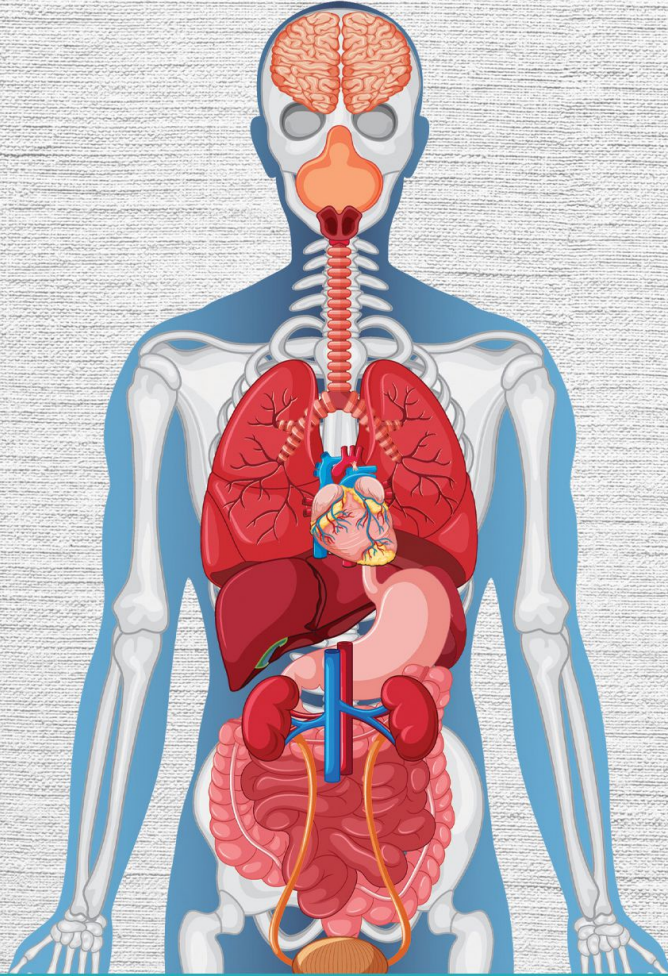


# Fizyoloji, Histoloji ve Embriyolojide Güncel Çalışmalar



LIVRE DE LYON

2023

Sağlık Bilimleri



# **Fizyoloji, Histoloji ve Embriyolojide Güncel Çalışmalar**

**Editör**

**Recep DOKUYUCU**



**LIVRE DE LYON**

Lyon 2023



# **Fizyoloji, Histoloji ve Embriyolojide Güncel Çalışmalar**

**Editör**

**Recep DOKUYUCU**



**LIVRE DE LYON**

Lyon 2023

## **Fizyoloji, Histoloji ve Embriyolojide Güncel Çalışmalar**

**Editor** • Assoc. Prof. Dr. Recep DOKUYUCU • Orcid: 0000-0001-6837-3477

**Cover Design** • Motion Graphics

**Book Layout** • Motion Graphics

**First Published** • October 2023, Lyon

**ISBN:** 978-2-38236-613-4

**copyright © 2023 by Livre de Lyon**

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without prior written permission from the Publisher.

**Publisher** • Livre de Lyon

**Address** • 37 rue marietton, 69009, Lyon France

**website** • <http://www.livredelyon.com>

**e-mail** • [livredelyon@gmail.com](mailto:livredelyon@gmail.com)



LIVRE DE LYON

## ÖNSÖZ

Değerli okurlar; “**Fizyoloji, Histoloji ve Embriyolojide Güncel Çalışmalar**” adlı bu değerli eserimizde 9 adet kendi alanlarında en güncel konuları içeren bölümleri siz değerli bilim insanlarına sunmanın haklı gururunu yaşıyoruz. Bu kitabın sağlık alanında çalışmakta veya okumakta olan hem öğrenci hem akademisyen hem de okuyuculara önemli bir kaynak olması en büyük arzumuzdur. Bu kitabın bilimsel içeriğinin hastaların tanı ve tedavisinde yol gösterici olması en büyük temennimizdir. Bu baskının yazım, şekil, tasarım ve baskıya hazır hale getirilmesinde emeği geçen yayın evine teşekkür ederim. Sizin değerli katkılarınız için şimdiden teşekkür ederim.

**Saygılarımızla,**

**Doç. Dr. Recep DOKUYUCU, 2023**



# İÇİNDEKİLER

<b>ÖNSÖZ</b>		I
<b>BÖLÜM I.</b>	ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ <i>Musa TATAR &amp; Ülker EREN</i>	1
<b>BÖLÜM II.</b>	GASTROİNTESTİNAL SİSTEM <i>Gizem YAMAN, Burak Veli ÜLGER &amp; Eda YILDIZHAN</i>	17
<b>BÖLÜM III.</b>	BÖBREK-GASTROİNTESTİNAL SİSTEM-BEYİN AKSI: KRONİK BÖBREK HASTALIĞI AÇISINDAN DEĞERLENDİRME <i>Zarife Nigâr ÖZDEMİR KUMRAL</i>	25
<b>BÖLÜM IV.</b>	İNTRAPERİTONAL YOLLA UYGULANAN MELATONİN HAMİLE FARELERDE MİDEYİ KADMİYUM KLORÜR TOKSİSİTESİNDEN KORUR <i>Erhan ŞENSOY</i>	39
<b>BÖLÜM V.</b>	PROTEKTİF ETKİLİ BİTKİSEL BİR AJAN: SİLYMARİN <i>Nevin KOCAMAN</i>	49
<b>BÖLÜM VI.</b>	AĞIR METAL MARUZİYETİNE BAĞLI DOKULARDA OLUŞAN TOKSİK ETKİLERE KARŞI N-ASETİLSİSTEİNİN TERAPÖTİK ETKİSİ <i>Sercan KAYA</i>	61
<b>BÖLÜM VII.</b>	KRONİK BÖBREK HASTALIĞINDA YENİ TERAPÖTİK YAKLAŞIMLAR: NÖROPEPTİDLER <i>Zarife Nigâr ÖZDEMİR KUMRAL</i>	93
<b>BÖLÜM VIII.</b>	DİŞİ VE ERKEK RATLARDA KASTRASYONUN (ORŞİEKTOMİ VE OVARİEKTOMİ) MESANE DUVARI, MESANE TRİGONU VE PROKSİMAL ÜRETRADA ENDOTELYAL, İNDÜKLENEN VE NÖRONAL NİTRİK OKSİT DÜZEYLERİNE ETKİLERİ VE ÜRİNER SİSTEM FONKSİYONLARI İLE İLİŞKİSİ <i>Selim YAZAR &amp; Hakkı UZUN &amp; Yıldırım Kalkan &amp; İbrahim Şehitoğlu &amp; Tolga MERCANTEPE &amp; Eyüp DİL</i>	129
<b>BÖLÜM IX.</b>	YENİ KEŞFEDİLMİŞ BİR MOLEKÜL; SUPRABASİN <i>Nevin KOCAMAN</i>	147





# BÖLÜM I

## ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ

### *Endoplasmic Reticulum Stress and Assessment*

**Musa TATAR<sup>1</sup> & Ülker EREN<sup>2</sup>**

*<sup>1</sup>(Dr. Öğr. Üyesi), Kastamonu Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji  
Anabilim Dalı, Kastamonu/Türkiye  
E-mail: mtatar@kastamonu.edu.tr  
ORCID: 0000-0002-5707-8832*

*<sup>2</sup>(Prof. Dr.), Aydın Adnan Menderes Üniversitesi,  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Aydın/Türkiye  
E-mail: ueren@adu.edu.tr  
ORCID: 0000-0002-2451-8512*

### 1. Giriş

**E**ndoplazmik retikulumda (ER) katlanma hatası olan ya da katlanmamış proteinlerin birikmesi sonucu ER hemeostazisinin bozulmasıyla ortaya çıkan hücresel cevap, ER stresi olarak tanımlanmaktadır. Salgı proteinlerin aşırı miktarda sentezlenmesi, hatalı katlanmış proteinlerin yüksek oranda eksprese olması, katlanmanın gerçekleşmesinde rol oynayan proteinlerdeki mutasyonlar, ER'deki Ca<sup>+2</sup> miktarındaki anormal değişiklikler ve viral enfeksiyonlar ER'de protein birikimine sebep olan etkenler olabilir (1–3). Güncel olarak, nörodejeneratif hastalıklar (amiyotrofik lateral skleroz, parkinson, alzheimer, huntington), iskemi/reperfüzyon hasarı olan hastalıklar, metabolik hastalıklar arasında ise tip 2 diyabet ve obezitenin patogeneğinde ER stresinin aracılık ettiği hastalıklar arasında saymak mümkündür (4,5).

## 2. Hatalı Katlanmış Proteinin Tanınması

Proteinlerin katlanıp katlanmadıkları şaperon sistemi ile ayırt edilmektedir. Bir proteinin diğer proteinin nasıl katlanmadığını fark etmesi, kısmen immunglobin bağlayıcı protein (GRP78) ve UDP (Uridine diphosphate/ Uridin difosfat) glukoz glikoprotein glikoziltransferaz (UGGT) aracılığıyla anlaşılır (6).

## 3. Katlanmamış Protein Cevabı (UPR)

ER’de hatalı katlanmış ya da katlanmamış proteinlerin birikmesinden sonra, hücrede homeostazı tekrar sağlamak ve stresten en az zararla kurtulmak için UPR olarak bilinen hücre içi sinyal yollarından oluşan cevabın aktifleşmesiyle, hücre ER stresinden kurtulmaya çalışır. UPR yanıtın öncelikli hedefi hücre yaşamını devam ettirmeye çalışmaktır (7,8). ER’de bulunan şaperon proteini GRP78, UPR düzenleyici olarak hizmet eder ve ER strese yanıtta İnositol gerektiren enzim-1 (IRE1), Pankreatik kinaz benzeri ER kinaz (PERK) ve Aktive edici transkripsiyon faktörü-6 (ATF6) aktivasyonunda önemli rol oynamaktadır (9). Hsp70 ailesinden olan GRP78, ER’ye taşınacak sentezlenmiş proteinlere geçici olarak bağlanan, katlanmamış ve hatalı katlanmış proteinlere ise kalıcı olarak bağlanan peptit bağımlı ATP-az’dır. Stres olmadığı durumlarda GRP78; IRE1, PERK ve ATF6’nın luminal alanlarına bağlanarak ER’de inaktif şekilde korunmalarını sağlamaktadır (10,11).

UPR’nin uyarılmasına neden olan unsurlar;

- Yeniden ER’nin normal işlevini oluşturmak ve değişen ortama adaptasyon sağlamak,
- ER stresi sırasında, ER lümenine gelecek ve birikime neden olacak yeni proteinlerin miktarını azaltmak,
- ER’de proteinlerin katlanma oranını arttırmak,
- ER’de bulunan hatalı katlanmış ya da katlanmamış proteinlerin yıkılmasını ve tekrar sitoplazmaya dönüşünü gerçekleştirmek (12,13).

## 4. Katlanmamış Protein Cevabı Sinyal Yolları

Hücrede, farklılaşma işlemleri ya da fizyolojik koşullarındaki değişiklikler sonucu, ER’de protein yükünde bir artış gözlenmektedir. ER’de protein yükü ER katlama kapasitesiyle ilişkili olarak arttığı zaman, ER stresine neden olan ER’de hatalı katlanmış proteinlerin birikimi ile sonuçlanmaktadır. Hücrenin ER stresini aşabilmesi için, protein yükü ile ER protein katlama mekanizması

arasında koordinasyon olması gerekir (14,15). ER stresine cevap oluşturarak ER’de yeniden homeostazis oluşturmayı sağlayan UPR, birkaç sinyal yolunun aktivasyonu aracılığıyla gerçekleştirilmektedir (8).

ER stresine maruz kalmış hücre bundan kurtulmak için UPR sinyal yolağının aktivasyonuna ihtiyaç duymaktadır. Üç farklı ER stres sensörü olarak bilinen PERK, ATF6 ve IRE1 tarafından UPR’nin aktivasyonu düzenlenmektedir (16). İntegral protein olan bu mediatörler, ER lümeninde ER stresine hassas bir alan ve sinyal efektörlerini aktive eden sitozolik bir alana sahiptirler. UPR’nin aktivasyonu sonucu; translasyonun azalması, protein sentez yükünü azaltarak ER’de katlanmamış proteinlerin birikiminin önlenmesi, ER şaperonları ile katlanma enzimlerini kodlayan genlerin translasyonunun artırılması gibi birçok hücrel yanıt meydana gelmektedir (17).

#### **4.1. Pankreatik Kinaz (PKR) benzeri ER kinaz (PERK)**

ER strese birincil hücrel yanıt kısa süreli translasyonu azaltmaktır (18). ER’de hatalı proteinlerin birikimi sonrasında hayatta kalma ve apoptotik sinyaller arasında uyum UPR’nin PERK yolağı ile sağlamaktır. PERK’ in esas fonksiyonu translasyonu ayarlamaktır (19). İnaktif PERK’ in GRP78 ile birlikte bulunması gerekmektedir (14,20). PERK’in aktive olması eIF2 $\alpha$ ’nın 51. pozisyonundaki serinin fosforillenmesiyle, hücre içinde genel translasyon durdurulur. Hücrenin protein yükü azaltılarak katlanmamış proteinler düzeltilmeye çalışılması PERK’in aktivasyonu ile gerçekleşir (17). Ancak fosforillenmiş eIF2 $\alpha$ , aktive edici transkripsiyon faktörü-4 (ATF4) mRNA’nın translasyonunu başlatır. Translasyonun düzenlenmesi, ATF4 ve defosforilize eIF2 $\alpha$  tarafından upregule edilen DNA hasarını tetikleyen gen 34 (GADD34) ve stresle tetiklenen fosfatase büyüme faktörünün durdurulmasıyla düzenlenir (18). C/EBP protein transkripsiyon faktör homologu (CHOP), GADD34, ATF3, aminoasitlerin transportu, glutatyon biyosentezi ve oksidatif strese dirençte rol alan genlerin transkripsiyonunu ATF4’ün nükleusa girmesiyle aktive edilir (17). Apoptoz sinyali olan CHOP, ATF6 tarafından aktive edilir ve hücreyi apoptozise götürür (21).

#### **4.2. Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 6 (ATF6) Sinyal Yolu**

Hem transkripsiyon aktivasyon bölgesi hem de şaperona bağlanan ER luminal bölgesi içeren sitozolik domainli bir tip II transmembran protein olan ATF6 normalde ER membranında GRP78 ile birlikte inaktif olarak bulunur (17). Hücrede ER stres meydana geldiğinde GRP78 lumene ayrıldığında

ATF6'nın golgiye transportu gerçekleşir. Sonrasında golgide site 1 ve site 2 proteazlar tarafından sırayla kesilerek aktif form oluşturulur (21). Aktif hale gelen ATF6'nın nükleusa transportu hedef genlerin aktivasyonunu (17) ve ER stres yanıtını destekleyen genlerin uyarılmasını sağlar (14).

### **4.3. Inositol Gerektiren Enzim 1 (IRE-1) Sinyal Yolu**

Serin/treonin kinaz ve sitosolik domainindeki endoribonukleaz aktiviteleri olan IRE-1 bifonksiyonel tip-1 transmembran glikoproteindir. GRP78 ile ilişkisi olan IRE1'in N-terminal bölgesi ER stresi proteinlerini fark etmek için ER lumenine yerleşmiştir (19). Memelilerde  $\alpha$  ve  $\beta$  olmak üzere IRE1'in bilinen iki izoformu mevcuttur (22). Yalnızca IRE-1 $\beta$  ekspresyonu bağırsak epitelyal hücreleriyle sınırlıyken, IRE-1 $\alpha$  tüm dokularda eksprese edilebilir (23,24). IRE-1'den ER stres sonucu GRP78'in ayrılmasıyla, IRE-1'in luminal bölgelerine hatalı proteinler bağlanarak IRE-1'in dimerizasyonunu ve sonrasında aktivasyonu uyarılır (25,26). Potensiyel transkripsiyon faktörü olarak hareket eden 41 kDa sXBP1'in, ER şaperonları ve HSP40 ailesi üyesi P58 dâhil birçok hedefleri mevcuttur (19,21).

## **5. ER Stresinde Hatalı Katlanan Proteinlerin Yıkımlanması (ERAD) ve Programlı Hücre Ölümü**

ER'de protein katlanması enerji gerektiren bir işlemdir. Stresiz ER ortamında protein sentezlenmesi sürecinde katlanma için gerekli ara maddeler katlanmamış olarak mevcut olabilir. Enerji yetersizliği ile oluşan ER stres meydana geldiği zaman, katlanma ara maddelerinin çoğu düşük enerjili fazda geri dönüşümsüz olarak yıkımlanır ve birikirler (13). ER lumenindeki ER stresi proteinleri ubiquitinlenmiş ve proteazom tarafından bozulmuş olan sitoplazmada translokon aracılığıyla yer değiştirirler (27). UPR tarafından düzenlenen bu proses ER stresinde hatalı katlanan proteinlerin yıkımlanması (ERAD) olarak tanımlanmaktadır (13). UPR aktivasyonunun korunması için ER'de hatalı katlanmış proteinlerin proteozomal yıkımlanmasına ihtiyaç duyulur. Proteazom inhibisyonu, ERAD'ın birkaç ögesini kodlayan genlerin transkripsiyonuna yol açan UPR'yi aktif hale getirmek için gereklidir (28). Diğer taraftan ER'de hatalı katlanmış ya da katlanmamış protein yükü ortadan kaldırılamazsa uzatılmış UPR aktivasyonu programlı hücre ölümüne yol açmaktadır (13). CHOP, c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ve kaspaz ER strese yanıtta rol alan apoptotik sinyal araçları olarak bilinmektedir (18).

Temel olarak pro-apoptotik olan CHOP, ER stres sırasında en yüksek düzeyde upregüle edilebilen genlerden biridir (22). Tüm UPR sinyal yollarının temel olarak PERK yolunu uyarmasına rağmen, CHOP transkripsiyonunun indüklenmesine de dâhil olmaktadır. Birkaç çalışmada ER stresi ile uyarılan apoptoz da CHOP'un dâhil olduğu bildirilmektedir (18). IRE-1-XBP-1 kolu UPR'nin en son prosurvival dalıdır. Stresin varlığı adaptör kinaz TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2) ve apoptoz sinyali düzenleyen kinaz-1 (ASK1) ve JNK gibi aktif kinazları gerektiren IRE-1 in proapoptotik sinyal yolunu tetiklemektedir (22). IRE1, JNK sinyal yolunu aktive ederek apoptozu teşvik eder. IRE1, JNK fosforilleyen TRAF2 ve ASK1 kompleksinden oluşmuştur. Poliglutamin proteininin yüksek seviyesinden dolayı ER strese maruz kalan nöronlarda IRE1'in apoptozu aktifleştirdiği bildirilmiştir (17). Kaspazlar ER stres tarafından uyarılan apoptozu katılmaktadır (18). ER ile bağlantılı sistein proteaz üyesi olan kaspazlar, hücre içerisinde inaktif proform olarak yer almaktadır. Apoptozun uyarılmasından sonra kaspazların aktif enzim formuna dönüşmesi için bir dizi işlemlerden geçmesi gerekmektedir (17). Apoptoz için gerekli olan kaspazların (kaspaz 3, 6, 7, 8, 9, 12) işlevleri ER stresi ile ilgili çalışmalarda gösterilmiştir. Kaspaz-12 ER stres ile uyarılan apoptozda önemli rol oynamaktadır (29,30). Kalsiyum tarafından aktive olan bir stoplazmik proteaz olan kalpainler tarafından aktive olan kaspaz-12 ER'de prokaspaz 9'u keser ve kaspaz 9'da kaspaz 3'ün aktivasyonuna yol açarak apoptoz meydana gelmektedir (31).

## 6. ER Stresinin Değerlendirilmesi

Hücrede ER stres seviyesini doğrudan ölçmek oldukça zor olmaktadır. Ancak, ER stresinin doğrudan ölçülebileceği en az iki yöntem bilinmektedir (32).

### 6.1. Elektron Mikroskop ile ER Lümen Genişlemesinin Ölçülmesi

ER stresine maruz kalmış doku ve hücrelerdeki ER'nin lumenindeki önemli derecedeki genişleme elektron mikroskop aracılığıyla belirlenebilir. Bu metot pankreatik  $\beta$  hücrelerindeki ER stresi belirlemek için sık sık kullanılır (32).

