sonucunda artan NADPH oksidaz aktivitesidir. C-peptid'in, insan aorta endotel hücrelerinde NADPH oksidaz ile indüklenen ROS artışını azalttığı bildirilmiştir. Hiperglisemik koşullarda ROS mitokondride de üretilmektedir. İntrasellüler Ca^{2+} artışı, hiperglisemik maruziyete bağlı apoptotik hücre ölümünün bir diğer nedenidir. İntrasellüler Ca^{2+} ve/veya ROS ile uyarılan transglutaminaz-2 hücre ölümü, proliferasyon, diferansiasyon ve migrasyon gibi çeşitli hücresel süreçlerde rol oynar. C-peptid'in, ROS ile indüklenen transglutaminaz 2 aktivasyonunu inhibe ederek hiperglisemi ile indüklenen endotel apoptozunu engellediği öne sürülmüştür. Bununla birlikte, hiperglisemi ile uyarılan endotel hücre apoptozunda intrasellüler transglutaminaz enziminin rolü net değildir. C-peptid'in, tip 1 ve tip 2 diyabetli hastalarda düz kas hücre proliferasyonu, makroanjiyopati ve neointima oluşumunu engelleyerek yararlı etkiler gösterdiği saptanmıştır. Buna ek olarak C-peptid'in, diyabetik sıçan hipokampüsü ve SH-SY5Y hücrelerinde antiapoptotik etki gösterdiği düşünülmektedir (Bhatt ve ark. 2013).

2.1.3. C-peptid'in kan hücreleri ve mikrovasküler kan akımı üzerine etkileri

Yapılan araştırmalar tip 1 diyabetli hastalarda ön kolda, deride ve miyokardda mikrovasküler kan akışına C-peptid'in iyileştirdiğini göstermiştir. (Medawala ve ark 2009)C-peptid'in kan dolaşımında eritrosit, trombosit ve lökositlerle etkileşime girdiği saptanmıştır. Tip1 diyabette Na^+K^+-ATPaz aktivitesinin azalmasına bağlı olarak eritrosit deformabilitesinde bozulma olmaktadır. (Kunt ve ark 1999) C-peptid'in C-terminal fragmenti Na^+K^+-ATPaz aktivitesini arttırmaktadır. (Rebsomen ve ark 2008) Aktivite artışını boğmaca toksini, EDTA veya ouabain durdurmaktadır. Bu yolla C-

peptid, eritrosit deformabilitesini ve kan akışını iyileştirmektedir (Forst ve ark 2008). Ayrıca C-peptid, eritrositlere insülinden bağımsız glukoz girişini sağlayan GLUT-1'i uyararak, ATP üretimini ve buna bağlı olarak $Na^{+}K^{+}$-ATPaz aktivitesini arttırmaktadır (Medawala ve ark 2009). C-peptid ile inkübe edilen diyabetik hasta eritrositlerinde deformabilite özelliğinin olumlu etkilendiği saptanmıştır. C-peptid etkisi ile üretimi artan ve eritrositlerden daha fazla salınan ATP'nin endotel hücre ve trombositlerde P2Y purinerjik reseptörlere bağlanarak eNOS uyarısı ile NO sentezini arttırdığı saptanmıştır. Vazodilatasyon yapan NO da eritrosit membranını doğrudan etkileyerek deformabiliteyi iyileştirmektedir. Eritrositlerden ATP salınımı, hipoksi, farmasötik ajanlar, asidoz ve deformasyon gibi çeşitli etkenler tarafından indüklenebilmektedir (Şekil 2.3) (Medawala ve ark. 2009).



Şekil 2.3: C-Peptid'in kan akımı üzerindeki etkileri (Medawala ve ark 2009)

Metal ile aktive edilmiş C-peptid'in, eritrositlerde deformasyonun olmadığı koşullarda ATP salınımını uyardığı saptanmıştır. Medawala ve ark. Zn^{2+} iyonları ile aktivasyonun C-peptid etkinliği için gerekli olduğunu öne sürmüşlerdir. C-peptid beta hücrelerinden salgılandıktan sonra Zn^{2+} ile bağlanmaktadır. C-peptid'in ATP aracılığı ile indüklediği NO salınımının kan akımını iyileştirerek lokal vasküler komplikasyonları hafifletebileceği öne sürülmüştür. C-peptid etkisi ile artan ve

trombosit aktivasyonunun kuvvetli bir inhibitörü olan NO, trombositler gibi ve lökositlerin de endotelyuma adhezyonunu azaltmaktadır (Medawala ve ark 2009).

2.1.4. Diyabette C-peptid ve böbrek fonksiyonları

"Diyabet Kontrol ve Komplikasyonları Çalışması'nda (DCCT)" etkin glisemik kontrol ile diyabet ile ilişkili morbiditenin azaltılabildiği fakat çok yüksek insülin dozları ile normale yakın düzeylerde kan glukoz konsantrasyonları sağlanabilse bile hastaların önemli bir kısmında komplikasyonların geliştiği saptanmıştır. Bu klinik gözlemler diyabet komplikasyonlarının ortaya çıkmasında hiperglisemi dışı faktörlerin de etkili olabileceğini düşündürmüştür (Hills ve Brunskill 2009b). Tip 1 diyabetli hastalarda, nefropatinin erken evresinde gelişen glomerüler hiperfiltrasyonu yeterli insülin tedavisi düzeltememektedir. Buna karşın, insülin ve C-peptid düzeyleri normal sınırlarda veya normalin üzerinde olan tip 2 diyabetli hastalarda, glomerüler hiperfiltrasyon veya hipertrofi görülmemektedir. Bu gözlemler araştırmacıları tip 1 diyabette C-peptid'in renal fonksiyon üzerine etkilerinin incelenmesine yönlendirmiştir (Hills ve Brunskill 2009a). Johansson ve ark. diyabette renal fonksiyonlardaki örneğin GFR'deki değişimin C-peptid tarafından düzeltilebilme olasılığını incelemişlerdir (Rebsomen ve ark. 2008). Araştırıcılar, tip 1 diyabet hastalarına kısa süreli (60 dak) C-peptid, kontrollere %0,9 NaCl infüzyonu yapmışlardır. Diyabet hastalarında GFR'de %7'lik azalma gözlemlenmiş, kontrollerde ise değişim gözlenmemiştir. Araştırıcılar, çift kör randomize bir çalışmada, gizli nefropatisi olan tip 1 diyabet hastalarına bir ay süre ile deri altı pompa ile insülin ile birlikte ekimolar oranda C-peptid infüzyonu yapmışlar ve C-peptid verilen grupta, GFR'de ~ %6, mikroalbüminüride %50 oranında azalma saptamışlardır. Sadece insülin verilen grupta hiçbir değişiklik gözlemlenmemiştir (Hills ve ark. 2010a). Mikroalbüminürik DN'i olan tip 1 diyabetli hastalara, çift kör, randomize çapraz bir çalışma kapsamında, 3 ay süresince insülin + C-peptid veya sadece insülin verilmiştir. Çalışma öncesinde normotensif olan tüm hastalarda 25 ve 220 μg/dk arasında olan mikroalbüminüri sürekli azalarak 3 aylık süre sonunda kontrollere göre %40 oranında azalmış olarak saptanmıştır. Benzer sonuç üriner albümin/kreatinin oranında da alınmıştır. Hastalar çalışma boyunca normotansif kalmış ve glisemik kontrolleri de aynı ölçüde, kısmen düzelme göstermiştir. Bu nedenle, C-peptid ile mikroalbüminüride sağlanan azalmanın, arteriyel kan basıncı veya glisemik

kontroldeki düzelme ile ilişkili olmadığı sonucuna varılmıştır (Nordquist ve Wahren 2009).

C-peptid'in böbrek koruyucu etkilerinin olduğu STZ diyabetik sıçanlarda da gösterilmiştir. Glomerüler hiperfiltrasyon ve nefropatinin klasik bulgularının görüldüğü STZ diyabetik sıçanlara 90 dakika süre ile verilen insan C-peptid'ininin diyabetik kontroller ile karşılaştırıldığında, glomerüler hiperfiltrasyonu %20, proteinüriyi %70 oranında azalttığı saptanmıştır. Diğer araştırıcı grupları C-peptid'in GFR, mesangial genişleme ve proteinüride azalmaya neden olarak renal fonksiyonlarda iyileşme sağladığını göstermişlerdir (Nordquist ve Wahren 2009) (Hills, ve ark. 2010a). Denatüre edilmiş C-peptid infüzyonunun hiçbir etkisinin olmadığı saptanmış ve belirtilen etkilerin C-peptid'in spesifik etkileri olduğu sonucuna varılmıştır. STZ diyabetik sıçanlarda C-peptid'in glomerüler hiperfiltrasyonu azaltıcı etkisinin bir ACE inhibitörü olan captopril'in etkisine eşdeğer olduğu saptanmıştır (Hills ve Brunskill 2009a).

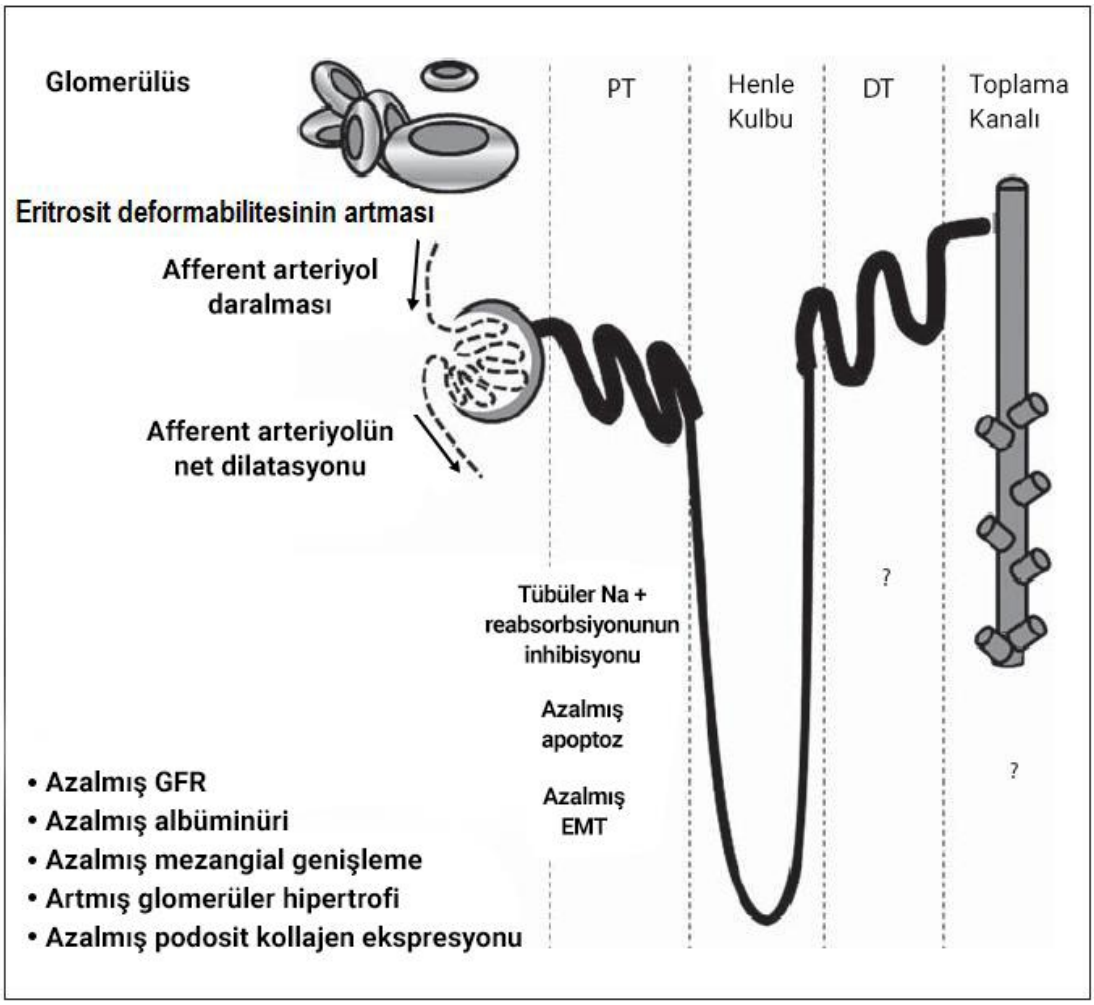
STZ diyabetik farelerde C-peptid'in idrar ile albümin atılımını ve bir profibrotik sitokin olan TGF-β ve tip IV kollajen proteinlerinin glomerüllerdeki ekspresyonunu azalttığı saptanmıştır. Fare glomerül podositleri C-peptid'e maruz bırakıldığında TGF-β ile indüklenen TipIV kollajen ve PAI1 mRNA ekspresyonlarının durduğunu saptamışlardır. Alloksan diyabetik fare glomerüllerinde yapılan mikroperfüzyon çalışmalarında afferent glomerül arteriol lumenine uygulanan C-peptid'in daraltıcı etki yaptığı gösterilmiştir. Normoglisemik farelerden alınan glomerüllerde bu etkinin minimal düzeyde kaldığı görülmüştür (Hills ve Brunskill 2009b).

Fiorina ve ark. adacık ve böbrek transplantasyonunu birlikte yaptıkları çalışmada C-peptid'in böbreği DN'ye karşı koruduğunu gösteren bulgular elde etmişlerdir. Transplantasyon sonrasında hastalardaki adacık fonksiyonlarının kalıcı olması durumunda sürvinin daha iyi olduğu ve glisemik kontrolden bağımsız olarak C-peptid salgısı ile transplante böbrek fonksiyonları arasında çok net bir pozitif korelasyon olduğu açıklanmıştır. Bu bulgular da C-peptid'in böbreği DN'e karşı koruduğunu göstermektedir (Rebsomen ve ark. 2008).

C-peptid'in non-diyabetik sağlıklı bireylerde yararlı etkileri görülmediği halde tip 1 diyabet hastalarında ve deneysel hayvan modellerinde endokrin-benzeri aktivite göstererek kontrolsüz hiperglisemi ile ilişkili olarak böbreklerde ortaya çıkan yapısal ve fonksiyonel bozuklukları hafiflettiği saptanmıştır. C-peptid'in glomerüler

hiperfiltrasyon, mikroalbüminüri ve mezangial genişlemeyi azalttığı, eNOS aktivitesini arttırdığı, proksimal tübülüslerde TNF-α ile indüklenen apoptoza ve TGF-β ile indüklenen epitelyal-mezenkimal tranzisyona karşı koruyucu olduğu bilinmektedir. Bu bilgiler, tip 1 diyabet hastalarında, insülin ile birlikte C-peptid replasmanının yararlı olacağını göstermektedir (Hills ve ark 2010a) (Şekil 2).

Nordquist ve ark. C-peptid'in GFR üzerine nasıl etkili olduğunu açıklamışlardır (Hills, ve ark. 2010a). STZ diyabetik sıçanlarda nefropati gelişiminin erken döneminde glomerüler afferent arteriolde dilatasyon ve efferent arteriolde konstriksiyon olmakta ve glomerüler kapiller basınç artışı hiperperfüzyona, hiperfiltrasyona ve albümin kaçışına neden olmaktadır (Nordquist ve Wahren 2009). Bu dönemde proksimal tübülüs hücrelerinde de Na^+K^+-ATPaz aktivitesinde artış olmaktadır. Diğer dokularda NO üretimini arttırdığı bilinen C-peptid böbrekte diyabet ile indüklenen eNOS aktivitesini azaltarak afferent arteriolde uygunsuz dilatasyonu engellemekte, GFR'yi ve albümin kaçışını azaltmaktadır. C-peptid, C-terminal EVARQ fragmenti aracılığı ile glomerüler afferent arteriolde konstriksiyon, efferent arteriolde dilatasyon yaparken proksimal tübülüslerde de Na^+K^+-ATPaz aktivitesini inhibe ederek Na^+ reabsorpsiyonunu inhibe etmektedir. Böbrek, oksijen tüketiminin %80'ini elektrolit transportunun gerektirdiği ATP'yi sentezlemek için harcadığından elektrolit transportundaki inhibisyonun böbrek dokusunun oksijenlenmesinde ve fonksiyonlarında iyileşme sağladığı öne sürülmüştür (Nordquist ve Wahren 2009) (Hills, ve ark. 2010).



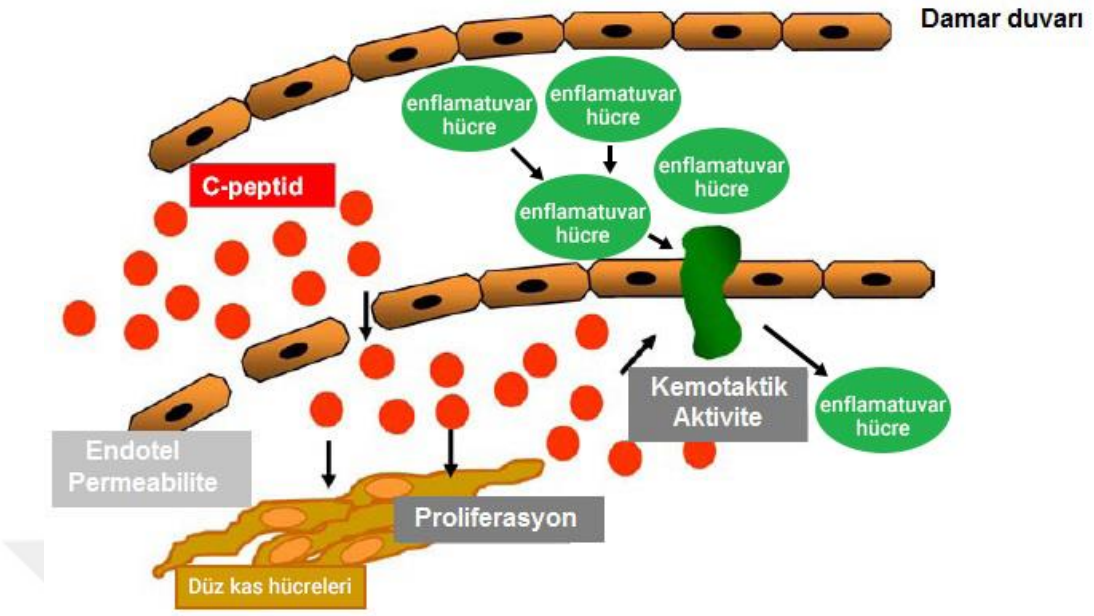
Şekil 2.4: C-peptid'in glomerülüsta, proksimal tübülüs, Henle kulbu, distal tübülüs ve toplayıcı kanallardaki koruyucu etkileri (Hills ve ark 2010a)

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada proksimal tübülüs hücrelerinde TGF-β ile indüklenen EMT'yi, C-peptid'in ortadan kaldırdığı ve insülin tedavisine yardımcı olmak üzere C-peptid'in diyabetin bazı böbrek komplikasyonlarının hafifletilmesinde kullanılabileceği bildirilmiştir (Hills ve Squires 2011). Kronik böbrek hastalığının altında yatan patoloji hem glomerüllerde ve hem de tübülüslerdeki renal fibrozdur. Glomerüllerdeki fibroz nefropatinin gizli kaldığı erken dönemde, tübülüsler arası dokudaki nekroz ise hastalığın ilerlemesi sırasında sürekli artar. İlerleyici renal fibroz kısmen tübüler epitel hücrelerinin miyofibroblastlara transdediferansiyasyonu (EMT) ile olmaktadır. Çeşitli sinyal yolları EMT ile ilişkilendirilmişse de, fibronektin, laminin, kollajen gibi ekstrasellüler matriks proteinlerinin glomerüler, mezangial ve tübüler hücrelerde sentezlerinin artışına bağlı renal hipertrofide anahtar rolü TGF-β1'in oynadığı saptanmıştır (Hills ve ark 2010a). (Şekil 2.4) Yakın zamanda yapılan bir

araştırmada, TGF-β1 ile birlikte insan proksimal tübülüs hücrelerine uygulanan C-peptid'in TGF-β1 etki mekanizmasında yer alan önemli unsurların etkinliklerini azalttığı veya engellediği saptanmıştır. C-peptid, TGF-β1 ile indüklenen EMT ile ilişkili fenotipik ve morfolojik değişiklikleri inhibe etmiş veya engellemiştir. C-peptid'in potansiyel anti-fibrotik bir rol oynadığı gösterilmiştir. C-peptid'in DN'nin önlenmesi ve tedavisinde önemli bir role sahip olup olamayacağı, uzun süreli çalışmalarla açıklığa kavuşturulacaktır (Hills, ve ark. 2010a) (Hills ve ark. 2009).

2.1.5. Tip 2 Diyabet ve C-peptid

Tip 2 diyabet insülin direnci ile ilişkilidir ve hastalarda hiperinsülinemi ile birlikte yüksek C-peptid düzeyleri görülmektedir. Artmış C-peptid düzeylerine rağmen bu hastalarda da nöropati ve nefropati görülmektedir. C-peptid'in yüksek konsantrasyonlarında mevcut reseptörlerin down-regüle olduğu düşünülmektedir. Tip 1 ve tip 2 diyabette komplikasyonlar bazı farklılıklar göstermektedir. Tip 1 diyabette nöropati daha öngörülebilir şekilde ve daha hızlı ilerlemekte ve tip 2 diyabet hastalarında görülmeyen miyelin kılıf ve akson dejenerasyonları ile seyretmektedir. Nefropati ise Tip 1 diyabette daha öngörülebilir şekilde ilerlediği halde tip 2 diyabette daha sinsi gelişmektedir. Ayrıca, diyabete özgü renal lezyonlar nefropatili bütün tip 1 diyabet hastalarında görülmesine rağmen tip 2 diyabette renal morfoloji daha heterojendir ve belirgin arterioskleroz ve iskemik nefropati bulguları göstermektedir (Hills ve Brunskill 2009b). Tip1 diyabette yaşamın ilk yirmi yılında başlayan kronik hiperglisemi böbrek hastalığının genellikle tek nedenidir. Diğer taraftan genellikle 40 yaşın üstünde olan tip 2 diyabetli hastalarda yaş ile ilişkili glomerüloskleroz bulguları ve hipertansiyon, obezite, dislipidemi gibi böbrek hastalığını arttıran etkenlerin varlığı önemlidir. Bu nedenle tip 1 ve tip 2 diyabetli hastaların farklı değerlendirilmeleri gerekmektedir. Ancak, tip 2 diyabetin ileri evrelerinde progresif beta hücre kaybına bağlı olarak insülin ve C-peptid'in birlikte eksikliği de söz konusudur (Bhatt ve ark 2013) (Nathan ve ark 2009).



Şekil 2.5: İnsülin direnci olan ve tip 2 diyabeti olan bireylerde C-peptidin aterogenezin başlangıç evresindeki rolü (Walcher ve Marx 2009)

C-peptid'in tip 2 diyabette vasküler enflamasyon ve ateroskleroz gelişiminde rolü olduğu öne sürülmüştür. Bu görüş, tip 2 diyabetli hastalarda ateroskleroz gelişiminin erken döneminde endotelde geçirgenlik artışı ile kendini gösteren endotel disfonksiyonunun olduğu dönemde, C-peptid'in, özellikle subendotelyal boşluk ve intimada olmak üzere, CD4+ lenfositleri ile birlikte birikime uğradığı, buna karşın diyabeti olmayan bireylerin benzer damar lezyonlarında bu birikimin çok az olduğu gözlemine dayanmaktadır. Bu çalışmada diyabet hastalarında da diyabet olmayanlarda da insülin ya da proinsülin birikimi gözlemlenmemiştir. Daha sonra yapılan in vitro çalışmalarda C-peptid'in CD4+ lenfositleri için kemotaktik aktivite gösterdiği fakat nötrofillere ve aterosklerotik lezyonlarda mevcut olmayan hücrelere karşı bu aktiviteyi göstermediği gözlenmiştir. (Şekil 2.5) Dolaşımdaki C-peptid düzeylerinin ölçülmediği, immünohistokimyasal bulguların rapor edildiği bu çalışmalarda araştırıcılar tip 2 diyabette C-peptid'in vasküler disfonksiyona katkıda bulunduğuna işaret etmişlerdir (Hills ve Brunskill 2009b). C-peptid'in, arteriosklerotik lezyonlarda okside LDL'nin makrofajlar tarafından alınmasını sağlayan scavenger reseptör CD36'nın ekspresyonunu PPAR-γ (peroksizom proliferatörleri ile aktive olan reseptör-gamma) aracılığı ile arttırdığı gösterilmiştir (Al-Rasheed ve ark. 2004). Bu bulgular, C-peptid'in monosit / makrofajların köpük hücrelerine farklılaşmalarını uyardığı şeklinde

yorumlanmıştır (Sano ve ark. 1998). Tip 2 diyabette vasküler enflamasyon ve ateroskleroz gelişiminde C-peptid'in anahtar rol oynayan bir medyatör olduğu görüşünün aksine Luppi ve ark. insan aorta endotel hücrelerinde (HAEC) endotel disfonksiyonunun biyokimyasal göstergelerinin ekspresyonlarını C-peptid'in azalttığını saptamışlar ve C-peptid'in antienflamatuvar ve antiaterojenik rol oynadığını öne sürmüşlerdir (Hills ve Brunskill 2009b).

Spence ve ark. tip 2 diyabet yapılmış sıçanlarda C-peptid'e karşı direnç geliştiğini öne sürmüşlerdir. BBZDR/Wor sıçanlarda Zn^{2+} iyonları ile aktive olan C-peptid'in eritrositlerden ATP salınımı üzerine etkilerini sağlıklı ve tip 2 diyabetli hastalarda incelemişlerdir (Medawala ve ark. 2009). Araştırıcılar, nondiyabetik koşullarda eritrositlerden ATP salınımının daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Daha önce yapılmış olan çalışmalarda eritrosit membranının iç tabakasında yer alan fosfatidilserin moleküllerinin hiperglisemik koşullarda yer değiştirerek membranın dış tabakasına geçtikleri gösterilmiştir. Diyabetik eritrositlerde fosfatidilserin moleküllerinin sahip oldukları negatif yükler ile fizyolojik pH'ta negatif yüklü olan C-peptid molekülleri arasındaki itme kuvvetinden dolayı C-peptid'in bağlanmasının engellendiği düşünülmüştür. Meyer ve ark. eritrositlerden Zn^{2+} iyonları ile aktive olan C-peptid aracılı ATP salınımının tip 2 diyabet modelinde metformin ile ön inkübasyon sonucunda kontroller düzeyine getirilebileceğini göstermişlerdir. Tip 2 diyabette kullanılan ve bir biguanid olan metformin'in membrana bağlanarak PS eksternalizasyonu ile meydana gelen negatifliği maskelediği ve C-peptid bağlanmasını arttırdığı öne sürülmüştür. Biguanidlerin antihiperglisemik etkinliklerinde membrandaki lipid domenlerinin önemli olduğuna inanılmaktadır. Glukoz transportu ve kan akışında metformin ile iyileşme olduğunu gösteren diğer çalışmalar da bu oral antidiyabetik ajanın genellikle membran akışkanlığını arttırarak etkili olduğunu düşündürmektedir (Hills ve ark. 2010a). Belirtilen bu çalışmalar tip 2 diyabette C-peptid direnci olduğunu, metforminin bu direnci kırıcı etki yaptığını gösterdiği gibi C-peptid'in ATP ile indüklenen NO salınımı mekanizması ile renal kan akımını iyileştirerek lokal vasküler komplikasyonları hafifletebileceğini de göstermektedir (Hills ve Brunskill 2009b).

2.2. Diabetes Mellitus

DM, kronik hiperglisemi ile karakterize metabolik hastalıkların hetorojen bir grubudur. DM insülin sekresyonunda, insülin etkisinde veya her ikisindeki bozukluklar sonucu karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki bozukluklara bağlı olarak gelişen kronik hiperglisemi ile karakterizedir. Diyabet susama, sık idrara çıkma, görmede bulanıklık, kilo kaybı, çok yemek yeme gibi bu hastalık için karakteristik olan semptomlar ile ortaya çıkabilir. Açlık hiperglisemisi ile karakterize olan hastalık klinik olarak belirgin olmayan devrelerde, en yaygın olarak da glukoz intoleransının olduğu dönemde teşhis edilebilir (Williams 2005).

DM'un etkileri uzun dönemli hasar, disfonksiyon, özellikle göz, böbrek, kalp ve kan damarlarıda olmak üzere organ yetmezliklerini içermektedir. Patolojik fonksiyonel değişikliklere yol açabilen hiperglisemi hastalığın teşhisinden uzun yıllar öncesinde var olabilir. DM'un birçok sebebinin bilinmesine rağmen, en sık görülen tiplerinin etyoloji ve patogenezi hala iyi anlaşılmış değildir. Diyabetli vakaların çoğunluğunu etyo-patogenetik açıdan tip 1 ve tip 2 diyabet oluşturmaktadır, fakat bu tipler arasında geniş bir çeşitlilik mevcuttur (Williams 2005).

1940 yılında kurulan "Amerikan Diyabet Birliği'nin (ADA)" yayınladığı tarihsel gelişime göre; DM ile ilgili ilk adım 1910'da İngiliz fizyolog Sir Edward Albert Sharpey - Schafer tarafından atılmıştır. Kendisinin pankreas üzerinde çalışıyor olması onu normal olarak non-diyabetiklerde üretilecek olan bir maddenin keşfine götürmüştür: insülin. Bu kelime, ada anlamında olup Latince'de insula kelimesinden kökenlenmektedir. Pankreasta insülin üreten Langerhans adacıklarından gelmektedir. Ardından 1916'da dünya çapında ünlü bir klinisyen ve eğitimci olan Elliott Joslin (MD), "Diabetes Mellitus Tedavi" isimli kitabının ilk baskısını yayımlamıştır. 1921'de Frederick Banting (MD) ve asistanı Charles Best (MD) köpek pankreasından aldıkları insülini, pankreası alınmış köpeklere enjekte etmişler ve köpeklerdeki kan şekeri seviyesinin aşağı indiğini gözlemlemişlerdir. 1949'da Rachmiel Levine (MD), insülinin hücrelere glukoz taşıyan bir anahtar gibi çalıştığını keşfetmiştir. 1959'da Solomon Berson (MD) ve Rosalyn Yalow radioimmunoassay teknolojisini kullanarak kandaki insülin miktarını ölçmüş ve diyabetli bazı hastaların hala kendi insülinlerini ürettiklerini farketmişlerdir ve "insülin - bağımlı" (tip 1) ve "insülin bağımlı olmayan" (tip 2) diyabeti tanımlamışlardır (Care, 2014).

2.2.1. Diabetes Mellitus'un Etyolojik Sınıflandırılması ve Kriterleri (Care, 2014; Care, 2019)

I. Tip 1 DM

Genellikle mutlak insülin eksikliğine neden olan β-hücre yıkımı

A.İmmün aracılı

B.Idiyopatik

II. Tip 2 DM

Göreceli insülin eksikliği ile ortaya çıkan insülin direnci ve ağırlıklı olarak progresif salgı kusurları ile ortaya çıkan insülin direnci arasında değişmektedir.

III. Diğer spesifik DM türleri

A. β - Hücre fonksiyonundaki genetik kusurlar sonucu ortaya çıkar.

Kromozom 12, HNF-1α (MODY3); kromozom 7, glukokinaz (MODY2); kromozom 20, HNF-4α (MODY1); kromozom 13, insülin promotör faktör-1 (IPF-1); (MODY4) kromozom 17, HNF-1β (MODY5); kromozom 2, NeuroD1 (MODY6) ve mitokondriyal DNA

B. İnsülin etkinliğindeki genetik kusurlar sonucu ortaya çıkar.

Tip A insulin direnci, Leprekonizm, Rabson-Mendenhall sendromu, lipoatrofik diyabet

C. Ekzokrin pankreas hastalıkları sonucu oluşur.

Pankreatit, travma / pankreotektomi, neoplazi, kistik fibroz, hemokromatoz, fibrokalkülöz pankreatopati

D. Endokrinopatiler

Akromegali, Cushing's sendromu, glukagonoma, feokromositoma, hipertiroidzm, somatostatinoma ve aldosteronoma

E. İlaç ya da kimyasal yolla indüklenmiş

Vacor, pentamidin, nikotinik asit, glukokortikoidler, tiroid hormonu, diazoksidin, β-adrenerjik agonistler, tiazidler, dilantin, γ-interferon

F. Enfeksiyonlar

Konjenital rubella, sitomegalo virus

G. İmmün aracılı nadir diyabet formları

Stiff-man sendromu, anti-insulin reseptör antikorları

H. Bazı durumlarda diyabetle ilişkili diğer genetik sendromlar

Down sendromu, Klinefelter sendromu,Turner sendromu, Wolfram sendromu, Friedreich ataksisi, Huntington kore hastalığı, Laurence-Moon-Biedl sendromu, Miyotonik distrofi, porfriya, Prader-Willi sendromu

IV. Gestasyonel diabetes mellitus

DM tanısı aşağıda belirtilen kriterlere göre konulmalıdır: (Care, 2014)

- HbA1c ≥ %6,5: HbA1c testi NGSP (National Glycohemoglobin Standardisation Programme) tarafından onaylanmış, DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) çalışmalarını referans almalıdır.

veya

- Açlık kan şekeri ≥ 126 mg/dL (7,0 mmol/L): 8 saatlik açlık zorunludur.

veya

- Oral glukoz tolerans testinde (OGTT) 2 saatlik plazma glukozu ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L)

OGTT WHO (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından tarif edildiği şekilde suda çözülmüş 75 g susuz glukoz kullanılarak yapılmalıdır

veya

- Günün herhangi bir zaman diliminde ölçülen plazma glukozu ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L) olan ve hipergliseminin klasik semptomlarını gösteren ya da hiperglisemik krizdeki hastalar

2.2.2. Tip 1 Diabetes Mellitus

Tip 1 DM özellikle β-hücre yıkımına bağlı olan diyabet formudur. Tip 1 diyabetli hastalarda insülin ve plazma C-peptid düzeyleri çok düşük ya da tesbit edilemez düzeylerdedir. Ketoza yatkınlık vardır ve genellikle hayatta kalmak için insülin tedavisi gerektiren diyabet tipidir. Tip 1 diyabette genellikle spesifik β-hücre

yıkımına yol açan otoimmün süreci gösteren anti- Glutamik Asit Dekarboksilaz (GAD), anti-adacık antikor ve anti-insülin antikorları mevcuttur. Bu antikorlardan bir veya birden fazlasına sahip kişiler tip 1A diyabet; β-hücrelerinde otoimmün yıkımı gösteren immünolojik belirteçlerin bulunmadığı fakat bilinmeyen mekanizmalarla insülin eksikliğinin meydana geldiği bireyler Tip 1B diyabet (idyopatik diyabet) olarak tanımlanır. Tip 1 DM'li hastaların nispeten az bir kısmı tip 1B sınıfına girmektedir. Tip 1B veya idiyopatik diyabetli hastaların çoğunluğu Asya ve Afrika kökenlidir (Williams 2005).

Tip 1A diyabette spesifik insan lökosit antijeni (HLA) alleli ile kuvvetli bir ilişki ve şiddetli insülin eksikliği vardır. β-hücre yıkım hızı değişkendir. Çocuk ve gençlerde yıkım hızlı olurken erişkinlerde bu süreç yavaştır. Bazılarında hafif düzeyde açlık hiperglisemisi varken bu durum hızla ciddi düzeyde hiperglisemiye veya ketoasidoza yol açabilirken, özellikle erişkinlerde rezidüel β-hücre fonksiyonlarının olması nedeniyle hastalığın belirgin hale gelmesi yıllar içinde olabilmektedir. Bu durum bazı zamanlar "latent otoimmün diyabet" olarak adlandırılmaktadır. Bu bireyler diyabetin tespitinden sonra birkaç yıl insülin tedavisine gereksinim duymaksızın yaşamlarını idame ettirebilirler. Tip 1A diyabetli hastalarda ayrıca Graves hastalığı, Hashimoto tiroiditi, Addison hastalığı, vitiligo ve pernisiyoz anemi gibi otoimmün hastalıklar da mevcut olabilir (Williams 2005).

2.2.3. Tip 2 Diabetes Mellitus

Tip 2 diyabet, diyabetin en yaygın formudur. Esas bozukluğun insülinin sekresyonunda ve etkinliğinde olmasıyla karakterizedir. Genellikle klinik olarak diyabet geliştiğinde, bu mekanizmalardaki bozukluklar da ortaya çıkar. Bu formun etyopatogenezi halen kesin olarak bilinmemekle birlikte, β-hücre yıkımı tip 2 diyabette olmamaktadır. Tip 2 diyabetli hastalarda genellikle insülin yetmezliğinden ziyade göreceli olarak insülin fazlalığı ve insülin direnci mevcuttur. Diyabet teşhisi konulduğunda ve sonrasında bu hastalarda glisemi kontrolü yapılması gerekse de hayatta kalmak için insülin tedavisine gereksinim duyulmayabilir. Diyabetin bu formu, diyabetin süresiyle artış gösteren β-hücre yetmezliği ile karakterizedir. Ketoasidoz sadece spontan olarak oluşur ve enfeksiyon gibi diğer hastalıkların eşlik ettiği durumlarda görülebilir (Williams 2005).

Tip 2 diyabetli hastaların çoğunluğu diyabet ortaya çıktığında obezdirler, ve obezite insülin resistansını arttırmaktadır. Hiperglisemi kademeli olarak ortaya çıkmakta ve yıllar boyunca klinik olarak bulgu vermektedir. Bu hastalarda mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyon gelişim riski yüksektir. İnsülin resistansından dolayı bu kişilerde insülin seviyesi normal veya yüksek olmasına rağmen kan şekeri düzeyleri normal sınırlarda tutulamamaktadır. Böylece bu hastalar göreceli olarak insülinopeniktirler (Williams 2005).

Tip 2 diyabet gelişme riski, yaş, obezite ve fiziksel inaktivite ile artış gösterir. Tip 2 diyabette aile hikayesi önemlidir. Ailesinde diyabetik bireylerin olması, obezite, hipertansiyon ve kadınlarda gestasyonel diyabet öyküsü mevcudiyeti tip 2 diyabet görülme riskini arttırmaktadır. Tip 2 diyabet sıklığı ırk ve etnik sub-gruplar arasında değişkenlik göstermektedir (Williams 2005).

2.2.4. Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları

Diyabetin akut komplikasyonları ketoasidoz, hiperglisemik hiperosmolar nonketotik koma ve hipoglisemidir. Diyabetin kronik komplikasyonlar ise retinopati, nöropati, nefropati gibi mikrovasküler ve koroner arter hastalığı, periferik vasküler hastalık, serebrovasküler hastalık gibi makrovasküler komplikasyonlardır (Powers 2012 pp.2968-3003). Birçok organ sistemini etkileyebilen kronik komplikasyonlar, diyabetle ilişkili morbidite ve mortalitenin çoğundan sorumludur. Kronik komplikasyon riski hiperglisemik kalınan süreye bağlı olarak artar; genellikle hipergliseminin ikinci de kadında ortaya çıkar (Powers 2012 pp.2968-3003).

Diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarının ortak patofizyolojik özellikleri; intrasellüler hiperglisemi varlığı, endotel hücre fonksiyonunda anormallik, damar duvarında protein birikiminin artması, damar duvarından hücre kaybı ve damarda tıkanma, posthiperglisemik öglisemi sırasında komplikasyonların ilerlemesi ve komplikasyonlara yatkınlığı belirleyen genetik komponent varlığı olarak sıralanabilir. Makrovasküler komplikasyonların patofizyolojik özellikleri endotel hücre disfonksiyonu ve dislipidemidir. Sadece diyabetli bireylerde görülen mikrovasküler komplikasyonların aksine makrovasküler komplikasyonlar diyabetli olmayan bireylerdeki gibi gelişmektedir. Bununla birlikte diyabetli bireylerde kardiyovasküler

hastalık daha hızlı ilerlemekte ve daha çok yayılmaktadır (Brownlee ve ark. 2016 pp. 1484-1581).

Tip 1 ve tip 2 diyabetli büyük hasta gruplarında yapılan randomize prospektif klinik çalışmalar [Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) ve United Kingdom Prospective Diabetes Study (UPKDS)] glisemi ile diyabetik mikrovasküler komplikasyonlar arasında kuvvetli bir ilişki bulunduğunu göstermiştir. UKPDS çalışmasında hipergliseminin diyabetik makrovasküler hastalıkta mikrovasküler hastalıklar için olduğu kadar merkezi öneme sahip olmadığı saptanmıştır. HbA1c değerinin 5.5% - 9.5% aralığında yükselmesi mikrovasküler komplikasyonlarda 10 katlık ilerlemeye neden olduğu, makrovasküler komplikasyonlarda ise sadece 2 katlık ilerleme görüldüğü saptanmıştır (Coppack ve Lawrence 2008 pp.321).

2.3. Diyabetik Nefropati

Diyabetik nefropati (DN), diyabetik hastalarda kronik hipergliseminin böbreğin çeşitli tip hücrelerinde disfonksiyona neden olduğu ve ilerleyici böbrek yetmezliğine yol açan bir metabolik bozukluktur (Chunsun Dai ve ark. 2004). Bir mikrovasküler komplikasyon olan DN'nin yıllık insidansında son on yılda iki kattan fazla artış olduğu ve bugün ileri evre böbrek hastalıklarının neredeyse % 50'sini oluşturduğu bilinmektedir (Hills ve Squires 2011). Diyabetik böbrek hastalıkları yıllar içinde gelişmektedir. DN'nin, diyabetin tanısından sonra geçen 3 yıldan daha erken bir dönemde görülmesi oldukça ender bir durumdur. Genellikle tip 1 diyabet hastalarında tanıyı takip eden 5-15 yıl içinde görülür. Tip 2 diyabet hastalarında belirtilerin nispeten hafif olması nedeniyle hastalığın başlangıcı ile tanısı arasında geçen sürenin belirsizliği, bu hastalarda böbrek hastalıklarının doğal seyrini daha az anlaşılır kılmaktadır. Bununla beraber tip 1 diyabete benzer olarak tip 2 diyabette de böbrek hastalıkları birkaç yıl içinde gelişmektedir (Williams 2005 pp.925-950).

DN klinik olarak, hipertansiyon, proteinüri ve renal disfonksiyon varlığı ile karakterize edilmektedir. Nefropatinin Mogensen tarafından tanımlanan klasik beş evresi sırası ile hiperfiltrasyon, sessiz evre, mikroalbüminüri, makroalbüminüri ve üremi ile karakterize renal fonksiyon bozukluğudur (Mogensen, 1997) **(**Şekil 2.6).



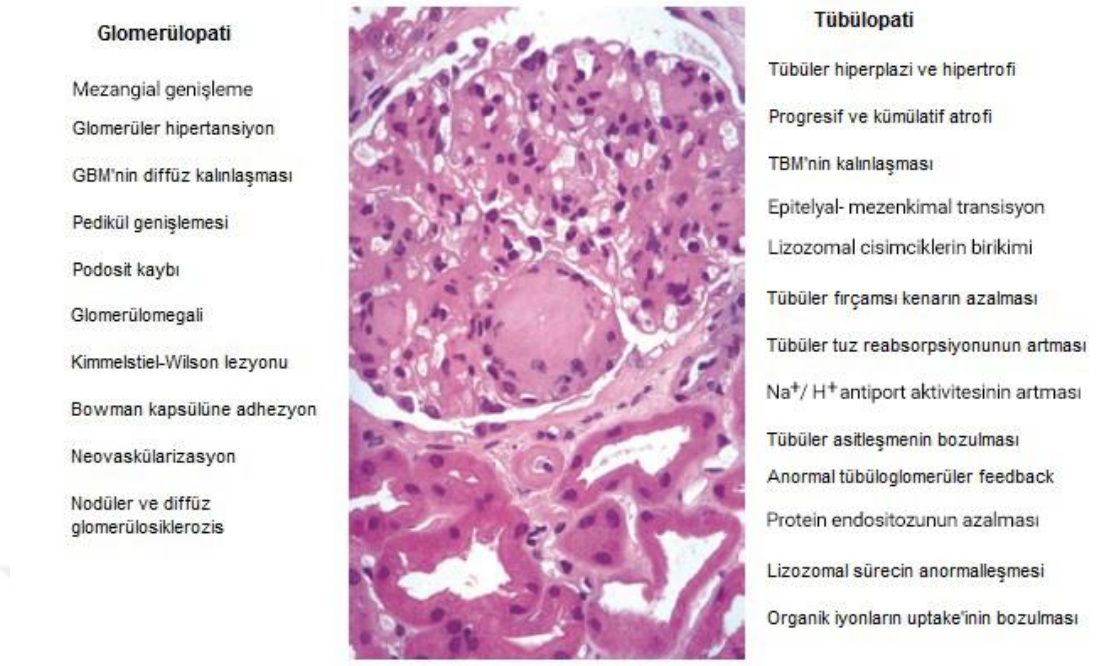
Şekil 2.6: Diyabetik nefropatinin evreleri (Brownlee ve ark. 2016 pp. 1484-1581)

Mikroalbüminüri 24 saatlik süre içinde toplanan idrarda 30-300 mg kadar albümin atılmasıdır . Tüm mikroalbüminürik vakaların aşikar proteinüriye ve böbrek yetersizliğine dönüşmediği bilinmektedir. 24 saatlik idrarda albümin ölçümü, doğru örnek toplanamaması nedeni ile sağlıklı sonuçlar vermemektedir. Bu noktada spot idrarda ölçülen albümin / kreatinin oranının kullanımı önerilmektedir; bu oranın hem tanı, hem de takipte yararlı olduğu gösterilmiştir. Normal değer, 30 µg albümin / mg kreatinin değerinin altındadır. Egzersiz, diyetsel özellikler, hamilelik, ilaçlar ve protein atılımını ve glomerüler hemodinamikleri etkileyen faktörler geçici olarak albüminüriyi arttırırlar (Williams 2005 pp.925-950).

Patogenezleri farklı olan Tip 1 ve Tip 2 diyabette böbreğin glomerül, tubülointerstisyum ve damar sistemi gibi farklı yapılarında benzer bozukluklar ortaya çıkmaktadır. Hiperglisemik hasardan glomerüler podositler, mezangial ve endotel hücreler, tübüler epitel hücreleri, interstisyel fibroblastlar ve vasküler endotel hücreleri de dahil olmak üzere böbreğin tüm hücre tipleri, değişen derecelerde de olsa etkilenmektedir (Kanwar ve ark. 2011).

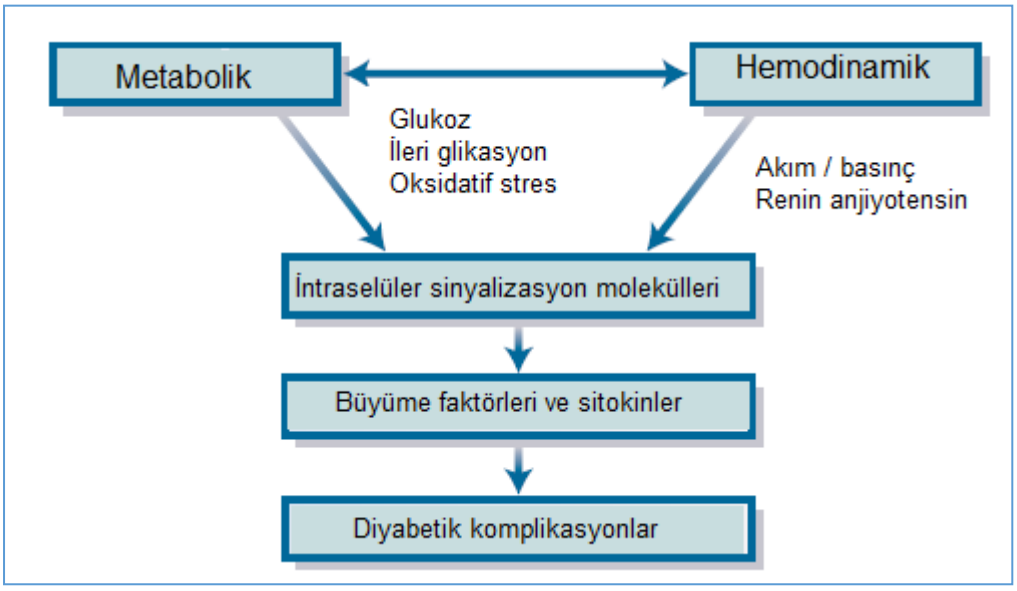
DN ilk olarak, diffüz ve nodüler glomerüloskleroz şeklinde kendini gösteren glomerülopati olarak tanımlanmıştır. Daha sonra elektron mikroskopisi kullanılarak yapılan çalışmalar diyabette glomerüllerde öne çıkan bulguların glomerüler bazal membran (GBM) kalınlaşması ve mezangial genişleme olduğunu göstermiştir (Reeves ve Andreoli 2000). Glomerüllerde podosit disfonksiyonu ve apoptozunun, diyabette

proteinürinin görülmesinde temel rol oynadığı anlaşılmaktadır. Diyabetik böbrekte daha çok glomerüllerdeki değişikliklere odaklanılmışsa da son yapılan çalışmalarda tübülüsler, interstisyum, medulla ve papilla gibi yapılarda da önemli değişiklikler olduğu saptanmıştır. Diyabetik tübülopati tübüloepitelyal hücre hipertrofisi, tübüler bazal membran (TBM) kalınlaşması, epiteliyal-mezenkimal transformasyon (EMT) gibi yapısal ve fonksiyonel değişiklikler ve glikojen birikimi ile karakterizedir. İnterstisyel alan miyofibroblast ve makrofaj gibi hücrelerin enfiltrasyonu sonucunda genişlemektedir. Diyabette tübüler fonksiyonlardaki düzenlenme bozukluğu, renal glomerülüslerdeki değişikliklerden önce veya eş zamanlı olarak ve protenüri ile birlikte görülebilir. Proksimal tübülüslerdeki fonksiyonel ve yapısal değişiklikler DN gelişiminde ve ilerlemesinde anahtar rol oynamaktadır. DN'de renal fonksiyon ve prognoz, glomerülüslerdeki değişikliklerden daha çok tübülüs ve kortikal interstisyumdaki yapısal lezyonlar ile korelasyon göstermektedir. Tübülointerstisyel bölgenin, böbreğin parankimal kütlesinin büyük çoğunluğunu (~%90) temsil ediyor olması DN patogenezinde, bu kompartmanın önemini vurgulamaktadır. Örneğin, DN'nin ilk aşamalarında, hiperfiltrasyon ve glomerüler genişleme yaygınlaşmaya başladığında, gözlenen renomegali tübülüslerdeki hipertrofi ile ilgilidir. Benzer şekilde, DN'nin sonraki aşamalarında bu bölgedeki hasarlanma, çeşitli patogenetik mekanizmalar ile böbrek fonksiyonlarını büyük ölçüde bozabilmektedir. DN'de glomerülopati ve tübülopati karakteristikleri Şekil 2.7 de görülmektedir (Kanwar ve ark. 2011).



