

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

Tez Yöneticisi  
Prof. Dr. Nurettin AYDOĞDU

**DENEYSEL BÖBREK İSKEMİ/REPERFÜZYON  
HASARINDA KİSSPEPTİNİN ROLÜNÜN  
İNCELENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Assel KUDAİBERGENOVA**

EDİRNE – 2018

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

Tez Yöneticisi  
Prof. Dr. Nurettin AYDOĞDU

**DENEYSEL BÖBREK İSKEMİ/REPERFÜZYON  
HASARINDA KİSSPEPTİNİN ROLÜNÜN  
İNCELENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Assel KUDAİBERGENOVA**

**Destekleyen kurum:**

**Tez no:**

EDİRNE – 2018

T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

O N A Y

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans programı çerçevesinde ve Prof. Dr. Nurettin AYDOĞDU danışmanlığında Yüksek Lisans öğrencisi Assel KUDAİBERGENOVA tarafından tez başlığı “**Deneysel Böbrek İskemi/Reperfüzyon Hasarında Kisspeptinin Rolünün İncelenmesi**” olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı **03/05/2018** tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından “**Yüksek Lisans Tezi**” olarak kabul edilmiştir.

İmza  
Prof. Dr. Selma Arzu VARDAR  
JÜRİ BAŞKANI

İmza  
Prof. Dr. Nurettin AYDOĞDU

ÜYE

İmza  
Prof. Dr. Yaşar İnci ALİCAN

ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Tammam SİPAHİ  
Enstitü Müdürü

## **TEŞEKKÜR**

Yüksek lisans eğitimin süresince bana her konuda yol gösteren, tezimin tüm aşamalarında sabırla bilgi ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Nurettin AYDOğDU'ya, eğitimimde emeği geçen Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Arzu VARDAR'a, Prof. Dr. Levent ÖZTÜRK, Dr. Öğr. Üyesi Oktay Kaya'a, çalışmama katılımlarıyla destekleyen Anabilim Dalı tüm asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

<b>GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
<b>AKUT BÖBREK HASARI</b> .....	<b>3</b>
<b>BÖBREK İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARININ FİZYOPATOLOJİSİ</b> .....	<b>5</b>
<b>SERBEST RADİKALLER</b> .....	<b>6</b>
<b>OKSİDATİF STRESS VE ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMİ</b> .....	<b>9</b>
<b>BÖBREK İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARINDA BİYOMARKERLERİN RÖLÜ</b> .....	<b>12</b>
<b>RENİN ANJİYOTENSİN ALDOSTERON SİSTEMİ</b> .....	<b>13</b>
<b>KİSSPEPTİN</b> .....	<b>15</b>
<b>GEREÇ VE YÖNTEMLER</b> .....	<b>18</b>
<b>BULGULAR</b> .....	<b>32</b>
<b>TARTIŞMA</b> .....	<b>53</b>
<b>SONUÇLAR</b> .....	<b>59</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>60</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>61</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>63</b>
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....	<b>76</b>
<b>TABLolar LİSTESİ</b> .....	<b>78</b>
<b>EKLER</b>	

## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>ABH:</b>	Akut Böbrek Hasarı
<b>ACE:</b>	Angiotensin Converting Enzyme
<b>ALT:</b>	Alanin aminotransferaz
<b>ANG II:</b>	Anjiyotensin II
<b>AST:</b>	Aspartat aminotranferaz
<b>ATP:</b>	Adenosin Trifosfat
<b>CK:</b>	Creatine kinase
<b>cNOS:</b>	Konstitütif NOS
<b>FeNa:</b>	Fraksiyonel sodyum atılımı
<b>I/R:</b>	İskemi Reperfüzyon
<b>iNOS:</b>	İndüklenen NOS
<b>K<sup>+</sup>:</b>	Potasyum
<b>KIM-1:</b>	Kidney Injury Molecule-1
<b>KISS:</b>	Kisspeptin
<b>MAU:</b>	Mikroalbuminüri
<b>MDA:</b>	Malondialdehit
<b>Na<sup>+</sup>:</b>	Sodyum
<b>NADPH:</b>	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
<b>NO:</b>	Nitrik Oksit
<b>OX – GSH:</b>	Okside Glutatyon
<b>RAAS:</b>	Renin Anjiyotensin Aldosteron Sistemi

**RED – GSH:** Glutasyon Redüktaz  
**RNS:** Reaktif Azot Türleri  
**ROS:** Reaktif Oksijen Türleri

## GİRİŞ VE AMAÇ

Akut böbrek hasarı (ABH); böbrek işlevlerinin ani kaybına bağlı olarak, idrar çıkışının azalması, kanda kreatinin ve azotlu ürünlerin artması, böbreğin sıvı ve elektrolit dengesinin düzenleme yeteneğinin azalması ile karakterize bir hastalıktır (1).

Çeşitli etiyolojik faktörler ile indüklenen ABH'nın en önemli nedenlerinden biri iskemi reperfüzyon (I/R) hasarıdır. Yılda yaklaşık 13,3 milyon hastayı etkileyen iskemi reperfüzyon hasarı nedeni ile gelişen ABH, yüksek morbidite, mortalite ve sağlık masraflarıyla seyreden toplumsal halk sağlığı sorunlarından biri olmaya devam etmektedir (2,3). Bu durum böbrek transplantasyon, kardiyovasküler cerrahi girişimler, sepsis, şok gibi çeşitli klinik durumlarda meydana gelmektedir (4).

Karmaşık olarak bilinen böbrek I/R hasarının patofizyolojisinde reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif azot türleri (RNS), pürin metabolitleri, vazoaktif peptidler anjiyotensin II (Ang II), Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ACE), nöropeptidler (orexin-A, nöropeptit Y, endotelin, ürotensin II) olmak üzere birçok mediyatör rol almaktadır (5,6,7). Bu peptidler, otokrin/parakrin mediyatör olarak böbrek dolaşımını ve böbrek tübüllerin fonksiyonunu düzenlediği bilinmektedir (6,7). Böylelikle çeşitli biyolojik aktif peptidler ve bunların reseptörleri böbrek fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli fizyopatolojik rol oynadığı rapor edilmiştir (9).

Kisspeptin KISS1 geni tarafından kodlanan biyolojik aktif peptidtir. Kisspeptin ve reseptörlerinin önceden merkezi sinir sistemi, kalp, ovaryum ve plasentada eksprese edildiği bilinmekteydi. Yapılan son çalışmalarda kisspeptin ve reseptörlerinin böbrek tübül hücreleri özellikle toplayıcı kanal hücreleri ile damar düz kas hücrelerinde yapısal olarak bulunduğu ortaya konulmuştur (8,10).



Günümüzde tümör metastazını baskılamada ve üremenin düzenlenmesinde büyük bir rolü olan kisspeptinin adrenal korteksten aldosteron salınımını uyararak bir vazokonstriktör olarak rol oynadığı bildirilmektedir (8,11,12,13). Ayrıca Shoji ve ark. tarafından kronik böbrek hasarının fizyopatolojisinde kisspeptin ekspresyonunun rol oynadığı tespit edilmiştir. Araştırmalarımıza göre kisspeptinin böbrek I/R hasarındaki rolü ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamaktadır. Çalışmamızda deneysel böbrek I/R hasarında kisspeptinin böbrek fonksiyonları, ANG II, ACE ve aldosteron ile ilişkilerini ve böbrek fizyopatolojisindeki rolünü araştırmayı amaçladık.

## GENEL BİLGİLER

### AKUT BÖBREK HASARI

Akut böbrek hasarı, yüksek mortalite ve morbidite ile seyreden kompleks bir klinik hastalıktır. Günümüzde ABH, yapılan yeni araştırmalara ve tedavideki yeni ilerlemelere rağmen, önemli bir klinik sorun olmaya devam etmektedir (14). ABH'nın görülebilen ve ölçülebilen semptomları arasında oligüri, anüri ve durumun ilerlemesiyle azotlu (üre ve kreatinin) ve azotlu olmayan, böbrekler tarafından normal olarak atılan ürünlerin kanda birikimi şeklinde sıralanabilir (15,16). Böbrek fonksiyon bozukluğunun şiddetine ve süresine bağlı olarak, metabolik asidoz, hiperkalemi gibi metabolik bozukluklar, vücut sıvısı dengesindeki değişiklikler ve diğer birçok organ sistemi üzerindeki etkiler eşlik etmektedir (16).

Günümüzde ABH'nın insidansını ve sonuçlarını değerlendirmek, böbrek hasarının şiddetini belirlemek için birkaç sınıflandırma sistemi (RIFLE, AKIN, KDIGO) mevcuttur. Akut Diyaliz Kalitesi Girişimi Grubunun 2004 yılında önerdiği RIFLE olarak adlandırılan standart bir sınıflandırma sistemi klinikte kullanılan ilk sistemdir. RIFLE sınıflandırma sistemine göre ABH sınıflandırılması serum kreatinin düzeyleri ve idrar çıkışı olmak üzere 2 kritere dayanmaktadır. 5 kategorili sınıflandırma sistemi olarak bilinen bu sınıflandırma sisteminde böbrek hasarı şiddetine göre 3 kategoriye: akut böbrek yetmezliği riski, böbrek yetmezliği ve böbrek fonksiyonlarının bozulması; hasar sonucu ise, böbrek fonksiyon kaybı ve son dönem böbrek yetmezliği olmak üzere 2 kategoriye ayrılmaktadır. Akut Diyaliz Kalitesi Girişimi Grubu 2007 yılında RIFLE kriterlerini daha güvenilir hale getirmek için, sistemde

bazı değişiklikler yaparak yeni AKIN sistemini önermiştir. Son dönemlerde Böbrek Hastalığı Küresel Sonuçları İyileştirme Grubu (KDIGO) tıp camiasında böbrek hasarını sınıflandırmada yaygınlıkla kullanılan RIFLE ve AKIN sistemlerini birleştirerek KDIGO sistemini önermiştir. Tıp için yeni ve önemli olan bu sınıflandırma sistemi böbrek hasarını 48 saat içinde görülen kreatinin miktarındaki değişiklikleri veya 7 gün içinde görülen glomerüler filtrasyon hızındaki (GFR) düşüşü göz önüne alarak sınıflandırmaktadır (17-20).

Son dönemlerde yapılan araştırmalarda hastanede hayatını kaybeden hastaların %20'sinin, yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların %50'sinin nedeninin ABH olduğu bildirilmektedir. ABH'na birçok faktör neden olmaktadır. İ/R hasarı hastane kaynaklı ABH nedenleri arasında önde gelmektedir (21). Akut böbrek iskemik hasarının nedenlerinin iskemik inme, böbrek transplantasyonu, travma, miyokard enfarktüsü, şok, sepsis, kardiyovasküler hastalıklar olduğu bildirilmiştir (22).

ABH nedenleri genellikle prerenal, intrinsik ve postrenal olmak üzere 3 major kategoriye ayrılır (23). Bunlardan sadece intrinsik ABH'nın gerçek böbrek hastalığını temsil ettiği, prerenal ve postrenal ABH'nın ise, glomerüler filtrasyon hızının azalmasına neden olan ekstrarenal hastalıkların sonucu olduğu rapor edilmiştir (24,25).

### **Prerenal Akut Böbrek Hasarı**

Prerenal ABH, yetersiz perfüzyon sonucu gelişen, böbrek disfonksiyonunun geri dönüşümlü bir formu olarak bilinmektedir (26). Prerenal ABH damar içi volüm kaybı, böbreğe gelen kan akımında azalma, nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar veya ACE inhibitörlerine bağlı gelişebilmektedir (27). Böbrek prerenal ABH'da, normovolemiyi devam ettirmek adına su (H<sub>2</sub>O) reabsorbsiyonunu artırıp yüksek miktarda sodyum (Na<sup>+</sup>) tutar. Bu sebeple fraksiyonel sodyum ekskresyonu %1'in altındadır (28,29). Prerenal ABH'da böbreğe yeterli derecede kan akımı sağlandığı durumda böbrek fonksiyonları 24-48 saat içerisinde düzelmektedir, böbrek perfüzyon yetersizliği şiddetli veya uzun sürdüğü durumlarda ise prerenal ABH intrinsik ABH'na dönüşmektedir (28,30).

### **İntrinsik Akut Böbrek Hasarı**

Nefron ve böbrek parankimde hasar oluşması ile karakterize intrinsik akut böbrek hasarı, ABH'nın yaklaşık %25'inden sorumludur (31). İntrinsik ABH, nefrotoksik ilaçlar, sepsis, böbrek iskemisi, glomerülo nefrit ve vaskülit gibi inflamatuvar hastalıklara bağlı olarak gelişmektedir (32). İntrinsik ABH tübüler hastalık, glomerüler hastalık, vasküler hastalık ve interstisyel hastalık olmak üzere dört majör sebepten kaynaklanmaktadır (25,33).

## **Postrenal Akut Böbrek Yetmezliği**

Postrenal ABH, idrar akışını engelleyen klinik koşullardan kaynaklanmaktadır (31). Bu durumlar genellikle boşaltım sisteminde meydana gelen tümör veya taş oluşumu sonucu obstrüksiyon ile görülmektedir. Düşük çözünürlüğü olan maddeler ile proteinlerin tübüllerde çökmesi, bu çöküntülerin toplanarak taş oluşmasına, dolayısıyla toplama sistemini tıkamasına neden olmaktadır. Böbrek taş oluşmasına en sık sebep olanlar: ürik asit, struvit, sistein ve kalsiyumdur. Bazı ilaçların da idrarda nispeten düşük çözünürlüğü vardır ve kristalleşerek toplama sistemini tıkayabilmektedir (34,35). Postrenal ABH'nın sık karşılaşılan nedenleri arasında böbrek taşları, tümörler, benign prostatik hipertrofisi ve mesane boynu tıkanıklığı önde gelmektedir. Postrenal böbrek yetmezliği tedavi edilmediği durumlarda, böbrek kaybı ile sonuçlanabilmektedir (31).

## **BÖBREK İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARININ FİZYOPATOLOJİSİ**

İskemi/Reperfüzyon hasarı, kardiyopulmoner bypass, sepsis, kısmi nefrektomi, böbrek transplantasyonu gibi durumlarda görülen ABH'nın gelişimine yol açan en yaygın nedenlerinden biridir (27,36). Bir organa gelen kan akımının kısıtlanması nedeni ile organ/dokunun oksijensiz kalmasına iskemi denilmektedir. Dokunun oksijensiz kalması hücre, adenosin trifosfat (ATP) düzeyinin düşmesine, toksik metabolitlerin birikmesine, dolayısıyla hücre hasarına sonrasında da hücre ölümüne yol açmaktadır (37,38). Enerji eksikliği nedeniyle doğrudan veya dolaylı olarak, hücresel iyon homeostaz bozuklukları, hidrolazın aktivasyonu ve hücresel zarların geçirgenliğinde artış gibi bazı (zararlı) hücre içi değişiklikler meydana gelir. Zararlı süreç ilerledikçe, bu değişikliklerin birbirleri ile net biçimde bağlanması geri dönüşümü olmayan hücre hasarına neden olmaktadır (39). Hücre ölümünün önlenmesi için kan akımı gerekmektedir. İskemiye maruz kalan dokuya kan akımının yeniden sağlanmasına reperfüzyon denilmektedir. Reperfüzyonun iskemik hücrenin ölümünü önlemede önemli bir rol oynadığı rapor edilmiştir. Fakat reperfüzyon aynı zamanda oksijen dönüşümü ile ilişkili olan 'reperfüzyon hasarı' olarak bilinen hücresel hasara katkıda bulunmaktadır. Böylece iskemi hasarı dokuya gelen oksijen eksikliği (hipoksi) nedeni ile gelişirken, reperfüzyon hasarı ise hipoksiye maruz kalan dokuya oksijenin geri dönmesi ile ortaya çıkmaktadır. İskemi ile reperfüzyon birlikteliği hayatı tehdit eden durum ve hastalıklar ile ilişkili olan majör organ ve dokuların fonksiyon bozukluğuna neden olmaktadır (40).

İskemi sırasında hücresel düzeyde böbrek tübüllerinde, glomerülde, damarlarda birtakım değişiklikler meydana gelmektedir (41). İskemi durumunda tübül hücrelerinde ATP

düzeyinin azalması, hücre membranından iyon taşıma mekanizmasının bozulmasına, ATP'ye bağımlı  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz pompasının işlev bozukluğuna dolayısıyla hücreye daha fazla  $\text{Na}^+$  ve  $\text{H}_2\text{O}$  girmesine neden olmaktadır. Endotel hücrelerinde benzer bir işlev bozukluğu damar içi boşluktan sıvı kaybını meydana getirir bu da kan hücrelerinin agregasyonu ile kan viskozitesinin artmasını sağlamaktadır. Kılcal damar tıkanıklığına ve kan akımının olmamasına sebep olan bu değişiklikler, reperfüzyon sırasında böbrek mikrodolaşımının onarımına engel olduğu bildirilmiştir (40,42). ATP eksikliğine bağlı hücrelerde gelişen bu hasarlara, reperfüzyona bağlı oksidan faktörler ile sitokinlerin salınımı, lökosit ve inflamatuvar mediatörlerin (interlökin, tümör nekroz faktör  $\alpha$ , trombosit aktive edici faktörler) göçü eşlik etmektedir (43).

Reperfüzyon, iskemik böbrek dokusunun sağ kalımı için gerekli olsa da hasar oluşumuna yol açmaktadır (44). İskemik hasarın bir efektör fazı olan reperfüzyon hasarı, ilk iskemiden saatler veya günler sonra gelişir. İskemiden sonra onarım ve rejenerasyon süreçlerinin sağlanması hücrel apoptoz, otofaji ve nekroz ile birlikte ortaya çıkar (45). Böbrek reperfüzyon hasarının oluşumunda rol alan hücrel mekanizmalar, kalsiyum homeostazı, oksidatif stres, fosfolipaz ve proteaz aktivasyonundaki işlev bozuklukları, hücrel pH'daki değişiklikler ve inflamatuvar hücrelerin postiskemik böbrek dokulara infiltrasyonunu kapsamaktadır. Bu mekanizmalar birbiriyle ilişkili olup ciddi hücrel hasara neden olur. Ayrıca böbrek I/R hasarı, hasar görmüş böbrekten dolaşım içine salınan mediatörler vasıtasıyla veya biyokimyasal değişikliklerden dolayı böbrek dışı diğer organların uzaktan yaralanmasına katkıda bulunduğu bilinmektedir (40).

## **SERBEST RADİKALLER**

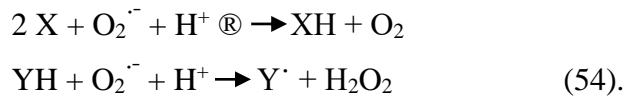
Atom orbitinde bağımsız olarak bir veya daha fazla eşleşmemiş elektronu olan bir atom veya moleküller serbest radikaller olarak bilinmektedir. Eşleşmeyen elektronları sayesinde serbest radikaller genellikle stabil olmayan, reaktivitesi yüksek ve kısa ömürlü olmaktadır (46). Serbest radikaller diğer moleküllere bir elektron verebilirler ya da bir elektron kabul edebilirler, bundan dolayı oksidanlar ya da indirgeyiciler olarak davranabilmektedirler (47). Oksijen içeren serbest radikaller, reaktif oksijen türlerinden (ROS) ve reaktif azot türlerinden (RNS) oluşur. ROS süperoksit anyon, hidroksi radikali, hipokloröz asit ve hidrojen peroksitten oluşurken, RNS'nin nitrik oksit (NO), azot dioksit, peroksinitrit, S-nitrosotiyol ve dinitrosil demir komplekslerini içermektedir (48,49).

Serbest radikaller insan vücudundaki normal metabolik süreç gibi iç kaynaklı kaynaklardan ve X-ışınlarına maruz kalma, sigara ve alkol kullanımı, hava ve su kirliliği, endüstriyel kimyasallar gibi dış kaynaklı kaynaklardan oluşabilmektedirler. Farklı yollar ile vücuda nüfuz eden dış kaynaklı bileşikler parçalanarak serbest radikal hallerine metabolize olmaktadır. Hem enzimatik hem de enzimatik olmayan reaksiyonların sonucu olarak hücrelerde serbest radikal oluşumu sürekli olarak meydana gelir. Serbest radikal kaynağı olarak işlev gören enzimatik reaksiyonlar, solunum zincirinde, fagositozda, prostaglandin sentezinde ve sitokrom P-450 sisteminde yer alanları içerir. Serbest radikaller, oksijenin, organik bileşiklerle olan enzimatik olmayan reaksiyonlarda olduğu kadar iyonlaştırıcı reaksiyonlarla başlatılan reaksiyonlarda da oluşabilir (47,50,51).

### **Süperoksit anyonu**

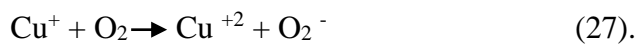
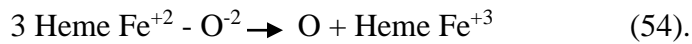
Süperoksit anyonu ( $O_2^{\cdot-}$ ), moleküler oksijenin tek değerli indirgenmesi sonucu oluşan oksijen türevi bir serbest radikaldir (52). Biyolojik olarak, süperoksit anyonu, ROS'un önemli hücresel kaynağı olarak bilinen mitokondriyal solunum zinciri ile fagositik nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidazı olmak üzere iki ana kaynaktan üretilmektedir. Bu nedenle, solunumun bir yan ürünüdür ve bağışıklık savunma sisteminin önemli bir bileşeni olduğu bilinmektedir (53).

Süperoksit anyon radikalinin oluşumu:



Aerobik organizmada oksijenin büyük kısmı mitokondriyal solunum zincirinde suya indirgenirken, oksijen moleküllerinin küçük bir kısmı süperoksit anyon radikaline dönüştürülür. Bu reaksiyonlar kompleks I (NADH: ubiquinone oksidoredüktaz) ve kompleks III (ubiquinol: sitokrom c oksidoredüktaz) tarafından solunum zincirinde görülür (54).

Süperoksit anyon oluşumunun bir diğer önemli yolu demir, bakır gibi geçiş metallerinin oksidasyonu ile gerçekleştirilmektedir. Demir deoksihemoglobinde demir (Fe II) haline indirgenir ve oksijene bağlandığında ara bir yapı oluşur (27,54,55).



### **Hidrojen peroksit**

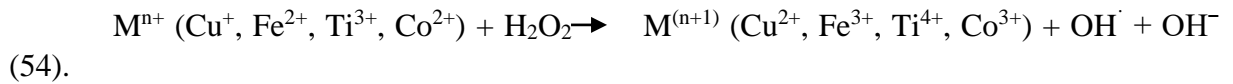
Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ROS'lar arasında en az reaktif molekül olan ve metal iyonlarının yokluğunda fizyolojik pH ve sıcaklığı dengede olan nötr bir moleküldür. Yüksek oranda diffüzyon olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plazma membranını kolayca geçebilmektedir. Vücudumuzda birçok sayıda reaksiyonlarla oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, genelde süperoksit anyonundan süperoksit dismutaz ile bir dismutasyon reaksiyonu vasıtasıyla üretilmektedir. Bunun yanı sıra amino asit oksidaz ve ksantin oksidaz gibi enzimler süperoksit anyonundan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretirler (54,56).

Serbest bir radikal olmayan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nispeten düşük konsantrasyonda hücreye zarar verdiği, yüksek seviyelerde ise, gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz gibi hücresel enerji üreten enzimler etkisiz hale getirdiği bildirilmiştir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin DNA üzerinde doğrudan bir etkisi yoktur ancak metal iyonlarının varlığında hidroksil radikali (OH<sup>-</sup>) üreterek DNA'ya zarar verebilmektedir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi ortadan kaldıran başlıca antioksidan enzimler arasında katalaz, glutatyon peroksidaz ve peroksiredoksinler bulunmaktadır (57).

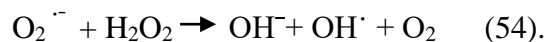
### **Hidroksil radikali**

Hidroksil radikali (OH<sup>·</sup>), çeşitli organik veya inorganik moleküller ve atomlardan bir elektron çıkarabilme kapasitesine sahip olan oksijen içeren reaktif bir serbest radikaldir (58). DNA, protein, lipid ve karbonhidratlar gibi organik ve inorganik moleküller ile kuvvetli bir şekilde reaksiyona girebilen OH<sup>·</sup>'nin hücrelere saldırarak çok ciddi hasar verdiği bilinmektedir (57). OH<sup>·</sup>'nin çok reaktif olduğunu öne süren bilim adamları, in vivo üretilen OH<sup>·</sup>'nin, bir mikrosaniyelik bile olmayacak kısa bir süre içinde yakın çevresindeki moleküller ile hızla birleştiğini rapor etmişlerdir (59).

Hidroksil radikali, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin genellikle ferritin (demir depolayan bir hücre içi protein), serüloplazmin gibi farklı proteinlerle kompleks halinde bulunan metal iyonlarıyla (Fe<sup>+2</sup> veya Cu<sup>+</sup>) reaksiyona girdiği bir Fenton reaksiyonunda oluşturulur (57).



Bunun yanı sıra hidroksil radikali Haber-Weiss reaksiyonu olarak adlandırılan, süperoksit radikali ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> arasındaki reaksiyon da oluşur (57).



### **Singlet oksijen**

Singlet oksijen, biyolojik molekülleri kolayca oksitleyen oldukça reaktif, kısa ömürlü bir reaktif oksijen türüdür (60). Singlet oksijen, süperoksit anyon ile yeniden işlev gören

hidrojen peroksitten veya hücrelerdeki ve dokulardaki HOCl veya kloraminlerden oluşur (56). Biyolojik sistemlerde önemli bir ROS olan singlet oksijen protein, lipid ve nükleik asitleri oksitlediği bilinmektedir (61). Hücre ölümüne yol açan bu oksidasyon, bir enflamatuvar yanıt bağlamında vücudu mikroorganizmaların istilasından savunma açısından yararlıdır. Günümüzde bu yöntem bazı kanserlerin, hedef hücrelerin ışığa maruz bırakarak öldürülmesi ile bilinen fotodinamik tedavisinde kullanılmaktadır (62).

## **OKSİDATİF STRES VE ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMİ**

Serbest radikaller hem toksik hem de yararlı bileşenler olarak ikili bir rol oynamaktadır. Bu iki zıt etki arasındaki hassas denge hayatın önemli bir yönüdür. Düşük veya orta düzeyde ROS ve RNS, gen ekspresyonu, hücre büyüme, hücresel yanıtlar ve bağışıklık fonksiyonu üzerinde faydalı etkiler sağlar. Yüksek konsantrasyonlarda ise, nükleik asit, lipid, sinyal yolları, proteinler dahil olmak üzere önemli hücre bileşenlerini ciddi şekilde etkileyerek hücre ölümüne neden olan, zararlı bir süreç olarak bilinen oksidatif stres oluşmasına neden olurlar (47,63).

Oksidatif stres, hücreler aşırı serbest radikalleri yeterince yok edemediğinde ortaya çıkmaktadırlar. Başka bir deyişle, oksidatif stres, ROS/RNS oluşumu ve nötralizasyonu arasındaki bir dengesizlikten kaynaklanır. Oksidatif stres düzenlenmediği zaman, damar hasarı, kanser, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar, I/R'den kaynaklanan böbrek hasarının gelişiminde büyük rol oynamaktadır (47,63).

Oksidatif stres, böbrek I/R hasarı ile ilişkili patolojik değişikliklerde önemli bir rol oynamaktadır. Böbrek I/R ile indüklenen oksidatif stres hasarı iskemi ve reperfüzyon evreleri olmak üzere iki aşamaya ayrılmaktadır. İskemi evresinde, O<sub>2</sub> yetersiz olması nedeniyle, asidoz oluşumuna ve hücrelerin pH'nda bir düşüşe neden olan anaerobik glikoliz hakim olur. ATP'nin iskemi sırasında kademeli olarak tükenmesi ile, hücre içi kalsiyum (Ca<sup>2+</sup>) konsantrasyonunda bir artışa neden olan Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATP az'ın işlevinde bozukluğun oluşumuna neden olur. Ca<sup>2+</sup> aşırı artımı, ksantin dehidrojenaz'ın ksantin oksidaz'a kalsiyum tetiklemeli ve proteaz bağımlı dönüşümünü aktive eder. Aynı zamanda, iskemi sırasında ATP'nin azalması, ksantin oksidaz ile katalize edilen, O<sub>2</sub><sup>·-</sup> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üreten oksitlenebilir bir substrat olan hipoksantin sağlar. Reperfüzyon aşamasında, kan akışının saptanması ile iskemik dokunun reperfüzyonu, oksidatif stres hasarını arttıran bir dizi olayı tetikler. Reperfüzyon fazında kontrolsüz ROS üretimi, endotel hücre hasarına ve dolayısıyla endotel fonksiyonunun bozulmasına neden olur. Bu, vazokonstriktörlerin salınımının arttırılması ve vazodilatatörlerin azalması ile vazoaktif



maddelerin yerel bir dengesizliğine neden olur. Oksidatif stres, böbrek tübüler hücrelerdeki lipid peroksidasyonu ve DNA mutasyonuna bağlı hücre hasarı meydana getirir ve dolayısıyla böbrek fonksiyon bozukluğuna neden olur (64).