### 6.2. ER Stres Sırasında Gerçek Zamanlı Redoks Ölçümleri

ER yeni sentezlenen proteindeki disulfid bağının oluşumunu teşvik etmek için oksitleyici çevreyi korumaktadır (33). ER stresini indükleyen ER protein yükündeki bir artış, disulfid oluşumunu önleyen katlama enzimlerinin



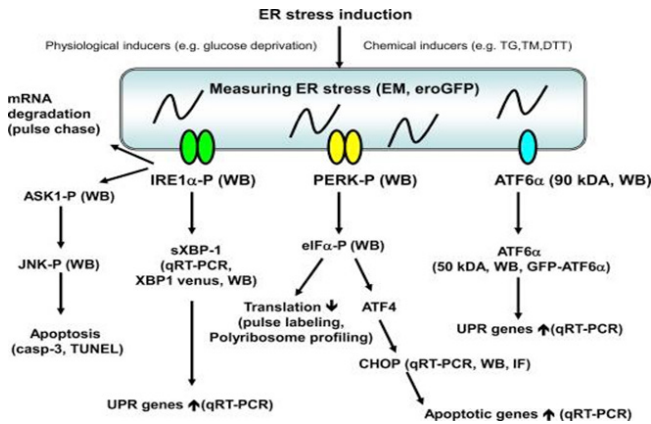
oksidasyonları ile bastırılabilir. Gren fluorescent proteins (GFP)'nin redoks durumunun gözlenmesiyle geliştirilen bir metot ile ER stres gösterilmiştir (34). Sistein çiftleri arasında disülfid oluşumu sırasında flüoresansın maksimum 400 ve 490 nm de değiştirmek üzere oksidatif protein katlanmasını ölçümü (eroGFP) adlı haberci tasarlanmıştır. Hücrelerdeki ER redoks durumu 400 nm flüoresans oranına karşı 490 nm'de ölçüldüğü bildirilmiştir (32).

## 7. UPR Ana Düzenleyicilerinin Aktivasyonunun İncelenmesi

ER stresi, endojen UPR'nin çeşitli bileşenlerinin aktivasyonunun/upregülasyonunun izlenmesiyle dolaylı olarak ölçülebilir. Tipik olarak bu, sırasıyla UPR mRNA ve protein seviyelerindeki değişiklikleri tespit etmek için qRT-PCR veya immünoiblottama tekniklerinin kullanılmasını içerir (35). IRE-1 $\alpha$  ve PERK fosforilasyonlarının ölçülmesi ve ATF6- $\alpha$  ayrılması, UPR aktivasyon seviyesini belirlemek için ideal olan parametrelerdir. Fakat bu moleküllerin endojen ekspresyon seviyeleri düşüktür ve mevcut ticari antikor ile tespit etmek zordur. Bu yüzden alternatif olarak UPR aktivasyonunu belirlemek için bu ana düzenleyiciler tarafından düzenlenen aşağıdaki bileşenlerin ekspresyonları ve aktivasyon seviyelerinin ölçülmesi önerilmektedir (Şekil 1) (32).

### 7.1. IRE-1 $\alpha$ Aktivasyonunun Ölçülmesi İçin Metotlar

IRE-1 $\alpha$  ER stresi sonrası otofosforilasyona maruz kalan serin/treonin kinaz ER transmembranıdır. Bu yüzden IRE-1 $\alpha$ 'nın aktivasyon seviyesini ölçmek için en iyi yol onun fosforilasyon seviyesini ölçmektir. Osowski ve ark, tarafından nonfosforile analog sütün peptidine karşı saflaştırılmış yığın antiserumdan anti-fosfo-IRE-1 $\alpha$  spesifik antikor geliştirilmiştir (32).



Şekil 1: Memeli hücrelerinde UPR'nin İncelenmesi (32).

Aktifleşmiş IRE-1 $\alpha$ , XBP-1 mRNA dan 26 çift baz intronun bir endoribonükleaz ile birleştiği zaman fonksiyoneldir. XBP-1 mRNA birleşmesi UPR transkripsiyon faktörünü aktifleştirir ve transkripsiyon gerçekleşir. XBP-1 birleşmesinin ölçülmesi, IRE-1 $\alpha$  aktivasyonunu belirlemenin indirekt güvenilir bir yöntemdir. Real-time PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) ile birleşmiş ve birleşmemiş XBP-1 transkripsiyonunu belirlemek için spesifik olan primerler dizayn edilmiştir (36). Bu primerler kullanılarak farklı hücrelerde birleşmiş ve birleşmemiş XBP-1'in ekspresyon düzeyleri başarılı bir şekilde değerlendirilebilir (37,38). Birleşmiş ve birleşmemiş XBP-1 mRNA aynı zamanda semi-kantitatif RT-PCR ile ölçülebilir. XBP-1 proteini spesifik anti-XBP-1 antikorunu kullanarak immunobloting aracılığıyla belirlenebilir (32).

### ***7.2. PERK Aktivasyonunun Ölçülmesi İçin Metotlar***

IRE-1 $\alpha$  benzer şekilde, PERK'de ER stresi koşullarında transotofosforilasyona maruz kalmaktadır. PERK'in fosforilasyon seviyesi fosforilasyon spesifik PERK antikorunu aracılığıyla belirlenebilir. Aktifleşen PERK, mRNA translasyonunu azaltmak için eIF2 $\alpha$ 'nin fosforillenmesini sağlar. Anti-fosfo-eIF2 $\alpha$  spesifik antikor kullanarak immunoblot yöntemiyle eIF2 $\alpha$ 'nin fosforilasyon seviyesinin ölçülmesi indirekt bir şekilde PERK aktivasyonunu yansıtmaktadır (32). Salubrinal, defosforillenmiş eIF2 $\alpha$  kompleksinin hücre içi selektif bir inhibitörüdür ve hücreye eIF2 $\alpha$  fosforilasyonunu artırmak için katılır (39).

### ***7.3 ATF6 $\alpha$ Aktivasyonunun Ölçülmesi İçin Metotlar***

Daha önce de belirtildiği gibi, ER strese yanıtta ATF6 $\alpha$  (90 kDa) UPR genlerinin transkripsiyonunu aktive etmek için hücre içinde yer değiştirerek 50 kDa SP1 ve SP2 ürünlerine ayrılır ve golgiye taşınır (40). GFP-ATF6 $\alpha$  füzyon proteinin hücrelere transfekte edilmesiyle, ER stres sırasında ATF6 translokasyonu flüoresan mikroskop ile izlenebilmektedir (41).

## **8. UPR Yanıtının ve Belirteçlerinin İncelenmesi**

### ***8.1. UPR Belirteçleri İçin İmmünohistokimyasal Boyama ve İmmünofloresans***

UPR aktivasyonunu ölçmek için İmmünohistokimyasal (IHC) boyama yapılabilir. ER stresi ile ilişkili hastalardan ya da fare modellerinden alınan dokularda IHC boyamanın yapılması avantajdır. Daha önce ele alınan antikorların

çoğu IHC için kullanılabilir (32). ER strese maruz kalan hücrelerde indikatör olarak CHOP, GRP78 ve PDI antikorları kullanılabilir. PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4 yolu etkisi altında düzenlenen CHOP, ER stresi aracılı apoptozda bir role sahip olduğu gösterilmiştir. Ancak, CHOP ekspresyonunu belirlemek için kullanılan ticari antikorların çoğu onun özgünlüğünün belirlenmesinde başarısızlığına dikkat edilmelidir (42). GRP78 protein katlanmasına yardım eden ER şaperon olmakla birlikte UPR stres sensörünün merkez düzenleyicisidir. ER’de işaretleyici olarak kullanılan GRP78, ER’de yüksek düzeyde eksprese edilmektedir. PDI, ER lumeninde protein katlanmasına katılmaktadır ve ekspresyonu ER stresi aracılığıyla uyarılmaktadır (32).

### **8.2. UPR Transkripsiyonel Aktivasyonunun Değerlendirilmesi**

ER stresi koşulları altında, UPR’nin ana düzenleyicileri ER’de protein katlama kapasitesinin artmasına neden olan araçlarla ve protein katlama ile ilgili genlerin transkripsiyonunu düzenlemek için hücre ile iletişim kurmaktadır. ERAD ve otofaji, ER stres koşullarına bağlı olarak hücrenin hayatta kalma ile ölüm faktörlerini belirleyen ve ER’de iş yükünü azaltan sistemlerdir. UPR genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerini ölçmenin yerine, endojen UPR aktivasyon seviyelerini ortaya çıkaran birkaç sistem bulunmaktadır (32).

### **8.3. UPR Translasyonunun Azalmasının Değerlendirilmesi**

ER’de protein yükünün azaltılması için erken UPR yanıtta translasyon azalması görülmektedir. Hücreler ER strese yanıtta PERK aracılı eIF2 $\alpha$  fosforilasyon sayesinde translasyonu azaltmaktadır. Daha önce belirtildiği gibi, eIF2 $\alpha$  fosforilasyonu western blot ile belirlenebilir. Translasyon azalması poliribozom belirlemenin standart protokolü kullanılarak ve yeni sentezlenen protein metabolik basınç etiketleme yöntemi ile ölçülebilir (43). UPR tarafından ER’de hemostazis sağlanmaya çalışıldığı zaman, protein sentezinin düzeltilmesi için GADD34 eIF2 $\alpha$ ’nin defosforilasyonu için fosfatase 1c proteini ile etkileşimdedir (44). GADD34 ekspresyonu ER stres tarafından uyarılır ve PERK-ATF4 yoluyla aracılığıyla düzenlenir (32).

### **8.4. ERAD ve Protein Stabilitesinin Değerlendirilmesi**

UPR aracılığıyla ERAD genlerinin ekspresyonları düzenlenerek zararlı proteinler ortadan kaldırılmaktadır. ERAD sırasında ER stresi proteinleri sitozol içindeki ER dışında yer değiştiren ER şaperonları tarafından fark edilir. Sonunda bu proteinler ubiquitin eklenerek protein yapısını değiştirilir ve proteozom

tarafından yıkımlanır. ERAD bileşenlerinin transkripsiyon düzenlenmesinde, ATF6, XBP-1 ve ATF4 dâhil olmaktadır. ERAD yolağını çalışmak için ER’de hatalı katlanmaya duyarlı olan TCR $\alpha$ , mutant alpha-1-antitrypsin NHK3 ve DeltaF508 sıklıkla kullanılır (45–47). Bu substratlar hücrelerde ektopik olarak eksprese edilebilir. Eksprese edilebilen substratların stabiliteleri sikloheksamit ya da metabolik basınç takip ölçüm etiketleri ile görüntülenebilir. Hücredeki ERAD aktivasyon seviyesi bu proteinlerin bozulma oranını ifade etmektedir. ERAD substratı ile ilgili ubiquitinasyon proteozom inhibitörü MG132 hücrelere eklenerek çalışılabilir (32).

### **8.5. mRNA Bozulmasının Ölçülmesi**

Hücrelerdeki mRNA’nın bozulması ER stresin hızlandığını göstermektedir. Bu da büyük oranda IRE1 $\alpha$ ’nın aktivitesinin RNaz bağlı olduğunu gösterir (48,49). Çözümlemeyen ER stres koşullarında, IRE1 $\alpha$ ’nın RNaz alanı XBP-1 mRNA zincirlemesine ek olarak kodlanmış ikincil proteinler mRNA’ların bozulmasında rol oynayabilir.  $\beta$  hücre hattında insülin mRNA’sının IRE1’ nin substratı olduğu ve ER stresi koşulları altında hızlı bir şekilde bozulduğu gösterilmiştir (50–52). Bu olgu pankreatik  $\beta$  hücrelerindeki ER stresini belirlemek ve ölçmek için kullanılabilir. İnsülin mRNA bozulma oranı  $\beta$  hücrelerindeki ER stres deneylerinde biomarker olarak kullanılabilir (32).

### **8.6. ER Stres Aracılı Apoptozun Değerlendirilmesi**

UPR, ER’de homeostazisi düzeltmekte başarısız olduğu zamanda UPR aktivasyonu ER stresini azaltmak için apoptoz mekanizmasının uyarılmasına neden olur. ER stres aracılı apoptoz birçok insan kronik hastalıklarına da katılır. Bu yüzden ER stresi aracılı apoptozu belirlemek ER stresi ilişkili bozuklukların patogenezisini anlamamızda yardım sağlayacaktır (32).

IRE1 $\alpha$ -ASK1-JNK sinyal yolu, Bcl-2 protein düzenleyicisi CHOP, glikojen sentetaz kinaz-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) ve ER lokalize olmuş Bax ve Bak apoptotik genleri, ER stresi aracılı apoptozu katkılarını olabilecek UPR bileşenleridirler. Aktifleşen IRE1 $\alpha$ , TRAF2 adaptör proteinine bağlandıktan sonra JNK yolağını aktive eden ASK1 aktive eder (53). JNK yolağının Bcl-2 protein ailesini düzenleyerek ER stresi aracılı hücre ölümünde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (54). IRE1 $\alpha$ , ASK1 ve JNK serine/threonin protein kinazlarıdır ve bunların aktivasyon seviyeleri spesifik antikorlar ile ölçülebilir (32). CHOP katlanmamış protein yanıtının pro-apoptotik transkripsiyon faktörüdür (55). CHOP’un temel ekspresyonu düşük olduğu için, onun upregülasyonu ve aktivasyonu immunoblot

ve real-time PCR ile ölçülebilir. ER stresi aracılı hücre ölümüne maruz kalmış hücreler aynı zamanda CHOP için IHC boyama yapılarak belirlenebilir (32).

Proapoptotik Bcl-2 aile üyeleri Bax ve Bak ER membranı ile ilişkilidir. ER stresi koşullarında, Bax ve Bak bir de apoptotik yolların aktivasyonunu stimule ederek sitozole  $Ca^{+2}$  akışını sağlayan membrandaki porlarda yapısal değişikliklere neden olmaktadır (56). Bax ve Bak double knockout hücreler ER stresi kaynaklı hücre ölümüne karşı dirençlidir. Bax ve Bak ekspresyon seviyeleri immunoblot aracılığıyla belirlenebilir (32,57). Son olarak GSK3 $\beta$  ER stresi aracılı apoptozda önemli rol oynamaktadır. GSK3 $\beta$  bir hayatta kalma substratıdır. ER stres aracılı apoptozda sebep olan GSK3 $\beta$ 'nin defosforilasyonu ER stresi sırasında Akt'nin fosforilasyonunun azalmasına aracılık ettiği gösterilmiştir (58).

ER stresi kaynaklı apoptoz, standart yöntemler ile ölçülebilir. FACS analizinin ardından Annexin-V ile hücreler boyanarak, immunoblot ile kaspaz-3 ayrılması ölçülebilir. Kolorimetrik TUNEL {(TdT)-aracılı nick end-labelling} sistemi DeadEnd kullanılarak TUNEL boyaması yapılabilir. CellTiter-Glo kullanılarak hücre canlılığı ölçülebilir. Sonuç olarak; hücrede ER stresi ve bağlantılı olarak bu stresi azaltmak için yine hücrede gerçekleşen katlanmamış protein yanıtı artan bir dikkatle son zamanlarda araştırılmaya devam edilmektedir. Özellikle kronik hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser konularında dikkatleri üzerine toplamaktadır (32).

## 9. Sonuç

Son kanıtlar, ER stresi aracılı hücre işlev bozukluğu ve ölümünün, kronik bozukluklarının patogenezinde rol oynadığını göstermektedir. Bu nedenle ER stres yolları ve seviyeleri, ayrıca UPR aktivasyonunu değerlendirilmesi ve ölçme yöntemlerinin bilinmesi patogeneze bakış açımızı değiştirecektir. ER stresi ve UPR'yi incelemek, patofizyolojiyi anlamamıza ve ER stresiyle ilişkili bozukluklar için yeni terapötik yöntemler geliştirmemize yardımcı olacaktır.

## Kaynakça

1. Almanza A, Carlesso A, Chintha C, et al. Endoplasmic reticulum stress signalling – from basic mechanisms to clinical applications. *FEBS J.* 2019;286(2):241-278. doi:10.1111/febs.14608
2. Corazzari M, Gagliardi M, Fimia GM, Piacentini M. Endoplasmic Reticulum Stress, Unfolded Protein Response, and Cancer Cell Fate. *Front Oncol.* 2017;7. doi:10.3389/fonc.2017.00078

3. Kincaid MM, Cooper AA. ERADicate ER Stress or Die Trying. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9(12):2373-2387. doi:10.1089/ars.2007.1817
4. Lu G, Wang Y, Shi Y, et al. Autophagy in health and disease: From molecular mechanisms to therapeutic target. *MedComm (Beijing)*. 2022;3(3). doi:10.1002/mco.2.150
5. Engin F, Hotamisligil GS. Restoring endoplasmic reticulum function by chemical chaperones: an emerging therapeutic approach for metabolic diseases. *Diabetes Obes Metab*. 2010;12(s2):108-115. doi:10.1111/j.1463-1326.2010.01282.x
6. Määttänen P, Gehring K, Bergeron JJM, Thomas DY. Protein quality control in the ER: The recognition of misfolded proteins. *Semin Cell Dev Biol*. 2010;21(5):500-511. doi:10.1016/j.semcdb.2010.03.006
7. Lee AS. GRP78 Induction in Cancer: Therapeutic and Prognostic Implications. *Cancer Res*. 2007;67(8):3496-3499. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0325
8. Read A, Schröder M. The Unfolded Protein Response: An Overview. *Biology (Basel)*. 2021;10(5):384. doi:10.3390/biology10050384
9. Turishcheva E, Vildanova M, Onishchenko G, Smirnova E. The Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Differentiation of Cells of Mesenchymal Origin. *Biochemistry (Moscow)*. 2022;87(9):916-931. doi:10.1134/S000629792209005X
10. Sano R, Reed JC. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2013;1833(12):3460-3470. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.06.028
11. Merighi A, Lossi L. Endoplasmic Reticulum Stress Signaling and Neuronal Cell Death. *Int J Mol Sci*. 2022;23(23):15186. doi:10.3390/ijms232315186
12. Xu C, Baily-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(10):2656-2664. doi:10.1172/JCI26373
13. Zhang K, Kaufman RJ. Signaling the Unfolded Protein Response from the Endoplasmic Reticulum. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(25):25935-25938. doi:10.1074/jbc.R400008200
14. Schröder M, Kaufman RJ. THE MAMMALIAN UNFOLDED PROTEIN RESPONSE. *Annu Rev Biochem*. 2005;74(1):739-789. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.074134



15. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(7):519-529. doi:10.1038/nrm2199

16. Adams CJ, Kopp MC, Larburu N, Nowak PR, Ali MMU. Structure and Molecular Mechanism of ER Stress Signaling by the Unfolded Protein Response Signal Activator IRE1. *Front Mol Biosci.* 2019;6. doi:10.3389/fmolb.2019.00011

17. Rasheva VI, Domingos PM. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis.* 2009;14(8):996-1007. doi:10.1007/s10495-009-0341-y

18. Lai E, Teodoro T, Volchuk A. Endoplasmic Reticulum Stress: Signaling the Unfolded Protein Response. *Physiology.* 2007;22(3):193-201. doi:10.1152/physiol.00050.2006

19. Chakrabarti A, Chen AW, Varner JD. A review of the mammalian unfolded protein response. *Biotechnol Bioeng.* 2011;108(12):2777-2793. doi:10.1002/bit.23282

20. Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature.* 2008;454(7203):455-462. doi:10.1038/nature07203

21. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.* 2006;7(9):880-885. doi:10.1038/sj.embor.7400779

22. Hussain SG, Ramaiah KV. Endoplasmic reticulum: Stress, signalling and apoptosis. *Curr Sci.* 2007;93(12):1684-1696. doi:10.1039/c3an01406a

23. Martino MB, Jones L, Brighton B, et al. The ER stress transducer IRE1 $\beta$  is required for airway epithelial mucin production. *Mucosal Immunol.* 2013;6(3):639-654. doi:10.1038/mi.2012.105

24. Martins AS, Alves I, Helguero L, Domingues MR, Neves BM. The Unfolded Protein Response in Homeostasis and Modulation of Mammalian Immune Cells. *Int Rev Immunol.* 2016;35(6):457-476. doi:10.3109/08830185.2015.1110151

25. Wang XZ, Harding HP, Zhang Y, Jolicoeur EM, Kuroda M, Ron D. Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J.* 1998;17(19):5708-5717. doi:10.1093/emboj/17.19.5708

26. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol.* 2000;2(6):326-332. doi:10.1038/35014014

27. Werner ED, Brodsky JL, McCracken AA. Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation: An unconventional route to a familiar fate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(24):13797-13801. doi:10.1073/pnas.93.24.13797

28. Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P. Functional and Genomic Analyses Reveal an Essential Coordination between the Unfolded Protein Response and ER-Associated Degradation. *Cell*. 2000;101(3):249-258. doi:10.1016/S0092-8674(00)80835-1

29. Szegezdi E, Fitzgerald U, Samali A. Caspase-12 and ER-Stress-Mediated Apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;1010(1):186-194. doi:10.1196/annals.1299.032

30. Zhang Q, Liu J, Chen S, et al. Caspase-12 is involved in stretch-induced apoptosis mediated endoplasmic reticulum stress. *Apoptosis*. 2016;21(4):432-442. doi:10.1007/s10495-016-1217-6

31. Qu LZ, Liu Z, Zhang HM, Su Y, Ye X, Yang D. Endoplasmic reticulum stress induced cell survival and apoptosis. *Journal of Chinese Clinical Medicine*. 2009;4(8):452-459.