Şekil 2.7: Diyabetik nefropatinin glomerüler ve tübüler bulguları (GMB, Glomerüler Bazal Membran; TMB, Tübüler Bazal Membran) (Brownlee ve ark. 2016 pp. 1484-1581)

Diğer diyabetik komplikasyonlarda olduğu gibi, DN patogenezinde de metabolik ve hemodinamik faktörler ve aralarındaki etkileşimler rol oynar. (Şekil 2.8)



Şekil 2.8: Diyabetik komplikasyonların patogenezinde yer alan faktörler (Brownlee ve ark. 2016 pp. 1484-1581)

2.3.1. Diyabetik Nefropati Patogenezinde Rol Alan Biyokimyasal Mekanizmalar

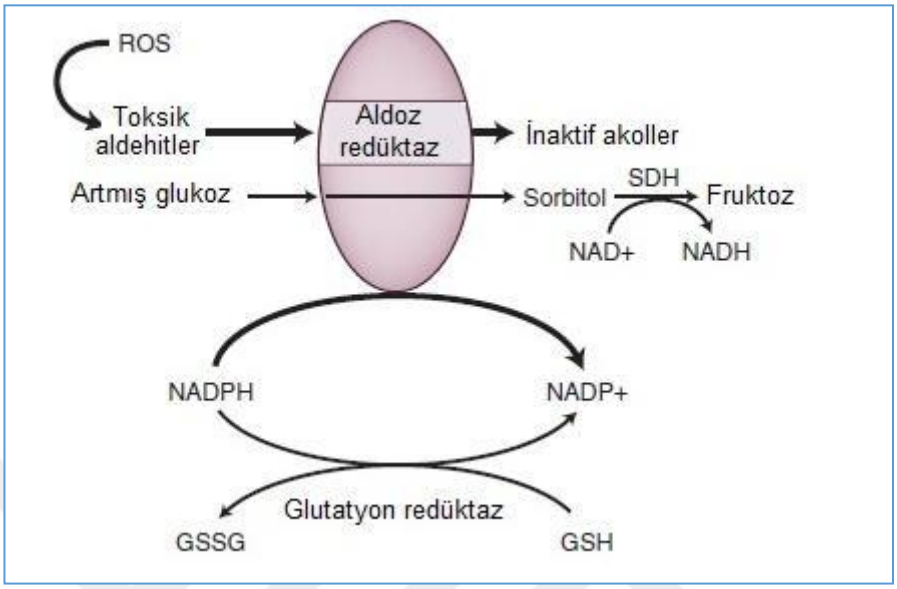
Araştırmalar hiperglisemik koşullara böbreğin tüm hücresel elemanlarının benzer hücre içi biyokimyasal mekanizmalarla yanıt verdiğini göstermektedir. Yüksek glukozlu ortamda uyarılan hücre içi olayları; poliol yolu aktivasyonu, ileri glikasyon son ürün (AGE) oluşumunda artış, protein kinaz C (PKC) aktivasyonu, heksozamin yolu aktivasyonu, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminde artış, TGF-β-Smad-mitojenle aktive olan protein kinaz (TGF-β-Smad-MAPK) aktivasyonu (TGF-β transforming growth factor β-1; Smad: small mothers against decapentaplegic; MAPK: mitojen ile aktive edilen protein kinaz); Janus kinaz-sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (JAK-STAT) yolu aktivasyonu; G protein aracılı sinyal yolu aktivasyonu, siklin kinaz ve inhibitörlerinin anormal ekspresyonu; ECM proteinlerinin ve yıkılım enzimleri olan metalloproteinaz ve inhibitörlerinin anormal ekspresyonudur. Bu mekanizmalar arasında çeşitli düzeylerde etkileşim olmaktadır. DN patogenezi ile ilgili bir diğer önemli unsur da hipergliseminin, lokal intrarenal renin-anjiyotensin-aldosteron sistemini aktive ederek glomerüllerde otoregülasyonu bozmasıdır. Bu şekilde mesangial hücre üzerindeki glomerüler kapiller basınç ve mekanik gerilmenin artması sonucunda, ROS oluşumunun artması ile çeşitli hücre içi metabolik yollar aktive olur ki bu da DN seyrini kötüleştirir. Bu bilgiler, DN patogenezinde hiperglisemide aktive olan metabolik yollar ile birlikte mekanik etkilerin de rol aldığını ortaya koymaktadır (Kanwar ve ark. 2011).

Böbrek hücrelerine glukoz girişi: Böbrek hücrelerine glukoz transportu glukoz taşıyıcı GLUT-1 ve GLUT-4 gibi pasif taşıyıcılar ve sodyum bağımlı glukoz taşıyıcıları SGLT-1 ve SGLT-2 gibi elektrokimyasal gradyana karşı taşıma yapan aktif taşıyıcılar tarafından sağlanır. GLUT-1 ve GLUT-4 kinetik özellikleri (bağlanma afinitesi / kapasitesi) nedeni ile normoglisemide doymuş durumdadır. Hiperglisemide glukoz taşınımının arttığı bilindiğinden, GLUT-1 ve GLUT-4 ekspresyon ve/veya aktivitesinde artış gereklidir (Kanwar ve ark. 2011).

2.3.1.1. Poliol Yolu Aktivasyonu

Bu metabolik yolda glukoz, NADPH-bağımlı aldoz redüktaz (AR) ile bir polialkol olan sorbitole indirgenir. Sorbitol, kofaktör olarak NAD^+ kullanan sorbitol dehidrojenaz ile fruktoza yükseltgenir. Normoglisemide, AR enziminin Km değerinin yüksek olması nedeni ile az miktarda glukoz poliol yolu ile metabolize olur. Poliol

yolunun artan etkinliği NADPH'ın azalmasına ve indirgenmiş glutatyon rejenarasyonunun azalmasına, psödohipoksi olarak nitelenen NADH / NAD^+ artışına ve nitrik oksit oluşumunun azalmasına yol açar (Kanwar ve ark. 2011). (Şekil 2.9)



Şekil 2.9: Aldoz redüktaz ve poliol yolu (Brownlee ve ark. 2016 pp. 1484-1581)

Hücre dışına difüze olmayan poliolün birikimi sonucunda osmotik stres, hücrenin redoks durumunun değişmesi sonucunda oksidatif stres oluşur. Bununla birlikte AR inhibitörlerinin diyabetik sıçanlarda böbrekteki hücresel ve matriks değişikliklerini ortadan kaldırmadığı gerçeği DN patogenezinde poliol yolunun rolünü ve önemini tartışmalı konuma sokmuştur (Kanwar ve ark. 2011).

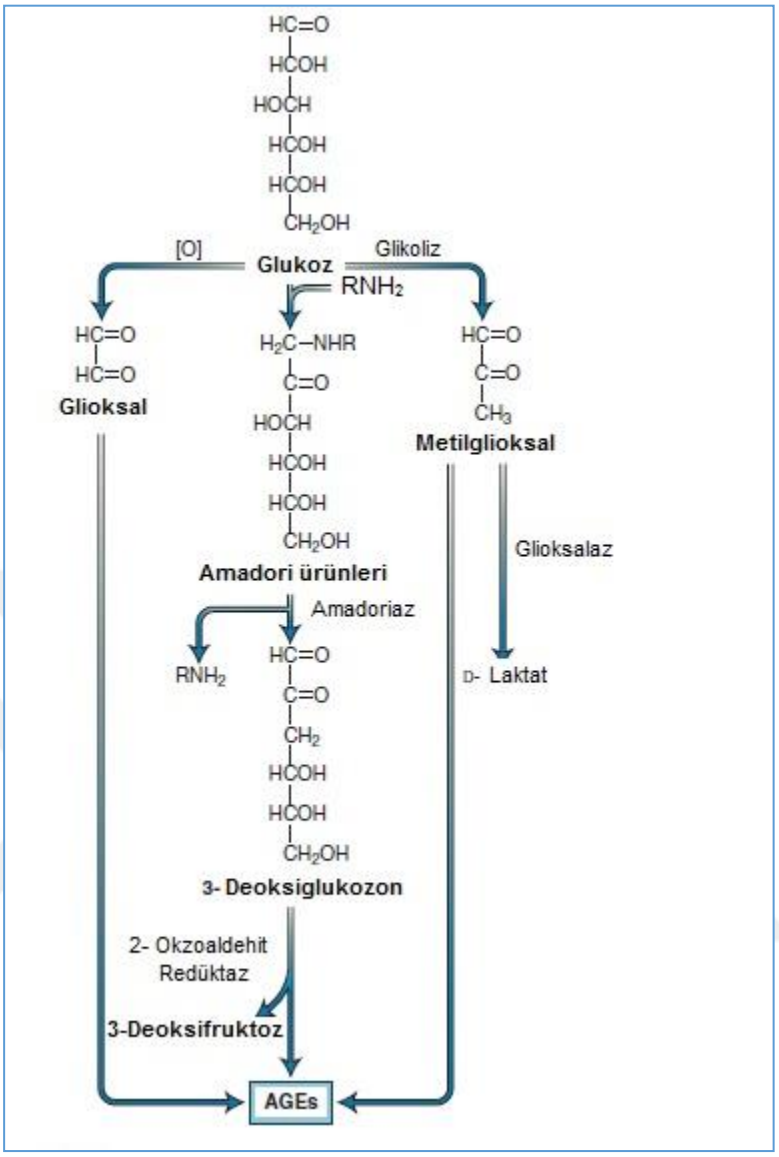
Glukozdan oluşan bir başka poliol de miyoinozitoldür. Miyoinozitol metabolizması DN patogenezinde yer almasına rağmen çok az ilgi çekmiştir. Glukozdan sorbitol oluşumunun artması ile miyoinozitol oluşumu azalmaktadır. Ayrıca, glukoz 6-fosfattan sentez edilen L-miyoinozitol 1-fosfattan, defosforilasyon ile oluşturulan miyoinozitol, böbreklere özgü bir enzim olan miyoinozitol oksijenaz ile D-glukuronik aside dönüştürülür. DN'de idrar yoluyla D-glukuronik asit atılımı arttıkça miyoinozitolün dokudaki konsantrasyonu azalır. Miyoinozitol eksikliği, sentezdeki azalma ile birlikte miyoinozitol oksijenaz aracılı yıkımdaki artıştan kaynaklanmaktadır. Miyoinozitol oksijenaz aktivitesinin deneysel DN'de arttığı gösterilmiştir. Miyoinozitol azlığı ve PKC ile indüklenen fosfolipaz A_2 aktivasyonu ile Na^+/K^+-ATPaz enziminin inhibitörleri olan araşidonik asit ve prostaglandin E_2 sentezlerinin artması, Na^+/K^+-

ATPaz aktivitesinde azalma meydana getirir. Bu biyokimyasal anormallikler miyoinozitol ile düzeltilebilmektedir. Proksimal tübülüs epitel hücre kültürlerine miyoinozitol eklenmesi, glukoz ile indüklenen proliferasyonu ve kollajen sentezini normalleştirmektedir (Kanwar ve ark. 2011).

2.3.1.2. İleri Glikasyon

2.3.1.2.1. Proteinlerin İleri Glikasyon Son Ürünleri ile Modifikasyonları

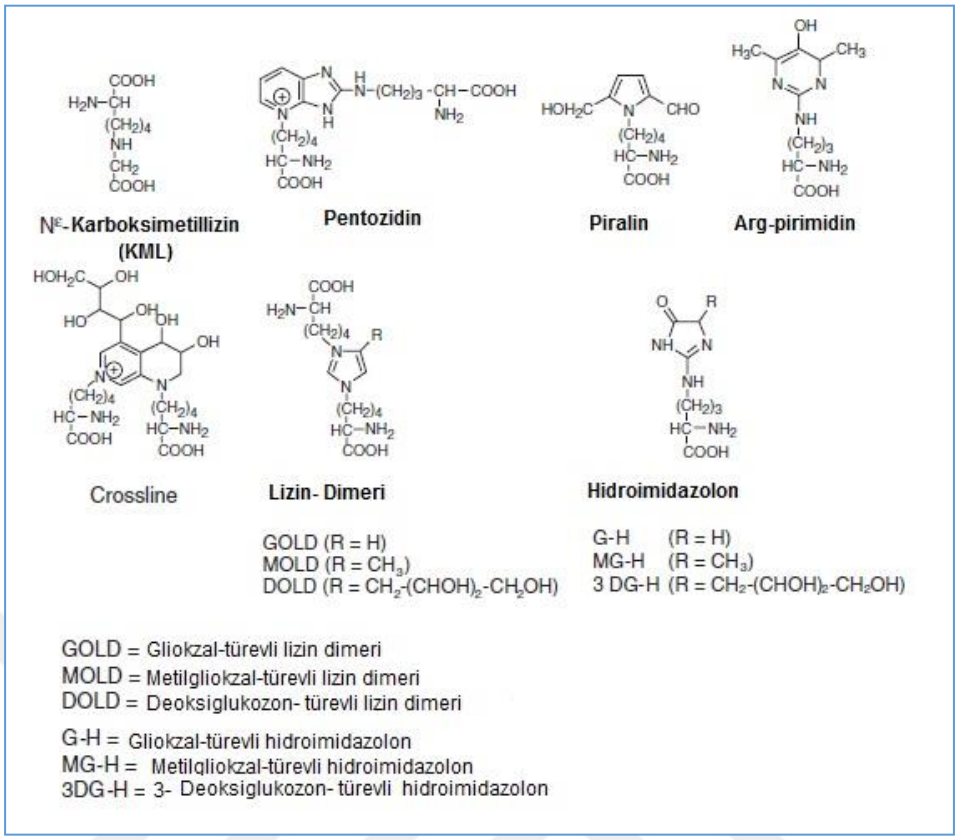
Glukoz veya dikarbonil bileşikleri proteinlerin amino grupları ile enzim aracılığı olmadan (non-enzimatik glikozilasyon/glikasyon) kondansasyon reaksiyonuna girmektedir. İlk adımda glikasyon reaksiyonu ile oluşan kararsız aldimin yapılı Schiff bazı molekül içi Amadori düzenlenmesi ile daha kararlı olan ketoamin yapıya dönüşür (Şekil 2.10). Amadori düzenlenmesi sonrasında aralarında oksidasyonun da yer aldığı, bir dizi yeniden düzenlenme, dehidratasyon ve polimerizasyon reaksiyonları ile çeşitli yapıda ileri glikasyon son ürünleri (advanced glycation end products: AGE'ler) oluşur (Kanwar ve ark. 2011) (Daroux ve ark. 2010). Karbonhidrat, lipid ve amino asit metabolizmaları tarafından sürekli olarak üretililen reaktif (di)karbonil bileşikleri (RCO), AGE öncül havuzunu oluştururlar ve vücutta bol miktarda mevcuttur. Oksidatif stres koşullarında üretimi artan RCO, şeker ve askorbat oto-oksidasyonları, lipid peroksidasyonu, glikoliz ve miyeloperoksidaz aktivasyonu da dahil olmak üzere çeşitli yollarla oluşturulabilmektedir (Busch ve ark. 2010). Glioksal, metilglioksal ve 3-deoksiglukozon önemli RCO'lar arasında yer alır; özellikle metilglioksalin reaktivitesi çok yüksektir. Glioksal glukozun otooksidasyonu, 3-deoksiglukozon Amadori ürününün bozunması ve metilglioksal gliseraldehid 3-fosfatın bölünmesi ile oluşur (Kanwar ve ark. 2011).



Şekil 2.10: İntraselüler dikarbonil bileşiklerinden AGE oluşumu
(Brownlee ve ark. 2016 pp. 1484-1581)

AGE-modifiye proteinlerin oluşum hızı, protein konsantrasyonuna, glikasyon ajanlarının konsantrasyonlarına, reaktivitelerine ve protein molekülünde glikasyona katılan bölgenin reaktivitesine bağlıdır. Protein molekülleri belirli amino asit kalıntıları üzerindeki komşu gruplar arasındaki etkileşimler, AGE oluşumunu aktive ederler. Glikasyona yatkınlığı yüksek olan bu bölgeler "sıcak noktalar" olarak tanımlanır (Rabbani ve Thornalley 2012 pp. 293-304).

Başlıca AGE bileşikleri şekil 2.11'de görülmektedir. Bu yapıların yan zincirleri fizyolojik pH'da iyonlaşmıştır.



Şekil 2.11: Başlıca AGE Bileşikleri (Busch ve ark. 2010)

Organizma dokularında en yüksek miktarlarda bulunan AGE'ler, arginin türevi olan hidroimidazolon AGE'ler ve özellikle de metilglioksal türevi MG-H1'dir. Plazma proteinlerinde MG-H1'den 5-10 kat daha düşük konsantrasyonlarda bulunan başlıca AGE, lizin türevi N(epsilon)-(karboksimetil)-lizin'dir (CML). Plazma proteinlerinde genellikle MG-H1 kalıntılarından 100-300 kat daha düşük konsantrasyonlarda bulunan pentozidin, çok çalışılmış olan ve fluoresans gösteren bir AGE bileşiğidir (Rabbani ve Thornalley 2012, pp. 293-304).

AGE'ler ile modifiye olmuş proteinlerdeki AGE kalıntılarının "proteine bağlı AGE'ler" olarak tanımlanmaları, protein veya peptid moleküllerinin AGE oluşumuna doğrudan katıldıkları gerçeğini yansıtmamakta, ayrı bir AGE molekülünün bir protein veya peptid molekülüne bağlı olduğunu ima etmektedir. Serbest AGE bileşikleri, AGE'ler tarafından modifiye edilmiş proteinlerin hücresel hidrolizleri, serbest amino asitlerin glikasyonları ve besin maddelerinde bulunan AGE'lerle modifiye edilmiş proteinlerin sindirim ve emilimleri sonucunda meydana gelir. Plazmada bulunan düşük molekül ağırlıklı AGE'lerin başlangıçta AGE'ler ile modifiye olmuş peptidler oldukları

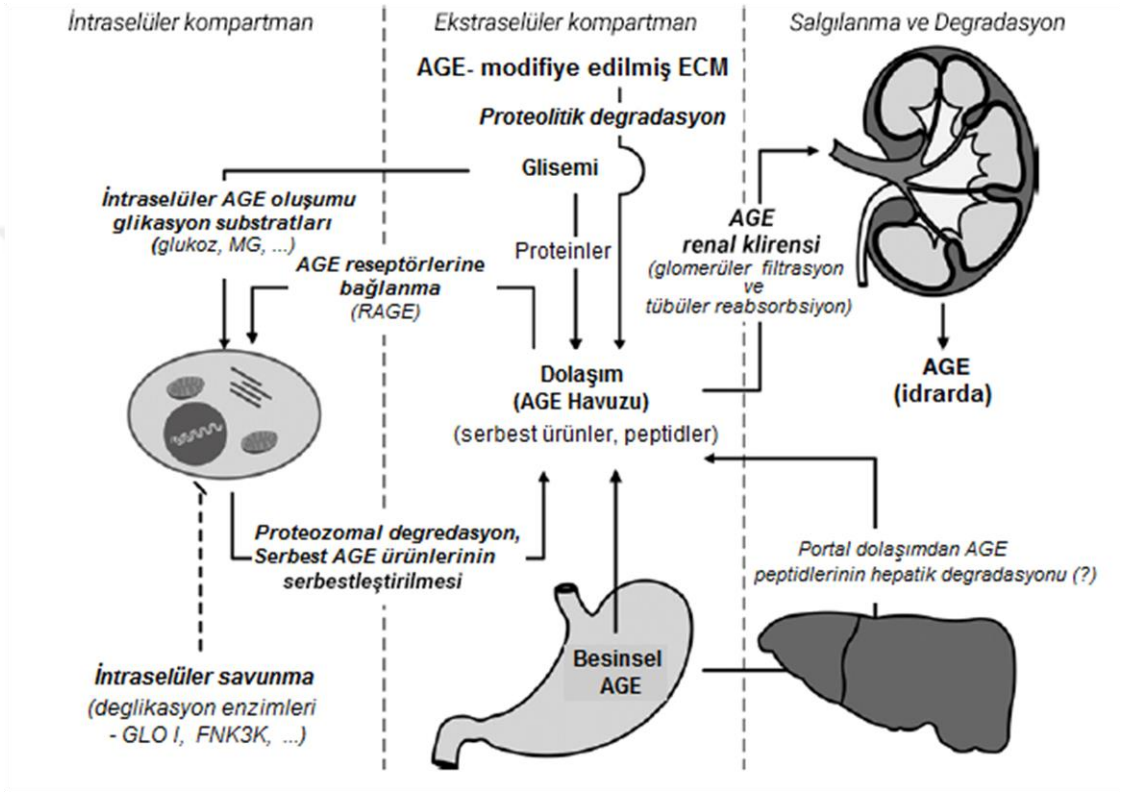
düşünülüyordu ancak daha sonra yapılan kütle spektrometrik analizler sonucunda bunların daha çok serbest AGE ürünleri oldukları gösterilmiştir (Rabbani ve Thornalley 2012, pp. 293-304).

2.3.1.2.2. AGE'ler ile modifiye proteinlerin metabolizmaları

AGE kalıntıları çoğu protein molekülünde çok düşük oranda bulunmaktadır; kimyasal olarak kararlı AGE'ler tarafından modifiye edilmiş uzun ömürlü proteinler dışında kalan proteinlerin genellikle %5'inden azı bir AGE kalıntısına sahiptir. AGE kalıntıları, plazmada albümin, daha yüksek molekül ağırlıklı protein molekülleri ve orta büyüklükte (500 - 60,000 Da) peptid ve proteinler üzerinde bulunmaktadır. Plazma proteinlerindeki AGE kalıntı konsantrasyonları AGE oluşum hızına, proteinlerin plazmadan klirens hızına, AGE kalıntılarının onarım veya geri dönüşüm hızlarına bağlıdır. Plazma proteinlerindeki AGE kalıntılarının onarım mekanizmaları henüz tanımlanmamıştır. Hidroimidazolon AGE'ler yavaş olmakla birlikte geri dönüşümlüdür; yarılanma ömürleri 12-69 gün kadardır. Orta büyüklükte olan moleküllerde AGE kalıntı oranı çok yüksek değildir (Rabbani ve Thornalley 2012, pp. 293-304). Öncül RCO konsantrasyonları azaldığı takdirde, uzun-ömürlü protein moleküllerinin AGE içeriklerinde dahi azalma olasılığı vardır. Aldoz redüktaz, aldehid dehidrogenaz ve glikoksalaz gibi birçok enzim tarafından RCO detoksifiye edilebilmektedir (Busch ve ark. 2010).

Dokularda oluşan AGE-modifiye proteinler doku makrofajları tarafından alınır ve yıkılırlar. AGE-modifiye plazma proteinleri karaciğer tarafından sinusoidal Kupfer ve endotel hücreleri makrofaj scavenger reseptörler (MSR) aracılığı ile endositoz ile alınırlar. Hücresel proteoliz sonucunda oluşan serbest AGE ürünleri, kısmi proteoliz sonucunda oluşan AGE-modifiye peptidler ve albümin gibi bazı AGE-modifiye plazma proteinleri plazmada mevcut AGE bileşikleridir. Sağlıklı bireylerde, serbest AGE ürünleri çok küçük bir oranda ($\leq$ 6%) bulunmaktadır. MA < 500 Da ve çapları 1-3 nm olan serbest AGE ürünleri, glomerüllerden kolayca süzülürler. Plazmadaki serbest AGE konsantrasyon artışı, GFR'deki azalmayı gösteren bağımsız bir parametredir (Busch ve ark. 2010). Serbest AGE ürünlerinin kendilerinin herhangi bir toksik etkilerinin olup olmadığı bilinmemektedir; bununla birlikte ECM veya hücresel proteinlere kovalent bağlanarak dokular üzerinde zararlı etkilerini gösterebilmektedir. Glomerüller tarafından süzülen AGE'ler ile modifiye peptid ve proteinler proksimal tübülüs

hücreleri tarafından reabsorbe edildikten sonra katabolize edilmektedir. Şekil 2.12'de AGE bileşiklerinin metabolizmaları görülmektedir. Besin maddelerinden gelen AGE katkısı tartışmalıdır. Özellikle sakkarid içeriği yüksek olan ve termal işlem görmüş birçok besin maddesi AGE'lerce zengindir. Besinlerdeki AGE kalıntıları, genellikle biyoyararlılıkları az olan, yüksek düzeyde hasarlı ve sindirilmeleri zor olan proteinlerde bulunurlar (Rabbani ve Thornalley 2012, pp. 293-304).



Şekil 2.12: AGE'lerin metabolizmaları; turnover ve çeşitli vücut kompartmanlarındaki konsantrasyonlarını etkileyen faktörler (Kanková, 2008)

Deneysel ve klinik üremi çalışmalarında böbrek yetmezliğinde AGE metabolizmasındaki en önemli değişimin, serbest AGE ürünlerinin plazmadaki belirgin birikimi olduğu gösterilmiştir. Serbest AGE ürünlerinin ölçümleri yapılabildiğinde böbrek yetmezliği tedavisinin bu parametrenin izlenmesi ile düzenlenmesinin klinik yarar sağlayacağı öngörülmektedir. İdrardaki serbest AGE ürünleri besinlerle alınan AGE modifiye proteinlerden kaynaklanan serbest AGE ürünleri de dahil olmak üzere vücudun tüm AGE maruziyetini yansıtır. Ancak, bu değerlendirmenin yapılabilmesi için rezidüel renal fonksiyon ve klirens göz önünde bulundurularak düzeltme yapılması gerekmektedir (Rabbani ve Thornalley 2012, pp. 293-304).

2.3.1.2.3. AGE-Reseptörleri (RAGE)

Fizyolojik koşullarda RAGE ekspresyonu endotel hücreleri, damar düz kas hücreleri, periferik kanda mononükleer hücreler, makrofajlar, nöral hücreler, akciğerler ve iskelet kaslarında saptanmıştır. İlk olarak endotel hücre yüzeyinde AGE'lere özgü reseptör olarak tanımlanan RAGE'ler, hiperglisemi, DM, böbrek yetmezliği ve enflamasyon gibi AGE'lerin hızlı oluşum ve birikimi ile karakterize koşullar ile ilişkilendirilmiştir. Bugün ise, RAGE immünoglobülin süper ailesinin bir multiligand reseptörü olarak da tanınmaktadır; AGE'ler dışında, Amiloid Beta Peptid (Aβ) ve β-tabakalı fibriller, S100 proteinleri, HMGB1 proteini (high mobility group box 1 protein) ve Mac-1 gibi çeşitli ligandlar tarafından RAGE'lerin aktif hale getirilebildiği bilinmektedir (Busch ve ark. 2010).

Hücre membranında bulunan RAGE'ler oligomerik yapıda olup AGE-R1 (OST-48, p60), AGE-R2 (80KH fosfoprotein), AGE-R3 (Galektin-3) proteinlerini ve makrofaj çöpçü reseptörleri olan SCR-II ve CD-36 proteinlerini içermektedir. Kaveolince zengin membran bölgelerine lokalize, iyi korunmuş bu reseptör kompleksi, modifiye protein moleküllerinin bağlanması, alınması ve yıkılmasından sorumlu olup AGE ile ilişkili hasarın önlenmesini sağlarlar. İnsan mesangial hücrelerinde AGE-R3'ün hem AGE-R1 hem de AGE-R2 ile etkileşime girdiği gösterilmiştir. AGE-R1, AGE'lerin hücre içi ve transmembran transportunda yer alan özgün tip 1 transmembran reseptör proteinidir. Son zamanlarda mesangial hücrelerde AGE-R1'in aktif olarak AGE turnover'ine katkıda bulunduğu ve AGE-RAGE ile tetiklenen renal hasara yol açan proenflamatuvar sinyal iletisini önlediği gösterilmiştir. Mesangial hücrelerde AGE-R1'in aşırı ekspresyonu, AGE ile indüklenen MAPK1,2 fosforilasyonunu ve NF- κB aktivitesini inhibe etmekte ve AGE-aracılı oksidatif stres-bağımlı sinyal iletisini azaltmaktadır. Bir membran proteini olan AGE-R2, protein kinaz substratı olan 80K-H homologu olarak tanımlanmıştır; AGE'ler ile doğrudan etkileşim halinde olmamakla birlikte, AGE-R3 ile asosiye olarak reseptör kompleksinin stabilizasyonunda yer almaktadır. Bir protein kinaz substratı olan AGE-R2, AGE ile etkileşim sonucunda fosforile edilme özelliği kazanarak reseptör aracılı sinyal iletiminde rol oynar. AGE-R3 karbonhidrat bağlayıcı bir proteindir ve geniş bir spektrum içinde AGE'lere yüksek afinite gösterir; yaygın olarak hücre içine lokalizedir ve aynı zamanda, hücre dışına da salgılanır. AGE-R3, ekspresyonunu AGE'lere maruz kaldıktan sonra arttırma yeteneğine sahiptir ve bu artış

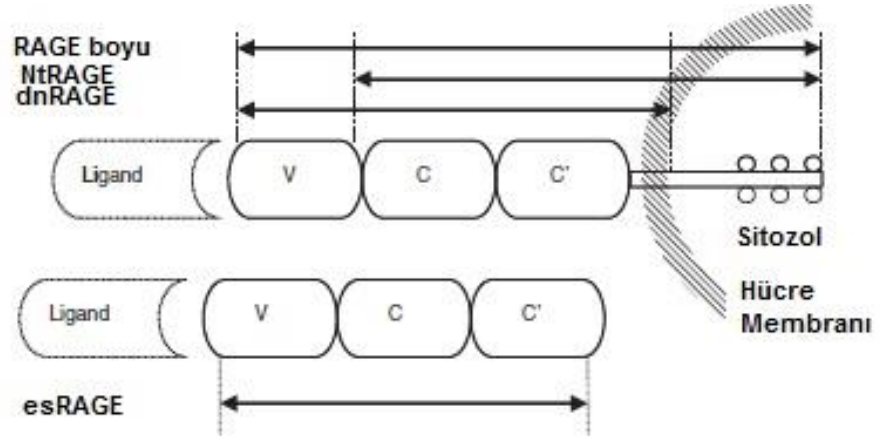
ile orantılı olarak hücre membranında yer alır. AGE-R3 proteininin membrana lokalize bir domeni olmadığı için, R1 ve R2 komponentlerinin bir araya getirilerek kompleksin oluşturulmasında krıtik rol oynadığı düşünülmektedir. Mesangial hücre kültür çalışmalarında glukozun normal konsantrasyonda bulunduğu koşullarda AGE-R3'ün saptanamadığı; yüksek glukozlu ortamda veya uzun süreli AGE maruziyeti sonucunda AGE-R3 ekspresyonunun uyarıldığı veya önemli ölçüde artmış olduğu saptanmıştır. AGE-R3 bileşeninin AGE'leri bağlama yeteneği dışında, mRNA molekülünü kesip yapıştırma aktivitesi, hücre döngüsünü kontrol edici, hücre adhezyonunu düzenleyici ve enflamasyonu modüle edici fonksiyonları da dahil olmak üzere çok çeşitli fonksiyonları vardır (Busch ve ark. 2010).

İnsan böbreğinde podositlerde fizyolojik koşullarda RAGE ekspresyonunun düşük düzeyde olduğu; DN'de podositlerdeki ekspresyonun belirgin bir şekilde arttığı gösterilmiştir. Mezangial veya renal tübüler hücrelerde, hastalık durumlarında bile RAGE ekspresyonunun görülmediği açıklanmıştır. Böbrek endotel hücrelerinde RAGE eksprese edildiğini ve bu ekspresyonun renal vasküler hasarda rol oynadığına dair kanıtlar vardır (Busch ve ark. 2010).

Son bilgilere göre in vivo koşullarda AGE-modifiye proteinlerin spesifik hücre yüzey reseptörlerine bağlanmaları daha az muhtemel görünmektedir. AGE'lerin reseptör aracılı etkilerini tartışmalı konuma sokan araştırma bulgularından birincisi, AGE reseptörleri ile etkileşime giren modifiye proteinlerin AGE içeriklerinin (molekül başına yaklaşık 30-40 AGE kalıntısı) suprafizyolojik olarak nitelenebilecek ölçüde yüksek olmasıdır. Fizyolojik koşullarda AGE'ler ile modifikasyon minimal düzeydedir. AGE'ler ile minimal ölçüde modifiye proteinlerin (molekül başına yaklaşık 1-2 AGE kalıntısı) reseptörler ile etkileşimleri oldukça zayıftır. AGE reseptörünün ligandı ile etkileşime girme yeteneği, genellikle, modifikasyonun kimyasal yapısı yerine modifikasyonun derecesi ile ilişkilidir. Yüksek oranda glikasyona uğramış proteinlerin bağlanmalarında protein agregasyonunun önemli olduğu düşünülmektedir. CML-albumin modifikasyonunda kullanılan kimyasal reaktiflerin yüksek konsantrasyonlarda olması nedeni ile, AGE oluşumundan bağımsız olarak proteinlerin denatüre ve agrege olduğu ortaya konulmuştur. İkinci olarak, yüksek oranda glike olmuş albuminin hepatik çöpçü reseptörleri aracılığı ile dolaşımdan temizlendiği saptanmış ve bu işlemde AGE reseptörlerinin rol oynadığı öne sürülmüştür. Bu bulgu da, suprafizyolojik düzeyde

modifikasyon varlığında elde edilmiştir. Fizyolojik düzeyde modifiye albümin molekülünün karaciğer tarafından alınmadığı veya yarı ömründe bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. AGE'ler ile modifiye plazma protein molekülleri hücresel proteolize uğramakta, serbestleşen AGE ürünleri böbrekler yolu ile atılmaktadır. Üçüncü olarak, AGE ve AGE reseptörlerinin in vivo birlikte bulunduklarını gösteren immünohistokimyasal bulgular, AGE reseptörlerinin non-glike protein ligandları tarafından aktivasyonu sonucunda antiglikasyon savunmanın down-regülasyonu ile açıklanmaktadır. SDBY'de plazmada konsantrasyonu artan ve bir fizyolojik RAGE agonisti olan S100A12, RAGE'lere bağlanmakta ve metilglioksal ve glioksal detoksifikasyonlarında kritik bir enzim olan glioksalaz-1 ekspresyonunun azalmasına neden olmaktadır; bu durumda lokal RCO konsantrasyonu ve AGE oluşumu artmaktadır. Hemodiyaliz ve periton diyalizi hastalarında, plazmadaki S100A12 konsantrasyonu yaklaşık iki katına çıktığı saptanmıştır. Adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu indükleyen, monosit / makrofaj göçüne ve aktivasyonuna aracılık eden S100A12 konsantrasyonunun SDBY hastalarında karotis intimal media kalınlığı ve ateroskleroz riski ile bağımsız ilişkili olduğu saptanmıştır (Thornalley ve Rabbani 2009).

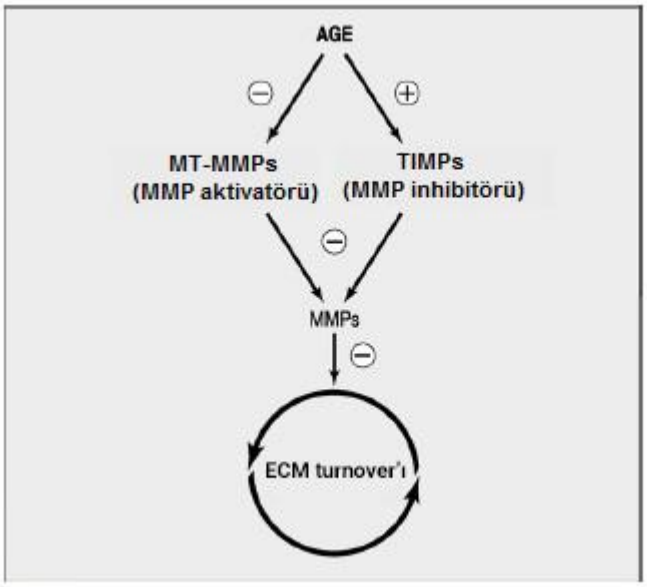
Tamamı hücre yerleşimli reseptöre ek olarak, farklı biyolojik özelliklere sahip kesik proteinleri kodlayan farklı, kesik RAGE mRNA varyantları tespit edilmiştir. RAGE'nin majör izoformları, membran boyunca devam eden tam uzunluktaki RAGE molekülü, sitozolik domeni eksik dominant-negatif RAGE (dnRAGE) ve N-kesik RAGE'dir (NtRAGE). dnRAGE ekstrasellüler ligandları bağlar fakat intrinsik etki göstermez; NtRAGE ise ligandları bağlayamaz. Ayrıca, RAGE'lerin kan içinde dolaşan, çözünür formları (sRAGE) mevcuttur. Reseptörün bu formlarında transmembran domen eksiktir; kesik bir varyant olan endojen salgısal RAGE (esRAGE) ile metalloproteinazlar varlığında bölünmüş ve dolaşıma atılmış (sRAGE) formlarının her ikisinin de, ligand bağlayıcı özellikleri ile RAGE'lerin NF-κB aracılı hücre içi yolların aktivasyonunu önlediği gösterilmiştir. Yapısal farklılıklarına rağmen AGE'ler sadece RAGE'lerin V domenlerine (vRAGE) bağlanırlar (Busch ve ark. 2010). (Şekil 2.13)



Şekil 2.13: AGE reseptör (RAGE) yapısı ve başlıca varyantları (Busch ve ark. 2010)

2.3.1.2.4. AGE'ler ile modifiye proteinler ve serbest AGE ürünlerinin fizyopatolojik önemleri

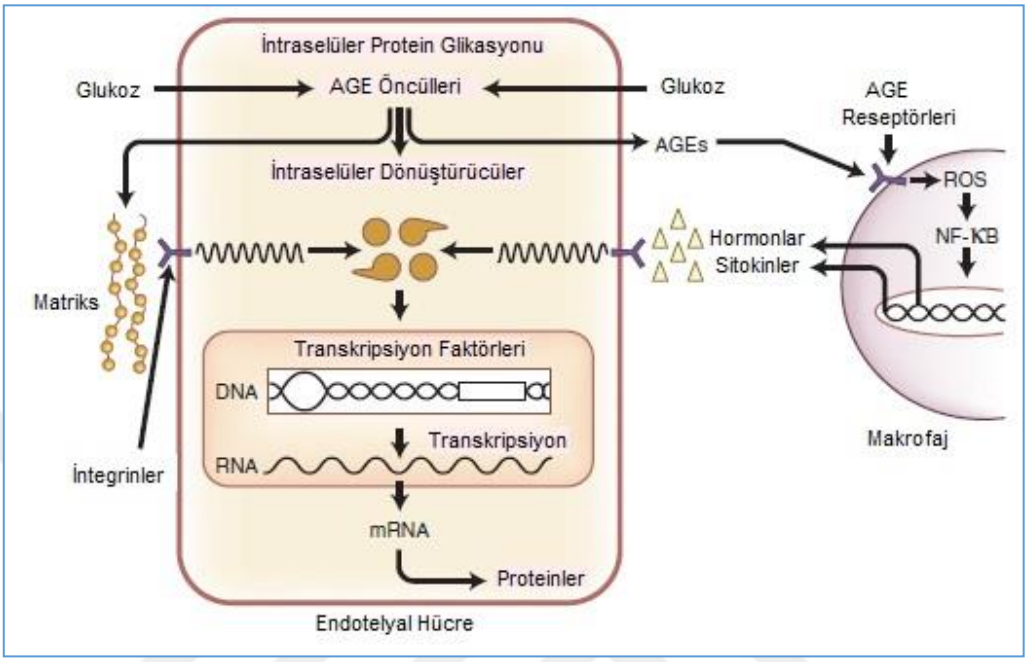
Fizyolojik koşullar altında, proteinler üzerinde az miktarlarda üretilen AGE'lerin birikimi yaşlanma ile artmaktadır. Diyabette, AGE oluşum ve birikimi hiperglisemi derecesine, hiperglisemik kalınan süreye ve proteinin yarı ömrüne bağlı olarak değişmektedir. Kronik hiperglisemi varlığında AGE oluşumunda belirgin bir artış görülür. AGE'ler özellikle damarlanması çok olan dokularda, hücre dışı ve hücre içi kompartmanlarda yer alan proteinler üzerinde oluşmaktadır. In vivo koşullarda kantitatif bakımdan en önemli AGE bileşiği olan metilglioksal-türevi hidroimidazolon (MG-H1) ile modifiye protein oranı genellikle %5 ten daha az olduğundan fizyolojik fonksiyon pek etkilenmemektedir (Rabbani ve ark. 2012). Proteinlerin fonksiyonel domenlerindeki modifikasyonunun fizyolojik sonuçları önemlidir. Ayrıca, uzun yarı-ömürlü proteinler üzerinde oluşan ve geri dönüşümlü olmayan AGE ürünlerinin zaman içinde artan birikimleri dokulara zarar vermektedir. Kollajen ve elastin gibi ECM proteinlerinde ileri glikasyon sürecinde molekül içi veya moleküller arası geri dönüşümsüz çapraz bağlar oluşmakta, ECM'in yapısı ve bütünlüğü bozulmaktadır. AGE'lerle modifikasyona bağlı olarak ECM'in sertleşmesi artmakta ve matriks metalloproteinazları (MMP) tarafından enzimatik hidrolizleri ve turnoverleri azaltmaktadır (Kanwar ve ark. 2011). (Şekil 2.14)



Şekil 2.14: AGE'lerin matriks metalloproteinaz aktiviteleri üzerine etkileri
(Daroux ve ark. 2010).

ECM proteinleri üzerinde oluşan AGE'ler matriks yapısını ve bütünlüğünü bozmaktadır (Kanwar ve ark. 2011). ECM üzerinde AGE oluşumu, sadece matriks komponentleri arasındaki etkileşimleri değil matiks-hücre ilişkilerini de etkilemektedir (Sun ve ark. 2010). Örneğin vasküler tip IV kollajen molekülünün integrin bağlayıcı bölgelerinde AGE'lerle modifikasyona bağlı olarak endotel hücre adhezyonu azalmakta, endotel hücreler koparak ayrılmakta ve sub-endotelin açığa çıkması sonucunda tromboz riski artmaktadır (Kanková, 2008); tip IV kollajen ve laminin proteinlerinin negatif yüklü proteoglikanlara bağlanmaları azalmakta ve kapiller damar geçirgenliği artmaktadır (Yamagishi ve Matsui 2010). AGE'ler ile modifikasyon LDL'nin reseptörlerine bağlanmasını etkilmemekte fakat ECM proteoglikanlarına bağlanmasını arttırmaktadır. Hücre dışı ortamda LDL'nin bulunma süresinin uzamasına neden olan bu nonoksidatif modifikasyon proteinin oksidasyona uğrama olasılığını ve aterojenisitesini arttırmaktadır. Arter duvarına afinitesi apolipoprotein B100'den yüksek olan küçük, yoğun aterojenik LDL oluşmaktadır (Thornalley ve Rabbani, 2009). Endotel hücrelerinde hücre içi proteinlerinin AGE'ler ile modifikasyon sonucunda fonksiyonları bozulabilmektedir; örneğin mitokondriyel elektron transfer sistem komponentlerinden elektron kaçağı olmakta, ROS oluşumu ve oksidatif stres artmaktadır. AGE öncülleri olan RCO bileşikleri sinyal mekanizmaları aracılığı ile gen

transkripsiyonunu etkileyerek çeşitli protein moleküllerinin sentezlerini etkilemektedir (Busch ve ark. 2010). (Şekil 2.15)



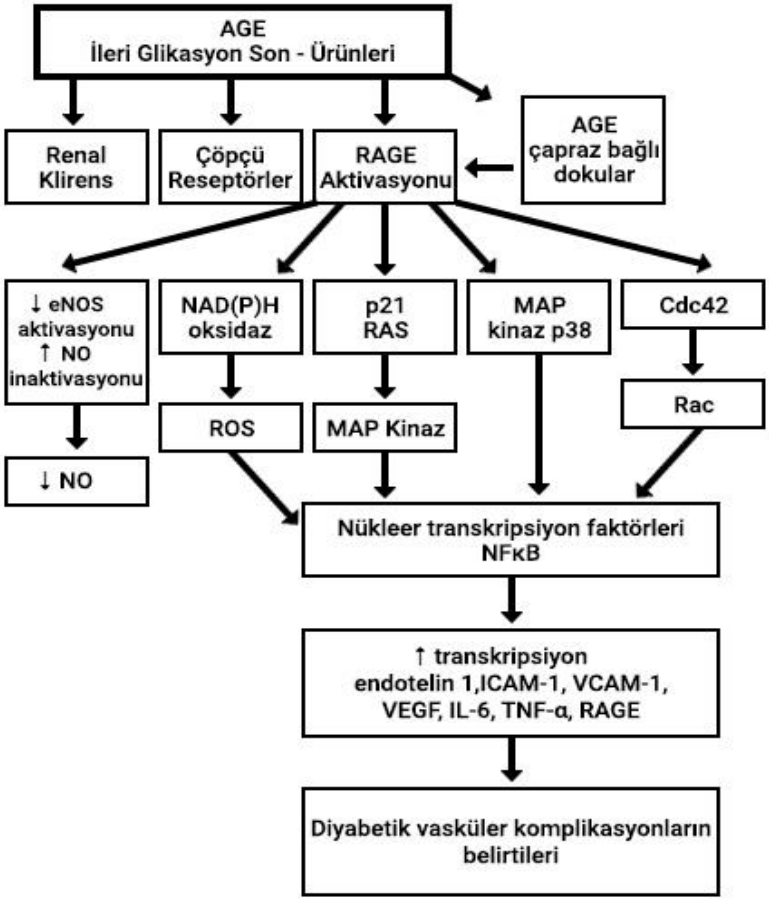
Şekil 2.15: İntraselüler dikarbonil bileşiklerinden AGE'lerin oluşum yolları
(Brownlee ve ark. 2016 pp. 1484-1581)

Hücre dışına çıkabilen AGE öncüllerinden bu ortamda yer alan proteinler üzerinde AGE'ler oluşabilmektedir. Plazma proteinleri üzerinde oluşan AGE'ler komşu hücrelerdeki örneğin makrofajlardaki AGE reseptörlerine bağlanmaktadır. AGE-RAGE etkileşimi, NADPH oksidaz aktivasyonu ve ROS oluşumuna yol açarak bir proenflamatuvar transkripsiyon faktörü olan NF-κB'nin sürekli aktivasyonunu sağlamaktadır. RAGE genine ait promotör bölge NF-κB bağlayıcı unsurlar içerdiğinden NF-κB aktivasyonu RAGE gen ekspresyonunu *up-regüle* etmektedir. TNF-α, NF-κB aktivasyonu yoluyla RAGE ekspresyonunu arttırmaktadır. AGE-RAGE etkileşimi çeşitli büyüme faktörleri ve TGF-β gibi sitokinlerin ekspresyonlarını düzenleyerek çeşitli ECM proteinlerinin sentezlerini kaçınılmaz biçimde etkilemektedir. Bu süreçler bir AGE inhibitörü ve AGE çapraz-bağ kırıcısı olan aminoguanidin ile veya RAGE blokajı ile kısmen tersine çevrilebilmektedir (Busch ve ark. 2010).

Hücre içi veya hücre dışı AGE'lerin yüksek konsantrasyonlarda bulunmaları durumunda NO konsantrasyonu azalmaktadır. Endotel hücrelerinde NO sentezinden

sorumlu eNOS enziminin kofaktörü tetrahidrobiopterin (BH_4) ROS'ların arttığı hiperglisemik koşullarda azalmaktadır. Ayrıca NO konsantrasyonu AGE'ler tarafından tutulum sonucunda da azalmaktadır. ROS'a benzer şekilde NO da PKC ve MAPK aktivitelerini modüle etmekte, NF-**κ**B ve aktivatör protein-1 (AP-1) aktive olmaktadır. Bu etkiler sonucunda ECM proteinlerinin ekspresyonlarında artma olmaktadır (Kanwar ve ark 2011).