İnsan vücudu normal fizyolojik koşullarda, oksidatif strese antioksidan üreterek karşı koyan birçok mekanizmalara sahiptir (65). Antioksidanlar, serbest radikal oluşumunu inhibe ederek veya serbest radikalın çoğalmasını keserek otomatik oksidasyonunu geciktiren bileşikler veya sistemlerdir (66). "Serbest Radikal Temizleyiciler" olarak bilinen antioksidanlar, ROS'un neden olduğu hasarları önleyerek veya onararak bağışıklık savunmasını geliştirmede ve hastalık riskini düşürmede katkıda bulunurlar (67-69). Antioksidan sistemi zincir kırıcı, önleyici, temizleyici, onarıcı ve metal şelatlayıcı etki olmak üzere 5 yolla etki göstermektedir (66,70).

Antioksidan sistemi günümüzde, enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak 2 major gruba ayrılmaktadır. ROS'un nötralizasyonu ile direkt olarak ilgilenen temel enzimatik antioksidanlar: Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz içerirler (67).

Enzimatik olmayan antioksidanlar metabolik ve besleyici antioksidanlar olarak 2'ye ayrılmaktadır. Endojen antioksidanlara ait metabolik antioksidanlar vücutta yağ asidi, glutatyon, L-arjinin, koenzim Q10, bilirubin ve albumin, ferritin, miyogloblin, transferrin gibi metal bağlayıcı proteinlerin metabolizmaları tarafından üretilirken; ekzojen antioksidanlar besin ile alınan E vitamini, C vitamini, karotenoidler, flavonoidler gibi besinler veya takviyelerle sağlanacak bileşikler ile üretilir (67-69,71).

## **Glutatyon**

Glutatyon tüm memeli dokularında, oksidatif strese karşı koruyan protein olmayan tiyol olarak bulunan bir tripeptid,  $\gamma$ -L-glutamil-L-sisteinil-glisindir. Ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda hayati önem taşıyan GSH, hücre proliferasyonunu, apoptozu, bağışıklık fonksiyonunu ve fibrojenizi modüle eden, redoks sinyalizasyonunun önemli bir belirleyicisidir (72). Glutatyonun tiyol indirgenmiş (GSH) ve okside glutatyon (ox – GSH) şeklinde 2 formu vardır. Belirtilen bu glutatyon formlarından GSH birçok hücrelerde milimolar konsantrasyonlarda bulunurken, ox – GSH ise % 1'den az bir miktarda bulunmaktadırlar (73).

Bağışıklık sistem aktivasyonu, serbest radikalleri süpürme, proteinlerin temel tiyol statüsünü korumak, sistein için bir rezervuar sağlamak, nükleotid metabolizması gibi birtakım hücresel işlevlerin düzenlenmesinde kritik bir rol oynayan GSH'nun en önemli ve iyi bilinen fonksiyonlarından biri hücreleri ROS ve RNS'in indüklediği oksidatif hasara karşı korumaktır

(74,75). GSH'nın bu antioksidan fonksiyonu genelde, GSH'nın glutatyon disülfide okside edildiğinde, hidrojen peroksit ve lipid peroksidi azaltan GSH peroksidaz (GPx) -katalizör reaksiyonları ile gerçekleşmektedir. ox – GSH, NADPH bağlı olarak glutatyon redüktaz (red – GSH) tarafından GSH'ye indirgenerek bir oksidasyon-redüksiyon döngüsü oluşturur (72).

### **Nitrik Oksit**

Nitrik oksit (NO), vasküler tonus, kan basıncı, nörotransmisyon, immün yanıt ve oksidasyona duyarlı mekanizmalar gibi birçok fonksiyonu düzenleyen bir sinyal molekülüdür (76).

İki atomlu serbest radikal olarak bilinen NO, NO sentazlar (NOS) olarak adlandırılan bir enzim ailesinin katalizlediği L-argininden sentezlenir (77). NO, NOS'un nöronal (nNOS), indüklenebilir (iNOS) ve endotel (eNOS) olmak üzere üç farklı izoformlarından üretilir (9,78). Belirtilen izoformların her biri NADPH ve oksijen substratları, tetrahidrobiopterin kofaktörü yardımları ile L-arginini L-sitrulin ve NO'ya dönüştürmektedir (46).

Bu izoformlardan konstitütif NOS (cNOS) olarak ifade edilen eNOS ve nNOS izoformları böbrek damar sisteminde, macula densa hücrelerinde ve jukstaglomerüler aparatı tanımlandığı, indüklenen NOS (iNOS) mezengial hücreler ile proksimal tübüllerinde tespit edildiği bilinmektedir (79).  $Ca^{2+}$ /kalmoduline bağımlı aktive olan cNOS kısa bir süre içerisinde fizyolojik amaçlar için düşük konsantrasyonlarda NO üretirken, sitokinler ve endotoksin tarafından uyarılan iNOS indüklendiğinde uzun sürede ve yüksek konsantrasyonlarda NO üretebilmektedir. Günümüzde iNOS tarafından üretilen NO'nun toksik bir ajan olduğu, buna karşılık nNOS ve eNOS'un koruyucu bir enzim olduğu bilinmektedir (3,80).

Nitrik oksit, damar tonusunun fizyolojik düzenlenmesi, trombosit agregasyonunun inhibisyonu, lökositin endotele yapışmasının zayıflatılması, oksijen türevi serbest radikallerin temizlenmesi, düz kas proliferasyonunun inhibisyonu yoluyla dokuya koruyucu bir şekilde etki edebilmektedir (77).

Günümüzde NO böbrek I/R hasarının fizyolojik ve patolojik süreçlerinin önemli bir mediatörü olarak tanınmaktadır (81). Böbrek I/R hasarı cNOS ve iNOS ekspresyonunda ve aktivitelerinde değişikliklere neden olmaktadır. Böbrek iskemi sırasında hasara yanıt olarak böbrek fonksiyonu için zararlı olan, iNOS aktivitesi artmaktadır. Yüksek konsantrasyonlarda iNOS izoformundan üretilen toksik ajan olarak bilinen NO, proksimal tübül hücre hasarını içeren böbrek patofizyolojisine katkıda bulunduğu bilinmektedir. I/R hasarı sırasında eNOS ekspresyonu artmasına rağmen, I/R sırasında hâkim olan hipoksik koşullar ve asidoz, eNOS

aktivitesini düşmesine ve iNOS aktivitesinin artmasına böylece böbreğin daha fazla hasara uğramasına sebep olduğu rapor edilmiştir (40).

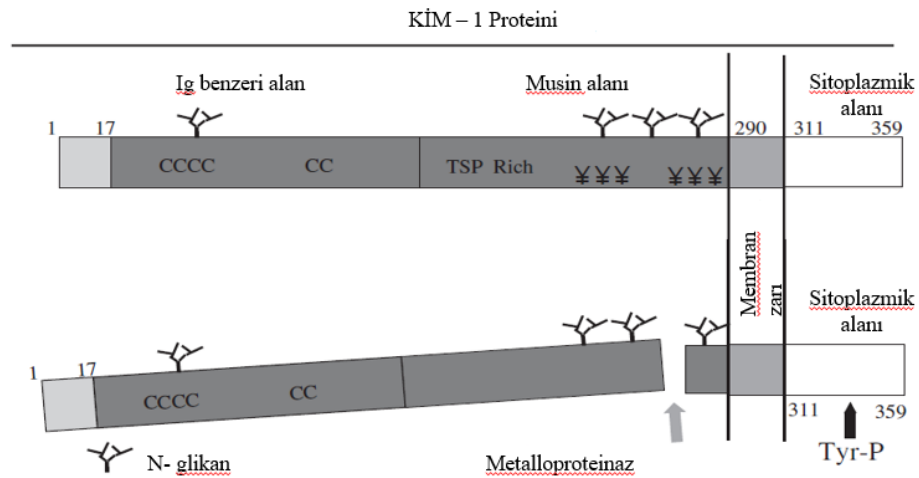
## BÖBREK İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARINDA BİYOMARKERLERİN ROLÜ

Biyomarkerler normal biyolojik ve patolojik süreçlerin, terapötik müdahale verilen farmakolojik yanıtların bir göstergesi olarak ölçülür ve değerlendirilir (82). Terapötik yanıtı değerlendirmek için kullanılan bu biyolojik belirteçler aynı zamanda hastalık aktivitesinin taranması, teşhisi veya izlenmesi için de klinikte sıkça kullanılmaktadır (83).

Son zamanlarda gittikçe yaygınlaşan ABH'nın, büyük oranda asemptomatik olmasından dolayı tanı koymak giderek zorlaşmaktadır. Uzun zamandır klinikte ABH tanımlamak için temel laboratuvar parametreleri olarak serum kreatinin, kan üre azotu (BUN), GFR kullanılmaktadır. Bu belirtecin ABH'ı geç belirtmesinden ve güvenilir bir sonuç vermemesinden dolayı son yıllarda ABH'ı erken belirlenmesinde yardımcı olacak birçok biyolojik belirteçler keşfedilmiştir (84,85).

### KIM - 1

KIM-1, 38.7-kD ağırlığında transmembran bir glikoproteindir. Protein, hücre dış kısmında N- glikozilasyon ve O-glikozilasyon bölgeleri olan musin ve Ig benzeri alanları, tirozin fosforilasyon alanı olan bir transmembran alanı ve kısa bir hücre içi alanını içermektedir (84,86-91).



Şekil 1. KİM - 1 proteini (68).

Böbrek epitel hücrelerindeki bir fosfatidilserin reseptörü olan KIM-1, apoptotik hücreleri tanıyarak onları lizozomlara yönlendiren ve dolayısıyla proksimal tübül hücrelerini fagosite ettiği rapor edilmektedir (92). Sağlıklı böbrek ve idrarda düşük bir düzeyde ifade edilen KIM-1 proteini, I/R hasarının başlaması ile aktive olur ve proksimal tübülün epitel hücrelerinin hasarı sonucu yüksek seviyelerde eksprese edilir (88,92). Yüksek seviyelerde eksprese edilen KIM-1 mRNA proteinin proksimal tübülün en fazla hasar gören bölgesinin apikal zarında lokalize olur (92). Böbrek hasarı sonrası protein ektodomeni bir metalloproteinaz ile parçalanarak idrarda görülür (84,86-91). Sağlıklı bireylerde normal değerleri 59-2146 pg / mL arasında değişen KIM-1 proteini enzim bağlantılı immunosorbent analizi ile idrarda ölçülür (93).

### **Mikroalbüminüri**

Albümin normal şartlarda glomerüler filtrasyona uğramasından sonra proksimal tübüllerden geri emilir. Diyabet, kalp hastalıkları, ABH gibi bir takım bozukluklar sonucu görülen glomerüler ve tubuler hasar albüminin geri emilimini engelleyerek mikroalbüminüriye neden olmaktadır (94).

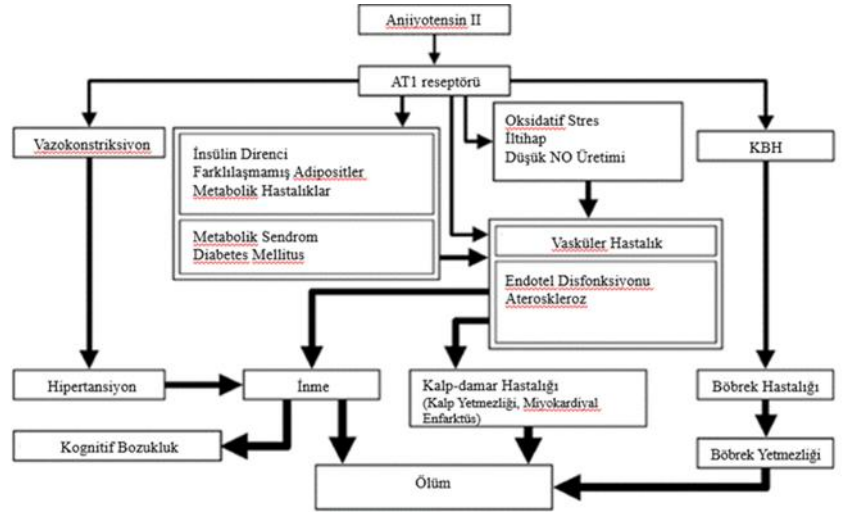
Mikroalbüminüri, albüminin idrarla anormal olarak atılmasına bağlı olarak (30 ila 300 µg / ml) albüminin idrarda subklinik yükselmesi olarak tanımlanır (95).

Günümüzde mikroalbüminüri, glomerüler yapı ve fonksiyonunun bozulması sonucu meydana gelen böbrek anormalliklerin varlığını sinyalini vermesi ile böbrek hastalığının gelişimi ve ilerlemesinde kritik bir tanı aracı olarak kabul edilmektedir (95,96).

### **RENİN ANJİYOTENSİN ALDOSTERON SİSTEMİ**

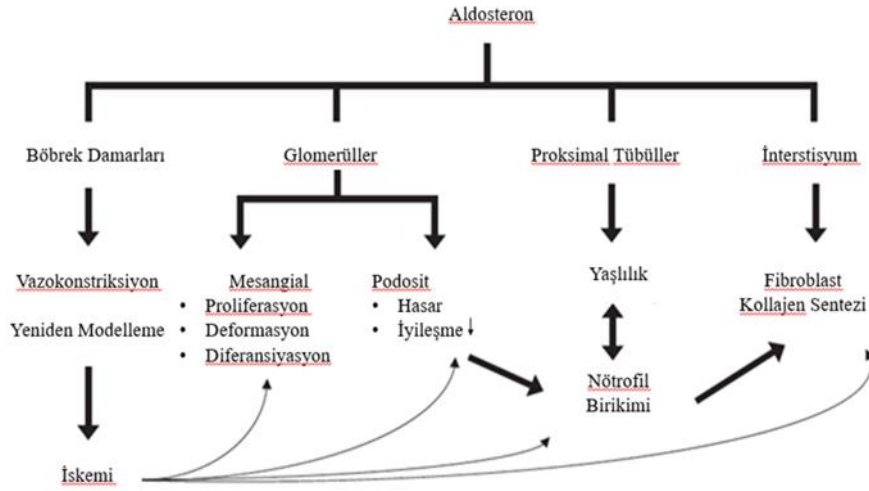
Renin anjiyotensin aldosteron sistemi (RAAS) kan basıncı ve sıvı dengesinin başlıca kontrol sistemlerinden biridir (97). RAAS aktivasyonu ve AngII seviyesinin yükselmesi I/R hasarının önemli risk faktörlerinden biridir. RAAS sisteminin aktivasyonu sempatik sinir stimülasyonuna, oksidatif strese, proksimal tübülün endotelial hücrelerinin apoptoz indüksiyonuna, böbrek damarlarının vazokonstrüksiyonuna yol açarak böbrek hasarına neden olduğu bilinmektedir (3). RAAS böbrek dokuda iltihabı, bu sistem tarafından üretilen biyolojik açıdan en aktif hormon olarak bilinen Ang II yardımı ile modüle etmektedir. İnflamasyon, proliferasyon ve fibrozis gibi patolojik durumları modüle ederek ABH'nın patogenezinde katkıda bulunan Ang II bu eylemi, tümör nekroz faktörü ve transforme edici büyüme faktörü

beta gibi pro-enflamatuvar ve pro-fibrotik sitokinlerin ekspresyonunu arttırarak gerçekleştirmektedir. Ang II, AT1, AT2 gibi belirli reseptörlere bağlanarak beyin, kalp, böbrek, vaskülatür ve bağışıklık sistemi dahil olmak üzere vücudun neredeyse tüm sistemlerini etkileyen geniş bir biyolojik eylemleri tetikleyerek etkilerini göstermektedir. Ang II bu etkisi ACE / AngII / AT1 reseptörü yoluyla ile gerçekleştirdiği rapor edilmiştir (3,97,98,99).AT1 reseptör yoluyla şekil 2’de gösterilmiştir.



Şekil 2. AT 1 reseptör yolu (98).

Ang II reseptörlerinin aktivasyonu, adrenal bezden böbrek hasarının gelişiminde ve ilerlemesinde rolü olan aldosteron sentezini uyarır (99,100). Aldosteron  $\text{Na}^+$  ve hücre dışı sıvı metabolizmasının düzenlenmesinde önemli bir role sahip, RAAS sisteminin önemli bir mediatörüdür (101). Aldosteron Ang II'ye, adrenokortikotropik hormona ve artmış serum potasyum düzeylerine yanıt olarak adrenal korteksin zona glomeruloza hücrelerinden salgılanan, mineralokortikoid aktivitesi olan bir steroid hormondur. Aldosteron genellikle etkilerini böbrekte yer alan nükleer reseptör 3 alt ailesinin bir üyesi olan ve NR3C2 geni tarafından kodlanan sitozolik Mineralokortikoid Reseptörüne bağlanarak göstermektedir (102). Aldosteronun en iyi bilinen fizyolojik fonksiyonları, sodyum dengesi, potasyum homeostazı ve hidrojen iyonlarının atılımı ile ilgilidir (103). Aldosteronun fizyolojik fonksiyonları şekil 3'te gösterilmiştir.



**Şekil 3. Aldosteronun etki yolları (104).**

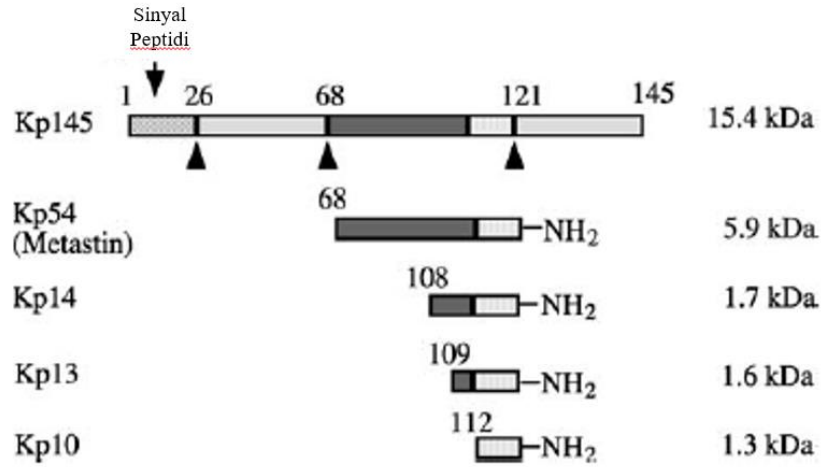
Günümüzde aldosteron'un, oksidatif stres, inflamasyon, fibroz ve hipertrofiye neden olarak kalp, damar ve böbreğin patofizyolojisinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (105). Aldosteron hücre içi adezyon molekülü 1'in , interlökin - 1 $\beta$  ve interlökin - 6, C-C motif kemokin 2, osteopontin gibi glomerüler inflamasyonda rol oynayan önemli inflamatuvar sitokin ve kemokinlerin ekspresyonunu arttırmaktadır. Bunun yanı sıra birçok çalışmalar aldosteronun böbrekte indirgenmiş NADPH oksidaz aktivasyon yolu ile ROS üretimi artırdığını, böylelikle glomerüler hasarın ilerlemesinde katkıda bulunduğunu rapor etmiştir. Dolayısı ile podositlerin, tübüler hücrelerin hasarı ve kaybına, böbrek iltihabına neden olan aldosteronun ABH'nın gelişiminde büyük bir katkısı olduğu rapor edilmiştir (102,104).

### **KİSSPEPTİN**

Kisspeptin - KİSS 1 geni tarafından kodlanan, bir proteindir (106). KİSS1 geni ilk 1996 yılı belli bir tümör metastazların baskılayıcı gen olarak Dr. Danny Welch tarafından keşfedilmiştir (107). Önceden merkezi sinir sistemi, kalp, ovaryum ve plasentada eksprese edildiği bilinen kisspeptin ve reseptörlerinin yapılan son çalışmalar sonucu böbrek tübül hücreleri, toplayıcı kanal hücreleri ile damar düz kas hücrelerinde yapısal olarak bulunduğu ortaya konulmuştur (8,10).

Günümüzde 4 izoformu mevcut olan kisspeptinlerin, 145 amino asidi kapsayan ön maddelerine preprokisspeptin denilmektedir (108). Bu preprokisspeptinler belirli bir yerlerden ayrılarak 4 kısa peptide ayrılmaktadır. Bunlar: metastin olarak adlandırılan ve dolaşım ile dokulardaki en büyük olanı Kisspeptin-54, metastinden kısa olan fragmanlar Kisspeptin-14,

Kisspeptin-13 ve Kisspeptin-10 (kisspeptin yanındaki sayılar ne kadar amino asit içerdiğin gösterir) (109). Kisspeptin izoformları şekil 4’te gösterilmiştir.



**Şekil 4. Kisspeptin İzoformları (110).**

Farklı uzunluklarda olmalarına rağmen benzer güce sahip olan bu kisspeptin izoformları reseptör ile bağlanmada sorumlu olan, ortak karboksi terminal dekapeptid dizisini içerirler (110). Tüm bu kisspeptin izoformları G- proteine bağlı 54 (GPR54) reseptörüne bağlanarak ile etkisini göstermektedirler (109). Kisspeptinlerin reseptörlerine etki düzeyi uzunluklarına bağlı değişmektedirler. Araştırmacılara göre bunların en uzun formları yavaş ve uzun süreli etki ederken, en kısa formu maksimum düzeyde etki etmektedirler (11, 108).

Kisspeptinin fizyolojik etkileri:

1. Gonadotropin serbestleyici hormon (GnRH) salınımını stimüle eder (111).
2. Cinsel/Puberte gelişimini uyarır (111).
3. Anti – metastatik etki gösterir (112).
4. İnsülin salınımını artırır (113).
5. Böbrek gelişiminin düzenlenmesinde rol oynar (114).

Yukarıda sıralanan fizyolojik etkilere ek olarak son zamanlarda yapılan literatür taraması sonucunda kisspeptinin adrenal korteksten RAAS sistemi üyesi olan aldosteron salınımını uyararak, bir vazokonstriktör olarak hareket ettiği ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (8,11,12). Kisspeptinin böbrek fonksiyonunda önemli bir rol oynadığı ile ilgili ilk kanıt Shoji ve ark. 2010 yılı yaptığı çalışmasında rapor edilmiştir. Kisspeptin ve Kiss1 reseptörünün sıçan böbreklerinin tübül hücreleri, toplayıcı kanal hücreleri ve damarın düz kas hücrelerinde bulunduğunu açıklayan Shoji ve ark. kronik böbrek yetmezliğinde Kiss1r protein seviyelerinin büyük ölçüde düştüğünü saptamıştır. Bu bulgular kisspeptinlerin, H<sub>2</sub>O veya elektrolitlerin taşınması gibi böbrek tübül fonksiyonları üzerinde önemli bir rolü olabileceğini

ortaya çıkarmıştır. Böbrek vasküler düz kas hücrelerinde eksprese edilen kisspeptinin otokrin/parakrin vazokonstriktör faktörler olarak etkide bulunabileceği rapor edilmiştir (112). Literatürdeki diğer çalışmalara baktığımızda Gpr54 olarak bilinen kisspeptin reseptörünün silinmesi embriyonik dallanma morfogenezinde defekte, glomerüler gelişminde geriliğe ve yetişkin böbrekte glomerüler sayısının düşmesine, böylelikle böbrek yetmezliğine yol açtığını rapor etmişlerdir. Buna ek olarak Gpr54 reseptörünün böbreklerin doğru gelişmesi için anahtar rol oynayan Bmp7 ekspresyonunu düzenlediğini belirtmişler böylece kisspeptin ve reseptörlerinin böbrek fonksiyonu ve gelişimindeki önemini vurgulamışlardır (114).



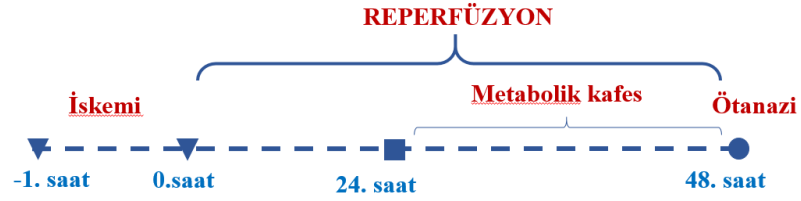
## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamızda Trakya Üniversitesi Deneysel Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'nda yetiştirilen 300-350 g ağırlığında erkek Sprague-Dawley sıçanları kullanıldı. Standart laboratuvar koşullarında ( $22 \pm 1$  °C ve 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda) tutulan bu sıçanlara yem ve su ad libitum olarak verildi. Çalışma için Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu'ndan (Ek-1) onay alındı.

Tüm hayvanlar randomize olarak, her grupta 8 sıçan olacak şekilde 2 gruba ayrıldı. Deneylede kullanılan sıçanlara anestezi yapmak amacı ile intramüsküler olarak 10 mg/kg Xylazine (Rompun, Bayer, Türkiye) ve 90 mg/kg Ketamin (Ketasol, Richterpharma AG, Wels-Austria) uygulandı. Anestezi sonrası 37 °C ısıtılmış deneyle masası üzerine yatırılan sıçanların karın bölgeleri traş edildi. Traşlanan bölgeyle betadin sürülerek orta hattın insizyon açılması ile iç organları steril gazlı bez üzerine alındı ve sağ ve sol böbrek damarları açığa çıkarıldı. Taklit operasyonu uygulanan kontrol grubu sıçanlarının böbrek damarları açığa çıkarıldı ve klemp uygulanmadan 60 dk sonunda insizyon kapatıldı. İ/R grubu sıçanlarının açığa çıkarılan sağ ve sol böbrek damarları atravmatik mikrovasküler klemp uygulanarak, 60 dk süre ile kan akımı engellendi. 60 dk süre ile uyguladığımız iskemi sonunda klemler alınarak 48 saat reperfüzyon uygulandı. Deneyle süresince, zorunlu kaybedilen sıvıyı yerine koymak için vücut ağırlığının % 5'i oranında 37 °C'deki steril fizyolojik serum batın içine verildi.



**Şekil 5. Kontrol grubunun deneysel protokolü**



**Şekil 6. I/R grubunun deneysel protokolü**

Tüm denekler insizyon kapatıldıktan yani reperfüzyonun 24. saatinde metabolik kafeslere yerleştirildi. Sıçanlar metabolik kafeslerde 24 saat tutularak süre sonunda idrar örnekleri alındı.

48 saatlik reperfüzyon sonunda deneklere 10 mg Rompun ve 50 mg/kg Ketamin uygulanarak anestezi altında her iki böbrek alındı. Kalpten kan alınarak ekssanguinasyon yöntemi ile ötanazi uygulandı. Böbreklerin kapsülü alındıktan sonra bisturi yardımı ile uzunlamasına 2 parçaya ayrıldı; soğuk serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra kurutma kağıtları ile kurutulup ependorf tüplerine konuldu. Devamında da doku homojenizasyonu yapıldı. Çalışma öncesi MDA analizi için 0,15 KCl, redükte glutatyon, okside glutatyon, arginin, NO, kisspeptin analizleri için 0.01 M fosfat tamponu (pH 7.4) hazırlandı. Analizler için gerekli tampon solüsyonlar hazırlandıktan sonra, dokular kesilip tartıldı. Tartılan böbrek dokuları buz kalıpları üzerinde steril bistüri ucu ile küçük parçalara ayrıldı ve tüplere yerleştirildi. Dokulara analiz için uygun tampon solüsyonları eklenmesiyle homojenatör ile homojenize edildi. Hazırlanan homojenatlardan +4 C'de 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek elde edilen supernatantlar MDA, NO düzeylerinin ölçümünde, 5000xg'de 5 dk santrifüj edilerek elde edilen supernatantlar kisspeptin düzeylerinin ölçümünde, 5000 devirde 15 dk santrifüj edilerek elde edilen supernatantlar arginin, okside glutatyon, redükte glutatyon düzeylerinin ölçümünde kullanıldı.

Kalpten alınan kan tüplere konuldu ve kan pıhtılaşmasını önlemek adına 4-5 kere alt üst edilerek karıştırıldı. Kan örnekleri 2 saat bekletildikten sonra, idrar örnekleri direkt santrifüj edildi. Kan ve idrar örnekleri soğutmalı santrifüjde + 4 °C’de 3000 devirde kan örnekleri 15 dk, idrar örnekleri 20 dk olacak şekilde santrifüj edildi ve ependorf tüplerine alınarak analiz yapılanaya kadar kadar –80 °C’ne konuldu.