32. Osowski CM, Urano F. Measuring ER Stress and the Unfolded Protein Response Using Mammalian Tissue Culture System. In: ; 2011:71-92. doi:10.1016/B978-0-12-385114-7.00004-0

33. Tu BP, Weissman JS. Oxidative protein folding in eukaryotes. *J Cell Biol*. 2004;164(3):341-346. doi:10.1083/jcb.200311055

34. Merksamer PI, Trusina A, Papa FR. Real-Time Redox Measurements during Endoplasmic Reticulum Stress Reveal Interlinked Protein Folding Functions. *Cell*. 2008;135(5):933-947. doi:10.1016/j.cell.2008.10.011

35. Beriault DR, Werstuck GH. Detection and quantification of endoplasmic reticulum stress in living cells using the fluorescent compound, Thioflavin T. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2013;1833(10):2293-2301. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.05.020

36. Allen JR, Nguyen LX, Sargent KEG, Lipson KL, Hackett A, Urano F. High ER stress in  $\beta$ -cells stimulates intracellular degradation of misfolded insulin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;324(1):166-170. doi:10.1016/j.bbrc.2004.09.035

37. Ishigaki S, Fonseca SG, Osowski CM, et al. AATF mediates an antiapoptotic effect of the unfolded protein response through transcriptional regulation of AKT1. *Cell Death Differ*. 2010;17(5):774-786. doi:10.1038/cdd.2009.175

38. Fonseca SG, Ishigaki S, Osowski CM, et al. Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells. *Journal of Clinical Investigation*. 2010;120(3):744-755. doi:10.1172/JCI39678

39. Boyce M, Bryant KF, Jousse C, et al. A Selective Inhibitor of eIF2 $\alpha$  Dephosphorylation Protects Cells from ER Stress. *Science (1979)*. 2005;307(5711):935-939. doi:10.1126/science.1101902

40. Yoshida H, Okada T, Haze K, et al. ATF6 Activated by Proteolysis Binds in the Presence of NF-Y (CBF) Directly to the *cis* -Acting Element Responsible for the Mammalian Unfolded Protein Response. *Mol Cell Biol*. 2000;20(18):6755-6767. doi:10.1128/MCB.20.18.6755-6767.2000

41. Nadanaka S, Yoshida H, Kano F, Murata M, Mori K. Activation of Mammalian Unfolded Protein Response Is Compatible with the Quality Control System Operating in the Endoplasmic Reticulum. *Mol Biol Cell*. 2004;15(6):2537-2548. doi:10.1091/mbc.e03-09-0693

42. Haataja L, Gurlo T, Huang C jiang, Butler PC. Many Commercially Available Antibodies for Detection of CHOP Expression as a Marker of Endoplasmic Reticulum Stress Fail Specificity Evaluation. *Cell Biochem Biophys*. 2008;51(2-3):105-107. doi:10.1007/s12013-008-9019-2

43. Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*. 1999;397(6716):271-274. doi:10.1038/16729

44. Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron D. Feedback Inhibition of the Unfolded Protein Response by *GADD34* -Mediated Dephosphorylation of eIF2 $\alpha$ . *J Cell Biol*. 2001;153(5):1011-1022. doi:10.1083/jcb.153.5.1011

45. Yu H, Kopito RR. The Role of Multiubiquitination in Dislocation and Degradation of the  $\alpha$  Subunit of the T Cell Antigen Receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(52):36852-36858. doi:10.1074/jbc.274.52.36852

46. Hosokawa N, Wada I, Hasegawa K, et al. A novel ER  $\alpha$ -mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation. *EMBO Rep*. 2001;2(5):415-422. doi:10.1093/embo-reports/kve084

47. Hosokawa N, Tremblay LO, You Z, Herscovics A, Wada I, Nagata K. Enhancement of Endoplasmic Reticulum (ER) Degradation of Misfolded Null Hong Kong  $\alpha$ 1-Antitrypsin by Human ER Mannosidase I. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(28):26287-26294. doi:10.1074/jbc.M303395200

48. Hollien J, Weissman JS. Decay of Endoplasmic Reticulum-Localized mRNAs During the Unfolded Protein Response. *Science (1979)*. 2006;313(5783):104-107. doi:10.1126/science.1129631

49. Hollien J, Lin JH, Li H, Stevens N, Walter P, Weissman JS. Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *Journal of Cell Biology*. 2009;186(3):323-331. doi:10.1083/jcb.200903014
50. Pirot P, Naamane N, Libert F, et al. Global profiling of genes modified by endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta cells reveals the early degradation of insulin mRNAs. *Diabetologia*. 2007;50(5):1006-1014. doi:10.1007/s00125-007-0609-0
51. Lipson KL, Ghosh R, Urano F. The Role of IRE1 $\alpha$  in the Degradation of Insulin mRNA in Pancreatic  $\beta$ -Cells. *PLoS One*. 2008;3(2):e1648. doi:10.1371/journal.pone.0001648
52. Han D, Lerner AG, Vande Walle L, et al. IRE1 $\alpha$  Kinase Activation Modes Control Alternate Endoribonuclease Outputs to Determine Divergent Cell Fates. *Cell*. 2009;138(3):562-575. doi:10.1016/j.cell.2009.07.017
53. Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, et al. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev*. 2002;16(11):1345-1355. doi:10.1101/gad.992302
54. Urano F, Wang X, Bertolotti A, et al. Coupling of Stress in the ER to Activation of JNK Protein Kinases by Transmembrane Protein Kinase IRE1. *Science (1979)*. 2000;287(5453):664-666. doi:10.1126/science.287.5453.664
55. Zinszner H, Kuroda M, Wang X, et al. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes & development*. 1998;12(7):982-995.
56. Zong WX, Li C, Hatzivassiliou G, et al. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J Cell Biol*. 2003;162(1):59-69. doi:10.1083/jcb.200302084
57. Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev*. 2001;15(12):1481-1486. doi:10.1101/gad.897601
58. Srinivasan S, Ohsugi M, Liu Z, Fatrai S, Bernal-Mizrachi E, Permutt MA. Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis Is Partly Mediated by Reduced Insulin Signaling Through Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and Increased Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  in Mouse Insulinoma Cells. *Diabetes*. 2005;54(4):968-975. doi:10.2337/diabetes.54.4.968



## BÖLÜM II

# GASTROİNTESTİNAL SİSTEM

### *Gastrointestinal System*

**Gizem YAMAN<sup>1</sup>, Burak Veli ÜLGER<sup>2</sup>& Eda YILDIZHAN<sup>3</sup>**

*<sup>1</sup>(Dr.), Bitlis Tatvan Devlet Hastanesi,  
e-mail: gizemyaman91@gmail.com  
ORICD: 0000-0003-2406-5864*

*<sup>2</sup>(Prof. Dr.), Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
e-mail: bvulger@gmail.com  
ORICD: 0000-0001-9843-6301*

*<sup>3</sup>(Dr.), Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
e-mail: blgc\_eda@hotmail.com  
ORICD: 0000-0002-5648-6498*

### 1. Giriş

**G**astrointestinal sistem (GİS) ortalama 9 metre uzunluğunda bir kanal sistemidir. Sindirim sistemi başlıca üç ana bölümden oluşmaktadır. Bunlar;

- Ağız Boşluğu (Oral kavite)
- Sindirim kanalı ve
- Büyük sindirim bezleridir.

Sindirim sisteminin başlıca görevleri arasında; su ve yiyeceklerin sindirim kanalı boyunca taşınması, elektrolitler ve sindirim enzimlerinin sentezlenmesi sindirilmiş ürünlerin emilimi ve sindirilmeyen kalıntıların atılımı yer almaktadır.

Gastrointestinal sistemi oluşturan organları tek tek ele aldığımızda;

1. Ağız
2. Özefagus



3. Mide
4. İnce bağırsak
5. Kalın bağırsak
6. Rektum ve
7. Anüstr (1-6).

## 2. Ağız Boşluğu

Sindirim sisteminin girişinde yer alıp, dudak ve yanaklardan orofarinksin girişine kadar uzanır (7). Histolojik açıdan dişlerin dış tarafı ile dudak ve yanaklar arasında kalan kısım olan Vestibul ile dişlerin arka tarafında kalan gerçek oral kavite olmak üzere ikiye ayrılır.

Ağız boşluğunu oluşturan organlar arasında;

- Dil
- Dişler
- Tükürük bezleri
- Damak
- Tonsillalar ve
- Küçük dil bulunmaktadır (8).

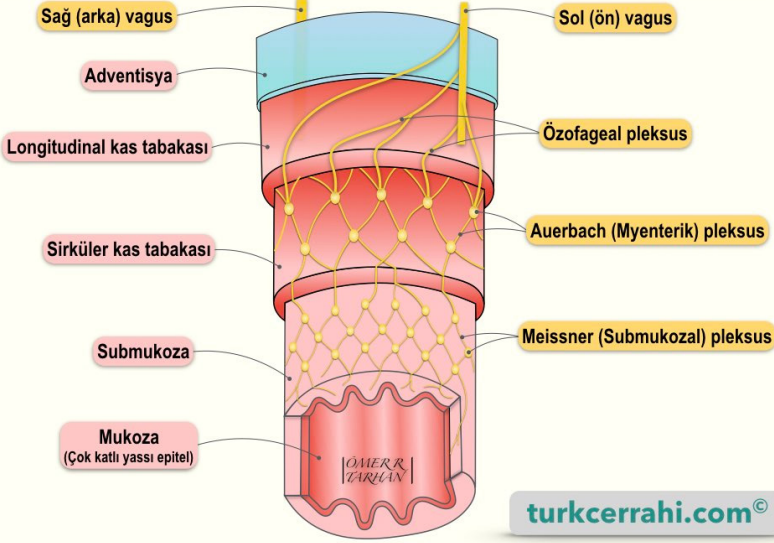
## 3. Özefagus

Özefagus, farenksi mideye bağlayan yaklaşık 25 cm uzunluğunda, kas tabakasından oluşan bir organdır (9). Özefagus anatomik olarak vertebra korpuslarının önünde, trakea ve kalbin arkasına konumlanmıştır (10).

**Histolojik yapısına** baktığımızda içten dışa doğru;

- Tunika mukoza: farinks ile devam eder. Non keratinize skuamöz epitel yapısındadır (9,10).
- Tunika submukoza: en kalın ve en sağlam tabakadır. Büyük kan damarları, Meissner sinir pleksusu ve özefagus bezlerinden oluşur.
- Tunika muskularis mukoza: uzunlamasına uzanan kas liflerinden oluşur. Üst kısmının ¼ü çizgili kaslardan oluşurken, geri kalan kısmı çizgili ve düz kaslardan oluşur.
- Son tabaka ise Tunika adventisya tabakasıdır. Bu tabaka ise en dıştaki tabaka olup, lifler ve bağ dokusundan oluşur (10) (Resim 1).

## Özofagusun Tabakaları ve İnnervasyonu



Resim 1. Özefagusun Tabakaları

### 4. Mide

Anatomik olarak özefagus distali ile duodenum proksimali arasında konumlanan, Kardiya, fundus, korpus, antrum ve pilordan oluşan bir organdır (11). Mide superiorda diyafram, sol lateralde dalak, sağ lateralde ise karaciğer ile komşuluk yapmaktadır.

**Histolojik yapısına** baktığımızda üç ana bölgeden oluşmaktadır.

Kardiya bölgesi (kardiya), özofagusun hemen bitiminde yer alan ve kardiya bezlerinden oluşan kısım,

Pilor bölgesi, pilor bezlerinden oluşan kısım ve

Fundus bölgesi, kardiya ve pilor arasında kalan ve fundus bezlerini içeren en büyük kısımdır (6) (Resim 2)

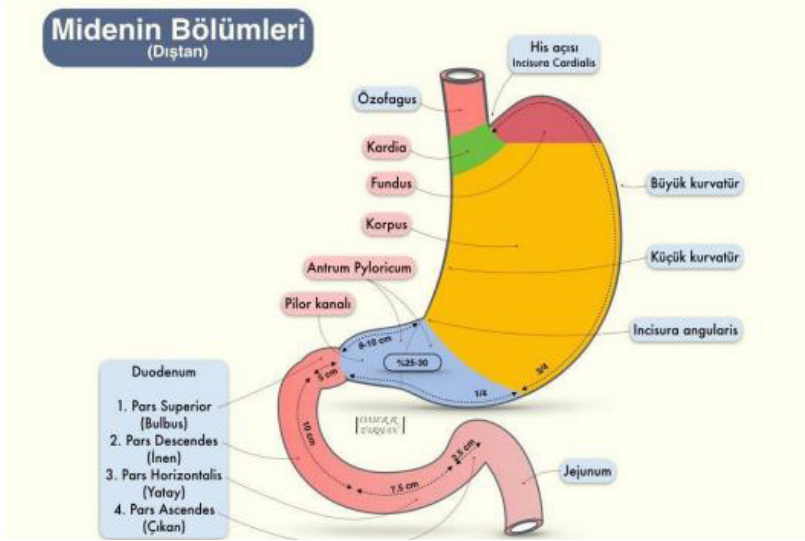
**Histolojik olarak** içten dışa doğru tabakalarına bakıldığında;

Tunika mukoza; Epiteli tek katlı basit prizmatik örtü epitelinden oluşurken, L. propria gevşek bağ dokusu yapısındadır ve mide bezlerini içerir. Muskularis Mukoza tabakası ise İçte sirküler, dışta longitudinal düz kaslardan oluşur.

T. submukoza; Kan ve lenf damarları içeren sıkı bağ dokusundan oluşmaktadır.

T. muskularis; İç tabaka oblik orta tabaka sirküler dış tabaka longitudinal düz kaslardan oluşur.

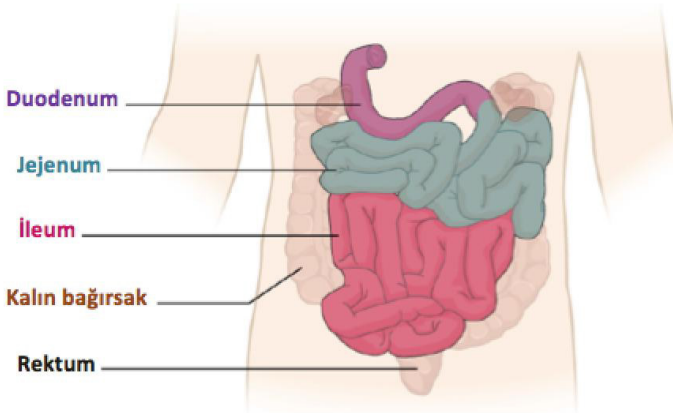
T. seroza tabaka ise; Mezotel ve gevşek bağ dokusundan oluşmaktadır. Midenin iç yapısını ise ruga adı verilen, longitudinal uzantılı katlantılar oluşturmaktadır (6).



Resim 2. Midenin Bölümleri (12)

## 5. İnce Bağırsak

Midenin pilor bölgesinden başlayarak, valvula ile ocaecaliste sonlanan, ortalama 6-7m uzunluğunda olan bir organdır (12-15). Üç kısımdan oluşmaktadır. Bunlar; duodenum, jejunum ve ileumdur (14,15) (Resim 3).



Resim 3. Bağırsağın bölümleri (5)

### 5.1. Duedonum

İnce bağırsağın ilk kısmı olup ayrıca en kısa parçasıdır. Yaklaşık 23-25 cm uzunluğundadır (13,14). Duodenumun bir kısmı retroperitoneal olup periton ile kaplı değilken, bulböz kısım ise periton ile kaplıdır (11,15).

#### Histolojik olarak;

**Tunika mukoza:** en kalın tabaka olup, kan damarlarından oldukça zengindir. Epiteli tek katlı silindirik epitel'den oluşmaktadır. Epitel hücrelerinin arasında ise Goblet hücreleri yer almaktadır (15-17).

**Tunika submukoza;** Brunner bezlerinin yer aldığı tabakadır. Bu bezler sadece duodenum'a özgü olduğundan diğer organlardan belirgin şekilde ayrılmaktadır (18,19). Brunner bezlerinin haricinde kan damarları, lifler (elastik lif) ve yağ hücrelerini de içermektedir (20).

**Tunika Muskularis:** İçte sirküler seyirli, dışta longitudinal uzanan düz kas tabakasından oluşmaktadır. Bu iki tabaka arasında Auerbach myenterik pleksusu yer almaktadır.

**Tunika Seroza (Adventisya):** En dış tabaka olan bu tabaka ince ve gevşek bağ dokusu yapısından oluşmaktadır. Gastrointestinal sistemin birçok bölgesinde bu tabaka periton ile kaplıdır. Bu tabakada lenfatikler, kan damarları ve sinirler yer almaktadır (20).

### 5.2. Jenenum ve İleum

Jejenum ve ileum arasında kesin bir sınır bulunmazken, yaklaşık 2/5'i jejunum, geri kalan 3/5'i ise ileumdan oluşmaktadır. Jejunum fleksura duodeno jejunalis'ten (Treitz ligamenti) başlar. İleum ise ileoçekal bileşkede sonlanmaktadır. Jejunum, ileum ve her ikisinin mezenteri visseral periton ile örtülüdür. Jejunum ve ileum'un mezenteri treitz ligamentinden başlayarak ileoçekal birleşke bölgesine uzanır ve yaklaşık 15 cm boyutundadır. Periton içerisinde arterler, venler, lenfatikler ve ganglionlar, sinirler ve yağ dokusu bulunmaktadır. Anatomik olarak bariyer görevi gören ileoçekal valv ile ileum ve çekum birbirinden ayrılmaktadır (20).

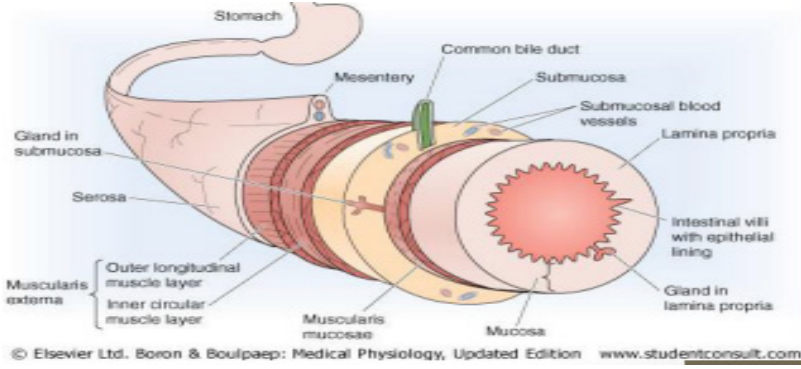
#### Histolojik olarak; dudonum tabakalarından farklı

➤ Tunika mukoza tabakasından Epitel ile lamina propria arasında villuslar yer almaktadır.

➤ Tunika submukoza,

➤ Tunika muskularis,

➤ Tunika seroza (adventisya) tabakalarından oluşmaktadır (17).



Şekil 2. İnce barsağın duvarı yapısı

## 6. Kalın Bağırsak

Kalın bağırsak anatomik olarak şu kısımlardan oluşmaktadır. Bunlar;

- **Çekum + Apendiks; çok sayıda lenf nodülleri içerir. Epiteli tek katlı prizmatik örtü epiteliyle döşelidir. Lümen oldukça dardır.**
- Kolon (Çıkan, Yatay, İnen); dış longitudinal tabakasında bant şeklinde kalınlaşmalar yani tenya coli izlenir.
- Sigmoid kolon
- Rektum; sigmoid kolon ile benzer yapıdan oluşmaktadır. Kalıcı katlantılar alt rektum ile anal kanalda görülmektedir.
- Anal kanal; epiteli çok katlı yassı epitelden oluşmaktadır.

Kalın bağırsağın spesifik özelliği Lieberkühn kriptaları adı verilen yoğun şekilde bulunan bağırsak bezlerinin bulunmasıdır. Ayrıca villus ve plika sirkularisler bulunmaz.

## 7. Sonuç

Kısacası; sindirim sistemi vücudtaki sistemler arasında oldukça büyük bir sistem olup birçok sayıda organları içermektedir. Bu sebepten kanser türlerinden (özofagus, pankreas, mide, kolon, rektum, anüs, safra yolları (bilier sistem) ve ince bağırsak kanserleri) tutunda dispeptik rahatsızlıklara kadar birçok hastalığa oldukça açık ve yatkındır. Bu hastalıkların da cerrahi tedaviler, medikal tedaviler ve organ nakli gibi birçok tedavi yöntemi günümüzde uygulanmaktadır. Bu sebepten toplumun sindirim sisteminden kaynaklanan rahatsızlıklarını ihmal etmemeleri, belirli aralıklarla tarama amaçlı doktor kontrollerini ve tetkiklerini yaptırılmaları oldukça önemlidir.