AGE'lerin hangi biyokimyasal mekanizmalarla diyabetik vasküler komplikasyonlarda yer aldığı Şekil 2.16'da görülmektedir. AGE'ler etkilerini reseptör bağımsız ve reseptör bağımlı gösterebildikleri gibi, hücre içinde ve hücre dışında da gösterebilmektedirler.

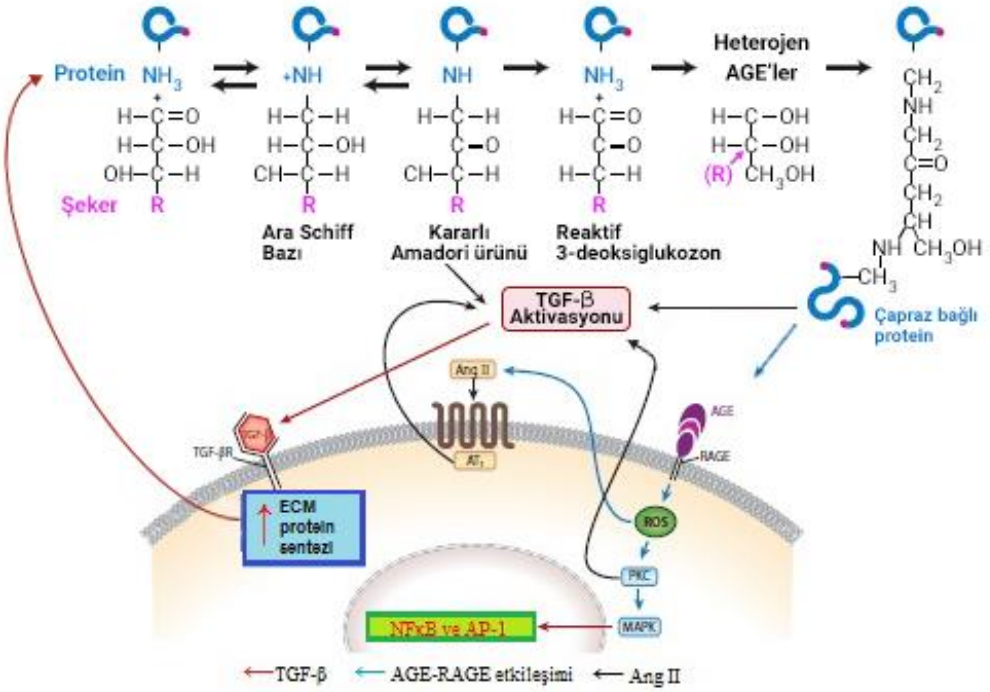


Şekil 2.16: AGE'lerin etkileri (Goh ve Cooper 2008)

2.3.1.2.5. İleri Glikasyon ve Diyabetik Nefropati

AGE'ler, kronik böbrek hastalığında (KBH) böbrekte görülen yapısal değişiklikler ile ilişkilidir ve hastalığın ilerlemesine paralel olarak dokudaki konsantrasyonlarının arttığı saptanmıştır. Bazal membran, mesangial ve endotel hücreler, podositler ve tübülüs hücreleri de dahil olmak üzere, hemen hemen tüm renal yapılarda AGE birikimine yatkınlık saptanmıştır (Singh ve ark. 2001).

Diyabette, AGE'lerin oluşum ve birikimleri ile nefropati arasında patojenik ilişki olduğu öne sürülmüştür. RAGE'lerin damar hasarının yanı sıra, podosit aktivasyonunu uyardığı ve glomerülosklerozu hızlandırdığı gösterilmiştir (Kanková, 2008). Böbrek endotel hücrelerinde RAGE eksprese edildiği ve ekspresyonun renal vasküler hasarda rol oynadığı gösterilmiştir. İntrarenal arter düz kas hücrelerindeki glikoksidasyon ile kompleman aktivasyonu arasındaki etkileşim hasara yol açarak DN'nin ilerlemesine yol açmaktadır (Busch ve ark. 2010). Böbrek hastalıklarının ilerlemesi ile protein turnover'inde belirginleşen yavaşlama ve oksidatif stresdeki artış, AGE oluşumunu ve birikimini daha da arttırmaktadır. Ortaya çıkan kısır döngü ileri glikasyonu arttırmakta ve hastalığın ilerlemesine neden olmaktadır (Singh ve ark. 2001). DN'li hasta böbrek biyopsilerinde, başlıca renal bazal membranda tespit edilmiş olan AGE-birikiminin podositlerdeki RAGE artışında rol oynadığı gösterilmiştir. Podositlerde fizyolojik koşullarda düşük düzeylerde olan RAGE ekspresyonunun DN'de belirgin bir şekilde arttığı gösterilmiştir. Sistemik dolaşımda bulunan AGE'lerin böbrek hücrelerinde RAGE'ler ile etkileşim sonucunda, ROS oluşumunu arttırdığı ve PKC, MAPK, NF-κB aktivasyonlarına neden oldukları bilinmektedir. AGE'lerin insan damar düz kas hücrelerinde, RAGE'ler aracılığı ile kimaz ekspresyonunu indükleyerek kimaz bağımlı anjiyotensin II oluşumunu arttırdığı saptanmıştır (Kanwar ve ark. 2011). Kimaz, diyabetik böbrekte ve damar hastalıklarında sentezi artan, anjiyotensin II üreten alternatif bir enzimdir. AGElerin, tübülüs hücrelerinde kollajen sentezini uyararak ECM'in genişlemesine neden olan TGF-β'nın ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir. AGE'ler ayrıca, ECM'in yapısını ve bütünlüğünü bozmaktadır (Kanwar ve ark. 2011), (Şekil 2.17).



Şekil 2.17: AGE oluşumu ve uyarılan hücre içi olayları (Kanwar ve ark. 2011).

AGE-modifiye proteinlerin infüzyon veya besinler yolu ile alınması sonucunda sistemik dolaşıma giren AGE'lerin böbrekler tarafından tutulduğu ve diyabet hasarına benzer şekilde hasara yol açtığı çeşitli hayvan çalışmalarında gösterilmiştir. AGE'lerin DN dışındaki bazı böbrek hastalıklarında da biriktikleri saptanmıştır (Busch ve ark. 2010).

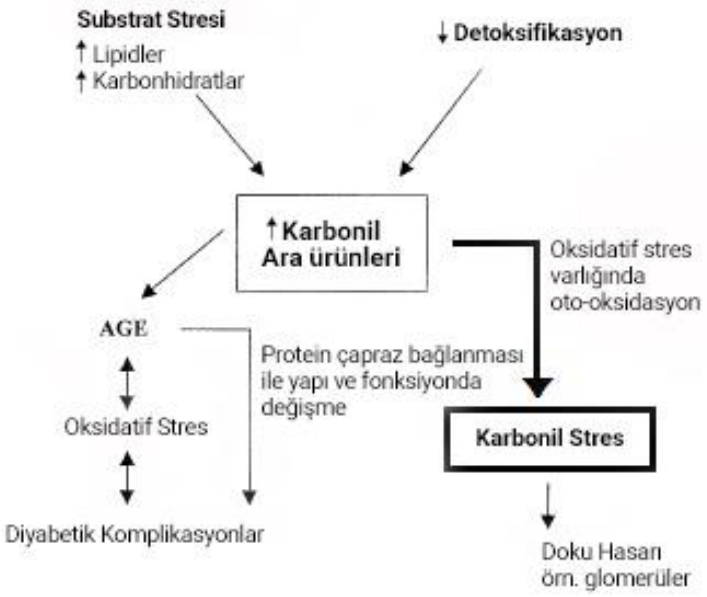
Çeşitli deneysel DN çalışmalarında glomerüloskleroz gelişiminden önce podositlerde hasarı oluştuğu gösterilmiştir (Ruggenenti ve ark. 2010). Bu nedenle AGE-RAGE etkileşimi podositlerde çalışılmıştır. Podositlerde AGE-modifiye ve CML-modifiye proteinlerin RAGE aktivasyonu sonucunda ROS oluşumunu arttırarak MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir. MCP-1 gen transkripsiyonunun düzenlenmesinde NF-κB ve SP1 moleküllerinin yer aldıkları saptanmıştır (Gu ve ark. 2007). AGE'ler ile indüklenen MCP-1 ekspresyonunun, pravastatin tarafından zayıflatılabildiği ve bu etkinin MAPK aktivasyonu, Sp1 ve NF-κB translokasyonunun engellenmesine bağlı olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular statinlerin, DN'de podosit aktivasyonu ve hasarının

önlenmesinde yeni bir terapötik ajan olarak değerlendirilebileceklerini ortaya koymaktadır (Busch ve ark. 2010).

AGE'ler podositlere aktif transport ile alınmaktadır. AGE-modifiye sığır serum albümini (AGE-BSA) ile inkübasyonun, podositlerde p^{27Kip1} mRNA ve protein ekspresyonunu indüklediği, hücre döngüsünü durdurduğu, hipertrofiye neden olduğu ve apoptotik hücre yerine nekrotik hücre sayısında artışa neden olduğu açıklanmıştır (Busch ve ark. 2010). Xu ve arkadaşları, yüksek konsantrasyonda glukozlu kültür ortamında, podositlerin p^{27Kip1} mRNA ve protein ekspresyonunda artış gözlemlemişler ve artışın podosit hipertrofisi ile ilişkili bulunduğunu açıklamışlardır. Bu bulguların bir anjiyotensin II reseptör blokeri ile azaltılabildiği saptanmış ve yüksek konsantrasyonda glukozun neden olduğu bazı etkilere anjiyotensin II'nin aracılık edebileceği öne sürülmüştür (Xu ve ark. 2005). Anjiyotensin II'nin doğrudan p^{27Kip1}'i indükleyebileceği öne sürülmüştür. Başka bir çalışmada podositlerin anjiyotensin (AT) tip 1 ve tip 2 reseptörlerini eksprese ettiği ve AGE'ler ile inkübasyonun AT tip 2 reseptörleri aracılığı ile RAGE ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Bu etkiler, NF-kB aktivasyonunu gerektirmektedir. Bu çalışma, podositlerde renin-anjiyotensin sistemi ile AGE / RAGE ekseni arasındaki etkileşimi ortaya koymaktadır. DN'de glomerüldeki anjiyotensin düzeyleri arttığından, bu etkileşimin DN gelişimi ile ilişkili podosit hasarı ve enflamasyonda rolü olduğu düşünülmüştür (Busch ve ark. 2010).

Daha ileri çalışmalar, AGE-aracılı podosit apoptozunda FOXO 4 transkripsiyon faktörünün rolü olduğunu göstermektedir (Chuang ve ark. 2007). Podositlerde AGE-BSA tarafından baskılandığı gösterilen neuropilin-1 (NRP-1) sinir sisteminin gelişiminde ve angiogenezde önemli rol oynamaktadır (Bondeva ve ark. 2009). Bu baskılanma diyabetik db/db farede görüldüğü gibi DN hasta biyopsilerinde de saptanmıştır. AGE-BSA ile indüklenen NRP-1 baskılanması, α-aktin gibi hücre iskelet proteinlerinde köklü değişime neden olarak podosit göçünün azalmasına yol açmaktadır (Busch ve ark. 2010). Podosit göçündeki azalma podosit yapısı ve işlevi için zararlıdır. Podositlerin göç yeteneklerini kaybetmeleri sonucunda çıplak alanların oluştuğu glomerül bazal membranının Bowman kapsülüne yapışması ile fokal olarak glomerüloskleroz başlamaktadır (D'Agati ve ark. 2010). Özet olarak yapılan çalışmalar, podosit patolojisinde AGE-RAGE etkileşiminin DN gelişiminde önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır. AGE-RAGE aksının aktivasyonu lupus nefriti gibi diğer böbrek hastalıkları ile de ilişkilendirilmiştir (Busch ve ark. 2010).

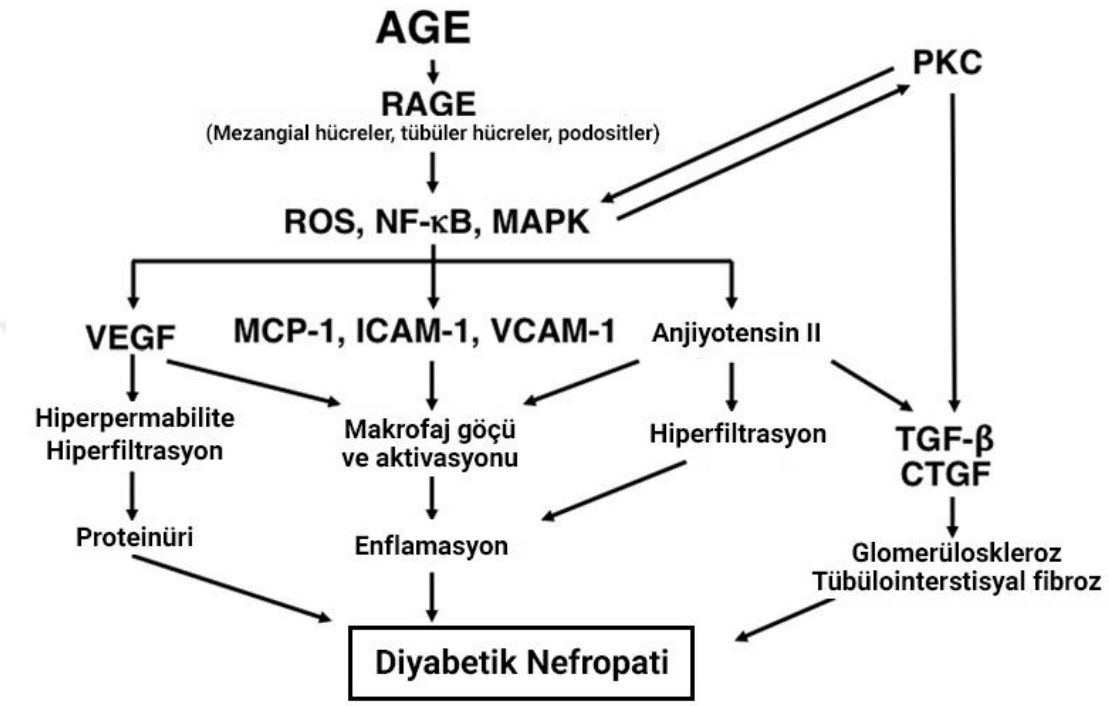
Deneysel akut böbrek yetmezliği modeli olan bilateral nefrektomide plazmada serbest AGE ürün konsantrasyonlarında 5-23 kat artış görülürken AGE'ler ile modifiye plazma protein konsantrasyonlarında artış görülmemiştir. Bu bulgular, serbest AGE ürünlerinin böbrekler tarafından temizlendiğini fakat glike proteinlerin temizlenmediğini ortaya koymaktadır (Thornalley ve Rabbani 2009). Fruktoz-lizin dokularda fruktozamin 3-fosfokinaz ile metabolize edildiği için konsantrasyonunda artış gözlenmemiştir. Serbest AGE ürünlerinin idrar ile atılımlarının klinik üremi, hafif kronik böbrek yetmezliği ve böbrek fonksiyonunda orta derecede azalma olan hastalarda değişmediği fakat plazma konsantrasyonlarının arttığı saptanmış; bu durum renal klirensdeki azalma ile açıklanmıştır (Kanková 2008). Serbest AGE ürünlerinin en yüksek düzeyleri SDBY hastalarında gözlenmiştir. Bu nedenle, serbest AGE ürünleri üremik toksinlerin bir sınıfı olarak kabul edilmektedir. Üremide serbest AGE ürünleri gibi, RCO bileşiklerinin de renal klirensleri azalmaktadır. Üremide ayrıca, RCO bileşiklerinin metabolik klirensleri (detoksifikasyon) azalmaktadır (Thornalley 2008) (Şekil 2.18).



Şekil 2.18: Karbonil ara ürünleri ve diyabet veya üremideki akıbetleri
(Singh ve ark. 2001).

AGE-RAGE aksının DN'de patofizyolojik rolü şekil 2.19'da görülmektedir. AGE-RAGE aksının aktivasyonona bağlı olarak active olur, ROS oluşumu artar, NADPH oksidaz, NF-κB, PKC ve MAPK; hedef genler TGF-β, CTGF (bağ dokusu

büyüme faktörü), Ang II, ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), VEGF (vascular endothelial growth factor) ve MCP-1 ve transkripsiyonları artar. Enflamasyon, glomerüloskleroz, tübülointerstisyel fibroz ve epitelyal-mezenkimal transdifferansiasyon olur (Rutledge ve ark. 2010).



Şekil 2.19: AGE-RAGE aksının diyabetik nefropatideki patofizyolojik rolü
(Yamagishi ve Matsui 2010)

2.3.1.2.6. Kronik Böbrek Hastalığında AGE'ler ve Ateroskleroz

Bu hastalıkta, ilk kardiyovasküler olay olasılığı sağlıklı popülasyona göre 2.5 kat daha yüksektir (Foley ve ark. 1998). SDBY'de, kardiyovasküler mortalite, total mortalitenin % 45'inden sorumludur. Hemodiyaliz ve böbrek nakli yapılan hastalar da dahil olmak üzere KBH'ın, farklı evrelerinde, sistemik dolaşımdaki AGE-konsantrasyonları sağlıklı kontrollere göre önemli ölçüde yüksektir. Sol ventrikül hipertrofisi KBH'de güçlü bir mortalite prediktörüdür. Serum CML ve imidazolon düzeyleri SDBY hastalarında sol ventrikül hipertrofisi için prediktör değer taşır. KBH'de, sigaranın AGE üzerine hiçbir etkisi bulunmamıştır. Aterojenez sürecinde anahtar fonksiyona sahip endotel disfonksiyonu ile endoteldeki AGE-birikimi arasındaki ilişkide RAGE'lerin yer aldığı düşünülmektedir (Ross 1999; Meerwaldt ve ark. 2009). KBH'de artmış total homosistein konsantrasyonu kardiyovasküler hastalık ile ilişkili bir başka göstergedir. SDBY hastalarında, oksidatif koşullarla oluşan

pentosidin ve CML gibi AGE'ler total homosistein ile pozitif korelasyon gösterirken, nonoksidatif koşullarda oluşan AGE bileşiği imidazolonun bu parametre ile korelasyonu saptanmamıştır (Busch ve ark. 2004). AGE ve total homosistein konsantrasyonları böbrek fonksiyonu ile ilişkilidir; bununla birlikte korelasyon varlığı her iki üründeki artışın oksidatif stres artışını yansıttığı kabul edilebilir. Ayrıca, serbest homosisteinin homosistine otooksidasyonu sırasında üretilen ROS glikooksidasyon ürünlerininin oluşumuna katkıda bulunabilir. Aterosklerotik plaklarda AGE'ler saptanmış ve hemodiyaliz hastalarında artan AGE düzeylerinin koroner kalsifikasyon ile ilgili olduğu bildirilmiştir. Tip IV kollajenin glikasyonu ve endotel hücre kaybı ile apolipoprotein B100 glikasyonu ve LDL'nin artmış aterojenisitesi protein glikasyonunu KBH'de kardiyovasküler risk artışı ile ilişkilendiren örneklerdir (Busch ve ark. 2010).

AGE artışı ile kardiyovasküler olayların ilişkilendirilmesi konusunda klinik bulgu çok azdır; prospektif veriler de nadirdir. Kronik kalp yetmezliği olan 141 hastada, pentosidin konsantrasyonu, kardiyak ölüm ve tekrar hastaneye yatış oranları ile bağımsız ilişkili bir risk faktörüdür (Koyama ve ark 2007). 232 KBH hastasının katıldığı prospektif bir çalışmada, serum CML, pentosidin ve imidazolon düzeyleri, bağımsız kardiyovasküler risk faktörü olarak değerlendirilmemişlerdir (Busch ve ark. 2004). SDBY, DM ve CRP artışı, kardiyovasküler hastalık risk faktörleri olarak belirlenmiştir. Wagner ve ark. "uzun süreden beri hemodiyaliz tedavisi alan ve 35'i diyabetli olan 154 hastada serumda CML, median değer olan 23.8 ng/mg protein üzerinde olan hastalarda mortalitenin yüksek" olduğunu açıklamışlardır (Wagner ve ark. 2006). Schwedler ve ark. hemodiyaliz hastalarında yaptıkları çalışmada serumda AGE bileşiklerinden kaynaklanan total fluoresans ve CML artışının kardiyovasküler mortalite üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını saptamışlardır (Schwedler ve ark 2002). Ayrıca, yüksek AGE düzeylerinin yaşam süresinin uzaması ile de ilişkili olduğu saptanmıştır, ki bu olasılıkla beslenme durumu ile ilgilidir. Basta ve ark. KBH hastalarında plazma sRAGE konsantrasyonlarını anlamlı derecede yüksek bulmuşlar (Basta ve ark. 2010); GFR ile sRAGE ve aynı zamanda intima-media kalınlığı arasında anlamlı ters bir ilişki saptamışlardır. Bu bulgular, sRAGE'lerin AGE bileşiklerini uzaklaştırıcı ve damar koruyucu rol oynadıkları hipotezi ile uyumludur (Busch ve ark. 2010).

Diyabet ve KBH'li hastalarda, AGE oluşum ve birikimine yatkınlık vardır. IDNT (Diyabetik Nefropati Irbesartan Çalışması) kapsamındaki 450 hastada yapılan post-hoc analizde, tip 2 diyabetin bir sonucu olarak DN geliştiği saptanmıştır (Busch ve ark. 2010).

Serum CML konsantrasyonunun bağımsız bir kardiyovasküler veya renal risk faktörü olmadığı tesbit edilmiş, önceden mevcut kardiyovasküler olaylar, yaş ve albüminüri kardiyovasküler risk artışı ile ilişkili bulunmuştur; bu bulgular IDNT verilerini doğrulamaktadır. Bu çalışmada GFR yaklaşık %50 oranında azalmasına rağmen, serum CML düzeyleri referans aralığının üstünde anlamlı bir artış göstermemiştir. Wagner ve ark. GFR<80 mL/dk olan hastaların CML düzeylerinde bir artış bulmuşlardır (Wagner ve ark. 2001). Kullanılan yöntemler arasındaki özgüllük ve/veya çapraz reaktivite özelliklerindeki farklılıklar nedeni ile çalışmalarda saptanmış olan CML değerleri geniş bir spektrumda yer almaktadır. Diyabette CML yapılı AGE bileşikleri yerine non-CML AGE bileşiklerinin mikro-ve makrovasküler komplikasyon patogenezinde daha çok rol oynayabilecekleri öne sürülmüştür (Busch ve ark. 2010).

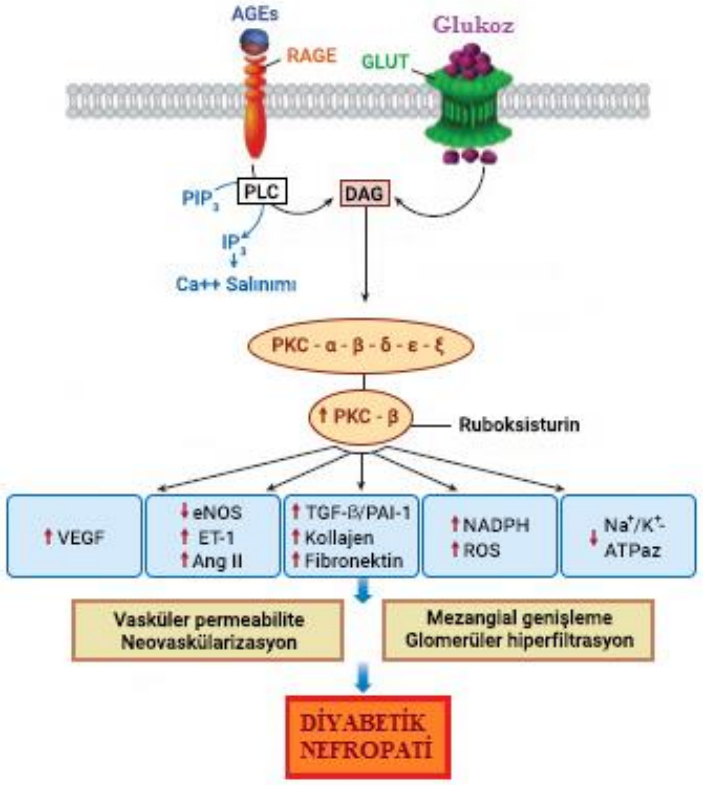
IDNT kapsamındaki 218 hastada yapılan çalışmada, DN'e bağlı üçüncü evre KBH'de pentosidinin kardiyovasküler bir risk faktörü olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu çalışma, diyabet süresinin uzunluğunun ve yüksek LDL konsantrasyonunun kardiyovasküler olaylar üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Buna ek olarak, malnütrisyon ve enflamasyonda da pentosidin düzeylerinin artmış olduğu gözlendiğinden plazmada pentosidin yüksekliğinin mortalite için iyi bir prediktör olmadığı sonucuna varılmıştır. Bahsedilen çalışmada proteindeki AGE kalıntıları ölçülmüştür. Serbest AGE ürünlerinin belirlenmesi için yapılan karşılaştırılabilir çalışmalar oldukça nadirdir ve böbrek hastalarının kardiyovasküler riskini belirlemede AGE'lerin serum veya plazma konsantrasyonlarının uygun gösterge olup olmadıkları tartışmalıdır. Serbest AGE ürünleri de dahil olmak üzere, serum / plazmada bulunan tüm AGE'lerin, AGE birikiminin ve AGE modifiye protein ve lipidlerin neden olduğu hücre içi ve hücre dışı etkiler ile ilişkileri zayıftır. AGE'lerin serum konsantrasyonları besinlere bağlı olarak dalgalanma gösterir. Öte yandan dokudaki birikim AGE oluşumunun uzun süreli göstergesidir. Serumdaki AGE'ler, yaşa ve diyabete bağlı olarak değişen dokudaki AGE birikimini yeterli derecede yansıtmaz. Deri biyopsi örneklerinde analiz veya doğrudan deride yapılan fluoresans ölçümü ile AGE analizi önem kazanmıştır. Deri kollajenindeki glikasyon ve CML konsantrasyonu, Tip 1 DM hastalarında 10 yıllık diyabetik retinopati ve DN seyrini gösteren prediktörlerdir. Hemodiyaliz hastalarında deride ölçülen fluoresans mortalite prediktörüdür. Bu çalışmalar AGE'lerin dokulardaki düzeylerinin kronik böbrek

hastalarında kardiyovasküler veya renal durum hakkında daha iyi bir prediktör olduğunu göstermektedir (Busch ve ark. 2010).

2.3.1.3. Protein Kinaz C (PKC) Aktivasyonu

PKC, çok çeşitli yollarla aktive edilir. Öncelikle, hücre içinde glukozdan glikoliz ile gliseraldehid 3-fosfat ve dihidroksi aseton fosfat (DHAP) oluşturulur. DHAP'den indirgenme ile oluşturulan gliserol 3- fosfat ikinci haberci bir sinyal molekülü olan diaçilgliserol (DAG) öncülüdür. DAG, PKC enziminin bazı izoformlarının aktivasyonundan sorumludur. Yüksek konsantrasyonda glukoz ile inkübe edilen böbrek mesangial hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli hücre kültür çalışmalarında DAG konsantrasyonu ve PKC aktivitesi arasında ilişki olduğu gözlenmiştir (Kanwar ve ark. 2011).

Poliol yolunun aktivasyonu veya AGE-RAGE etkileşimine bağlı olarak da PKC aktivasyonu olabilmektedir. AGE-RAGE etkileşimi, membrana bağlı fosfolipaz C (PLC) aktivitesini modüle ederek DAG artışı ve sitozolik Ca^{2+} artışına yol açar (Inoguchi ve ark 2003) (Şekil 2.20).



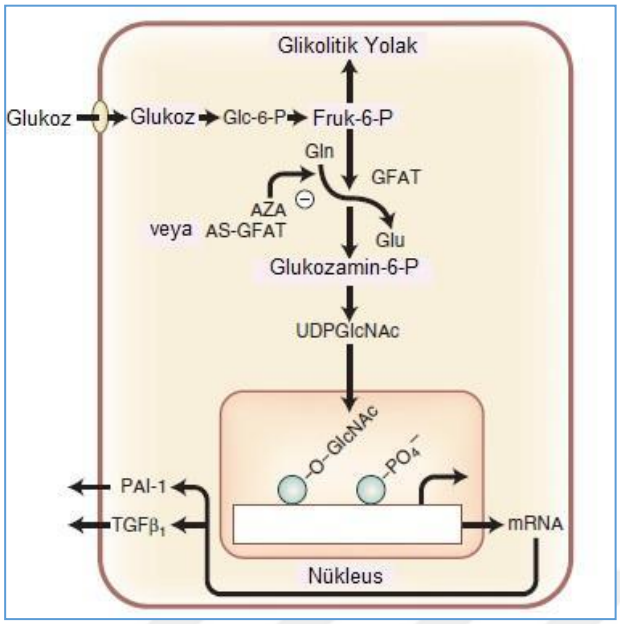
Şekil 2.20: AGE-RAGE etkileşimi ve GLUT aracılığı ile hücre içine aşırı miktarda glukoz girişi ile gelişen olaylar (Kanwar ve ark. 2011).

Sinyal transdüksiyon mekanizmalarında rol alan kinazlar arasında PKC, DN patogenezindeki en önemli unsur gibi görünmektedir. Birçok PKC izoformunun (PKC-α, -β, -δ, -ε, ve -ξ) böbrekte eksprese edildiği diyabetik sıçanlarda saptanmış ve aktivasyona uğradığı glomerüler hücre kültür çalışmalarında gösterilmiştir.

PKC aktivasyonuna bağlı olarak eNOS ekspresyonunda ve NO oluşumunda azalma; eNOS (endotelyal nitrik oksit sentaz) *knock-out* farelerde VEGF ve endotelin-1 *up-regülasyonu* gösterilmiştir. PKC aktivasyonu sonucunda ayrıca anjiyotensin II'de artma; TGF-β1 ve PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) ekspresyonlarında artma, kollajen ve fibronektin sentezlerinde artma; NF-κB aktivitesinde artma ve proenflammatuvar gen ekspresyonunda artma, plasmalemmal NADPH oksidaz aktivitesinde ve ROS oluşumunda artma ve Na^+/ K^+ATPaz aktivitesinde azalma saptanmıştır. Gözlenen patofizyolojik değişiklikler, kan akımında bozulma, kapiller geçirgenlik artışı, yeni damar oluşumu, mezangial genişleme, glomerüler hiperfiltrasyon, enflamasyon ve trombotik angiopatidir. Deneysel tip 2 diyabet modelinde (*db/db* fareler) PKC enziminin β_1 ve β_2 izoformlarının inhibitörü olan ruboksistarin mezilat maddesinin böbrekteki hasarı kısmen engellediği gösterilmiştir. Bu bulgu diyabetik mikrovasküler komplikasyonların patogenezinde PKC'nin önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Kanwar ve ark. 2008; 2011).

2.3.1.4. Heksozamin Yolu Aktivasyonu

Yüksek glukozlu ortamda oluşan fruktoz 6-fosfat hız kısıtlayıcı glutamin: fruktoz 6-fosfat-aminotransferaz (GFAT) enzimi etkinliğinde glukozamin 6-fosfata dönüştürülür. Glukozamin 6-fosfattan ECM komponentlerinden proteoglikanların yapıtaşları arasında yer alan N-asetilglukozamin sentez edilir. N-asetilglukozamin molekülünün aktif taşıyıcısı olan UDP N-asetilglukozamin, Sp1 transkripsiyon faktörünü modifiye ederek TGF-β1 ve PAI-1 moleküllerinin sentezlerini arttırır. N-asetilglukozamin eNOS'un da glikozilasyonunda (O-glikozilasyon) da yer alır (Kanwar ve ark. 2011). (Şekil 2.21)



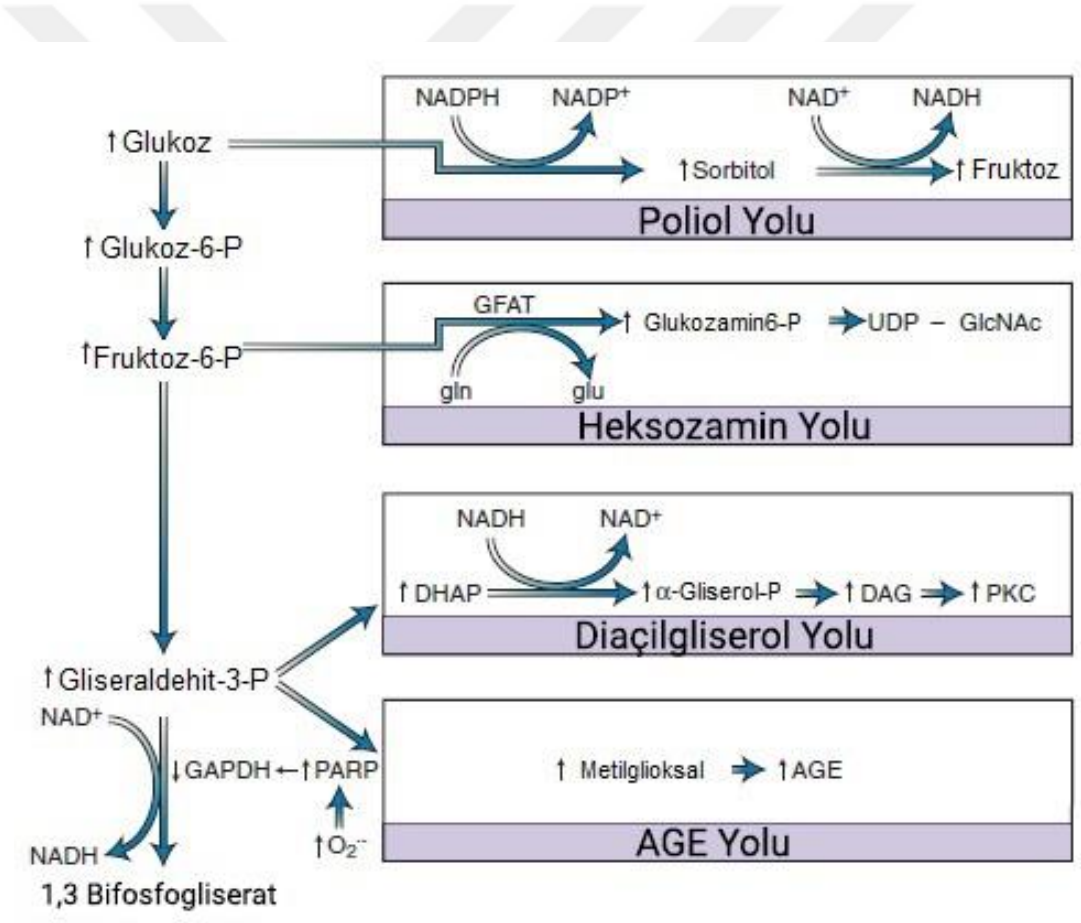
Şekil 2.21: Heksozamin yolu (Brownlee ve ark. 2016 pp. 1484-1581)

2.3.1.5. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ile Hiperglisemide İndüklenen Sinyal İleti Olayları Arasındaki İlişkiler

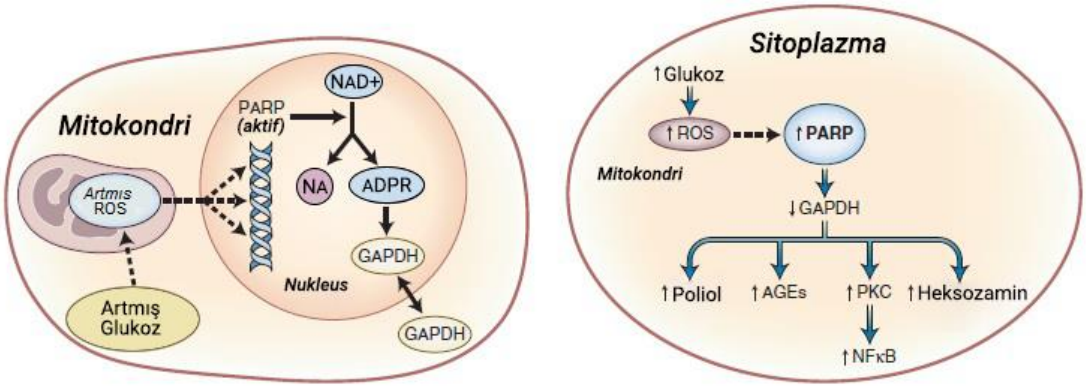
Fizyolojik koşullarda, hücrede az miktarlarda üretilen ROS redoks homeostazının sağlanmasında önemlidir. Hiperglisemi varlığında önemli ölçüde artan ROS organlara zarar vermektedir. Böbreklere hasar verdiği gösterilen ROS, süperoksit anyon radikalleri ($O_2^{\bullet -}$), hidrojen peroksit, (H_2O_2) hidroksil radikalleri ($OH^{\bullet}$) ve peroksinitrit anyon radikalleridir ($ONOO^{\bullet -}$). Sitoplazmik CuZn süperoksit dismutaz (CuZnSOD), mitokondriyel manganez süperoksit dismutaz (MnSOD), ve hem oksijenaz-1 gibi enzimler ROS'un temizlenmesinde görevlidirler. Hiperglisemi durumunda artan oksidatif strese yanıt olarak hem oksijenaz-1 aktivitesinde 15 kattan daha fazla artış meydana gelmektedir (Kanwar ve ark. 2011).

ROS oluşumunun başlıca kaynağı mitokondriyel oksidatif fosforilasyondur. Az miktarlarda NADPH-oksidaz ile de oluşturulur. Oksidatif fosforilasyonda ROS yan ürün olarak oluşmaktadır. Mitokondri iç ve dış membranları arasında H^+ konsantrasyonunun aşırı arttığı durumlarda elektron transferi inhibisyona uğrar. Radikal yapılı koenzim Q metabolitlerinin yarı-ömürleri uzar ve oksijenden $O_2^{\bullet -}$radikalleri oluşur; aşırı $O_2^{\bullet -}$oluşumu oksidatif stresle sonuçlanır (Ha ve ark. 2005) $O_2^{\bullet -}$ doğrudan

Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz'ı (GADPH) inhibe edebilmektedir; ancak bu etkiyi gösterebilen $O_2^{\bullet -}$ konsantrasyonu intrasellüler hiperglisemi koşullarında ulaşılan düzeyin çok üzerindedir. *In vivo* intrasellüler hiperglisemik koşullarda mitokondride ROS artışı sonucunda nukleusda DNA iplikçiklerinde kırılmalar olmakta ve DNA onarım enzimi olan poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) aktivasyona uğramaktadır. Aktif enzimin NAD^{+}'yi nikotinik asit ve ADP moleküllerine ayrıştırdıktan sonra oluşturduğu ADP-riboz polimerleri ile GAPDH enzimi modifiye olmakta ve aktivitesi azalmaktadır. GAPDH aktivitesindeki azalma poliyol yolu, AGE oluşumu, PKC ve heksozamin yolu aktivasyonlarına yol açmaktadır. GAPDH geninin bozulması da aynı hücresel olayları güçlendirmektedir (Kanwar ve ark. 2011). (Şekil 2.22 ve Şekil 2.23)



Şekil 2.22: Hiperglisemi ile mitekondride indüklenen aşırı süperoksid oluşumunun dört hiperglisemik hasar mekanizmasını uyarması
(Brownlee ve ark. 2016 pp. 1484-1581)



Şekil 2.23: Hiperglisemi ile mitekondride indüklenen aşırı süperoksid oluşumunun neden olduğu PARP aktivasyonu, GADPH modifikasyonu ve hiperglisemik hasar mekanizması (Brownlee ve ark. 2016 pp. 1484-1581)

Son çalışmalar, hiperglisemide ROS oluşumu ile ileri glikasyon ve PKC aktivasyonu arasında karşılıklı indükleyici ve amplifiye edici etkileşimler olduğunu göstermektedir (Kanwar ve ark. 2011).

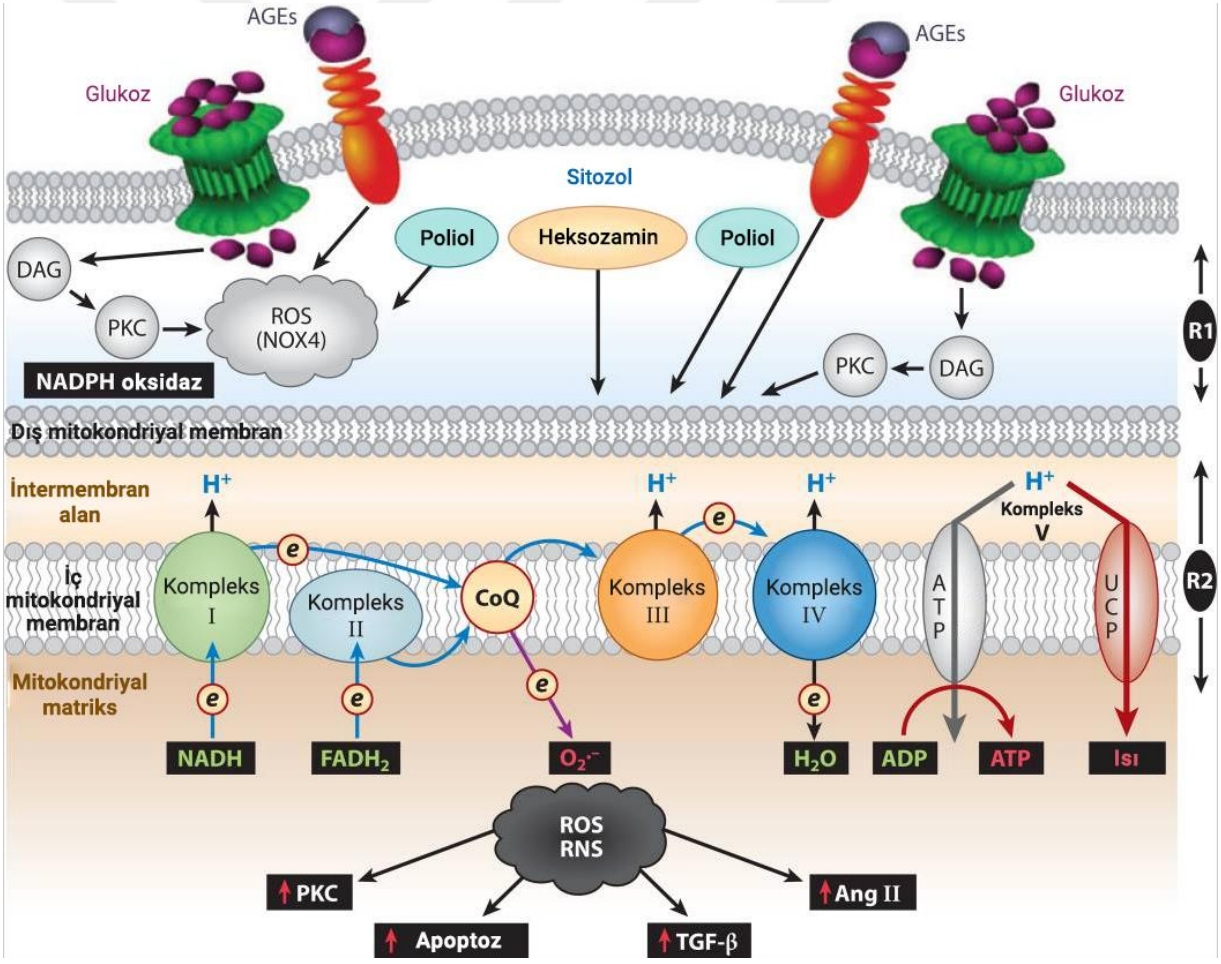
MnSOD veya mitokondri membranları arasındaki alanda H^+ konsantrasyonu azaltan (*uncoupling protein-1*) UCP-1'in mitokondride ROS oluşumunu azaltarak yüksek glukoz konsantrasyonlarında uyarılan dört büyük hücresel olayı kontrol altına alabildiği gösterilmiştir (Kanwar ve ark. 2011).

NADPH-oksidaz sistemi ile oluşturulan ekstramitokondriyel ROS'un DN patogenezinde rolü olduğunu gösteren araştırmalar vardır. Sitoplazmik CuZnSOD'un db / db fareler ve streptozotosin (STZ) ile diyabetik yapılmış farelerde aşırı ekspresyonunun glomerüler patofizyolojik değişiklikleri azaltmış olduğu saptanmıştır. Normalde aktif olmayan NADPH-oksidaz enzimi, membrana bağlı flavositokrom b558 komponenti ($gp91^{phox}$ ve $p22^{phox}$ heterodimeri) çeşitli sitozolik proteinler ($p47^{phox}$; p^{67phos}; p^{40phox}; ve GTP-bağlayıcı protein olan p21rac) ile bağlandıktan sonra $O_2^{\bullet -}$ve H_2O_2 oluşturur. Bu sitozolik proteinler arasında, Nox4 böbrek patobiyolojisinde özellikle ilginç bir yere sahiptir; çünkü bu, böbrekte eksprese edilen nötrofil $gp91^{phox}$'un bir homologudur (Kanwar ve ark. 2011).

Böbrek hücrelerinde NADPH oksidaz sistemi, mitokondriyel elektron transport sistemine benzer şekilde, AGE, PKC, DAG ve IP_3 (Inositol 1,4,5-trifosfat) tarafından aktif hale getirilebilmektedir. Siklooksijenaz yolunun metabolitleri de yüksek glukozlu ortamda NADPH oksidazı aktive edebilmektedir. NADPH oksidaz inhibitörlerinin (apocynin ve difenilen iyodonyum) tübüler ya da mesangial hücrelerdeki fibronektin

ekspresyonunu azalttığı saptanmış ve NADPH oksidazın yüksek konsantrasyonlardaki glukozun yol açtığı hasarda; hücre büyümesi, apoptoz, hücre göçü ve ECM yapılanması gibi redoks-duyarlı süreçlerde önemli olduğu düşünülmüştür. ECM yapılanması farklı sinyal yolları, transkripsiyon faktörleri ve büyüme faktörleri tarafından belirgin şekilde modüle edilmektedir. Güçlü bir sitokin olan TGF-β DN patogenezinde önemli bir rol oynamaktadır (Kanwar ve ark. 2011).

Reaktif nitrojen türleri (RNS) olarak bilinen özel ROS formları (NOX4), hiperglisemi ile indüklenen endotel hasarı takiben üretilmektedir. Sitozolde ve mitokondride ROS oluşumuna yol açan metabolik olaylar şekil 2.24'de görülmektedir (Kanwar ve ark. 2011).



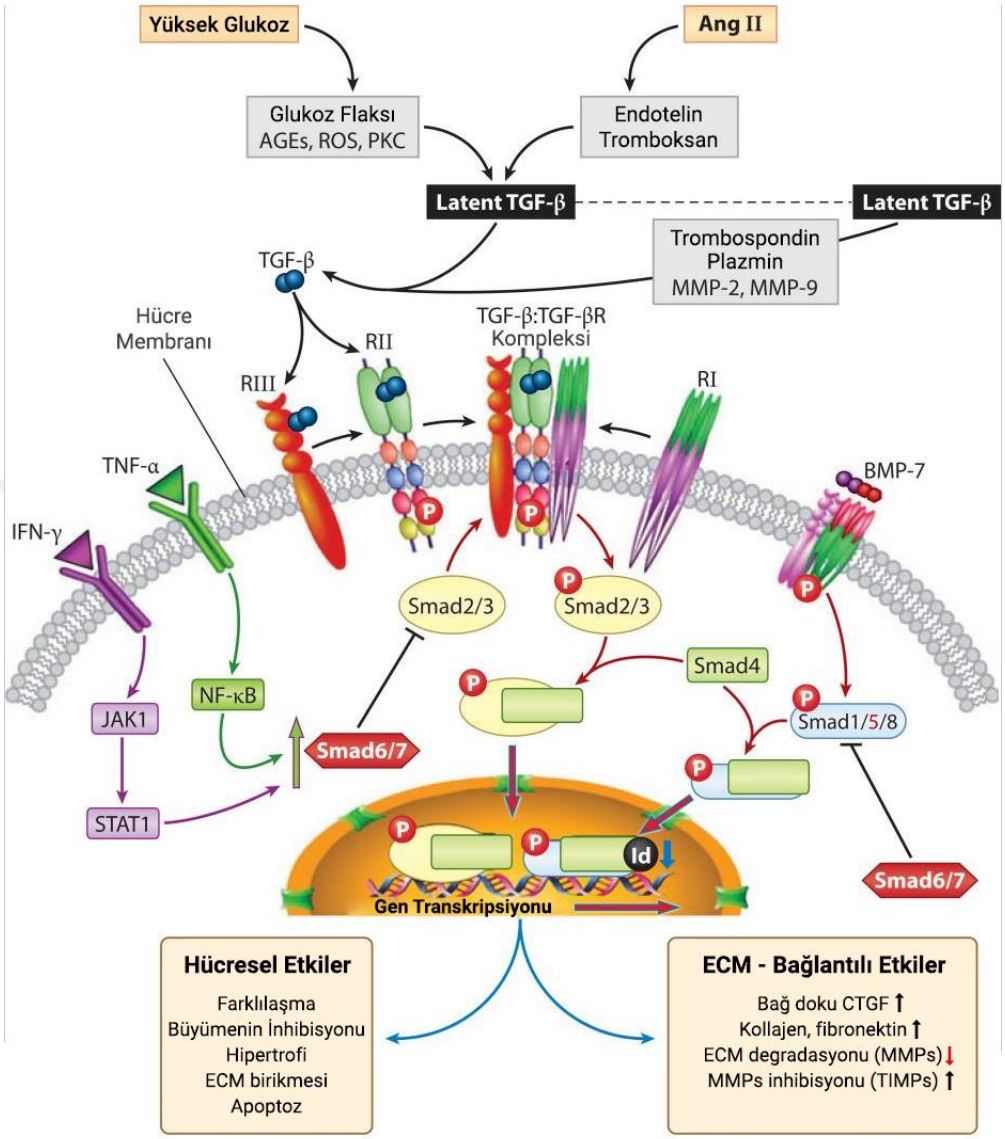
Şekil 2.24: Sitozolde ve mitokondride ROS oluşumu ile sonuçlanan olaylar
(Kanwar ve ark. 2011).