### Kullanılan Gereçler

**Tablo 1. Kullanılan Cihaz ve Aletler**

Cihaz Adı	Cihaz marka ve modeli
Otoanalizör	Kamelab Prime 60i, Finlandiya
Derin dondurucu	Thermo Elektron Corporation, USA
Spektrofotometre	Spectronic Unicam Helios α, İngiltere
Homojenizatör	Polytron Kinematica AG, İsviçre
Soğutmalı santrifüj	MPW 350R, Polonya
Hassas terazi	Mettler Toledo, AB204-S, İsviçre
Otomatik pipetler	Eppendorf Multipipette/Repeate(Xstream), Almanya
Vorteks	Heidolp, Almanya
pH metre	InoLab, Level 1, Almanya
Manyetik karıştırıcı	Biosan MSH-300, Letonya
Orbital çalkalayıcı	Biosan PSU – 10i, Letonya
Su banyosu	Nickel Clifton Elektro LTD, İngiltere
Cam malzemeleri	Deney tüpleri, beherler vb.
Elisa plaka okuyucu	Bio Tek Instruments, Inc (USA)
Elisa plaka yıkayıcı	Bio Tek Instruments, Inc (USA)

**Tablo 2. Kullanılan kimyasal maddeler**

Kimyasal adı	Kimysalın marka ve katalog numaraları
Tiyobarbitürik asit	Merck, Almanya
Sodyum dodesil sülfat	Merck, Almanya
Butanol	Merck, Almanya
Piridin	Merck, Almanya
NaOH	Merck, Almanya
Asetik asit	Merck, Almanya
KCl	Merck, Almanya
Okside Glutasyon ELİSA kit	Mybiosource (MBS752665), ABD
Redükte Glutasyon ELİSA kit	Mybiosource (MBS724319), ABD
Rat KIM-1 ELISA Kiti	Mybiosource (MBS564137), ABD
Nitrik oksit ELİSA kit	Enzo (ADI-917-020)
Mikroalbuminuri ELİSA kit	Elabscience (E- EL- R0025)
Aldosteron ELİSA kit	Elabscience (E- EL- R0554)
ACE ELİSA kit	Elabscience (E- EL- R2401)
ANG II ELİSA kit	Elabscience (E- EL- R1430)
Arginin ELİSA kit	Mybiosource (MBS751058), ABD
Rat KİSS1 (Kisspeptin) ELİSA kit	Elabscience (E-EL-R2530)

## Biyokimyasal Çalışmalar

Serumda sodyum (Na<sup>+</sup>), potasyum (K<sup>+</sup>), Alanin aminotransferaz (ALT), Aspartat aminotransferaz (AST) ve Kreatin kinaz (CK) aktiviteleri ile üre, kreatinin düzeyleri, idrarda kreatinin, Na<sup>+</sup> ve K<sup>+</sup> düzeyleri Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkez Laboratuvarı'nda otoanalizör cihazı ile ölçüldü.

## Malondialdehit Miktar Tayini

Lipit peroksidasyonunun bir belirteci olan MDA'nın sıcak ve asit ortamda tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girmesi neticesinde ortaya çıkan pembe renk spektrofotometrik yöntemle ölçüldü (115,116).

Çözeltiler:

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

Deneyin yapılışı: 0.2 ml 10 kat dilüe edilmiş doku homojenatı; 0.2 ml %8.1'lik SDS, 1.5 ml %20'lik asetik asit, 1.5 ml %0.8'lik TBA ve 0.6 ml distile su ile karıştırıldı. Karışım 1 saat süre ile 95 °C'deki sıcak su banyosunda tutuldu. Musluk suyu altında soğutulduktan sonra üzerine 1 ml distile su ve 5 ml butanol/piridin (15:1) eklenerek 1 dk vorteksle karıştırıldı. 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek organik faz ayrıldı. Spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda homojenat içermeyen ayıraç körüne karşı absorbanslar okundu.

Sonuçların hesaplanması

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

A: Absorbans

V<sub>t</sub>: Total reaksiyon hacmi

10<sup>9</sup>: Molün nanomole çevrilmesi

V<sub>s</sub>: Total reaksiyon içindeki numune hacmi

E: Tüketim katsayısı (1.56 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

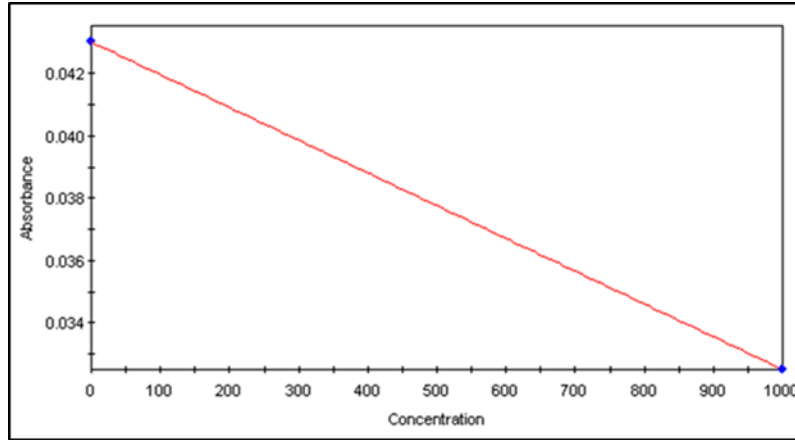
L: Küvet çapı

10<sup>3</sup>: Litrenin mililitreye çevrilmesi

Sonuçlar MDA nmol/g doku olarak ifade edildi.

## Okside Glutasyon Düzeyinin Ölçümü

Böbrek homojenatında ox - GSH düzeylerinin değerlendirilmesi için Mybiosource markalı ELİSA (Cat. No: MBS752665) kiti kullanıldı. Çalışma önce -80C'de muhafaza edilen böbrek homojenatları ve ayrıca kit prosedürüne uygun olarak muhafaza edilen tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Mevcut kit prosedürüne uygun olarak Blank, standart ve numune kuyucukları belirlendi. Standart konsantrasyonları 0, 125, 250, 500, 1000, 2500 pg/ml. Blank kuyucuğuna 100 µl PBS, standart kuyucuklarına ise 100 µl kitte hazır olarak bulunan standartlardan, numune kuyucuklarına ise 100 µl böbrek homojenatı pipetlendi. Ardından numune kuyucuklarına 10 µl balans solüsyonu pipetlendi. Blank kontrol kuyucuğu hariç her kuyucuğa 50 µl konjugate pipetlendikten sonra iyice karıştırıldı. Bu aşamadan sonra plakanın üstü kapatılarak 37°C 1 saat süreyle inkübe edildi. Ardından kit kullanım kılavuzuna uygun olarak hazırladığımız yıkama solüsyonunu kullanarak otomatik plaka yıkama cihazında 5 kez yıkama yapıldı. Yıkama sonrasında blank dahil tüm kuyucuklara 50 µl substrat A solüsyonun ardından 50 µl substrat B solüsyonundan pipetlendi. ELİSA plakası, 10-15 dk 37°C derecede beklendikten sonra 50 µl stop solüsyonu pipetlenerek reaksiyon sonlandırıldı. ELİSA plaka okuyucusunda 450 nm'de okuma gerçekleştirildi. Çalışma grafiği şekil 7'de sunulmuştur.

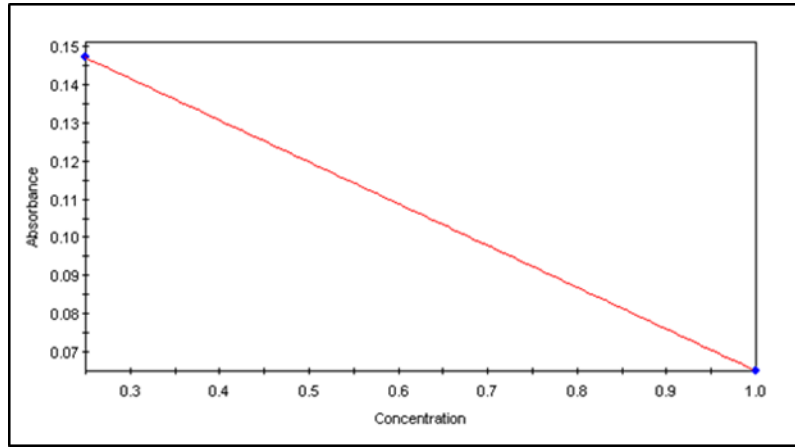


Şekil 7. Okside Glutasyon standart eğri grafiği

## Redükte Glutasyon Düzeyinin Ölçümü

Böbrek homojenatında red - GSH düzeylerinin değerlendirilmesi için Mybiosource markalı ELİSA (Cat. No: MBS724319) kiti kullanıldı. Çalışma önce -80C'de muhafaza edilen böbrek homojenatları ve ayrıca kit prosedürüne uygun olarak muhafaza edilen tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Mevcut kit prosedürüne uygun olarak Blank, standart ve numune kuyucukları belirlendi. Standart konsantrasyonları 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 ng/ml'dir. Blank kuyucuğuna 100 µl PBS standart kuyucuklarına ise 100 µl kitte hazır olarak bulunan

standartlardan, numune kuyucuklarına ise 100 µl böbrek homojenatı pipetlendi. Blank kontrol kuyucuğu hariç her kuyucuğa 50 µl konjugat pipetlendikten sonra iyice karıştırıldı. Bu aşamadan sonra plaka üstü kapatılarak 37°C 1 saat süre ile inkübe edildi. Kuyucukların aspirasyonunu takiben kit kullanım kılavuzuna uygun olarak hazırladığımız yıkama solüsyonunu kullanarak otomatik plaka yıkama cihazında 5 kez yıkama yapıldı. Ardından tüm kuyucuklara 50 µl substrat A solüsyonundan sonrasında 50 µl substrat B solüsyonu pipetlendi. Plakanın üstü kapatılarak güneş ışığından sakınarak 10-15 dk süre ile 37°C inkübe edildi. İnkübasyonu takiben 50 µl stop solüsyonu pipetlenerek reaksiyon sonlandırıldı. ELİSA plaka okuyucusunda 450 nm’de okuma gerçekleştirildi. Çalışma grafiği şekil 8’de sunulmuştur.

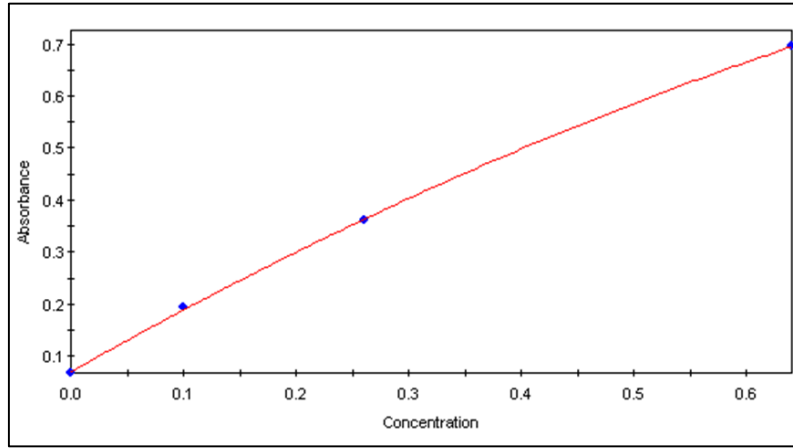


**Şekil 8. Redükte Glutasyon standart eğri grafiği**

### **KİM-1 Düzeylerinin Ölçümü**

İdrar KİM – 1 düzeylerinin değerlendirilmesi için Mybiosource markalı ELISA (Cat. No: MBS564137) kiti kullanıldı. Çalışma önce derin dondurucuda muhafaza edilen idrar örnekleri ve ayrıca kit prosedürüne uygun olarak muhafaza edilen tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Kit kılavuzuna uygun olarak hazırlanan standartlar ilgili kuyucuklara 100 µL pipetlendi. Örnek kuyucuklarına ise 100 µL idrar örnekleri pipetlendi. Plakanın üstü kapatılarak 120 dk boyunca oda sıcaklığında orbital karıştırıcıda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından kit metodolojisine uygun olarak laboratuvarımızda bulunan otomatik plaka yıkayıcı ile toplamda 4 kez yıkama yapıldı. Yıkama sonrası kuyucukların nemli olmamasına dikkat edildi. Uygun şekilde dilüe edilmiş belirleme antikoru her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde pipetlendi ve oda sıcaklığında karanlık ortamda 20 dk boyunca orbital karıştırıcıda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından kit metodolojisine uygun olarak laboratuvarımızda bulunan otomatik plaka yıkayıcı ile toplamda 4 kez yıkama yapıldı. Yıkama sonrası kuyucukların nemli olmamasına dikkat edildi. Uygun şekilde dilüe edilmiş HPR-streptavidin her kuyucuğa 100 µL

pipetlendi ve daha sonra oda sıcaklığında karanlık ortamda 20 dk boyunca orbital karıştırıcıda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından kit metodolojisine uygun olarak laboratuvarımızda bulunan otomatik plaka yıkayıcı ile toplamda 4 kez yıkama yapıldı. Yıkama sonrası kuyucukların nemli olmamasına dikkat edildi. Ardından her kuyucuğa 100 µL TMB pipetlendi ve daha sonra oda sıcaklığında karanlık ortamda 10 dk boyunca orbital karıştırıcıda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından her kuyucuğa 100 µL reaksiyonu sonlandırma solüsyonu pipetlendi. ELİSA cihazında 450 nm dalga boyunda idrar KİM 1 düzeyleri ölçüldü. Çalışma grafiği şekil 9’da sunulmuştur.

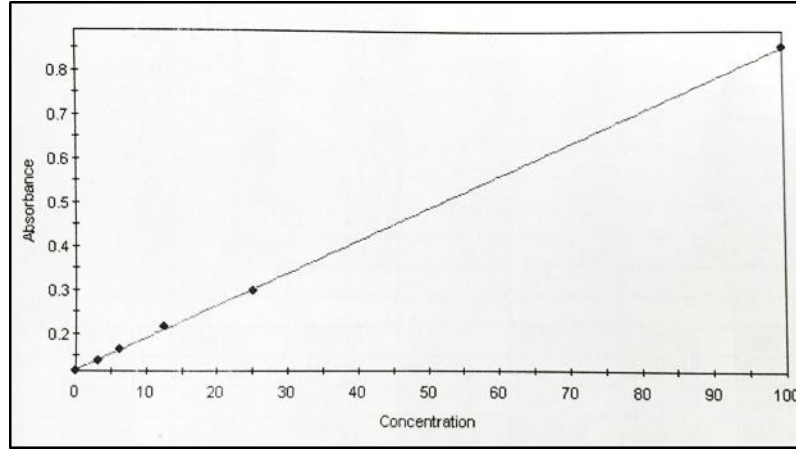


**Şekil 9. KİM-1 standart eğri grafiği**

### **Nitrik Oksit Düzeylerinin Ölçümü**

Serum, idrar ve dokuda NO düzeylerinin değerlendirilmesi için Enzo markalı ELİSA (Cat. No: ADI-917-020) kiti kullanıldı. Çalışma önce -80C’de muhafaza edilen serum, idrar ve doku örnekleri ve ayrıca kit prosedürüne uygun olarak muhafaza edilen tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Kullanılacak kuyucuk sayısı önceden belirlendi. Blank kuyucuklarına 200 reaksiyon tamponu pipetlendi. 1’den 6’ya kadar olan standart kuyucuklarına 50 µL standartlar pipetlendi. Standartlar deneysel protokolde belirtildiği gibi, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 ve 3.125 konsantrasyonlarda olup çift çalışıldı. Zero standart olarak 50 µL reaksiyon buffer pipetlendi. Ardından serum, idrar ve böbrek numunelerinden 50 µL alınarak örnek kuyucuklarına pipetlendi. Tüm zero standart, standart ve örnek kuyucuklarına nitrat redüktaz final enzim dilisyonundan 25 µL pipetlendikten sonra plakanın yan tarafından tutularak dikkatli bir şekilde karıştırıldı sonrasında 37<sup>0</sup>C 30 dk inkübe edildi. İnkübasyonun ardından blank kuyucuğu hariç her kuyucuğa önce 50 µL Griess Reagent I sonrasında 50 µL Griess Reagent II pipetlendi. Plakanın yan tarafından tutularak dikkatli bir şekilde karışması sağlandı ve ardından oda

sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir ve son olarak ELİSA cihazında NO düzeyleri ölçüldü. Çalışma grafiği şekil 10'da sunulmuştur.

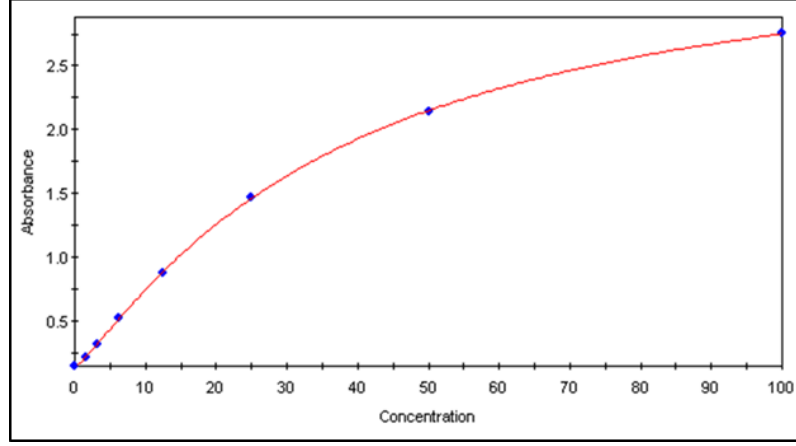


**Şekil 10. Nitrik Oksit standart eğri grafiği**

### **Mikroalbuminüri Düzeylerinin Ölçümü**

İdrarda Mikroalbuminüri düzeylerinin değerlendirilmesi için Elabscience markalı ELİSA (Cat. No: E- EL- R0025) kiti kullanıldı. Çalışma önce -80C'de muhafaza edilen idrar örnekleri ve ayrıca kit prosedürüne uygun olarak muhafaza edilen tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Reaktifler kit kullanım kılavuzuna uygun olarak hazırlandı. Kit kılavuzuna uygun şekilde standart kuyucuğuna önceden hazırlanmış 100 µL standartlardan, numune kuyucuklarına ise 100 µL numune pipetlendi ve nazikçe karıştırıldıktan sonra 37 ° C'de 90 dakika inkübe edildi. Devamında plate içeriği dikkatli şekilde boşaltıldı ve tüm kuyucuklara 100 µL Biotinylated Detection AB solüsyonundan pipetlendi ve nazikçe karıştırıldıktan sonra 37 ° C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası yıkama solüsyonunu ile otomatik plaka yıkama cihazında 3 kez yıkama yapıldı. Ardından tüm kuyucuklara 100 µL HPR konjugate pipetlenerek nazikçe karıştırıldı ve 37°C 30 dk süre ile inkübe edildi. Sonrasında otomatik plaka yıkama cihazında 5 kez yıkama yapıldı. Yıkama ardından tüm kuyucuklara 90 µL Substrate Reagente pipetlenerek iyice karıştırıldı ve 37°C 15 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüm kuyucuklara 50 µL stop solüsyonunda pipetlendi ve ELİSA plaka okuyucusunda 450 nm'de okuma gerçekleştirildi. Çalışma grafiği şekil 11'de sunulmuştur.

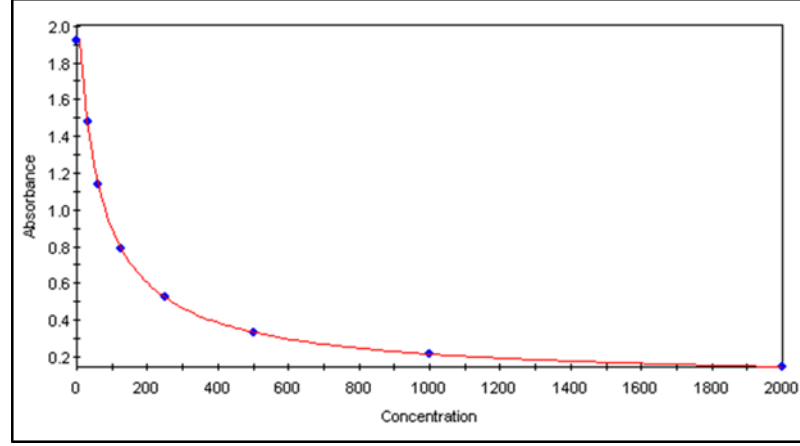




**Şekil 11. Mikroalbuminüri standart eğri grafiği**

### **Aldosteron Düzeylerinin Ölçümü**

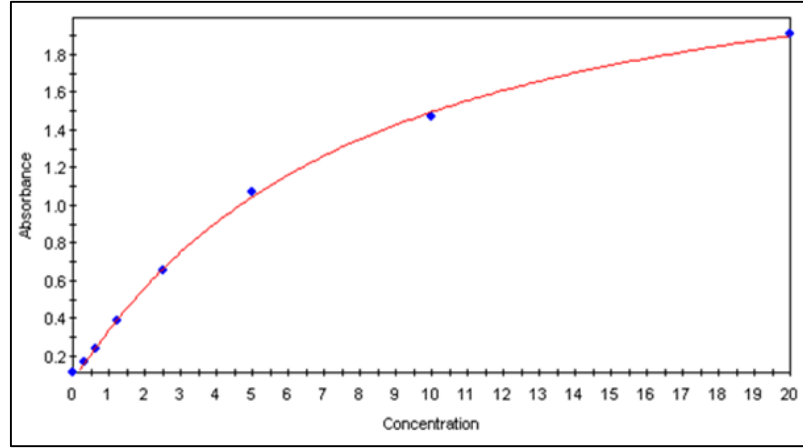
Serumda Aldosteron düzeylerinin değerlendirilmesi için Elabscience markalı ELİSA (Cat. No: E- EL- R0554) kiti kullanıldı. Çalışma önce -80C’de muhafaza edilen serum örnekleri ve ayrıca kit prosedürüne uygun olarak muhafaza edilen tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. İlk önce, önceden belirlenmiş standart kuyucuklarına 100 µL standartlardan, numune kuyucuklarına da 100 µL serum örnekleri pipetlendi. Tüm kuyucuklara 50 µL Biotinylated Detection AB solüsyonu pipetlendikten sonra nazikçe karıştırıldı ve plaka üstü kapatılarak 37<sup>0</sup>C 45 dk süre ile inkübe edildi. Kuyucukların aspirasyonunu takiben kit kullanım kılavuzuna uygun olarak hazırladığımız yıkama solüsyonunu ile otomatik plaka yıkama cihazında 3 kez yıkama yapıldı. Ardından 100 µL HPR konjugate pipetlendi ve nazikçe karıştırıldıktan sonra 37<sup>0</sup>C 30 dk süre ile inkübe edildi. İnkübasyon süresinin bitmesi ile otomatik plaka yıkama cihazında 5 kez yıkama yapıldı. Yıkama sonrası 90 µL Substrate Reagent pipetlendi ve iyice karıştırıldıktan sonra 37<sup>0</sup>C 30 dk süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüm kuyucuklara 50 µL stop solüsyonunda pipetlendi ve ELİSA plaka okuyucusunda 450 nm’de okuma gerçekleştirildi. Çalışma grafiği şekil 12’de sunulmuştur.



**Şekil 12. Aldosteron standart eğri grafiği**

### **ACE Düzeylerinin Ölçümü**

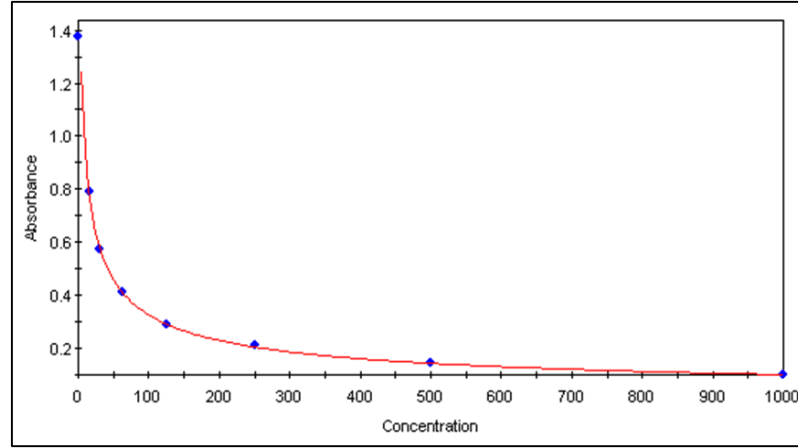
Serum ACE düzeylerinin değerlendirilmesi için Elabscience markalı ELİSA (Cat. No: E-EL-R2401) kiti kullanıldı. Çalışma önce -80C’de muhafaza edilen serum örnekleri ve ayrıca kit prosedürüne uygun olarak muhafaza edilen tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. İlk olarak standart kuyucuklarına ve numune kuyucuklarına 100 µL standartlar ve serum örnekleri pipetlendikten sonra nazikçe karıştırıldı ve plaka üstü kapatılarak 37<sup>0</sup>C 90 dk süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası plate içeriği dikkatli şekilde boşaltıldı ve tüm kuyucuklara 100 µL Biotinylated Detection AB solüsyonundan pipetlendi. Plaka üstü kapatıldıktan sonra nazikçe karıştırılarak 37<sup>0</sup>C 60 dk süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası yıkama solüsyonunu ile otomatik plaka yıkama cihazında 3 kez yıkama yapıldı. Ardından tüm kuyucuklara 100 µL HPR konjugate pipetlenerek nazikçe karıştırıldı ve 37<sup>0</sup>C 30 dk süre ile inkübe edildi. Sonrasında otomatik plaka yıkama cihazında 5 kez yıkama yapıldı. Yıkama ardından tüm kuyucuklara 90 µL Substrate Reagente pipetlenerek iyice karıştırıldı ve 37<sup>0</sup>C 15 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüm kuyucuklara 50 µL stop solüsyonunda pipetlendi ve ELİSA plaka okuyucusunda 450 nm’de okuma gerçekleştirildi. Çalışma grafiği şekil 13’te sunulmuştur.



Şekil 13. ACE standart eğri grafiği

### ANG II Düzeyinin Ölçümü

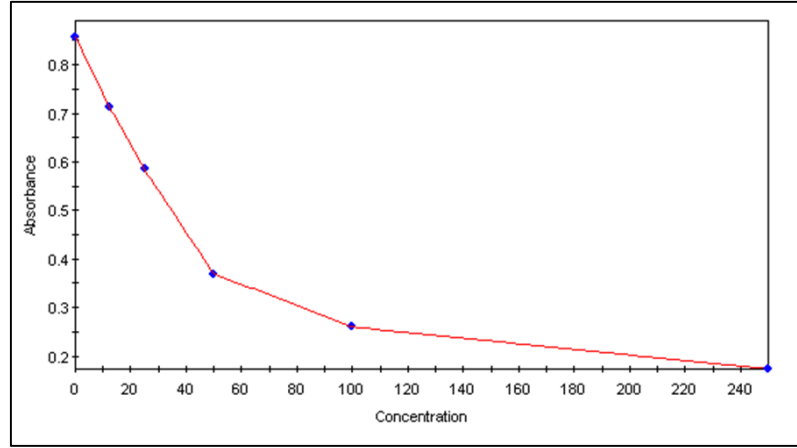
Serum ANG II düzeyinin değerlendirilmesi için Elabscience markalı ELİSA (Cat. No: E-EL-R1430) kiti kullanıldı. Çalışma önce -80°C’de muhafaza edilen serum örnekleri ve ayrıca kit prosedürüne uygun olarak muhafaza edilen tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Kit kullanım kılavuzunda belirtilen örnek ve standartlar kılavuza uygun şekilde hazırlanarak ilgili kuyucuklara 50 µL pipetlendi. Kit prosedüründe belirtildiği üzere 100 kat dilüe edilen biotinlenmiş antikor 50 µL hacminde örnek ve standartlar olmak üzere tüm kuyucuklara pipetlendi, nazikçe karıştırıldıktan sonra 37°C’de 45 dk etüvde inkübasyona bırakıldı. Sonrasında otomatik plaka yıkama cihazı ile kitte belirtildiği gibi 3 kez yıkama yapıldı. Kılavuzda açıklandığı gibi 100 kat dilüe edilen HRP-Konjugat antikorunu her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde pipetlenerek, nazikçe karıştırıldıktan sonra 37°C’de 30 dk inkübe edildi. Devamında da kılavuzda belirtilen koşullarda 5 kez yıkama yapıldı. Yıkamanın ardından 90 µL substrat solüsyonu pipetlenerek, nazikçe karıştırıldıktan sonra 37°C’de 15 dk inkübe edildi. İnkübasyonun ardından her kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu pipetlenerek reaksiyon durduruldu ve ELISA plaka okuyucusunda 450 nm’de okumaları yapıldı. Çalışma grafiği şekil 14’te sunulmuştur.