## Kaynaklar

1. Akyüz N, Çavdar İ. Sindirim Sisteminin (Gastrointestinal Sistem-GİS) Cerrahi Hastalıkları ve Bakımı. Akyolcu N, Kanan N, Aksoy G (Editörler). Cerrahi Hemşireliği II: Nobel Tıp Kitabevleri, 2017;155-244.
2. Pakyüz SÇ. Sindirim Sisteminin Değerlendirilmesi. Karakovan A, Eti Aslan F (Editörler). Dahili ve Cerrahi Hastalıklarda Bakım Cilt 1. 4. Baskı: Akademisyen Kitabevi, 2017;625-35.
3. Dikmen BT. Gastrointestinal Sistemin Yapı ve Fonksiyonu. Yıldız Fındık Ü, Ünver S, Eyi S (Editörler). Gastrointestinal Sistemin Cerrahi Hastalıkları ve Hemşirelik Bakımı: Nobel Tıp Kitabevleri, 2019; 3-12.
4. Kasımay Ö, Yeğen BÇ. Gastrointestinal Sistem Fizyolojisi. Sayek İ (Editör). Temel Cerrahi. 4.Baskı. Cilt1: Güneş Tıp Kitabevleri, 2012; 94- 1180.
5. Betts JG, Desaix P, Johnson E, Johnson JE, Korol O, Kruse D, Young KA. Open Stax College & Rice University. Anatomy & Physiology, 2013.
6. Pawlina W, Ross MH. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. Baykal B (Çeviri Editörü). 6. Baskıdan Çeviri, Ankara: Palme, 2014: 573-586.
7. Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ. Oral Anatomy, Histology and Embryology (Fifth edit). PA: Elsevier, 2018
8. Ross MH, Pawlina W. Histology a text and atlas ( Seventh edit). PA: Wolters Kluwer Health, 2016
9. Gray H. Chapter 35: Mediastinum. Standring S, ed. Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice. 40 th ed. New York, NY: Churchill Livingstone Elsevier, 2008;939-57.
10. Beasley P. Anatomy of the pharynx and esophagus. Kerr AG, Gleeson M, eds. Scott- Brown's Otolaryngology. 6th ed. Oxford, UK: Butterworth-Heinemann, 1997
11. Arıncı K, Elhan A. Anatomi. 1.Cilt, Ankara, Güneş Kitap evi. 2006; 25-37
12. Moore KL, Persaud TVN. İnsan embriyolojisi (Türkçe çeviri, Arcalı S.). Altıncı baskı, İzmir, Güven Kitabevi, 2002; 252-84.
13. Hatiboğlu MT. Anatomi ve fizyoloji. On dördüncü baskı. Ankara, Hatiboğlu Yayınları, 2003; 196-213.
14. Doğan S. İnce bağırsakta yaşa bağlı değişiklikler. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi. 2008.
15. Gökmen FG. Sistemik anatomi. Dördüncü baskı. İzmir, İzmir Güven Kitabevi, 2003; 56-64

16. Erdoğan D, Hatiboğlu MT, Görgün M, Ilgaz C. Özel Histoloji. Ankara. Hatiboğlu Yayınları. 1996

17. Gartner LP, Hiatt LJ. Color textbook of histology. Second edition. . Chicago, WB Saunder Comp, 2001; 114- 27.

18.Cui D, Daley WP, Fratkin JD, Haines DE, Lynch JC, Naftel JP, Yang G. Atlas of histology: with functional and clinical correlations. Wolters Kluwer/ Lippincott Williams &Wilkins, 2011.

19.Lowe JS, Anderson PG. Stevens and Lowes Human Histology. Philadelphia, Elsevier Health Sciences, 2014;186-224.

20. Ross M, Romrell JR, Kaye GI. Histology; 1995; 16:453-4



## BÖLÜM III

# BÖBREK-GASTROİNTESTİNAL SİSTEM- BEYİN AKSI: KRONİK BÖBREK HASTALIĞI AÇISINDAN DEĞERLENDİRME

### *Kidney-Gastrointestinal System-Brain Axis: Evaluation in Terms of Chronic Kidney Disease*

Zarife Nigâr ÖZDEMİR KUMRAL

(Dr.), Marmara Üniveristesi, Tıp Fakültesi,  
Fizyoloji Anabilim Dalı, zarifeozdemir@gmail.com,  
znozdemir@marmara.edu.tr,  
ORCID: 0000-0002-9485-0174

### 1. Kronik böbrek Hastalığı

**K**ronik böbrek hastalığı (KBH), özellikle çeşitli bilişsel bozuklukların eşlik ettiği yaygın bir halk sağlığı sorunudur. (1) Böbrek hastalığı, doktorlar tarafından böbreklerde çok hafif bir hasar olsa bile herhangi bir anormalliği tanımlamak için kullanılan bir terimdir. ‘Kronik’, tamamen iyileşmeyen ve uzun süre devam eden bir durum anlamına gelmektedir ve kronik ‘şiddetli’ anlamına gelmez. Anahtar noktalara değinecek olursak; KBH’li 10 kişiden 1’i diyaliz veya böbrek nakline ihtiyaç duyar. KBH’li bir kişi, özellikle sigara içiyorsa veya aşırı kiloluysa, kalp krizi veya felç riski daha yüksektir. KBH’li kişilerin böbrek fonksiyonlarını ve kan basıncını düzenli olarak kontrol etmeleri ve kan basınçlarının yükselmesi durumunda tedavi görmeleri gerekir. Özellikle, son dönem böbrek hastalığı (SDBH) olan hastalar yüksek oranda nörobilişsel işlev bozukluğundan muzdariptir. (2) Bu sinirsel komplikasyon hastaların günlük yaşamının yanı sıra klinik tedaviyi de ciddi şekilde etkiler ve bu da olumsuz klinik sonuçlara yol açar. (3) Ancak SDBH hastalarındaki bilişsel bozuklukların nöromekanizması belirsizliğini korumaktadır. Bu nedenle KBH’da potansiyel sinir yollarının anlaşılması ve yeni terapötik hedeflerin bulunması hayati önem taşımaktadır.

### ***1.2. Kronik Böbrek Hastalığı ve mikrobiyota ilişkisi***

Küresel nüfusun yaklaşık %10'unu etkileyen ve 2022 verilerine göre Türkiye'de her 7 kişiden birinin erken evre KBH olduğu bildirilen bu ciddi tablo ciddi bir mali etkiye de sahiptir. Hipertansiyon, KBH için önemli bir risk faktörüdür ve evre 3-5 KBH hastalarının yaklaşık %85-90'ında vardır. (4) Uzun süreli hipertansiyon, yüksek intraglomerüler basınca yol açar ve bu da daha sonra glomerüler filtrasyonu bozar. Bu nedenle kan basıncını düşürmek, KBH ilerlemesini yavaşlatmak için önemli ve yaygın olarak kullanılan bir yaklaşımdır. Erken evre KBH'nin mevcut yönetimi, kan basıncı kontrolü, protein ve tuz alımının azaltılması, akut böbrek hasarının önlenmesi ve glisemik kontrole odaklanmaktadır. (5) KBH'nin önlenmesine yönelik herhangi bir tedavi veya strateji mevcut değildir ve hastalığın erken evrelerinde semptom eksikliği nedeniyle zamanında tedavi son derece zordur. (6) Bağırsak mikrobiyotası dengesinin bozulması olarak tanımlanan disbiyozis ve değişmiş bağırsak patolojisi hipertansiyon ile ilişkili olduğundan hipertansiyon, bağırsak mikrobiyotasının bileşiminde değişiklik gösteren bulgu olan KBH gelişimine katkıda bulunan önemli bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Renin-angiotensin sistemi (RAAS), otonom sinir sistemi (OSS) ve bağışıklık sistemi dahil olmak üzere, hipertansiyona katkıda bulunan birçok faktörün düzensizliği gösterilmiştir. (7) Epigenetik ve genetik bileşenlerle ilişkili çevresel faktörler, hipertansiyonun başlaması, sürdürülmesi ve ilerlemesinde kritik rollere sahiptir. Ek olarak, ortaya çıkan kanıtlar, bağırsak mikrobiyotasının hipertansiyon gelişiminde önemli bir rolü olduğunu da östermektedir. (8) Bağırsak disbiyozu hayvan modellerinde ve hipertansiyonu olan hastalarla yapılan birçok çalışmada bildirilmiştir. Ayrıca, spontan hipertansif sıçanlar (SHR'ler), aynı yaşta normotansif Wistar Kyoto (WKY) kontrolleri ile karşılaştırıldığında, goblet hücrelerinin sayısında ve villus uzunluğunda azalma ve artan fibrozis dahil olmak üzere bağırsakta patofizyolojik değişiklikler göstermiştir. Bu değişiklikler yetişkin SHR'lerinde henüz hipertansiyon geliştirmemiş genç SHR'lerden daha derin olmasına rağmen, prehipertansif/jüvenil SHR'ler, juvenil WKY sıçanlarına kıyasla çoklu sıkı bağlantı proteinlerinin seviyelerinin daha az olduğu, ancak benzer bağırsak geçirgenliğine sahip olduğu gösterilmiştir. (9) Bu bulgular, bağırsak patolojisinin, SHR'lerde kan basıncı yükselmesinin başlangıcından önce meydana geldiğini göstermektedir. Hipertansiyon oluşumunda bağırsak disbiyozunun nedensel rolüne dair daha fazla kanıt fekal mikrobiyota transplantasyonundan (FMT) gelmiştir. (10) Hipertansiyonlu hastalardan germ-free farelere disbiyotik dışkı örneklerinin veya hipertansif felç eğilimli

spontan hipertansif sıçanlardan normotansif Wistar Kyoto sıçanlarına dışkı transferinin alıcılarda kan basıncını arttırdığı gösterilmiştir. (10) Bağırsaktaki patofizyolojik değişiklikler, bağışıklık tepkileri ve FMT'ye verilen otonomik tepkiler değerlendirilmediğinden, kan basıncında FMT'nin neden olduğu bu artışın altında yatan potansiyel mekanizmaları belirlemek için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Hayvan modellerinde ve hipertansiyonlu hastalarda yapılan çalışmalar, yüksek lifli diyet, probiyotikler ve antibiyotikler gibi bağırsak mikrobiyotasını hedef alan müdahalelerin kan basıncını düşürücü etkileri olduğunu bildirmiştir. (11) Son yıllarda yapılan çalışmaların ışığında bağırsak mikrobiyotası böbrek hastalığının başlangıcına aracılık eden önemli faktörlerden biri olarak gösterilmektedir. Sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında, evre 3-4 KBH olan hastaların dışkılarında kültürlenebilir anaerobik bakterilerde azalma gözlenmiştir. (12) Buna karşılık, sağlıklı yetişkinlere kıyasla henüz diyalize girmeyen KBH'li hastaların dışkısında kültürlenebilir aerobik bakterilerde bir artış bildirilmiştir. Çoğu bağırsak bakterisinin kültürü şu anda mümkün olmadığından, bu bulguların PCR veya pyro sekanslama gibi kültüre bağımlı olmayan yöntemlerle doğrulanması yapılmaktadır. 5/6 nefrektomi ile indüklenen KBH sıçanlarda bakteri taksonlarının fazlalığı bakımından seham opere kontrollerden önemli ölçüde farklı olduğu ve kan basıncında, serum üre ve kreatinin seviyelerinde ve idrar protein seviyelerinde artış olduğu gösterilmiştir. (13)

Yaygın olarak hipertansiyon ile ilişkili ve tümü bağırsak disbiyozu ve değişmiş konak-mikrobiyota karşılıklı etkileşimi ile bağlantılı olan bağışıklık düzensizliği, metabolik bozukluk ve sempatik aktivasyon KBH'na işaret etmektedir. Hipertansiyon ve KBH'da beyin, bağırsak, mikrobiyota ve böbrek arasındaki karmaşık etkileşim ve bu hastalıkların patogenezi için beyin-bağırsak-böbrek eksenini hipotezi önem kazanmaktadır. Normal homeostazın korunmasında beyin-bağırsak-böbrek ekseninin rolünün ve bu eksenin KBH ve hipertansiyondaki düzensizliğinin dikkate alınması, yeni terapötik hedeflerin tanımlanmasına yardımcı olacaktır. Ek olarak, mikrobiyal toplulukların ve bunlarla ilişkili metabolitlerin keşfi ve aydınlatılması beyin-bağırsak-böbrek sinyalizasyonunda yenilikçi araştırmalara, klinik deneylere, KBH ve hipertansiyon tedavilerine yol açan temel bilgi boşluklarının doldurulmasına neden olacaktır

Diyalize girmeyen son dönem böbrek hastalıklı 30 hastayı içeren bir çalışmada, hastaların %20'sinin kanında hastaların bağırsaklarında aşırı çoğalma gösteren bakteriyel DNA tespit edilmiştir. Ayrıca, C-reaktif protein ve IL-6

(düşük dereceli inflamasyonun biyobelirteçleri) seviyeleri, bakteri DNA'sı tespit edilmeyenlere göre dolaşımında bakteriyel DNA'sı olan hastalarda önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur. (14) Bu bulgular, sayısı fazlaca artmış bakterilerin bağırsaktan kana yer değiştirdiğini ve burada düşük dereceli inflamasyon düzeylerinin artmasına katkıda bulduklarını ve böylece KBH patolojisini alevlendirdiğini göstermektedir.

### ***1.3. Bağırsak mikrobiyotası***

İnsanda gastrointestinal sistem ağız boşluğundan başlayan, mide, bağırsaklar yoluyla devam eden ve son olarak anüste sona eren ve, 1:1'e yakın oranlarda mikrobiyal ve konakçı hücrelerden oluşan karmaşık bir sistemdir. Bağırsak mikrobiyotası ile konakçı arasındaki etkileşim, çeşitli hastalıklara dahil olması nedeniyle büyük ilgi odağı olmasını sağlamaktadır. (15) Bağırsak epitel; epitel hücreleri goblet hücreleri, bağırsıklık hücreleri, enterokromafin hücreleri, düz kas hücreleri, enterik nöronlar ve Cajal'ın interstisyel hücreleri gibi çeşitli hücre tiplerini içerir. (16, 17) Bağırsak hareketi ve işlevi, sinirsel ve kassal organizasyon arasındaki koordinasyonun sonucudur. Kas organizasyonu, boşluk bağlantılarıyla birbirine bağlanan düz kas hücrelerini ve Cajal'ın interstisyel hücrelerini içermektedir. Bağırsak epiteli, ilk savunma hattını sağlayan üç tip immüno-sensör hücre içerir. (18) Birinci tip immüno-sensör hücreler, patojenin varlığını algılayan ve antimikrobiyal maddeler salgılayan enterositlerdir; böylece doğuştan gelen ve adaptif bağırsıklık sistemini aktive eder. İkinci tip hücre ise antijen sunumuna yardımcı olan M hücreleridir; ancak üçüncü tip hücre, patojeni fagosite eden ve mezenterik lenf düğümlerine hareket eden bağırsak dendritik hücreleridir. Goblet hücreleri, bakterilerden arınmış ancak bütirat gibi metabolitlerini içeren epitelyal hücre tabakasının üzerinde mukus üreten emici enterosit tabakasının arasında yer alır. (19) Epitel bariyerinin uygun şekilde geliştirilmesi ve bakımı çok önemlidir ve dengesizliği arızalara veya çeşitli inflamatuvar hastalıklara neden olabilir. (19)

Artan kanıtlar, bağırsak mikrobiyotasının hipertansiyon ve KBH gelişiminde önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. Bağırsak mikrobiyotası, konakçının beyin, kemik iliği, damar sistemi, böbrek, bağırsıklık sistemi ve otonom sinir sistemi gibi hayati organ sistemleri ile sürekli iletişim halindedir ve bu iletişim, konağın homeostazisine ve sağlığına katkıda bulunur. Kemik iliği kaynaklı bağırsıklık hücreleri, bağırsak mikrobiyotası tarafından aktive edilir ve dolaşım yoluyla beyni, OSS ve böbreği etkileyen düşük dereceli inflamasyona yol açar. Periferik uyaranlar, OSS'ni daha sonra böbrek, bağırsak ve lenfoid

organlara nöral girdileri değiştirmesi için etkiler. Ayrıca bağışıklık ve bağırsak mikrobiyotasından türetilen ürünler böbrek fonksiyonunu etkiler ve KBH üzerinde önemli etkiler oluşturur.

Bağırsak disbiyozisi birçok kronik hastalıkta önemli bir role sahiptir. Disbiyozun iyileştirilmesi, hedefteki hastalıkların önlenmesi ve yönetimi için potansiyel bir strateji olabilir. Bağırsak mikrobiyotasının ve beyin-bağırsak-böbrek eksenindeki nöral, hormonal, kemik iliği ve bağışıklık sistemleri gibi ana bileşenlerle etkileşimlerinin iyi tanımlanması ve kritik noktalarda etkili olabilecek ajanların yollarının aydınlatılması tedavi stratejileri açısından önemlidir.

- Bağırsak mikrobiyotasının KBH ve hipertansiyon da dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda önemli rolleri vardır.
- Bağırsak mikrobiyotası kan basıncı ve böbrek fonksiyonları dahil olmak üzere konakçı homeostazını düzenlemek için endokrin, sinir ve bağışıklık sistemleri ile iletişim kurar.
- Bağırsak-böbrek eksenini, azalan otonom regülasyonla birlikte beyinden gelen sinyalleri, bağırsak ve böbreklerden gelen mikrobikrobiyal metabolitler ve immün bileşikler içerir.
- Bağırsakları hedef alan KBH ve hipertansiyon için potansiyel terapötik stratejiler mikrobiyotayı etkileyecek diyet müdahalelerini, probiyotikleri, prebiyotikleri, sinbiyotikleri, mikrobiyota nakli ve metabolom modülasyonunu içerir.

Enteroendokrin hücreler, gastrointestinal sistemin özelleşmiş endokrin hücreleridir. Uyarı üzerine bu hücreler, dolaşım yoluyla alıcı hücreler üzerindeki hedef reseptörlere taşınan ve bağırsak ve/veya sistemik fizyolojik fonksiyonları düzenleyen hormonlar salgırlar. Fermantasyon tarafından diyet liflerinden üretilen kısa zincirli yağ asitleri (SCFA) de dahil olmak üzere bağırsak mikrobiyal metabolitleri konak endokrin sistemini etkiler. (20)

Örneğin, SCFA propiyonat, glukagon benzeri peptit 1 (GLP1)'in salınımını uyarır ve aynı zamanda kemirgen bağırsak kültürlerinden serbest yağ asidi reseptörü 2'ye (FFAR2) bağımlı bir mekanizma yoluyla bağırsak hormonu peptit YY'nin (PYY) salınımını uyarır. Farelerde yapılan bir başka çalışma, PYY'nin FFAR3'e bağımlı bir şekilde bağırsak mikrobiyotası tarafından indüklendiğini bildirmiştir. Bu bulgular, endokrin hormonların üretiminde bağırsak mikrobiyotasından türetilen SCFA'ların rolü olduğunu göstermektedir. (20)

Otonom (dışsal) ve enterik (içsel) sinir (ESS) sistemleri aracılığıyla sağlanan gastrointestinal system nöral düzenlenmesinde OSS; asitlik, besin seviyeleri, ozmolarite ve ağrı gibi bağırsaktaki fizyolojik koşulları beyne iletir. Bağırsak içinde myenterik plexus ve submukozal plexustan oluşan ESS lokal (yerinde) nöral iletişime katkıda bulunur ve OSS ile bağlantı kurarken merkezi sinir sistemi (MSS) kontrolünden bağımsız olarak bağırsak motor ve duyuşal işlevlerinden sorumlu olarak karşımıza çıkmaktadır. Mikrop içermeyen (germ-free) farelerde, bağırsak mikrobiyotası kolonizasyonunun ESS'nin gelişimi ve olgunlaşması için kritik olduğu gösterilmiştir. Bağırsak mikrobiyotası ve metabolitleri, enterokromaffin hücreleri tarafından üretilen nörotransmitter serotoninin güçlü uyarıcılarıdır. Bu anahtar nörotransmitter, bağırsak salgısına, motiliteye ve lokal sinir reflekslerine aracılık eder. Deneysel bir çalışmada kolitli farelerde probiyotik bakteri olan *Bifidobacterium longum* tarafından fermente edilmiş ortamla gerçekleştirilen tedavinin enfeksiyon ile ilişkili kaygıyı ve ileal myenterik plexus nöronlarının uyarılabilirliğini azalttığı, bunun da probiyotiklerin ESS ve vagal sinir yoluyla MSS ile iletişiminin bir göstergesi olduğu vurgulanmıştır. (21) Bir sıçan obezite modelinde, yüksek enerjili diyetin neden olduğu bağırsak mikrobiyotasındaki değişiklikler, vagal tokluk sinyalini değiştirebilen ve enerji alımını ve yağlanmayı uyarabilen beyin-bağırsak vagal (NTS) iletişimindeki değişikliklerle ilişkilendirilmiştir. Probiyotikler *Lactobacillus rhamnosus* ve *B. longum*) ile tedavinin stres ve anksiyete üzerindeki bir dizi faydalı etkisinin vagus sinirine bağlı olduğu gösterilmiştir. (22)

Bağırsak-böbrek eksenini, metabolizmaya bağımlı yollar ve bağırsaklık yolları olarak üzere ikiye bölünebilir. Metabolizma bağımlı yollar, konakçının fizyolojik fonksiyonlarını düzenleme kabiliyetine sahip olan bağırsak mikrobiyotası tarafından üretilen metabolitlerin aracılık ettiği bir yoldur. Bağırsaklık yolağında ise, bağırsaklık sisteminin bileşenleri (örneğin, lenfositler, monositler ve sitokinler) bağırsak ve böbrek arasındaki iletişimde kritik bir role sahiptir. Metabolizma bağımlı ve bağırsaklık yolu arasındaki karşılıklı etkileşim de bağırsak-böbrek ekseninin dengesinin korunmasında önemli bir role sahiptir.