2.4. Dönüştürücü Büyüme Faktörü (TGF-β1) Aktivasyonu

Bir düzineden fazla fibrojenik faktörün böbrek fonksiyonunu etkilediği bilinmesine rağmen, renal fibrozun başlıca düzenleyicisinin TGF-β1-Smad yolu olduğu kabul edilmektedir (Li ve ark. 2004). TGF-β1 *up-regülasyonu*, KBH'nın tüm formlarında, hem insan hem de hayvan modellerinde görülmektedir (Hills ve Squires, 2011). Membranöz nefropati, obstrüktif nefropati ve DN de dahil olmak üzere, deneysel böbrek hastalık modellerinde TGF-β reseptör ekspresyonunun artmış olduğu ve spontan diyabet modellerinde hipergliseminin üç-yedinci günlerinde TGF-β1 mRNA ekspresyonunun artmış olduğu saptanmıştır (Chen ve ark. 2001). STZ diyabette, hipergliseminin üçüncü gününde TGF-β1 ve tip II TGF-β1 reseptörlerine ait mRNA ekspresyonunda artış saptanmıştır (Sharma ve ark. 1996). DN'li hastalarda TGF-β1'in fibroz ile ilişkili olduğu ve tip 1 ve tip 2 diyabetli hastalarda böbreklerde TGF-β1 ekspresyonundaki artışın glisemik kontrol ile yakından ilişkili olduğu saptanmıştır (Iwano ve ark. 1996; Sharma ve ark.1997). Hiperglisemi, AGE'ler, ROS, DAG-PKC ve heksozamin yolu aktivasyonları ile TGF-β1 sentezini arttırmakta ve ECM'nin aşırı birikimine yol açmaktadır. Glukoz ile indüklenen TGF-β1 aracılı ECM artışı mesangial hücre, podosit ve tübüler epitel hücre kültürlerinde saptanmış, kümülatif etki ile renal parankimanın yok olduğu gözlenmiştir. Reiniger ve ark. tarafından diyabetik OVE26 farelerde yapılan çalışmada AGE reseptörünün çıkarılması ile renal fonksiyonda iyileşme ve glomerülosklerozda zayıflama sağlanmıştır (Reiniger ve ark. 2010). İnsan proksimal tübülüs hücrelerinde aşırı PKC ekspresyonu sonucunda fibrotik etkiler gözlenmiştir (Hills ve Squires, 2011).

TGF-β süper ailesi, salgısal peptidlerden oluşan ve MIS (Mullerian inhibitory substance), inhibin / aktivin, "*kemik morfogenik protein"* BMP ve TGF-β aileleri olarak tanımlanan dört ana alt gruba ayrılır (Wrighton ve ark. 2009). MIS ailesi dışında kalan peptidler genel olarak memeli gelişimi, homeostaz ve patobiyoloji ile ilişkilidir. Pleitropik bir sitokin olan TGF-β1 hücre büyümesi, farklılaşması, adhezyon, proliferasyon, doku onarımı ve apoptoz da dahil olmak üzere, birçok temel biyolojik süreci düzenler; mesangial hücrelerde hiperplasi ve hipertrofiye neden olur (Bottinger ve ark. 2002; Schmierer ve ark. 2007). Omurgalılarda tespit edilmiş olan, beş ayrı izoformun sadece üçü memelilerde gösterilmiştir (Pelton ve ark. 1991). TGF-β1 geni, 390 amino asitlik öncül bir molekülü kodlar; bu molekül sinyal peptid, etkin TGF-β1 molekülü ve "*latency associated peptide"* (LAP) içermektedir. Sinyal peptid ayrıldıktan

sonra LAP ile kovalent bağlı, aktif olmayan latent TGF-β1 salınır (Gentry ve ark. 1988). Latent TGF-β1 ECM'de bağlayıcı protein ile kompleks yapmış olarak bulunur ve bu kompleksin bileşenleri matriks proteinlerine transglutaminaz etkinliğinde çapraz bağlarla bağlanmıştır. Glukoz, AGE'ler, ROS ve anjiyotensin II tarafından uyarılan latent kompleksten plasmin, MMP-2, MMP-9 veya trombospondin etkinliğinde kovalent bağın kopması sonucunda TGF-β1 ayrılmaktadır. Bu ayrışma ortamın pH değişikliklerinden etkilenir. Aktif TGF-β1 önce serin / treonin kinaz aktiviteli tip II ve tip III reseptörlerine bağlanır. Bu bağlanma tip I reseptörlerinin assosiye olmasını ve sitoplazmik bölgesinde fosforilasyona uğramasını sağlar. Aktif heteromerik kompleks fosforilasyon ile klasik sinyal aracıları olan Smad2 ve Smad3 aktivasyonlarını sağlar. Aktif Smad2/3, co-Smad 4 ile bağlanır; oluşan Smad2/3/4 kompleksi nükleusa geçerek çeşitli ECM geni ve CTGF geninin transkripsiyonunu başlatır. Smad2/3, IFN-γ ve TNF-α sinyal iletileri ile indüklenen Smad 6/7 tarafından inhibisyona uğratılır. BMP ise Smad 1/5/8'i aktive eder, aktif kompleksin co-Smad 4 ile bağlanması ile oluşan kompleks nükleusa geçerek farklılaşmayı ve bazı transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanmalarını inhibe eden Id proteinlerini indükler. Bu mekanizma ile BMP, TGF-β1'i antagonize eder (Kanwar ve ark. 2011) .(Şekil 2.25)



Şekil 2.25: TGF-β1 ve BMP-7 (kemik morfogenik protein) ile uyarılan sinyal mekanizmaları (Kanwar ve ark. 2011).

TGF-β1 kendi transkripsiyonunu düzenleme yeteneğine sahiptir. TGF-β1'in otoindüksiyonu, çeşitli hücre türlerinde tanımlanmıştır (Van Obberghen-Schilling ve ark.1988). Oto-indüksiyonun etkisi, dokuya özgü ve yararlı ya da zararlı olabilmektedir. Örneğin, TGF-β1 mRNA oto- indüksiyonunun iskemik hasar sonrası kardiyak yara iyileşmesinde yararlı bir rolü olduğu düşünülmektedir (Flanders ve ark. 1995). Proksimal tübülüs hasarında ise TGF-β1 oto-indüksiyonu pozitif geri bildirim ile

EMT'yi hızlandırıp miyofibroblast üretimini arttırarak fibrozun şiddetlenmesine yol açabilmektedir. Smad sinyal yolu ve TGF-β1 oto-indüksiyonu arasındaki ilişki Smad3'ün varlığına ve aktivasyonuna bağlıdır. Renal proksimal tübülüs hücrelerinde yapılan son çalışmalar, anjiyotensin II ile indüklenen tübüler EMT'nin Smad 3-bağımlı olduğunu göstermektedir (Sato ve ark. 2003). Unilateral tıkanma ve kronik tübülointerstisyel fibrozda Smad3-bağımlı bir mekanizma ile TGF(2) (β) 1-integrin gen ekspresyonunun *up-regüle* olduğu saptanmıştır. Bu protein renal fibrozda tedavi ajanlarının potansiyel hedefleri arasında yer almaktadır. İnsan proksimal tübülüs hücrelerinde, adhezyon proteini E-kadherinde Smad 3 bağımlı azalma ile MMP- 2'deki Smad 2 bağımlı indüksiyon arasında paralellik saptanmıştır (Hills ve Squires, 2011).

Hücrelerin TGF-β'dan korunmaları amacıyla Smad sinyal yolunun kontrol altında tutulması gerekmektedir. Bu doğrultuda inhibitör Smad'lar (Smad 6 ve 7) ve transkripsiyonel ko-represörler görev yapmaktadır. Ko-represör fonksiyonlu SnoN (Ski-related novel gene, non Alu-containing), Ski (Sloan-Kettering Institute proto-oncogene) ve TGIF (TG interacting factor) proteinleri düzenleyici Smad'ları (Smad 1, 2, 3, 5 ve 8) inhibe ederek gen transkripsiyonunu önlerler (Luo ve ark. 2004). Ko-represör düzeylerinin obstrüktif nefropati ve deneysel diyabet modellerinde azaldığı gözlenmiştir (Fukasawa ve ark. 2006). Smurf 2 (Smad ubiquitination regulation factor) bir ubikuitin ligazdır ve Ski, SnoN ve TGIF gibi Smad proteinlerin bazı üyelerinin yıkımlarını sağlamak üzere fonksiyon yapmaktadır. Smurf 2 disregülasyonunun profibrotik TGF-β / Smad sinyal yolunu etkileyerek insanlarda renal fibrotik hastalıkların gelişmesine ve ilerlemesine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Tübüler EMT artışına paralel olarak, inhibitör Smad 7, Smurf 2'nin rol oynadığı yıkıma uğramaktadır (Hills ve Squires 2011).

TGF-β1 izoformları Smad'lar gibi, ERK 1 ve 2 (extracellular regulated kinase), p44/p42 MAPK'lar (mitogen activated protein kinase), JNK/SAPK (c – Jun N-terminal kinaz/stress-activated protein kinase) ve p38 MAPK gibi çeşitli efektörlerin mesangial hücrelerde TGF-β1 sinyal iletisini modüle ettikleri gösterilmiştir. TGF-β1'in Smad ve MAPK sinyal ileti yolları arasında *cross-talk* olduğu ve TGF-β1 sinyal iletisinin DN'de ECM patobiyolojisinde merkezi role sahip olduğu bildirilmiştir (Kanwar ve ark. 2011).

2.4.1. Epitelyal Mezenkimal Transisyon (EMT) ve Diyabetik Nefropati

DN'nin, karakteristik histolojik bulgusu glomerüler mesangium ve tübüler interstisyumda aşırı ECM birikimidir. Glomerüloskleroz, tübülointerstisyel fibroz, enflamatuvar ajan enfiltrasyonu ve "*α-smooth muscle actin"* (α-SMA) pozitif miyofibroblast aktivasyonu olarak tanımlanabilen bu fibrotik değişiklikler arasında tübülointerstisyel fibroz, patojenezde anahtar rol oynamakta ve SDBY gelişiminde son ortak yolu temsil etmektedir. EMT veya tübülointerstisyel fibroz, tübüler epitel hücrelerinin miyofibroblastlara transdiferansiasyonudur (Hills ve Squires 2010) DN'de, patofizyolojik uyaranlara maruz kalan hücreler apoptozdan kaçış sırasında transdiferansiasyona uğramaktadır (Thiery ve ark. 2003; Ju ve ark. 2006). Aktif miyofibroblastlarda aşırı ECM sentezi yapılır ve doku normal yapısını kaybeder. DN'de proksimal tübülüs hücrelerinde EMT açık bir şekilde ortaya konulmuş, bu süreçte TGF-β1'in anahtar rol oynadığı kanıtlanmıştır. ECM birikimi, renal hasara yanıt olarak normal yara iyileşmesinde olduğu gibi hücre bütünlüğünü ve fonksiyonunu korumak için gereklidir; ancak renal fibrozda patolojik olarak matriks aşırı birikmektedir. Matriks proteinlerinin sentez ve yıkımları arasındaki denge enflamatuvar veya bağ dokusu hücrelerinden serbestleştirilen medyatörler aracılığı ile sağlanmaktadır. TGF-β1 sinyal yolunun *up-regülasyonu*, etiyolojisi ne olursa olsun her kronik böbrek hasarı sonrasında ortak olaydır. TGF-β1, podositler, endotel ve tübüler epitel hücrelerinde apoptozu uyararak, mesangial hücre ve interstisyel fibroblastlarda matriks bileşenlerinin büyük miktarlarda sentezini sağlayarak ve EMT'yi başlatarak glomerüloskleroz, tübülointerstisyel fibroz ve renal fibroza neden olmaktadır. TGF-β1'in bu etkileri sonucunda en sonunda da SDBY gelişmektedir. Diyabette hiperglisemi, patojenezin itici gücüdür ve fibrotik materyalin birikimi kaçınılmazdır. Fibroza paralel olarak nefron sayısında azalma olmakta ve böbrek fonksiyonları bozulmaktadır (Hills ve Squires 2011).

Tübüler epitel hücreleri normal koşullarda, adhezyon molekülü E-kadherin varlığında yüksek oranda kenetli epitel tabakanın oluşturulmasını sağlar. E-kadherin ekspresyonunda kayıp, EMT'nin erken dönemlerinde ortaya çıkar. E-kadherin ile birlikte (ZO-1) ("*zona occludens protein-1"*) de azalır. "*Adherens-junction"* kompleksinin ayrışmasına morfolojik ve fenotipik değişiklikler eşlik eder. α-SMA, vimentin ve Ca^{2+}-bağlayıcı bir protein olan "*fibroblast-spesifik protein-1"* (FsP1) gibi

mezenkimal markerlerde *up-regülasyon* görülür. Sonunda TBM'den ayrılan hücreler interstisyuma geçerek renal fibrozu arttırırlar (Hills ve Squires 2010).

EMT, DN'de olduğu gibi kronik böbrek hastalıklarının çeşitli formlarında tarif edilmiştir. Glomerüler fibroz, diyabette, nefropatinin gizli kaldığı başlangıç evresinden aşikar olduğu evreye kadar ilerlemesi sırasında gözlenmektedir. Tübülointerstisyel fibroz, erken aşamalarda gözlenebildiği halde hastalığın ilerleme sürecinde ve böbrek fonksiyonundaki kademeli azalma ile korele bir şekilde artmaktadır. Renal hastalık modellerinde, hipoksi, ROS, AGE'ler, çok sayıda pro-fibrotik sitokin, büyüme faktörü ve metalloproteinaza tepki olarak EMT ortaya çıkmaktadır. TGF-β1, fibrotik komplikasyonların gelişimi ve ilerlemesinde en önemli etkenler arasında yer alır. EMT'yi, sıçan tübüler epitel hücre soyu (NRK-529) ve STZ diyabetik Sprague Dawley sıçanlarda çalışmışlardır. (Burns ve ark. 2006) NRK-529 hücrelerinin TGF-β1 ile inkübasyonundan sonra, α-SMA, vimentin ve E-kadherin ekspresyonlarındaki değişim ile EMT varlığı doğrulanmıştır. Kontrol sıçanlarla karşılaştırıldığında diyabetik Sprague Dawley sıçanlarda 32. haftada renal TGF-β1, α-SMA ve kollajen gen ekspresyonlarında artış, E-kadherin ekspresyonunda azalma gözlemlenmiştir. Benzer EMT markerleri, STZ diyabetik Wistar Kyoto sıçanları ve STZ-Ren-2 sıçanları dahil olmak üzere çeşitli hayvan modellerinde gözlemlenmiştir. Diyabetli hastaların podositlerinde FsP1 varlığı, büyük olasılıkla EMT yoluyla podosit dekolmanının indüksiyonu ile ilişkilidir. Glomerüler podositlerin eksikliği progressif DN'nin önemli bir özelliğidir. FsP1 yapısal olarak doku fibroblast sitoplazmasında veya EMT ile fibroblasta dönüştürülmüş olan epitel hücrelerinde eksprese edilir. Yamaguchi ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, Tip 2 diyabeti ve aynı zamanda DN'si olan 109 hastanın % 35'inde normoalbuminüri, % 15'inde mikroalbuminüri, % 7'sinde makroalbuminüri ve % 43'ünde böbrek fonksiyonlarının azalmış olduğu saptanmıştır. Bu hastalardan 43'ünün biyopsilerinde FsP1(+) podosit sayısı, makroalbüminürili bireylerde normoalbuminürili olanlara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Ayrıca, FsP1(+) podosit sayısı glomerüllerde diffüz mezangiopatisi olanlarda fokal mezangiopatisi olanlara göre daha yüksek olarak saptanmıştır (Hills ve Squires, 2011).

Son çalışmalarda, diyabetik böbrekte EMT'nin düzenlenmesinde mikroRNA'ların (miRNA) rolü olduğu belirtilmiştir. miRNA'lar, endojen, kodlayıcı-olmayan RNA molekülleridir ve gen ekspresyonunun negatif regülatörleridir. İnsan böbreğinin hem glomerüler ve hem de tübüler bölümlerinde eksprese edilen miRNA

192, DN'de TGF-β tarafından *down-regüle* edilir ve bu durum fibroz artışı ile korelasyon gösterir. DN'de fibroz ve miRNA192 kaybı arasındaki bu ilişkinin, EMT'de yer alan gen regülasyonlarındaki bozulmadan kaynaklandığı düşünülmektedir. Yakın zamanda Wang ve ark. tarafından sıçan proksimal tübül hücrelerinde yapılan çalışmada miR-200a ekspresyonunun olmaması durumunda TGF-β1 ve TGF-β2'nin EMT'yi ve fibrogenezi indükleyebildikleri gösterilmiştir (Hills ve Squires 2011).

Yakın zamanlara kadar, EMT, nefronun daha çok proksimal bölgeleri ile ilişkili olarak tanımlanıyordu. Ancak, Butt ve ark. fetal primat obstrüktif nefropati modeli kullanarak yaptıkları çalışmalar sonucunda toplayıcı kanal hücrelerinde de EMT kapasitesinin varlığını ortaya koymuşlardır (Butt ve ark. 2007). Ayrıca, daha önceki çalışma bulgularının aksine, hem insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) ve hem de TGF-β1'e yanıt olarak, fare iç medüller toplayıcı kanal hücrelerinde, klasik EMT benzeri değişiklikler gösterilmiştir. TGF-β1 ile indüklenen EMT'nin distal nefronda fibroza nasıl katkıda bulunduğu belirsizdir. Aldehni ve ark. fare böbrek toplayıcı kanalında TGF-β1 ile indüklenen EMT sonucunda hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunu düzenleyen ve hücre proliferasyonunu arttırdığı bilinen Best-1 proteininin (Bestrophin-1) arttığını göstermişlerdir (Aldehni ve ark. 2009). Toplayıcı kanal hücre kültürlerinde TbRII delesyonunun TGF-β aktivasyonuna ve renal fibroza yol açtığı gösterilmiştir. TGF-β1 ayrıca, epitel hücre sodyum kanalını kontrol ederek sodyumun geri emilmesini düzenleyen bir serin / treonin kinaz olan serum ve glukokortikoid ile indüklenebilir kinaz-1 (SGK1) ekspresyonunu uyarmaktadır. SGK1'in diyabet modellerinde yükselmesi sekonder hipertansiyon gelişimine katkıda bulunabildiğinin bir işaretidir. SGK1, Crohn hastalığı, akciğer fibrozu, karaciğer sirozu, pankreatik fibroz, DN ve glomerülonefritte olduğu gibi fibrozun gelişebildiği pek çok dokuda eksprese edimektedir (Hills ve Squires 2011).

2.4.2. Diyabetik Nefropatide Tedavi Hedefi olarak TGF-β1

Pro-fibrotik etkileri nedeni ile TGF-β böbrek-koruyucu ajanlar için ideal bir hedeftir. TGF-β1 fibrozda majör izoform kabul edilmesine rağmen, hem TGF-β1 ve hem de TGF-β2 ekspresyonlarında azalma sonucunda böbrek fonksiyonlarında iyileşme saptanmıştır. STZ-diyabetik sıçanlarda, hastalığın erken evrelerinde renal TGF-β2 ekspresyonunun önemli ölçüde arttığı ve bu artışın ECM birikimi ile paralellik gösterdiği görülmüştür. Buna karşılık, bu ilk dönemde TGF-β1 mRNA seviyeleri

artmasına rağmen, TGF-β1 proteininin değişmeden kaldığı saptanmıştır. Progressif böbrek hastalığının önlenmesine yönelik yeni çalışmalar, TGF-β2'nin antifibrotik potansiyeli üzerine odaklanmaktadır. Bununla birlikte, diyabette, her üç izoformun (TGF- β 1, TGF-β 2 ve TGF-β 3) da profibrotik rolünün varlığı kabul edilmektedir. Böbrekte fibrozun azaltılması ve genel olarak böbrek fonksiyonunun iyileştirilmesi için bu üç izoformun da nötralizasyonu hedeflenmektedir. TGF-β inhibisyonu aynı zamanda glomerüler genişlemeyi önlemekte ve kimyasal maddelerle oluşturulan diyabet modellerinde ECM proteinlerini kodlayan gen ekspresyonlarını baskılamaktadır. TβRI ve TβRII reseptör mRNA ekspresyonunda artış görülen db / db farelerinde TGFβ nötralize edici antikorlar ile uzun süreli tedavi sonucunda, kollajen ve fibronektin ekspresyonlarının ve mesangial matriks genişlemesinin belirgin bir biçimde azaldığı saptanmıştır (Hills ve Squires 2011).

BMP-7 ve HGF dahil olmak üzere birçok anti-fibrotik ve böbrek-koruyucu maddenin kısmen de olsa TGF-β ile indüklenen fibrozu hafiflettiği gösterilmiştir. Bir osteojenik faktör olan BMP-7 böbrek gelişiminde ve nefrogenezin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Diyabette böbrek fibrozu BMP-7 tarafından inhibe edilmektedir. EMT'yi takiben artmış TGF-β düzeylerine paralel olarak, gremlin düzeylerinin artması sonucunda, BMP-7 ekspresyonunda azalma olmaktadır. BMP-7 kullanılabilirliğini sınırlayan gremlin DN'li hastalarda belirgin şekilde yüksektir. Bu karşılıklı ilişki akut ve kronik böbrek hasarı modellerinde, düşük BMP-7 konsantrasyonlarını açıkladığı gibi eksojen BMP-7'nin EMT blokajı yaparak renal fonksiyonu düzeltmesini de açıklamaktadır. BMP-7, STZ-sıçan ve db / db farelerde görülen, glomerüler renoprotektif etkilerinin dışında, TGF-β sinyal yolunu da durdurma kapasitesine sahiptir (Hills ve Squires 2011).

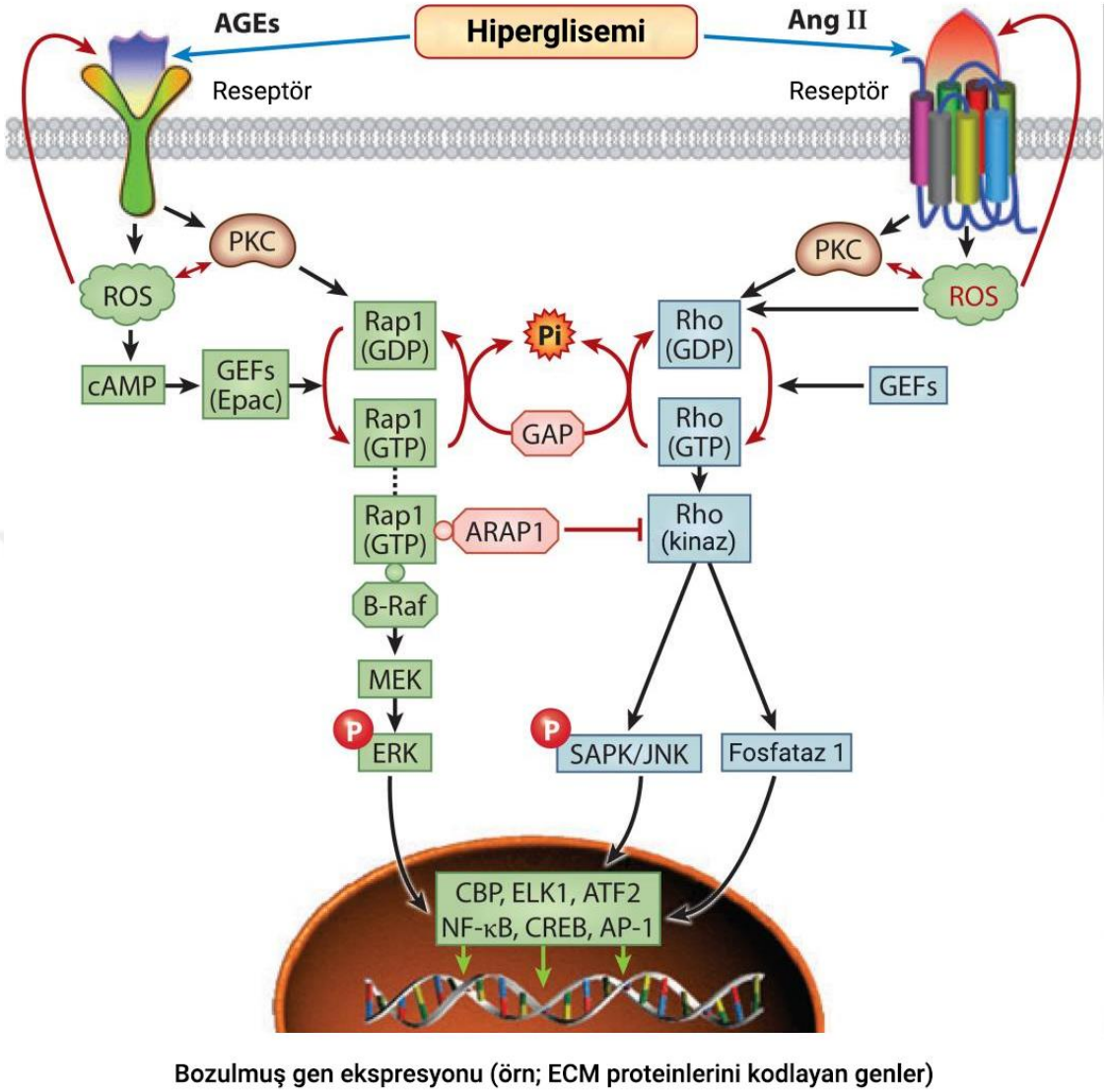
Bir anahtar anti-fibrotik sitokin olan HGF kronik hasar sonrası böbrek doku fibrozunu önlemektedir. BMP-7 ile olduğu gibi, HGF ve TGF- β arasında da karşılıklı bir ilişki vardır. Bu böbrek koruyucu etkilere aracılık eden moleküler mekanizmalar çok fazla bilinmemektedir. Anti-fibrotik HGF aktivitesi, transkripsiyonel ko-represör SnoN *up-regülasyonu* ile ilişkili görünmektedir. DN'de HGF tedavisi ile glomerülosklerozun geriletilebildiği, albüminürinin azaltılabildiği, fibrozun durdurulabildiği ve bunların sonucunda renal fonksiyonda bir iyileşme olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, *db / db* farelerinde, kronik HGF yüksekliğinin nefropati ilerlemesini hızlandırdığı görülmüştür. Ayrıca, HGF'nin potansiyel proto-onkojenik etkileri tedavi amaçlı kullanımın

sorgulanmasını gerektirmektedir. 9-cis Retinoik asit, 1,25-dihidroksivitamin D_3, PPARγ agonisti troglitazone ve C-peptid dahil olmak üzere bazı maddelerin HGF etkilerini arttırdıkları saptanmıştır (Hills ve Squires 2011).

DN'de ağırlıklı olarak diyabetik hayvan modellerinde gerçekleştirilmiş miRNA ekspresyonu çalışmaları, miRNA'ların gelecekte renal fibroz tedavisinde potansiyel hedef olabileceğini düşündürmektedir (Kato ve ark 2007). miRNA'ların böbrek içindeki rollerinin bölgesel farklılıklar gösterdiği; örneğin STZ diyabetik fare glomerüllerinde miR-192 ekspresyonunun yüksek olduğu ve ECM proteinleri ile ilişkili TGF-β1 ile indüklenen değişiklikleri baskılayıcı rolleri olduğu görülmektedir. Bunun aksine, proksimal tübülüslerde miR-192 ekspresyonunun düşük düzeylerde olduğu ve miR-192 kaybının, DN'de tübülointerstisyel fibroz derecesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Hills ve Squires 2011).

2.5. G- Proteinler, Hücre Siklusu Proteinleri ve Diyabetik Nefropati

DN patogenezinde, GTP bağlayıcı proteinler ile G-proteinler ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. Çalışılan majör G-proteinler, Ras, Rap1 (Ras-proximate-1) ve Rho ailelerinin üyeleri olup 20 ila 40 kDa boyutlu 100'den fazla küçük GTPaz'dır. Bu moleküller GDP bağlı inaktif ve GTP-bağlı aktif yapıları ile düzenleyici fonksiyon yaparlar. GDP-GTP değişimini sağlayan "*Guanine exchange factors"* (GEF'ler) bu proteinleri aktive; GTPase-activating proteins (GAP'lar) inaktive ederler. GTPaz süper ailesinin üyeleri arasında yer alan Ras, Rap1 ve Rho aileleri, birçok transdüksiyon mekanizmasında yer alırlar. Fizyolojik koşullarda büyüme faktörlerinin reseptörlerine bağlanmaları sonucunda aktifleşen G-proteinleri, seri kinaz aktivasyonları ile gen ekspresyonu üzerinde etkili olarak, hücre hipertrofisi, morfonogenez, hareketlilik, aracılık, sitokinez, hücre içi trafik gibi çok ceşitli hücresel süreçleri modüle etmektedir. Karşıt bir denge içinde bulunan Rap1 ve Ras komponentlerinin aktiviteleri, ligand-bağlı büyüme faktörü reseptörünün fosforillenmesi sonucunda aktivite kazanan ve bir serin / treonin kinaz olan Raf ile ilişkisine bağlıdır. Örneğin, insülin uyarısı ile, Rap1 ile Raf arasındaki ilişki kopar ve serbest kalan Raf, GTP-bağlı aktif Ras ile bağlanır. İnsülin eksikliğinde Rap1, Raf ile ilişkiye girerek aktive olur. Rap1, Ca^{2+}, CAMP ve DAG gibi ikincil haberciler tarafından aktifleştirilir. Rap1 / Raf / MAPK yolu aynı zamanda AGE: RAGE etkileşimine bağlı PKC aktivasyonu ve ROS oluşumu ile de aktivasyona uğramaktadır (Kanwar ve ark. 2011) (Şekil 2.26).



Şekil 2.26: AGE ile Ang II'nin reseptörleri ile etkileşimleri sonucunda ROS oluşumu, PKC, Rap1 ve RhoGTPazların aktivasyonu (Kanwar ve ark. 2011).

Bu aktivasyon CBP [CREB-(CAMP- response element binding protein-) binding protein)], (ELK1) ets-like gene 1, activating transcription factor (ATF2), activating protein 1 (AP-1) ve NF-κB gibi transkripsiyon faktörlerini fosforilasyon ile aktifleştirerek örneğin ECM proteinleri gibi proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonlarını değişime uğratmaktadır. ECM komponenti olan fibronektin sentezinin yüksek konsantrasyonlu glukozlu ortamda Rap1b *up-regülasyonu* yoluyla, *in vitro* ve *in vivo* olarak arttığı saptanmıştır. Rap1b, farnezilasyon gibi bir post-translasyonel lipid modifikasyonu sonucunda aktive olup iç plasmalemmal katmana transloke olarak ECM

protein sentezinde kritik rol oynayabilmektedir. Benzer modifikasyon olan geranilgeranilasyon da Rho GTPazlarda meydana gelir. Rho ailesi proteinler, hücre iskeletinin organizasyonu, aktin polimerizasyonu, hücre göçü ve adhezyonunu düzenlemektedir. Bununla birlikte, son bulgular Rho GTPazların fibronektin gibi, ECM proteinlerinin patobiyolojisinde çok önemli bir rol oynamakta olduğunu göstermektedir; bu proteinlerin sentezini TGF-β ile indüklenen ve böbrek glomerül ve tübülointerstisyel hücrelerde güçlü bir profibrojenik sitokin olarak eksprese edilen CTGF modüle etmektedir. Benzer şekilde, Rho-bağımlı mekanizmalar böbrekte anjiyotensin II, "*platelet derived growth factor"* (PDGF) ve endotelin de dahil olmak üzere diğer profibrojenik moleküller tarafından aktive olurlar. Çeşitli ECM proteinlerinin ekspresyonunu modüle eden bu faktörlerin DN patogenezinde rol oynadığı belirtilmektedir. Ang II'nin reseptörlerine bağlanması ile oluşan ROS'lar ve PKC aktivasyonu, Rho GTP ve sırası ile Rho kinaz, SAPK / JNK aktivasyonları ile yukarıda belirtilen transkripsiyon faktörlerini fosforilasyon ile aktifleştirerek gen ekspresyonunu değişime uğratmaktadır. Rho kinaz alternatif olarak fosfataz 1 aktivasyonu ile transkripsiyon faktörlerinin defosforilasyonunu sağlayabilmektedir. CREB, çeşitli ECM proteinleri için majör bir transkripsiyon faktörüdür. (ARAP 1) anjiyotensin II type 1 receptor-associated protein proteininin Rap 1 ile oluşturduğu Rap 1-ARAP 1 kompleksi Rho kinaz aktivitesini inhibe etmektedir (Kanwar ve ark. 2011).

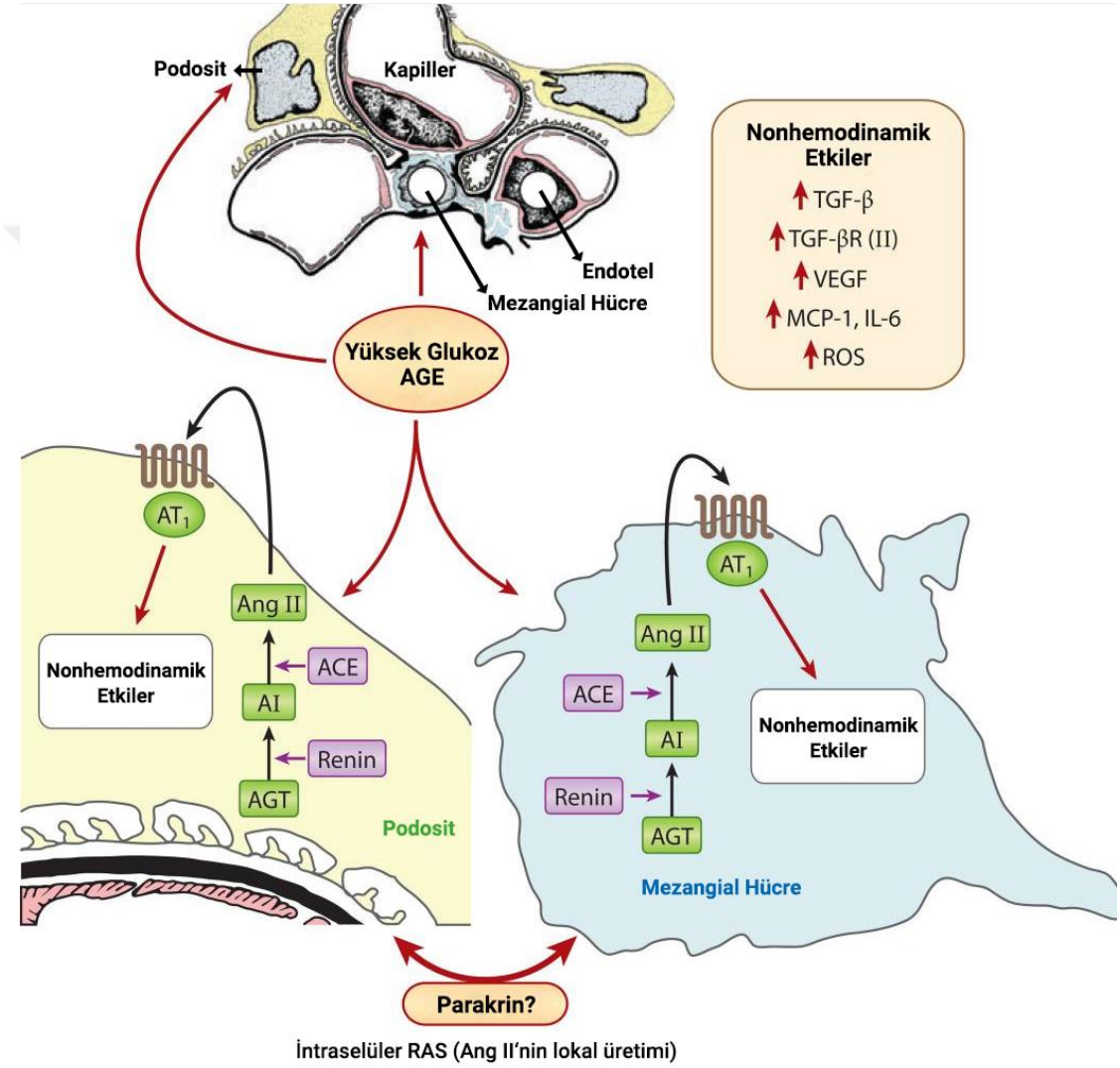
G-proteinleri, serum yanıt faktörü uyarısı ve JNK / SAPK ve P38 / MAPK aktivasyonu yolu ile, AP-1 ve NF-κB gibi transkripsiyon faktörlerini etkileyerek apoptoz, farklılaşma ve hücre proliferasyonu gibi hücresel süreçlerde düzenleyici rol oynamaktadır (Werner 2004; Hall 2005) . DN'nin erken evrelerine ait süreçler olarak tanımlanan tubüler hücrelerde apoptoz ve mesangial hücre proliferasyonu çeşitli hücre döngüsü proteinleri ve inhibitörleri tarafından modüle edilmektedir. Hücre döngüsü proteinleri, siklinler ve siklin bağımlı kinazlardan (CDK) oluşmaktadır. CDK'lar siklinler ile heterodimerize olduktan sonra aktive edilmektedir. Siklinlerin düzeyleri, hücre döngüsü boyunca dalgalanma göstermekte ve ekspresyonları büyüme faktörleri ile düzenlenmektedir. CDK'lar ise yapısal olarak eksprese edilmekte ve aktiviteleri fosforile olup olmadıklarına ve siklinlere bağlı olup olmadıklarına göre değişmektedir. Siklin / CDK heterodimer kompleksinin aktivitesinin düzenlenmesinde CDK inhibitörleri (CDI) olarak bilinen bir başka küçük proteinler grubu yer almaktadır. CDI'lar Cip / Kip ($p21^{Cip1}$ ve $p27^{Kip1}$) ve 1NK4/ARF ($p16^{1NK4}$ ve $p14^{ARF}$) olarak

tanımlanan iki ana aileden oluşmaktadır. DN'de hücre-döngüsü proteinlerinin rolü, ilk olarak bir tip 2 diyabet modeli olan db / db farelerinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir; araştırmacılar heterozigotlara göre homozigotlarda $p27^{Kip1}$ ekspresyonunda artış görmüşlerdir. Aynı şekilde, STZ ile indüklenen tip 1 diyabetik fare böbreklerinde CDI ekspresyonunda benzer bir artış gösterilmiştir. Yüksek konsantrasyonda glukozlu ortama maruz bırakılan mesangial hücrelerde de $p27^{Kip1}$ ekspresyonunda artış saptanmış ve proteinin diyabetik ortamda aktive olduğu bilinen MAPK veya PKC enzimleri tarafından fosforilasyon uğratıldığı öne sürülmüştür. STZ'nin $p27^{Kip1-/-}$ fare böbreklerinde lezyona yol açmaması, hücre döngüsü proteinlerinin DN patogenezindeki önemini vurgulamaktadır. Ayrıca, yüksek konsantrasyonda glukozlu ortamda prolifere olan mesangial hücrelerde, $p21^{Cip1}$ ekspresyonundaki azalmanın, CDK-2 ve CDK-4 kinaz aktivitelerindeki azalma ile ilişkili olduğu bulgusu da siklinlerin rolünü desteklemektedir. Bu deneylerde, Ras ve Rho ekspresyonu da artmakta ve sentezlenen bu proteinler daha sonra plazma membranının iç kısmına transloke olmaktadır. Bu bulgular hiperglisemik strese verilen hücresel yanıtta hücre döngüsü proteinlerinin ve GTPaz / p21 sinyal yolunun önemini destekleyici bulgulardır (Kanwar ve ark. 2011).

2.6. Diyabetik Nefropati Patogenezinde İntraglomerüler Hipertansiyon

DN'nin iyi bilinen erken patofizyolojik özelliği hiperfiltrasyondur; glomerüler filtrasyon hızındaki belirgin artışın hiperfiltrasyonu yansıttığı ilk olarak Anderson ve Brenner tarafından tanımlanmıştır (Anderson ve Brenner 1988). Bu artış, intrarenal hipertansiyonun ya da daha spesifik olarak, glomerüler kapiller basınçtaki artışın sonucu gibi görünmektedir. Artan basıncın, diyabetik ortamda metabolik ve hemodinamik faktörler arasındaki etkileşimler ile renovasküler komplikasyonları hızlandırma olasılığı bulunmaktadır. Deneysel diyabetik sıçanlarda sistemik kan basıncı normal olmasına rağmen intraglomerüler hipertansiyon saptanmış, efferent ve afferent arteriyollerin farklı ölçüde dilate oldukları gözlenmiştir (Hossetter ve ark 1982). Bu bulgular transkapiller hidrolik basınç farkında ve plazma akış hızında meydana gelen artış nedeni ile lokal glomerüler mikrodolaşımda otoregülasyonunun bozulmuş olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Hiperglisemi muhtemelen, renin-anjiyotensin sistemini (RAS) etkinleştirerek ve lokal anjiyotensin II üretimini arttırarak böbrekte lokal kan basıncı

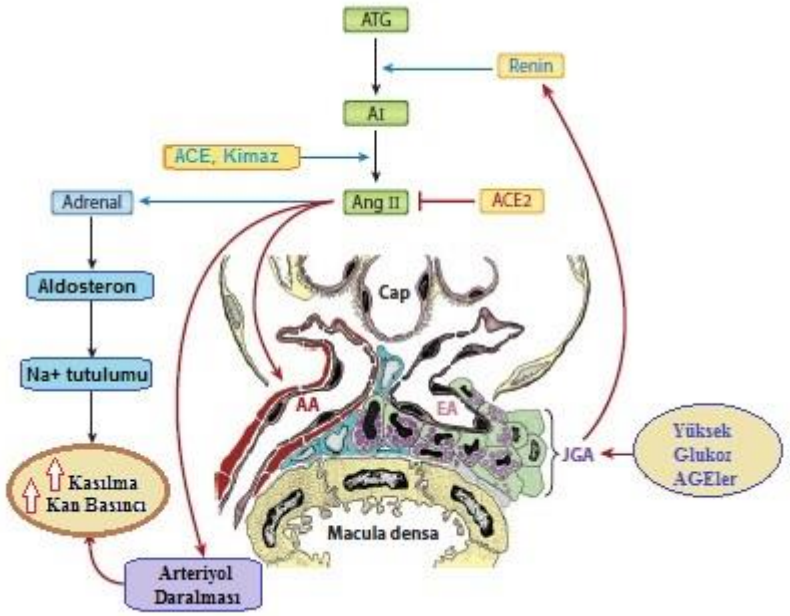
artışına neden olmaktadır. Hiperglisemide intraglomerüler hipertansiyonun azalması durumunda mikroalbüminüride görülen azalma bu hipotezi desteklemektedir. Mesangial hücreler ve podositler gibi glomerülüs hücreleri de, anjiyotensin II ve reseptörlerini sentezlerler; bölgesel RAS aktivasyonu ve mekanik basınç artışı hasar oluşumuna neden olur ve hiperglisemi ile indüklenen oksidatif veya glikatif stres sonucu böbrekte gelişen hasar artar ve kalıcı hale gelir (Kanwar ve ark. 2011) (Şekil 2.27).



Şekil 2.27: Glukoz ve AGE'ler tarafından renin-angiotensin sisteminin lokal glomerüler aktivasyonu (Kanwar ve ark. 2011).

Bu mekanizmalar, DN'nin iyileştirilmesinde ACE inhibisyonun önemini ortaya koymaktadır. Hemodinamik faktörlerin rolünü açıklamak için yapılan hayvan çalışmalarında negatif bir ACE regülatörü olan ACE2 eksikliği, uzun süreli deneysel diyabette, lokal tübüler anjiyotensin II artışı ve tübülointerstisiyel fibroz artışı ile ilişkilidir. ACE2 *knockout* farelerde, glomerüloskleroz gelişme eğiliminin olması DN'yi

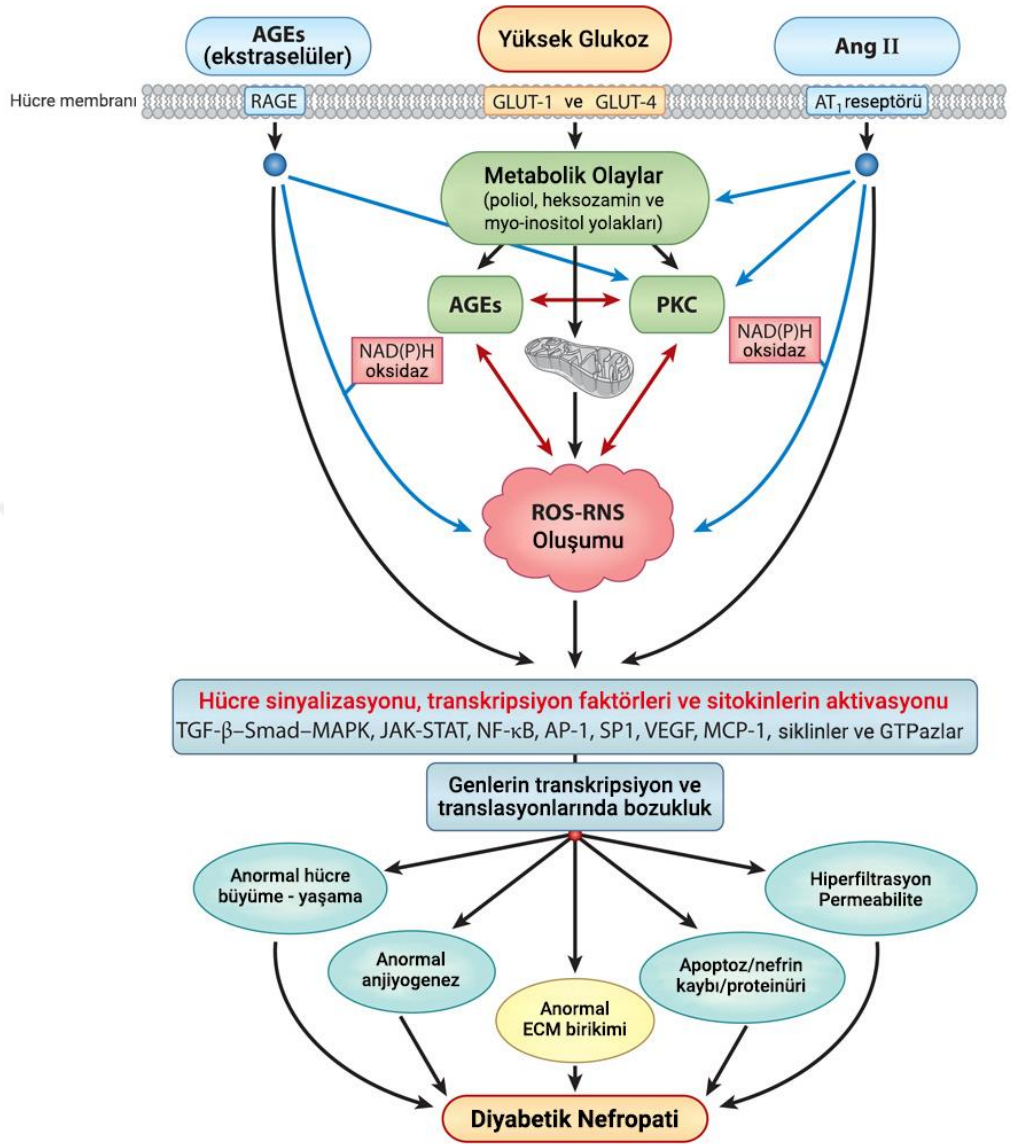
düşündürmekte ve DN patogenezinde ACE2'nin ve intraglomerüler hemodinamiğin önemini vurgulamaktadır (Kanwar ve ark. 2011)(Şekil 2.28).



Şekil 2.28: Glukoz ve AGE'ler tarafından renin-angiotensin sisteminin sistemik aktivasyonu (Kanwar ve ark. 2011).