**Şekil 14. ANG II standart eğri grafiği**

### **Arginin Düzeyinin Ölçülmesi**

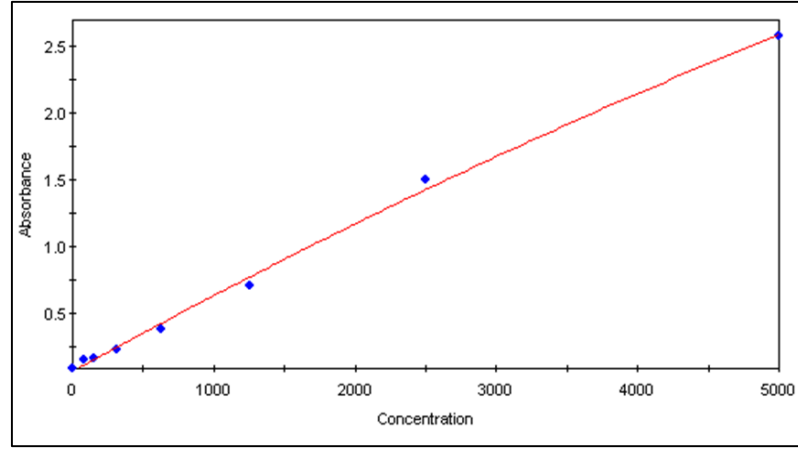
Serum Arginin düzeyinin değerlendirilmesi için Mybiosource markalı ELİSA (Cat. No: MBS751058) kiti kullanıldı. Çalışma önce -80C'de muhafaza edilen serum örnekleri ve ayrıca kit prosedürüne uygun olarak muhafaza edilen tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Mevcut kit prosedürüne uygun olarak Blank, standart ve numune kuyucukları belirlenmiştir. Standart konsantrasyonları 0, 12.5, 25, 50, 100, 250 ng/ml'dir. Blank kuyucuğuna 100 µL PBS, standart kuyucuklarına ise 100 µL kitte hazır olarak bulunan standartlardan, numune kuyucuklarına ise 100 µL serum ve böbrek homojenatı pipetlendi. Böbrek homojenat örnekleri olan kuyucuklara 10 µL Balans çözeltisini pipetlendi ve karıştırıldı. Blank kontrol kuyucuğu hariç her kuyucuğa 50 µL Konjugat pipetlendikten sonra plaka üstü kapatılarak 37<sup>0</sup>C 1 saat süre ile inkübe edildi. Kuyucukların aspirasyonunu takiben kit kullanım kılavuzuna uygun olarak hazırladığımız yıkama solüsyonunu kullanarak otomatik plaka yıkama cihazında 5 kez yıkama yapıldı. Ardından blank kontrol kuyucukları hariç tüm kuyucuklara 50 µL hem substrat A solüsyonundan sonrasında 50 µL substrat B solüsyonu pipetlendi ve nazikçe karıştırıldı. Sonrasında plakanın üstü kapatılarak karanlık ortamda 10-15 dk süre ile 37<sup>0</sup>C inkübe edildi. İnkübasyonu takiben blank kontrol kuyucuğu dahil tüm kuyucuklara 50 µL stop solüsyonu pipetlenerek reaksiyon sonlandırıldı. ELİSA plaka okuyucusunda 450 nm'de okuma gerçekleştirildi. Çalışma grafiği şekil 15'te sunulmuştur.



**Şekil 15. Arginin standart eğri grafiği**

### **Kisspeptin Düzeyinin Ölçülmesi**

Serum, idrar ve doku örneklerinde Kisspeptin düzeyinin değerlendirilmesi için Elabscience markalı ELİSA (Cat. No: E-EL-R2530) kiti kullanıldı. Çalışma önce -80C'de muhafaza edilen serum, idrar ve doku örnekleri ve ayrıca kit prosedürüne uygun olarak muhafaza edilen tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Önceden belirlenmiş ilgili kuyucuklara 100 µL standart, numune kuyucuklarına ise 100 µL serum örnekleri pipetlendi ve üstü kapatılarak etüvde 37<sup>0</sup>C 90 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası plate içeri boşatıldı ve yıkama yapılmadan 100 µL Biotinylated Detection AB solüsyonu pipetlendi ve plate nazikçe karıştırıldıktan sonra üstü kapatılarak 37<sup>0</sup>C 45 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası yıkama solüsyonunu ile otomatik plaka yıkama cihazında 3 kez yıkama yapıldı. Ardından tüm kuyucuklara 100 µL HPR konjugate pipetlenerek nazikçe karıştırıldı ve 37<sup>0</sup>C 30 dk süre ile inkübe edildi. Sonrasında otomatik plaka yıkama cihazında 5 kez yıkama yapıldı. Yıkama ardından tüm kuyucuklara 90 µL Substrate Reagente pipetlenerek iyice karıştırıldı ve 37<sup>0</sup>C 15 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüm kuyucuklara 50 µL stop solüsyonunda pipetlendi ve ELİSA plaka okuyucusunda 450 nm'de okuma gerçekleştirildi. Çalışma grafiği şekil 16'da sunulmuştur.



**Şekil 16. Kisspeptin standart eğri grafiği**

## **İSTATİSTİKSEL ANALİZ**

Çalışmamızda elde edilen bulgular ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. Gruplar arası farklılığı karşılaştırmada Mann-Whitney U testi kullanıldı.  $p < 0.05$  istatistiksel anlamlılık sınır değeri olarak kabul edildi. İstatistiksel analizlerde SPSS 20.0 (Lisans No: 10240642) paket programı kullanıldı.

## BULGULAR

Çalışmamızda sıçanlara 60 dakika iskemi ve 48 saat reperfüzyon uygulayarak oluşturduğumuz deneysel iskemi ABH modelinde, toplam 16 adet sıçan ile çalışıldı. Sıçanlar her grupta sekiz adet olacak şekilde Kontrol ve I/R grubu olarak iki gruba ayrıldı. 48 saat reperfüzyon sonrası sıçanlara anestezi verilerek, kan ve doku örnekleri alındı. Deney sürecince herhangi bir kayıp görülmedi.

Çalışmadaki tüm 16 sıçanın

**Dokuda:** Kisspeptin düzeyi pg/mL, MDA düzeyi nmol/g doku, red-GSH ng/mL ve ox-GSH pg/mL düzeyleri, Arginin uM/L düzeyi, NO  $\mu$ mol/mg protein düzeyleri; **Serumda:** Kisspeptin pg/mL, Aldosteron pg/mL, ACE ng/mL, Ang 2 pg/mL düzeyleri, Sodyum (Na<sup>+</sup>) mmol/L ve Potasyum (K<sup>+</sup>) mmol/L düzeyleri, Üre mg/dl, Kreatinin mg/dl, Alanin aminotransferaz (ALT) U/L ve Aspartat aminotransferaz (AST) U/L düzeyleri, Kreatin kinaz (CK) U/L, Arginin uM/L ve NO  $\mu$ mol/L düzeyleri; **İdrarda:** Kisspeptin pg/mL, KIM-1 ng/mL, Mikroalbuminüri  $\mu$ g/mL, Kreatinin mg/dl, NO  $\mu$ mol/L, sodyum (Na<sup>+</sup>) mmol/L ve potasyum (K<sup>+</sup>) mmol/L düzeyleri ölçüldü. Kreatinin klirensi = idrar kreatin miktarı x günlük idrar miktarı / serum kreatinin x 1440 formülü ile hesaplandı. Fraksiyonel sodyum atılımı (FeNa) = [ idrar Na miktarı x serum kreatinin / idrar kreatin x serum Na miktarı ] x 100 formüllerine göre hesaplandı.

Gruplara ait veriler Tablo 3-4'te, değişkenlere ait ortalamalar ise Tablo 5,6,7'de verilmiştir.

**Tablo 3. Kontrol grubunun biyokimyasal verileri**

<b>SN</b>	<b>Serum Na<sup>+</sup></b>	<b>Serum K<sup>+</sup></b>	<b>Serum Üre</b>	<b>Serum Kreatinin</b>	<b>ALT</b>	<b>AST</b>	<b>CK</b>	<b>Serum Aldosteron</b>	<b>Serum ACE</b>	<b>Serum ANG II</b>	<b>Serum KİSS</b>	<b>Serum Arginin</b>	<b>Serum NO</b>
<b>1</b>	141	4	31	0,3	42	285	1577	1009,40	5,18	593,39	106,08	81,96	40,37
<b>2</b>	138	4,6	38	0,3	49	280	1402	1456,04	6,32	948,69	85,44	66,89	42,3
<b>3</b>	124	4,4	42	0,3	57	390	2730	655,59	6,78	438,98	107,80	72,37	48,55
<b>4</b>	122	4,6	30	0,2	50	273	2145	1001,63	7,83	602,29	75,13	70,09	42,84
<b>5</b>	135	5,6	42	0,3	48	265	2229	2588,21	8,11	1322,94	114,69	63,70	45,83
<b>6</b>	125	5	39	0,3	57	289	2679	732,21	5,77	392,91	106,08	79,68	42,57
<b>7</b>	143	6	36	0,3	52	255	1639	8445,28	4,61	2165,35	121,58	46,63	69,08
<b>8</b>	123	5,3	35	0,3	56	313	2445	7389,94	8,62	1643,70	80,28	98,86	41,35

**SN:** Sıra numarası; **Na<sup>+</sup>:** Sodyum; **K<sup>+</sup>:** Potasyum; **ALT:** Alanin aminotransferaz; **AST:** Aspartat aminotranferaz; **CK:** Kreatin kinaz; **ACE:** Anjiyotensin dönüştürücü enzim; **ANG II:** Anjiyotensin II; **KİSS:** Kisspeptin; **NO:** Nitrik oksit;



**Tablo 3. Kontrol grubunun biyokimyasal verileri (devam)**

<b>SN</b>	<b>Böbrek KISS</b>	<b>MDA</b>	<b>red-GSH</b>	<b>ox- GSH</b>	<b>Böbrek Arginin</b>	<b>Böbrek NO</b>	<b>İdrar KİM-1</b>	<b>İdrar Kreatinin</b>	<b>İdrar MAU</b>	<b>İdrar Na<sup>+</sup></b>	<b>İdrar K<sup>+</sup></b>	<b>İdrar NO</b>	<b>İdrar KISS</b>
1	411,87	0,003	0,06	181,27	1,58	15,89	0,06	155,75	6,43	169	309	11,85	52,80
2	371,05	0,012	0,07	93,46	1,12	15,79	0,01	108,68	17,53	139	293	13,21	71,69
3	376,56	0,011	0,06	39,25	0,89	14,31	0,04	103,53	22,35	146	324	8,04	23,65
4	383,79	0,010	0,07	24,15	0,34	13,88	0,05	101,15	15,99	106	251	9,4	28,79
5	337,53	0,010	0,07	38,76	0,38	14,96	0,03	77,91	32,57	122	167	14,43	28,79
6	346,25	0,012	0,06	106,04	0,22	15,70	0,05	98,4	6,65	147	353	8,99	61,38
7	363,27	0,011	0,06	23,11	0,08	13,81	0,01	97,41	15,41	96	298	10,08	54,52
8	356,37	0,010	0,06	37,59	0,50	13,76	0,05	122,22	19,01	187	340	10,62	37,36

**SN:** Sıra numarası; **KISS:** Kisspeptin; **MDA:** Malondialdehit; **red-GSH:** Glutatyon redüktaz; **Ox-GSH:** Okside glutatyon; **NO:** Nitrik oksit; **KİM-1:** Böbrek hasar molekülü-1; **MAU:** Mikroalbuminüri; **Na<sup>+</sup>:** Sodyum; **K<sup>+</sup>:** Potasyum;

**Tablo 4. IR grubunun biyokimyasal verileri**

SN	Serum Na <sup>+</sup>	Serum K <sup>+</sup>	Serum üre	Serum kreatinin	ALT	AST	CK	Serum Aldo	Serum ACE	Serum ANG 2	Serum KISS	Serum Arginin	Serum NO
1	133	4,9	389	4	65	364	1193	428,17	40,57	357,85	107,80	38,49	42,98
2	116	5,5	426	5,4	60	342	1728	444,68	29,59	357,85	68,25	28,37	50,59
3	132	5,1	324	2,8	77	447	2088	943,11	48,93	602,29	92,32	28,49	70,85
4	121	4,5	356	3,9	74	486	1981	481,08	28,25	521,53	82,00	33,37	65,55
5	115	4,1	346	3,8	66	449	1140	909,54	45,62	764,74	102,64	16,54	47,19
6	144	4,2	267	2,3	91	480	993	483,25	26,94	514,37	112,97	40,12	71,66
7	132	6,1	428	4,8	192	621	2489	755,01	20,95	480,73	76,84	20,47	73,16
8	130	7,8	470	6	94	436	1564	604,37	19,32	274,20	88,88	37,44	55,62

SN: Sıra numarası; Na<sup>+</sup>: Sodyum; K<sup>+</sup>: Potasyum; ALT: Alanin aminotransferaz; AST: Aspartat aminotranferaz; CK: Kreatin kinaz; ACE: Anjiyotensin dönüştürücü enzim; ANG II: Anjiyotensin II; KISS: Kisspeptin; NO: Nitrik oksit;

**Tablo 4. IR grubunun biyokimyasal verileri (devam)**

SN	Böbrek KİSS	MDA	red- GSH	ox- GSH	Böbrek Arginin	Böbrek NO	İdrar KİM-1	İdrar Kreatinin	İdrar MAU	İdrar Na <sup>+</sup>	İdrar K <sup>+</sup>	İdrar NO	İdrar KISS
1	167,72	0,021	0,09	144,93	0,79	12,65	0,41	21,19	34,03	36	55	53,18	56,23
2	105,34	0,010	0,10	164,27	0,82	12,82	0,28	9,53	49,38	61	37	83,36	63,10
3	159,20	0,006	0,09	136,99	0,49	13,38	0,43	22,26	49,63	33	43	55,21	133,65
4	136,00	0,010	0,09	133,33	0,22	14,55	0,39	25,94	47,17	47	57	74,79	130,20
5	30,21	0,008	0,09	134,00	0,61	12,01	0,37	15,01	80,37	31	48	70,98	159,53
6	101,09	0,021	0,09	139,62	0,12	13,67	0,43	29,61	51,34	28	48	62,69	69,97
7	82,70	0,013	0,09	147,57	0,29	12,98	0,34	11,52	40,34	35	40	81,86	95,76
8	152,87	0,012	0,10	173,67	1,17	13,30	0,38	8,74	49,48	57	30	63,24	102,64

**SN:** Sıra numarası; **KISS:** Kisspeptin; **MDA:** Malondialdehit; **red-GSH:** Glutatyon redüktaz; **Ox-GSH:** Okside glutatyon; **NO:** Nitrik oksit; **KİM-1:** Böbrek hasar molekülü-1; **MAU:** Mikroalbuminüri; **Na<sup>+</sup>:** Sodyum; **K<sup>+</sup>:** Potasyum;

**Tablo 5. Grupların böbrek değişkenlerine ait ortalama±SD verileri**

Parametreler	Grup 1. Kontrol	Grup 2. I/R	P - değeri
	Ort ± SD	Ort ± SD	
MDA µmol/mg protein	0,99 ± 0,29	1,26 ± 0,56	p>0,05
red-GSH ng/mg protein	0,06 ± 0,004	0,09 ± 0,006	p<0.001
ox-GSH pg/mg protein	67,95 ± 55,38	146,80 ± 14,76	p<0,05
Arginin µmol/mg protein	0,64 ± 0,51	0,56 ± 0,36	p>0,05
NO µmol/mg protein	14,76 ± 0,94	13,17 ± 0,75	p<0.01
Kiss pg/mg protein	368,34 ± 23,34	116,89 ± 46,44	p<0.001

MDA: Malondialdehit; red-GSH: Glutasyon redüktaz; Ox-GSH: Okside glutasyon; NO: Nitrik oksit; KISS: Kisspeptin;

**Tablo 6. Grupların serum değişkenlerine ait ortalama±SD verileri**

Parametreler	Grup 1. Kontrol	Grup 2. I/R	P- değeri
	Ort ± SD	Ort ± SD	
ALT U/L	51,38 ± 5,24	89,88 ± 43,00	p<0.001
AST U/L	293,75 ± 42,56	453,13 ± 85,04	p<0.01
CK U/L	2105,75 ± 513,09	1647,00 ± 523,63	p>0,05
Üre mg/dl	36,63 ± 4,53	375,75 ± 65,57	p<0.001
Kreatinin mg/dl	0,29 ± 0,35	4,13 ± 1,25	p<0.001
Na <sup>+</sup> mmol/L	131,38 ± 8,77	127,88 ± 9,85	p>0,05
K <sup>+</sup> mmol/L	4,94 ± 0,67	5,28 ± 1,22	p>0,05
Aldosteron pg/mL	2909,79 ± 3162,41	631,15 ± 210,86	p<0.01
ACE pg/mL	6,65 ± 1,44	32,52 ± 11,16	p<0.001
ANG II pg/mL	1013,53 ± 641,95	449,12 ± 108,52	p<0,05
Kiss pg/mL	99,64 ± 17,05	91,46 ± 15,60	p>0,05
Arginin µmol/L	72,52 ± 15,21	30,41 ± 8,59	p<0.001
NO µmol/L	46,61 ± 9,45	59,70 ± 12,06	p<0.05

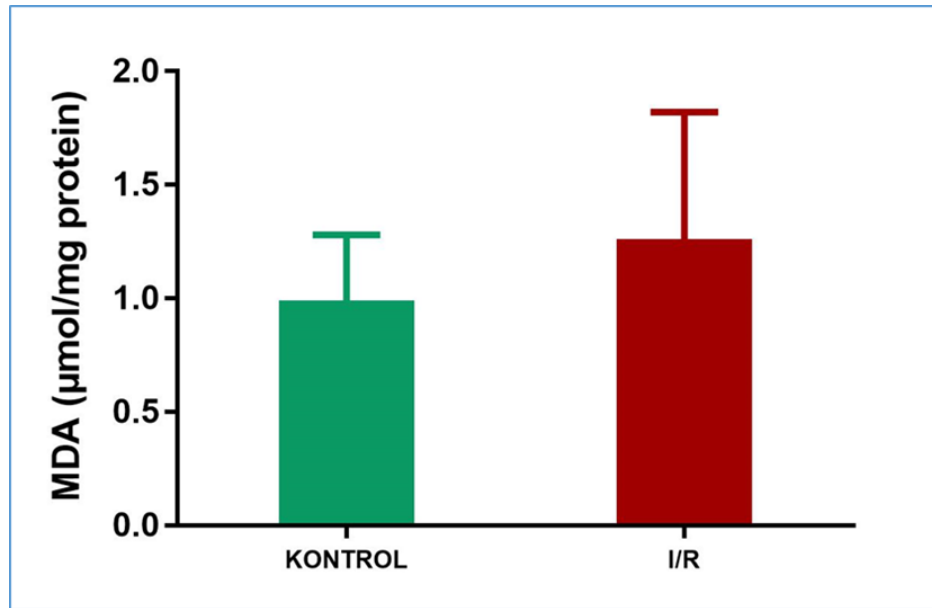
ALT: Alanin aminotransferaz; AST: Aspartat aminotranferaz; CK: Kreatin kinaz; ACE: Anjiyotensin dönüştürücü enzim; ANG II: Anjiyotensin II; Na<sup>+</sup>: Sodyum; K<sup>+</sup>: Potasyum; KISS: Kisspeptin; NO: Nitrik oksit;

**Tablo 7. Grupların idrar değişkenlerine ait ortalama±SD verileri**

Parametreler	Grup 1. Kontrol	Grup 2. IR	P - değeri
	Ort ± SD	Ort ± SD	
Na <sup>+</sup> mmol/L	139,00 ± 30,58	41,00 ± 12,46	p<0.001
K <sup>+</sup> mmol/L	291,88 ± 59,38	44,75 ± 9,10	p<0.001
Kreatinin mg/dl	108,13 ± 22,86	17,98 ± 7,88	p<0.001
Kreatinin Klirensi ml/dk	2,76 ± 0,61	0,15 ± 0,10	p<0.001
FeNa %	0,29 ± 0,08	11,67 ± 11,62	p<0.001
NO µmol/L	10,85 ± 2,19	68,16 ± 11,44	p<0.001
KIM-1 ng/mL	0,04 ± 0,02	0,38 ± 0,05	p<0.001
Kiss pg/mL	44,87 ± 17,61	101,39 ± 37,37	p<0.01
İdrar Hacmi ml	10,73 ± 2,35	39,88 ± 5,93	p<0.001

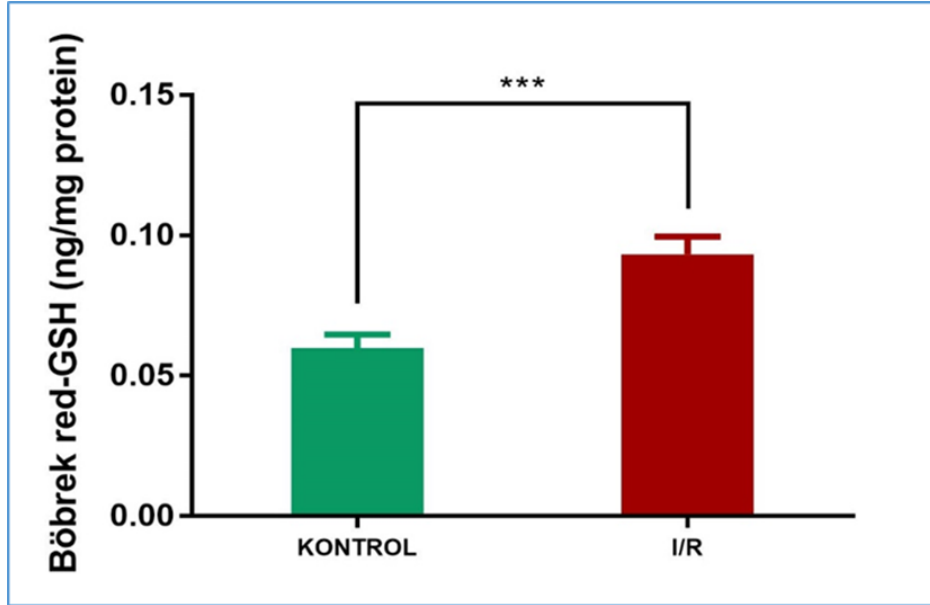
Na<sup>+</sup>: Sodyum; K<sup>+</sup>: Potasyum; ; FeNa: Fraksiyonel sodyum atılımı; NO: Nitrik oksit; KIM-1: Böbrek hasar molekülü-1; KISS: Kisspeptin;

Gruplar arası böbrek MDA düzeyleri değerlendirildiğinde, gruplar arasında istatistik olarak anlamlı bir değişiklik gözlemlenmedi p>0,05. Gruplar arası böbrek MDA düzeylerinin dağılımları şekil 17’de sunulmuştur.



**Şekil 17. Gruplar arası ortalama MDA düzeylerinin karşılaştırılması**

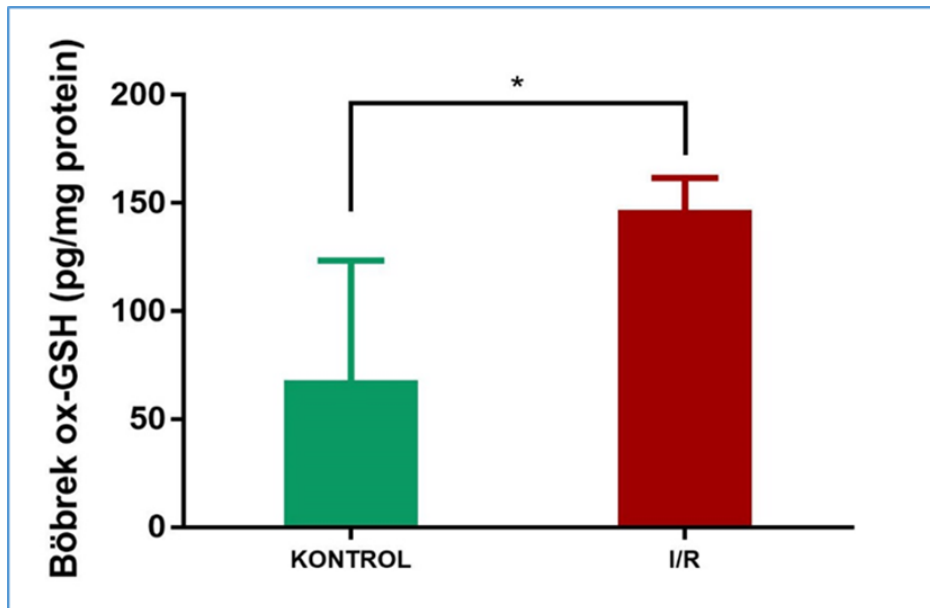
Gruplar arası böbrek red - GSH düzeyleri karşılaştırıldığında Kontrol grubu sıçanlarının böbrek red - GSH düzeylerine göre I/R grubu sıçanlarının böbrek red - GSH düzeylerinde  $p<0,001$  düzeyinde istatistik olarak anlamlı bir artış saptanmıştır. Gruplar arası böbrek red – GSH düzeylerinin dağılımları şekil 18’de sunulmuştur.



Karşılaştırmalar: Kontrol grubu ile IR grubu \*\*\* $p<0.001$

Şekil 18. Gruplar arası ortalama red - GSH düzeylerinin karşılaştırılması

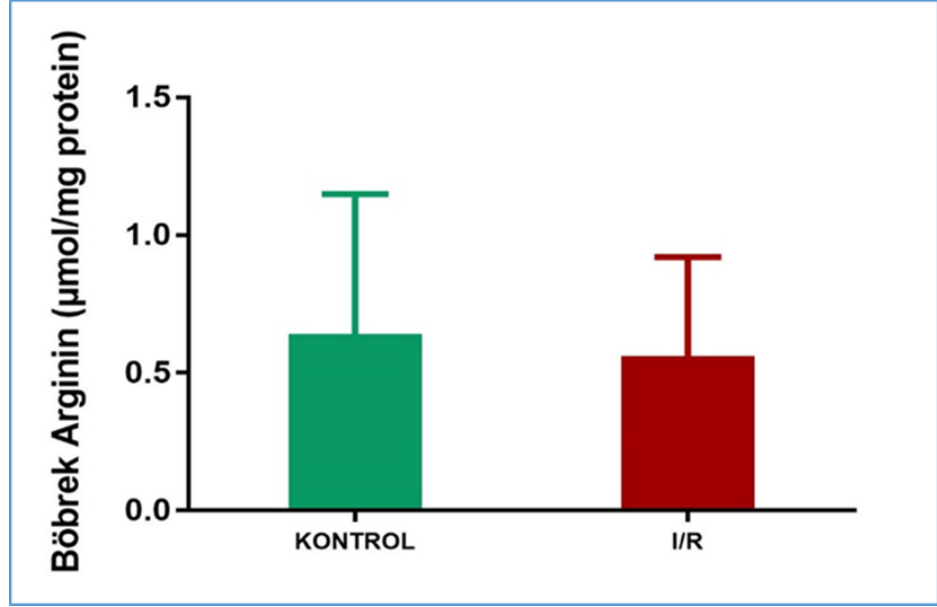
Gruplar arası böbrek ox - GSH düzeyleri incelendiğinde, böbrek ox - GSH değerleri Kontrol grubuna göre I/R grubunda  $p<0,05$  düzeyinde istatistik olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu. Gruplar arası böbrek ox - GSH düzeylerinin dağılımları şekil 19’da sunulmuştur.