### **1.3.1. Metabolizmaya bağlı yollar**

Metabolizmaya bağımlı yollarla ilgili olarak, bağırsak mikrobiyotalarının temel düzenleyicisi olarak karşımıza çıkmaktadır. Bağırsak epitel hücreleri için ana enerji kaynağı proteinden ziyade diyetle fermente olabilen liflerdir. Yeterli diyet lifi temini ile proteinden türetilen  $\alpha$ -amino nitrojen neredeyse tamamen

fekal biyokütleyle dahil edilir. Diyet liflerinin veya aşırı protein veya hayvansal yağların eksikliği, bağırsak mikrobiyotası tarafından üremik toksinlere dönüştürülebilir a-amino nitrojenin aşırı birikmesine yol açar. Hemodiyalize giren ve sağlam kolona sahip hastalarda, p-cresil sülfat ve indoksil sülfat düzeylerinin, hasta kolonlu hastalara göre anlamlı olarak daha yüksek olması, kolonik mikroorganizmaların üremik toksinlerin üretimine önemli katkısını vurgulamaktadır. Kolonik geçiş süresi, üremik toksin üretiminin değiştirilebilir bir belirleyicisidir. Uzatılmış bir geçiş süresi, kolondaki karbohidratların mevcudiyetini azaltır, artan protein fermantasyonunu kolaylaştırır ve proteolitik bakteri popülasyonunu genişletir. Bu nedenle, kolonik mikrobiyota, üremik toksinlerin üretimine önemli bir katkı sağlar. KBH'da böbrek filtreleme kapasitesindeki azalma, atık ürünlerin kanda birikmesine neden olur. Bağırsakta ve kanda protein fermantasyon ürünlerinin (örneğin, a-amino nitrojen) birikmesi, bağırsak içi lümen pH'ını artırır, bağırsak homeostazını bozar ve bağırsak bozukluklarını tetikler. Ek olarak, böbrek fonksiyonu azaldıkça, kolon, üre ve ürik asitin birincil atılım yeri olarak böbreğin yerini alır. Kolonik epitel hücrelerinin üreye sürekli maruz kalması canlılıklarını azaltır ve epitel bariyer fonksiyonunu azaltır ve bağlantı proteinlerine etki ederek (örneğin, claudin 1, okludin ve zonula oklüdens) hem in vitro hem de in vivo kolonik sıklığı bozar. Sonuç olarak, sağlıklı bireylere kıyasla KBH'li hastalarda dolaşımdaki endotoksin ve bakteriyel ürün seviyeleri yükselir. Sızdıran bir bağırsakla ilişkili böbrek fonksiyonundaki eksiklikler, kanda metabolik atıkların birikmesini şiddetlendirir ve sonunda üremiye neden olabilir.

### ***1.3.2. Bağışıklı yolağı***

Bağırsak mikrobiyotasını ve böbreği birbirine bağlayan başka bir yola bağışıklık sistemi aracılık eder. (23). Mikropsuz (germ-free) farelerde kommensal mikrobiyota kolonizasyonu, bağışıklık hücrelerinin birincil kaynağı olan kemik iliğinde inflamatuvar sitokin profilinde değişikliklere neden olur. Sitokinlerin hematopoezde önemli etkileri vardır ve farelerde bağırsak mikrobiyotasının antibiyotik aracılı tükenmesi, kemik iliğinde multipotent progenitörlerin baskılanmasına yol açmıştır. Bu nedenle, bağırsak mikrobiyotası sadece bağırsak bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunu değil, aynı zamanda kemik iliğindeki bağışıklık progenitör hücrelerinin profilini de modüle eder. (24)

Kemik iliği, kardiyovasküler sistem, hipertansiyon ve KBH arasındaki ilişki uzun zamandır bilinmektedir. (24) Kemik iliği ablasyonunu takiben, WKY sıçanlarının SHR'lerden kemik iliği ile yeniden oluşturulması, kan basıncında



ve iltihaplanmada bir yükselmeye yol açarken, SHR'lerin WKY kemik iliği ile yeniden yapılandırılması zıt etkiye neden olmuştur. Klinik bir ortamda, kemik iliği nakli alıcılarında böbrek fonksiyon bozukluğu bulunmuştur, bu da böbrek iltihabının başlamasında kemik iliğinin katkıda bulunan bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Proinflamatuvar sitokinlerin seviyeleri, albüminüri ve proteinüri gelişimi ile pozitif korelasyon gösterdiğinden, erken intrarenal inflamasyon, böbrek hastalığının başlangıcında önemli bir patojenik mekanizma olarak öne sürülmüştür. Ek olarak, kemik iliğinden türetilen olgunlaşmamış miyeloid hücrelerinin, KBH'nın başlangıcında ve ilerlemesinde rol oynayan çözünabilir ürokinaz plazminojen aktivatör yüzey reseptörünün dolaşım seviyelerindeki yükselmeden sorumlu olduğu bildirilmiştir. Çalışmalar ayrıca kemik iliğindeki multipotent hücrelerin damar yapıları ve böbrekler de dahil olmak üzere hasarlı dokuları çoğalma, mobilizasyon, farklılaşma ve nihayetinde bu dokulara katılma yoluyla onardığını göstermektedir. Kemik iliğinden çıktıktan sonra, bağırsaktaki olgun bağırsıklık hücreleri, bağırsak ilişkili lenfoid dokular gibi periferik lenfoid organlardaki bağırsak mikrobiyotası tarafından aktive edilir. (25) Artmış bağırsak geçirgenliği, dolaşımda bakteri ve bakteri ürünlerinin birikmesine yol açar ve kronik ve sistemik düşük dereceli inflamasyona önemli ölçüde katkıda bulunur. Düşük dereceli inflamasyon, hipertansiyon ve KBH dahil olmak üzere birçok kronik hastalığın sürdürülmesinde kritik bir role sahiptir.

Bir dizi çalışma, hipertansiyonun oluşumunda makrofajlar, T hücreleri ve B hücrelerinin katkı sağlayan rollerini göstermiştir. Prehepatik portal hipertansiyon modelinde, bağırsak bakterisi olmayan farelerde bağırsak mikrobiyotalı kontrollere göre daha düşük portal basınç tespit edilmiştir ve bu düşük değerler bağırsak lenfatik ve kan damarlarının yoğunluğunun azalmasıyla ilişkilendirilmiştir. (26) Bu veriler, hipertansiyonun immün hücre aracılı oluşumuna bağırsak mikrobiyotasının dahil olduğunu göstermektedir.

Bağırsak mikrobiyotası ayrıca sistemik metabolik sendrom ve CKD'de çok önemli bir role sahiptir. Mikropsuz koşullarda barındırılan adenin kaynaklı böbrek yetmezliği olan farelerin, SPF koşullarında barındırılanlardan daha düşük üremik toksin seviyelerine sahip oldukları gösterilmiştir. Bununla birlikte, SPF fareleri ile karşılaştırıldığında mikropsuz farelerde, SCFA'lar ve amino asitlerin verimsiz kullanımına dayalı renoprotektif maddelerin üretiminin azalması nedeniyle daha ciddi böbrek hasarı gözlenmiştir. Bu bulgular KBH'da dengeli bir bağırsak mikrobiyotasının önemini vurgulamaktadır. (27)

SDBH hastalarında gut-mikrobiyota kaynaklı üremik toksinler üremili hastalarda ve hayvanlarda artan bağırsak geçirgenliği, üremik sıçanlarda bağırsak duvarından bakterilerin artan penetrasyonu ile gastrointestinal sistemde inflamasyonu indükler. (28)

P-cresyl ve indoxyl sülfatların dolaşımında patolojik birikimi kan damarlarında sistemik inflamasyona, endotel disfonksiyonuna, insülin direncine ve hipertansiyon ve KBH'nin ortak özellikleri olan renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminin aktivasyonuna neden olur. Ayrıca, KBH'na bağlı olarak plazmada üremik toksinlerin yüksek konsantrasyonları, bu toksinlerin bağırsak mikrobiyomunun bileşimini etkilediği gastrointestinal kanalda artan konsantrasyonlarına yol açar. (29) Ortaya çıkan disbiyoz ve lokal bağırsak bağışıklık tepkilerinin düzensizliği, böbrek fonksiyon kaybını, metabolik atıkların birikmesini geri-bildirme (feedback, çoğunlukla pozitif) döngüsünde metabolik değişiklikleri terikler.

Beyin-bağırsak-kemik iliği ekseninin kan basıncının yükselmesine katkısı gösterilmiştir. (30, 31) Beyin, sempatik sinir sistemi yoluyla metabolizmaya bağımlı SSS'nin efferent lifleri böbrek damar sistemini ve jukstaglomerüler hücreleri innerve eder ve afferent lifler böbrekten mekanik ve kimyasal bilgileri iletir. 5/6- nefrektomi ile indüklenen KBH'li sıçanlarda otonom beyin merkezlerinde hızlı noradrenalin devri olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda sempatik uyarıyı baskılama ajanı moksonidin, üriner albümin atılımını düşürür ve subtotal nefrektomi uygulanmış sıçanlarda glomerülosklerozu azaltır. Bu veriler, KBH'de beyin ve böbrek arasındaki değişmiş çift yönlü otonomik iletişimi ortaya koymaktadır.

Hipotalamusunparaventrikülerçekirdeği(PVN),NTSverostalventrolateral medulla (RVLM) dahil olmak üzere, sempatik çıkışın düzenlenmesinde çok sayıda merkezi sinir bölgesi yer almaktadır. Bu bölgeler birbirleriyle iletişim kurar ve sempatik çıkışın tonisitesini belirlemek için çeşitli girdileri entegre eder. Hipertansiyonda santral sempatik bölgelerde nöroinflamasyon gözlenir ve santral renin-anjiyotensin sistemi nöroinflamasyona aracılık etmede önemli bir role sahiptir. KBH'de indoksil sülfat, bazı hastalarda gözlenen nörodejenerasyonu kolaylaştırabilen nöroinflamasyonu artırır. 5/6 nefrektomize farelerde, renal denervasyon kan basıncını düşürür ve azalmış sempatik sinir aktivitesi, PVN'ye artan GABA girişi ile ilişkilidir, bu da hipertansiyon ve KBH bağlamında böbrek ve beyin arasındaki karşılıklı iletişimi göstermektedir. (32)

Potansiyel terapötik stratejileri değerlendirecek olursak beyin-bağırsak-böbrek eksenini hipotezine göre beyni, SSS'yi veya bağırsağı hedef alan tedaviler,

hipertansiyon ve/veya KBH olan hastalar için potansiyel olarak faydalı olabilir. Ayrıca, dirençli hipertansiyon ve KBH olan hastalarda sempatik dürtüyü hedef alan renal denervasyonun yararlı etkileri bildirilmiştir. (33) Bağırsak mikrobiyotasının modülasyonu, her ikisi de hipertansiyon ve KHB'na katkıda bulunan sistemik inflamasyonu ve SSS aktivitesini azaltır. Bu nedenle, bu hastalıkların tedavisi için bağırsak mikrobiyotasını modüle etmek için çeşitli yaklaşımlar araştırılmaktadır.

Antibiyotik kullanımı ile bağırsak mikrobiyotasının manipülasyonuna bakıldığında kan basıncını etkilediği ve hipertansiyon kontrolü için yararlı bir müdahale olduğu ortaya konmuştur. (34) Anjiyotensin-II ile indüklenen hipertansiyonu olan sıçanlarda, minosiklin uygulamasının bağırsak mikrobiyotasını değiştirdiği ve kan basıncını düşürdüğü gösterilirken propionat uygulamasının farelerde kan basıncını muhtemelen G protein-bağlı reseptör 41'e (GPR41) ve olfaktör reseptör 78'e bağlanma yoluyla modüle ettiği de rapor edilmiştir. Tedaviye dirençli hipertansiyonu olan bir hasta ile ilgili vaka sunumunda vankomisin, rifampin ve siprofloksasin kombinasyonunun kullanıldığı antibiyotik tedavisinin antihipertansif ilaçların yokluğunda SBP'ni azalttığı gösterilmiştir. Böbrekler metabolitlerin vücuttan uzaklaştırıldığı önemli organlardır ve hasarlanmaları bu metabolitlerin birikimine neden olur. *Escherichia coli* O157:H7 enfeksiyonunda antibiyotik tedavisi hemolitik üremik sendrom riskini artırmaktadır. Farklı bakteri popülasyonlarının artış gösterdiği KBH'da antibiyotik kullanımı sonrası bakteriyofaj tedavisi alternative olarak uygulamaya koyulmaya başlanmıştır. (35)

## 2. Sonuç

Gastrointestinal sistem, insan sağlığı üzerinde önemli etkisi olan, insanlarla ilişkili en büyük mikrobiyal topluluğa ev sahipliği yapmaktadır. Bu mikrobiyotanın bileşimi bireyler arasında veya aynı kişide yaşam boyu farklılık gösterir ve diyet, yaş, yaşam tarzı ve ilaç tedavisi gibi çeşitli faktörlerden etkilenir. Bağırsak ile ilişkili mikrobiyota, diyet ve endojen molekülleri mikrobiyal türevli metabolitlere dönüştürür; bu metabolitler, bunların humoral, endokrin, bağışıklık ve diğerleri gibi çeşitli modlar yoluyla vücuttaki periferik organlar ve dokularla iletişim kurmasını sağlar. Bu nedenle, gastrointestinal kanalın ve ilişkili mikrobiyotanın, yani 'bağırsak-organ ekseninin' daha karmaşık bir rolü, çeşitli organların sağlığının korunmasında önem kazanmaktadır. Mikrobiyota ve konakçı arasındaki etkileşimler de doku homeostazisinin korunması açısından önemlidir, ancak bozulan etkileşimler birçok kronik hastalıkta temel etkendir.

Hastalıkların çoğunda, hayati insan organlarında patofizyolojileri tetikleyen değişen mikrobiyota yapıları rapor edilmiştir. Bu nedenle, bu aşamada, değiştirilmiş mikrobiyotanın bir hastalığa mı katkıda bulunduğu yoksa sadece bir hastalık durumunu mu yansıttığı şeklindeki büyük soruyu çözmek önem kazanmaktadır. Durum ne olursa olsun, bağırsak ve ilgili mikrobiyotanın türetilmiş metabolitlerle aynı anda çeşitli organlarla etkileşime girmesini ve dolayısıyla konakçının sağlığını etkilemesini sağlar. Dahası, GM, diğer insan organları gibi, konakçısıyla aktif olarak iletişim kurar ve biz onların sinyallerini ve insan sağlığı ve ilgili hastalıklarla ilgisini henüz yeni yorumlamaya başladık. Bu nedenle mikrobiyomu hedef alan ve onu bilinçli olarak kontrollü bir şekilde değiştiren bir tedavi geliştirmeliyiz. Şu anda bilgi uygulamanın gerisinde kalıyor; bu nedenle FMT gibi hedefsiz müdahalelerin zayıf ve tutarsız sonuçlarının nedeni bilinmemektedir. Sonuç olarak, etkili mikrobiyom modülasyonu hala erken bir aşamadır. Kültür tekniklerindeki gelişmeler ve epigenetik genomik ve metabolomik gibi yüksek verimli dizileme teknolojileriyle, belirli mikrobiyal türler ve bunların işlevleri, mikrobiyotanın ile çeşitli organlar arasındaki ilişkiyi keşfetmek için tanımlanabilir ve bu da sonuçta altta yatan hastalık mekanizmasını aydınlatır. KBH, kanser ve otoimmün hastalıklar gibi durumların tedavisine yardımcı olabilecek müdahaleler, ancak tür kataloglarının ötesine geçip mikropların birbirleriyle ve konakçılarıyla olan karmaşık ve değişken evrimsel ve ekolojik ilişkilerini anlamaya başladığımızda bilinebilecektir.

## KAYNAKÇA

1. Burns CM, Knopman DS, Tupper DE, Davey CS, Slinin YM, Lakshminarayan K, et al. Prevalence and Risk of Severe Cognitive Impairment in Advanced Chronic Kidney Disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2018;73(3):393-9.
2. Kurella Tamura M, Yaffe K, Hsu CY, Yang J, Sozio S, Fischer M, et al. Cognitive Impairment and Progression of CKD. *Am J Kidney Dis.* 2016;68(1):77-83.
3. Kurella Tamura M, Yaffe K. Dementia and cognitive impairment in ESRD: diagnostic and therapeutic strategies. *Kidney Int.* 2011;79(1):14-22.
4. Rao MV, Qiu Y, Wang C, Bakris G. Hypertension and CKD: Kidney Early Evaluation Program (KEEP) and National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), 1999-2004. *Am J Kidney Dis.* 2008;51(4 Suppl 2):S30-7.
5. Inker LA, Astor BC, Fox CH, Isakova T, Lash JP, Peralta CA, et al. KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline

for the evaluation and management of CKD. *Am J Kidney Dis.* 2014;63(5): 713-35.

6. Andrassy KM. Comments on 'KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease'. *Kidney Int.* 2013;84(3):622-3.

7. Grenham S, Clarke G, Cryan JF, Dinan TG. Brain-gut-microbe communication in health and disease. *Front Physiol.* 2011;2:94.

8. Carabotti M, Scirocco A, Maselli MA, Severi C. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Ann Gastroenterol.* 2015;28(2):203-9.

9. Yao Y, Shen Y. Cross-talk between gut microbiota and liver steatosis: Complications and therapeutic target. *Open Life Sci.* 2023;18(1):20220699.

10. Battson ML, Lee DM, Weir TL, Gentile CL. The gut microbiota as a novel regulator of cardiovascular function and disease. *J Nutr Biochem.* 2018;56:1-15.

11. Settanni CR, Ianiro G, Bibbò S, Cammarota G, Gasbarrini A. Gut microbiota alteration and modulation in psychiatric disorders: Current evidence on fecal microbiota transplantation. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2021;109:110258.

12. Loomba R, Seguritan V, Li W, Long T, Klitgord N, Bhatt A, et al. Gut Microbiome-Based Metagenomic Signature for Non-invasive Detection of Advanced Fibrosis in Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Metab.* 2019;30(3):607.

13. Vaziri ND, Wong J, Pahl M, Piceno YM, Yuan J, DeSantis TZ, et al. Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora. *Kidney Int.* 2013;83(2):308-15.

14. Poesen R, Meijers B, Evenepoel P. The colon: an overlooked site for therapeutics in dialysis patients. *Semin Dial.* 2013;26(3):323-32.

15. Hillman ET, Lu H, Yao T, Nakatsu CH. Microbial Ecology along the Gastrointestinal Tract. *Microbes Environ.* 2017;32(4):300-13.

16. Parikh K, Antanaviciute A, Fawcner-Corbett D, Jagielowicz M, Aulicino A, Lagerholm C, et al. Colonic epithelial cell diversity in health and inflammatory bowel disease. *Nature.* 2019;567(7746):49-55.

17. Rescigno M. The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity. *Trends Immunol.* 2011;32(6):256-64.

18. Sharma R, Young C, Neu J. Molecular modulation of intestinal epithelial barrier: contribution of microbiota. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:305879.