DN patogenezinde çok sayıda mekanizma yer almaktadır. Hipergliseminin, böbrekte hangi mekanizma ile hemodinamik hasarı arttıran anjiyotensin II'nin yüksek miktarlarda üretilmesine neden olduğunun bilinmesi kritik önem taşımaktadır. Anjiyotensin II üretimindeki artışın, diyabette böbrek hücrelerinde erken dönemde görülen hiperplazide ve geç dönemde görülen hipertrofide merkezi rol oynadığı düşünülmektedir ve bu süreçte sentezleri artan TGF-β, CTGF, IL-6, MCP-1 ve VEGF-A gibi sitokinlerin yer aldığı bilinmektedir (Jandeleit-Dahm ve Cooper 2006; Wolf 2004). İlk olarak, mezangial hücrelerde, yüksek konsantrasyondaki glukoz, renin ve anjiyotensinojen sentezlerini arttırmaktadır ve konsantrasyonu artan intrarenal anjiyotensin II otokrin ve parakrin yollarla, çeşitli sitokinlerin üretimine ve ECM birikimine yol açmaktadır (Singh ve ark. 2003). İkinci olarak, hiperglisemi ile indüklenen çeşitli hücresel olaylarda, AGE-RAGE etkileşiminde olduğu gibi, oluşan ROS böbrek hücrelerinde, anjiyotensinojen ekspresyonunu ve anjiyotensin II sentezini arttırmaktadır . AGE infüzyonu, RAS'ın çeşitli bileşenlerinin ekspresyonunda dikkate değer bir artışa neden olurken anjiyotensin II infüzyonu, hem serum hem de böbrekteki

AGE konsantrasyonlarını arttırmaktadır; bu bulgular yüksek konsantrasyonda glukozlu ortamda meydana gelen hücresel olayların karmaşıklığını ortaya koymaktadır (Thomas ve ark. 2005). Anjiyotensin II-AGE jukstakrin döngüsü, efferent arteriolü etkileyerek, glomerüler kapiller basınçta oldukça sabit bir artışa neden olabilmektedir. Glomerül hücreleri üzerinde yaratılan sürekli gerginlik glomerül hacminde paralel değişikliklere yol açmakta ve çeşitli sinyal yollarının aktivasyonuna ve kan basıncında artışa neden olabilmektedir. Sürekli mekanik gerginlik, mesangial hücre biyolojisini çeşitli şekillerde, olumsuz yönde etkileyebilmektedir (Kanwar ve ark. 2011) . İlk olarak, mesangial hücre kültür ortamında glukoz normal konsantrasyonda olmasına rağmen GLUT-1 ekspresyonu ve hücre içi glukoz konsantrasyonu artar (Gnudi ve ark 2003; 2007) . İkinci olarak, *in vitro* tekrarlanan gerginlik ve gevşeme, hücre çoğalmasını ve ECM sentezini arttırır, ECM'i yıkan enzim sentezini azaltır (Yasuda ve ark 1996) . Üçüncü olarak, mekanik gerginlik, doğrudan TGF-β ekspresyonunu ve reseptörünü indükleyebidiği gibi dolaylı olarak PKC ve p38 / MAPK aktivasyonları ile çeşitli ECM proteinlerinin sentezlerinin artmasına neden olabilir (Gruden ve ark. 2000). Mesangial hücrelerdeki anjiyotensin II aracılı gerginlik stresine karşı verilen bir diğer önemli tepki de, MCP-1 uyarılmasıdır (Gruden ve ark. 2005); MCP-1 enflamatuvar yanıtın amplifikasyonuna ve böbrek hasarına yol açabilen ICAM-1 sentezini ve ROS oluşumunu arttırır. Monositlerin glomerüllere girmeleri ve glomerüler mesangiuma tutunmaları klinik böbrek biyopsilerinde sık görülen bir bulgudur; bu bulgu enflamatuvar sitokinlerin DN patogenezinde rol oynadıklarını göstermektedir. Mesangial hücrelerin yanı sıra, podositler de muhtemelen VEGF-A oluşumu nedeni ile, süregelen glomerüler kapiller gerginlikten olumsuz etkilenir. Bu tür bir stres, hücre iskeletinde, tersinir yeniden yapılanmaya ve podositlerde α3β1 integrin ekspresyonunda azalmaya yol açabilir; bunun bir sonucu olarak, podositler GBM'dan ayrılıp, apoptoza uğrayabilir ve proteinüri görülebilir. Diyabetik nefropatide, AGE-RAGE aksı ile RAS sistemi arasındaki *cross-talk* ve hiperglisemi ile indüklenen metabolik olaylar arasındaki karşılıklı ilişkiler şekil 2.29'da görülmektedir (Kanwar ve ark. 2011).



Şekil 2.29: Böbrek hücrelerinde yüksek glukoz konsantrasyonlarına maruziyete bağlı olan ve diyabetik nefropati ile sonuçlanan gen ekspresyon değişiklikleri ve hücresel bozukluklar (Kanwar ve ark. 2011).

2.7. Diyabetik Nefropatide Tübülointerstisyel Hasar Mekanizmaları

DN'nin ileri aşamalarında gözlenen proteinüri ve özellikle non-selektif proteinürinin, çeşitli mekanizmalarla tübülointerstisyel hasara neden olabildiği bildirilmiştir (Bazzi ve ark 2000). İlk olarak, aşırı miktarda profibrojenik sitokin içeren glomerüler filtratın, tübüler epitel ve interstisyel hücre biyolojisi üzerine olumsuz etkileri söz konusudur. İkinci olarak, tübüler epitelden reabsorbe edilecek protein

yükünün aşırı artması nedeni ile lizozom yapısının bozulması, enerji ihtiyacının artması ve sonuçta apoptoz olasıdır. Üçüncü olarak, tübüler epitel hücre hasarı, tübüler lümende yüksek konsantrasyonlarda bulunan C3, C3a, C5a, C5b-9 ve Crry gibi kompleman sisteminin çeşitli bileşenleri veya endojen düzenleyici proteinleri tarafından daha da arttırılabilir ve kemotaktik özellikli bazı bileşenlerin etkileri ile enflamatuvar yanıtın ortaya çıkması, MCP-1 ve monosit akışı sonucunda tübülointerstisyumun zarar görmesi olasıdır (Hori ve ark. 1999; Shimizu ve ark. 2003). Dördüncü olarak, diğer KBH'da olduğu gibi, proteinüri, EMT ile ilişkili olabilir. İntegrin-bağlı kinaz aracılığında gerçekleşen EMT'yi glomerüllerde fibrozu ve sklerozu arttıran ve aktivitesi TGF-β tarafından modüle edilen CTGF uyarır (Kanwar ve ark. 2011).

DN'de meydana gelen tübülointerstisyel hasarı açıklayan bir diğer mekanizma da proteinüri varlığından bağımsız olan hipoksik hasardır. Hipoksiye yol açan kronik iskemi, lokal RAS aktivasyonu veya NO kaybına sekonder olarak intrarenal vazokonstriksiyon ya da yapısal bozukluğa bağlı kan akımı azalması nedeni ile gelişmektedir. Hasarlı dokudaki peritübüler kapillerleri saran interstisyel fibroza sekonder oluşabilen yapısal bozukluk tübülüslerde oksijenasyonu kısıtlar. Benzer şekilde, oksidatif stres artışı ile birlikte NO eksikliği ve kapiller endotel disfonksiyonun daha da artması sonucunda tübülointerstisyel bölgede hipoksi olmaktadır (Kanwar ve ark. 2011). Deneysel ve klinik DN çalışmalarında hipoksinin tübüler hücre mitokondrilerinde fonksiyonel bozukluk ve apoptoza neden olduğu sık olarak gözlemlenmiştir (Kumar ve ark. 2004). Ayrıca, hipoksinin interstisyel hücreleri aktive ederek tübüler hücrelerde EMT'yi indüklediği ve fibrozun hızlanması ile peritübüler oksijenin daha da kısıtlandığı bildirilmiştir. Oksijenden yoksun bırakılan renal interstisyel fibroblastlarda yapılan *in vitro* çalışmalarda kollajen ve tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) gen transkripsiyonlarında artış gözlenmiştir. TIMP-1 ekspresyonundaki artış, hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) transkripsiyon faktörü ile ilişkilidir. HIF-1, aynı zamanda, bir profibrojenik sitokin olan CTGF'nin promotör bölgesine bağlanarak fibrozu arttırabilmektedir. HIF-1, birçok yolağı ve VEGF ve eritropoietin (EPO) gibi çeşitli genlerin ekspresyonunu modüle eden çok yönlü bir transkripsiyon faktörüdür. Hipoksinin erken dönemlerinde, intakt peritübüler hücreler yeterli miktarlarda EPO üreterek hemoglobin düzeylerini ve interstisyumdaki oksijen basıncını koruyabilmektedir. Ancak, kronik hipoksi, hiperglisemi, oksidatif stres ve endotel disfonksiyonu varlığında ortaya çıkan kalıcı hasara bağlı EPO üreten

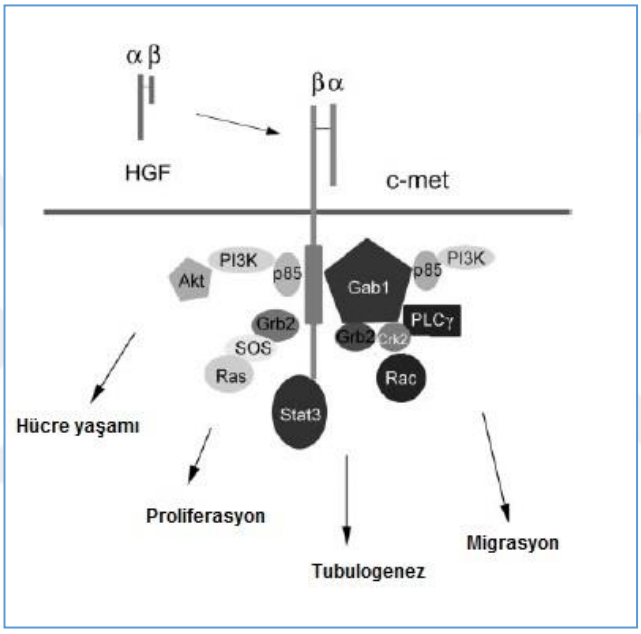
fibroblastlarda kayıp sonucunda anemi ve interstisyel fibroz gelişebilmekte ve hipoksi ve tübülointerstisyel hasar arasında kısır döngü başlayabilmektedir (Kanwar ve ark. 2011).

2.8. Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF)

Doku fibrozu, organların kronik ve kalıcı hasarla karşı karşıya kaldıkları durumda vardıkları son ortak sonuçtur. Zararlı uyaranlardan etkilenen dokularda öncelikle onarma, hasardan kurtulma ve iyileşmeye yönelik bir dizi olay gerçekleşir. Bu yara iyileşmesi süreçleri, kemokin ve sitokinlerin üretim ve salgılanmalarını, hasarlı bölgelere enflamatuvar hücrelerin toplanmasını, ECM oluşturmak üzere fibroblast aktivasyonunu, hücre çoğalması ve farklılaşması yoluyla hasarlı dokunun yenilenmesini ve son olarak da, matriksin yeniden modellenmesini kapsamaktadır. Bununla birlikte, kronik hasarlı dokularda maladaptasyon ve aşırı ECM üretimi sonucunda dokuda fibrotik lezyonlar ve skarlaşma meydana gelmektedir. Dokunun hasarlanmasından sonra birçok faktörün fibrojenik süreçde yer aldığı bilinmektedir. Bu faktörler arasında TGFβ-1, prosklerotik bir sitokin olarak merkezi konumdadır. Son çalışmalar, HGF'nin, intrinsik antifibrotik faktör olduğunu ve doğrudan TGF-β1'in profibrotik etkilerini antagonize ettiğini göstermektedir (Liu, 2004). Önceki çalışma bulguları, HGF'nin embriyonik gelişimde ve akut hasarlanma sonrası doku yenilenmesinde yer aldığı yönünde olmasına rağmen (Michalopoulos ve DeFrances 1997; Matsumoto ve Nakamura 2001), yeni bulgular çeşitli hayvan modellerinde doku fibrozunun önlenmesinde HGF'nin rol oynadığını ortaya koymaktadır. Böbrek de dahil olmak üzere çok çeşitli organlarda, HGF'nin fibrotik doku lezyonlarını inhibe etme yeteneği gösterilmiştir. HGF proteini ya da HGF gen tedavisinin çeşitli nedenlerle meydana gelen KBH'da böbrek fonksiyonlarının ilerleyici kaybını önlediğini gösteren kanıtlar giderek çoğalmaktadır. HGF sinyal yolunun nötralizan bir antikor tarafından bloke edilmesi sonucunda renal fibroz ve fonksiyon bozukluklarının ilerlemesi belirgin bir biçimde hızlanmaktadır. Bu bulgular eksojen HGF'nin kronik böbrek yetmezliği ile mücadelede etkin bir strateji olabileceğini göstermektedir (Liu, 2004).

Çok fonksiyonlu bir polipeptid olan HGF, 1980'lerin sonlarında hepatosit çoğalmasını ve karaciğer rejenerasyonunu sağlayan özel bir protein olarak tanımlanmıştır (Michalopoulos ve DeFrances 1997; Matsumoto ve Nakamura 2001; Liu 2002). HGF, bir adet disülfid bağı ile bağlı α (69 kDa) ve β (34kDa) zincirlerinin

oluşturduğu heterodimerik bir glikoproteindir. Heparin bağlama özelliği vardır. Biyolojik etkilerine, *c-met* protoonkogen ürünü ve reseptör tirozin kinaz süper ailesinin bir üyesi olan tek bir c-met reseptörü aracılık eder. HGF bağlayan **c-met** reseptörü tirozin otofosforilasyonu ile uyarılır; fosforillenmiş tirozinlere Src homolojisi gösteren domenlere sahip, PI-3K'nın p85/p110 alt-birimleri, Grb-2/ Sos/ Ras kompleksi, PLC-γ ve multiadaptör protein olan Gab-1 gibi çeşitli sinyal transdüksiyon proteinleri bağlanır. HGF, hücresel canlılık, çoğalma, göç ve tübülogenez gibi süreçleri düzenler (Liu, 2004). (Şekil 2.30)



Şekil 2.30: Böbrek hücrelerinde HGF sinyal yolları (Liu, 2004).

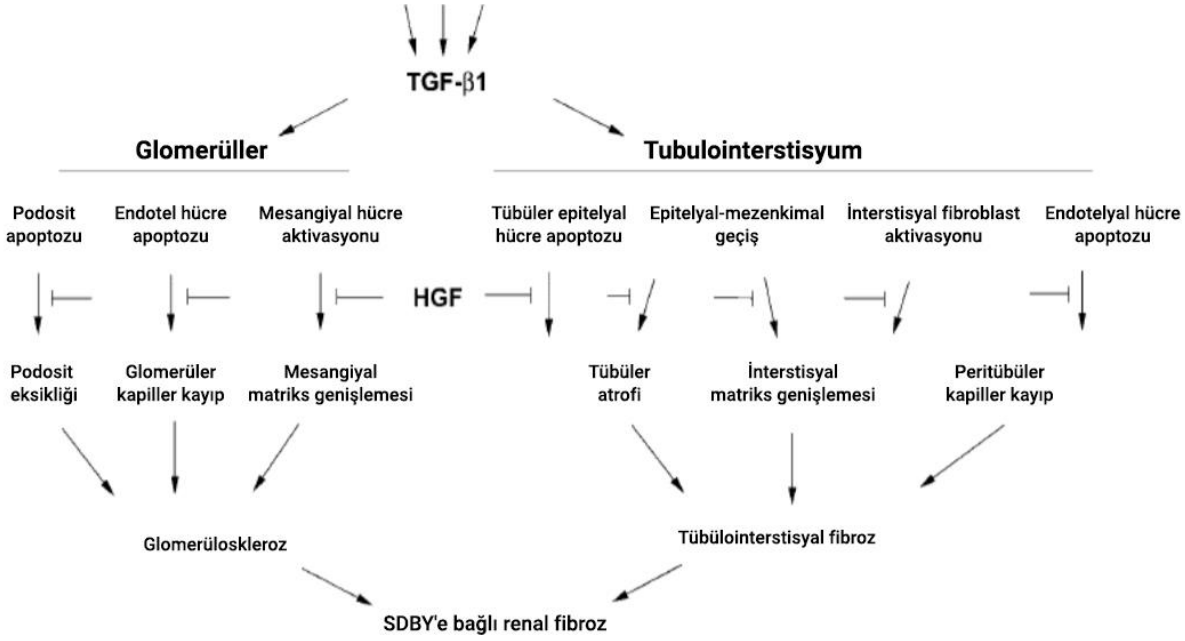
HGF esas olarak, endotel hücreleri, mesangial hücreler ve fibroblastlar gibi non-epitelyal hücrelerde üretilmesine rağmen, c-met reseptörü, hemen hemen her tür böbrek hücresinde yapısal olarak eksprese edilmekte olup; C-met reseptör ekspresyonunu kontrol altında tutan başlıca transkripsiyon faktörü Sp ailesinin bir üyesidir (Zhang ve Liu 2003; Zhang ve ark 2003). HGF böbrekte çeşitli hedef hücrelerde çeşitli biyolojik etkiler göstermektedir. Glomerüler mesangial hücreler, podositler, proksimal tübülüs hücreleri, toplayıcı kanal epitel hücreleri ve interstisyel fibroblastlar dahil olmak üzere, test edilen tüm böbrek hücrelerinde, HGF'nin etkili olduğu bilinmektedir (Liu, 2004).

2.8.1. HGF ve TGFβ-1

In vitro çalışmalar, HGF'nin, TGF-β1'in birçok profibrotik eylemini dengelediğine işaret eder. HGF ve TGF-β1 arasındaki bu dengenin, kronik böbrek fibrozu patogenezinde belirleyici bir rol oynaması olasıdır. Geniş anlamda, HGF ve TGF-β1, karşıt eylemleri ortaya çıkaran yin – yang gibi fonksiyon gören doku fibroz sinyalleridir (Liu 2004). Doku hasarı sonrası ilk dönemde hem HGF'nin ve hem de TGF-β1'in uyarılması, her ikisinin de yara iyileşmesi ve doku onarımında gerekli ve önemli olduğunu göstermektedir. Eğer zararlı uyaran akut atak sonrası durumda olduğu gibi geçici ise, HGF sinyalinin etkinliğinde doku onarımı ve rejenerasyonu ve hatta tamamen iyileşme olacaktır. Bu durumda, TGF-β1 ekspresyonu sadece onarıcı aşamada matriksin yeniden modellenmesi için değil, aynı zamanda iyileşme sonrasında HGF aktivitesinin negatif modülasyonu için de çok önemlidir. Öte yandan, eğer hasar kronik ise, TGF-β1 ekspresyonu tüm hasar süreci boyunca kademeli olarak artarken HGF başlangıçta artar, ancak daha sonra muhtemelen TGF-β1 tarafından inhibisyon nedeniyle yavaş yavaş azalmaya başlar ve kronik hasar varlığında TGF-β1 ve HGF arasındaki denge net olarak profibrotik TGF-β1 lehine kayar. Hasar sürecinin uzunluğu TGF-β1 / HGF oranını ve doku yanıtlarının nihai sonuçlarını büyük ölçüde belirlemektedir (Mou ve ark. 2009). Hastalıklı böbrekteki TGF-β1 hiperaktivitesi birçok nedenle ortaya çıkabilmektedir. TGF-β1 ekspresyonunun indüksiyonu bu nedenlerden sadece biridir. Çalışmalar, TGF-β1 proteininin posttranslasyonel aktivasyonunun ve perisellüler bölgede latent kompleksden salınımının, patolojik koşullarda arttığını göstermektedir. Ayrıca, hastalıklı böbrekte arttığı bilinen TGF-β1 izoformlarının tüm böbrek hücreleri üzerinde fibrojenik etkiler sergiledikleri ve karşılıklı olarak birbirlerinin ekspresyonlarını uyardıkları saptanmıştır. Buna ek olarak, TGF-β1 reseptörleri hastalık varlığında indüklenmektedir. Son çalışmalar fibrotik böbreklerde Smad transkripsiyonel korepresörleri olan SnoN ve Ski proteinlerinde belirgin *down-regülasyon* olduğunu ortaya koymaktadır. Bu farklı düzeylerdeki çoklu düzenlemenin varlığına bağlı olarak, TGF-β1 sinyal yolunda aktivasyon, fibrotik böbrekte TGF-β1 / HGF dengesinin büyük ölçüde kaymasına neden olmaktadır. Dengelenmemiş TGF-β1 aktivitesi, hasarlı dokuda miyofibroblast aktivasyonu ve apoptozun uyarılması gibi profibrotik etkileri göstermektedir. TGF-β1'in renal interstisyel fibroblastlar ve glomerüler mesangial hücreleri uyarmasına bağlı olarak miyofibroblastik aktivasyon ile α-SMA ekspresyonu indüklenmekte ve aşırı miktarlarda ECM bileşenleri oluşmaktadır.

Aynı zamanda, TGF-β1 EMT'yi indüklemekte ve fenotipik dönüşüm sonucunda matriks-üreten efektör hücreler çoğalmaktadır. TGF-β1 böbrek hücrelerinin apoptoza girmelerini indükleyebildiği gibi apoptozu da kuvvetlendirebilmektedir; bu durum podosit ve kapiller kaybına ve tübüler atrofiye neden olmaktadır. Bu etkileri ile TGF-β1 en sonunda doku fibrozuna yol açmaktadır. Bunun aksine, HGF doğrudan TGF-β1 etkilerine karşı etki göstererek doku onarımını sağlar; bu bağlamda, HGF aktivasyonundaki herhangi bir kusurun yıkıcı sonuçlar doğurabileceği düşünülmelidir. Şekil 2.31'de TGF-β1'nin hangi etkilerini HGF'in antagonize ettiği görülmektedir (Liu, 2004).

HGF ve TGF-β1 etkileri arasındaki zıtlık, bu iki sitokinin karşılıklı olarak birbirlerini düzenlemelerinde de görülmektedir. *In vitro* bulgular TGF-β1'in fibroblast ve mesangial hücrelerde HGF ekspresyonunu baskıladığını doğrulamaktadır (Yo ve ark. 1998). Benzer şekilde, in vitro ve in vivo hasta böbreklerde HGF'nin, TGF-β1 indüksiyonunu ortadan kaldırdığı bilinmektedir (Mizuno ve ark. 2001; Yang ve Liu 2002). TGF-β1 ekspresyonunun ve/veya aktivitesinin inhibisyonu fibrotik lezyonların azaltılmasında faydalıdır . Liu'nun 2004 yılında yayınladığı derlemedeki çeşitli hayvan modellerinde eksojen HGF'nin kronik böbrek fibrozunun ilerlemesini önlediği gösterilmiştir (Liu, 2004). ECM yıkımında yer alan proteazları HGF'nin indüklediği gösterilmiştir. MMP ekspresyonunudaki artış HGF tarafından dokulardaki fibrotik değişimi baskılamak ve/veya fibrozun çözeltisini kolaylaştırıcı bir mekanizmadır. HGF aracılı 3-D epitelyal tubülogenez dallanmada ürokinaz tipi plazminojen aktivatörünün aktivasyonu ve membran tip-1 MMP çok önemli rol oynamaktadır (Nakamura ve ark. 2011). Ürokinaz plazminojen aktivatör reseptörü eksik (uPAR-/-) farelerde tek zincirli pro-HGF'nin, iki zincirli aktif forma dönüşümünde bozukluk olduğu ve obstrüktif yaralanma sonrasında görülen renal fibroz artışında bu durumun kısmen sorumlu olabileceği düşünülmüştür (Liu, 2004).



Şekil 2.31: Renal fibrozun HGF tarafından inhibisyonuna yol açan hücresel mekanizmalar (Liu, 2004).

Çeşitli tedavi ajanlarının etkileri, TGF-β1 ve HGF arasındaki denge üzerine olan etkileri ile ilişkili olabileceği düşünülebilir. Örneğin, böbrek koruyucu etkili oldukları bilinen vitamin D analoglarının bu etkilerine büyük bir ihtimalle HGF gen ekspresyonunun uyarılması aracılık etmektedir. Benzer şekilde östrojenler HGF ekspresyonunda *up-regülasyon* yaparak renal fibroz ve renal işlev bozukluğunun ilerlemesini azaltmada rol oynamaktadır. Ang II'nin, TGF-β1'i indükleyici ve HGF ekspresyonunu inhibe edici faaliyetleri gösterilmiştir; bu nedenle, klinikte anti-Ang II ile tedavi etkinliğinin kısmen TGF-β1 ve HGF regülasyonları ile ilgili olduğu düşünülmüştür. Kronik fibrotik hastalıkların çeşitli tedavi stratejilerinde ortak hedefin profibrotik TGF-β1 ve antifibrotik HGF arasındaki hassas dengenin korunması olduğu görünmektedir (Liu, 2004).

Yeni çalışmalar, KBH'da HGF'nin hangi moleküler mekanizmalarla TGF-β1'i antagonize ettiği konusunda aydınlatıcı bilgiler vermektedir. HGF'nin, farklı tipte böbrek hücrelerinde farklı mekanizmalarla TGF-β1 ile uyarılan Smad sinyal yolunu engelleyebildiği gösterilmiştir. HGF, interstisyel fibroblastlarda Smad'ların nükleer translokasyonlarını engellemekte; glomerüler mesangial hücrelerde Smad ko-represörü

TGIF'in yıkılmasını engellemekte ve tübüler epitel hücrelerinde Smad ko-represörü SnoN ekspresyonunu indüklemektedir (Liu, 2004).

HGF'nin, hücre canlılığı üzerine hücre tipine bağımlı ve iki-yönlü düzenleyici etki göstermesi dikkat çekicidir. Sıçanlarda karaciğer sirozu modellerinde, HGF'nin hepatositlerde apoptozu baskıladığı fakat doku fibrozundan sorumlu hücreler olan α-SMA miyofibroblastlarda apoptozu kolaylaştırdığı saptanmıştır (Kim ve ark. 2005). Endojen HGF nötralizasyonunun hepatositlerde apoptoz / nekroz oranını arttırdığı ve / veya karaciğer rejenerasyonunu baskıladığı saptanmıştır. HGF'nin hepatotrofik rolü, koşullu *knockout* fareler kullanılarak kesin olarak gösterilmiştir; hepatositlerinde met geni eksik farelerin agonistik anti-Fas antikorunun düşük dozlarına bile aşırı duyarlı oldukları ve hafif karaciğer yaralanması şeklinde yanıt verdikleri tespit edilmiştir. Bu farelerde, inatçı enflamatuvar reaksiyon, karaciğer rejenerasyonunda gecikme ve karaciğerde fibrotik değişime duyarlılık gözlenmiştir. Aynı şekilde, hepatosite özgü met -/- farelerde safra kanalı ligasyonu ile oluşturulan kronik kolestatik karaciğer hasarında hepatositte apoptoz, enflamasyon ve profibrojenik tepkilerde artış görülmüş, kontrol fareler ile karşılaştırıldığında kronik enflamasyon ve fibroza yatkınlığın daha fazla olduğu saptanmıştır (Giebeler ve ark. 2009). Bu bulgular, karaciğerin rejenerasyonu, enflamasyon veya fibroza karşı korunmasında HGF-met yolunun fizyolojik önemini ortaya koymaktadır; diğer büyüme faktörleri, sitokinler ve biyoaktif moleküller HGF yerine geçemezler. HGF'nin hepatotrofik ve hepatoprotektif rolleri son yirmi yılda tam olarak anlaşılmıştır . Karaciğere benzer şekilde, farklı dokularda da, HGF-met yolunun doku korunması ve / veya yenilenmesindeki rolü gösterilmiştir; ancak, doku tiplerine bağlı olarak bu yola olan bağımlılığın farklılıklar gösterdiği de ortaya çıkmıştır. HGF-met yolu böbrek, akciğer, sinir sistemi, kalp-damar sistemi, deri ve mide-bağırsak sistemi dokularının korunmasını ve rejenerasyonunu desteklemektedir (Nakamura ve ark. 2011). Böbrek toplayıcı kanallarında *met-knockout* farelerin, ünilateral üreter tıkanıklığı sonrasında interstisyel fibroz ve tübüler nekroza daha duyarlı oldukları ve tıkanmanın ortadan kaldırılması ile tübüler hücre rejenerasyon kapasitesinin ve fonksiyonel iyileşmenin azalmış olduğu gözlemlenmiştir (Ma ve ark. 2009). Podositlerinde *met-knockout* farelerde, pataloji saptanmamış, fakat kontrol farelerle karşılaştırıldığında, podosit apoptozunun ve albuminürinin daha ağır olduğu saptanmıştır (Dai ve ark 2010). Pankreatik β-hücrelerinde *met-knockout* farelerde, glukoz yüklemesinden sonra plazma insülin düzeyinin önemli ölçüde azalmış olduğu

saptanmış fakat total hücre kütlesi, adacık morfolojisi veya hücre proliferasyonunda değişiklik gözlenmemiştir. Kontrol β-hücreleri ile karşılaştırıldığında, met-/- *knockout* fare β-hücrelerinde, *in vitro* olarak glukoz ile uyarılan insülin salgılanmasında %50 azalma görülmüştür. β-hücrelerinde *met-/-knockout* farelerde yapılan bir başka çalışmada, glukoza yanıt olarak orta derecede hiperglisemi ve akut fazdaki insülin salgılanmasında tam bir kayıp görülmüştür. Bu nedenle, β-hücrelerindeki HGF-met sinyal yolunun hücre büyümesi için gerekli olmadığı, ancak glukoz ile uyarılan insülin salgılanması ve glukoz homeostazı için gerekli olduğu sonucuna varılmıştır (Nakamura ve ark. 2011).

2.8.2. AGE'lerin otofajik klirensleri ve HGF

Otofaji, sitoplazmik proteinleri yıkılmak üzere lizozomlara taşıyan ana yoldur. Son zamanlarda, otofajinin, agregasyona eğilimli oldukları bilinen, Huntington hastalığındaki poliglutamin-ile modifiye huntingtin proteini, Alzheimer hastalığındaki amiloid β-proteini ve diyabette oksidatif strese bağlı agrege sitoplazmik proteinler gibi çeşitli proteinlerin klirensinde önemli olduğu bildirilmiştir. HGF indüksiyonunun otofaji ile AGE klirensini sağladığı ve diyabetik vasküler komplikasyonların iyileştirilmesinde rolü olduğu öne sürülmüştür (Peng ve ark. 2011).

2.8.3. Kronik Böbrek Hastalığı ve Antienflamatuvar HGF Etkisi

KBH'nın birçok formu, önemli derecede morbidite ve mortalite riski taşıyan SDBY'e doğru hızlı ilerleme göstermektedir. Bu hastalık formlarını başlatan etmenler değişmekle beraber, tüm böbrek hastalıklarına sekonder gelişen süreçlerin çok yaygın görüldüğü genel kabul görmektedir. Nefron kaybı, progresif glomerüloskleroz ve tübülointerstisyel fibroz ile ilerleyen bir kısır döngü oluşmaktadır (Remuzzi 1998; Eddy 2000; 2005). Böbrek enflamasyonu hastalığın ilerlemesinde anahtar sekonder süreçlerden biridir. Vasküler endotel aktivasyonu böbrek parankimasında enflamatuvar hücrelerin toplanmasında meydana gelen erken ve kaçınılmaz bir olaydır. KBH'da, anti-endotel hücre antikorları, dislipidemi ve AGE'ler gibi spesifik patojenik uyaranlar ile TNF-α, IL-1 gibi çok sayıda çözünür medyatörün aşırı üretimleri ile birlikte renal vasküler endotel hücre aktivasyonu ve pro-enflamatuvar fenotipe geçişi önemlidir. Aktif endotel hücreleri, çok sayıda adhezyon molekülünü eksprese ederek,

enflamasyonlu bölgeye lökosit geçişini kolaylaştırmaktadır. Yuvarlanma, yapışma, diyapedez ve kemotaksi ile ilerleyen bu süreçte ilk adım yuvarlanmadır ve lökositlerin marjine olarak aktif endotele tutunmaları için gereklidir (Gong ve ark. 2006). Yuvarlanmada adhezyon moleküllerinin selektin ailesi rol oynar; bunlar endotel, trombosit ve lökosit hücrelerine ait E-selektin, P-selektin ve L-selektin molekülleridir. P-selektin ve L-selektin yapısal olarak eksprese edilmektedir; *de novo* ekspresyonu sadece proenflamatuvar uyarı sonucunda gerçekleşen E-selektin ise lökosit trafiğinde çok önemli rol oynamaktadır (Ley 2003).Çok fonksiyonlu pleitropik bir büyüme faktörü olan HGF, remnant böbrek, ünilateral üreter tıkanıklığı ve DN de dahil olmak üzere çeşitli modellerde kronik böbrek hasarının iyileşmesini sağlar (da Silva ve ark. 2012). HGF'nin bu yararlı etkileri anti-apoptoz, matriks yıkımında artış ve EMT blokajı gibi çeşitli mekanizmalarla açıklanmıştır. Son zamanlardaki çalışmalar, HGF'nin doğrudan anti-enflamatuvar etkilere de sahip olduğunu ve bu etkinin böbrek koruyucu etkinliğinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. HGF'in, enflamatuvar bağırsak hastalığı ve hava yolları enflamasyonu da dahil olmak üzere böbrek dışı çeşitli hastalık modellerinde, akut ve kronik enflamasyonu iyileştirme özelliğine sahip olduğu bildirilmiştir (Gong ve ark. 2006).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmaya, Bağcılar Eğitim Araştırma Hastanesi Dahiliye Bölümü Nefroloji Polikliniği'nde "Amerikan Diyabet Derneği'nin (ADA)" 2009 tanı kriterlerine göre tip 2 DM tanısı ile takip ve tedavi edilen 26 kadın ve 32 erkek olmak üzere 58 hasta; 9'u kadın 19 sağlıklı birey dahil edildi. Gestasyonel DM, kronik karaciğer hastalığı, kronik renal yetmezliği, kanser, nörolojik ve psikiyatrik hastalığı bulunanlar, ciddi sistemik enfeksiyonu, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, herhangi bir endokrin hastalığı (Cushing sendromu, hipotrioidi, hipertiroidi, hiperprolaktinemi, akromegali v.s.), genetik hastalığı (Down sendromu, Klinefelter sendromu, porfiriya v.s.), klinik kardiyovasküler hastalığı (ilerleyen semptomatik iskemik kalp hastalığı, periferik arter hastalığı ve ciddi karotis darlığı) olanlar ve son 6 ay içinde akut kardiyovasküler olay geçiren hastalar araştırmaya dahil edilmedi. Hastalara araştırma süresince özel bir diyet uygulanmadı. Kilo, boy ve sistolik ve diyastolik kan basınçları ölçülerek fiziksel muayeneleri yapıldı. Nisan 2013- Ocak 2014 süresi içinde örnek toplama işlemi tamamlandı.

Tüm kan örnekleri 8-12 saat açlıktan sonra sabah 08:00-10:30 arasında antekübital venden alındı. Biyokimya ve hormon testleri için örnekler jel ayıraçlı tüplere (Becton Dickinson) alındı.

Ayırılan serum örnekleri Bağcılar Eğitim Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı'nda aynı gün ilk üç saat içinde Roche Modular Analytics Cobas 8000 Immunoassay analizöründe açlık kan şekeri, üre, kreatinin ürik asit, total protein, albumin fotometrik metotla, insülin ve C-peptid elektrokemilüminesans immunoassay (ECLIA) tekniği kullanılarak ölçüldü.

HbA1c, EDTA'lı tüplere (Becton Dickinson) alınan tam kan örneklerinde yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile Adams A1c HA-8180 analizöründe ölçüldü.

AGE, TGF-β1 ve HGF analizleri için mikrosantrifüj tüplerine bölünen serum örnekleri analiz yapılıncaya kadar –80°C'da saklanıp, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Fikret Biyal Merkez Araştırma Laboratuvarı'nda manüel yöntemlerle (ELISA) analizler yapıldı.

Kan örneklerine paralel olarak alınan spot idrar örnekleri 1000 g de 5 dakika santrifüj edildikten sonra mikroalbuminüri ve kreatinin konsantrasyonları üç saat içinde

Roche Modular Analytics Cobas 8000 analizöründe türbidimetrik yöntemle ölçülmüştür. AGE analizi için ayrılan idrar örnekleri ise –80°C'da saklandı.

3.1. Gereçler

Enjektör

8 mL'lik jelli kuru ve 2 mL'lik EDTA'lı kan alma tüpleri

Mikrosantrifüj tüpleri

5 mL ve 10 mL dereceli pipet

5 µl- 1000 µl ayarlanabilir tek kanallı mikropipetler ve tek kullanımlık uçları

50 µl ile 300 µl ayarlanabilir çok kanallı mikropipetler ve tek kullanımlık uçları

Santrifüj (Janetzki T30)

Santrifüj (Universal 320R Hettich Zentrifugen)

Buzdolabı (Beko)

-20 °C derin dondurucu (Indesit)

Distile su cihazı (GFL)

Etüv (Heraus)

Mikroplaka çalkalayıcı

Çok kanallı otomatik ELISA yıkama sistemi yıkayıcısı (Elx50 Auto Strip Washer Bio-Tek Instruments Inc)

ELISA okuyucusu (450 nm, referans dalga boyu 620 nm) (Elx800 Bio-Tek Instruments inc.)

Yazıcı (hp Laser Jet 1010)

ANALİZ KİTLERİ

Advanced Glycation End- Products ELISA kiti (BIOMATIK)

HGF ELISA kiti (e-Bioscience)

TGF-β1 ELISA kiti (e-Bioscience)

3.2. Yöntemler

3.2.1. TGF-β1 analizi

Prensip: Kuyucuklar anti-insan TGF- β1 antikoru ile kaplıdır. Örnek veya standart kuyucuklara konulur ve inkübe edilir. TGF-β1 kuyucuklardaki antikora bağlanır; inkübasyondan sonra yıkama yapılır, biyotin ile konjuge anti-insan TGF-β1

antikoru eklenir ve inkübe edilir. Biyotin ile konjuge anti-insan TGF-β1 antikoru, ilk antikor tarafından yakalanan TGF-β1'e bağlanır. Yıkama yapılır, streptavidin-HRP eklenir ve inkübe edilir. Yıkama yapılır, HRP substratı eklenir ve inkübe edilir. TGF-β1 ile orantılı miktarda renkli ürün oluşur. Asit ilavesi ile reaksiyon durdurulur 450 nm'de absorbans ölçülür. Çizilen standart kalibrasyon eğrisinden TGF-β1 konsantrasyonu belirlenir.

Kit Reaktifleri

İnsan TGF-β1 monoklonal antikoru ile kaplı 96 kuyucuklu plaka

Anti-insan TGF-β1 poliklonal antikoru biyotin konjugatı: Temiz bir plastik tüpte 0.12 mL biyotin konjugatı üzerine 11.88 mL deney tampon çözeltisi katılarak, 1:100 oranında seyreltildi

Streptavidin-HRP: Bir plastik tüpte 0.12 mL streptavidin-HRP üzerine 11.88 mL deney tampon çözeltisi katılarak, 1:100 oranında seyreltildi.

İnsan TGF- β1 standard çözeltisi: Liyofilize standart üzerine 650 µl distile su eklendi, hafifçe karıştırılarak tam olarak çözünmesi sağlandı. 10-30 dakika sonra kullanıldı. (4 ng / mL)

Derişik (20x) deney tampon çözeltisi (PBS içinde %1 Tween 20 ve %10 BSA): seyreltilerek deney tampon çözeltisi hazırlandı. 5 mL derişik çözelti distile su ile 100 mL'e seyreltildi. 2-25°C arasında saklandı.

Derişik (20x) yıkama çözeltisi (PBS, %1 Tween 20 ile) seyreltilerek yıkama çözeltisi hazırlandı. 50 mL derişik çözelti distile su ile 1000 mL'e seyreltildi. 2°C - 25°C arasında saklandı.

1N HCI

1 N NaOH

Substrat çözeltisi: Tetrametil-benzidin çözeltisi (TMB)

Durdurma çözeltisi (1 M Fosforik asit)

6 adet yapışkan film

Kit 2°C - 8°C arasında saklandı.

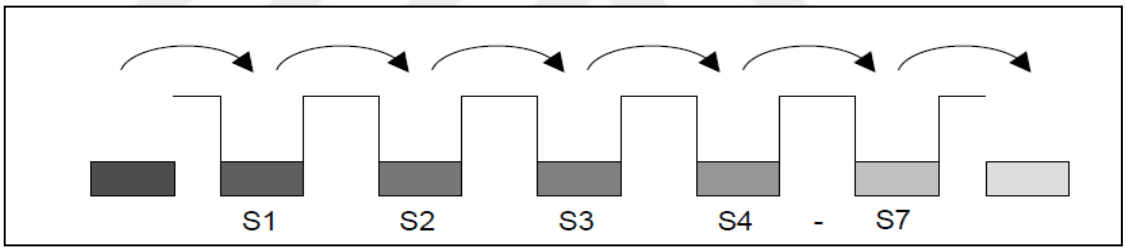
Test Protokolü:

1.Örnek hazırlanması: 20 µl serum üzerine 180 µl deney tampon çözeltisi eklenerek serum örnekleri 1:10 oranında seyreltildi. 200 µl seyreltilmiş örneğe 20 µl 1N HCI eklenerek oda ısısında (18 °C - 25 °C) 1 saat inkübe edildi. 20 µl 1N NaOH eklenerek nötralize edildi.

2.Plakada yer alan kuyucuklara kör (2x), standart (2x) ve serum örneklerinin hangi şablona göre uygulanacakları belirlendi.

3.Kuyucuklara ~ 400 µl yıkama çözeltisi eklendi, 10-15 saniye beklendikten sonra yıkandı. Yıkama tamponunun fazlasının uzaklaştırılması için kağıt havlu üzerine plaka ters çevrildi ve kuyucukların kurumasına izin verilmeden uygulamaya devam edildi.

4.Standart örneklerinin hazırlanması : Yedi tüp S1, S2, S3, S4, S5, S6 ve S7 olarak etiketlendi ve her tüpe 225 µl tampon çözelti konuldu. Stok standart çözeltiden 225 µl S1'e konuldu, karıştırıldı ve daha sonra, aşağıda gösterildiği gibi, 1:2 oranında seri seyreltme yapıldı. Tampon çözelti kör olarak kullanıldı.



5.Standart kuyucuklarına S1-S7 standart çözeltilerinden 100 µl pipetlendi.

6.Kör kuyucuklarına 100 µl tampon çözeltisi pipetlendi.

7.Örnek kuyucuklarına 60 µl tampon çözelti ve ön işlem uygulanmış örnekten 40 µl pipetlendi.

8.Plaka yapışkan tabaka ile örtülüp mikro çalkalayıcı (400 rpm) üzerinde 2 saat oda sıcaklığında de inkübe edildi.

9.Yapışkan tabaka kaldırıldı, kuyucuklar aspire edildi. Kuyucuklar yıkama çözeltisi ile beş kez yıkandı.

10.Kuyucuklara biyotin konjugatından 100 µl eklendi.

11.Plaka yapışkan tabaka ile kapatılıp, mikro çalkalayıcı üzerinde, oda ısısında bir saat inkübe edildi.

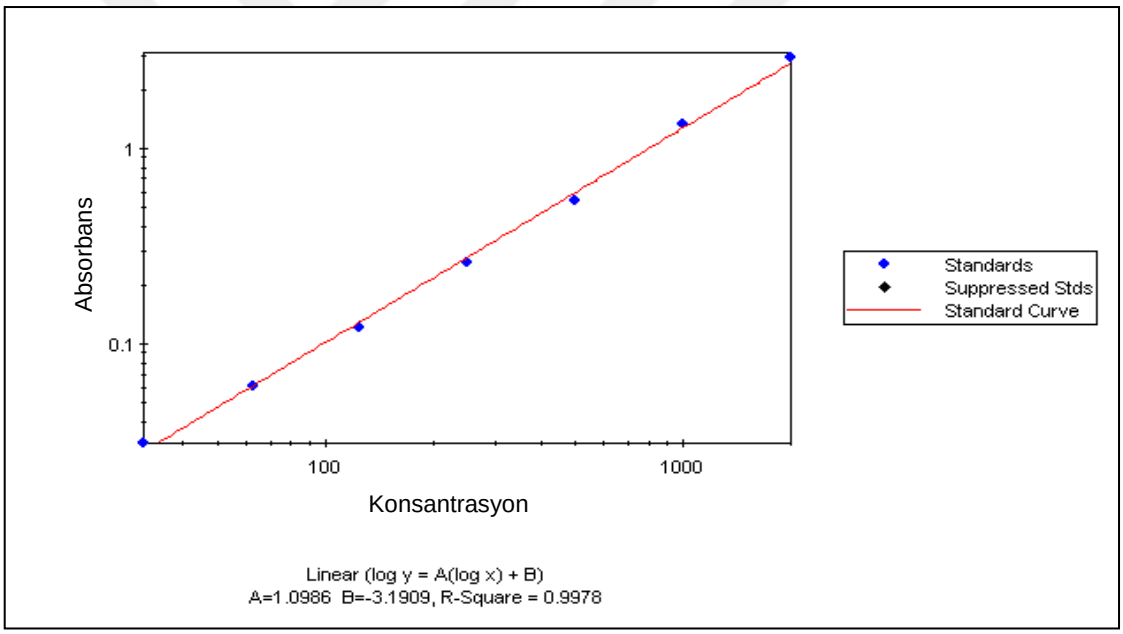
12.Yapışkan tabaka kaldırılıp kuyucuklar aspire edildi, beş kez yıkama işlemi yapıldı.

13.Kuyucuklara 100 µl Streptavidin-HRP pipetlendi. Plaka yapışkan tabaka ile örtülüp, mikro çalkalayıcı üzerinde, oda ısısında bir saat inkübe edildi. Yapışkan tabaka kaldırılıp kuyucuklar aspire edildikten sonra beş kez yıkama işlemi yapıldı.

14.Tüm kuyucuklara 100 µl TMB substrat çözeltisi pipetlendi ve oda ısısında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sırasında doğrudan ışık maruziyetinden kaçınıldı.

15.En yüksek konsantrasyonlu standart kuyucuğunda (S1) koyu mavi renk oluştuğu anda 100 µl durdurma çözeltisi eklenerek enzimatik reaksiyon durduruldu ve 450 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Referans dalga boyu: 620 nm (610-650 nm).

16.Hesaplama : Standart ve örneklerde ölçülen absorbans değerlerinden kör için ölçülen absorbans değeri çıkarıldı. Standart konsantrasyonları x-eksenine, absorbans değerleri y-eksenine yerleştirilerek 4-parametreli lojistik fonksiyon kalibrasyon eğrisi çizildi. Örneklerdeki TGF-β1 konsantrasyonu eğriden yararlanılarak hesaplandı.



Şekil 3.1: TGF-β1 standart kalibrasyon eğrisi

3.2.2. HGF analizi

Prensip: Kuyucuklar anti-insan HGF antikoru ile kaplıdır. Örnek veya standart kuyucuklara konulur ve inkübe edilir. HGF kuyucuklardaki antikora bağlanır; inkübasyondan sonra yıkama yapılır, biyotin ile konjuge anti-insan HGF antikoru eklenir ve inkübe edilir. Biyotin ile konjuge anti-insan HGF antikoru, ilk antikor tarafından yakalanan HGF'ye bağlanır. Yıkama yapılır, streptavidin-HRP eklenir ve

inkübe edilir. Yıkama yapılır, HRP substratı eklenir ve inkübe edilir. HGF ile orantılı miktarda renkli ürün oluşur. Asit ilavesi ile reaksiyon durdurulur 450 nm'de absorbans ölçülür. Çizilen standart kalibrasyon eğrisinden HGF konsantrasyonu belirlenir.

Kit Reaktifleri

İnsan HGF monoklonal antikoru ile kaplı 96 kuyucuklu plaka

Anti-insan HGF poliklonal antikoru biyotin konjugatı (liyofilize)

Streptavidin-HRP (liyofilize)

2 adet insan HGF standard stripi (Renklendirilmiş)

Derişik (20x) yıkama çözeltisi (PBS,%1 Tween 20 su ile) seyreltilerek yıkama çözeltisi hazırlandı. 25 mL derişik çözelti distile su ile 500 mL'e seyreltildi. 2°-25°C arasında muhafaza edildi.

Substrat çözeltisi (tetrametil-benzidin) (12 mL)

Durdurma çözeltisi (1 M Fosforik asit) (15 mL)

2 adet yapışkan film

Saklama Koşulları: ELISA plakası ve standart örnekler -20° C'de, kit reaktifleri 2°-8° C arasında saklandı.

Test Protokolü:

1. Plakada yer alan kuyucuklara kör (2x), standart (2x) ve serum örneklerinin hangi şablona göre uygulanacakları belirlendi.

2. A1, A2 standart stripleri ve H1, H2 işaretli kör striplerinde belirtilen hacimlerde distile su standart ve kör kuyucuklarına konuldu.

3. Örnek kuyucuklarına 100 µl distile su eklendi.

4. Her bir örnekten 50 µl, belirlenmiş kuyucuklara ilave edildi

5. Yapıştırıcı film ile örtülüp mikro-plaka karıştırıcı üzerinde 3 saat süre ile oda sıcaklığında inkübe edildi. (Çalkalamak testin performansı için kesinlikle gereklidir.)