Karşılaştırmalar: Kontrol grubu ile I/R grubu \* $p<0.05$

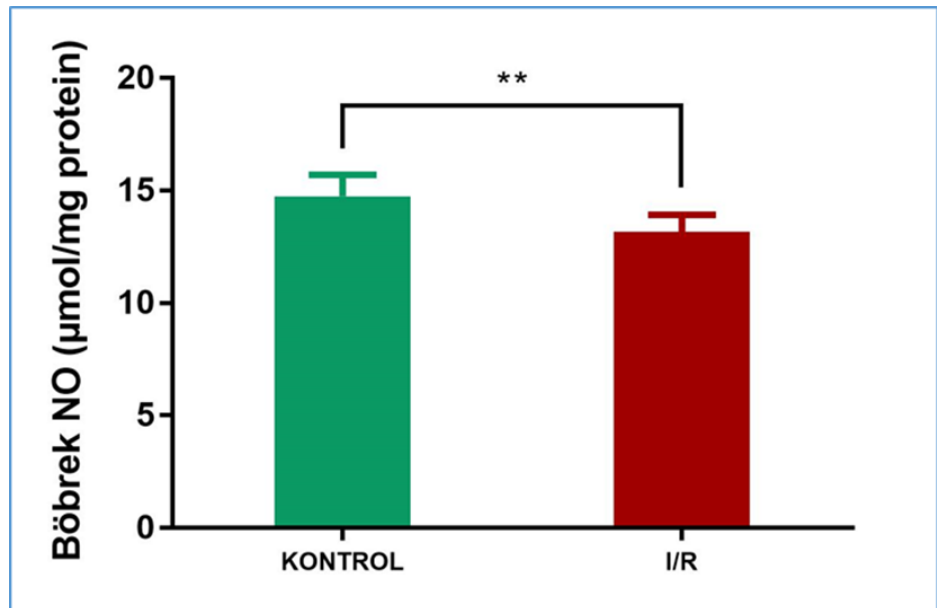
Şekil 19. Gruplar arası ortalama ox- GSH düzeylerinin karşılaştırılması

Gruplar arası böbrek Arginin düzeyleri karşılaştırıldığında her iki grup sıçanlarının böbrek Arginin düzeylerinde istatistik olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi  $p > 0,05$ . Gruplar arası böbrek Arginin düzeylerinin dağılımları şekil 20’de sunulmuştur.



Şekil 20. Gruplar arası ortalama Arginin düzeylerinin karşılaştırılması

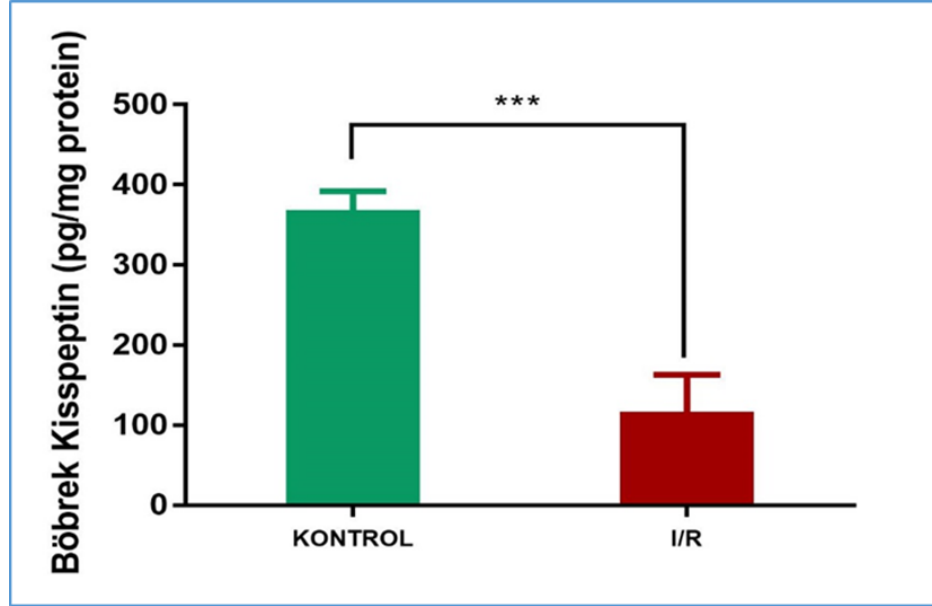
Gruplar arası böbrek NO düzeyleri değerlendirildiğinde, Kontrol grubu sıçanlarının böbrek NO düzeylerine göre I/R grubu sıçanlarının böbrek NO düzeylerinde  $p < 0,01$  düzeyinde istatistik olarak anlamlı düşüş saptanmıştır. Gruplar arası böbrek NO düzeylerinin dağılımları şekil 21’de sunulmuştur.



Karşılaştırmalar: Kontrol grubu ile I/R grubu \*\* $p < 0.01$

Şekil 21. Gruplar arası ortalama böbrek NO düzeylerinin karşılaştırılması

Gruplar arası böbrek KİSS düzeyleri karşılaştırıldığında Kontrol grubu sıçanlarının böbrek KİSS düzeylerine göre I/R grubu sıçanlarının böbrek KİSS düzeylerinde  $p<0,001$  düzeyinde istatistik olarak anlamlı bir azalma saptanmıştır. Gruplar arası böbrek KİSS düzeylerinin dağılımları şekil 22’de sunulmuştur.

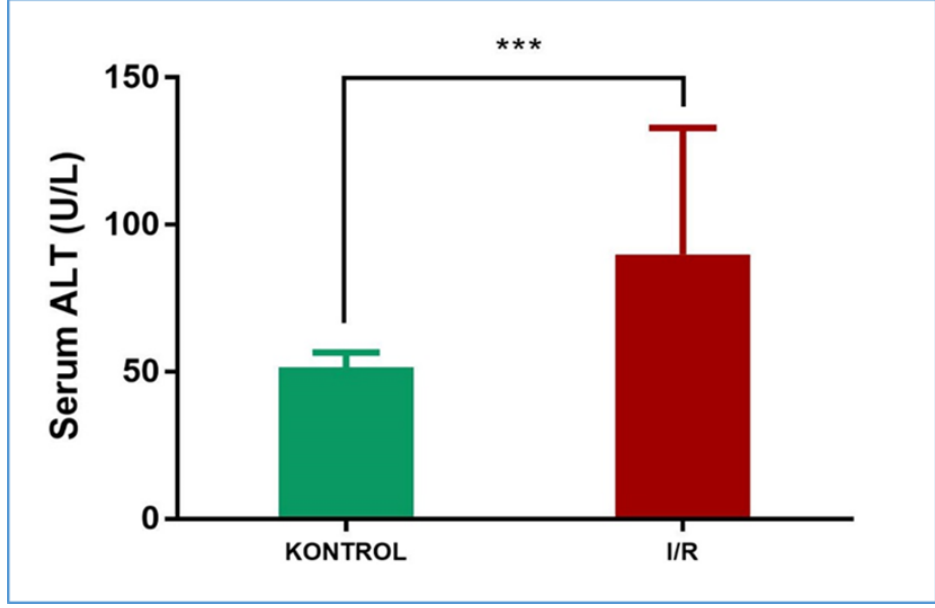


Karşılaştırmalar: Kontrol grubu ile I/R grubu \*\*\* $p<0.001$

**Şekil 22. Gruplar arası ortalama böbrek Kisspeptin düzeylerinin karşılaştırılması**

Gruplar arası serum ALT düzeyleri incelendiğinde istatistik olarak anlamlı bir değişim görülmüştür. Akut böbrek hasarı oluşturulan I/R grubunun sıçanlarının serum ALT düzeyleri sham operasyonu uygulanan Kontrol grubunun sıçanlarının serum ALT düzeylerine  $p<0,001$  düzeyinde anlamlı şekilde arttığı görülmüştür. Gruplar arası serum ALT düzeylerinin dağılımları şekil 23’te sunulmuştur.

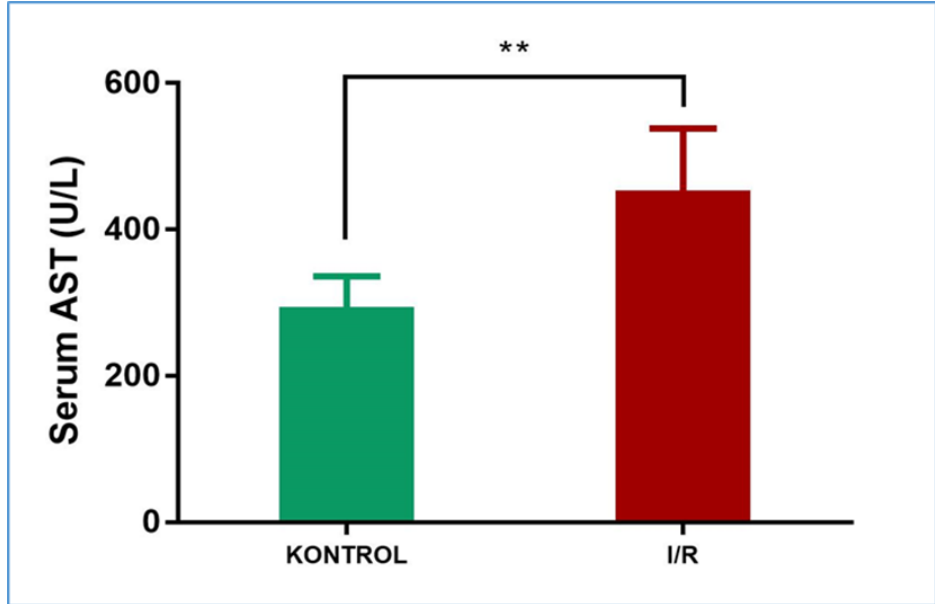




Karşılaştırmalar: Kontrol grubu ile I/R grubu \*\*\* $p < 0.001$

**Şekil 23. Gruplar arası ortalama serum ALT düzeylerinin karşılaştırılması**

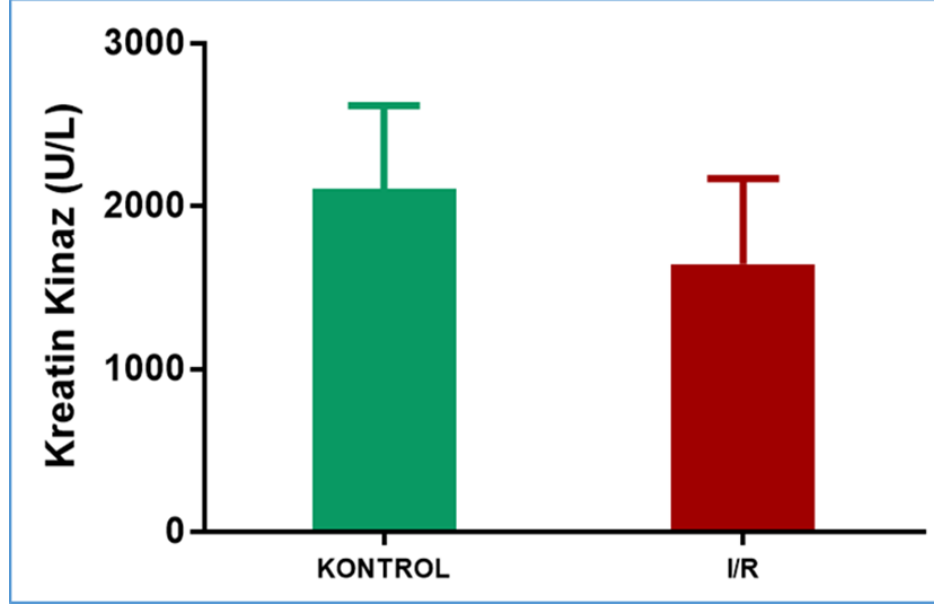
Gruplar arası serum AST düzeyleri karşılaştırıldığında Kontrol grubu sıçanlarının serum AST düzeylerine göre I/R grubu sıçanlarının serum AST düzeylerinde  $p < 0,01$  düzeyinde istatistik olarak anlamlı bir şekilde arttığı bulunmuştur. Gruplar arası serum AST düzeylerinin dağılımları şekil 24’te sunulmuştur.



Karşılaştırmalar: Kontrol grubu ile I/R grubu \*\* $p < 0.01$

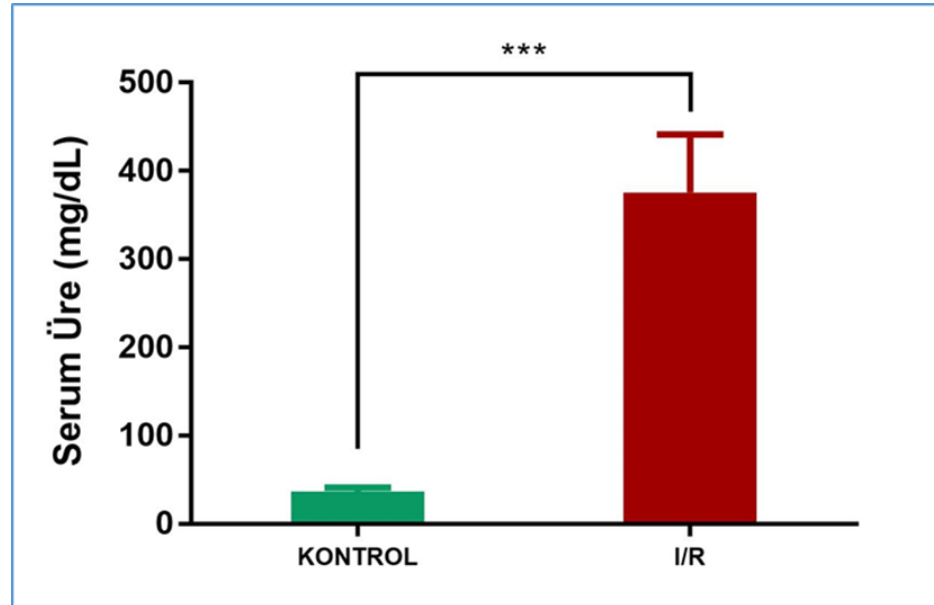
**Şekil 24. Gruplar arası ortalama serum AST düzeylerinin karşılaştırılması**

Gruplar arası serum Kreatin Kinaz düzeyleri değerlendirildiğinde, gruplar arasında istatistik olarak anlamlı bir değişiklik gözlemlenmedi  $p>0,05$ . Gruplar arası serum Kreatin kinaz düzeylerinin dağılımları şekil 25'te sunulmuştur.



Şekil 25. Gruplar arası ortalama kreatin kinaz düzeylerinin karşılaştırılması.

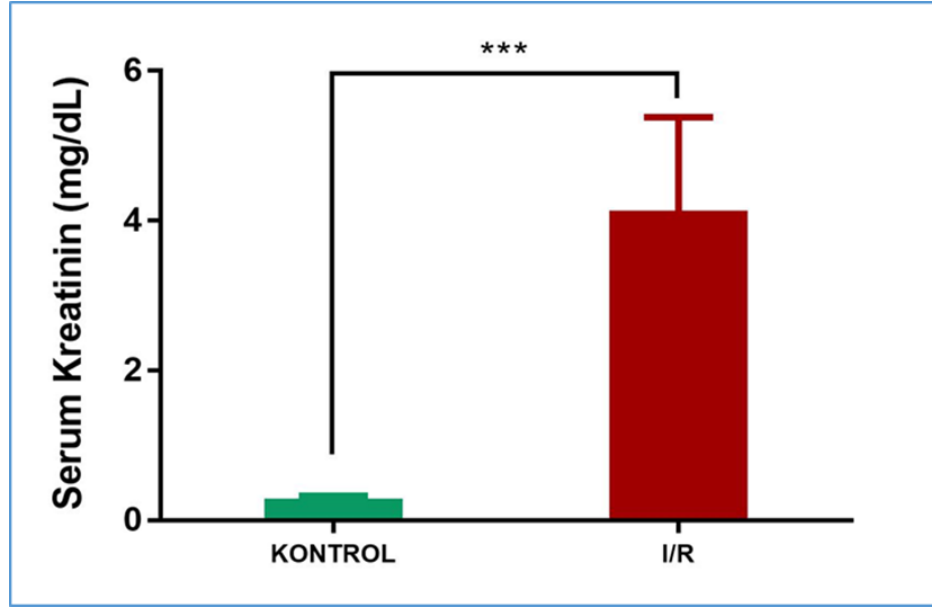
Gruplar arası serum üre düzeyleri incelendiğinde, Kontrol grubu sıçanlarının serum üre düzeylerine göre I/R grubu sıçanlarının serum üre düzeylerinde  $p<0,001$  düzeyinde istatistik olarak anlamlı bir şekilde arttığı saptanmıştır. Gruplar arası serum üre düzeylerinin dağılımları şekil 26'da sunulmuştur.



Karşılaştırmalar: Kontrol grubu ile IR grubu \*\*\* $p<0,001$

Şekil 26. Gruplar arası ortalama serum Üre düzeylerinin karşılaştırılması

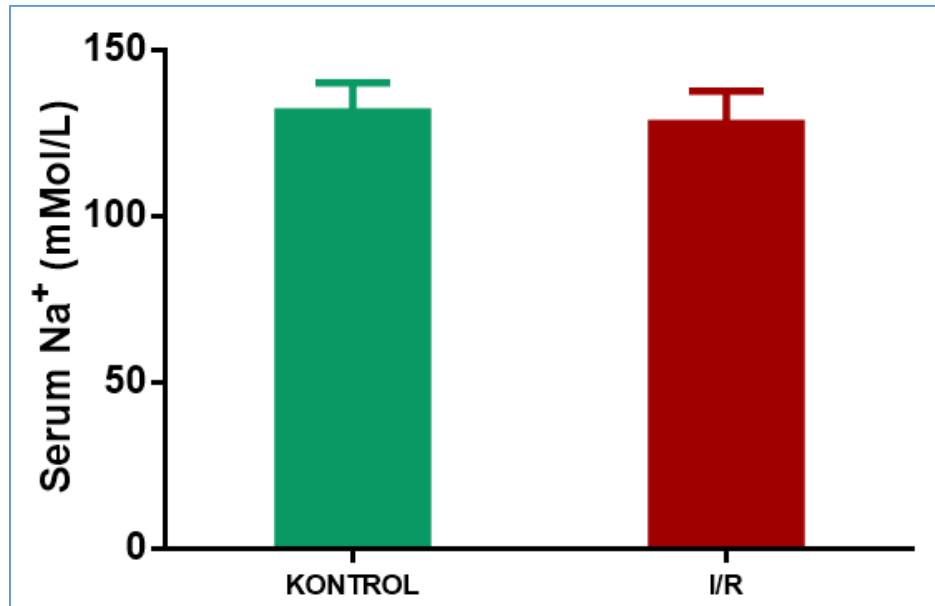
Gruplar arası serum kreatinin düzeyleri karşılaştırıldığında Kontrol grubu sıçanlarının serum kreatinin düzeylerine göre I/R grubu sıçanlarının serum kreatinin düzeylerinde  $p < 0,001$  düzeyinde istatistik olarak anlamlı bir şekilde arttığı saptanmıştır. Gruplar arası serum kreatinin düzeylerinin dağılımları şekil 27’de sunulmuştur.



Karşılaştırmalar: Kontrol grubu ile I/R grubu \*\*\* $p < 0.001$

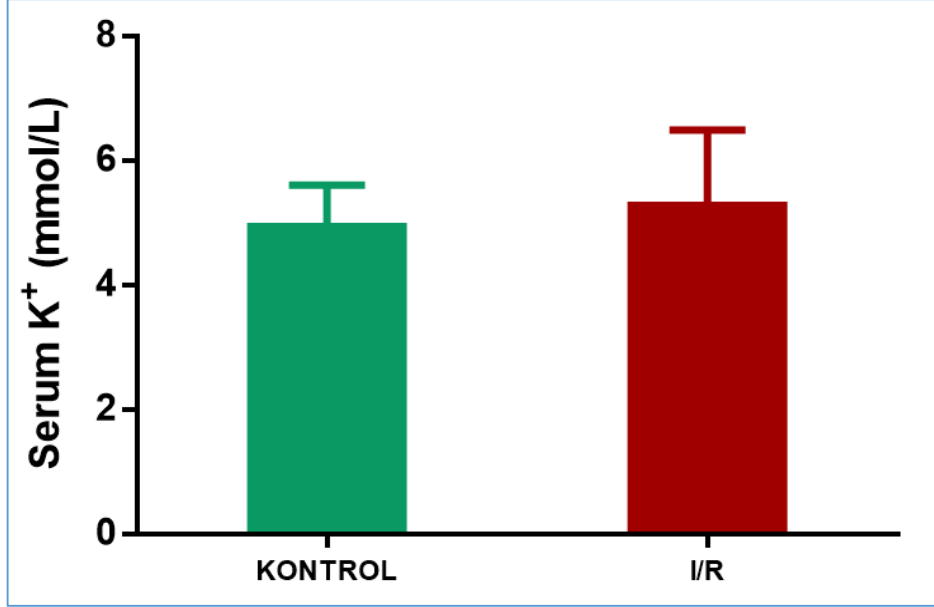
Şekil 27. Gruplar arası ortalama serum kreatinin düzeylerinin karşılaştırılması

Sham operasyonu uygulanan Kontrol grubu sıçanları ile akut böbrek hasarı oluşturulan I/R grubu sıçanlarının serum  $\text{Na}^+$  düzeyleri incelendiğinde istatistik olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi  $p > 0,05$ . Gruplar arası serum  $\text{Na}^+$  düzeylerinin dağılımları şekil 28’de sunulmuştur.



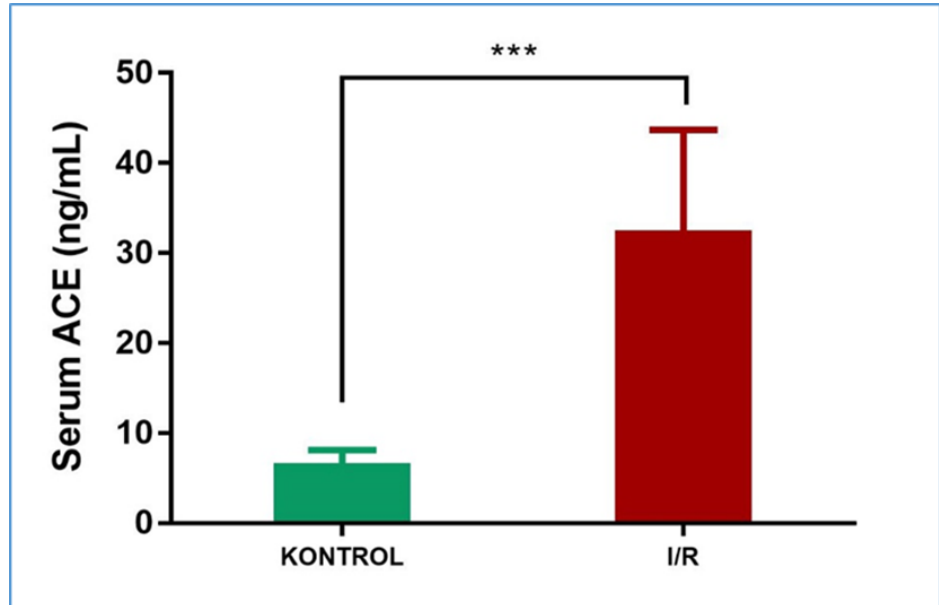
### Şekil 28. Gruplar arası ortalama serum Na<sup>+</sup> düzeylerinin karşılaştırılması

Gruplar arası serum K<sup>+</sup> düzeyleri karşılaştırıldığında her iki grup sıçanlarının serum K<sup>+</sup> düzeylerinde istatistik olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi p >0,05. Gruplar arası serum K<sup>+</sup> düzeylerinin dağılımları şekil 29’da sunulmuştur.



### Şekil 29. Gruplar arası ortalama serum K<sup>+</sup> düzeylerinin karşılaştırılması

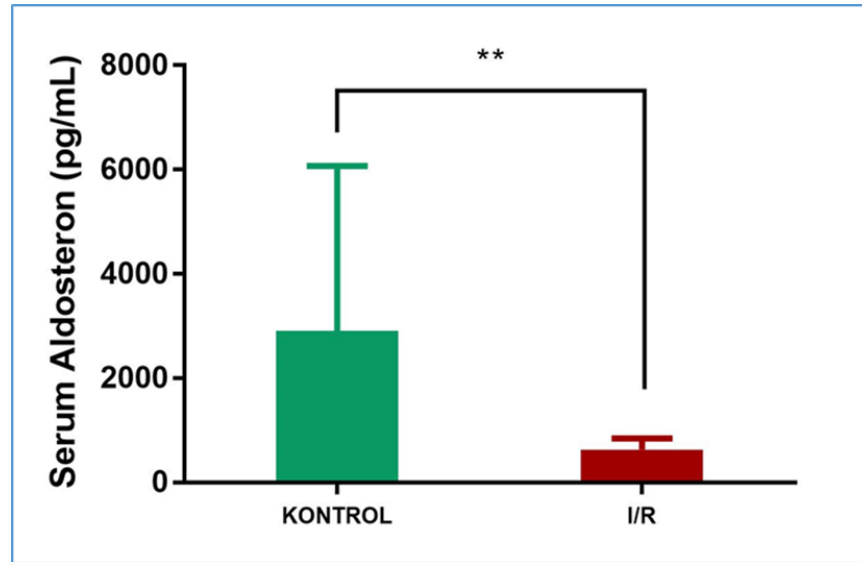
Gruplar arası serum ACE düzeyleri karşılaştırıldığında, serum ACE değerleri Kontrol grubuna göre I/R grubunda p<0,001 düzeyinde anlamlı şekilde yüksek bulundu. Gruplar arası serum ACE düzeylerinin dağılımları şekil 30’da sunulmuştur.



Karşılaştırmalar: Kontrol grubu ile IR grubu \*\*\*p<0.001

### Şekil 30. Gruplar arası ortalama serum ACE düzeylerinin karşılaştırılması

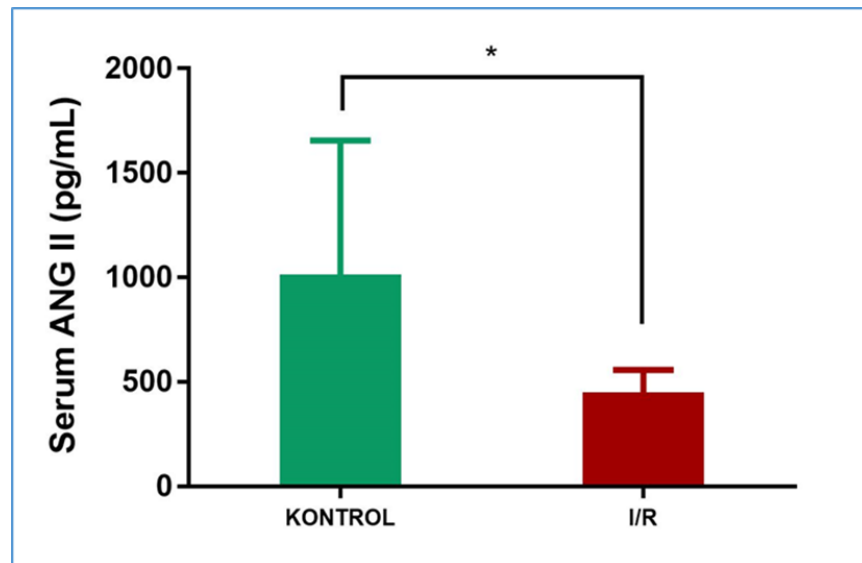
Gruplar arası sıçanların serum Aldosteron düzeyleri incelendiğinde istatistik olarak anlamlı bir değişiklik gözlemlenmiştir. I/R grubu sıçanlarının serum Aldosteron düzeylerinde Kontrol grubu sıçanlarının serum Aldosteron düzeylerine göre  $p=0,006$  ( $p<0,01$ ) düzeyinde bir anlamlı azalma gözlemlendi. Gruplar arası serum Aldosteron düzeylerinin dağılımları şekil 31’de sunulmuştur.



Karşılaştırmalar: Kontrol grubu ile IR grubu  $**p<0.01$

**Şekil 31. Gruplar arası ortalama serum Aldosteron düzeylerinin karşılaştırılması**

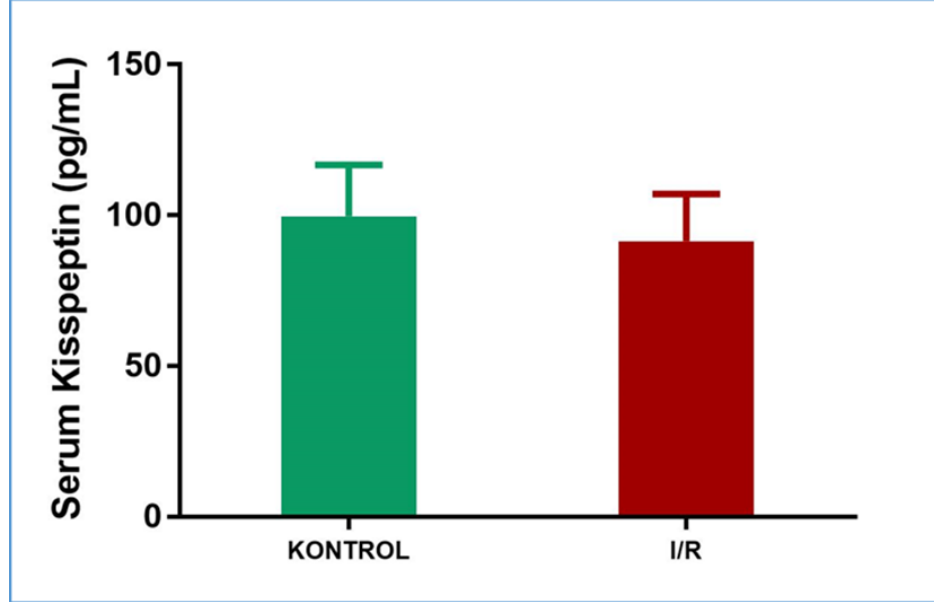
Gruplar arası serum ANG II düzeyleri karşılaştırıldığında, serum ANG II değerleri Kontrol grubuna göre I/R grubunda  $p=0,031$  ( $p<0,05$ ) düzeyinde istatistik olarak anlamlı bir azalma bulundu. Gruplar arası serum ANG II düzeylerinin dağılımları şekil 32’de sunulmuştur.