19. Biancheri P, Di Sabatino A, Corazza GR, MacDonald TT. Proteases and the gut barrier. *Cell Tissue Res.* 2013;351(2):269-80.
20. Macfarlane GT, Macfarlane S. Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health. *J AOAC Int.* 2012;95(1):50-60.
21. Villa CR, Ward WE, Comelli EM. Gut microbiota-bone axis. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017;57(8):1664-72.
22. Chen YC, Greenbaum J, Shen H, Deng HW. Association Between Gut Microbiota and Bone Health: Potential Mechanisms and Prospective. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(10):3635-46.
23. McDermott AJ, Huffnagle GB. The microbiome and regulation of mucosal immunity. *Immunology.* 2014;142(1):24-31.
24. Yan J, Herzog JW, Tsang K, Brennan CA, Bower MA, Garrett WS, et al. Gut microbiota induce IGF-1 and promote bone formation and growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(47):E7554-E63.
25. Hahm E, Wei C, Fernandez I, Li J, Tardi NJ, Tracy M, et al. Bone marrow-derived immature myeloid cells are a main source of circulating suPAR contributing to proteinuric kidney disease. *Nat Med.* 2017;23(1):100-6.
26. Gussen H, Hohlstein P, Bartneck M, Warzecha KT, Buendgens L, Luedde T, et al. Neutrophils are a main source of circulating suPAR predicting outcome in critical illness. *J Intensive Care.* 2019;7:26.
27. Hartmann C, Schwietzer YA, Otani T, Furuse M, Ebnet K. Physiological functions of junctional adhesion molecules (JAMs) in tight junctions. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2020;1862(9):183299.
28. Pluznick JL, Protzko RJ, Gevorgyan H, Peterlin Z, Sipos A, Han J, et al. Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(11):4410-5.
29. Vaziri ND, Yuan J, Rahimi A, Ni Z, Said H, Subramanian VS. Disintegration of colonic epithelial tight junction in uremia: a likely cause of CKD-associated inflammation. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27(7):2686-93.
30. Santisteban MM, Ahmari N, Carvajal JM, Zingler MB, Qi Y, Kim S, et al. Involvement of bone marrow cells and neuroinflammation in hypertension. *Circ Res.* 2015;117(2):178-91.
31. Afsar B, Sag AA, Yalcin CE, Kaya E, Siriopol D, Goldsmith D, et al. Brain-kidney cross-talk: Definition and emerging evidence. *Eur J Intern Med.* 2016;36:7-12.

32. Winklewski PJ, Radkowski M, Wszedybyl-Winklewska M, Demkow U. Brain inflammation and hypertension: the chicken or the egg? *J Neuroinflammation*. 2015;12:85.

33. Hering D, Marusic P, Duval J, Sata Y, Head GA, Denton KM, et al. Effect of renal denervation on kidney function in patients with chronic kidney disease. *Int J Cardiol*. 2017;232:93-7.

34. Yang T, Santisteban MM, Rodriguez V, Li E, Ahmari N, Carvajal JM, et al. Gut dysbiosis is linked to hypertension. *Hypertension*. 2015;65(6):1331-40.

35. Yang J, Jose PA, Zeng C. Gastrointestinal-Renal Axis: Role in the Regulation of Blood Pressure. *J Am Heart Assoc*. 2017;6(3).



## BÖLÜM IV

# İNTRAPERİTONAL YOLLA UYGULANAN MELATONİN HAMİLE FARELERDE MİDEYİ KADMIYUM KLORÜR TOKSİSİTESİNDEN KORUR

*Melatonin Administered Intraperitoneally Protects the  
Stomach from Cadmium Chloride Toxicity in Pregnant Mice*

**Erhan ŞENSOY**

(Dr. Öğr. Üyesi), [erhansensoy@kmu.edu.tr](mailto:erhansensoy@kmu.edu.tr) Karamanoğlu

Mehmetbey Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi.

[sensoyerhan42@gmail.com](mailto:sensoyerhan42@gmail.com)

ORCID: 0000-0003-2989-459X

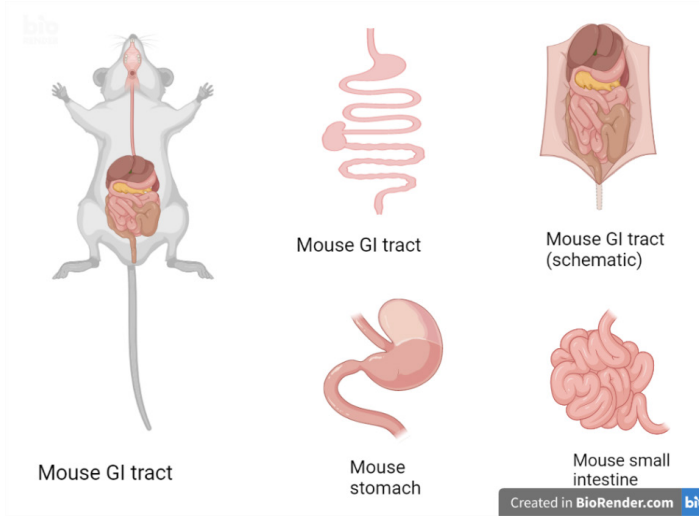
### 1. Giriş

Endüstrinin gelişimine paralel olarak ağır metallerin kullanımı artmış, günümüz dünyasında bu durum halk sağlığını etkiler hale gelmiştir. Çevre kirletici ağır metaller arasında yedinci sırada yer alan Kadmiyum'un (Cd) (Zehirli Maddeler ve Hastalık Kayıt Ajansı; ATSDR, 1) doğada Kadmiyum klorür ( $CdCl_2$ ), kadmiyum oksit, kadmiyum sülfid ve kadmiyum sülfat formları vardır. Tekstil, plastik, rafineri, elektronik, otomobil ve sigara üretimi gibi endüstriyel faaliyetlerle ve doğal kaynaklarla çevreye yayılır. Fosil yakıtların yanması sonucu atmosferde biriken Cd tozları, yağmur sularıyla yeryüzüne iner. Tarımsal üretimde gübre ve kontamine su kullanımı sonucu, toprakta Cd kirliliği oluşur. Cd'nin önemli bir kısmı metabolizmaya dahil olurken, bir kısmı da doku ve organlarda birikerek patolojilere neden olabilir (2).

Gastrointestinal sistemde (GI) besinlerin sindirimi ve emilimi; ağız, yutak, yemek borusu, mide, ince bağırsak, kalın bağırsak ve anüsten oluşan sistemin bütünlüğü tükürük bezleri, safra kesesi, karaciğer ve pankreasın sinerjisi ile sağlanır (Şekil 1.). Çoklu organ yetmezliğine neden olan kadmiyum, tüm GI

organları etkilediği gibi mideyi de olumsuz etkiler (3), Melatonin (Mel; N-asetil-5-metoksitriptamin) pineal bezden salgılanan terapötik etkiye sahip doğal bir antioksidan hormondur (4,5)

**Şekil 1.** Farede Gastrointestinal Sistem



Literatürde, intraperitoneal (i.p.) yolla  $CdCl_2$  uygulanan gebe farelerin midelerinde meydana gelen patolojilerin melatoninle tedavi edildiği bir çalışma yer almamaktadır. Çalışmanın amacı; gebelik sürecinde intraperitoneal yolla  $CdCl_2$  verilen farelerin midelerinde meydana gelen patolojilerin belirlenmesi ve melatoninin tedavi edici etkisinin test edilmesidir.

## 2. Materyal ve Metot

Etik kurul izni Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp ve Araştırma Merkezi'nden alındı (SUDAM, 2019-64).

### 2.1. Hayvan Materyali

Deney hayvanı olarak kullanılan Swiss Albino ırkı 8 haftalık gebe fareler, SUDAM'dan temin edildi.

### 2.2. Çalışma Grupları

Farelerin gece boyunca çiftleşmesine izin verildi ve vajinal tıkaç oluşumu günlük olarak kontrol edildi. Vajinal tıkaç oluşumu belirlenen 18 fare, gebeliğin sıfırıncı gününde kabul edildi ve rastgele ayrı kafeslere aktararak üç grup (n:6) oluşturuldu (Tablo 1.). Grup kafeslerinde 12 saat aydınlık-karanlık döngüsünde ve oda sıcaklığında tutulan farelere yem ve su kısıtlaması yapılmadı.

**Tablo 1.** Deney gruplarına gerçekleştirilen işlemler

Deney Grupları (n:6)	Uygulanan Madde	Uygulanan Maddenin Dozu	Uygulama Şekli	Uygulama Süresi (Gün)
I	Salin +CdCl <sub>2</sub>	2 ml/gün/bw +2 mg/kg/bw	i.p.	21
II	Salin +Mel	2 ml/gün/bw +3 mg/kg/bw	i.p.	21
III	Salin+ CdCl <sub>2</sub> +Mel	2 ml/gün +2 mg/kg/bw +3 mg/kg/bw	i.p.	21

### 2.3. Gruplara yapılan işlemler

Cd'nin fareler için oral LD<sub>50</sub> değeri: 107 mg/kg/bw'dir (7). CdCl<sub>2</sub>: 2 mg/kg/bw, Mel: 3 mg/kg/bw dozları 2 ml salin içinde çözülerek intraperitoneal yolla (i.p.) 21 gün süreyle uygulandı (Tablo 1). Uygulanan CdCl<sub>2</sub> değeri, LD<sub>50</sub> değerinin 1/50'si olup; dozlar literatür bilgisi dikkate alınarak belirlendi (8-10). Melatoninin kararlı yapısını korumak amacıyla karanlıkta saklandı ve uygulamalar her akşam aynı saatte yapıldı. Tüm kimyasallar Sigma ve Merck firmasından temin edildi.

### 2.4. Histolojik işlemler

Mide dokuları %10 formaldehitte tespit edildi, rutin doku takip işlemlerinin ardından parafine alındı. Parafin bloklardan 6 µm kalınlığında alınan kesitler Hematoksilen-Eozin ile boyandı (11). Elektron mikroskopisi için dokular 4.39 nm iridium ile kaplandı. Preparatlarda aynı bölgeler, ışık mikroskopunda (Nikon DS Kamera Kontrol Ünitesi DS-L1 ve DS-5M digital camera at x40 magnification) ve elektron mikroskopunda (ZEISS Gemini SEM 500 Field Emission Scanning Electron Microscope; FE-SEM, 5K magnification) incelendi. Histomorfolojik kriter olarak; Lamina Muscularis ve Lamina Propria tabakalarının genel durumu, mukozal dejenerasyon, vakuol oluşumu hemoraj açısından değerlendirildi (12).

### 2.5. İstatistiksel Analiz

Farklı değişkenler varyans analizi ve ardından uygun posthoc testi (Duncan testi) ile analiz edildi, farklılıklar p<0.05 düzeyinde anlamlı kabul edildi.

### 3. Bulgular

#### 3.1. Mide ağırlıkları

Sıçanların mide ağırlıkları çalışmanın sonlandırıldığı gün tartılarak kayıt edildi. Ortalama mide ağırlıklarının CdCl<sub>2</sub> grubunda azaldığı, CdCl<sub>2</sub>+Mel grubunda artış gösterdiği, Mel grubunda en yüksek seviyeye ulaştığı tespit edildi (p: 0.02), (Tablo 2.).

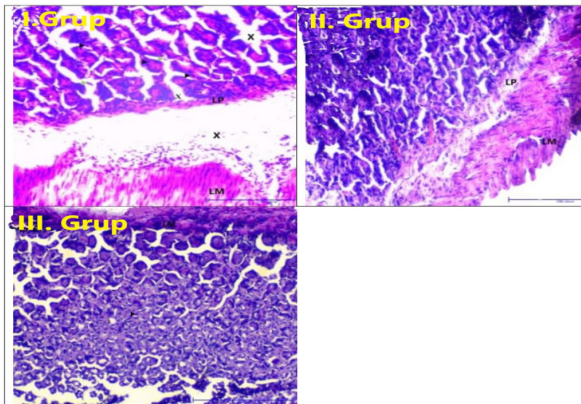
**Tablo 2.** Ortalama mide ve rölatif mide ağırlıkları

Grup	Ortalama Mide Ağırlığı (gr)	Rölatif Mide Ağırlığı
I.	0.45	0.014
II.	0.51	0.013
III.	0.48	0.014

#### 3.2. Histolojik değerlendirme

Dokular, ışık mikroskobu ve elektron mikroskobunda analiz edildi. I. grupta, LM ile Lamina Propria (LP) arasında geniş boşlukların varlığı belirlenirken, mukozal dejenerasyon olarak yorumlanan hasarlı bez hücreleri, vakuol oluşumu ve hemoraji görüldü. II. grupta, mide dokusunun normal histolojik görünümüne sahip olduğu, LM ve LP konturlarının düzenli olduğu ve aralarında boşluk olmadığı belirlendi. Bu grupta hasarlı bez hücrelerine, vakuol oluşumuna ve hemorajiye rastlanmadı. III. grupta, mide dokusunun genel histolojik görünümü normal olduğu, çekirdek ve sitoplazmanın koyu boyandığı görüldü. LM konturlarının düzenli olmaması, az miktarda hasarlı bez hücrelerinin ve vakuolün varlığı önemli olarak değerlendirildi (Şekil 2. ve Şekil 3.).

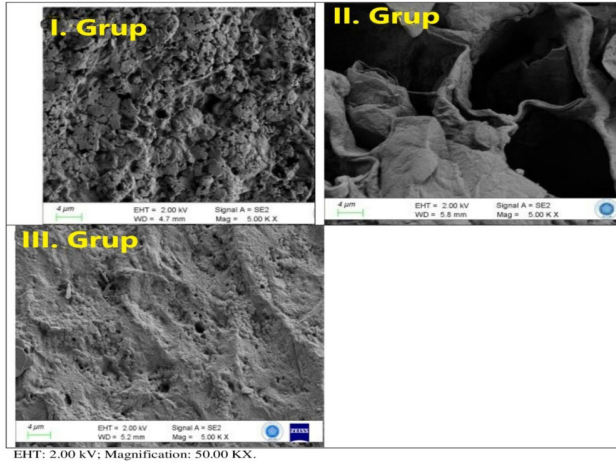
**Şekil 2.** Mide dokusuna ait ışık mikroskobu görüntüleri.



H-E boyama, Büyüme çizgisi: 100 µm X 40.

LM: Lamina Propria, LP: Lamina Propria, X: Vakuol, ►: Dejeneratif görünümlü hücre, ►: Hemoraji

Şekil 3. Mide dokusuna ait elektron mikroskobu görüntüleri



#### 4. Tartışma

Kadmiyum, insan sağlığına zarar veren ve çoklu organ toksisitesine yol açan tehlikeli bir ağır metaldir (2, 13). Cd'nin farelerin farklı organ ağırlıklarında azalmaya yola açtığı bildirilmesine karşın (15,16), bir grup araştırmacı farklı sürelerde ve dozlarda Cd verilen farelerin (17) ve ratların (18,19) çeşitli organ ağırlıklarında değişim gözlenmediği bildirilmiştir. Cd'nin farelerde mide ağırlığında azalmaya neden olduğuna işaret eden bulgularımız, benzer çalışmaların büyük bir bölümüyle uyumluluk göstermektedir. Sonuçlarımızın diğer çalışmalarla uyumlu olmamasının nedeninin, farklı çalışmalarda kullanılan Cd dozunun, süresinin ve hayvanların yaşının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Gastrointestinal sistem, kadmiyumun ana hedeflerinden biridir (20). Cd mide, ince bağırsak, böbrekler ve karaciğerde birikerek hasara yol açar (21). 30 gün süreyle Cd verilen sıçanların mide dokusundaki hücrelerin dejeneresyona uğradığı, nekroz ve vezikül oluşumu meydana geldiği bildirilmiştir (22). İçme sularına CdCl<sub>2</sub> eklenen sıçanların mide mukozasında hafif şiddette displazi ve interstisyel inflamasyon *belirlendiği ifade edilmiştir* (23). Memelilerde, detoksifikasyon stratejilerinden birisi olan melatonin uyku, üreme ve immünsistemi stimule eder (24-27). Literatürde Melatoninin koruyucu etkilerini belirlemeyi amaçlayan çalışmalar olmakla birlikte, mide üzerine olan etkisinin araştırıldığı çalışmalar yetersizdir. Melatonin tarafından olumlu etkilenen bağırsak mikrobiyomunun Cd'ye karşı koruyucu olduğu rapor edilmiştir (28).

Sonuçlarımız, CdCl<sub>2</sub>'nin mide dokusunda patolojiye neden olması yönüyle benzer çaişmalarla uyumluluk gösterirken, CdCl<sub>2</sub>+Mel uygulanan grupta patolojilerin görülmemesi yönüyle özgün bir değere sahiptir. Bu bağlamda Melatoninin terapotik etkisi nedeniyle midede patolojilerin azaldığı hatta tamamen kaybolduğu görülmüştür.

## 5. Sonuç

Melatonin, gebe farelerin midesinde CdCl<sub>2</sub> nedeniyle meydana gelen patolojilerin tedavisinde etkili olabilir. Melatoninin olumlu etkileri göz önüne alındığında, yoğun olarak kadmiyum toksisitesine maruz kalan insanların, Melatonin tabletleri alması faydalı olabilir. Kadmiyum maruziyetinin diğer sistemlerdeki etkisini ve melatoninin bu sistemler üzerindeki koruyucu özelliğini belirlemeyi amaçlayan tamamlayıcı çalışmaların yapılması önerilir.

## Kaynakça

1. Arroyo S, Flores B, Ortiz E, Gómez-Quiroz C, Gutiérrez-Ruiz V. Liver and Cadmium toxicity. *J Drug Metabolism Toxicology*. 2012;5(1):1-7. doi: 10.4172/2157-7609.S5-001.
2. Beyrami M, Karimi E, Oskoueian M. Synthesized chrysin-loaded nanoliposomes improves cadmium-induced toxicity in mice. *Environmental Sciences Pollution Researchs*. 2020;27(1):40643–40651. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10113-7>.
3. Salama A, Arab, M. Hassan, A. Maghrabi K. Cadmium-induced hepatocellular injury: modulatory effects of  $\gamma$ -glutamyl cysteine on the biomarkers of inflammation, dna damage, and apoptotic cell death. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2019;52,74-82.<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.12.003>.
4. Zeng T, Guo W, Jiang L, Luo Q, Shi Z, Lei B, Cai Z. Integration of omics analysis and atmospheric pressure MALDI mass spectrometry imaging reveals the cadmium toxicity on female ICR mouse. *Science of The Total Environment*. 2021;801,149803. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149803>
5. Carlomagno M, Minini V, Tilotta From implantation to birth: insight into molecular melatonin functions. *International Journal Of Molecular Sciences*. 2018;19(9):2802. <https://doi.org/10.3390/ijms19092802>.
6. Zhang H, Liu Y, Zheng X, Zha M, Elsabagh Y, Zhang H. Effects of the maternal gut microbiome and gut-placental axis on melatonin efficacy in

alleviating cadmium-induced fetal growth restriction. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2022;237,113550. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022;113550>.

7. Sigma-Aldrich, <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/sds/ALDRICH/202908> erişim Tarihi: 12.02. 2023

8. Feng X, Jin R, Zhou Q, Jiang Y, Wang X, Zhang J. Deep learning approach identified a gene signature predictive of the severity of renal damage caused by chronic cadmium accumulation. *J Hazard Mater*. 2022;433 Article 128795, 10.1016/j.jhazmat.2022.128795

9. Candan D, Bayram N, Calapoğlu N. Effect of Melatonin and Selenium on reproductive system of cadmium given female rats. *Suleyman Demirel University Medical Faculty Journal*. 2017;24(3):84-95. <https://doi.org/10.17343/sdutfd.270310>.

10. Jiang Z, Xu X, Yao W, Liu N. An integrated multi-omics approach revealed the regulation of melatonin on age-dependent mitochondrial function impair and lipid dyshomeostasis in mice hippocampus.. *Pharmacology Research*. 2022; Article 179106210, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022;106210>.

11. Şensoy E, Öznurlu Y. Determination of the changes on the small intestine of pregnant mice by histological, enzyme histochemical, and immunohistochemical methods. *The Turkish Journal of Gastroenterology*. 2019;30(10):917. <https://doi.org/10.5152/tjg.2019;18681>.

12. Aksu I, T Deprem. Immunohistochemical localization of hepatocyte growth factor hgf; in the fundus region of the stomach of diabetic and non-diabetic mice. *Ataturk University Journal of Veterinary Sciences*. 2021;16(3):251-258. <https://doi.org/10.17094/ataunivbd.879099>.

13. Fatima G, Raza AM, Hadi N, Nigam N, Mahdi AA. Cadmium in human diseases: it's more than just a mere metal. *Indian J Clin Biochem*. 2019; 34(4):371-378, 10.1007/s12291-019-00839-8

14. Şensoy, E. Investigation Of The effect of cadmium chloride applied during pregnancy on the morphological parameters of mouse offspring and the protective role of melatonin. *Journal of Hazardous Materials Advances*.2023;9,100222<https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2022;100222>.