6. Yapışkan film çıkarılıp kuyucuklar boşaltıldı. Kuyucuklar altı kez, kuyucuk başına yaklaşık 400 µl'lik yıkama tamponu ile yıkandı. Aspirasyon öncesinde 10-15

saniye yıkama tamponunun kuyulara oturması için beklendi. Son yıkamadan sonra, fazla yıkama tamponununun kalmaması için kağıt havlu üzerine plaka ters çevrildi.

7. Kuyucuklara biyotin konjugatından 100 µl eklendi.

8. Plaka yapışkan tabaka ile kapatılıp, mikro çalkalayıcı üzerinde, oda ısısında bir saat inkübe edildi.

9. Yapışkan tabaka kaldırılıp kuyucuklar aspire edildi, ve 6. basamaktaki gibi altı kez yıkama işlemi uygulandı.

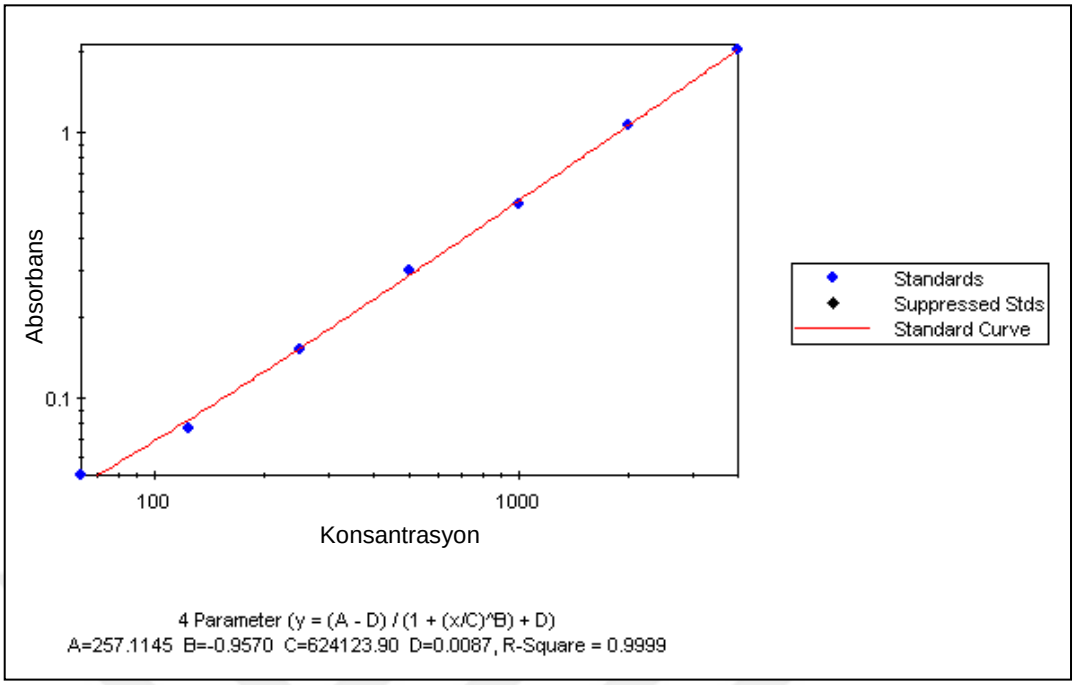
10. Kuyucuklara 100 µl Streptavidin-HRP pipetlendi. Plaka yapışkan tabaka ile örtülüp, mikro çalkalayıcı üzerinde, oda ısısında bir saat inkübe edildi. Yapışkan tabaka kaldırılıp kuyucuklar aspire edildikten sonra altı kez yıkama yapıldı.

11. Kör dahil tüm kuyucuklara 100 µl TMB çözeltisi eklendi.

12. Oda ısısında 30 dakika inkübe edildi. (doğrudan ışık maruziyetinden kaçınıldı.)

13. En yüksek standardın koyu mavi renge ulaştığı zamanda kör dahil tüm kuyulara 100 µl durdurma çözeltisi eklenip enzimatik reaksiyon durduruldu. Enzimin tamamen inaktive edilmesi için durdurma çözeltisinin kuyuda hızlı ve homojen yayılması çok önemlidir. Durdurma çözeltisinin eklenmesinden hemen sonra veya 2°-8°C'de karanlıkta bir saat bekletildiken sonra 450 nm de absorbans ölçümü yapıldı.

14. Hesaplama: Standart ve örnek absorbanslarından kör absorbansı çıkarıldı. Her bir standart konsantrasyonu x-eksenine, standart absorbansları y-eksenine yerleştirilerek 4-parametreli lojistik fonksiyon kalibrasyon eğrisi çizildi. Örneklerdeki HGF konsantrasyonu eğri kullanılarak hesaplandı.



Şekil 3.2: HGF standart kalibrasyon eğrisi

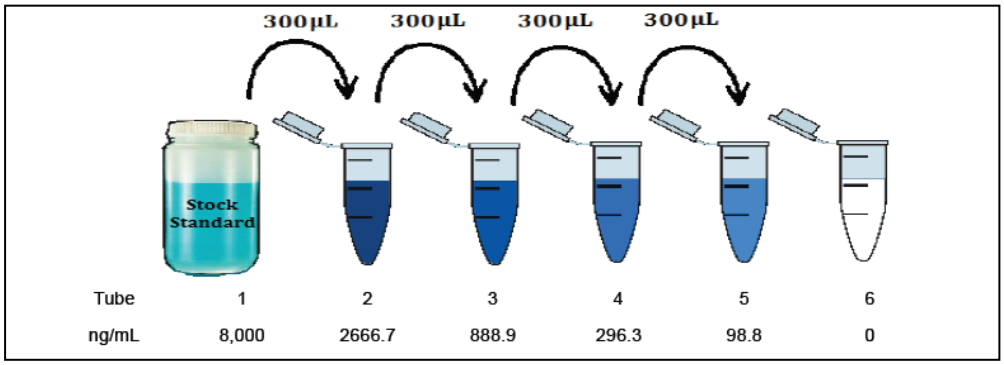
3.2.3. AGE analizi

Prensip : Yarışmalı inhibisyon tekniği uygulanmaktadır. Kuyucuklar AGE için spesifik bir antikor ile kaplıdır. HRP ile işaretli AGE ve işaretlenmemiş AGE kuyucuklara kaplı spesifik AGE antikorları ile bağlanmak için yarışmaya girerler. İnkübasyondan sonra, bağlanmamış olan HRP-AGE konjugatı yıkama ile uzaklaştırılır. Bağlı HRP örnekteki AGE konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Substrat çözeltisinin eklenmesinden sonra, ortaya çıkan rengin şiddeti örnekteki AGE konsantrasyonu ile ters orantılıdır.

Kit Reaktifleri:

İnsan AGE spesifik antikoru ile kaplı 96 kuyucuklu plaka

Standart (2 adet): 0,5 mL standart seyreltici ile standart seyreltildi, oda sıcaklığında 10 dakika beklenip, yavaşça çalkalandı (köpük oluşumu engellendi) Standart çözeltisindeki AGE konsantrasyonu 8.000 ng/ mL'dir. 0,6 mL standart seyreltici içeren 5 tüp hazırlandı ve aşağıda gösterildiği şekilde 3 kat seyreltme yapıldı. Her tüp bir sonraki transferden önce iyice çalkalandı. 8.000 ng / mL, 2666.7 ng/ mL, 888.9 ng/ mL, 296.3 ng/ mL, 98.8 ng/ mL konsantrasyonlu çözeltiler hazırlandı. Standart seyreltici içeren son tüp kör olarak kullanıldı (0 ng/ mL).



Saptama reaktifi A (biyotin ile işaretli) 1 x 120 µl: Kısa süre çalkalandı, 1:100 oranında seyreltme yapıldı.

Saptama reaktifi B (avidin bağlı HRP) 1 x 120 µl: Kısa süre çalkalandı, 1:100 oranında seyreltme yapıldı.

TMB substratı (1 x 9 mL)

Derişik yıkama tamponu (30x) 1 x 20 mL: Yıkama tamponu , 580 mL distile su ile seyreltilip ve 600 mL yıkama tamponu oluşturuldu.

Standart seyreltici 1 x 20 mL

Örnek seyreltici A 1 x 12 mL

Örnek seyreltici B 1 x 12 mL

Durdurma çözeltisi 1 x 6 mL

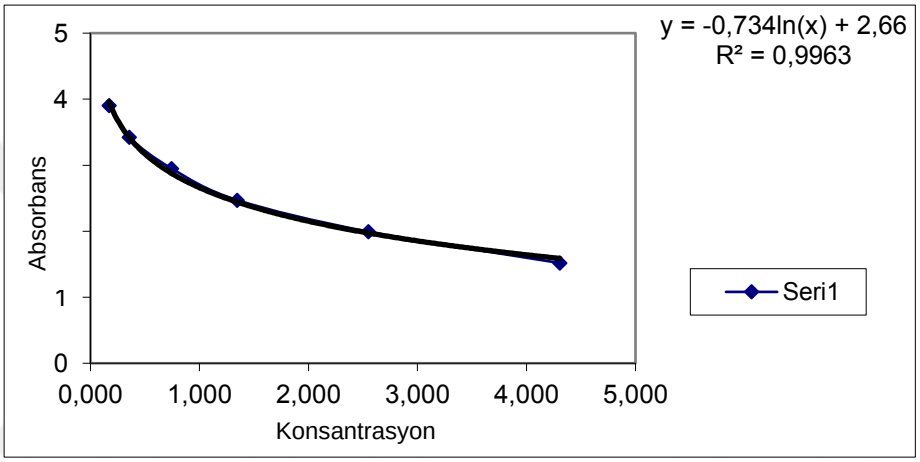
4 adet yapışkan film

Örneklerin konsantrasyonları hakkında çalışma öncesinde fikir sahibi olmak amacıyla, örnekler belli oranlarda PBS (pH=7.0-7.2) ile seyreltilerek pre-test çalışma yapıldı. Örneklerin seyreltilmeden çalışılmasına karar verildi.

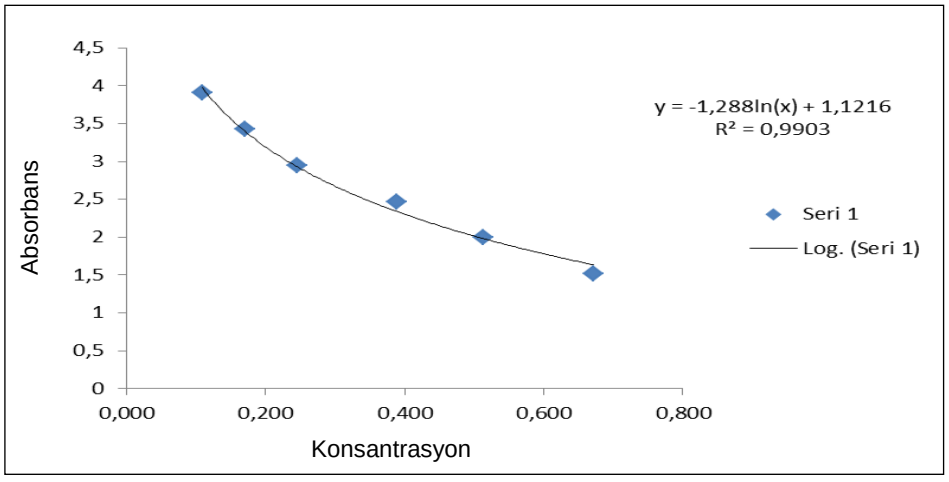
Test Protokolü:

1. Seyreltilmiş standart, kör ve örnekler için kuyucuklar belirlendi. Standartlar için 5, kör için 1 kuyucuk ayrıldı. Hazırlanan seyreltilmiş standartlar, kör ve serum/idrar örneklerinden 50'şer µl sırasıyla konuldu. Ardından ivedilikle, her birine biyotin ile işaretli saptama reaktifi A'dan 50 µl eklendi. Üzeri yapışkan film ile örtüldükten sonra mikroplaka çalkalayıcı kullanılarak hafifçe çalkalandı ve 37°C'de 1 saat boyunca inkübe edildi.
2. Kuyucuk içeriği aspire edildikten sonra çok kanallı pipet kullanılarak, her kuyucuk 350 µL 1x yıkama tamponu ile yıkandı ve 1-2 dakika bekletildi. Emici kağıda plakadaki tüm kuyucuklarda kalan sıvı tamamen emdirildi. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. Son yıkamadan sonra, yıkama tamponu aspirasyon ile uzaklaştırıldı. Plaka ters çevrilip emici kağıt vasıtasıyla kuruması sağlandı.
3. Her bir kuyucuğa 100 µL avidin bağlı HRP içeren saptama reaktifi B eklenip yapışkan film ile kaplandı ve 37°C'de 30 dakika süre ile inkübe edildi.
4. 2. adımda gerçekleştirilen, aspirasyon / yıkama işlemi 5 kez tekrarlandı.
5. Her bir kuyucuğa substrat çözeltisinden 90µL eklendi ve yeni yapışkan film ile örtüldü. Işıktan korunarak 37°C'de 15 – 25 dakika inkübe edildi. Substratın ilavesi ile renk maviye dönüştü.
6. Her bir kuyucuğa 50 µL durdurma çözeltisinin ilave edildi, rengin sarıya dönüştüğü gözlemlendi. Plakanın yan tarafına hafifçe vurularak içeriğin iyice karıştırılması sağlandı.

7. Su kalıntısı olmamasına ve plakanın altında herhangi bir parmak izi bırakılmamasına dikkat edilerek 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapıldı.
8. Hesaplama**:** Standart ve örneklerin absorbanslarından kör absorbansı çıkarıldı. Standart konsantrasyonları x-eksenine, absorbanslar ise y-eksenine yerleştirilerek 4-parametreli lojistik fonksiyon kalibrasyon eğrisi çizildi. Örneklerdeki AGE konsantrasyonu eğri kullanılarak hesaplandı.



Şekil 3.3: Serumda AGE analizinde kullanılan standart grafik



Şekil 3.4: İdrarda AGE analizinde kullanılan standart grafik

3.2.4. eGFR Hesaplama Yöntemi

Glomerül filtrasyon hızı, kısa MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) formülü ile hesaplanmıştır.

3.2.5. İstatistiksel Analiz Yöntemi

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde IBM Statistical Package for the Social Sciences SPSS 21.0 programı kullanılmıştır. Gönüllülere ait tanımlayıcı istatistikler ortalama ± standart sapma (SD) olarak verilmiştir. Kolmogrov-Smirnov testine göre dağılımının normal olduğu belirlenen parametreler, parametrik testlerden tek yönlü ANOVA ve gruplar arası karşılaştırmalarda t-testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Pearson korelasyon analizi yapılmıştır. Sonuçlar % 95 güven aralığında, istatistiksel anlamlılık $p<0,05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

AKŞ (mg/dL) kontrol grupta, 92, 47 ± 8,24; DM grubunda 216,33 ± 109,38; DN grubunda 186,76 ± 92,65; mikroalbüminürili DN grubunda 209,47 ±106,08 ve makroalbüminürili DN grubunda 167,45 ± 77,04 olarak saptandı. (Tablo 4.9)

HbA1c (%) kontrol grubunda 5,31 ± 0,31; DM grubunda 8,95 ± 2,38; DN grubunda 8,31 ± 1,94; mikroalbüminürili DN grubunda 8,76 ± 1,78 ve makroalbüminürili DN grubunda 7,93 ± 2,03 olarak saptandı. (Tablo 4.10)

AKŞ ve HbA1c parametrelerinin değerleri kontrol grubuna göre DM (p = 0,000 ve p = 0,000), DN (p = 0,001 ve p = 0,000), mikroalbüminürili DN (p=0,001 ve p=0,000) ve makroalbüminürili DN (p = 0,047 ve p = 0,000) gruplarında anlamlıderecelerde yüksek bulunmuştur.

İnsülin (mu/L) kontrol grubunda 11,87 ±5,73; DM grubunda 14,63 ± 14,33; DN grubunda 18,84 ± 13,09, mikroalbüminürili DN grubunda 20,00 ± 13,22 ve makroalbüminürili DN grubunda 17,86 ± 13,25 olarak saptandı. (Tablo 4.9, Tablo 4.10)

C-peptid (ng/ mL) kontrol grubunda 1,60 ± 0,53; DM grubunda 1,49 ± 0,58; DN grubunda 2,30 ± 1,72, mikroalbüminürili DN grubunda 2,37 +1,49 ve makroalbüminürili DN grubunda 2,25 ± 1,94 olarak saptandı. (Tablo 4.9, Tablo 4.10)

İnsülin ve C-peptid parametrelerinin değerlerinde gruplar arasında anlamlıfarklılık bulunmadı. C-peptid değerinin DN grubunda DM grubuna göre anla mLılık sınırına yakın dercede yüksek olduğu dikkati çekmiştir. (p=0,056)

Total protein (g/dL) kontrol grubunda 7,43 ± 0,36; DM grubunda 7,75 ± 0,57; DN grubunda 7,60 ± 0,58, mikroalbüminürili DN grubunda 7,75 ± 0,59 ve makroalbüminürili DN grubunda 7,47 ± 0,55 olarak saptandı. (Tablo 4.9, Tablo 4.10)

Albümin (g/dL) kontrol grubunda 4,56 ± 0,36; DM grubunda 4,59 ± 0,43; DN grubunda 4,51 ± 0,45, mikroalbüminürili DN grubunda 4,82 ± 0,26 ve makroalbüminürili DN grubunda 4,25 ± 0,40 olarak saptandı. (Tablo 4.9, Tablo 4.10)

Çalışma gruplarının total protein değerleri arasında anlamlı farklılık bulunmadı. Albümin ise, DM grubunda makroalbüminürili DN grubuna göre ve mikroalbüminürili DN grubunda makroalbüminürili DN grubuna göre daha yüksek olarak saptandı (p = 0,032 ve p = 0,000)

Kreatinin (mg/dL) kontrol grubunda 0,77 ± 0,15; DM grubunda 0,85 ± 0,21; DN grubunda 1,28 ± 0,77, mikroalbüminürili DN grubunda 0,97 ± 0,31; makroalbüminürili

DN grubunda ise 1,54 ± 0,93 olarak bulunmuştur. (Tablo 4.9, Tablo 4.10) Kreatinin değerlerinin kontrol grubuna göre DN ve makroalbüminürili DN gruplarında daha yüksek (p = 0,004 ve p = 0,000) olduğu; DN grubunda, DM grubuna göre daha yüksek (p = 0,016) olduğu; makroalbüminürili DN grubuna göre DM ve mikroalbüminürili DN gruplarında daha düşük olduğu (p=0,000 ve p = 0,007) saptandı. (Şekil 4.1)

eGFR (mL/dk/1,73m^2) kontrol grubunda 110,62 ± 14,76; DM grubunda 97,77 ± 29,96; DN grubunda 70,53 ± 27,10, mikroalbüminürili DN grubunda 82,31 ± 19,37 ve makroalbüminürili DN grubunda 60,53 ± 29,10 olarak saptandı. (Tablo 4.9, Tablo 4.10) eGFR değerleri, kontrol grubuna göre DN, mikroalbüminürili ve makroalbüminürili DN gruplarında daha düşük (p = 0,000, p = 0,003 ve p = 0,000) olduğu; DN grubunda, DM grubuna göre daha düşük olduğu (p = 0,000); DM ve mikroalbüminürili DN gruplarında makroalbüminürili DN grubuna göre daha yüksek (p=0,000 ve p = 0,032); olduğu bulunmuştur.

Üre (mg/dL) kontrol grubunda 26,49 ± 6,07; DM grubunda 31,77 ± 8,95; DN grubunda 48,55 ± 25,40, mikroalbüminürili DN grubunda 36,43 ± 17,12 ve makroalbüminürili DN grubunda 58,86 ± 27,05 olarak saptandı. Üre değerlerinin, kontrol grubuna göre DN ve makroalbüminürili DN gruplarında daha yüksek (p = 0,000 ve p = 0,000); mikroalbüminürili DN grubuna göre makroalbüminürili DN grubunda daha yüksek (p = 0,001) ve DM grubuna göre DN ve makroalbüminürili DN gruplarında daha yüksek (p=0,004 ve p = 0,000) olduğu bulunmuştur. (Tablo 4.9, Tablo 4.10)

Ürik asit (mg/dL) kontrol grubunda 5,63 ± 1,39; DM grubunda 4,75 ± 1,28; DN grubunda 6,38 ± 1,86, mikroalbüminürili DN grubunda 5,89 ± 2,05 ve makroalbüminürili DN grubunda 6,80 ± 1,63 olarak saptandı. Ürik asit değerleri, DM grubuna göre DN ve makroalbüminürili DN gruplarında daha yüksek (p = 0,001 ve p = 0,001) olduğu bulunmuştur. (Tablo 4.9, Tablo 4.10)

Mikroalbüminüri (mg/g kreatinin) kontrol grubunda 7,63 ± 8,14; DM grubunda 13,70 ± 8,95; DN grubunda 643,59 ± 852,85 mikroalbüminürili DN grubunda 91,15 ± 52,84 ve makroalbüminürili DN grubunda 1113,16 ± 933,08 olarak saptandı. (Tablo 4.9, Tablo 4.10)

HGF (pg/ mL) kontrol grubunda 423,14 ± 123,36; DM grubunda 684,57 ± 360,20; DN grubunda 710,03 ± 278,19, mikroalbüminürili DN grubunda 757,36 ± 223,95 ve makroalbüminürili DN grubunda 669,80 ± 317,31 olarak saptandı. HGF parametresinin, kontrol grubuna göre DM, DN, mikroalbüminürili ve

makroalbüminürili DN gruplarında daha yüksek olduğu bulunmuştur. (p = 0,011, p = 0,001, p = 0,003 ve p = 0,041) (Tablo 4.9, Tablo 4.10)

TGF-β1 (ng/ mL) kontrol grubunda 22,42 ± 12,73; DM grubunda 21,08 ± 14,64; DN grubunda 20,21 ± 15,36, mikroalbüminürili DN grubunda 19,62 ± 14,66 ve makroalbüminürili DN grubunda 20,72 ± 16,29 olarak saptandı. (Tablo 4.9, Tablo 4.10)

AGE serum (ng/ mL) kontrol grubunda 57,75 ± 7,45; DM grubunda 55,82 ± 9,68; DN grubunda 58,42 ± 11,01, mikroalbüminürili DN grubunda 55,87 ± 8,57 ve makroalbüminürili DN grubunda 60,59 ± 12,53 olarak saptandı. (Tablo 4.9, Tablo 4.10)

AGE idrar (µg/ g kreatinin) kontrol grubunda 4,72 ± 4,89; DM grubunda 6,23 ± 5,51; DN grubunda 7,50 ± 7,66, mikroalbüminürili DN grubunda 5,89 ± 4,58 ve makroalbüminürili DN grubunda 8,87 ± 9,44 olarak saptandı. (Tablo 4.9, Tablo 4.10)

TGF-B1, AGE ve AGE idrar parametreleri bakımından gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı.

Tablo 4.1: Kontrol Grubuna Ait Demografik Özellikler

AD SOYAD	Cinsiyet	Yaş (yıl)	Kilo (kg)	Boy (m)	BMI (kg/m^2)	Sistolik / Diyastolik Kan Basıncı (mmHg)
A.Ö.	E	31	95	1.84	28.06	120/80
A.K	E	30				
B.E.	K	34	57	1.63	21.45	120/80
Ç.K.	K	38	55	1.67	19.72	130/70
D.E.	K	25	62	1.72	20.96	110/70
G.G.	K	40	65	1.6	25.39	100/60
H.U.	E	32	76	1.74	25.10	110/70
H.D.	E	31	92	1.75	30.04	100/60
İ.B.	E	41	102	1.68	36.14	120/80
M.U.	E	34	68	1.72	22.99	120/70
M.U.	K	32	64	1.63	24.09	90/70
M.U.	E	34	80	1.7	27.68	110/80
Ö.B.	K	40	60	1.56	24.65	100/60
S.E.	K	34	64	1.63	24.09	90/60
S.K.	E	31	79	1.8	24.38	120/80
S.H.K.	E	45	76	1.68	26.93	110/75
S.Y.	K	31	65	1.68	23.03	100/70
Ş.G.	E	44	72	1.78	22.72	120/70
Z.A.	K	24	60	1.58	24.03	100/60

Tablo 4.2: Diabetes Mellitus Grubuna Ait Demografik Özellikler

AD SOYAD	Cinsiyet	Yaş (yıl)	Kilo (kg)	Boy (m)	BMI (kg/m^2)	Sistolik / Diyastolik Kan Basıncı (mmHg)	Tedavi Yöntemi
A.O.	K	47	55	1.45	26.16	110/80	OAD
A.M.	K	34	61	1.55	25.39	120/80	İnsülin
B.Ç	E	53	88	1.70	30.45	120/80	OAD
B.O.	E	60	74.5	1.68	26.40	120/80	OAD
B.Ü.	E	57	76	1.74	25.10	120/70	OAD
C.Ö.	E	54	70	1.70	24.22	120/80	Yeni tanı
D.Ş.	E	44	73	1.72	24.68	120/70	OAD
G.E	K	55	98	1.58	39.26	140/100	OAD
H.G	E	65	92	1.80	28.40	120/80	OAD
H.İ.	E	47	78	1.70	26.99	160/80	OAD
K.T	E	49	73	1.78	23.04	120/70	OAD
M.Ş.	E	39	90	1.68	31.89	120/80	OAD
N.K.	K	51	66	1.54	27.83	120/80	OAD
N.C.	K	39	76	1.62	28.96	120/80	OAD
Ş.D.	K	54	75	1.50	33.33	120/70	OAD
T.B.	E	32	85	1.80	26.23	120/80	Yeni tanı
Y.Y.	E	40	85	1.68	30.10	120/70	OAD + İnsülin
A.A.	E	67	77	1.70	26.64	120/70	Yeni tanı
M.Ç.	E	44	99	1.84	29.24	120/80	OAD
K.Y.	K	41	45	1.68	15.94	120/70	OAD
H.Ş.	K	62	68	1.55	28.30	120/80	Yeni tanı

Tablo 4.3: Mikroalbüminürili Diyabetik Nefropati Grubuna Ait Demografik Özellikler

AD SOYAD	Cinsiyet	Yaş (yıl)	Kilo (kg)	Boy (m)	BMI (kg/m^2)	Sistolik / Diyastolik Kan Basıncı (mmHg)	Tedavi Yöntemi
Y.Ü.	E	57	103	1.69	36.06	120/70	OAD
O.D.	E	66	90	1.72	30.42	120/70	OAD + İnsülin
M.Ç.	E	66	79	1.6	30.86	120/80	OAD
A.T.	E	49	80	1.79	24.97	120/80	OAD + İnsülin
A.K.	E	73	69	1.63	25.97	130/70	OAD
M.A.	E	32	145	1.73	48.45	140/80	OAD
G.D.	K	49	84	1.51	36.84	120/70	OAD
E.D.	K	57	77	1.59	30.46	130/70	OAD
H.P.	K	51	115	1.58	46.07	120/80	OAD
N.Ç.	K	50	80	1.63	30.11	120/70	Yeni tanı
G.Ö.	K	28	93	1.57	37.73	120/80	OAD
G.A.	K	56	68	1.65	24.98	130/80	İnsülin
N.F.	K	32	67	1.63	25.22	120/80	OAD + İnsülin
E.A.	E	44	95	1.76	30.67	120/80	Yeni tanı
A.K.	K	34	65	1.60	25.40	120/80	Yeni tanı
A.P.	E	68	100	1.58	40.06	130/80	OAD
H.Y.	E	52	110	1.74	36.33241	130/80	OAD + İnsülin

Tablo 4.4: Makroalbüminürili Diyabetik Nefropati Grubuna Ait Demografik Özellikler

AD SOYAD	Cinsiyet	Yaş (yıl)	Kilo (kg)	Boy (m)	BMI (kg/m^2)	Sistolik / Diyastolik Kan Basıncı (mmHg)	Tedavi Yöntemi
M.A.	E	53	98	1.68	34.72222	110/80	OAD + İnsülin
H.Ö.P.	K	48	89	1.53	38.01957	120/70	OAD
H.D.	K	45	72	1.6	28.125	120/70	OAD + İnsülin
G.K.	K	58	76	1.56	31.22945	130/90	OAD + İnsülin
D.C.	E	43	74	1.7	25.60554	120/70	OAD
A.B.	E	61	98	1.76	31.6374	130/80	OAD
T.Ö.	K	53	77	1.6	30.07813	110/70	OAD
M.T.	K	52	80	1.6	31.25	130/70	OAD
M.O.	K	58	70	1.57	28.39872	140/80	OAD + İnsülin
C.D.	K	70	105	1.62	40.00914	140/80	OAD
İ.Y.	E	64	69	1.56	28.35306	130/60	OAD
N.T.	E	60	91	1.85	26.58875	130/70	OAD + İnsülin
S.C.	K	61	60	1.5	26.66667	130/80	OAD + İnsülin
B.S.	E	62	85	1.72	28.73175	130/70	OAD
D.M.G.	E	55	75	1.68	26.57313	130/70	OAD + İnsülin
S.B.	K	54	65	1.5	28.88889	140/80	Yeni tanı
G.T.	K	64	71	1.59	28.08	140/70	OAD
M.A.	E	54	-	-	-	-	Yeni tanı
İ.T.	E	59	74	1.65	27.1809	140/60	OAD
M.D.	E	47	82	1.68	29.05329	137/67	OAD

Tablo 4.5: Kontrol Grubunda Saptanan Biyokimyasal Parametrelerin Ortalama ± Standart Sapma Değerleri

AD SOYADI	AKŞ mg/dL	HbA1c %	İnsülin mU/L	C-peptid ng/ mL	T.protein g/dL	Albümin g/dL	Kreatinin mg/dL	eGFR mL/min/1,73m²	Üre mg/dL	Ürik asit mg/dL	Mikroalbüminüri mg/g kreatinin	AGE serum ng/ mL	AGE idrar µg/g kreatinin	TGF-β1 ng/ mL	HGF pg/ mL
A.Ö.	95	5.2	13.32	2.02	7.6	4.4	0.84	113.28	38.9	7	0.73	61.52	5.80	43.68	460.98
A.K.	91	5.9	11.65	2.2	8.1	4.7	0.79	122.40	26.3	6.3	11.9	52.38	4.43	20.63	482.68
B.E.	91	5.4	7.52	1.24	7.3	4.4	0.77	91.20	25.3	4.2	3.50	54.43	2.89	12.41	367.40
C.K.	92	5.1	11.3	1.35	7.4	4.4	0.63	112.40	22.7	2.8	21.20	60.67	4.12	21.96	417.70
D.E.	80	5.0	5.55	1.00	7.4	4.2	0.68	112.05	19.3	4.9	11.87	60.09	1.67	14.39	310.40
G.G.	82	5.2	13.46	1.7	6.7	3.9	0.61	115.46	17.1	5.1	3.16	58.70	2.15	22.41	562.60
H.U.	100	5.8	12.22	1.59	7.4	4.8	0.83	114.12	31.5	6.2	3.35	49.85	2.21	17.31	381.80
H.D.	97	5.7	30.27	2.62	7.7	4.8	1.03	89.53	33.4	7.1	1.47	66.09	2.34	6.59	381.78
I.B.	85	4.9	7.29	1.3	7.4	4.4	0.83	108.52	27.6	6.1	32.70	60.61	3.41	2.03	757.24
M.U.	92	5.9	9.63	1.15	7.4	4.5	0.76	124.79	35.7	5.4	4.64	61.38	3.75	34.16	544.42
M.U.	100	5.2	14.83	1.87	7.2	4.3	0.62	118.56	21.8	5.3	3.48	54.78	4.60	15.10	385.40
M.U.	89	5.5	14.84	2.52	7.5	5.5	1.03	87.86	27.8	6.1	15.55	55.41	1.94	14.73	421.30
O.B.	93	5.2	9.19	1.08	7.4	5.2	0.51	141.96	26.3	4.2	6.70	65.11	4.31	43.94	349.60
S.E.	113	5.2	15.02	1.68	7.3	4.6	0.66	108.96	18.2	3.7	7.56	68.70	5.27	28.05	591.80
S.K.	91	5.1	8.25	1.02	7.2	4.4	0.99	93.71	33.8	7.1	1.44	57.32	2.32	39.86	360.30
S.H.K.	90	5.1	7.00	1.37	8.3	4.8	0.93	93.39	22.2	7.5	2.07	41.59	3.67	21.34	432.10
S.Y.	91	5.2	18.51	1.86	6.9	4.4	0.56	134.20	23.3	4.1	7.59	63.61	24.20	35.22	289.20
S.G.	105	4.9	10.49	2.06	7.6	4.6	0.81	110.03	22.9	7.8	2.35	63.47	5.72	28.55	253.80
Z.A.	80	5.3	5.10	0.71	7.45	4.3	0.7	109.27	29.1	6.0	3.74	41.59	4.82	3.60	289.12
ORTALAMA	**92.47**	**5.31**	**11.87**	**1.60**	**7.43**	**4.56**	**0.77**	**110.62**	**26.49**	**5.63**	**7.63**	**57.75**	**4.72**	**22.42**	**423.14**
STD SAPMA	**8.24**	**0.31**	**5.73**	**0.53**	**0.36**	**0.36**	**0.15**	**14.76**	**6.07**	**1.39**	**8.14**	**7.45**	**4.89**	**12.73**	**123.36**

Tablo 4.6 Diabetes Mellitus Grubunda Saptanan Biyokimyasal Parametrelerin Ortalama ± Standart Sapma Değerleri

AD SOYADI	AKŞ mg/dl	HbA1c %	İnsülin mU/L	C-peptid ng/ mL	T.protein g/dL	Albümin g/dL	Kreatinin mg/dL	eGFR mL/min/1,73m²	Üre mg/dL	Ürik asit mg/dL	Mikroalbüminüri mg/g kreatinin	AGE serum ng/ mL	AGE (idrar) µg/g kreatinin	TGF-β1 ng/ mL	HGF pg/ mL
A.Ö.	504	13	2.9	0.74	7.4	4.5	1.06	59.06	21.6	3.3	3.9	61.36	4.68	1.66	282.04
A.M.	121	11.1	5.86	0.68	6.4	4.1	0.44	173.97	19.3	2.4	28.2	56.56	4.61	11.85	360.30
B.Ç.	140	6.4	7.38	0.99	8.3	4.9	1.05	78.53	31.2	5.8	9.5	47.45	2.30	15.74	522.59
B.O.	226	10.8	6.42	1.24	7.5	4.0	0.82	101.86	40.7	2.9	28.1	65.66	6.23	1.66	457.36
B.Ö.	211	7.6	6.19	1.17	8.3	5.1	1.05	77.38	27.8	5.4	8.9	43.68	3.95	42.54	417.69
C.Ö.	117	8.5	2.52	0.75	7.5	4.6	0.83	102.62	46.9	5.1	9.1	59.66	3.23	1.83	540.78
D.Ş.	108	5.6	14.86	2.11	7.4	4.6	1.07	79.80	49.9	6.1	6.3	50.04	2.63	14.34	371.03
G.E.	116	6.4	14.66	1.41	7.6	4.5	0.66	98.83	28.2	5.5	12.6	70.83	6.27	29.75	1051.39
H.G.	259	7.4	16.9	1.89	7.9	4.7	1.04	76.18	40.4	6.4	4.5	66.34	6.19	30.74	537.14
H.İ.	293	8.8	8.86	1.46	8.7	4.8	0.85	102.69	38.7	4.2	4.5	52.33	3.88	23.24	493.55
K.T.	126	5.8	7.15	1.18	8	4.8	0.89	96.56	33.0	5.7	20.5	48.96	6.94	26.49	879.58
M.Ş.	261	8.3	13.43	2.07	7.3	4.8	0.89	101.14	44.5	5.3	3.9	54.43	3.01	25.19	460.98
N.K.	292	10.9	5.6	1.82	7.3	3.9	0.61	109.90	27.8	3.1	8.8	49.45	10.36	5.26	1723.21
N.C.	166	8.6	15.77	1.79	8.2	4.8	0.66	105.97	16.1	4.4	4.9	37.85	3.72	18.51	428.50
S.D.	120	5.8	16.7	2.06	8.3	4.8	0.80	79.45	28.0	5.8	15.7	59.54	6.24	44.40	727.70
T.B.	310	11.5	9.98	2.28	7.7	4.9	1.11	81.60	34.7	6.5	18.0	61.36	8.09	19.36	1315.26
Y.Y.	151	9.6	40.05	0.86	6.8	4.3	0.86	104.68	28.5	3.0	10.1	43.53	4.34	34.52	857.28
A.A.	188	7.9	16.3	2.32	8.2	5.0	1.14	68.10	28.9	5.2	18.9	51.01	0.89	2.83	757.24
M.Ç.	108	8.9	15.36	2.16	8.2	5.0	0.85	104.07	30.4	5.9	13.8	69.73	0.82	51.14	529.87
K.Y.	309	13.5	66.61	0.63	6.1	3.4	0.46	159.11	25.7	3.5	33.3	72.32	22.53	13.62	1088.92
H.Ş.	417	11.6	13.63	1.71	8	4.8	0.69	91.63	24.8	4.2	24.2	50.04	20.00	28.10	573.58
ORTALAMA	**216.33**	**8.95**	**14.63**	**1.49**	**7.75**	**4.59**	**0.85**	**97.77**	**31.77**	**4.75**	**13.70**	**55.82**	**6.23**	**21.08**	**684.57**
STD SAPMA	**109.38**	**2.38**	**14.33**	**0.58**	**0.57**	**0.43**	**0.21**	**26.96**	**8.95**	**1.28**	**8.95**	**9.68**	**5.51**	**14.64**	**360.20**

Tablo 4.7 Mikroalbüminürili Diyabetik Nefropati Grubunda Saptanan Biyokimyasal Parametrelerin Ortalama ± Standart Sapma Değerleri

AD SOYADI	AKŞ mg/dl	HbA1c %	İnsülin mU/L	C-peptid ng/ mL	T.protein g/dL	Albümin g/dL	Kreatinin mg/dL	eGFR mL/min/1,73m²	Üre mg/dL	Ürik asit mg/dL	Mikroalbüminüri mg/g kreatinin	AGE serum ng/ mL	AGE (idrar) µg/g kreatinin	TGF-β1 ng/ mL	HGF pg/ mL
Y.Ü.	141	8.1	8.78	2.18	7.3	5.0	0.72	119.59	28.5	4.9	93.0	57.87	3.43	20.61	694.54
O.D.	210	8.1	33.53	0.65	8.3	4.9	1.33	57.18	37.2	9.6	48.1	51.01	2.28	38.23	1228.26
M.Ç.	217	8.8	28.85	7.10	8.4	4.5	1.78	40.85	60.1	6.1	131.7	60.98	7.01	14.48	537.14
A.T.	208	7.9	11.83	1.74	7.3	5.0	0.84	103.22	51.4	6.4	101.1	65.28	2.35	1.52	665.12
A.K.	120	6.1	13.53	2.90	7.5	4.6	0.90	87.91	41.9	8.5	47.6	44.79	2.62	33.23	738.77
M.A.	245	10.4	8.67	1.49	7.2	4.5	1.01	90.99	23.5	4.6	162.6	49.47	2.27	28.18	471.82
G.D.	136	7.5	13.17	1.96	7.5	4.6	0.68	97.74	20.3	2.6	234.0	43.53	3.91	52.54	887.02
E.D.	274	11.9	10.86	1.67	7.8	4.8	0.75	84.66	26.5	4.2	80.0	60.98	9.54	16.72	526.22
H.P.	141	6.5	37.89	3.61	7.3	4.8	0.76	85.27	34.9	6.7	43.9	64.21	8.04	3.26	1021.42
N.Ç.	184	9.4	10.33	1.74	8.3	4.9	0.73	89.69	23.8	5.5	57.0	62.42	3.65	2.55	639.44
G.Ö.	112	6.0	27.15	2.91	8.0	5.5	0.80	90.78	27.4	8.9	77.1	52.33	1.90	32.51	894.47
G.A.	541	11.1	7.75	0.05	7.0	4.9	0.81	77.74	29.7	3.6	41.7	43.68	16.40	22.12	928.00
N.F.	329	11.1	21.47	2.67	8.5	4.9	0.84	83.51	26.1	3.7	141.5	43.68	6.25	15.19	931.72
E.A.	248	9.8	16.71	2.23	9.1	5.1	1.00	86.28	23.8	5.0	82.2	69.92	15.88	5.79	346.01
A.K.	187	8.6	21.99	2.24	7.76	4.75	0.85	81.37	24.8	5.8	96.72	59.15	7.24	15.10	690.86
A.P.	89	7.6	11.03	2.92	7.1	4.8	1.57	46.93	83.5	8.9	21.5	56.92	6.34	29.82	738.78
H.Y.	179	10.0	56.47	2.19	7.4	4.4	1.09	75.50	55.9	5.2	89.8	63.47	1.05	1.69	935.46
ORTALAMA	**209.47**	**8.76**	**20.00**	**2.37**	**7.75**	**4.82**	**0.97**	**82.31**	**36.43**	**5.89**	**91.15**	**55.87**	**5.89**	**19.62**	**757.36**
STD SAPMA	**106.08**	**1.78**	**13.22**	**1.49**	**0.59**	**0.26**	**0.31**	**19.37**	**17.12**	**2.05**	**52.84**	**8.57**	**4.58**	**14.66**	**223.95**

Tablo 4.8 Makroalbüminürili Diyabetik Nefropati Grubunda Saptanan Biyokimyasal Parametrelerin Ortalama ± Standart Sapma Değerleri

AD SOYADI	AKŞ mg/dl	HbA1c %	İnsülin mU/L	C-peptid ng/ mL	T.protein g/dL	Albümin g/Dl	Kreatinin mg/dL	eGFR mL/min/1,73m²	Üre mg/dL	Ürik asit mg/dL	Mikroalbüminüri mg/g kreatinin	AGE serum ng/ mL	AGE (idrar) µg/g kreatinin	TGF-β1 ng/ mL	HGF pg/ mL
M.A.	88	6.7	36.92	1.09	7.6	4.1	1.34	59.27	49.4	9.6	1179.9	47.56	3.08	3.99	742.48
H.Ö.P.	127	6.3	22.41	3.07	7.6	4.5	0.71	93.38	24.0	6.4	486.8	69.38	3.13	19.69	360.30
H.D.	88	7.9	26.38	0.43	6.7	4.0	0.75	88.82	39.6	5.1	312.1	43.68	2.19	20.76	727.70
G.K.L	176	8.0	29.88	2.82	8.1	4.8	1.13	52.56	61.6	7.4	489.4	48.07	3.34	50.10	591.84
D.C.	160	6.9	8.85	1.51	7.6	4.9	0.77	117.19	20.5	5.3	743.9	62.42	15.61	2.06	446.48
A.B.	133	6.0	33.3	8.66	7.0	4.4	2.35	30.12	81.1	8.2	916	56.31	4.37	14.98	646.77
T.Ö.	130	6.9	54.79	5.58	8.4	4.7	1.24	48.09	55.4	7.2	440.7	69.30	6.67	26.23	385.36
M.T.	238	10.8	11.93	0.59	6.9	3.8	1.16	52.14	52.4	4.6	2331.3	60.39	29.04	40.48	924.31
M.O.	137	10.3	19.13	1.55	7.2	4.0	1.41	40.71	69.3	6.1	3543.2	57.21	14.71	3.81	1062.65
C.D.	143	8.0	18.14	2.63	7.8	3.9	0.75	81.20	38.3	6.3	762	43.53	2.67	15.19	1742.39
I.Y.	198	7.5	19.15	0.89	6.9	4.1	1.32	58.04	63.1	10.5	1153.5	74.98	3.57	5.41	378.19
N.T.	148	6.7	18.76	0.93	8.1	4.5	2.31	30.83	101	6.7	618.8	80.65	37.80	24.49	716.65
S.C.	327	11.9	5.69	2.97	7.2	4.1	1.79	30.60	59.5	6.4	3234.7	64.83	10.83	1.75	414.05
B.S.	369	12.9	13.07	3.01	7.1	4.0	3.44	19.34	102.3	6.0	1306	63.61	8.62	34.48	493.55
D.M.G.	180	7.1	6.02	1.19	7.1	4.2	1.11	73.10	37.9	8.5	1382.7	41.59	2.84	38.06	497.15
S.B.	84	5.5	10.41	2.48	7.8	4.0	2.34	23.02	86.2	6.2	1357.3	84.98	9.05	2.50	650.44
G.T.	199	7.0	2.97	0.93	7.6	4.3	0.88	68.76	40.2	3.7	323.2	61.52	4.08	19.18	493.56
M.A.	67	5.8	3.71	1.98	6.4	3.3	4.09	57.5	118.8	7.2	1148.25	47.45	9.53	16.97	613.79
I.T.	220	8.3	4.58	0.97	8.2	4.5	1.24	63.42	41.1	8.0	278.7	71.67	1.28	17.22	894.47
M.D.	137	8.1	11.12	1.67	8.0	4.9	0.73	122.41	35.5	6.5	254.8	62.71	5.03	57.04	613.79
ORTALAMA	**167**	**7.93**	**17.86**	**2.25**	**7.47**	**4.25**	**1.54**	**60.53**	**58.86**	**6.80**	**1113.16**	**60.59**	**8.87**	**20.72**	**669.80**
STD SAPMA	**77.04**	**2.03**	**13.25**	**1.94**	**0.55**	**0.40**	**0.93**	**29.10**	**27.05**	**1.63**	**933.08**	**12.53**	**9.44**	**16.29**	**317.31**

Tablo 4.9 İstatistiksel Karşılaştırma Bulguları-(I)

Parametreler	Kontrol	DM	DN
	(n = 19)	(n = 21)	(n=37)
AKŞ (mg/dl)	92,47 ± 8,24	216,33 ± 109,38****[a]	186,76 ± 92,65 ***[a]
HbA1c (%)	5,32 ± 0,31	8,95 ± 2,38 ****[a]	8,31 ± 1,94 ****[a]
İnsülin (mU/L)	11,87 ± 5,73	14,63 ± 14,33	18,84 ± 13,09
C-Peptid (ng/ mL)	1,60 ± 0,53	1,49 ± 0,58	2,30 ± 1,72
Total protein (g/dL)	7,43 ± 0,36	7,67 ± 0,66	7,60 ± 0,58
Albümin (g/dL)	4,56 ± 0,36	4,59 ± 0,43	4,51 ± 0,45
Kreatinin (mg/dL)	0,77 ± 0,15	0,85 ± 0,21	1,28 ± 0,77***[a], *[b]
eGFR (mL/min/1,73m²)	110,62 ± 14,76	97,77 ± 29,96	70,53± 27,10****[a,b]
Üre (mg/dL)	26,49±6,07	31,77±8,95	48,55±25,40****[a],***[b]
Ürik Asit (mg/dL)	5,63 ± 1,39	4,75 ± 1,28	6,38 ± 1,86***[b]
Mikroalbüminüri (mg/g kreatinin)	7,63 ± 8,14	13,70 ± 8,95	643,59 ± 852,85
AGE serum (ng/ mL)	57,75 ± 7,45	55,82 ± 9,68	58,42 ± 11,02
AGE idrar (µg/g kreatinin)	4,72 ± 4,89	6,23 ± 5,51	7,50 ± 7,66
TGF-β1 (ng/ mL)	22,42 ± 12,73	21,08 ± 14,64	20,21 ± 15,36
HGF (pg/ mL)	423,14 ± 123,36	684,57 ± 360,20**[a]	710,03 ± 278,19***[a]

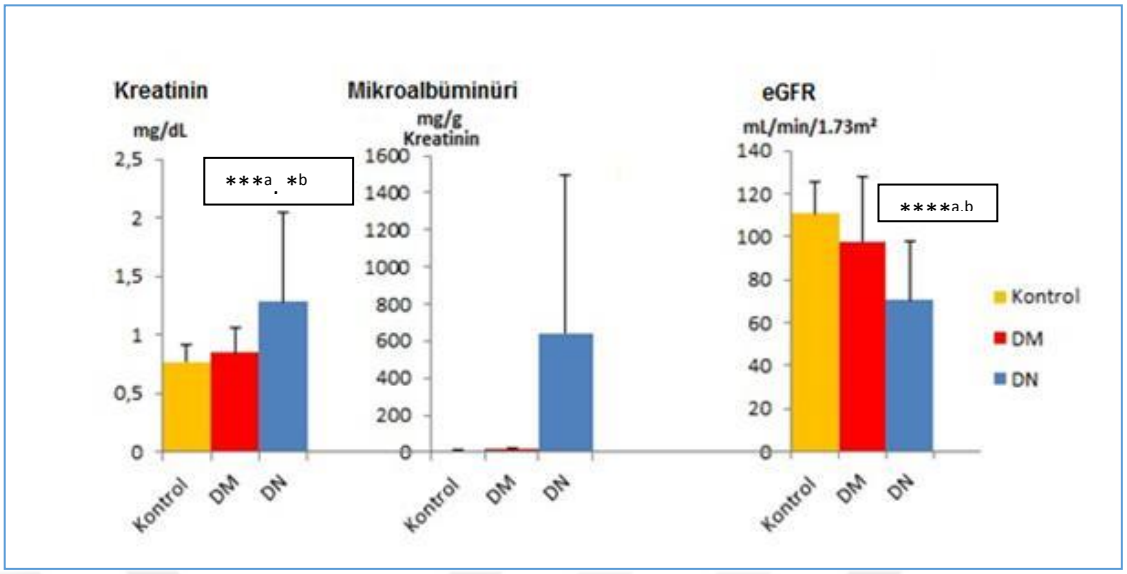
a: vs kontrol, b: vs diabetes mellitus; *p< 0.050, **p <0.010, ***p<0.005, ****p<0.001