Karşılaştırmalar: Kontrol grubu ile I/R grubu  $*p<0.05$

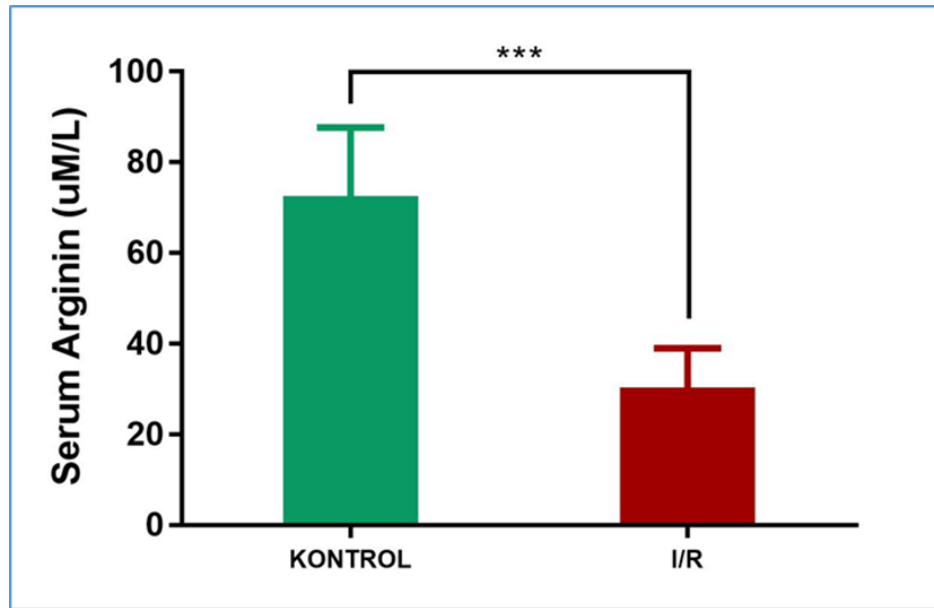
**Şekil 32. Gruplar arası serum ANG II düzeylerinin karşılaştırılması**

Gruplar arası serum KISS düzeyleri değerlendirildiğinde, gruplar arasında istatistik olarak anlamlı bir değişiklik gözlemlenmedi  $p>0,05$ . Gruplar arası serum KISS düzeylerinin dağılımları şekil 33'te sunulmuştur.



Şekil 33. Gruplar arası ortalama serum Kisspeptin düzeylerinin karşılaştırılması

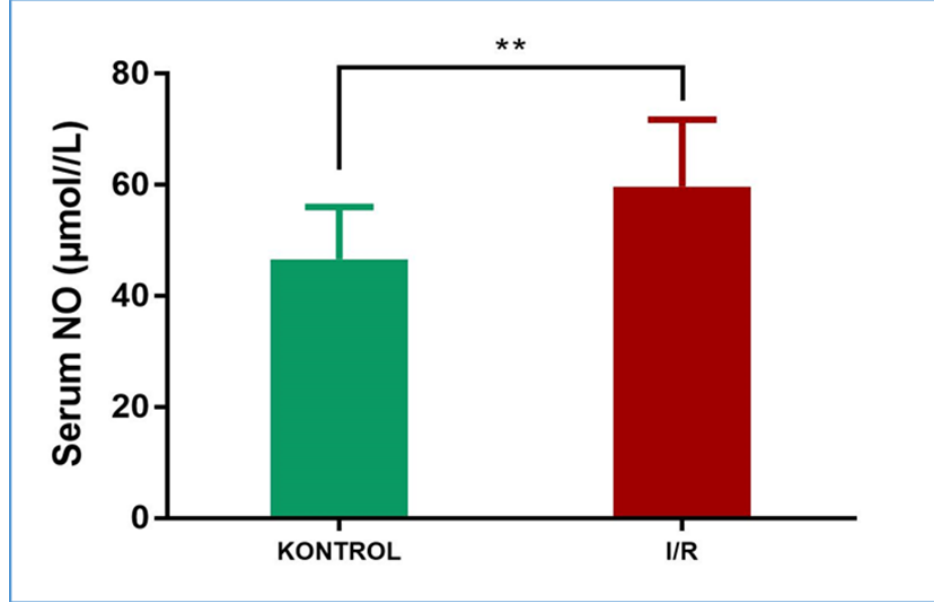
Gruplar arası serum Arginin düzeyleri incelendiğinde, serum Arginin değerleri Kontrol grubuna göre I/R grubunda  $p<0,001$  düzeyinde istatistik olarak anlamlı bir azalma bulundu. Gruplar arası serum Arginin düzeylerinin dağılımları şekil 34'te sunulmuştur.



Karşılaştırmalar: Kontrol grubu ile IR grubu \*\*\* $p<0.001$

Şekil 34. Gruplar arası ortalama serum Arginin düzeylerinin karşılaştırılması

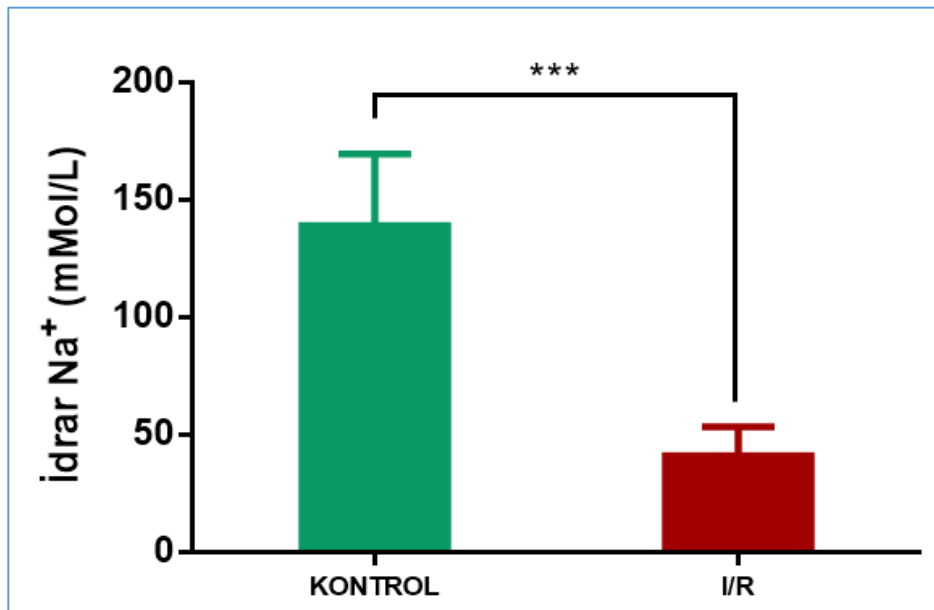
Gruplar arası serum NO düzeyleri karşılaştırıldığında, serum NO değerleri Kontrol grubuna göre I/R grubunda  $p<0,01$  düzeyinde istatistik olarak anlamlı bir artış saptandı. Gruplar arası serum NO düzeylerinin dağılımları şekil 35’te sunulmuştur.



Karşılaştırmalar: Kontrol grubu ile IR grubu \*\* $p<0.01$

Şekil 35. Gruplar arası ortalama serum NO düzeylerinin karşılaştırılması

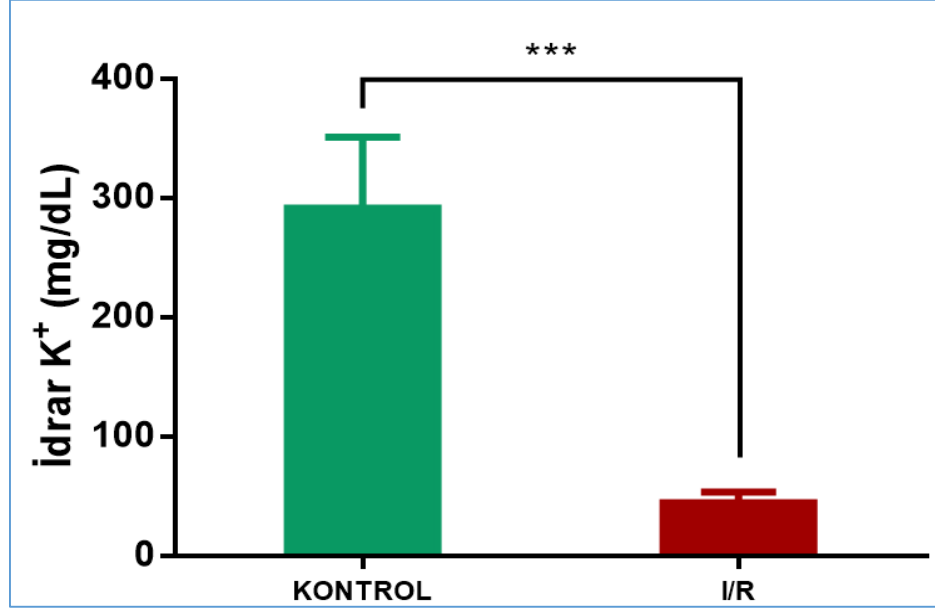
Gruplar arası idrar Na düzeyleri değerlendirildiğinde Kontrol grubu sıçanlarının idrar Na düzeylerine göre I/R grubu sıçanlarının idrar Na düzeylerinde  $p<0,001$  düzeyinde istatistik olarak anlamlı bir azalma saptanmıştır. Gruplar arası idrar Na düzeylerinin dağılımları şekil 36’da sunulmuştur.



Karşılaştırmalar: Kontrol grubu ile IR grubu \*\*\* $p<0.001$

Şekil 36. Gruplar arası ortalama idrar Na düzeylerinin karşılaştırılması

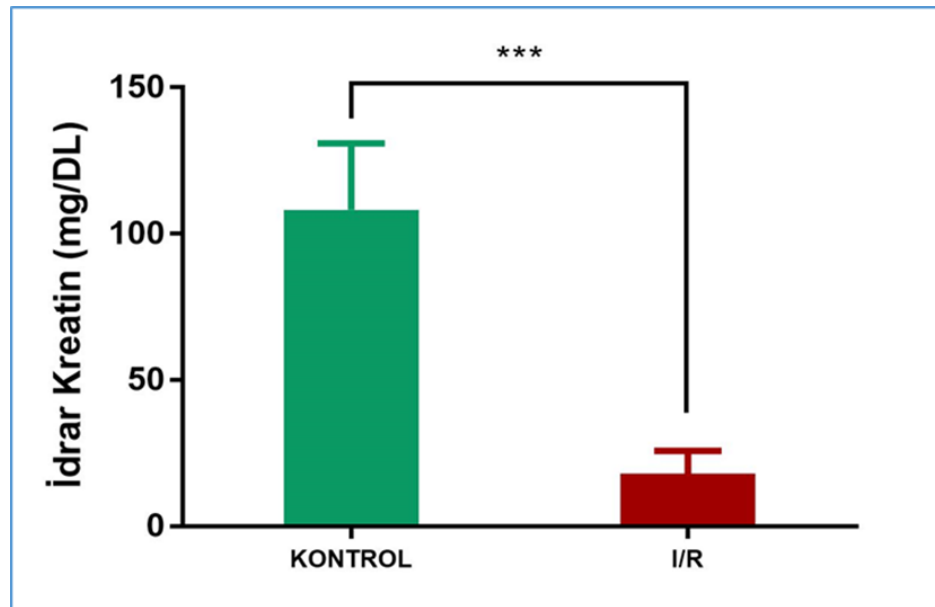
Gruplar arası idrar K<sup>+</sup> düzeyleri karşılaştırıldığında, idrar K<sup>+</sup> değerleri Kontrol grubuna göre I/R grubunda p<0,001 düzeyinde anlamlı şekilde düşük bulundu. Gruplar arası idrar K<sup>+</sup> düzeylerinin dağılımları şekil 37’de sunulmuştur.



Karşılaştırmalar: Kontrol grubu ile I/R grubu \*\*\*p<0.001

Şekil 37. Gruplar arası ortalama idrar K düzeylerinin karşılaştırılması

Gruplar arası idrar Kreatinin düzeyleri incelendiğinde Kontrol grubu sıçanlarının idrar Kreatinin düzeylerine göre I/R grubu sıçanlarının idrar Kreatinin düzeylerinde p<0,001 düzeyinde istatistik olarak anlamlı bir azalma saptanmıştır. Gruplar arası idrar Kreatinin düzeylerinin dağılımları şekil 38’de sunulmuştur.

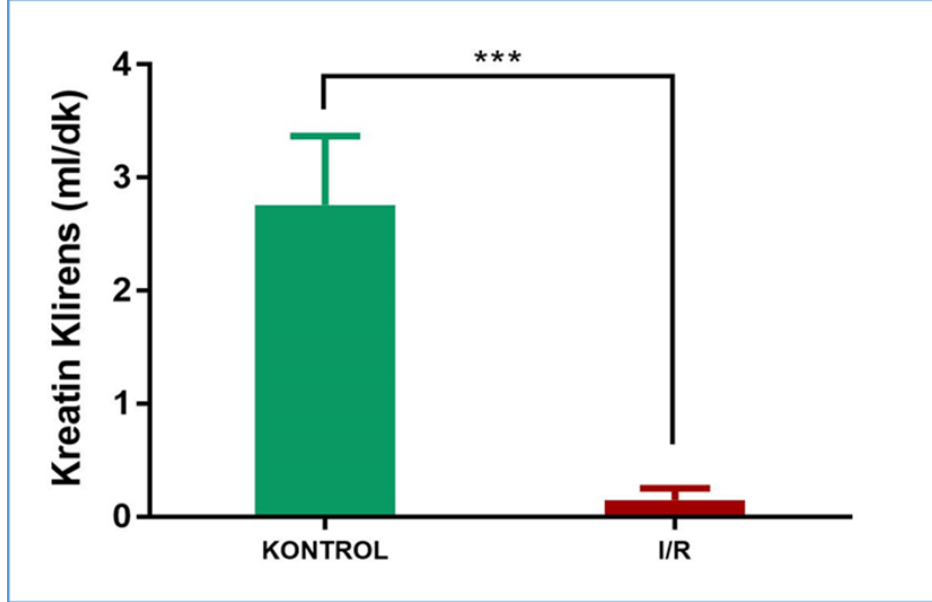


Karşılaştırmalar: Kontrol grubu ile I/R grubu \*\*\*p<0.001

Şekil 38. Gruplar arası ortalama idrar Kreatinin düzeylerinin karşılaştırılması



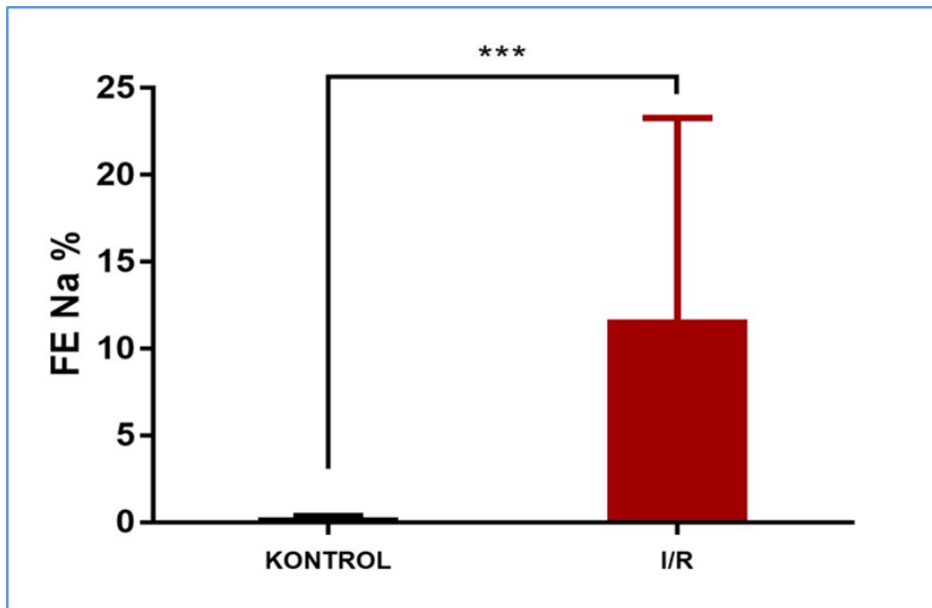
Gruplar arası kreatinin klirens düzeyleri karşılaştırıldığında, kreatinin klirens değerleri Kontrol grubuna göre I/R grubunda  $p<0,001$  düzeyinde anlamlı derecede düştüğü saptanmıştır. Gruplar arası serum ACE düzeylerinin dağılımları şekil 39'da sunulmuştur.



Karşılaştırmalar: Kontrol grubu ile I/R grubu \*\*\* $p<0.001$

Şekil 39. Gruplar arası ortalama Kreatin Klirens düzeylerinin karşılaştırılması

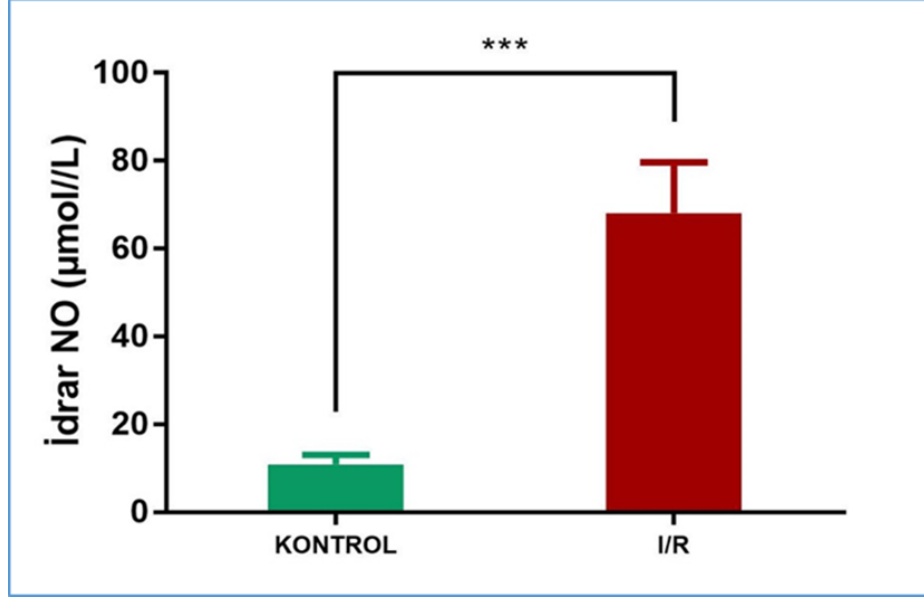
Gruplar arası Fraksiyonel  $\text{Na}^+$  atılım düzeyleri incelendiğinde Kontrol grubu sıçanlarının fraksiyonel  $\text{Na}^+$  atılım düzeylerine göre I/R grubu sıçanlarının fraksiyonel  $\text{Na}^+$  atılım düzeylerinde  $p<0,001$  düzeyinde istatistik olarak anlamlı bir artış saptanmıştır. Gruplar arası fraksiyonel  $\text{Na}^+$  dağılımları şekil 40'da sunulmuştur.



Karşılaştırmalar: Kontrol grubu ile I/R grubu \*\*\* $p<0.001$

Şekil 40. Gruplar arası ortalama FE Na düzeylerinin karşılaştırılması

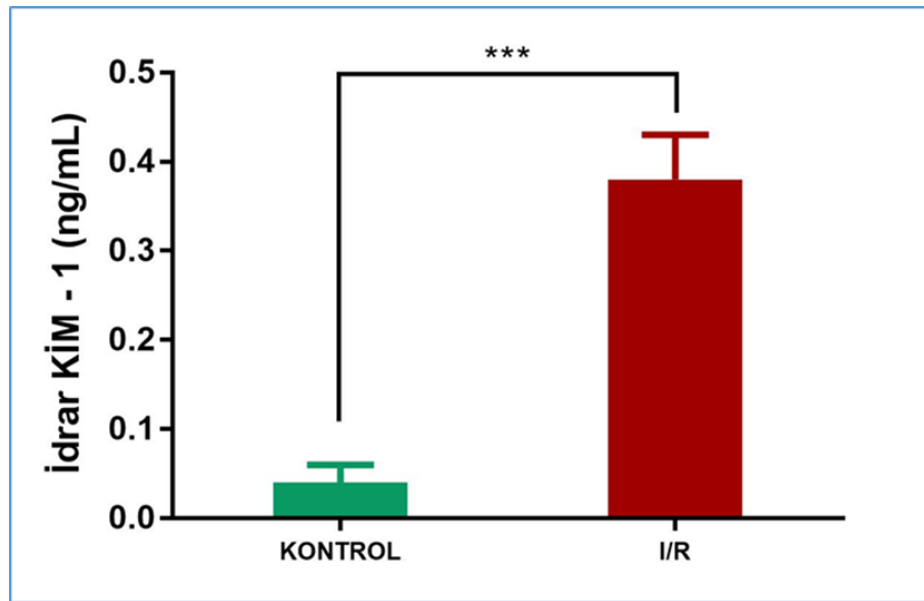
Gruplar arası idrar NO düzeyleri karşılaştırıldığında, idrar NO değerleri Kontrol grubuna göre I/R grubunda  $p<0,001$  düzeyinde istatistik olarak anlamlı bir artış saptandı. Gruplar arası idrar NO düzeylerinin dağılımları şekil 41’de sunulmuştur.



Karşılaştırmalar: Kontrol grubu ile I/R grubu \*\*\* $p<0.001$

Şekil 41. Gruplar arası ortalama idrar NO düzeylerinin karşılaştırılması

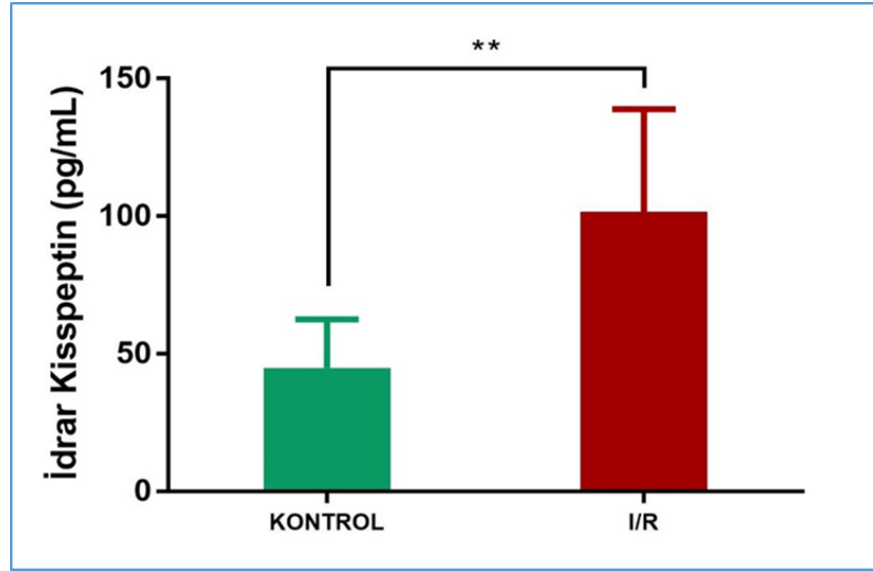
Gruplar arası idrar KİM - 1 düzeyleri incelendiğinde, Kontrol grubu sıçanlarının idrar KİM -1 düzeylerine göre I/R grubu sıçanlarının idrar KİM -1 düzeylerinde  $p<0,001$  düzeyinde istatistik olarak anlamlı bir artış saptanmıştır. Gruplar arası idrar KİM -1 düzeylerinin dağılımları şekil 42’de sunulmuştur.



Karşılaştırmalar: Kontrol grubu ile I/R grubu \*\*\* $p<0.001$

Şekil 42. Gruplar arası ortalama idrar KİM – 1 düzeylerinin karşılaştırılması

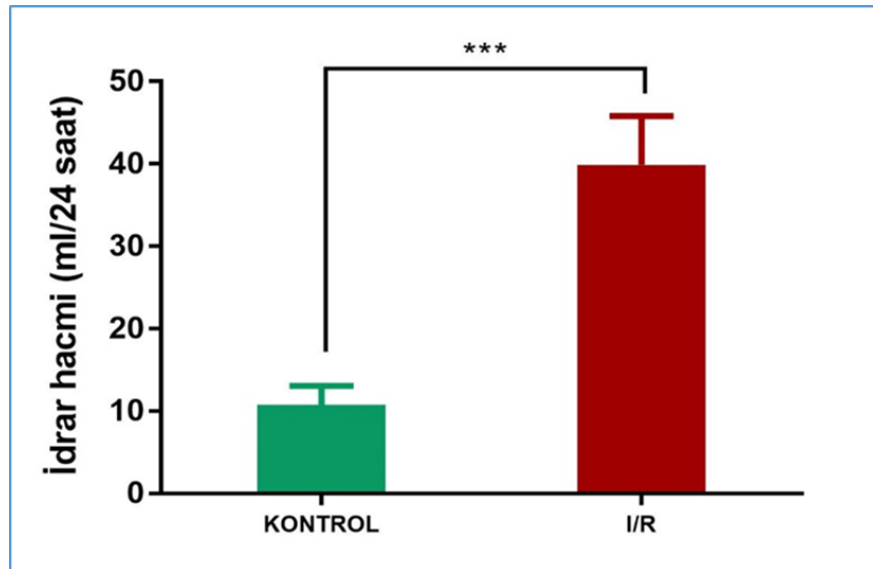
Gruplar arası idrar KİSS düzeyleri karşılaştırıldığında, Kontrol grubu sıçanlarının idrar KİSS düzeylerine göre I/R grubu sıçanlarının idrar KİSS düzeylerinde  $p<0,01$  düzeyinde istatistik olarak anlamlı bir artış saptanmıştır. Gruplar arası idrar KİSS düzeylerinin dağılımları şekil 43'te sunulmuştur.



Karşılaştırmalar: Kontrol grubu ile I/R grubu  $**p<0.01$

**Şekil 43. Gruplar arası ortalama idrar Kisspeptin düzeylerinin karşılaştırılması**

Gruplar arası sıçanların idrar hacimleri karşılaştırıldığında, Kontrol grubu sıçanlarının idrar hacimlerine göre I/R grubu sıçanlarının idrar hacimleri  $p<0,001$  düzeyinde istatistik olarak anlamlı bir artış gösterdiği bulunmuştur. Gruplar arası idrar hacimlerinin dağılımları şekil 44'te sunulmuştur.



Karşılaştırmalar: Kontrol grubu ile I/R grubu  $***p<0.001$

**Şekil 44. Gruplar arası ortalama idrar hacim düzeylerinin karşılaştırılması**

## TARTIŞMA

Güncel tıbbın önemli bir problemi olan ABH, son zamanlarda sık görülen ve potansiyel olarak hayati tehlike oluşturan bir durumdur. Kompleks bir hastalık olarak bilinen ABH'nın en yaygın nedenlerinin biri I/R hasarıdır (117,118). Böbrek İ/R hasarı ile indüklenen ABH, yüksek morbidite ve mortaliteye neden olan, böbrek fonksiyonunda ani bir azalma ile karakterize bir sendromdur (119). Yapılan araştırmalar sonucu böbrek I/R'ye bağlı gelişen ABH böbrek vasküler cerrahisi, böbrek nakli, kardiovasküler hastalıklar ve şok gibi birçok nedenle ortaya çıkmaktadır (120). Böbrek İ/R hasarı, doku inflamasyonu, tübüler epitel apoptozu ve mikrovasküler bozulma gibi çok çeşitli zararlı etkilere neden olur. Günümüzde I/R'ye bağlı gelişen ABH olan hastalar için böbrek transplantasyonu ve destekleyici tedavilerin yanı sıra, spesifik tedaviler bulunmamaktadır. Bu nedenle, ABH sonucu gelişen böbrek yetmezliği ve böbrek işlevsel düşüşün korunması için yeni bir tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır (119). Tedavideki bu açığı kapatmak amacı bilim insanları deney hayvanları üzerinde ABH modellerini oluşturarak birçok deneysel çalışma yapılmaktadır. İndüksiyon yöntemine bağlı yapılan bu deneysel ABH modelleri çeşitlilik göstermektedir. Biz çalışmamızda sıkça kullanılan bilateral böbrek İ/R ile oluşturulan ABH modelini kullandık.