15. Sugiharto Manuhara W, Wibowo D, Winarni U. The comparison toxicity effects of lead and cadmium exposure on hematological parameters and organs of mice. *Ecology, Environment and Conservatio*. 2020;26(4):1842-1846.

16. Saedi S, Shirazi M, Totonchi N. Effect of prepubertal exposure to cdcl2 on the liver, hematological, and biochemical parameters in female rats;



an experimental study. *Biological Trace Element Research*. 2020;194,472-481. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01800>.

17. Thijssen S, Maringwa C, Lambrichts, E. Chronic exposure of mice to environmentally relevant, low doses of cadmium leads to early renal damage, not predicted by blood or urine cadmium levels. *Toxicology*. 2007;229(1-2).145-156. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.10.011>.

18. Chen Y, Zhou Y, Bian F, Fu X. Cadmium exposure promotes thyroid pyroptosis and endocrine dysfunction by inhibiting nrf2/keap1 signaling. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2023;249,114376.[https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.\(2022;114376](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.(2022;114376)

19. Breton J, Daniel J, Dewulf S, Pothion N, Froux M. Gut microbiota limits heavy metals burden caused by chronic oral exposure. *Toxicology Letter*. 2013;13(16):1249-1256. [https://doi.org/10.1016/j.toxlet.\(2013;07.021](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.(2013;07.021).

20. Liu W, Liu, H, Lu C. Piperlongumine restores the balance of autophagy and apoptosis by increasing bcl2 phosphorylation in rotenone-induced parkinson disease models. *Autophagy*. 2018;14(5):845-861. <https://doi.org/10.1515/reveh-2019-0016>.

21. Kumar N, Kumari, C. Ram, B. Impact of oral cadmium intoxication on levels of different essential trace elements and oxidative stress measures in mice: a response to dose. *Environmental Sciences Pollutions Researchs*. 2018;25,5401-5411. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0868-3>.

22. Asar M, Kayisli V, Uysal G, Öner M, Kaya S, Polat Z. Cadmium-induced changes in epithelial cells of the rat stomach. *Biological Trace Element Research*. 2000;77(1):65-81. <https://doi.org/10.1385/BTER: 2000;77:1:65>.

23. Nai, A, Filho, S, Estrella S. Teixeira Study of the influence of the ph of water in the initiation of digestive tract injury in cadmium poisoning in rats. *Toxicology Reports*. 2015;2,1033-1038. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015;07.012>.

24. Pivonello C, Negri, R, Patalano, F. Amatrudo, T. The role of melatonin in the molecular mechanisms underlying metaflammation and infections in obesity: a narrative review. *Obesity Reviews*. 2022;23(3):e13390. <https://doi.org/10.1111/obr.13390>

25. Rahbarghazi R, Farhoudi M, Rahmani-Youshanlouei H, Hassanpour M, Rahbarghazi A, Rezaie J, Ahmadi M. Putative effect of melatonin on cardiomyocyte senescence in mice with type 1 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*. 2022;21(1):353-359.<https://doi.org/10.1007/s40200-022-00982-9>

26. Guo Y, Wang H, Chen H, Xia Z, Zhang C, Xu X. N-acetylcysteine alleviates cadmium-induced placental endoplasmic reticulum stress and fetal growth restriction in mice. *PLoS One*. 2018;13(1):101-112.e0191667. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191667>

27. Dashtbani S, Keshtmand A. Mixture of Multi-Strain Probiotics (Lactobacillus Rhamnosus, Lactobacillus Helveticus, and Lactobacillus Casei) had Anti-Inflammatory, Anti-Apoptotic, and Anti-Oxidative Effects in Oxidative Injuries Induced By Cadmium in Small Intestine and Lung. *Probiotics & Antimicro Prot*, 2022;15(2):226-228. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-09946-0>

28. Wilkinson D, Shepherd, M. Melatonin for women in pregnancy for neuroprotection of the fetus. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2016;1(3):1-8. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010527.pub2>.



## BÖLÜM V

# PROTEKTİF ETKİLİ BİTKİSEL BİR AJAN: SİLYMARİN

### *A Protective Effective Herbal Agent: Silymarin*

Nevin KOCAMAN

(Doç. Dr.) Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi

Histoloji & Embriyoloji ABD.

E-mail: drnkocaman@gmail.com

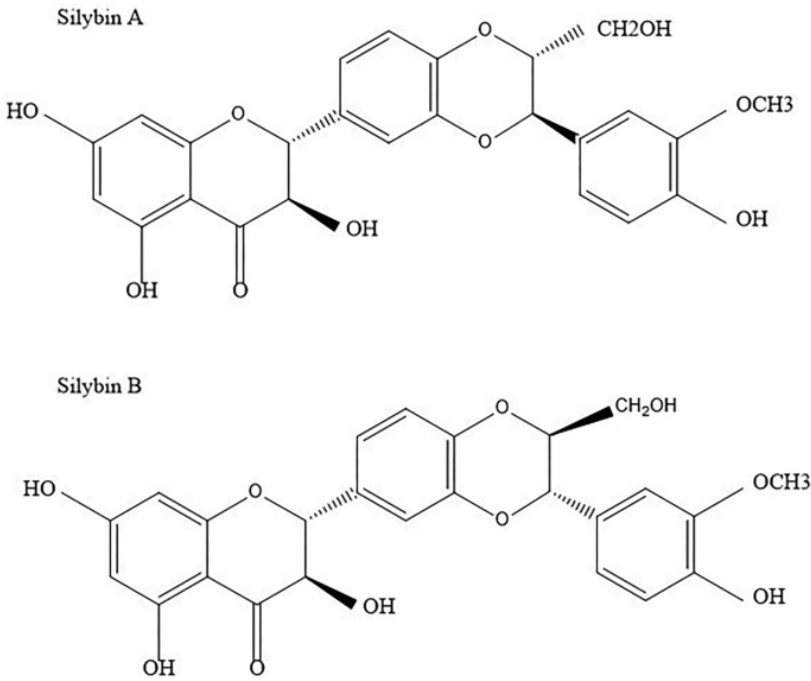
ORCID: 0000-0002-6682-6345

### 1. Giriş

Silymarin, *Silybum marianum* (Süt devedikeni)'un Asteraceae familyasından olup tohumları karaciğer, safra kesesi hastalıkları, mantar, yılan zehirlenmeleri ve böcek ısırıklarının tedavisinde binlerce yıldır kullanılan bitkisel bir ajandır. İçeriği birden çok flavonolignan izomerinin karışımından oluşan silymarinin, suda çözünürlüğü ve oral biyoyararlanımı oldukça düşük olduğundan terapötik aktivitesini artırmak için nanoemülsiyon formülleri elde edilmiştir. Flavonoidler uzun zamandır araştırılmakta ve antioksidan etkileri dışında immunstimulan, vazodilatatör, östrojenik, antialerjik ve antiviral etkilerinin olduğu ve  $\alpha$  tokoferol rejenerasyonu, bakır ve demir şelasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir. (1-3)

Silymarin hücrel hasar, fibrozis ve siroz gelişiminden sorumlu enzimleri düzenlemekte, serbest radikal toplayıcı olarak işlev görmekte ve sirozlu hastalarda karaciğerle ilişkili mortaliteyi azaltmaktadır. Aynı zamanda diyabetli hastalarda glisemik kontrolü iyileştiren, oksidatif stresi ve hücrel sitotoksiteyi azaltarak sağlam karaciğer hücrelerini veya henüz irreversible hasar oluşmamış hücreleri koruyan ve bu nedenle hepatoprotektif olarak kabul edilen bir moleküldür. Günümüzde silymarin, *S. marianum*'un meyve ekstraktı olarak kullanılmaktadır. Silymarin ekstraktının ve ana bileşeni silibinin (örneğin, diğerlerinin yanı sıra göğüs, deri, kolon, serviks, yumurtalık, prostat, akciğer

ve hepatosellüler kanserler) potansiyel antikanser aktivitesi, ilaç endüstrisinin ilaç geliştirmeye olan ilgisini artırmıştır. (4) Yüksek oral biyoyararlanıma ve iyi karakterize edilmiş farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklere sahip Eurosil 85® formülasyonunu içeren Legalon® dahil olmak üzere bir dizi silymarin formülasyonu mevcuttur ve özellikle yağlı karaciğer hastalığında, karaciğerin rejeneratif potansiyelinin yüksek olduğu dönemde maksimum fayda için mümkün olduğu kadar erken başlanması önerilmektedir. Silymarin dört ana flavonolignan izomeri olan silybin(%50-60), izosilybinin(%5), silikristin(%20) ve silidianin(%10) den oluşan kompleks bir bileşiktir. Silymarinin ana maddesi olan silybin yaklaşık olarak %60'ını kapsar ve silymarin kompleksinin biyolojik olarak en aktif bileşenidir. Silybin, moleküler formülü C<sub>25</sub>H<sub>22</sub>O<sub>10</sub> olan ve moleküler ağırlığı 482.44 g/mol olan polifenolik flavonoid bir antioksidandır. Eşmolar oranda karışmış iki diastereomerin olan silybinin A ve silybinin B'den oluşur. (5,6)



Şekil 1. Silymarin ekstraktının ana bileşenlerinin (flavonoglignanlar) kimyasal yapıları.

## 2. Farmakokinetik Özellikler

Silymarin ekstraktı lipofilik olup suda az çözünür. Bu nedenle sindirimden sonra sadece yaklaşık %20-50'si mide-bağırsak yolundan emilir. Yine karaciğer

tarafından hızlı metabolize edildiği için düşük biyoyararlanıma sahiptir. Doruk plazma konsantrasyonuna oral uygulamadan yaklaşık 2-4 saat sonra ulaşılır ve plazma yarı ömrü yaklaşık 6 saattir. Genelde safra yoluyla çok az bir kısmı (%1-5) da idrarla atılır. Akut toksisite çalışmalarında çok iyi tolere edildiği gösterilmiş olup, erişkinlerde günde üç kez 100-300 mg/kg dozunda verilebilir. Silymarin, bağırsak ve karaciğer hücrelerinde hızlı konjuge olup safraya atılır. Yaklaşık %20 ila %40'ı enterohepatik dolaşıma girer, kalan kısmı ise dışkıyla atılır. Ancak safraya atılım nedeniyle düşük sistemik oral biyoyararlanıma sahiptir. Silymarin biyoyararlanımını artırmak ve yan etkilerini azaltmak için nanosüspanسیونlar, nanoemülsiyonlar, polimer nanotaşıyıcılar, katı-lipid nanopartiküller ve nanoyapılı yeni formülasyonlar tasarlanmıştır. Silymarin östrojen ve statinlerle etkileşime girme potansiyeline sahip olup, diyabetli hastalarda yüksek kan şekeri ve hemogloblin A1C düzeylerini düşürmesi nedeniyle antidiyabetik ilaç alan hastalarda hipoglisemi açısından dikkatli olunmalıdır. (7-11)

### 3. Farmakodinamik Özellikler

Silymarinin antioksidan, antiinflamatuvar, antifibrotik ve insülin direnci modülasyonu dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik etkileri tanımlanmıştır.

#### 3.1. Silymarin / Silybin'in Antioksidan Etkileri

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi, çoğunlukla detoksifikasyon süreçlerinde karaciğerdeki biyokimyasal reaksiyonların doğal bir sonucu olarak meydana gelir. Aşırı miktarda toksin veya serbest yağ asitlerinin aşırı oksidasyonuna maruziyet, anormal ROS üretimine yol açarak endojen antioksidanların tükenmesine sebep olabilir. Böylece hepatositler, kupffer hücreleri, endotel hücreleri ve inflamatuvar lökositler gibi çeşitli hücre tiplerinde serbest radikallerin oluşumu artar. Endojen antioksidanlar tarafından nötralize edilmeyen ROS ise karaciğer fibrozu dahil pek çok karaciğer hasarının patogeneğinde rol oynayan oksidatif stres tablosuna neden olur. Silibin ana antioksidan etkisini Nrf2 üzerinden çoklu enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanları aktive ederek hücrede optimal redoks dengesini koruyarak olmaktadır. Bu şekilde spesifik ROS üreten enzimleri inhibe ederek veya stres koşullarında mitokondrinin bütünlüğünü iyileştirerek serbest radikal oluşumunu önleyebilir. (12)

İn vitro çalışmalar silybinin ısı şok proteinleri, tioredoksin ve sirtuinler gibi koruyucu moleküllerin sentezinden sorumlu vitajenleri aktive etme kapasitesine sahip olduğunu ve dolayısıyla oksidatif strese karşı ek koruma sağlayabileceğini göstermiştir. Yine silybinin hepatositlerin yüzeyinde, organik iyon alım

taşıyıcılarını ve tümör nekroz faktörü-alfa (TNF-a) ekspresyonunu inhibe ederek mantar zehirleri de dahil olmak üzere ksenobiyotiklerin hücre alımını azaltabileceği de gösterilmiştir. (13) Silymarin ekstraktı ve ana aktif bileşeni silybin, hidroksil ve peroksil anyonları ve hipokloröz asit gibi reaktif oksijen türlerini güçlü bir şekilde temizlediği trombositler, karaciğer mikrozoamları, lökositler, endotel hücreleri, eritrositler ve fibroblastlar üzerinde gösterilmiştir. Ek olarak, silybin (%50 inhibisyonun meydana geldiği konsantrasyon 80 µmol/l) ile tedaviden sonra izole kupffer hücrelerinde süperoksit anyon seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir. (6,13,14,15,2) Silymarin, biyosentezi için substrat miktarında (sistein) artış sağlanması yoluyla karaciğerde glutatyon üretimini artırabilir ve bu da karaciğer dokularında antioksidan kapasitesinin artmasına katkıda bulunur. (3)

Silymarinin hepatoprotektif etkilerinde ana mekanizmalar antioksidasyon etki olup ilk olarak, lipid peroksidasyonunun inhibisyonu yoluyla membran geçirgenliğini stabilize eder. Böylece karaciğerin kendi koruyucu antioksidanı olan glutatyon düzeylerinin korunmasına yardımcı olur. Çeşitli çalışmalar karaciğerde lipoksijenaz inhibisyonu nedeniyle lökotrien oluşumunu engellediğini, hepatositlerde protein sentezini arttırdığını, tümör öncüllerinin aktivitesini azalttığını, mast hücre stabilizasyonunu sağladığını ve immun fonksiyonları düzenlediğini göstermiştir. (3,7). Silymarinin antioksidan özelliklerine bağlı olarak çeşitli nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde etkili olabileceği belirlenmiştir. Hiperlipidemik farelerde, plazma kolesterolü ve LDL (Low Density Lipoprotein) seviyelerini düşürdüğü tespit edilmiş ve diyetle bağlı hiperkolesterolemide, silymarinin etkisiyle HDL (High Density Lipoprotein) kolesterolünde artış ve total kolesterolda düşüş saptandığı bildirilmiştir. Silymarinin karaciğer hastalıkları, siroz, safra kesesi hastalıkları dışında depresyon ve kanser tedavisinde de olumlu etkilere sahip olduğu belirlenmiş olup tümör nekroz faktörü-alfa (TNF-α), interferon-gama, interlökin (IL)-2 ve IL-4 üretimini inhibe ederek çeşitli toksik kimyasallardan kaynaklanan yaralanmalara karşı da koruma sağladığı bilinmektedir. (15-18)

Çalışmalar; bakteriyel endotoksinler, viral hepatit, toksik hepatit, D galaktozamin, karbon tetraklorid, tioasetamid, benzopiren, thallium, parasetamol ve etanol nedenli karaciğer hasarına karşı silymarinin koruyuculuğunu göstermiştir. Hepatoprotektif etkili bir ajan olan silymarin ve preparatları alkolle ilişkili karaciğer hastalıkları, kronik hepatit, siroz ve çevresel toksinlere bağlı hasarların tedavisinde destekleyici amaçla kullanılmaktadır. Silymarinin en aktif bileşeni olan silybinde karaciğerde hasarlı dokularının rejenerasyonunda etkili olup hepatik nükleer faktör kapp B (NFκ B ) aktivasyonunu inhibe ederek

hepatositlerin yüzeyindeki organik iyon alım taşıyıcılarını bloke ettiği ve mantar zehirleri dahil olmak üzere ksenobiyotiklerin hücre alımını azalttığı, böylece amanita phalloides, fenotiazin, bütrifenonese bağlı zehirlenmelerde karaciğer hasarını geriletmediği bildirilmiştir. (19- 22)

### **3.2. Silymarin / Silybin'in Antiinflatuar Etkileri**

Silymarinin, tümör nekroz faktörü-a (TNF-a), E-selektin gibi yapışma moleküllerinin salınmasının yanı sıra nükleer faktörün baskılanması yoluyla anti-inflatuar etki gösterdiği gösterilmiştir. Kronik inflamasyon; progresif hepatik fibroz ve siroz gelişimi ile ilişkilendirilmiş olup oksidatif stres, çeşitli karaciğer bozukluklarında hepatik inflamasyonun başlamasında ve ilerlemesinde ortak altta yatan mekanizmadır. NF-κB, inflamatuvar yanıtın önemli bir transkripsiyon düzenleyicisidir ve karaciğerde inflamatuvar sinyal yollarının düzenlenmesinde önemli rol oynayarak viral hepatit, biliyer karaciğer hastalığı dahil hemen hemen tüm kronik karaciğer hastalıklarında aktive olmaktadır. Silymarinin, NF-κB dışında inflamatuvar mediatörlerin (prostaglandin E2 ve lökotrien B4) inhibisyonu yoluyla da etkili olduğunu gösteren çalışmalar dikkat çekmektedir. (23, 24)

Kupffer hücreleri, enflatuvar mediatörlerin ekspresyonu ve salgılanması yoluyla doğuştan gelen immün yanıtlarda ve konakçı savunmasında yer aldığı bilinen yerleşik karaciğer makrofajlarıdır. (25) İzole sıçan kupffer hücrelerinde, silymarin düşük konsantrasyonlarda (15 µmol/l) bile PGE2 oluşumunu zayıf bir şekilde, LTB4 oluşumunu ise güçlü bir şekilde inhibe etmektedir. Kupffer hücreleri ve muhtemelen diğer hücre tipleri tarafından LTB 4 oluşumunun bu seçici inhibisyonu, silymarinin anti-inflatuar potansiyelini açıklamaktadır. (2)

### **3.3. Silymarin / Silybin'in Antifibrotik Etkileri**

Silymarinin hayvan ve in vitro modellerde antifibrojenik etkileride göstermiştir. Kronik karaciğer hasarında hepatik fibrojeniz, karaciğere özgü bir perisit türü olan hepatik stellat (yıldız) hücrelerin (HSC'ler) aktivasyonu ile gerçekleşir. Hepatik yıldız hücrelerinin miyofibroblastlara dönüşmesi, karaciğer sirozuna yol açan kollajen liflerinin birikmesine ve fibrojenize neden olur. Karaciğer fibrozu, karaciğer mimarisinin yeniden şekillenmesine yol açarak hepatik yetmezliğe, portal hipertansiyona ve hepatik ensefalopatiye yol açabilir. İnsan hepatik fibrojenizinin in vitro modelinde, silybinin, aktive edilmiş insan HSC'sinde büyüme faktörü kaynaklı prokollajenin üretimini doza bağlı olarak



inhibe ettiği ve antifibrojenik özellikler sergilediği belirlenmiş olup bu etki, insan dışı primatlarda alkolün neden olduğu hepatik fibrozis hayvan modelinde de doğrulanmıştır. (23-25)

### **3.4. Silymarin / Silybin'in Antianjiojenik Etkileri**

Silymarinin doz bağımlı olarak insan ovaryum kanseri vasküler yapılarında ve göbek kordonu toplardamar endotel hücrelerinde vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF)'nü azalttığı göstermiş ve karaciğer, cilt, serviks, akciğer, meme, prostat, mesane ve böbrek kanserleri dahil birçok in vitro ve hayvan kanseri çalışmalarında antineoplastik etkili oldukları rapor edilmiştir. Silymarinin siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinin p21, p15 ve p27 olarak indüklenmesi yolu ile G1/S fazında hücre döngüsünü durdurabildiği, ek olarak proapoptotik protein olan Bax'ı yukarı regüle ettiği, anti-apoptotik protein Bcl-2'yi ise aşağı regüle ederek hücre kinazlarını (PKC, AKT ve MAPK) ve NF- $\kappa$ B gibi inflamatuvar transkripsiyon faktörlerini inhibe ettiği belirlenmiştir. Ayrıca silymarinin ERK1/2 ve STAT3 sinyal yollarını baskılayarak hücre proliferasyonunu, hücre göçünü, onkogenezi ve iNOS gen ekspresyonunu inhibe ettiği ve malign hücrelerde kaspaz aktivasyonu ile apoptotik hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir. (26-31)