Tablo 4.10 İstatistiksel Karşılaştırma Bulguları-(II)

Parametreler	Kontrol	DM	DN (mikroalbüminüri)	DN (makroalbüminüri)
AKŞ (mg/dl)	92,47 ± 8,24	216,33± 109,38****a	209,47± 106,08***a	167,45 ± 77,04*a
HbA1c (%)	5,32 ± 0,31	8,95 ± 2,38 ****a	8,76 ± 1,78 ****a	7,93 ± 2,03****a
İnsülin (mU/L)	11,87 ± 5,73	14,63 ± 14,33	20,00 ± 13,22	17,86 ± 13,25
C-Peptid (ng/ mL)	1,60 ± 0,53	1,49 ± 0,58	2,37 ± 1,49	2,25 ± 1,94
Total protein (g/dL)	7,43 ± 0,36	7,67 ± 0,66	7,75 ± 0,59	7,47 ± 0,55
Albümin (g/dL)	4,56 ± 0,36	4,59 ± 0,43	4,82 ± 0,26	4,25 ± 0,40 ****c *b
Kreatinin (mg/dL)	0,77 ± 0,15	0,85 ± 0,21	0,97 ± 0,31	1,54 ± 0,93****a,b **c
eGFR (mL/min/1,73m²)	110,62 ± 14,76	97,77 ± 29,96	82,31 ± 19,37 ***a	60,53 ± 29,10 ****a,b *c
Üre (mg/dL)	26,49±6,07	31,77±8,95	36,43±17,12	58,86±27,05 ****a,b ***c
Ürik asit (mg/dL)	5,63 ± 1,39	4,75 ± 1,28	5,89 ± 2,05	6,80 ± 1,63 ***b
Mikroalbüminüri (mg/g kreatinin)	7,63 ± 8,14	13,70 ± 8,95	91,15 ± 52,84	1113,16 ±933,08
AGE serum (ng/ mL)	57,75 ± 7,45	55,82 ± 9,68	55,87 ± 8,57	60,59 ± 12,53
AGE idrar (µg/g kreatinin)	4,72 ± 4,89	6,23 ± 5,51	5,89 ± 4,58	8,87 ± 9,44
TGF-β1 (ng/ mL)	22,42 ± 12,73	21,08 ± 14,64	19,62 ± 14,66	20,72 ± 16,29
HGF (pg/ mL)	423,14 ± 123,36	684,57 ± 360,20 *a	757,36± 223,95***a	669,80 ± 317,31*a

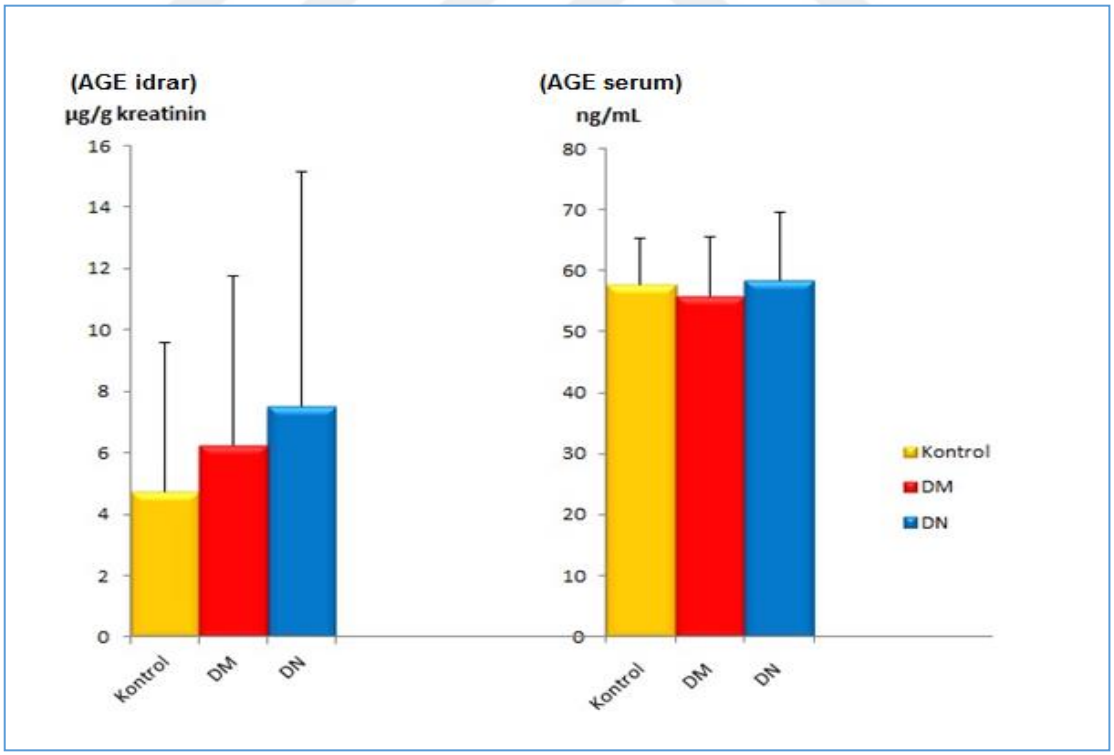
a: vs kontrol, b: vs diabetes mellitus c: vs mikroalbüminürili diyabetik nefropati

*p< 0.050, **p <0.010, ***p<0.005, ****p<0.001



Şekil 4.1: Çalışma Gruplarında; Kreatinin, Mikroalbüminüri ve eGFR Ortalama ± Standart Sapma Değerleri

a: vs kontrol, b: vs diabetes mellitus; *p< 0.050, **p <0.010, ***p<0.005, ****p<0.001



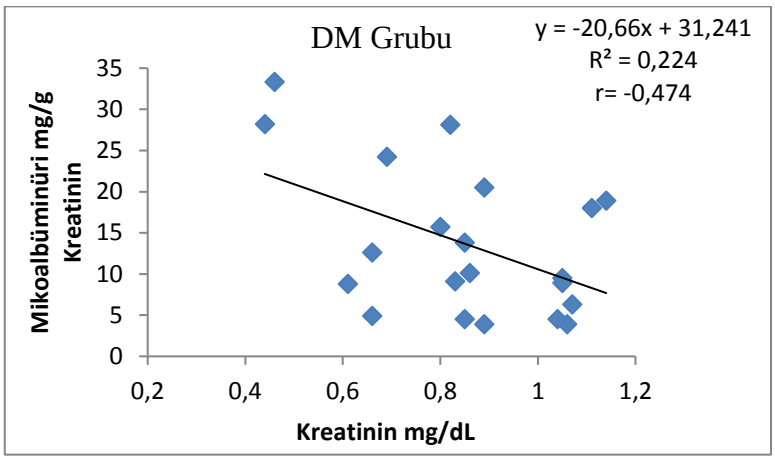
Şekil 4.2: Çalışma Gruplarında; AGE serum ve AGE idrar Ortalama ± Standart Sapma Değerleri

4.1. Korelasyon Bulguları

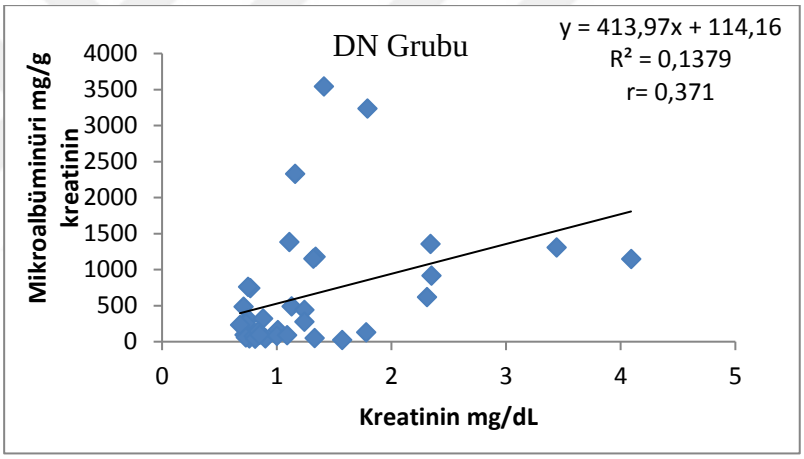
- AKŞ ve HbA1c parametreleri arasında DM, DN, makroalbüminürili ve mikroalbüminürili DN gruplarında korelasyon saptandı. (r = 0,706 p=0,000; r = 0,775 p=0,000; r = 0,823 p=0,000; r = 0,742 p=0,001)
- HbA1c ile mikroalbüminüri parametreleri arasında, makroalbüminürili DN grubunda korelasyon saptandı. (r = 0,583 p=0,007)
- HbA1c ile total protein ve albümin değerleri arasında DM grubunda negatif korelasyon saptandı. (r = -0,542 p=0,011 ve r = -0,571 p=0,007)
- HbA1c ile üre değerleri arasında kontrol grubunda sınırda anlamlı korelasyon saptandı. (r = 0,452 p=0,052)
- HbA1c ile ürik asit değerleri arasında DM, DN ve mikroalbüminürili DN gruplarında negatif korelasyon saptandı. (r = -0,675 p=0,001, r = -0,478 p=0,003, r = -0, 658 p=0,004)
- AKŞ ve ürik asit parametreleri arasında DN ve mikroalbüminürili DN gruplarında negatif korelasyon saptandı. (r = -0,402 p=0,014 ve r = -0,519 p=0,033)
- Kreatinin ile üre değerleri arasında kontrol, DN, mikroalbüminürili ve makroalbüminürili DN gruplarında pozitif korelasyon (r=0,527 p=0,000, r = 0,898 p=0,000, r=0,751 p=0,001, r=0,931 p=0,000), DM grubunda sınırda anlamlı pozitif korelasyon saptandı. (r = 0,432 p=0,051)
- eGFR ile üre değerleri arasında DN, mikroalbüminürili ve makroalbüminürili DN gruplarında negatif korelasyon saptandı. (r = -0,771 p=0,000, r=- 0,628 p=0,007 ve r=-0,754 p=0,000)
- Kreatinin ile ürik asit değerleri arasında kontrol ve DM gruplarında pozitif korelasyon saptandı. (r = 0,741 p=0,000 ve r = 0,595 p=0,004)
- eGFR ile ürik asit değerleri arasında DM grubunda negatif korelasyon (r = -0,558 p=0,009); DN grubunda anlamlılık sınırına yakın derecede negatif korelasyon saptandı (r=- 0,314 p=0,058)
- Üre ile ürik asit değerleri arasında kontrol, DN ve mikroalbüminürili DN gruplarında pozitif korelasyon (r=0,461 p=0,047, r=0,342 p=0,038, r=0,496 p=0,043); DM grubunda anlamlılık sınırına yakın pozitif korelasyon saptandı (r = 0,426 p=0,054)
- Kreatinin ile mikroalbüminüri değerleri arasında DM grubunda negatif, DN grubunda pozitif korelasyon saptandı. (r = -0,474 p=0,030 ve r=0,371 p=0,024) (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4)
- Kreatinin ile albümin değerleri arasında DM grubunda pozitif, DN ve makroalbüminürili DN gruplarında negatif korelasyon saptandı. (r=0,663 p=0,001, r=-0,584 p=0,000 ve r=-0,526 p=0,017)
- eGFR ile mikroalbüminüri değerleri arasında DM grubunda pozitif, DN ve makroalbüminürili DN gruplarında negatif korelasyon saptandı.(r = 0,552 p=0,009, r=-0,523 p=0,001 ve r = -0,456 p=0,043) (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6)
- eGFR ile albümin ile değerleri arasında DM grubunda negatif, DN grubunda pozitif korelasyon saptandı. . (r = -0,674 p=0,001 ve r = 0,515 p=0,001)

- Albümin ile mikroalbüminüri değerleri arasında DM, DN ve makroalbüminürili DN gruplarında negatif korelasyon saptandı. (r = -0,480 p=0,028, r=-0,637 p=0,000, r=-0,463 p=0,040)
- Total protein ile mikroalbüminüri değerleri arasında DN grubunda negatif korelasyon (r = -0,378 p=0,021) DM grubunda anlamlılık sınırına yakın negatif korelasyon saptandı. (r=-0,420 p=0,058)
- C-peptid ile insülin değerleri arasında kontrol, DN ve makroalbüminürili DN gruplarında pozitif korelasyon saptandı. (r=0,780 p=0,000, r=0,423 p=0,009, r=0,513 p=0,021)
- C-peptid ile total protein ve albümin değerleri arasında DM grubunda pozitif korelasyon (r = 0,481 p=0,027 ve r = 0,500 p=0,021) saptandı. İnsülin ile total protein ve albümin değerleri arasında DM grubunda negatif korelasyon (r = -0,515 p=0,017, r = -0,509 p=0,019) saptandı. (Şekil 4.7)
- C-peptid ile kreatinin arasında mikroalbüminürili DN grubunda pozitif korelasyon saptandı. (r=0,535 p=0,027) (Şekil 4.8)
- C-peptid ile eGFR arasında DM grubunda sınırda anlamlı negatif korelasyon saptandı. (r=-0,433 p=0,050) (Şekil 4.9)
- C-peptid ile ürik asit arasında DM grubunda pozitif korelasyon saptandı. (r=0,574 p=0,006) (Şekil 4.9)
- TGF-β1 ile eGFR değerleri arasında kontrol grubunda pozitif korelasyon saptandı. (r = 0,465 p=0,045)
- TGF-β1 ile ürik asit değerleri arasında DM grubunda pozitif korelasyon saptandı. (r = 0,437 p=0,048)
- TGF-β1 ile albümin değerleri arasında DM grubunda pozitif korelasyon saptandı. . (r = 0,444 p=0,044)
- AGE serum ile AGE idrar değerleri arasında DN grubunda pozitif korelasyon saptandı. (r = 0,342 p=0,038) (Şekil 4.10)
- AGE serum ile insülin değerleri arasında kontrol grubunda pozitif korelasyon saptandı. (r = 0,462 p=0,047)
- AGE serum ile TGF-β1 değerleri arasında DN ve mikroalbüminürili DN gruplarında negatif korelasyon saptandı. (r = -0,380 p=0,020 ve r=-0,755 p=0,000)
- AGE serum ile HGF değerleri arasında DN grubunda negatif korelasyon saptandı. (r=-0,382 p=0,020) (Şekil 4.11)
- AGE idrar ile AKŞ, HbA1c ve insülin değerleri arasında DM grubunda pozitif korelasyon saptandı. (r = 0,503 p=0,020, r = 0,556 p=0,009, r=0,539 p=0,012) (Şekil 4.12)
- AGE idrar ile kreatinin değerleri arasında DM grubunda negatif korelasyon saptandı. (r = -0,526 p=0,014) AGE idrar ile eGFR değerleri arasında kontrol grubunda pozitif korelasyon saptandı. (r = 0,472 p=0,041)
- AGE idrar ile mikroalbüminüri değerleri arasında DM ve DN gruplarında pozitif korelasyon (r = 0,578 p=0,006 ve r=0,346 p=0,036); AGE idrar ile albümin değerleri arasında DM grubunda negatif korelasyon saptandı. (r = -0,546 p=0,010)
- AGE idrar ile HGF ile değerleri arasında DM grubunda anlamlılık sınırına yakın pozitif korelasyon saptandı. (r = 0,417 p=0,060) (Şekil 4.11)
- HGF ile mikroalbüminüri değerleri arasında kontrol grubunda pozitif korelasyon saptandı. (r = 0,523 p=0,022)

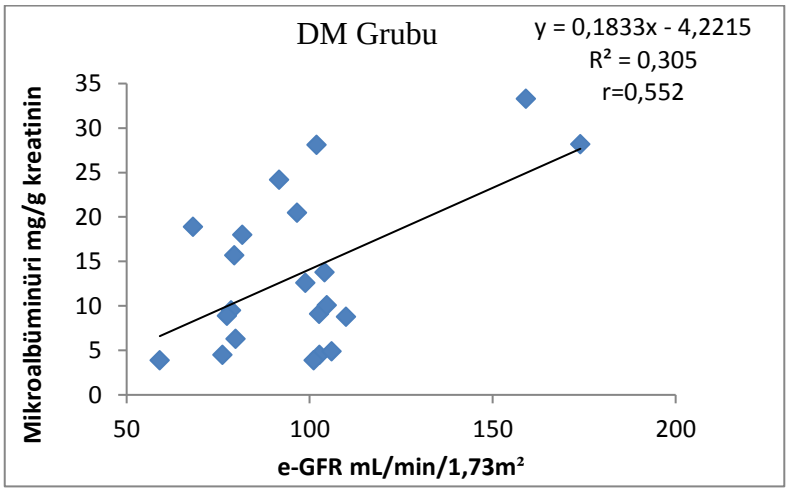
- HGF ile insülin değerleri arasında mikroalbüminürili DN grubunda pozitif korelasyon saptandı. (r = 0,493 p=0,044)



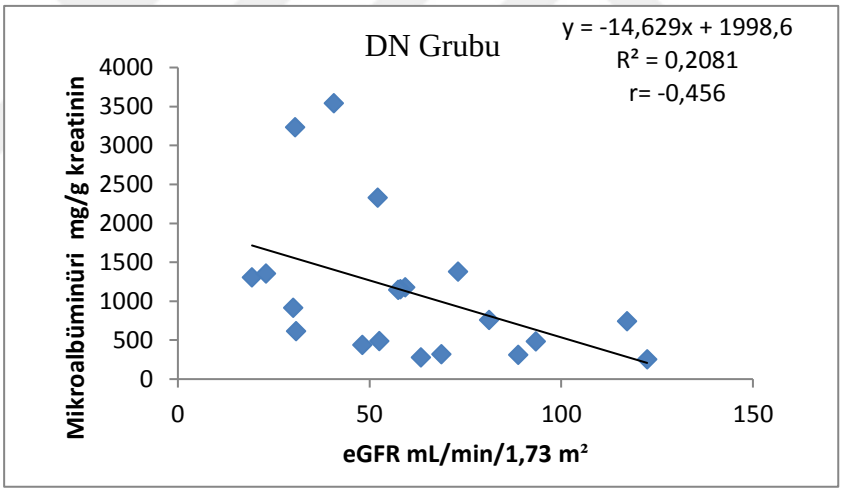
Şekil 4.3: DM Grubunda Mikroalbüminüri – Kreatinin değerleri arasındaki ilişki



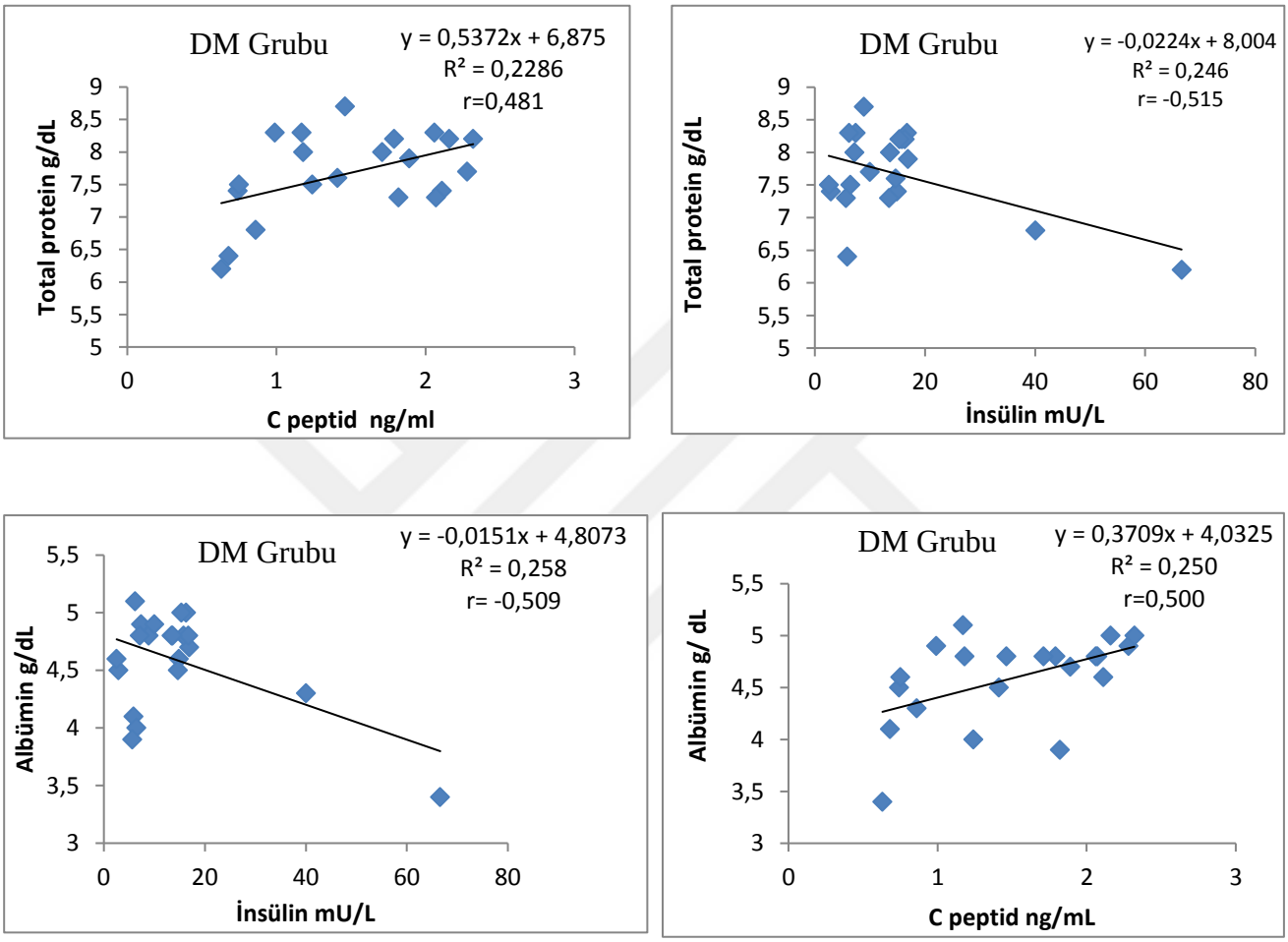
Şekil 4.4: DN Grubunda Mikroalbüminüri – Kreatinin değerleri arasındaki ilişki



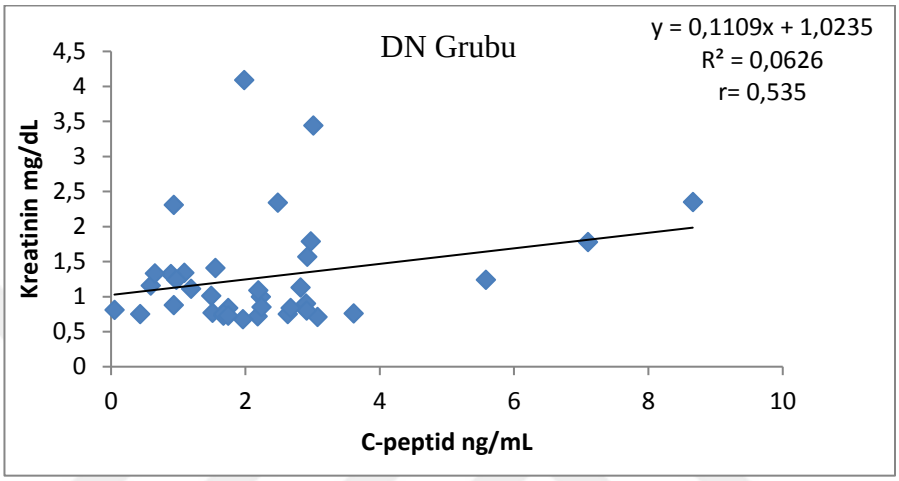
Şekil 4.5: DM Grubunda Mikroalbüminüri – eGFR değerleri arasındaki ilişki



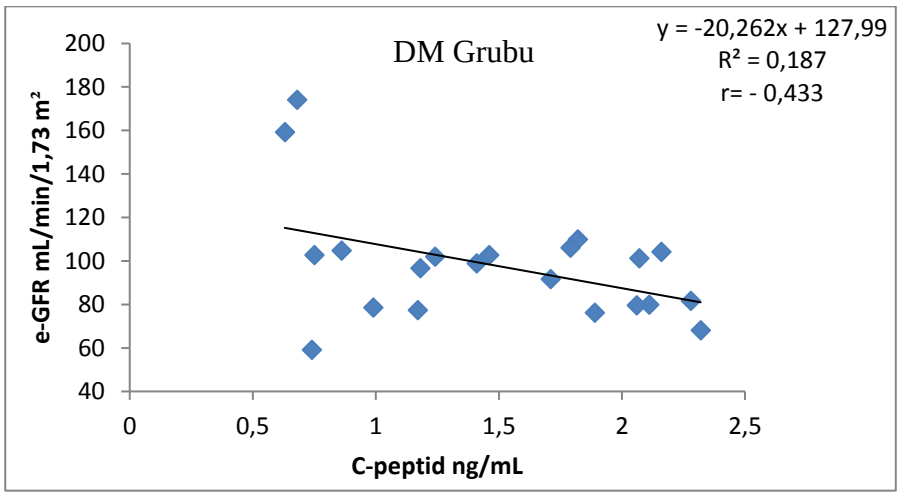
Şekil 4.6: Makroalbüminürili DN Grubunda Mikroalbüminüri – eGFR değerleri arasındaki ilişki



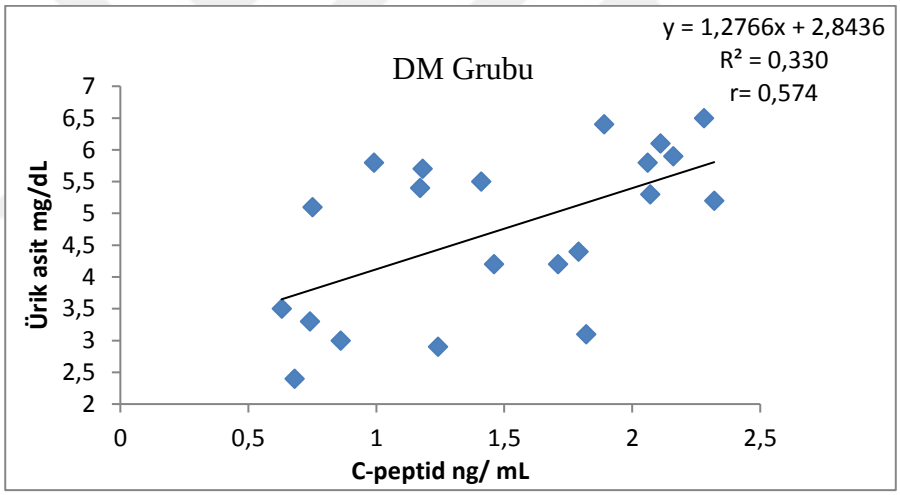
Şekil 4.7: DM Grubunda; Total protein ve albümin değerlerinin C-peptid ve insülin değerleri ile aralarındaki ilişkiler



Şekil 4.7: Mikroalbüminürili DN Grubunda C peptid - Kreatinin değerleri arasındaki ilişki

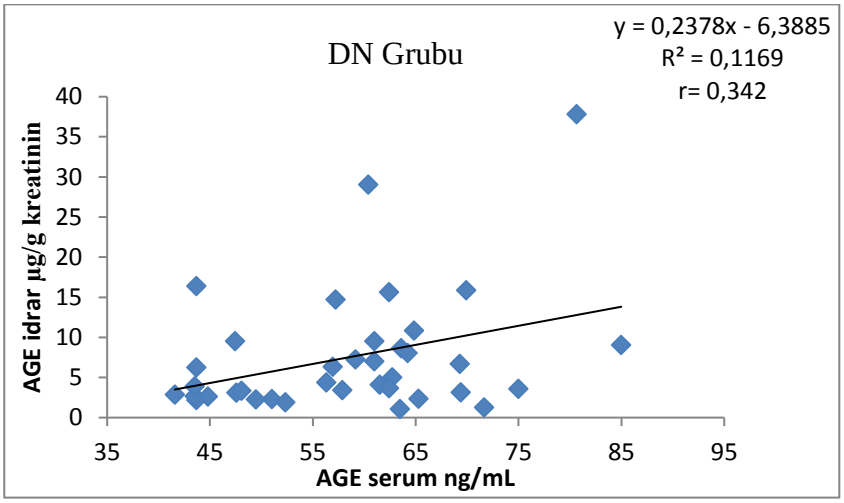


DM Grubu C-peptid – eGFR değerleri arasındaki ilişki

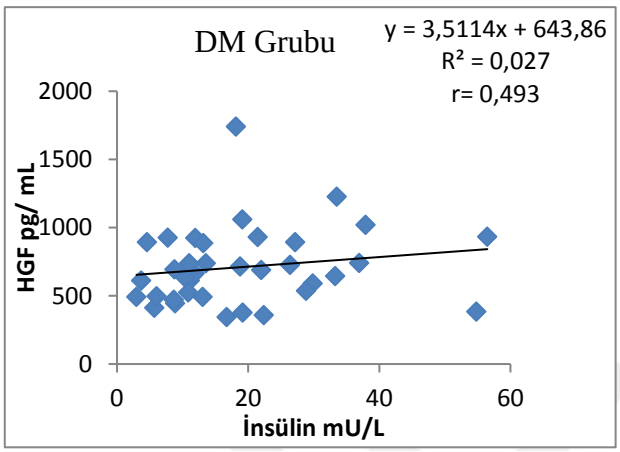


DM Grubu C-peptid – ürik asit değerleri arasındaki ilişki

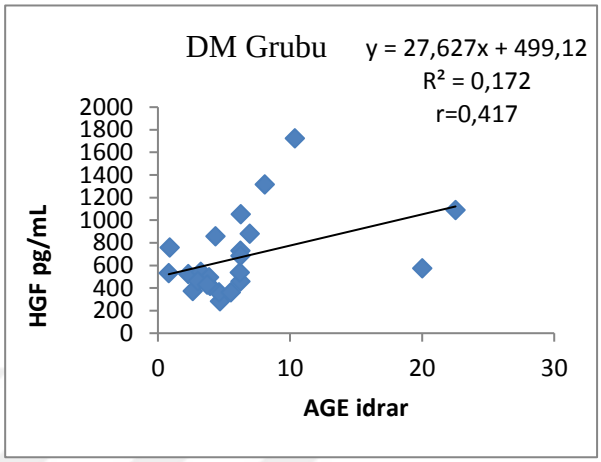
Şekil 4.8: DM Grubunda C peptid'in eGFR ve ürik asit değerleri arasındaki ilişki



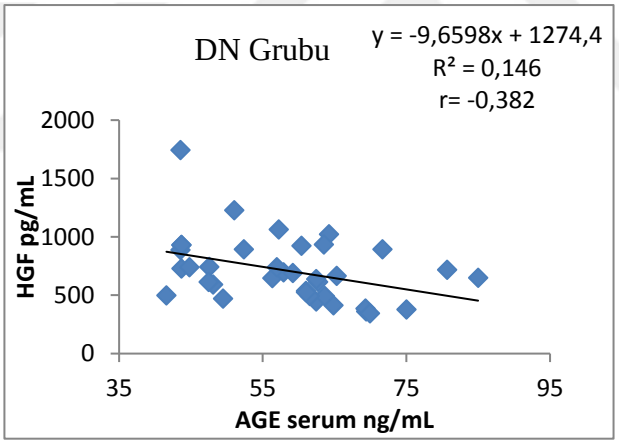
Şekil 4.9: DN Grubunda AGE idrar ile AGE serum değerleri arasındaki ilişki



DM Grubu HGF - İnsülin değerleri arasındaki ilişki

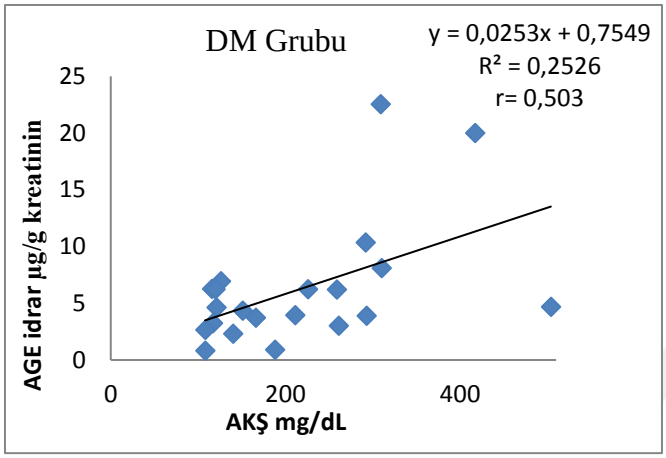


DM Grubu HGF - AGE İdrar değerleri arasındaki ilişki

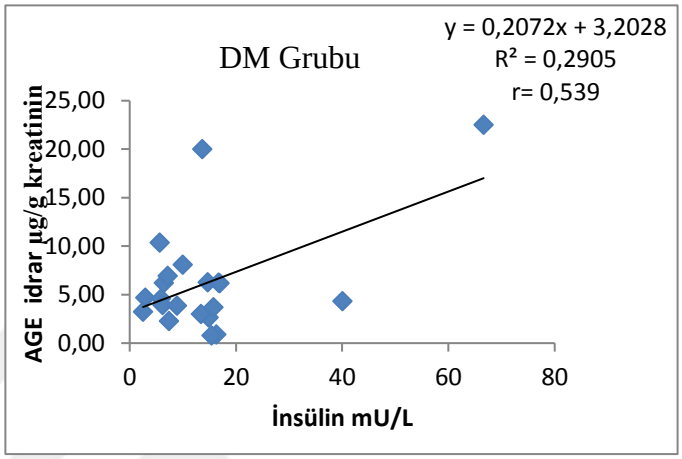


DN Grubu HGF - AGE Serum değerleri arasındaki ilişki

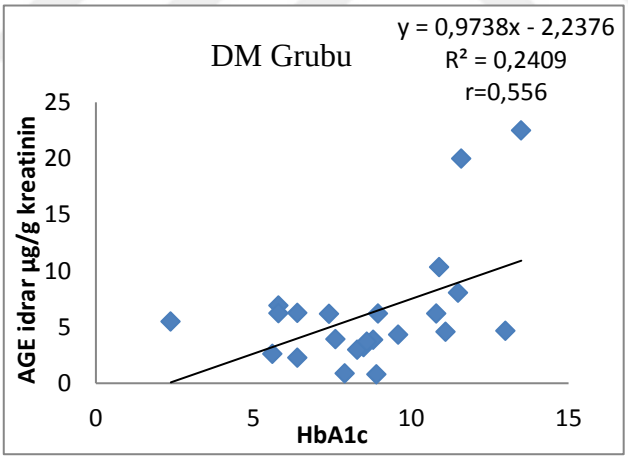
Şekil 4.10: Mikroalbüminürili DN Grubu HGF- insülin, AGE serum ve AGE idrar değerleri arasındaki ilişki



DM Grubu AGE idrar - AKŞ değerleri arasındaki ilişki



DM Grubu AGE idrar - İnsülin değerleri arasındaki ilişki



DM Grubu AGE idrar – HbA1c değerleri arasındaki ilişki

Şekil 4.11: DM Grubunda AGE idrar ile AKŞ, HbA1c ve insülin değerleri arasındaki ilişki

5. TARTIŞMA

Biyolojik olarak inert olduğu kabul edilen C-peptid'in son yıllarda endokrin benzeri aktivite gösteren, sinyal özellikli bir peptid olduğu bildirilmiştir (Leighton ve ark. 2017). Sağlıklı bireylerde belirgin etkisi olmayan C-peptid'in tip 1 DM hastalarında ve deneysel tip 1 diyabet modellerinde mikrovasküler komplikasyonları (nefropati, periferal nöropati ve retinopati) azaltabildiğini gösteren araştırmalar mevcuttur (Wahren, 2016). Rezidüel C-peptid varlığının tip 1 diyabetli hastalarda bu komplikasyonların gelişimini yavaşlattığı öne sürülmüştür (Hills, ve ark. 2010a). Tip 2 diyabetli hastalarda düşük C-peptid düzeylerinin mikrovasküler komplikasyonlar ile ilişkili olduğu açıklanmıştır (Kim ve ark. 2012).

Bu tez çalışmasında diyabetik nefropati patogenezinde yer alan AGE ve TGF-β1 parametreleri ile böbrek koruyucu etkili HGF'in C-peptid ile aralarındaki ilişkiler tip 2 DM hastalarında nefropati kriterleri eşliğinde incelendi. Literatür taraması bu parametreler arasındaki ilişkilerin birlikte ilk kez bu çalışmada incelenmiş olduğunu göstermektedir. 40-65 yaş aralığında yer alan nefropatili ve nefropatisiz tip 2 DM hastalarında ve sağlıklı bireylerde çalışıldı ve nefropatili hastalar "Amerikan Diyabet Topluluğu'nun (ADA)" kriterlerine göre mikroalbüminürili ve makroalbüminürili olmak üzere iki gruba ayrıldı. Bu kriterlere göre spot idrarda 30-299 mg protein/g kreatinin olması durumunda mikroalbüminüri tanısı konulmaktadır (Care, 2015).

İnsülin ve C-peptid değerleri bakımından gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı. C-peptid değerinin DM grubuna göre DN grubunda anlamlılık sınırına yakın derecede yüksek olduğunu gözlemlendi (p=0,058). C-peptid ile insülin arasında kontrol, DM ve makroalbüminürili DN gruplarında saptadığımız pozitif korelasyonlar C-peptidin insülin salgılanmasının güvenilir bir göstergesi olduğu bilgisi ile uyumludur.

Glisemik kontrol göstergeleri olan AKŞ ve HbA1c tüm hasta gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu ve bu parametreler arasında pozitif korelasyon saptandı. Serumda ölçülen kreatinin, üre ve ürik asit konsantrasyonları DN grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek, eGFR daha düşük saptandı. Bu parametreler bakımından kontrol grubu ile DM grubu arasında istatistiksel bakımından anlamlı bir farklılık gözlenmezken DM grubuna göre DN grubunda kreatinin, üre ve ürik asit konsantrasyonlarının daha yüksek, eGFR değerinin daha düşük olduğu gözlendi. Bulgularımız bu parametreler ile diyabette nefropati varlığının doğru bir şekilde

değerlendirilebildiğini göstermektedir. Makroalbüminürili DN grubunda, mikroalbüminürili DN grubuna göre serum kreatinin ve üre konsantrasyonlarının yüksek ve eGFR'nin düşük saptanmış olması bu parametrelerin nefropatili ve nefropatisiz diyabetik hastalar arasında olduğu gibi, mikroalbüminürili ve makroalbüminürili diyabetik nefropatili hastalar arasında da ayırt edici olduğunu göstermektedir. Serum kreatinin ve mikroalbüminüri değerleri arasında saptanan korelasyonun DM grubunda negatif, DN grubunda ise pozitif olması dikkat çekicidir. (Şekil 4.6 ve 4.7) Bu bulguler ile uyumlu olarak serumda ölçülen kreatinin ve albümin değerleri arasında DM grubunda pozitif, DN ve makroalbüminürili DN gruplarında negatif korelasyon saptanmıştır. DM grubunda DN grubuna göre daha yüksek saptanan eGFR glomerüler hiperfiltrasyonu yansıtmaktadır. Glomerül kapillerlerinde artan kan basıncı, filtrasyonu ve protein geçişini arttırmaktadır. DN varlığında glomerüllerde filtrasyon azaldığı halde glomerül bazal membranındaki yapısal değişime bağlı olarak protein geçirgenliği artmaktadır. Tip IV kollajen ve laminin proteinlerinin non-enzimatik glikasyonu, negatif yüklü proteoglikanlar ile etkileşimlerini azaltarak vasküler membranın albümin geçirgenliğini arttırmaktadır (Yamagishi ve Matsui, 2010). Hiperfiltrasyon ve tek nefronda ölçülen glomerül filtrasyon artışı, DN gelişiminin ilk beş yılı içinde olmaktadır (Sabatini ve Kurtzman, 2010). Okada ve ark. tarafından Japon toplumunda yapılmış olan büyük ölçekli bir çalışmada pre-diyabet ve pre-hipertansiyon tanılı hastalarda glomerüler hiperfiltrasyonun, kan glukoz düzeyi ve kan basıncı ile orantılı olduğu açıklanmıştır (Okada ve ark. 2012). Palatini "diyabet ve hipertansiyon varlığında hiperfiltrasyon ve mikroalbüminüri riski arasında güçlü bir ilişki bulunduğunu ve hiperfiltrasyonun diyabetik nefropatinin önemli bir habercisi olarak algılanması gerektiğini" bildirmiştir (Palatini, 2012).

Bozuk glisemik kontrolün diyabetik nefropatide albüminüri gelişmesinde çok önemli rolü olduğu açıklanmıştır (Hills, ve ark. 2010a). Makroalbüminürili DN grubunda HbA1c ile proteinüri düzeyi arasında saptadığımız pozitif korelasyon bu açıklama ile uyumludur. Serum ürik asit değerlerinin HbA1c ile DM ve DN gruplarında ; AKŞ ile DN ve mikroalbüminürili DN gruplarında negatif korelasyon göstermesi ilginç bulundu. Bulgularımızla uyumlu olarak Aziz ve ark. "tip 1 ve tip 2 diyabetli hastalarda HbA1c ve serum ürik asit düzeyleri arasında ters bir ilişki saptamışlar ve ürik asidin β-hücrelerinden insülin salgılanmasını arttırdığını" bildirmişlerdir. Antioksidan etkili olduğu bilinen ürik asidin diyabette β-hücrelerini apoptoza karşı koruduğunu ve buna bağlı olarak insülin

salgılanmasını arttırdığını ve insülin artışı ile AKŞ ve HbA1c değerlerinin azaldığını öne sürmüşlerdir (Aziz, 2014). Çalışmamızda, DM grubunda C-peptid ile ürik asit değerleri arasında pozitif korelasyon saptandı. C-peptidin salgılanan insülin miktarını yansıttığı bilindiğinden, bu bulgu ürik asidin insülin salgılatıcı etkisini desteklemektedir. Diğer taraftan C-peptid ile ürik asit değerleri arasındaki pozitif korelasyon bulgumuz tip 2 diyabet hastalarında hiperinsülinemi ve insülin direnci varlığında ürik asit atılımının azaldığı şeklinde de yorumlanabilir (Ping ve ark. 2018).

Çalışma gruplarımızın serum total protein konsantrasyonları arasında bir farklılık gözlenmemiş olduğu halde, serum albümin konsantrasyonu makroalbüminürili DN grubunda, DM ve mikroalbüminürili DN gruplarına göre daha düşük olarak saptandı. DM grubunda serum total protein ve albümin konsantrasyonları ile HbA1c ve insülin değerleri arasında negatif korelasyon saptandı. Anabolizan bir hormon olan insülinin karaciğerde serum proteinlerinin ve çok düşük dansiteli lipoproteinlerin (VLDL) sentezini arttırdığı bilindiğinden negatif korelasyon bulgusunun tip 2 diyabetli hastalarda insülin direncine bağlı olduğu düşünüldü. DM grubunda serum total protein ve albümin konsantrasyonlarının C-peptid ile pozitif korelasyon gösterdiği gözlemlendi. İnsülin ile negatif olan bu ilişkinin, C-peptid ile pozitif olması ilginç bulundu. Bu bulgu, DM grubundaki C-peptid ile eGFR arasındaki negatif korelasyon bulgusu ile birlikte değerlendirildiğinde, tip 2 diyabetli hastalarda C-peptid'in glomerüler hiperfiltrasyona karşı koruyucu olduğu ve proteinüriyi azalttığı şeklinde yorumlandı. C-peptid replasmanının Tip 1 diyabette glomerüler hiperfiltrasyonu ve proteinüriyi azalttığı bilinmektedir (Hills ve ark. 2009).

AGE'ler ile modifiye doku ve plazma proteinleri doku makrofajları ve karaciğerin makrofaj *scavenger* reseptörleri taşıyan sinusoidal Kupfer ve endotel hücreleri tarafından alınıp proteolize uğratılmaktadır. Glomerüler filtrata geçen serbest AGE ürünleri, AGE-modifiye peptidler ve AGE-modifiye albümin gibi bazı proteinler proksimal tübülüs hücreleri tarafından reabsorbe edilerek katabolize edilmekte ve idrar ile atılmaktadır. Çalışmamızda serumda ve idrarda ölçtüğümüz AGE değerleri bakımından gruplar arasında farklılık bulunmadı. DM grubunda idrar AGE değerleri ile AKŞ ve HbA1c değerleri arasında saptadığımız pozitif korelasyon (Şekil 5.3) glisemik kontrol bozuldukça organizma genelinde AGE'lerin oluşum ve idrar ile atılımlarının arttığı şeklinde yorumlandı. DN grubunda serumda ve idrarda ölçülen AGE değerleri arasında saptadığımız pozitif korelasyon (Şekil 5.4) bu yorumumuzu desteklemektedir. DM

grubunda idrar AGE değerlerinin eGFR ile pozitif, serum kreatinin ile negatif korelasyon göstermesi etkin AGE eliminasyonu için glomerüler filtrasyonun önemine işaret etmektedir. Üremi toksinleri olarak kabul edilen serbest AGE ürünlerinin serum konsantrasyonlarının glomerüler filtrasyon hızındaki azalma ile bağımsız ilişkili değişken olduğu açıklanmıştır (Busch ve ark. 2010). Shimoike ve ark. normoalbüminürili, mikroalbüminürili, makroalbüminürili ve hemodiyaliz alan diyabetik hastalarda, diyabeti olmayan nefropatili hastalarda ve sağlıklı kontrollerde serum ve idrar AGE düzeylerini ölçmüşlerdir. Araştırıcılar, serum AGE değerlerinin diyabet grubunda kontrol grubuna göre farklılık göstermediğini fakat makroalbüminürili ve hemodiyaliz alan diyabetlilerde normoalbüminürili ve mikroalbüminürili diyabetlilere göre daha yüksek olduğunu; idrar AGE değerlerinin gruplar arasında farklılık göstermediğini saptamışlardır (Shimoike ve ark. 2000). Araştırıcıların serum AGE değerlerinin ve serum kreatinin ile pozitif, kreatinin klirens ile negatif korelasyon bulguları çalışmamızdaki idrar AGE değerleri ile serum kreatinin ve kreatinin klirens arasında görülen korelasyon bulguları ile örtüşmektedir.

Diyabette renal fibrozun uyarılmasında TGF-β1 anahtar rol oynamaktadır. Deneysel ve klinik diyabet çalışmalarında böbrekte AGE birikiminin TGF-β1 ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Hills ve Squires, 2011; Sureshbabu ve ark. 2016; Kim ve ark. 2017). AGE reseptörleri uzaklaştırılmış diyabetik OVE26 farelerde glomerülosklerozun azaldığı ve böbrek fonksiyonlarında iyileşme olduğu gösterilmiştir (Hills ve Squires, 2011). Çalışmamızda TGF-β1'in serum değerleri bakımından gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Metwally ve ark. mikro- ve makro-düzeylerinde albüminürisi olan diyabetik nefropatili hastalar, sadece diyabeti olan hastalar ve sağlıklı kontrollerde serumda TGF-β1 ölçümü yapmışlar ve diyabetlilere göre nefropatili diyabetlilerde TGF-β1 değerlerini daha yüksek bulmuşlar, diyabetli hastalar ile sağlıklı kontroller arasında fark bulmamışlardır. Araştırıcılar nefropatili diyabetlilerde serum TGF-β1 ile albüminüri, açlık ve tokluk kan glukoz, HbA1c ve serum kolesterol değerleri arasında pozitif korelasyon bulunduğunu; diyabetik nefropatinin ilerlemesinde TGF-β1'in anahtar rol oynadığını ve TGF-β1 antagonistleri ile diyabetik nefropati gelişmesinin veya ilerlemesinin önlenebileceğini öne sürmüşlerdir (Metwally SS, Mosaad YM, 2005). Son yıllarda yapılan deneysel böbrek hastalığı çalışmalarında TGF-β1'in enflamasyonu azaltıcı, ve otofajiyi arttırıcı etkileri gösterilmiş, profibrotik olduğu gibi koruyucu olduğu da öne sürülmüştür (Sureshbabu ve ark. 2016). Çalışmamızda DM

grubunda serumda TGF-β1 konsantrasyonu arttıkça ürik asit konsantrasyonunun arttığı saptandı ve profibrojenik TGF-β1 artışının ürik asit klirensini azalttığı düşünüldü.