Sıçanların her iki böbrek damarlarına 60 dk iskemi ve 48 saat reperfüzyon uygulanması ile oluşturduğumuz deneysel ABH modelinde, böbrek işlevlerinin bozulduğu, böbrek proksimal tübül hasarının bir biomarkeri olan KİM 1 düzeylerinin ve oksidatif stresin arttığı görüldü. Elde ettiğimiz bu veriler İ/R'na bağlı olarak ABH modelinin oluştuğunu göstermektedir. Yapılan deney sonucu böbrek hasarının oluşmasında iskemi süresi çok önemli bir rol oynar. Günümüzde ABH oluşturmak için farklı sürelerde I/R uygulayan birçok çalışmalar bulunmaktadır.

Deneysel I/R modelinde hem distal hem proksimal tübüllerde hasar oluşması için böbrek damarlarına 60 dk boyunca iskemi uygulanması gerektiğini belirtmişlerdir (121,29). Biz de çalışmamızda bu yüzden 60 dk iskemi süresini seçtik ve 48 saat reperfüzyon sonrasında böbrek patofizyolojisinde kisspeptinin böbrek fonksiyonları, oksidatif stres, aldosteron ve NO ile ilişkisini araştırmayı amaçladık.

Çalışmamızda sıçan böbrek damarlarına I/R hasarı uyguladığımız I/R grup verilerini Kontrol grubu verileri ile kıyasladığımızda red – GSH, ox – GSH, serum ALT, serum AST, üre, kreatinin, serum ACE, serum NO, Fraksiyonel Na<sup>+</sup>, idrar NO, idrar KİM – 1 düzeyleri ve idrar hacimlerinde anlamlı bir artış görüldü. MDA, böbrek Arginin, Kreatin kinaz, serum Na<sup>+</sup>, serum K<sup>+</sup> düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi. Böbrek NO, serum aldosteron, serum ANG II, serum arginin, idrar Na<sup>+</sup>, idrar K<sup>+</sup>, idrar kreatinin, kreatinin klirens düzeylerinde anlamlı bir azalma görüldü. Çalışmamızda I/R hasarı oluşturduğumuz grupta Kontrol grubuna göre idrar kisspeptin düzeylerinde artış, böbrek kisspeptin düzeylerinde azalma görüldü. Serum kisspeptin düzeylerinde ise anlamlı bir değişiklik görülmedi. Yapılan literatür araştırmalarımıza göre çalışmamız ABH'da kisspeptin rolünü inceleyen ilk çalışmadır.

İdrarda Kim 1 proteinin görülmesi, böbrek proksimal tübül hasarlarının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Peng ve ark. (122) 60 dk iskemi ve farklı sürelerde reperfüzyon uygulayarak yaptıkları çalışmalarında, idrar Kim 1 biyomarker düzeyinin en çok 24 saatlik bir reperfüzyon uyguladıkları sıçanlarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu bildirilmiştir, Soljancic ve ark. (123) 40 dk iskemi 24 saat reperfüzyon uyguladığı, Yoshida ve ark. (124) 45 dk iskemi ve 24 saat reperfüzyon uyguladıkları çalışmalarında da Kontrol grubu ile kıyasla I/R grubunda idrar Kim 1 düzeyinde istatistik olarak anlamlı bir artış görüldüğünü rapor etmişlerdir. Çalışmamızda 60 dk iskemi ve 48 saat reperfüzyon uyguladığımız I/R grubunda böbrek hasarının oluştuğunu belirten idrar Kim 1 düzeyinin artması yukarıda belirtilen çalışma sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Günümüzde RAAS sistemi I/R yaralanmasının ilerlemesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Literatürde RAAS sistemi ve I/R ilişkisi ile ilgili bir çok çalışmalar bulunmaktadır. Ramı' rez ve ark. (125), Meji'a-Vilet ve ark. (126) 20 dk iskemi ve 24 saat reperfüzyon uygulayarak yaptıkları çalışmalarında serum Aldosteron düzeyinin Kontrol grubuna göre I/R grubunda anlamlı düzeyde arttığı rapor edilmiştir. A. Fouada ve ark. (127) 30 dk iskemi ve 24 saat reperfüzyon uygulayarak yaptıkları çalışmada, IR grubunda serum aldosterone düzeyinde istatistik olarak anlamlı bir artış görüldüğünü rapor etmiştir. Wang ve ark. (128) 45 dk iskemi ve 24 saat reperfüzyon uyguladıkları I/R grubunda serum Ang II

düzeyinde artış görüldüğünü, Kontogiannis ve ark. (129), Efrati ve ark. (130) 60 iskemi ve çeşitli zamanlarda reperfüzyon uygulayarak yaptıkları çalışmalarında, böbrek ve serum Ang II düzeylerinin en çok 24 saatlik reperfüzyon uyguladıkları I/R grupta anlamlı olarak attığını belirtmişler. D. da Silveira ve ark. (131) çalışmasında 45 dk iskemi, farklı zaman periyodlarında reperfüzyon uyguladıkları IR gruplarında Kontrol grubu ile kıyasla böbrek ACE düzeyinin azaldığını rapor etmiştir. Yukarıda belirtilen çalışmalardan I/R süresinin farklı olması ile ayırt edilen çalışmamızın sonuçlarında serum Aldosteron, serum ANG II düzeylerinin düşmesi, serum ACE düzeylerinin artması ile farklı sonuçlar göstermektedir.

Böbrek I/R hasarı sonucu genellikle, böbrek tübül ve glomerüllerinde hasar ve fonksiyon bozuklukları görülmektedir (132). Çalışmamızda I/R grubu sıçanlarında serum üre ve serum kreatinin miktarlarında artış ve kreatinin klirensinde azalma görülmesi glomerüler işlev durumunun bozulduğunu göstermektedir. Buna ek olarak I/R grubu sıçanlarında böbrek tübül işlev bozukluğunun bir göstergesi olan fraksiyonel Na<sup>+</sup> atılımında, kas hasarı derecesini anlamak için kullanılan serum AST ve ALT düzeylerinde bir artış görüldü. Böbrek tübül hücrelerinde bulunan AST enziminin serumda artması tübüler hasar oluştuğunu, FeNa düzeylerinin artması ise tübüler hasar oluştuğunu ve tübül fonksiyonunun bozulduğunu göstermektedir (27). Çalışmamızın bu bulguları daha önce yapılan Chatterjee ve ark. (133), Malek ve ark. (134), Uyanoglu ve ark. (135), Khastar (136), Seifi ve ark.(137), Tripatara ve ark. (138), Aydoğdu ve ark. (139) çalışma bulguları ile uyumluluk göstermektedir.

Günümüzde NO, I/R aracılı böbrek hasarının patofizyolojisinde önemli bir rol oynadığını gösteren birçok çalışma mevcuttur. Nitrik oksit, nitrik oksit sentazlar (NOS) aracılığı ile L-arginin'in L-sitrulin'e dönüştürülmesi sırasında oluşmaktadır (140). Böbrekte NO glomerüler hemodinamiğin düzenlenmesi, mitokondriyal solunumun düzenlenmesi, tübüloglomerüler geribildirim mekanizması, renin salgılanması dahil olmak üzere Na<sup>+</sup>,Cl<sup>-</sup> ve H<sub>2</sub>O atılımı gibi birçok olaylarda rol oynadığı bilinmektedir (141,142). Yapılan çeşitli literatür araştırmalarında iskemik böbreklerde iNOS ekspresyonu ve aktivitelerinde artış, cNOS aktivitelerinin de azalma olduğu bildirilmiştir (141). Deneysel I/R hasarı aracılı akut böbrek hasarı oluşturduğumuz modelde sıçanların böbrek NO düzeylerinde azalma, serum NO ve idrar NO düzeylerinde anlamlı bir artış görüldü. Çalışmamızın bu sonuçları daha önce yapılan Koç ve ark. (143), Liu ve ark. (144) çalışmaları gibi birçok çalışmada sonuçları ile benzerlik gösterdi.

İskemi sırasında serbest radikaller düzeyinin artışı hücrelerde hasar oluşturmaktadır. Bu durum ilk olarak hücre zarındaki lipidleri etkilemektedir. Hücre zarındaki lipidler serbest radikaller tarafından oksitlendiğinde bir takım reaksiyonlar başlamakta ve ortaya son ürün

olarak MDA çıkmaktadır. Lipid peroksidasyonu zar geçirgenliğinin bozulmasına ve dolayısıyla hücre yıkımına neden olmaktadır. Tübüler hücrelerde de meydana gelen bu olaylar, böbrek hasarının oluşmasında en büyük nedenlerin biri olarak bilinmektedir. Yapılan literatür araştırmalarında böbrek I/R hasarı ile oluşturulan akut böbrek hasar modellerinde I/R grubunda MDA düzeyinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu bildirilmektedir (140), (145), (146), (147). Bizim çalışmada MDA düzeyinde kontrol grup ile I/R grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmazsa, I/R grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek düzeyde olduğunu saptadık. Çalışmamızda 60 dk iskemiden sonra 48 saat reperfüzyon uygulamanın MDA düzeyinde anlamlı farklılığın görülmemesinin bir nedeni olabilir. Bu sonuçlar I/R grubunda oksidatif hasarın arttığını göstermektedir. İ/R süresinde meydana gelen oksidatif hasar sonrası görev vücudumuzdaki GR, katalaz, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimlerin üstüne düşmektedir. Daha önce yapılan birçok benzer çalışmalarda Bağcıoğlu ve ark. (145), Walker ve ark. (148), Singh ve ark. (149), Korkmaz (150) kontrol grubu sıçanlarına göre I/R uyguladıkları sıçanların böbrek red – GSH düzeylerinde azalma, ox – GSH düzeylerinin ise arttığını rapor etmişler. Bu çalışmada böbrek red – GSH ve ox – GSH düzeyleri ölçülmüştür. Yaptığımız çalışmada ise I/R uyguladığımız sıçan böbreklerinde ox – GSH düzeyleri yukarıda belirtilen çalışma sonuçları ile uyumlu bir şekilde artış gösterirken, red – GSH düzeyinin ilginç bir şekilde arttığı saptandı. Sonuçlarda ki bu farklılığın sebebi sıçan böbreklerine uyguladığımız I/R süresindeki farklılık ile reperfüzyon süresinin uzun olması hücrel antioksidan savunma sisteminin artışına neden olabilir.

Günümüzde böbreklerden böbreğin fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerinde rol oynadığı bilinen çeşitli peptid ve reseptörler böbrekte eksprese edilmektedir (8). Kisspeptin GPR 54 reseptörünü aktive ederek Kiss 1 geni tarafından kodlanan bir peptidtir (11). Son zamanlarda kisspeptinin direkt ve dolaylı olarak urogenital sistemin fizyolojisi ve patofizyolojisi ile ilişkisi olduğu rapor edilmektedir (151). Yi ve ark. (153) yaptığı çalışmalarında, böbrek gelişimi ve morfojenезini düzenlediği bilinen kisspeptinin böbrek gelişimi ve böbrek hastalıklarında tübüler hasarın onarımı işlemlerinde önemli rol oynayan bmp7 ekspresyonunu da kontrol ettiğini bildirmişler (152,153). Ancak günümüzde halen kisspeptinin böbrek ve böbreğin çeşitli patolojik durumları ile ilgili ilişkisi hakkında bilgi sınırlıdır dolayısıyla kisspeptinin akut böbrek hasarında da fizyopatolojik rolleri bilinmemektedir.

Yapılan literatür araştırmalarımıza göre çalışmamız ABH'da kisspeptin değişimini inceleyen ilk çalışmadır. Çalışmamızda iskemi reperfüzyona bağlı gelişen akut böbrek hasarına

yanıt olarak kisspeptin ekspresyonundaki değişiklikleri değerlendirdik. Yapılan alışma sonucu Kontrol grubuna göre deneysel akut böbrek hasarını oluşturduğumuz I/R grubunda böbrek kisspeptin düzeylerinde azalma, idrar kisspeptin düzeylerinde ise artış görüldü. Serum KISS düzeylerinde ise anlamlı bir değişiklik görülmedi. Shoji ve ark. 5/6 nekrektomi uygulayarak geliştirdikleri kronik böbrek hasarı modelinde; kontrol grubu ile kıyasladığımızda iskemi grubunda kisspeptin mRNA düzeylerinin 3. günlerde anlamlı fark göstermediği, 56. günde ise azaldığı göstermiştir. Ayrıca 56. günde kisspeptin immunoreaktivitesinde anlamlı artma olduğu bildirilmiştir. Böbreklerde kisspeptin reseptörlerinin mRNA düzeylerinde; 3. günde anlamlı farklılık göstermediği 14 ve 56 günlerde anlamlı artış olduğu bildirilmektedir. Kronik böbrek hasarı geliştirilen bu çalışmada; kisspeptin ve reseptörlerinin böbrek fonksiyonlarının düzenlenmesinde ve kronik böbrek hasarının fizyopatolojisinde rol oynadığı rapor edilmiştir (8). Bizim uyguladığımız modelde serum kisspeptin düzeylerinde anlamlı farklılık görülmemesinin nedeni, reperfüzyon süresinin az olmasından kaynaklanabilir.

Sawyer ve ark. (154) Ang II ile hipertansiyon oluşturdukları çalışmalarında istatistiksel olarak anlamlı olmazsada kontrol grubuna göre hipertansiyon grubunda kisspeptin mRNA düzeyinin arttığını, kisspeptin konsantrasyonunun ise düştüğünü rapor etmişlerdir.

Kisspeptinin normal olarak (hamilelik hariç) serumda düzeyinin oldukça düşük olduğu bildirilmektedir. Kisspeptinin reseptörlerinin fetal adrenal bezindeki düzeyinin erişkin adrenal bezindeki düzeyinden 50 kat daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Kisspeptinin fetal adrenal kortekste aldosteron düzeyini 2 kat arttırdığı rapor edilmiştir. Ayrıca kisspeptinin Ang II düzeyini arttırarak aldosteron salgılanmasına neden olduğu bildirilmektedir. Hamilelik süresi boyunca dramatik düzeyde kisspeptin konsantrasyonun arttığı ki bunun sonucu olarakta fetal adrenal bezinde aldosteron düzeyini arttırdığı rapor edilmiştir (155,156). Bizim alışmamızda I/R grubunda serum kisspeptin düzeylerinde görülen azalma anlamlı değildir, ancak serum Ang II ve aldosteron düzeylerinde anlamlı azalma olduğu saptandı. ACE düzeyinde ise anlamlı bir artma görüldü.

Ten ve ark. (157) anestezi edilmiş sıçanlarda merkezi kisspeptin verilmesinin Na<sup>+</sup> atılımını ve idrar hacmini azalttığı, plazma antidiyoretik hormon düzeylerini arttırdığı rapor edilmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgularımız ile literatürdeki bilgileri birlikte değerlendirdiğimizde kisspeptinin serum düzeylerinde anlamlı farklılık görülmemesi reperfüzyon süresinin kısa olması sonucu olabilir. Çalışmada elde ettiğimiz bulgular ile literatür sonuçları bir arada değerlendirildiğinde kisspeptinin deneysel I/R hasarının fizyopatolojisindeki rolünü göstermede yetersiz kalmaktadır.



Kisspeptinin böbrek fonksiyonları ve böbrek hasarı ile ilişkisini araştırmak amacıyla farklı reperfüzyon süreleride kisspeptinin böbrek mRNA konsantrasyonu ile kisspeptin reseptörlerinin mRNA düzeylerinin incelenmesi gerektiği düşüncesindeyiz. Ayrıca farklı dozlarda kisspeptin verilerek böbrek kan akımı, böbrek fonksiyonları, oksidatif hasar derecesini gösteren parametreleri ile NO metabolizması üzerindeki etkilerinin incelendiği daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğu düşüncesindeyiz.

## SONUÇLAR

Çalışmamızda böbrek damarlarına klemp yardımı ile I/R uygulayarak oluşturduğumuz ABH'da kisspeptinin böbrek fonksiyonları, Ang II, ACE ve aldosteron ile ilişkilerini ve böbrek fizyopatolojisindeki rolünü inceledik. Araştırma sonucunda;

I/R grup verilerini Kontrol grup verileri ile karşılaştırdığımızda red – GSH, ox – GSH, böbrek fonksiyon belirteci olan serum üre ve kreatinin, serum NO, tübüler fonksiyon durumunu gösteren Fraksiyonel Na atılımında, proksimal tübül hasarını gösteren idrar KİM – 1 düzeylerinde anlamlı bir artış görüldü. Böbrek NO, idrar kreatinin, glomerüler filtrasyon belirteci olan kreatinin klirensi düzeylerinde anlamlı bir azalma görüldü. Bu veriler sıçanlarda ABH modelinin oluştuğunu göstermektedir.

Ayrıca Kontrol grup verilerine göre I/R grup verilerinde serum ACE ve idrar kisspeptin düzeylerinde artış, serum aldosteron, serum ANG II ve böbrek kisspeptin düzeylerinde azalma görüldü. Serum kisspeptin düzeylerinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı.

Bulgularımız, kisspeptinin akut böbrek hasarı ve böbrek fonksiyonlarının fizyopatolojisi ile ilişkili olabileceğini gösterdi. Kisspeptinin böbrek fonksiyonu ve böbrek hasarı ile ilişkilerinin açıklanabilmesi için kisspeptin ve reseptörlerinin mRNA konsantrasyonu ile düzeylerini, kisspeptinin böbrek fonksiyonu ve hasarında etkilerini araştıran daha kapsamlı ve ayrıntılı çalışmaların yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

## ÖZET

Kisspeptin, KISS1 geni tarafından kodlanan, böbrek tübül, damar ve toplayıcı kanal hücrelerinde yapısal olarak bulunan, tümör metastazını baskılamada, üremenin düzenlenmesinde ve vazokonstriktör olarak önemli rol oynayan aktif bir peptiddir. Çalışmamızda deneysel böbrek I/R hasarında kisspeptinin böbrek fonksiyonları, ANG II, ACE ve aldosteron ile ilişkilerini ve böbrek fizyopatolojisindeki rolünü araştırmayı amaçladık.

Çalışmamızda 300-350 gr ağırlığında 16 adet Spraque-Dawley erkek sıçan Kontrol ve İ/R grubu olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Grup 1 sıçanların böbrek damarları diseksiyon ile ayrıldı ve insizyon 60 dakika sonra kapatıldı. Grup 2'deki renal damarlar diseksiyon ile ayrıldı ve 60 dakika iskemiden 48 saat sonra mikrovasküler klemp reperfüze edildi. 24 saat idrar toplandıktan sonra sıçanlar anestezi altında sakrifiye edildi. Kan ve böbrek dokusu örnekleri toplandı.

Çalışmamızda Kontrol grubuna göre İ/R grubunda serum AST, ALT, üre, kreatinin, ACE ( $p<0.01$ ), idrar Kim-1 düzeylerinde artma ( $p<0.05$ ), fraksiyonel sodyum atılımında, kreatinin klirensi, serum aldosteron ve ANG II düzeylerinde azalma görüldü ( $p<0.05$ ). Serum kisspeptin düzeylerinde anlamlı bir değişiklik olmamasına rağmen, böbrek kisspeptin düzeylerinin azaldığı ve idrar kisspeptin düzeylerinin arttığı saptanmıştır ( $p<0.05$ ).

Sonuç olarak bulgularımız, kisspeptinin akut böbrek hasarı ve böbrek fonksiyonlarının fizyopatolojisi ile ilişkili olabileceğini göstermiştir. Kisspeptinin bu ilişkisinin mekanizmasının ayrıntılı olarak araştırılması gerektiğini düşünüyoruz.

**Anahtar kelimeler:** Kisspeptin, akut böbrek hasarı, iskemi/reperfüzyon

## **INVESTIGATION OF KISSPEPTIN ROLE IN EXPERIMENTAL KIDNEY ISCHEMIA/REPERFUSION INJURY**

### **SUMMARY**

Kisspeptin is an active peptide encoded by the KISS1 gene that is structurally found in the kidney tubule, vascular and collecting duct cells, plays an important role in suppressing tumor metastasis, regulating the uremia, and acting as a vasoconstrictor. In our study we aimed to investigate the role of kisspeptin in kidney I/R injury, kidney function, ANG II, ACE and Aldosterone, and its role in renal pathophysiology.

In our study, 16 groups of Sprague-Dawley male rats weighing 300-350 gr and 2 groups of I/R groups were separated. The kidney vessels of group 1 rats were separated by dissection and the incision was closed after 60 minutes. Renal vessels in group 2 were separated by dissection and microvascular clamp was reperfused 48 hours after 60 minutes of ischemia. After 24 hours of urine collection, the rats were sacrificed under anesthesia. Blood and kidney tissue samples were collected.

Serum AST, ALT, urea, creatinine, ACE ( $p < 0.01$ ), urine Kim-1 levels ( $p < 0.05$ ), fractional sodium excretion, creatinine clearance, serum aldosterone and ANG II levels decreased in the I/R group according to the control group ( $p < 0.05$ ). Although there was no significant change in serum kisspeptin levels, kidney kisspeptin levels decreased and urine kisspeptin levels increased ( $p < 0.05$ ).

In conclusion, our findings have shown that kisspeptin may be associated with acute renal damage and renal function physiopathology. We think that the mechanism of this association of the kisspeptin should be investigated in detail.

**Key words:** Kisspeptin, acute kidney injury, ischemia/reperfusion

## KAYNAKLAR

1. Bellomo R, Kellum JA, Ronco C. Acute kidney injury. *Lancet* 2012, 380: 756–66.
2. Zuk A, Bonventre JV. Acute Kidney Injury. *Annu Rev Med* 2016, 67: 293–307.
3. Malek M, Nematbakhsh M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. *J Renal Inj Prev* 2015, 4(2): 20-27.
4. Can S. Sıçanlarda Uzun Süreli Böbrek İskemi / Reperfüzyon Hasarına Karşı Geraniol'ün Koruyucu Etkisi. Yüksek lisans tezi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi.
5. Bi W, Wang F, Bi Y, Wang T, Xue P, Zhang Y, et al. Renal ischemia/reperfusion injury in rats is attenuated by a synthetic glycine derivative. *Eur J Pharmacol* 2009, 616 (1-3):256-64.
6. Takahashi K, Arihara Z, Suzuki T, Sone M, Kikuchi K, Sasano H ve ark. Expression of orexin-A and orexin receptors in the kidney and the presence of orexin-A-like immunoreactivity in human urine. *Peptides* 2006, 27: 871–877.
7. Takahashi K, Hirose T, Mori N, Morimoto R, Kohzuki M, Imai Y, Totsune K. The renin-angiotensin system, adrenomedullins and urotensin II in the kidney: possible renoprotection via the kidney peptide systems. *Peptides* 2009, (8):1575-85.
8. Shoji I, Hirose T, Mori N, Hiraishia K, Kato I, Shibasaki A et al. Expression of kisspeptins and kisspeptin receptor in the kidney of chronic renal failure rats. *Peptides* 2010, 31: 1920–1925
9. Korkmaz A, Kolonkaya D. Inhibiting inducible nitric oxide synthase with rutin reduces renal ischemia/reperfusion injury. *Can J Surg* 2013, 6(1):6-14.

10. Reynolds RM, Logie JJ, Roseweir AK, McKnight AJ and Millar RP. A role for kisspeptins in pregnancy: facts and speculations. *Reproduction the journal of the Society for Reproduction and Fertility* 2009, 1-7. DOI: 10.1530/REP-09-0026, Online version via [www.reproduction-online.org](http://www.reproduction-online.org).
11. Oakley AE, Clifton DK, and Steiner RA. Kisspeptin Signaling in the Brain. *Endocrine Reviews* 2009, 30(6), 713–743.
12. Takahashi K, Shoji I, Shibasaki A, Kato I, Hiraishi K, Yamamoto H ve ark. Presence of kisspeptin-like immunoreactivity in human adrenal glands and adrenal tumors. *J Mol Neurosci* 2010, 41(1):138-44.
13. Takahashi K, Kato I, Nishiyama H, Ohba K, Kaneko K, Morimoto R ve ark. Expression of kisspeptin and its receptor in aldosterone-producing adrenal adenomas. *Endocrine Abstracts* 2012, (29):38.
14. Koza Y. Acute kidney injury: current concepts and new insights. *J Inj Violence Res* 2016, 8(1): 58-62.
15. Sara N. Incidence, biomarkers, and outcome of acute kidney injury in critically ill adults. Doctoral dissertation. University of Helsinki.
16. Lameire N, Biesen WV, Vanholder R. Acute renal failure. *The Lancet* 2005, 365(9457): 417–430.
17. Dirkes S. Acute Kidney Injury: Not Just Acute Renal Failure Anymore?. *Critical Care Nurse* 2011, 31(1): 37-45.
18. Lagny MG, Jouret F, Koch JN, Blaffart F, Donneau AF, Albert A et al. Incidence and outcomes of acute kidney injury after cardiac surgery using either criteria of the RIFLE classification. *BMC Nephrology* 2015, 16:76.
19. Levi TM, Souza SP, Magalhães JG, Carvalho MS, Cunha ABL, DantasJGAO et al. Comparison of the RIFLE, AKIN and KDIGO criteria to predict mortality in critically ill patients. *Rev Bras Ter Intensiva* 2013, 25(4): 290–296.
20. Lopes JA, Jorge S. The RIFLE and AKIN classifications for acute kidney injury: a critical and comprehensive review. *Clin Kidney J* 2013, 6(1): 8–14.
21. Chen YT, Tsai TH, Yang CC, Sun CK, Chang LT, Chen HH et al. Exendin-4 and sitagliptin protect kidney from ischemia-reperfusion injury through suppressing oxidative stress and inflammatory reaction. *J Transl Med* 2013, 11: 270.
22. Star RA. Treatment of acute renal failure. *Kidney Int* 1998, 54(6):1817-31.

23. Nagamani R, Sudarsi K, Amaravati KS, Khan M, Sakuntala P and Deepthi. A Study on Clinical Profile of Acute Kidney Injury. *International Journal of Scientific and Research Publications* 2015, 5(7): 1-5.
24. Lameire N, Massenhove VJ, Biesen VW. What is the difference between prerenal and renal acute kidney injury? *Acta Clin Belg* 2012, 67(5):309-14.
25. Makris K, Spanou L. Acute Kidney Injury: Definition, Pathophysiology and Clinical Phenotypes. *Clin Biochem Rev* 2016, 37(2): 85–98.
26. Macedo E, Mehta RL. Prerenal failure: from old concepts to new paradigms. *Curr Opin Crit Care* 2009, 15(6):467-73.
27. Öz S. Deneysel böbrek iskemisi/reperfüzyon hasarında pelargonium sidoidesin etkileri. Yüksek lisans tezi. Trakya Üniversitesi.
28. Horoz M, Özgür Ö. Akut Böbrek Yetmezliği. *Harran Tıp Fak Der* 2004, 1(3): 48-61.
29. Poyraz MD. Deneysel böbrek iskemisi/reperfüzyon hasarında likopenin etkileri. Doktora tezi. Trakya Üniversitesi.
30. Tanrıverdi MH, Karadağ F. Akut Böbrek Yetersizliği. *Konuralp Tıp Dergisi* 2010, 2(1):46-52.
31. Bell M. Acute Kidney Injury, outcome studies. Thesis for doctoral degree. Karolinska Institutet.
32. Hertzberg D, Rydén L, Pickering JW, Sartipy U, Holzmann MJ. Acute kidney injury—an overview of diagnostic methods and clinical management. *Clin Kidney J* 2017, 10(3): 323–331.
33. Agrawal M, Swartz R. Acute Renal Failure. *Am Fam Physician* 2000, 61(7):2077-2088.
34. Awdishu L, Wu SE. Acute Kidney Injury. *CCSAP 2017, Book 2, Renal/Pulmonary Critical Care*, 7-21.
35. Ögütmen MB. Akut Böbrek Yetmezliği. *GKD Anest Yoğ Bak Dern Derg* 2011, 17(2): 25-33.
36. Hesketh EE, Czopek A, Clay M, Borthwick G, Ferenbach D, Kluth D. Renal Ischaemia Reperfusion Injury: A Mouse Model of Injury and Regeneration. *J Vis Exp* 2014, (88): 1-8.



37. Şener G, Yeğen BÇ. İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Klinik Gelişim* 2009;22(3):5-13.
38. Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg* 1991, 78(6):651-5.
39. Groot H, Rauen U. Ischemia-reperfusion injury: processes in pathogenetic networks: a review. *Transplant Proc* 2007, 39(2):481-4.
40. Chatterjee PK. Novel pharmacological approaches to the treatment of renal ischemia-reperfusion injury: a comprehensive review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2007,376(1-2):1-43.
41. Basile DP, Anderson MD, Sutton TA. Pathophysiology of Acute Kidney Injury. *Compr Physiol* 2012, 2(2): 1303–1353.
42. Frega NS, DiBona DR, Guertler B, Leaf A. Ischemic renal injury. *Kidney Int Suppl* 1976, 6:S17-25
43. Ashtiyani CS, Zohrabi M, Hassanpoor A, Hosseini N, Hajihashemi S. Oral administration of the aqueous extract of *Rosmarinus officinalis* in rats before renal reperfusion injury. *Iran J Kidney Dis* 2013,7(5):367-75.
44. Aragno M, Cutrin JC, Mastrocola R, Perrelli MG, Restivo F, Poli G, Danni O, Boccuzzi G. Oxidative stress and kidney dysfunction due to ischemia/reperfusion in rat: attenuation by dehydroepiandrosterone. *Kidney Int* 2003,64(3):836-43.
45. Kosieradzki M, Rowiński W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. *Transplant Proc* 2008, 40(10):3279-88.
46. Zweier JL, Talukder MA. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2006,70(2):181-90.
47. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev* 2010, 4(8): 118–126.
48. Liu T, Zhong S, Liao X, Chen J, He T, Lai S, Jia Y. A Meta-Analysis of Oxidative Stress Markers in Depression. *PLoS One* 2015, 10(10):e0138904.
49. Kurian GA, Rajagopal R, Vedantham S, Rajesh M. The Role of Oxidative Stress in Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury and Remodeling: Revisited. *Oxid Med Cell Longev* 2016, 2016:1656450.

50. Bagchi K, Puri S. Free Radicals And Antioxidants in Health and Disease. Eastern Mediterranean Health Journal 1998, 4(2):350-359.
51. Liu T, Stern A, Roberts LJ, Morrow JD. The isoprostanes: novel prostaglandin-like products of the free radical-catalyzed peroxidation of arachidonic acid. J Biomed Sci 1999, 6(4):226-35.
52. Katusic ZS. Superoxide anion and endothelial regulation of arterial tone. Free Radic Biol Med 1996, 20(3):443-8.
53. Hayyan M, Hashim MA, AlNashef IM. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. Chem. Rev 2016, 116 (5): 3029–3085.
54. Ozcan A, Ogun M. Biochemistry of Reactive Oxygen and Nitrogen Species. Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress 2015,Chapter 3. Publisher: InTech.
55. Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. Semin Fetal Neonatal Med 2010,15(4):186-90.
56. Lee J, Koo N, Min DB. Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety 2004, 3(1): 21-33.
57. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. Indian J Clin Biochem 2015, 30(1):11-26.
58. Cheng FC, Jen JF, Tsai TH. Hydroxyl radical in living systems and its separation methods. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci 2002, 781(1-2):481-96.
59. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. Am J Med 1991,(3C):14 -22.
60. Kanofsky JR. Singlet oxygen production by biological systems. Chemico-Biological Interactions 1989, 70 (1–2): 1-28.
61. Telfer A. Singlet oxygen production by PSII under light stress: mechanism, detection and the protective role of  $\beta$ -carotene. Plant Cell Physiol 2014,55(7):1216-23.
62. Klotz LO, Kröncke KD, Sies H. Singlet oxygen-induced signaling effects in mammalian cells. Photochem Photobiol Sci 2003,2(2):88-94.
63. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. Int J Biomed Sci. 2008 Jun; 4(2): 89–96.

64. Wang P. Regulation of oxidative stress and inflammation in ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury. Phd Thesis. The University of Manitoba.
65. Kurutas EB. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Kurutas Nutrition Journal* 2016, 15(71), 1-22.
66. Noori S. An Overview of Oxidative Stress and Antioxidant Defensive System. *Open Access Scientific Reports* 2012, 1(8):1-9.
67. Gupta RK, Patel AK, Shah N, Choudhary AK, Jha UK, Yadav UC. Oxidative Stress and Antioxidants in Disease and Cancer: A Review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2014, 15, 4405- 4409.
68. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006, 160(1), 1-40.
69. Chatterjee M, Saluja R, Kanneganti S, Chinta S, Dikshit M. Biochemical and molecular evaluation of neutrophil NOS in spontaneously hypertensive rats. *Cell Mol Biol* 2007, 53(1), 84-93.
70. Banerjee R, Verma AK, Siddiqui WM. *Natural Antioxidants: Applications in Foods of Animal Origin*. Apple Academic Press 2017, 200.
71. Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. Antioxidants and prevention of chronic disease. Review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2004, 44(1), 275-95.
72. Lu SC. Glutathione Synthesis. *Biochim Biophys Acta* 2013,1830(5): 3143–3153.
73. Lu SC. Regulation Of Glutathione Synthesis. *Mol Aspects Med* 2009, 30(1-2): 42–59.
74. Liu RM, Gaston Pravia KA. Oxidative stress and glutathione in TGF- $\beta$ -mediated fibrogenesis. *Free Radic Biol Med* 2010,48(1): 1.
75. Chen Y, Dong H, Thompson DC, Shertzer HG, Nebert DW, Vasiliou V. Glutathione Defense Mechanism In Liver Injury: Insights From Animal Models. *Food Chem Toxicol* 2013, 60: 38–44.
76. Napoli C, Paolisso G, Casamassimi A, Al-Omran M, Barbieri M, Sommese L et al. Effects of nitric oxide on cell proliferation: novel insights. *J Am Coll Cardiol* 2013,62(2):89-95.
77. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 2002,105(2):248-58.

78. Ehab MMA, Soha MH, Tarek MM. Nitric Oxide Synthase and Oxidative Stress: Regulation of Nitric Oxide Synthase. *Oxidative Stress - Molecular Mechanisms and Biological Effects* 2012, Publisher InTech.
79. Yu L. Role of Nitric Oxide in Acute Renal Failure. *Renal Failure* 1997, 19(2): 213-216.
80. Weight SC, Nicholson ML. Nitric Oxide and Renal Reperfusion Injury: a Review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1998, 16: 98-103.
81. Viñas JL, Sola A, Genescà M, Alfaro V, Pí F, Hotter G. NO and NOS isoforms in the development of apoptosis in renal ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med* 2006, 40(6):992-1003.
82. Koçan H, Yıldırım Ş, Özdemir E. Böbrek Biyobelirteçleri: Derleme. *İKSST Derg* 2016, 8(2):71-74.
83. Etzioni R, Urban N, Ramsey S, McIntosh M, Schwartz S, Reid B, Radich J, Anderson G, Hartwell L. The case for early detection. *Nat Rev Cancer* 2003, 3(4):243-52.
84. Vaidya VS, Ozer JS, Dieterle F, Collings FB, Ramirez V, Troth S et al. Kidney injury molecule-1 outperforms traditional biomarkers of kidney injury in preclinical biomarker qualification studies. *Nat Biotechnol* 2010, 28(5):478-85.
85. Peres LAB, Junior ADC, Schäfer AJ, Silva AL, Gaspar AD, Scarpari DF et al. Biomarkers of acute kidney injury. *J Bras Nefrol* 2013, 35(3):229-236.
86. Devarajan P. Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Curr Opin Pediatr* 2011, 23(2):194-200.
87. Alge JL, Arthur JM. Biomarkers of AKI: a review of mechanistic relevance and potential therapeutic implications. *Clin J Am Soc Nephrol* 2015, 10(1):147-55.
88. Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a urinary biomarker and much more. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2009, 24(11):3265–3268.
89. Bonventre JV, Yang L. Kidney injury molecule-1. *Current Opinion in Critical Care*: December 2010, 16(6):556–561.
90. Bonventre JV. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a specific and sensitive biomarker of kidney injury. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 2008, 241:78-83.

91. Waanders F, Timmeren MM, Stegeman CA, Bakker SJ, Goor H. Kidney injury molecule-1 in renal disease. *J Pathol* 2010, 220(1):7-16.
92. Ichimura T, Hung CC, Yang SA, Stevens JL, Bonventre JV. Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004, 286(3):F552-63.
93. Schmid M, Dalela D, Tahbaz R, Langetepe J, Randazzo M, Dahlem R. Novel biomarkers of acute kidney injury: Evaluation and evidence in urologic surgery. *World J Nephrol* 2015, 4(2): 160–168.
94. Yılmaz İ. NGAL diyabetik nefropatinin erken bir belirteci olabilir mi?. Uzmanlık tezi. Erciyes Üniversitesi.
95. Zulu M, Kaile T, Kantenga T, Chileshe C, Nkhoma P, Sinkala M. Kidney injury molecule-1 and microalbuminuria levels in Zambian population: biomarkers of kidney injury. *Pan Afr Med J* 2016, 24(54): 1-4.
96. Charlton JR, Portilla D, Okusa MD. A basic science view of acute kidney injury biomarkers. *Nephrol Dial Transplant* 2014, 29(7):1301-11.
97. Sparks MA, Crowley SD, Gurley SB, Mirosou M, Coffman TM. Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. *Compr Physiol* 2014, 4(3):1201-28.
98. Iwai M, Horiuchi M. Devil and angel in the renin-angiotensin system: ACE-angiotensin II-AT1 receptor axis vs. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas receptor axis. *Hypertens Res* 2009, 32(7):533-6.
99. Aqeel SH, Sanchez A, Battle D. Angiotensinogen as a biomarker of acute kidney injury. *Clin Kidney J* 2017, 10(6): 759–768.
100. Brewster UC, Perazella MA. The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. *Am J Med* 2004, 116(4):263-72.
101. Xiao X, Tang R, Zhou X, Peng L, Yu P. Aldosterone induces NRK-52E cell apoptosis in acute kidney injury via rno-miR-203 hypermethylation and Kim-1 upregulation. *Exp Ther Med* 2016, 12(2):915-924.
102. Briet M, Schiffrin EL. Aldosterone: effects on the kidney and cardiovascular system. *Nat Rev Nephrol* 2010, 6(5):261-73.
103. Knochel JP, White MG. The role of aldosterone in renal physiology. *Arch Intern Med* 1973, 131(6):876-84.

104. Rafiq K, Hitomi H, Nakano D, Nishiyama A. Pathophysiological roles of aldosterone and mineralocorticoid receptor in the kidney. *J Pharmacol Sci* 2011, 115(1):1-7.
105. Calvier L, Martinez-Martinez E, Miana M, Cachofeiro V, Rousseau E, Sádaba JR et al. The impact of galectin-3 inhibition on aldosterone-induced cardiac and renal injuries. *JACC Heart Fail* 2015, 3(1):59-67.
106. Ulaş N. Erişkin Erkek Siçanlarda Kisspeptinin Spermatogenezis ve Apoptozise Etkisinin İmmünohistokimyasal, Işık ve Elektron Mikroskopik Olarak İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, 2009, 22-28.
107. Pasquier J, Kamech N, Lafont AG, Vaudry H, Rousseau K, Dufour S. "Molecular evolution of GPCRs: Kisspeptin/kisspeptin receptors". *Journal of Molecular Endocrinology* 2014, 52 (3), 101-117.
108. Kaya A. Yenidoğan Döneminde Meme Büyümesi Olan Bebeklerde Plazma Kisspeptin Düzeyleri. Yüksek Lisans Tezi, 2014, 2-19.
109. Dhillo W. Timeline: Kisspeptins. *The lancet diabetes and endocrinology* 2013, 1(1): 12-13.
110. Colledge WH. GPR54 and Kisspeptins. *Results Probl Cell Differ* 2008, 46:117-43. doi: 10.1007/400\_2007\_050.
111. Verin VK, Ivanov VV. Гормоны и их эффекты: Справочник. Издательство Фолиант, 2012, 11. Санкт – Петербург.
112. Bhattacharya M and Babwah AV. Kisspeptin: Beyond the Brain. *Endocrinology* 2015, 156(4), 1218–1227.
113. Nabi G, Muhammad H, Ali S. and Ullah S. Kisspeptin, its Localization and Physiological Functions in Primates: A Review. *World Journal of Zoology* 2015, 10 (2), 94-101.
114. Yi T, Tan K, Cho S-G, Wang Y, Luo J, Zhang W et al. Regulation of Embryonic Kidney Branching Morphogenesis and Glomerular Development by KISS1 Receptor (Gpr54) through NFAT2- and Sp1-mediated Bmp7 Expression. *The Journal Biological Chemistry* 2010, 285(23), 17811–17820.
115. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipit peroxides in animal tissues by thiobarbutiric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-8.
116. Devi GS, Prasad MH, Saraswathi I, Raghu D, Rao DN, Reddy PP. Free radicals antioxidant enzymes and lipit peroxidation in different types of leukemias. *Clin Chim Acta* 2000;(293):53–62.

117. Li PK, Burdmann EA, Mehta RL. Acute kidney injury: global health alert. *Kidney Int* 2013, 83(3):372-6.
118. Schrezenmeier EV, Barasch J, Budde K, Westhoff T, Schmidt – Ott KM. Biomarkers in acute kidney injury – pathophysiological basis and clinical performance. *Acta psychologica* 2017, 219(3): 556–574.
119. Yang K, Li WF, Yu JF, Yi C, Huang WF. Diosmetin protects against ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury in mice. *Journal of Surgical Research* 2017, (214) 69-78.
120. Xie GL, Zhu L, Zhang YM, Zhang QN, Yu Q. Change in iron metabolism in rats after renal ischemia/reperfusion injury. *Plos One* 2017, 12(4):1-4.
121. Andreucci VE. *Acute Renal Failure: Pathophysiology, Prevention, and Treatment*. Springer Science & Business Media 2012, 17.
122. Peng H, Mao Y, Fu X, Feng Z, Xu J. Comparison of biomarkers in rat renal ischemia-reperfusion injury. *Int J Clin Exp Med* 2015, 8(5):7577-84.
123. Soljancic A, Lopez Ruiz A, Chandrashekar K, Maranon R, Liu R, Reckelhoff JF, Juncos LA. Protective role of testosterone in ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2013, 304(11):R951-8.
124. Yoshida T, Kumagai H, Kohsaka T, Ikegaya N. Relaxin protects against renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013, 305(8):F1169-76.
125. Ramí´rez V, Trujillo J, Valdes R, Uribe N, Cruz C, Gamba G, Bobadilla NA. Adrenalectomy prevents renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009, 297(4):F932-42.
126. Meji´a-Vilet JM, Ramí´rez V, Cruz C, Uribe N, Gamba G, Bobadilla NA. Renal ischemia-reperfusion injury is prevented by the mineralocorticoid receptor blocker spironolactone. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007, 293(1):F78-86.
127. Fouada AA, Al-Mulhimb AS, Jresatc I, Morsyd MA. Protective effects of captopril in diabetic rats exposed to ischemia/reperfusion renal injury. *J Pharm Pharmacol* 2013, 65(2):243-52.
128. Wang Z, Liu Y, Han Y, Guan W, Kou X, Fu J, Yang D, Ren H, He D, Zhou L, Zeng C. Protective effects of aliskiren on ischemia-reperfusion-induced renal injury in rats. *Eur J Pharmacol* 2013, 718(1-3):160-6.

129. Kontogiannis J, Burns KD. Role of AT1 angiotensin II receptors in renal ischemic injury. *Am J Physiol* 1998, 274(1 Pt 2):F79-90.
130. Efrati S, Berman S, Hamad RA, Siman-Tov Y, Ilgiyaev E, Maslyakov I, Weissgarten J. Effect of captopril treatment on recuperation from ischemia/reperfusion-induced acute renal injury. *Nephrol Dial Transplant* 2012, 27(1):136-45.
131. Da Silveira KD, Pompermayer Bosco KS, Diniz LR, Carmona AK, Cassali GD, Bruna-Romero O, de Sousa LP, Teixeira MM, Santos RA, Simões e Silva AC, Ribeiro Vieira MA. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas axis in renal ischaemia/reperfusion injury in rats. *Clin Sci (Lond)* 2010,119(9):385-94.
132. Mark LA, Robinson AV, Schulak JA. Inhibition of Nitric Oxide Synthase Reduces Renal Ischemia/Reperfusion Injury. *Journal of Surgical Research* 2005, 129:236–241.
133. Chatterjee PK, Patel NS, Kvale EO, Cuzzocrea S, Brown PA, Stewart KN, Mota-Filipe H, Thiernemann C. Inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int.* 2002, 61(3):862-71.
134. Malek M, Nematbakhsh M. The preventive effects of diminazene aceturate in renal ischemia/reperfusion injury in male and female rats. *Adv Prev Med* 2014; 2014:740647, 13.
135. Uyanoglu M, Canbek M, Ceyhan E, Senturk H, Bayramoglu G, Gunduz O, Ozen A, Turgak O. Preventing organ injury with carvedilol after renal ischemia/reperfusion. *Journal of Medicinal Plants Research* 2011, 5(1), pp. 72-80.
136. Khastar H. Protective effects of vitamin E against liver damage caused by renal ischemia reperfusion. *Ren Fail* 2015, 37(3): 494–496.
137. Seifi B, Kadkhodae M, Najafi A, Mahmoudi A. Protection of Liver as a Remote Organ after Renal Ischemia-Reperfusion Injury by Renal Ischemic Postconditioning. *Int J Nephrol* 2014, 2014: 120391. doi: 10.1155/2014/120391
138. Tripatara P, Patel NSA, Webb A, Rathod K, Lecomte FMJ, Mazzon E, Cuzzocrea S, Yaqoob MM, Ahluwalia A, Thiernemann C. Nitrite-Derived Nitric Oxide Protects the Rat Kidney against Ischemia/Reperfusion Injury In Vivo: Role for Xanthine Oxidoreductase. *J Am Soc Nephrol* 2007, 18: 570–580.
139. Aydoğdu N, Kaymak K, Yalçın Ö. Sıçanlarda Böbrek İskemi/Reperfüzyon Hasarında N-Asetilsisteinin Etkileri. *Fırat Tıp Dergisi* 2005, 10(4): 151-155.
140. Silver JH. Nitrite and Nitric Oxide as Potential Diagnostic Markers in Acute Vascular Diseases. *J Neurol Neurophysiol* 2011,1:1-13.



141. Sharma SP. Nitric oxide and the kidney. *Indian J Nephrology* 2004, 14: 77- 84.
142. Kone BC. Nitric oxide in renal health and disease. *Am J Kidney Dis* 1997, 30(3): 311-33.
143. Koç M, Kumral ZNÖ, Özkan N, Memi G, Kaçar Ö, Bilsel S, Çetinel Ş, Yeğen BÇ. Obestatin improves ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats via its antioxidant and anti-apoptotic effects: Role of the nitric oxide. *Peptides* 2014, 60: 23–31.
144. Liu X, Chen H, Zhan B, Xing B, Zhou J, Zhu H, Chen Z. Attenuation of reperfusion injury by renal ischemic postconditioning: The role of NO. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007, 359: 628–634.
145. Bağcıoğlu M, Kocaaslan R, Uslu M, Fındık Güvendi G. The Effect of Ticagrelor on Ischemia-Reperfusion Injury of Kidney: Is the Pleiotropic Effect a Valid Factor? *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2017, 23 (6): 917-924.
146. Mahfoudh-Boussaid A, Aayed Tka KH, Amine Zaouali M, Rosello'- Catafau J, Abdennebi HB. Effects of trimetazidine on the Akt/eNOS signaling pathway and oxidative stress in an in vivo rat model of renal ischemia-reperfusion. *Ren Fail* 2014, 36(9): 1436–1442.
147. Singh D, Chopra K. Effect of trimetazidine on renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Pharmacological Research* 2004, 50: 623–629.
148. Walker LM, York JL, Imam SZ, Muldrew KL, Mayeux PR. Oxidative stress and reactive nitrogen species generation during ischemia. *Toxicological Science* 2001, 63: 143-148.
149. Singh D, Chander V, Chopra K. The effect of quercetin, a bioflavonoid on ischemia/reperfusion induced renal injury in rats. *Arch Med Res* 2004, 35(6):484-94.
150. Korkmaz A. Investigation of the effects of flavonoid application against experimental ischemia-reperfusion damage in rat kidney. *Doktora tezi. Hacettepe Üniversitesi.*
151. Wahab F, Atika B, Shahab M, Behr R. Kisspeptin signalling in the physiology and pathophysiology of the urogenital system. *Nature Reviews | Urology* 2015, 1-12.
152. Tsujimura T, Idei M, Yoshikawa M, Takase O, Hishikawa K. Roles and regulation of bone morphogenetic protein-7 in kidney development and diseases. *World J Stem Cells* 2016, 8(9): 288-296.
153. Yi T, Tan K, Cho SG, Wang Y, Luo J, Zhang W, Li D, Liu M. Regulation of Embryonic Kidney Branching Morphogenesis and Glomerular Development by KISS1 Receptor (Gpr54) through NFAT2- and Sp1-mediated Bmp7 Expression. *The journal of biological chemistry* 2010, 285(23):17811–17820.

154. Sawyer I, Smillie SJ, Bodkin JV, Fernandes E, T. O'Byrne K, D. Brain S. The Vasoactive Potential of Kisspeptin-10 in the Peripheral Vasculature. PLoS ONE 2011, 6(2): 1-8.
155. Nakamura Y, Aoki S, Xing Y, Sasano H, Rainey WE. Metastin Stimulates Aldosterone Synthesis in Human Adrenal Cells. Reproductive Sciences 2007, 14(8): 836-845.
156. Katugampola H, King PJ, Chatterjee S, Meso M, Duncan AJ, Achermann JC ve ark. Kisspeptin Is a Novel Regulator of Human Fetal Adrenocortical Development and Function: A Finding With Important Implications for the Human Fetoplacental Unit. J Clin Endocrinol Metab 2017, 102(9):3349-3359.
157. Ten SC, Gu SY, Niu YF, An XF, Yan M, He M. Central Administration of Kisspeptin-10 Inhibits Water and Sodium Excretion of Anesthetized Male Rats and the Involvement of Arginine Vasopressin. Endocrine Research 2010, 35(3):128–136.

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Kidney protein molecule - 1 .....	12
Şekil 2. AT 1 reseptör yolağı.....	14
Şekil 3. Aldosteronun etki yolları.....	15
Şekil 4. Kisspeptin İzofomları.....	16
Şekil 5. Kontrol grubunun deneysel protokolü.....	19
Şekil 6. I/R grubunun deneysel protokolü.....	19
Şekil 7. Okside Glutatyon standart eğri grafiği.....	22
Şekil 8. Redükte Glutatyon standart eğri grafiği.....	23
Şekil 9. KIM-1 standart eğri grafiği.....	24
Şekil 10. Nitrik Oksit standart eğri grafiği.....	25
Şekil 11. Mikroalbuminüri standart eğri grafiği.....	26
Şekil 12. Aldosteron standart eğri grafiği.....	27
Şekil 13. ACE standart eğri grafiği.....	28
Şekil 14. ANG II standart eğri grafiği.....	29
Şekil 15. Arginin standart eğri grafiği.....	30
Şekil 16. Kisspeptin standart eğri grafiği.....	31
Şekil 17. Gruplar arası ortalama MDA düzeylerinin karşılaştırılması.....	38
Şekil 18. Gruplar arası ortalama red - GSH düzeylerinin karşılaştırılması.....	39
Şekil 19. Gruplar arası ortalama ox- GSH düzeylerinin karşılaştırılması.....	39
Şekil 20. Gruplar arası ortalama Arginin düzeylerinin karşılaştırılması.....	40
Şekil 21. Gruplar arası ortalama böbrek NO düzeylerinin karşılaştırılması.....	40
Şekil 22. Gruplar arası ortalama böbrek Kisspeptin düzeylerinin karşılaştırılması.....	41

<b>Şekil 23.</b> Gruplar arası ortalama serum ALT düzeylerinin karşılaştırılması.....	42
<b>Şekil 24.</b> Gruplar arası ortalama serum AST düzeylerinin karşılaştırılması.....	42
<b>Şekil 25.</b> Gruplar arası ortalama kreatin kinaz düzeylerinin karşılaştırılması.....	43
<b>Şekil 26.</b> Gruplar arası ortalama serum Üre düzeylerinin karşılaştırılması.....	43
<b>Şekil 27.</b> Gruplar arası ortalama serum kreatinin düzeylerinin karşılaştırılması.....	44
<b>Şekil 28.</b> Gruplar arası ortalama serum Na <sup>+</sup> düzeylerinin karşılaştırılması.....	44
<b>Şekil 29.</b> Gruplar arası ortalama serum K <sup>+</sup> düzeylerinin karşılaştırılması.....	45
<b>Şekil 30.</b> Gruplar arası ortalama serum ACE düzeylerinin karşılaştırılması.....	45
<b>Şekil 31.</b> Gruplar arası ortalama serum Aldosteron düzeylerinin karşılaştırılması.....	46
<b>Şekil 32.</b> Gruplar arası serum ANG II düzeylerinin karşılaştırılması.....	46
<b>Şekil 33.</b> Gruplar arası ortalama serum Kisspeptin düzeylerinin karşılaştırılması.....	47
<b>Şekil 34.</b> Gruplar arası ortalama serum Arginin düzeylerinin karşılaştırılması.....	47
<b>Şekil 35.</b> Gruplar arası ortalama serum NO düzeylerinin karşılaştırılması.....	48
<b>Şekil 36.</b> Gruplar arası ortalama idrar Na <sup>+</sup> düzeylerinin karşılaştırılması.....	48
<b>Şekil 37.</b> Gruplar arası ortalama idrar K <sup>+</sup> düzeylerinin karşılaştırılması.....	49
<b>Şekil 38.</b> Gruplar arası ortalama idrar Kreatin düzeylerinin karşılaştırılması.....	49
<b>Şekil 39.</b> Gruplar arası ortalama Kreatin Klirens düzeylerinin karşılaştırılması.....	50
<b>Şekil 40.</b> Gruplar arası ortalama FE Na düzeylerinin karşılaştırılması.....	50
<b>Şekil 41.</b> Gruplar arası ortalama idrar NO düzeylerinin karşılaştırılması.....	52
<b>Şekil 42.</b> Gruplar arası ortalama idrar KİM – 1 düzeylerinin karşılaştırılması.....	51
<b>Şekil 43.</b> Gruplar arası ortalama idrar Kisspeptin düzeylerinin karşılaştırılması.....	52
<b>Şekil 44.</b> Gruplar arası ortalama idrar hacim düzeylerinin karşılaştırılması.....	52

## TABLÖLAR LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> Kullanılan Cihaz ve Aletler.....	20
<b>Tablo 2.</b> Kullanılan kimyasal maddeler.....	20
<b>Tablo 3.</b> Kontrol grubunun biyokimyasal verileri.....	33
<b>Tablo 4.</b> IR grubunun biyokimyasal verileri.....	35
<b>Tablo 5.</b> Grupların böbrek değişkenlerine ait ortalama±SD verileri.....	37
<b>Tablo 6.</b> Grupların serum değişkenlerine ait ortalama±SD verileri .....	37
<b>Tablo 7.</b> Grupların idrar değişkenlerine ait ortalama±SD verileri.....	38

## ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında Kazakistan'ın Türkistan ilçesinde doğdum. Lise öğrenimi Alpamıs Batır okulunda 2009 yılında bitirdim. Lisans öğrenimimi ise Güney Kazakistan Eczacılık Akademisi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Bölümünde 2014 yılında tamamladım. 2015 yılında Trakya Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Engelli Çalışmaları Anabilim Dalı'nda, 2016 yılında da Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım.

### **Yayımları:**

1) Kudaibergenova A, Aydogdu N, Kandemir N, Aydın MA. Investigation of Kisspeptin Role in Experimental Kidney Ischemia/Reperfusion Injury. *Acta Physiologica* 2017, Volume 221, Issue Supplement S714, p 91.

2) Kandemir N, Aydogdu N, Taştekin E, Kudaibergenova A, Aydın MA. Investigation of the Effects of Lycopene on Experimentally Hypertension-induced Rats. *Acta Physiologica* 2017, Volume 221, Issue Supplement S714, p 28.

## **EKLER**

## EK – 1



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

### HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Oturum Sayısı: 2016/13

Karar Tarihi: 28.12.2016

KARAR NO: 2016.13.08

Yürütcülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Nurettin AYDOĞDU'nun yaptığı, Yüksek Lisans Öğrencisi Assel Kudaibergenova'nın Yüksek Lisans tezi olarak planlanan TÜHADYEK-2016/58 protokol nolu "Deneysel böbrek iskemisi/reperfüzyon hasarında kisspeptinin rolünün incelenmesi" başlıklı çalışma görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda değişiklik önerisinin; Hayvan deneyleri yerel etik kurulu yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

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

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

- İZİNLI -

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

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

- MAREZETLI -

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

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

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

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

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

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