Karaciğerin non-parenkimal hücrelerinde sentezlenen HGF, kronik hasar sonrası oluşan doku fibrozunu önleyici ve terapötik potansiyel taşıyan önemli bir sitokindir (Nakamura ve ark. 2011). Çalışmamızda serum HGF konsantrasyonunun DM ve DN gruplarında kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu ve DN grubunda HGF ile insülin arasında pozitif korelasyon bulunduğu saptandı. (Şekil 5.12) HGF'nin β-hücrelerini apoptoza karşı koruyarak ve proliferasyonlarını uyararak salgılanan insülin miktarını arttırdığı açıklanmıştır (Araújo ve ark. 2012; Oliveira ve ark. 2018). HGF reseptörlerinin (Met) insülin reseptörleri ile hibrid oluşturdukları, HGF-Met etkileşiminin karaciğerde glukoz alımını arttırdığı ve kana glukoz çıkışını azalttığı gösterilmiştir (Araújo ve ark. 2012). Karaciğerin insüline optimum yanıt verebilmesi için Met reseptörlerinin esansiyel olduğu açıklanmıştır. Obezite ve tip 2 diyabette, insülin direncini kompanse etmek üzere HGF'nin arttığı öne sürülmüştür (Araújo ve ark. 2012). HGF'nin, renal fibrozun uyarılmasında anahtar rol oynayan TGF-β1'i antagonize ettiği gösterilmiştir (Dai ve ark. 2004). HGF'nin TGF-β1 transkripsiyonunu kontrol altında tutan ko-represör molekülün sentezini arttırarak antifibrotik etkisini gösterdiği açıklanmıştır (Liu, 2004). Literatürde yer alan bu bilgi ile uyumlu olarak çalışmamızın diyabetik nefropatili hasta gruplarında HGF'nin TGF-β1 sentezi üzerindeki baskılayıcı etkisi nedeni ile TGF-β1 değerlerinde artış görülmediği yorumu yapılabilir. DN grubunda serum HGF ve AGE değerleri arasındaki negatif korelasyon AGE klirensinde HGF'nin rolü olduğunu ima etmektedir. Literatürde HGF'nin AGE'lerin otofajik-lizozomal klirensini kolaylaştırdığı bilgisi yer almaktadır (Peng ve ark. 2011). Diğer taraftan insulinin de karaciğerde makrofaj çöpçü reseptörlerinin ekspresyonunu arttırarak in vitro AGE'lerin endositik alımını arttırdığı ve bu etkinin fosfatidil inozitol 3-kinaz (PI3- kinaz) inhibitörü olan wortmannin tarafından baskılandığı gösterilmiştir (Sano ve ark. 1998). Bu bilgiler doğrultusunda AGE'lerin otofajik-lizozomal klirensinde HGF ve insülinin birlikte etkili oldukları düşünülebilir. Ayrıca, AGE klirensinde insülin etkisine aracılık eden PI3-kinaz enziminin C-peptid tarafından da kullanıldığı bilinmektedir (Hills ve Squires, 2011).

Sonuç olarak sağlıklı kontroller, nefropatili ve nefropatisiz tip 2 DM hastalarında C-peptid ile AGE, TGF-β1 ve HGF arasındaki ilişkilerin nefropati kriterleri eşliğinde incelendiği bu tez çalışmasında : DM grubunda glisemik kontrol bozuldukça organizma genelinde AGE oluşumunun ve idrar ile atılımının arttığı saptandı. DN grubunda serumda

ve idrarda ölçülen AGE değerleri arasında pozitif korelasyon saptandı. DM ve DN gruplarında serumda HGF konsantrasyonunun yüksek olduğu, serum HGF ve insülin konsantrasyonları arasında pozitif korelasyon bulunduğu, HGF'nin AGE klirensini arttırdığı yorumu yapıldı. Renal fibrozu arttırdığı bilinen TGF-β1'in serumdaki konsantrasyonunun DM ve DN varlığında artmadığı saptandı; bu bulgunun anti-fibrotik HGF artışına bağlı olabileceği öne sürüldü. DM grubunda C-peptid'in glomerüler hiperfiltrasyona karşı koruyucu olduğu, proteinüriyi azalttığı öne sürüldü. DM grubunda ürik asidin insülin salgılatıcı etkisi olduğu ve TGF-β1 artışı ile ürik asit klirensinin azaldığı görüldü.

C-peptid'in insülin ile birlikte, AGE klirensini arttırarak TGF-β1 ile uyarılan renal fibrozu ortadan kaldırabilme potansiyelinin, böbrek dokusunda AGE ölçümünün de yapılabileceği deneysel tip 2 diyabet modelinde araştırılması gerekmektedir. İnsülin ile uyarılan otofajik-lizozomal AGE klirensine aracılık eden PI3-kinaz enziminin inhibitörü wortmannin kullanımının etkileri incelenmelidir. Diğer taraftan deneysel tip 1 diyabet modelinde C-peptid replasmanının ve wortmannin kullanımının etkileri araştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

Al-Rasheed, N. M., Chana, R. S., Baines, R. J., Willars, G. B., ve Brunskill, N. J. (2004). Ligand-independent activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by insulin and C-peptide in kidney proximal tubular cells: dependent on phosphatidylinositol 3-kinase activity. *The Journal of Biological Chemistry, **279**(48)*, 49747-54.

American Diabetes Association. (2014) *Diagnosis and classification of diabetes mellitus.* Diabetes Care 2014;***37***(Suppl. 1):S13–S90

American Diabetes Association. (2015) *Microvascular Complications and Foot Care.* Diabetes Care 2015;***38***(Suppl. 1):S58–S66

American Diabetes Association. (2019) *Diagnosis and classification of diabetes mellitus.* Diabetes Care 2019;***42***(Suppl. 1):S81–S28

Anderson, S. ve Brenner, B.M. (1988). Pathogenesis of diabetic glomerulopathy: hemodynamic considerations. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews **4*:**163-67, 116.

Araújo, T.G., Oliveira, A.G., Carvalho, B.M., Guadagnini, D., Protzek, A.O., Carvalheira, J.B., ve ark. (2012). Hepatocyte growth factor plays a key role in insulin resistance-associated compensatory mechanisms. *Endocrinology, **153**,* 5760-5769.

Aziz, K.M.A. (2014). Effect of serum uric acid in augmentation of ınsulin secretion and ımprovement of hba1c in diabetic patients: proposed statistical regression models for uric acid , HbA1c and insulin. *Journal of Research in Diabetes.* **2014**. 1-14.

Basta, G., Leonardis, D., Mallamaci, F., Cutrupi, S., Pizzini, P., Gaetano, L. ve ark. (2010). Circulating soluble receptor of advanced glycation end prod-uct inversely correlates with atherosclerosis in patients withchronic kidney disease. *Kidney International. **77***, 225–31

Bazzi, C., Petrini, C., Rizza, V., Arrigo, G. ve D'Amico, G. (2000). A modern approach to selectivity of proteinuria and tubulointerstitial damage in nephrotic syndrome. *Kidney International. **58:***1732-41

Bhatt, M.P., Lim, Y.C., Hwang, J., Na, S., Kim, Y.M. ve Ha, K.S. (2013). C-peptide prevents hyperglycemia-induced endothelial apoptosis through inhibition of reactive oxygen species-mediated transglutaminase 2 activation. *Diabetes, **62***, 243-253.

Bondeva, T., Ruster, C., Franke, S., Hammerschmid, E., Klagsbrun, M., Cohen, C.D. ve Wolf, G. (2009). Advanced glycation end-products suppress neuro- pilin-1 expression in podocytes. *Kidney International, **75***,605-16.

Bottinger, E.P. ve Bitzer, M. (2002). TGF-beta signaling in renal disease. *Journals of the American Society of Nephrology, **13***,2600-10.

Brownlee, M., Aiello, L.P., Friedman, E., Vinik, A.I., Nesto, R.W. ve Boulton, A.J.M. (2016). Complications of Diabetes Mellitus. İçinde Melmed, S., Polonsky, K., Larsen, P., Kronenberg, H., Williams, R. (Ed.) *Williams Textbook of Endocrinology* (13th ed.) Philedelphia, PA : Elsevier Health Sciences; 1484-1581

Burns, W.C., Twigg, S.M., Forbes, J.M., Pete, J., Tikellis, C., Thallas-Bonke, V.,ve ark.. (2006). Connective tissue growth factor plays an important role in advanced glycation end product-induced tubular epithelial-to-mesenchymal transition:

implications for diabetic renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology, **17(9)**,* 2484-94.

Busch, M., Franke, S., Rüster, C. ve Wolf, G. (2010). Advanced glycation end-products and the kidney. *European Journal of Clinical Investigation, **40(8)**,* 742-55.

Butt, M.J., Tarantal, A.F., Jimenez, D.F. ve Matsell, D.G. (2007). Collecting duct epithelial-mesenchymal transition in fetal urinary tract obstruction. *Kidney International, **72(8)**,* 936-944. Chen, S., Hong, S.W., Iglesias-de la Cruz, M.C., Isono, M., Casaretto, A. ve Ziyadeh, F.N. (2001). The key role of the transforming growth factor-beta system in the pathogen- esis of diabetic nephropathy. *Renal Failure, **23**,*471-81.

Chuang, P.Y., Yu, Q., Fang, W., Uribarri, J. ve He, J.C. (2007). Advanced glycation endproducts induce podocyte apoptosis by activation of the FOXO4 transcription factor. *Kidney International, **72**,*965-76.

Coppack, S.W. ve Lawrence V.J. (2008). Diabetes mellitus: pathophysiology and biochemical background. İçinde Marshall, W.J., Bangert, S.K. (Ed.). *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects.* (2nd ed.). Philedelphia, PA : Elsevier Health Sciences; 321

Da Silva, C.G., Maccariello, E.R., Wilson, S.W., Putheti, P., Daniel, S., Damrauer, S. M. ve ark. (2012). Hepatocyte growth factor preferentially activates the anti-inflammatory arm of NF-κB signaling to induce A20 and protect renal proximal tubular epithelial cells from inflammation. *Journal of Cellular Physiology, **227(4)**,* 1382-90.

D'Agati, V., Yan, S.F., Ramasamy, R. ve Schmidt, A.M. (2010). RAGE, glomerulo-sclerosis and proteinuria: roles in podocytes and endothelial cells. *Trends in Endocrinology and Metabolism, **21**,*50-6.

Dai, C. (2004). Hepatocyte Growth Factor Antagonizes the Profibrotic Action of TGF- 1 in Mesangial Cells by Stabilizing Smad Transcriptional Corepressor TGIF. *Journal of the American Society of Nephrology, **15(6)**,* 1402-1412.

Dai, C., Yang, J., Bastacky, S., Xia, J., Li, Y., ve Liu, Y. (2004). Intravenous administration of hepatocyte growth factor gene ameliorates diabetic nephropathy in mice. *Journal of the American Society of Nephrology, **15**,*2637-2647.

Dai, C., Saleem, M.A., Holzman, L.B., Mathieson, P. ve Liu, Y. (2010). Hepatocyte growth factor signaling ameliorates podocyte injury and proteinuria. *Kidney International, **77**,* 962–73.

Daroux, M., Prévost, G., Maillard-Lefebvre, H., Gaxatte, C., D'Agati, V. D., Schmidt, a M. ve ark. (2010). Advanced glycation end-products: implications for diabetic and non-diabetic nephropathies. *Diabetes & Metabolism, **36(1)**,* 1-10.

Dehghan, A., Hoek, M. Van, Sijbrands, E.J.G., Hofman, A. ve Wetteman, J.C.M. (2008). High serum uric acid as a novel risk factor for type 2 diabetes. *Cardiovascular and Metabolic Risk, **31(2)**,* 2007-2008.

Ding, Y. ve Choi, M.E. (2015). Autophagy in Diabetic Nephropathy. *Journal of Endocrinology. **224***(1): 15–30.

Eddy, A.A. (2000). Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatric Nephrology, **15**,* 290–301.

Eddy, A.A. (2005). Progression in chronic kidney disease. *Advances in Chronic Kidney*

*Disease, **12**,* 353–365.

Fafalios, A., Ma, J., Tan, X., Stoops, J., Luo, J., Defrances, M.C.A. ve ark. (2011) Hepatocyte Growth Factor Receptor (Met)–Insulin Receptor hybrid governs hepatic glucose metabolism. *Nature Medicine. **17***(12): 1577–1584.

Flanders, K.C., Holder, M.G. ve Winokur, T.S. (1995) Autoinduction of mRNA and protein expression for transforming growth factor-beta S in cultured cardiac cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology. **27***,805-12.

Foley, R.N., Murray, A.M., Li, S., Herzog, C.A., McBean, A.M., Eggers, P.W. ve ark. (2005). Chronic kidney disease and the risk for cardiovascular disease, renal replacement, and death in the United States Medicare population, 1998 to 1999. *Journals of the American Society of Nephrology,. **16**,* 489-95.

Forst, T., Kunt, T., Wilhelm, B., Weber, M.M. ve Pfützner, A. (2008). Role of C-Peptide in the regulation of microvascular blood flow. *Experimental Diabetes Research, **2008**:*176245.

Fukasawa, H., Yamamoto, T., Togawa, A., Ohashi, N., Fujigaki, Y., Oda, T., ve ark (2006) Ubiquitin-dependent degradation of SnoN and Ski is increased in renal fibrosis induced by obstructive injury. *Kidney International, **69**,*1733-1740.

Gentry L.E., Lioubin, M.N., Purchio, A.F., ve Marquardt, H. (1988) Molecular events in the processing of recombinant type 1 pre-pro-transforming growth factor beta to the mature polypeptide. *Molecular and Cellular Biology. **8**,*4162-8.

Giebeler, A., Boekschoten, M.V., Klein C ve ark. (2009) c-Met confers protection against chronic liver tissue damage and fibrosis progression after bile duct ligation in mice. *Gastroenterology. **137**,* 297–308.

Gnudi, L., Thomas, S.M., ve Viberti, G. (2007). Mechanical forces in diabetic kidney disease: a trigger for impaired glucose metabolism. *Journals of the American Society of Nephrology. **18**,* 2226-32

Gnudi, L., Viberti, G., Raij, L., Rodriguez, V., Burt, D., Cortes, P., Hartley, B., Thomas, S., Maestrini, S., ve Gruden, G. (2003). GLUT-1 overexpression: link between hemodynamics and metabolic factors in glomerular injury? *Hypertension. **42**,* 19-24

Goh, S.Y., ve Cooper, M.E. (2008). Clinical review: The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. **93(4)**,* 1143-52.

Gong, R., Rifai, A., ve Dworkin, L. D. (2006). Anti-inflammatory effect of hepatocyte growth factor in chronic kidney disease: targeting the inflamed vascular endothelium. *Journal of the American Society of Nephrology. **17***(9), 2464-73.

Granner, D.K. (2003). The Diversity of the Endocrine System. İçinde Murray R.K (Ed.), *Harper's illustrated biochemistry*. Lange Medical Books; 434-456

Gruden, G., Setti, G., Hayward, A., Sugden, D., ve Duggan, S., ve ark. (2005). Mechanical stretch induces monocyte chemoattractant activity via NF-κB-dependent MCP-1-mediated pathway in human mesangial cells: inhibition by rosiglitazone. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. **16**,* 688-96

Gruden, G., Zonca, S., Hayward, A., Thomas, S,. Maestrini, S., Gnudi, L., ve Viberti, G.C. (2000). Mechanical stretch-induced fibronectin and transforming growth factor-beta1 production in human mesangial cells is p38 mitogen-activated protein

kinase-dependent. *Diabetes.* ***49***, 655- 61

Gu, L., Ni, Z., Qian, J.,ve Tomino, Y. (2007) Pravastatin inhibits carbo- xymethyllysine-induced monocyte chemoattractant protein 1 expression in podocytes via prevention of signalling events. *Nephron Experimental Nephrology.* ***106***, 1-10.

Ha, H., ve Lee, H.B. (2005) Reactive oxygen species amplify glucose signaling in renal cells cultured under high glucose and in diabetic kidney. *Nephrology.* ***10***, 7-10.

Hall, A. (2005). Rho GTPases and the control of cell behavior. *Biochemical Society Transactions.* ***33***, 891-95

Henle, T. (2007). Dietary advanced glycation end products--a risk to human health? A call for an interdisciplinary debate. *Molecular Nutrition & Food Research,* ***51***(9), 1075-8.

Hills, C.E., ve Brunskill, N.J. (2009a). C-Peptide and its intracellular signaling. *The Review of Diabetic Studies.* ***6***(3), 138-47.

Hills, C.E., ve Brunskill, N.J. (2009b). Cellular and physiological effects of C-peptide. *Clinical Science (London, England : 1979).* ***116***(7), 565-74.

Hills, C.E., Brunskill, N.J., ve Squires, P.E. (2010a). C-peptide as a therapeutic tool in diabetic nephropathy. *American Journal of Nephrology.* ***31***(5), 389-97.

Hills, C.E., ve Squires, P.E. (2010). TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and therapeutic intervention in diabetic nephropathy. *American Journal of Nephrology.* ***31***(1), 68-74.

Hills, C.E., ve Squires, P.E. (2011). The role of TGF-? and epithelial-to mesenchymal transition in diabetic nephropathy. *Cytokine & Growth Factor Reviews,* ***22***(3), 131-9.

Hills, C.E., Al-Rasheed, N.N., Willars, G.B., Brunskill, N.J., Al-Rasheed, N.N. ve Willars, G.B., (2009). C-peptide reverses TGF-beta1-induced changes in renal proximal tubular cells: implications for treatment of diabetic nephropathy. *American Journal of Physiology. Renal Physiology.* ***296***(3), 614-21.

Hills, C.E., Willars, G.B., ve Brunskill, N.J. (2010b). Proinsulin C-peptide antagonizes the profibrotic effects of TGF-beta1 via up-regulation of retinoic acid and HGF-related signaling pathways. *Molecular Endocrinology.* ***24***(4), 822-31.

Hori, Y., Yamada, K., Hanafusa, N., Okuda, T., Okada, N., Miyata, T., Couser, W.G., Kurokawa, K., Fujita, T., ve Nangaku, M. (1999). Crry, a complement regulatory protein, modulates renal interstitial disease induced by proteinuria. *Kidney International.* ***56***, 2096-106

Hostetter, T.H., Rennke, H.G., ve Brenner, B.M. (1982). Case for intrarenal hypertension in initiation and progression of diabetic and other glomerulopathies. *The American Journal of Medicine.* ***72***, 375-80

Inoguchi, T., Sonta, T., Tsubouchi, H., Etoh, T., Kakimoto, M., Sonoda, N., Sato, N., Sekiguchi, N., Kobayashi, K., Sumimoto, H., Utsumi, H., ve Nawata, H. (2003). PKC-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. *Journals of the American Society of Nephrology.* ***14***:227-232,.

Iwano, M., Kubo, A., Nishino, T., Sato, H., Nishioka, H., Akai, Y., Kurioka, H., Fujii, Y., Kanauchi, M., Shiiki, H., ve Dohi, K. (1996) Quantification of glomerular TGF-

beta 1 mRNA in patients with diabetes mellitus. *Kidney International.* ***49***, 1120-6.

Jandeleit-Dahm, K., ve Cooper, ME. (2006). Hypertension and diabetes: role of renin-angiotensin system. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America.* ***35***, 469-90.

Ju, W., Ogawa, A., Heyer, J., Nierhof, D., Yu, L., Kucherlapati, R., Shafritz, D.A., Böttinger, E.P. (2006) Deletion of Smad2 in mouse liver reveals novel functions in hepatocyte growth and differentiation. *Molecular and Cellular Biology.* ***26***, 654-67.

Kanková, K. (2008). Diabetic threesome (hyperglycaemia, renal function and nutrition) and advanced glycation end products: evidence for the multiple-hit agent? *The Proceedings of the Nutrition Society*, ***67***(1), 60-74.

Kanwar, Y.S., Sun, L., Xie, P., Liu, F.Y., ve Chen, S. (2011). A glimpse of various pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. *Annual Review of Pathology.* ***6***, 395-423.

Kanwar, Y. S., Wada, J., Sun, L., Xie, P., Wallner, E. I., Chen, S., ve ark. (2008). Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression. *Experimental Biology and Medicine.* ***233***, (1), 4-11.

Kim, B.Y., Jung, C.H., Mok, J.O., Kang, S.K., ve Kim, C.-H. (2012). Association between serum C-peptide levels and chronic microvascular complications in Korean type 2 diabetic patients. *Acta Diabetologica.* ***49***(1), 9-15.

Kim, D.J., Kang, J.M., Park, S.H., Kwon, H.K., Song, S.J., Moon, H., Kim, S.M. ve ark. (2017) Diabetes Aggravates Postischaemic Renal Fibrosis through Persistent Activation of TGF-β1 and Shh Signalling. *Scientific Reports.* ***7***, 16782.

Kim, W.H., Matsumoto, K., Bessho, K., ve Nakamura, T. (2005). Growth inhibition and apoptosis in liver myofibroblasts promoted by hepatocyte growth factor leads to resolution from liver cirrhosis. *The American Journal of Pathology.* ***166***(4):1017-28.

Kim, Y.C., An, J.N., Kim, J.H., Choi, Y.W., Oh, S., Kwon, S.H. ve ark. (2018). Soluble cMet levels in urine are a significant prognostic biomarker for diabetic nephropathy. *Scientific Reports.* ***8***, 12738.

Koyama, Y., Takeishi, Y., Arimoto, T., Niizeki, T., Shishido, T., Takahashi, H.,ve ark. (2007) High serum level of pentosidine, an advanced glycation end product (AGE), is a risk factor of patients with heart failure. *Journal of Cardiac Failure.* ***13***, 199-206.

Kumar, D., Robertson, S., ve Burns, K.D. (2004). Evidence of apoptosis in human diabetic nephropathy. *Molecular and Cellular Biochemistry.* ***259***, 67-70

Kunt, T., Forst, T., Pfützner, A., Beyer, J., ve Wahren, J. (1999a). The physiological impact of proinsulin C-peptide. *Pathophysiology.* ***5***, 257-262.

Kunt, T., Schneider, S., Pfützner, A., Goitum, K., Engelbach, M., Schauf, B., ve ark. (1999b). The effect of human proinsulin C-peptide on erythrocyte deformability in patients with Type I diabetes mellitus. *Diabetologia.* ***42***(4), 465-71.

Ley, K. (2003) The role of selectins in inflammation and disease. *Trends in Molecular Medicine.* ***9***, 263–268,

Li, J.H., Huang, X.R., Zhu, H.J., Oldfield, M., Cooper, M., Truong, L.D. ve ark. (2004). Advanced glycation end products activate Smad signaling via TGF-beta-dependent

and independent mechanisms: implications for diabetic renal and vascular disease. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal.* ***18***, 176-8

Lippi, G., Targher, G., Montagnana, M., Salvagno, G.L., ve Guidi, G.C. (2008). High serum uric acid as a novel risk factor for type 2 diabetes: response to Dehghan et al. *Diabetes Care.* ***31***(9):e68.

Liu Y. (2002) Hepatocyte growth factor and the kidney. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension.* ***11***, 23–30.

Liu, Y. (2004). Hepatocyte growth factor in kidney fibrosis: therapeutic potential and mechanisms of action. American Journal of Physiology. *Renal Physiology.* ***287***(1), F7-16.

Leighton, E., Sainsbury, C.A.R., ve Jones, G.C. (2017) A Practical Review of C-Peptide Testing in Diabetes. *Diabetes Therapy.* ***8***(3): 475–487.

Luo, K. (2004) Ski and SnoN: negative regulators of TGF-beta signaling. *Current Opinion in Genetics and Development.* ***14***, 65-70.

Ma, H., Saenko, M., Opuko, A., Togawa, A., Soda, K., Marlier, A., ve ark. (2009) Deletion of the Met receptor in the collecting duct decreases renal repair following ureteral obstruction. *Kidney International.* ***76***, 868–76.

Marren S.M., Hammersley, S., McDonald T.J., Shields, B.M., Knight, B., Hill, A. Ve ark. (2019). Persistent C-peptide is associated with reduced hypoglycaemia but not HbA1c in adults with longstanding Type 1 diabetes: evidence for lack of intensive treatment in UK clinical practice? *Diabetic Medicine*.

Matsumoto, K. ve Nakamura, T. (2001) Hepatocyte growth factor: renotropic role and potential therapeutics for renal diseases. *Kidney International.* ***59***, 2023– 2038.

Medawala, W., McCahill, P., Giebink, A., Meyer, J., Ku, C.J., ve Spence, D.M. (2009). A Molecular Level Understanding of Zinc Activation of C-peptide and its Effects on Cellular Communication in the Bloodstream. *The Review of Diabetic Studies.* ***6***(3), 148-58.

Meerwaldt, R., Zeebregts, C.J., Navis, G., Hillebrands, J.L., Lefrandt, J.D, ve Smit, A.J. (2009). Accumulation of advanced glycation end products and chronic complications in ESRD treated by dialysis. *American Journal of Kidney Diseases.* ***53***, 138-50.

Metwally, S.S., Mosaad, Y.M., Nassr, A.A., ve Zaki, O.M. (2005). Transforming growth factor-beta 1 in diabetic nephropathy. *Egyptian Journal of Immunology.* ***12***(1), 103-112.

Michalopoulos, G.K. ve DeFrances, M.C. (1997). Liver regeneration. *Science.* ***276***, 60-66.

Mizuno, S., Matsumoto, K., ve Nakamura, T. (2001) Hepatocyte growth factor suppresses interstitial fibrosis in a mouse model of obstructive nephropathy. *Kidney International.* ***59***, 1304–1314.

Mogensen, C.E. (1997) How to protect the kidney in diabetic patients: with special reference to IDDM. *Diabetes.* ***46*** Suppl 2:S104-11.

Mou, S., Wang, Q., Shi, B., Gu, L., ve Ni, Z. (2009) Hepatocyte growth factor suppresses transforming growth factor-beta-1 and type III collagen in human primary renal fibroblasts. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences.* ***25***(11):577-87.

Nakamura, T., Sakai, K., Nakamura, T., ve Matsumoto, K. (2011). Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, ***26***, Suppl 1188-202.

Nathan, D.M., Buse, J.B., Davidson, M.B., Ferrannini, E., Holman, R. R., Sherwin, R., ve ark. (2009). Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: A consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy. *Diabetes Care.* ***32***(1), 193-203.

Nordquist, L., ve Wahren, J. (2009). C-Peptide: the missing link in diabetic nephropathy? *The Review of Diabetic Studies.* ***6***(3), 203-10.

Okada, R., Yasuda, Y., Tsushita, K., Wakai, K., Hamajima, N., ve Matsuo, S. (2012). Glomerular hyperfiltration in prediabetes and prehypertension. *Nephrology, Dialysis, Transplantation.* ***27***, 1821-5.

Oliveira, A.G., Araújo, T.G., Carvalho, B.M., Rocha, G.Z., Santos, A.ve Saad, M.J.A. (2018). The Role of Hepatocyte Growth Factor (HGF) in Insulin Resistance and Diabetes. *Frontiers in Endocrinology.* ***9***, 503.

Palatini, P. (2012). Glomerular hyperfiltration: a marker of early renal damage in pre-diabetes and pre-hypertension. *Nephrology, Dialysis, Transplantation.* ***27***, 1708-14.

Pelton, R.W., Saxena, B., Jones, M., Moses, H.L., ve Gold, L.I. (1991). Immunohistochemical localization of TGF beta 1, TGF beta 2, and TGF beta 3 in the mouse embryo: expression patterns suggest multiple roles during embryonic development. *The Journal of Cell Biology.* ***115***, 1091-105.

Peng, K.Y., Horng, L.Y., Sung, H.C., Huang, H.C., ve Wu, R.T. (2011). Hepatocyte growth factor has a role in the amelioration of diabetic vascular complications via autophagic clearance of advanced glycation end products: Dispo85E, an HGF inducer, as a potential botanical drug. *Metabolism: Clinical and Experimental.* ***60***(6), 888-92.

Ping, W., Guanlin, Z. ve Luqin, D. (2018). Study on correlation between serum uric acid, insulin resistance and pancreatic islet B cell function of elderly patients with Type 2 Diabetes. *Acta Medica Mediterranea.* ***34***.6, 1901-1905.

Williams, M.E. ve Stanton, R.C. (2005). Management of Diabetic Kidney Disease. İçinde Joslin, E.P. ve Kahn, C.R. (Ed.) *Joslin's diabetes mellitus.* (14nd ed.) Philadelphia, Pa. : Lippincott Williams & Willkins; 925-950

Powers, A.C. (2008). Diabetes Mellitus. İçinde Fauci, A.S., Braunwald, E., Kasper, D.L, Hauser, S.L., Longo, D.L., Jameson, J.L.J., ve ark. (Ed.) *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 17th Edition. The McGraw-Hill Companies. 2275- 2305

Rabbani, N., Thornalley, P.J. (2012) Advanced Glycation Endproducts (AGEs). İçinde Niwa T. (Ed.) *Uremic Toxins.* Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. ; 293-304

Rabbani, N., Adaikalakoteswari, A., Rossing, K., Rossing, P., Tarnow, L., Parving, H.H., ve Thornalley, P.J. (2012). Effect of Irbesartan treatment on plasma and urinary markers of protein damage in patients with type 2 diabetes and microalbuminuria. *Amino Acids.* ***42***(5), 1627-39.

Rebsomen, L., Khammar, A., Raccah, D., ve Tsimaratos, M. (2008). C-Peptide effects on renal physiology and diabetes. *Experimental Diabetes Research.* ***2008***, 281536.

Reeves, W.B., ve Andreoli, T.E. (2000). Transforming growth factor beta contributes to progressive diabetic nephropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **97***(14), 7667-9.

Reiniger, N., Lau, K., McCalla, D., Eby, B., Cheng, B, Lu, Y., ve ark. (2010) Deletion of the receptor for advanced glycation end products reduces glomerulosclerosis and preserves renal function in the diabetic OVE26 mouse. *Diabetes. 59*, 2043-54.

Remuzzi, G., ve Bertani, T. Pathophysiology of progressive ne- phropathies. *The New England Journal of Medicine. 339*, 1448–1456.

Rhee, S.Y. ve Kim Y.S. (2018). The Role of Advanced Glycation End Products in Diabetic Vascular Complications. *Diabetes and Metabolism Journal. **42***(3): 188–195.

Robles-Cervantes, J.A., Ramos-Zavala, M.G., González-Ortiz, M., Martínez-Abundis, E., Valencia-Sandoval, C., Torres-Chávez, A. ve ark. (2011). Relationship between Serum Concentration of Uric Acid and Insulin Secretion among Adults with Type 2 Diabetes Mellitus. *International Journal of Endocrinology. **2011***, 107904.

Ross, R. (1999). Atherosclerosis - an inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine. **340***, 115-26.

Ruggenenti, P., Cravedi, P., ve Remuzzi, G. (2010). The RAAS in the pathogenesis and treatment of diabetic nephropathy. Nature Reviews. *Nephrology. **6***(6), 319-30.

Rutledge, J.C., Ng, K. F., Aung, H.H., ve Wilson, D.W. (2010). Role of triglyceride-rich lipoproteins in diabetic nephropathy. *Nature Reviews Nephrology. **6***(6), 361-70.

Sabatini, S., ve Kurtzman, N. (2010). Role of macrophages in the pathogenesis of diabetic nephropathy. İçinde Prabhakar, S.S. (Ed) *Advances in Pathogenesis of Diabetic Nephropathy.* Nova Science Publishers, Inc.; 46-54.

Sano, H., Higashi, T., Matsumoto, K., Melkko, J., Jinnouchi, Y., Ikeda, K., ve ark. (1998). Insulin enhances macrophage scavenger receptor-mediated endocytic uptake of advanced glycation end products. *The Journal of Biological Chemistry*, ***273***(15), 8630-7.

Sato, M., Muragaki, Y., Saika, S., Roberts, A.B., ve Ooshima, A. (2003). Targeted disruption of TGF-beta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibro- sis induced by unilateral ureteral obstruction. *Journal of Clinical Investigation. **112***, 1486-94.

Schmierer, B. ve Hill, C.S. (2007) TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specific- ity and functional flexibility. *Nature Reviews Molecular Cell Biology. **8***, 970-82.

Schwedler, S.B., Metzger, T., Schinzel, R. ve Wanner, C. (2002) Advanced glyca- tion end products and mortality in hemodialysis patients. *Kidney International. **62***, 301-10.

Sharma, K., Jin, Y., Guo, J. ve Ziyadeh, F.N. (1996) Neutralization of TGF-beta by anti-TGF- beta antibody attenuates kidney hypertrophy and the enhanced extracellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice. *Diabetes. **45***, 522-30.

Sharma, K., Ziyadeh, F.N., Alzahabi, B., McGowan, T.A., Kapoor, S., Kurnik, B.R. ve ark. (1997) Increased renal production of transforming growth factor-beta1 in patients with type II diabetes. *Diabetes. **46***, 854-9.

Shimizu, H., Maruyama, S., Yuzawa, Y., Kato, T., Miki, Y, ve ark. (2003). Anti-MCP-1 gene therapy attenuates renal injury induced by protein-overload proteinuria. *American Society of Nephrology Renal Research. **14***, 1496-505

Shimoike, T., Inoguchi, T., Umeda, F., Nawata, H., Kawano, K., ve Ochi, H. (2000). The meaning of serum levels of advanced glycosylation end products in diabetic nephropathy. *Metabolism: Clinical and Experimental, **49***(8), 1030-5.

Singh, R., Singh, A.K., Alavi, N. ve Leehey, D.J. (2003). Mechanismof increased angiotensin II levels inglomerular cells cultured in high glucose. *Journals of the American Society of Nephrology. **14***, 873-80

Singh, R., Barden, A., Mori, T., ve Beilin, L. (2001). Advanced glycation end- products: A review. *Diabetologia. **44***, Issue 2, pp 129–146

Sourris K.C., ve Forbes J.M. (2012). Diabetic Nephropathy: Current and Novel Therapeutic Approaches to Prevent Its Development and Progression. İçinde Sahay, M. (Ed.), *Diseases of Renal Parenchyma*. InTech:179-202

Sourris, K.C., Harcourt, B.E., Penfold, S. a, Yap, F.Y.T., Morley, A.L., Morgan, P.E. ve ark. (2010). Modulation of the cellular expression of circulating advanced glycation end-product receptors in type 2 diabetic nephropathy. *Experimental Diabetes Research. **2010***, 974681.

Sun, W., Gao, X., Zhao, X., Cui, D., ve Xia, Q. (2010). Beneficial effects of C-peptide on renal morphology in diabetic rats. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica. **42***(12): 893-899.

Sureshbabu A., Muhsin, S.A. ve Choi, M.E. (2016). TGF-β signaling in the kidney: profibrotic and protective effects. *American Journal of Physiology-Renal Physiology. **1***, 310(7): 596–606.

Thiery JP. (2003) Epithelial-mesenchymal transitions in development and patholo- gies. *Current Opinion in Cell Biology.**15***,740-6.

Thomas MC, Tikellis C, Burns WM, Bialkowski K, Cao Z, ve ark. (2005). Interaction between renin angiotensin system and advanced glycation in the kidney. *Journals of the American Society of Nephrology. **16***, 2976-84

Thornalley, P.J. ve Rabbani, N. (2009) Highlights and hotspots of protein glycation in end-stage renal disease. *Seminars in Dialysis. **22***(4):400-4.

Thornalley, P.J. (2008) Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems-role in ageing and disease. *Drug Metabolism and Drug Interactions. **23***, 125-50.

Van Obberghen-Schilling, E., Roche, N.S., Flanders, K.C., Sporn, M.B. ve Roberts, A.B. (1988) Transforming growth factor b1 positively regulates its own expression in normal and transformed cells. *The Journal of Biological Chemistry **263***, 7741-6.

Wagner, Z., Molnar, M., Molnar, G.A., Tamasko, M., Laczy, B., Wagner, L. ve ark. (2006). Serum carboxymethyllysine predicts mortality in hemodialy- sis patients. *American Journal of Kidney Diseases. **47***, 294-300.

Wagner, Z., Wittmann, I., Mazak, I., Schinzel, R., Heidland, A., Kientsch-Engel R. ve ark. (2001) N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine levels in patients with type 2 diabetes: role of renal function. *American Journal of Kidney Diseases. **38***, 785-91

Wahren, J. (2016) C-peptide and the pathophysiology of microvascularcomplications of

diabetes. *The Journal of Internal Medicine, **281**,* 3–6.

Walcher, D. ve Marx, N. (2009). Advanced glycation end products and C-peptide—modulators in diabetic vasculopathy and atherogenesis. *Seminars in Immunopathology, **31***, 103–111

Werner, E. (2004). GTPases and reactive oxygen species: switches for killing and signaling. *Journal of Cell Science. **117***,143-53

Williams, M.E. ve Stanton, R.C. (2005). Management of Diabetic Kidney Disease. İçinde Joslin, E.P. ve Kahn, C.R. (Ed.) *Joslin's diabetes mellitus.* (14nd ed.) Philadelphia, Pa. : Lippincott Williams & Willkins; 925-950

Wolf, G. (2004). New insights into the pathophysiology of diabetic nephropathy: from hemodynamics to molecular pathology. *European Journal of Clinical Investigation. **34***, 785-96

Wrighton, K.H., Lin, X. ve Feng, XH. (2009) Phospho-control of TGF-beta superfamily signaling. *Cell Research. **19***, 8-20.

Xu, Z.G., Yoo, T.H., Ryu, D.R., Cheon, P.H., Ha, S.K., Han, D.S. ve ark. (2005). Angiotensin II receptor blocker inhibits p27Kip1 expression in glucose-stimulated podocytes and in diabetic glomeruli. *Kidney International. **67***, 944-52

Yamagishi, S.I. ve Matsui, T. (2010). Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity, **3***(2), 101-8.

Yang, J. ve Liu, Y. (2002) Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis. *Journals of the American Society of Nephrology. **13***, 96–107, 2002.

Yang, J., Dai, C., ve Liu, Y. (2005). A novel mechanism by which hepatocyte growth factor blocks tubular epithelial to mesenchymal transition. *Journal of the American Society of Nephrology. **16***(1), 68-78.

Yasuda, T., Kondo, S., Homma, T., Harris, R.C. (1996). Regulation of extracellular matrix by mechanical stress in rat glomerular mesangial cells. *Journal of Clinical Investigation. **98***, 1991-2000

Yo, Y., Morishita, R., Yamamoto, K., Tomita, N., Kida, I., Hayashi, S., ve ark. (1998) Actions of hepatocyte growth factor as a local modulator in the kidney: potential role in pathogenesis of renal disease. *Kidney International. **53***, 50–58,

Zhang, X., Liu, Y., Dai, C., Yang, J., Mundel, P,. ve Liu, Y. (2003) Sp1 and Sp3 transcription factors synergistically regulate HGF receptor gene expres- sion in kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology. **284***, 82–94.

Zhang, X. ve Liu, Y. (2003) Suppression of HGF receptor gene expression by oxidative stress is mediated through the interplay between Sp1 and Egr-1. *American Journal of Physiology-Renal Physiology. **284***, 1216–1225,

Zhenga, L., Li, L., Qi, G., Hu, M., Hu, C., Wang, S. ve ark. (2018). Transplantation of Telocytes Attenuates Unilateral Ureter Obstruction-Induced Renal Fibrosis in Rats. *Cellular Physiology and Biochemistry. **46***, 2056-2071.

FORMLAR (HASTA ONAM FORMU)

Bir klinik çalışmaya katılmak için davet edilmiş bulunmaktasınız. Aşağıdaki bilgileri okuduktan sonra çalışmaya katılmak isterseniz, bu formu imzalayınız. Formu imzalamanız çalışmanın kapsamı ve riskleri hakkında bilgilendirildiğinizi ve kararınızı serbestçe verdiğinizi belirtmektedir. Bu onay formunun bir kopyası size verilecektir. Bu formda anlamadığınız ifadeler varsa çalışmadaki doktorlara veya araştırmacılara sorarak bilgi edininiz.

Araştırma : Tip 2 Diyabet Hastalarında C-peptid'in Nefropati Kriterleri, AGE, TGF-β1 ve HGF ile İlişkilerinin İncelenmesi

Önerilen araştırmada , tip 2 diabetes mellitus hastalarında ve sağlıklı kontrollerde, C-peptid'in AGE, TGF-β1 ve HGF ile ilişkilerinin nefropati kriterleri eşliğinde incelenmesi amaçlanmıştır. Alınan açlık kan örneklerinde glukoz , HbA1c, insülin, C-peptid ,kreatinin, AGE, TGF-β1 ve HGF ölçülecektir. Kan örneklerine paralel olarak alınacak idrar örneklerinde ilgili ölçümler yapılarak glomerüler filtrasyon hızı (kreatinin klirensi), AGE klirensi, mikroalbüminüri , β2-mikroglobülinüri ve total protein saptanacaktır

Çalışmamız İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı ve Bağcılar Eğitim ve Araştırma Hastanesi olmak üzere iki farklı birimde gerçekleştirilecektir. Bağcılar Eğitim ve Araştırma Hastanesi İç Hastalıkları Eğitim Sorumlusu tarafından belirlenen hastalardan alınacak kan ve idrar örneklerinde, AGE,TGF-β1 ve HGF parametreleri Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda, diğer rutin parametreler Bağcılar Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nin Merkez Laboratuvarı'nda çalışılacaktır. Tüm veriler standardize edilmiş formlarda toplanacaktır.

Değerlendirme prosedürleri ve takip

Dahili muayene: Kan basıncı, kilo, boy, bel çevresi ölçülecek ; standart açlık koşullarında alınacak venöz kan örneklerinde glukoz , HbA1c, insülin, C-peptid , kreatinin, AGE, TGF-β1 ve HGF ölçülecektir. Kan örneklerine paralel olarak alınacak 24 saatlik idrar örneklerinde mikroalbüminüri , β2-mikroglobülinüri ve total protein saptanacak, kreatinin ve AGE ölçümleri yapılarak glomerüler filtrasyon hızı (kreatinin klirensi) ve AGE klirensi saptanacaktır.

Bu amaçla hasta ve sağlıklı kontrollerden bir kez 8 ml (2 tüp) venöz kan (toplardamar kanı) alınacaktır. **Kan alma işleminin komplikasyonu ve riski yoktur. Bu işlem dışında herhangi bir ilaç, madde verilmeyecek veya girişim yapılmayacaktır.** Kan alma işleminde damara giriş esnasında hafif bir acı hissedilebilir ve hafif bir kızarıklık olabilir. Kan örnekleri santrifüj edilerek ependorflarda çalışma anına kadar -20°C de muhafaza edilecektir.

Çalışma için sizden alınan kandan yapılacak analizler için sizden veya bağlı olduğunuz sağlık güvenlik kuruluşundan (SGK) ücret talep edilmeyecek ve sizin doktorunuzu ziyaret etmeniz istenmeyecektir. Ayrıca çalışmaya katıldığınız için size herhangi bir ödeme yapılmayacaktır. Çalışmaya katılmayabilir veya istediğiniz anda çalışmadan çıkabilirsiniz, böyle bir durumda takip ve tedavinizde aksama olmayacaktır. Soru sorma hakkına sahipsiniz.

Doktorunuz uygun görürse sizi çalışmadan çıkarabilir, böyle bir durumda takip ve tedavinizde aksama olmayacaktır. Çalışmadan dolayı herhangi bir maliyet yüklenmeyecektir. Çalışma tamamen bilimsel araştırma amaçlı olup, tedavi protokolunuzda herhangi bir değişikliğe neden olmayacaktır, sonuçları bu amaç dışında kullanılmayacak ve bilgiler başka kişilere verilmeyecektir. Eğer isterseniz çalışmanın sonuçları konusunda bilgilendirileceksiniz.

İzleyiciler, yoklama yapan kişiler, Etik Kurul, Bakanlık ve diğer ilgili sağlık otoritelerinin sizin orijinal tıbbi kayıtlarınıza doğrudan erişimleri bulunabilir, ancak bu bilgiler gizli tutulacaktır.

Sizin kimliğinizi ortaya çıkaracak kayıtlar gizli tutularak kamuoyuna açıklanmayacaktır; araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi sizin kimliğiniz gizli kalacaktır. Araştırma konusuyla ilgili ve sizin araştırmaya devam etme isteğinizi etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde zamanında bilgilendirileceksiniz.

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum. Ayrıca ‘’Verdiğim numunenin ileride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum.’’. Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllü	Tanık	Araştırmacı
Adı-soyadı:		Elif Begüm İlter
İmza-Tarih:		
Tel:		0532 645 79 63
Adres:		C.T.F Tıbbi Biyokimya A.B.D

ETİK KURUL KARARI

T.C .
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

İstanbul ...../ ..../ .....

Sayı : 83045809/ 1688
Konu:

Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Başkanlığına

21 Ocak 2013

İLGİ:24.12.2012 tarihli, 2403 sayılı yazınıza:

Bölümünüze bağlı Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi **Prof.Dr.Gülden BURÇAK'ın** danışmanlığında **Yüksek Lisans Öğrencisi Elif Begüm İLTER'in** yürüteceği **Prof.Dr.Gülnur ANDİCAN, Uzm.Dr.Suat Hayri KÜÇÜK** ve **Doç.Dr.Dede ŞİT'in** yardımcı araştırıcılıklarında **"Tip 2 Diyabet Hastalarında C-peptid'in Nefropati Kriterleri, AGE, TGF-β1 ve HGF ile İlişkilerinin İncelenmesi"** başlıklı **Yüksek Lisans Tezi** hakkında ilgi yazınız ve ekleri **08 Ocak 2013** tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup; Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği alınması koşuluyla etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi,durumun adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini rica ederim.

Eki:
1 dosya

G. Soydaner
Ocak 2013 S. SELEK

Prof.Dr.Fatiş ALTINDAŞ
Dekan Yardımcısı
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

Not: Yanıtlarımızda yazımızın gün ve sayısının belirtilmesi rica olunur.
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa/İSTANBUL
Telefon 0 (212) 414 32 52 Dahili: 22300 Faks: 0(212) 632 00 40 e-posta:ctfetik@istanbul.edu.tr.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

TİP 2 DİYABET HASTALARINDA C-PEPTİD'İN NEFROPATİ KRİTERLERİ, AGE, TGF-ß1 VE HGF İLE İLİŞKİLERİNİN İNCELENMESİ

ORIJINALLIK RAPORU

%8	%5	%3	%6
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	acikerisim.aku.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
2	istanbulsaglik.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
3	Submitted to Ankara University Öğrenci Ödevi	<%1
4	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<%1
5	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	<%1
6	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<%1
7	issuu.com İnternet Kaynağı	<%1
8	doczz.net İnternet Kaynağı	<%1

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ - CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TEZ BENZERLİK RAPORU BAŞVURU VE UYGUNLUK FORMU

ÖĞRENCİNİN

Numarası : 2701100015
Adı Soyadı : ELİF BEGÜM İLTER GARCİA MORENO
Anabilim Dalı : Biyokimya Anabilim Dalı
Programı : Biyokimya Tezli Yüksek Lisans Programı
Öğretim Yılı/Dönemi : 2018-2019 Bahar

Tez Adı	:	Tip 2 Diyabet Hastalarında C-peptid'in Nefropati Kriterleri, AGE, TGF-β1 ve HGF ile İlişkilerinin İncelenmesi

Programda Taranan Sayfa Sayısı	:	158
Tezin İntihal Yönünden Taranma Tarihi	:	26.05.2019
Taranan Tezin Benzerlik Yüzdesi (%)	:	8
Enstitü Benzerlik Yüzdesi Ölçütü (%)	:	20
Enstitü Uygunluğu	:	Evet

Tezin Taratılma Gerekçesi	:	Tez, Tez Savunma Sınav Tarihi almak için İLK kez taratılmıştır.

Danışmanım ile hazırlayarak tamamlamış olduğum Yüksek Lisans tezimin benzerlik ön değerlendirmesi için yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu ve ileride tezimle ilgili her türlü oluşabilecek hukuki sonuca razı olduğumu bilgilerinize arz ederim.

Tarih : 27.05.2019

Elif Begüm İlter Garcia Moreno
Öğrenci İmza

Yukarıda danışmanı olduğum Yüksek Lisans öğrencime ait tezin benzerlik ön değerlendirme talebinin ve elde edilen TURNITIN intihal tarama sonucunun bilgim dahilinde alındığını bilgilerinize arz ederim.

Tarih : 27.05.2019

Prof. Dr. Gülden Burçak
Danışman İmza

Doç. Dr. Gamze Tanrıverdi
Taramayı Yapan İmza

Açıklamalar

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Elif Begüm	**Soyadı**	İlter Garcia Moreno
Doğ.Yeri	Beyoğlu/ İstanbul	**Doğ.Tar.**	14.04.1987
Uyruğu	T.C. Vatandaşı	**TC Kim No**	25705651944
Email	elif-ilter@hotmail.com	**Tel**	0532 645 79 63

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	İ.Ü. Biyoloji Bölümü	2010
Lise	Ümraniye Anadolu Lisesi	2005

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.	Medikal Danışman	Sağlık Bahçesi	2017-
2.	Medikal Danışman	Reaktör	2015-2017
3.	Jr. Medikal Müdür	Publicis Healthcare	2015-2015

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok İyi		70 (TOEFL)
İspanyolca	İyi	İyi	Orta		

***Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
LES Puanı	95		
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
Microsoft Office	Çok iyi
Mendeley	İyi
Veeva Vault	Çok iyi

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

İş Güvenliği Uzmanlığı (C Sınıfı): T.C. Çalışma Bakanlığı Sertifika No; 79787

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Müzik, Sinema, Seyahat