Silymarin etkisiyle NF- $\kappa$ B'ye bağlı gen ekspresyonunun baskılanması; NF- $\kappa$ B'nin TNF $\alpha$  ile indüklenen aktivasyonunun blokajı ve STAT3 sinyalinin inhibisyonu yolu ile antikanserojenik etkilerine aracılık edebileceğini göstermiştir. Hayvan çalışmaları ve in vitro çalışmalar, silybinin gama radyasyonun sebep olduğu DNA hasarını engellemek için güçlü bir radyoprotektif özelliğe sahip olduğunu ve gama radyasyonunun sebep olduğu hücre hasarına karşı kullanılabilirliğini ve deney hayvanlarından alınan normal spermatozoidlerin korunmasında tamamlayıcı tıpta umut verici bir radyoprotektif bitkisel ajan olduğunu belirlemiştir. Özellikle kronik hepatit, siroz ve alkol ilişkili karaciğer hastalıklarında destekleyici tedavide kullanılmaya başlanmış bir ürün olup antiinflamatuvar, antioksidan, antidiyabetik, antiviral, apoptoz tetikleyici, kardiyoprotektif, kolesterol düşürücü, nöroprotektif, antikanser gibi etkilerinin olduğu ve ilaveten adhezyon moleküllerini etkileyerek ateroskleroz tedavisinde kullanılabilirliğini göstermiştir. (32-35)

### **3.5. Silymarin / Silybin'in Antikanserojen etkileri**

Silymarin I $\kappa$ Ba'nın fosforilasyonunu ve bozunmasını inhibe ederek NF- $\kappa$ B'nin TNF $\alpha$  kaynaklı aktivasyonunu doza ve zamana bağlı bir şekilde

baskıladığını ve ayrıca p65'in DNA'ya bağlanma yeteneğini etkilemeden çekirdeğe translokasyonunu bloke ettiğini göstermiştir. TNFα'nın indüklediği hücre sinyallemesi tümörlerde veya tümör promotörlerine maruz kalan hücrelerde silymarin tarafından inhibe edilir. Silymarin NF-κB'ye bağımlı raportör gen transkripsiyonu ve mitojenle aktiveleştirilen protein kinazın (MAPK) ve c-Jun N-terminal kinazın TNFα kaynaklı aktivasyonunu da inhibe eder. Bunun sonucunda TNFα kaynaklı sitotoksitesiteyi ve kaspaz aktivasyonunu ortadan kaldırır ve TNFα kaynaklı reaktif oksijen ara ürünlerin üretimini ve lipid peroksidasyonunu baskılar. Ek olarak fotokarsinogeneze karşı da koruyucu etkisi kanıtlanmış olup deride lokal silymarin uygulamasını takiben ultraviyole-B (UV-B) nedeni tümörün, büyüklüğünün azaldığı tesbit edilmiştir. Silymarinin deride kanserli dokularda apoptozisi artırıp ödemi azalttığı, katalaz aktivitesini, siklooksijenaz ve ornitin dekarboksilaz aktivitesini tetiklediği belirlenmiştir. Yine silymarinin melanomda ultraviyole uygulamasına karşı hücreleri koruduğu ve ultraviyolenin tetiklediği oksidatif stres, enflamasyonu, immün reaksiyonu ve DNA hasarını baskıladığı belirtilmiştir. (36, 8, 6)

### ***3.6. Silymarin / Silybin'in Diğer Etkileri***

Organ nakillerinde yapılan soğuk iskemi/reperfüzyon işlemi esnasında meydana gelen ROS'ların, hücreleri etkileyerek laktat dehidrogenaz ve DNA/protein biyosentezinde artış sonucu kimyasal hasara neden olduğu bilinmektedir. Silymarin kullanımı bu gibi hasar oluşum mekanizmalarını ya azaltmış ya da tamamen ortadan kaldırmıştır. Aynı şekilde sisplatin nefrotoksitesitesinde de silymarin uygulanmasının glomerular ve böbrek hasarını azalttığı belirlenmiştir. (6,19)

Silymarinin ilaç taşıyıcı glikoproteinleri düzenlediği, 5-lipooksijenazı bloke ederek antienflamatuar ve antiartritlik özellikler sergilediği de gösterilmiştir. Silymarin yan etkileri yönüyle güvenli bir ajan olup literatürde son derece az sayıda gastrointestinal bozukluklar ve allerjik deri döküntüleri yönünde etkileri bildirilmiştir. (6, 20, 21)

## **4. Hastalıklar Üzerine Etkileri**

### ***4.1. Silymarin / Silybin'in ve Ateroskleroz/İskemi***

Silymarinin atero-koruyucu mekanizmaları, önemli antioksidan özellikleri ve azaltılmış LDL oksidasyonunu içermektedir. Silibininin, günlük 100 ve 200 mg/kg dozlarında kullanıldığı hiperkolesterolemik tavşanların arterlerindeki

aterosklerotik plak yükünü doza bağlı bir şekilde azalttığı kanıtlanmıştır. Ayrıca silybinin (günlük 20 mg/kg ip) aort ve plazmadaki asimetrik dimetilarjinin (ADMA) seviyelerini azaltarak endotelial fonksiyon bozukluğunu hafiflettiği, nitrik oksit sentaz inhibisyonunu tersine çevirdiği gösterilmiştir. (37)

#### 4.2. *Silymarin / Silybin'in ve Diabetes Mellitus*

Silymarin 60 mg/kg ile 300 mg/kg arasında değişen günlük dozlarında serum glukoz düzeylerini düşürmekte ve yağ dokusunda glukoz homeostazisinin artırmaktadır. Araştırmacılar silmarinin pankreatik  $\beta$  hücrelerin canlılıklarını ve hücre sayısını yukarı regüle ettiğini, hücrelerin in vivo ve in vitro fonksiyonlarında iyileşme yaptığını tespit etmişlerdir. (38)

#### 4.3. *Silymarin / Silybin'in ve Hipertansiyon*

Silybinin (300 mg/kg/gün) bir tarafta kan basıncı ve ventriküler hipertrofi, diğer tarafta enfarktüs boyutu ve koroner arter ligasyonu sonrası ölüm oranını azalttığı bilinmektedir. Ciddi pulmoner arter hipertansiyonunun erken döneminde silymarin uygulamasının (5 hafta boyunca 200 mg/kg/gün) önemli ölçüde iyileşme sağladığı gösterilmiştir. Altta yatan mekanizma kemokin/reseptör (CXCR4/SDF-1: CXCR4 bir kemokin reseptörüdür ve SDF-1, stromal hücreden türetilmiş faktör, onun ligandıdır) baskılanması yoluyla olup bu da pulmoner vasküler tıkanmayı geciktirerek yeniden yapılanma ve sonucunda pulmoner arteriyel hipertansiyonu düzeltmektedir. (39,40).

### 5. Sonuç

Güvenilirliği, koruyucu etkileri ve iyi farmokinetik özellikleri nedeniyle silymarin; parkinson, alzheimer sepsis, osteoporoz, yanık, diyabet, kolestaz, ülseratif kolit, kanserler, hiperkolesterolemi, nefrotoksisite, nörotoksisite, kardiyotoksisite, amanita phalloides zehirlenmesi, akciğer ve karaciğer hastalıkları, prostat hastalığı, depresyon ve tüp bebek (IVF-in vitro fertilizasyon) gibi geniş kullanım alanlarına sahip bir moleküldür. (22).

Silymarin suda çözünmediği için kapsül formunda bulunan ve başta karaciğer olmak üzere çeşitli doku ve organ hasarında koruyucu amaçla kullanılan, iyi tolere edilen, kullanımı güvenli ve farklı hastalıklarda tedavi edici yönleri açısından araştırmalara açık, gelecek vadeden bitkisel bir moleküldür. (23, 6).

## 6. Kaynaklar

1. Ding T, Tian S, Zhang Z, et al. Determination of active component in silymarin by RP-LC and LC/MS. *J Pharm Biomed Anal.* 2001;26(1):155-161.
2. Parveen R, Baboota S, Ali J, Ahuja A, Vasudev SS, Ahmad S. Effects of silymarin nanoemulsion against carbon tetrachloride-induced hepatic damage. *Arch Pharm Res.* 2011;34(5):767-774.
3. Aydemir Celep N, Gedikli S. Protective Effect of Silymarin on Liver in Experimental in the Sepsis Model of Rats. *Acta Histochem Cytochem.* 2023;56(1):9-19.
4. Gillessen A, Schmidt HH. Silymarin as Supportive Treatment in Liver Diseases: A Narrative Review. *Adv Ther.* 2020;37(4):1279-1301.
5. Marceddu R, Dinolfo L, Carrubba A, Sarno M, Di Miceli G. Milk thistle (*Silybum marianum* L.) as a novel multipurpose crop for agriculture in marginal environments: a review. *Agronomy.* 2022;12(3):729.
6. Kren V, Walterová D. Silybin and silymarin--new effects and applications. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2005;149(1):29-41.
7. Delmas D, Xiao J, Vejux A, Aires V. Silymarin and Cancer: A Dual Strategy in Both in Chemoprevention and Chemosensitivity. *Molecules.* 2020;25(9):2009.
8. Karbasforooshan H, Hosseini S, Elyasi S, Fani Pakdel A, Karimi G. Topical silymarin administration for prevention of acute radiodermatitis in breast cancer patients: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Phytother Res.* 2019;33(2):379-386.
9. Di Costanzo A, Angelico R. Formulation Strategies for Enhancing the Bioavailability of Silymarin: The State of the Art. *Molecules.* 2019;24(11):2155.
10. Tvrđý V, Pourová J, Jirkovský E, Křen V, Valentová K, Mladěnka P. Systematic review of pharmacokinetics and potential pharmacokinetic interactions of flavonolignans from silymarin. *Med Res Rev.* 2021;41(4):2195-2246.
11. Shah D, Mahurkar N, Gadhav D, Nikhate R, Kakad K. Hepatoprotective activity of Balsamodendron mukul extract against Paracetamol-induced liver toxicity in rats: In vivo pharmacological and toxicological evaluation. *Ann Pharm Fr.* 2023;81(5):814-825.
12. Luo S, Yang Y, Zhao T, et al. Albumin-Based Silibinin Nanocrystals Targeting Activated Hepatic Stellate Cells for Liver Fibrosis Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2023;15(6):7747-7758.

13. Gillessen A, Schmidt HH. Silymarin as Supportive Treatment in Liver Diseases: A Narrative Review. *Adv Ther.* 2020;37(4):1279-1301.

14. Yang Z, Zhuang L, Lu Y, Xu Q, Chen X. Effects and tolerance of silymarin (milk thistle) in chronic hepatitis C virus infection patients: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Biomed Res Int.* 2014;2014:941085.

15. Barreto R, Kawakita S, Tsuchiya J, et al. Metal-induced oxidative damage in cultured hepatocytes and hepatic lysosomal fraction: beneficial effect of a curcumin/absinthium compound. *Chin J Dig Dis.* 2005;6(1):31-36.

16. Nencini C, Giorgi G, Micheli L. Protective effect of silymarin on oxidative stress in rat brain. *Phytomedicine.* 2007;14(2-3):129-135.

17. Chantarojanasiri T. Silymarin treatment and reduction of liver enzyme levels in non-alcoholic fatty liver disease: a case report. *Drugs Context.* 2023;12:2023-1-4.

18. Xu S, Jiang X, Liu Y, et al. Silibinin Alleviates Lipopolysaccharide Induced Inflammation in Porcine Mammary Epithelial Cells via mTOR/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway. *Mol Nutr Food Res.* 2023;67(14):e2200715.

19. Divya MK, Lincy L, Raghavamenon AC, Babu TD. Ameliorative effect of *Apodytes dimidiata* on cisplatin-induced nephrotoxicity in Wistar rats. *Pharm Biol.* 2016;54(10):2149-2157.

20. Fraschini F, Demartini G, Esposti D. Pharmacology of silymarin. *Clinical Drug Investigation.* 2002;22: 51-65.

21. Matsuda T, Ferreri K, Todorov I, et al. Silymarin protects pancreatic beta-cells against cytokine-mediated toxicity: implication of c-Jun NH2-terminal kinase and janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathways. *Endocrinology.* 2005;146(1):175-185.

22. Farghali H, Kameniková L, Hynie S, Kmonicková E. Silymarin effects on intracellular calcium and cytotoxicity: a study in perfused rat hepatocytes after oxidative stress injury. *Pharmacol Res.* 2000;41(2):231-237.

23. Matveev AV, Koniaeva EI, Kurchenko VP, Shchekatikhina AS. *Eksp Klin Gastroenterol.* 2011;(2):130-135.

24. Ferenci P, Dragosics B, Dittrich H, et al. Randomized controlled trial of silymarin treatment in patients with cirrhosis of the liver. *J Hepatol.* 1989;9(1):105-113.

25. Davis-Searles PR, Nakanishi Y, Kim NC, et al. Milk thistle and prostate cancer: differential effects of pure flavonolignans from *Silybum marianum* on antiproliferative end points in human prostate carcinoma cells. *Cancer Res.* 2005;65(10):4448-4457.

26. Singh RP, Deep G, Blouin MJ, Pollak MN, Agarwal R. Silibinin suppresses in vivo growth of human prostate carcinoma PC-3 tumor xenograft. *Carcinogenesis*. 2007;28(12):2567-2574.
27. Deep G, Agarwal R. Chemopreventive efficacy of silymarin in skin and prostate cancer. *Integr Cancer Ther*. 2007;6(2):130-145.
28. Féher J, Lengyel G. Silymarin in the prevention and treatment of liver diseases and primary liver cancer. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13(1): 210-217.
28. Khorsandi L, Saki G, Bavarsad N, Mombeini M. Silymarin induces a multi-targeted cell death process in the human colon cancer cell line HT. *Biomed Pharmacother*. 2017;94:890-897.
29. Ramasamy K, Agarwal R. Multitargeted therapy of cancer by silymarin. *Cancer Lett*. 2008;269(2):352-362.
30. Surai PF. Silymarin as a Natural Antioxidant: An Overview of the Current Evidence and Perspectives. *Antioxidants (Basel)*. 2015;4(1):204-247.
31. Won DH, Kim LH, Jang B, et al. In vitro and in vivo anti-cancer activity of silymarin on oral cancer. *Tumour Biol*. 2018;40(5):1010428318776170.
32. Gharagozloo M, Javid EN, Rezaei A, Mousavizadeh K. Silymarin inhibits cell cycle progression and mTOR activity in activated human T cells: therapeutic implications for autoimmune diseases. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2013;112(4):251-256.
33. Adhikari M, Arora R. Nano-silymarin provides protection against  $\gamma$ -radiation-induced oxidative stress in cultured human embryonic kidney cells. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015;792:1-11.
34. Fatehi D, Rostamzadeh A. letter to the editor: potential effects of diagnostic irradiation from computed tomography on reproductive system and general protective strategies. *Radiat Prot Dosimetry*. 2018;179(2):196-197.
35. Chantarojanasiri T. Silymarin treatment and reduction of liver enzyme levels in non-alcoholic fatty liver disease: a case report. *Drugs Context*. 2023;12:2023-1-4.
36. Ghodousi M, Karbasforooshan H, Arabi L, Elyasi S. Silymarin as a preventive or therapeutic measure for chemotherapy and radiotherapy-induced adverse reactions: a comprehensive review of preclinical and clinical data. *Eur J Clin Pharmacol*. 2023;79(1):15-38.
37. Wang YK, Hong YJ, Huang ZQ. Protective effects of silybin on human umbilical vein endothelial cell injury induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in vitro. *Vascul Pharmacol*. 2005;43(4):198-206.

38. Chu C, Gao X, Li X, et al. Involvement of Estrogen Receptor- $\alpha$  in the Activation of Nrf2-Antioxidative Signaling Pathways by Silibinin in Pancreatic  $\beta$ -Cells. *Biomol Ther (Seoul)*. 2020;28(2):163-171.

39. Zhang T, Kawaguchi N, Tsuji K, et al. Silibinin Upregulates CXCR4 Expression in Cultured Bone Marrow Cells (BMCs) Especially in Pulmonary Arterial Hypertension Rat Model. *Cells*. 2020;9(5):1276.

40. Yu L, Hales CA. Effect of chemokine receptor CXCR4 on hypoxia-induced pulmonary hypertension and vascular remodeling in rats. *Respir Res*. 2011;12(1):21.

## BÖLÜM VI

# AĞIR METAL MARUZİYETİNE BAĞLI DOKULARDA OLUŞAN TOKSİK ETKİLERE KARŞI N-ASETİLSİSTEİNİN TERAPÖTİK ETKİSİ

*Therapeutic Effect of N-Acetylcysteine Against  
Toxic Effects in Tissues due to Heavy Metal Exposure*

**Sercan KAYA**

*(Dr. Öğr. Üyesi), Batman Üniversitesi,  
Sağlık Hizmetleri MYO, Tıbbi Hizmetler  
ve Teknikler Bölümü, sercan.kaya@batman.edu.tr,  
ORCID: 0000-0001-9014-2448.*

### 1. Giriş

Çevre, sürekli olarak doğal ve antropojenik kaynaklardan gelen çeşitli kimyasallara maruz kalmaktadır. Dünyanın birçok bölgesinde hızlı sanayileşme ve kentleşme nedeniyle bu kimyasalların antropojenik kaynaklardan salınması artmaya devam etmektedir. Ağır metaller, her yerde bulunan ve biyolojik olarak parçalanamayan bir grup çevresel kimyasaldır. (1) Ağır metaller, atmosferde uzun süre kalmaları, insan vücudunda biyolojik birikim göstermeleri ve toksik etkileri nedeniyle iyi bilinen çevre kirleticileridir. Ağır metaller su, toprak ve hava gibi alanlarda farklı çevresel elementlerle karışarak son derece toksik hale gelebilmektedir. İnsanlar ve diğer canlı organizmalar besin zinciri yoluyla ağır metallerle maruz kalabilmektedir. (2) Çevresel kirlenme ve ağır metallerle maruz kalma, giderek büyüyen ciddi bir küresel sorundur. (3)

### 2. Ağır Metaller

Ağır metaller, 5 g/cm<sup>3</sup>'ten daha büyük bir spesifik yoğunluğa sahip olan bir grup metal veya metaloiddir. (4) Ağır metal terimi genel olarak insan veya çevre



için potansiyel toksisiteye sahip metaller ve yarı metaller için kullanılmaktadır. (5) Tıp ve sağlık bilimlerinde ağır metal kavramı, elementlerin atomik ağırlıkları dikkate alınmaksızın tüm toksik etki gösteren metalleri içerir. (6)

Ağır metaller toksisitelerine göre esansiyel ve esansiyel olmayan ağır metaller olmak üzere iki gruba ayrılır. Birinci grup esansiyel ağır metaller, düşük konsantrasyonda zararsız veya nispeten daha az zararsız olan bakır, çinko, demir, kobalt ve manganezi içerir. İkinci grup esansiyel olmayan metaller ise düşük konsantrasyonlarda bile oldukça toksik etki gösteren arsenik (As), kurşun (Pb), cıva (Hg) ve kadmiyum (Cd) gibi ağır metallerden oluşur. (7) Vücutta ağır metal yükü yüksek olan bireylerde diyabet, kalp-damar hastalıkları, kısırlık, kanser, nörotoksosite ve böbrek hasarı riski oldukça yüksektir. (8, 9)

### **2.1. Arsenik (As)**

Hem metalik hem de metalik olmayan özelliklere sahip metaloid As, Albertus Magnus tarafından keşfedilmiştir. (10) As'nin elementel formu doğada nadir olmasına rağmen mineralleri çevrede bol miktarda bulunur. Su-kaya bağlantıları, As'nin doğal koşullarda mobilizasyonu ve birikmesinde önemli rol oynar. Tarımsal ve endüstriyel faaliyetlerden kaynaklanan As içeren atıklar, sızıntı olaylarından dolayı yüzey ve yeraltı sularının yanı sıra yüzeyel toprakların da kirlenmesine yol açabilecek önemli bir kirlenme kaynağıdır. (11) Ayrıca, As içeren çok sayıda kimyasal endüstriyel olarak üretilmektedir. Bununla birlikte As bileşikleri amipli dizanteri, sıtma, astım, egzama, frengi, sedef hastalığı, kolera ve tripanozomiyazisin gibi hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır. (5, 12)

### **2.2. Kurşun (Pb)**

Pb, yer kabuğunda eser miktarda bulunan, doğal olarak oluşan mavimsi gri bir metaldir. (13) Çevre, en yaygın Pb kaynağıdır. Ayrıca taşıt yakıtları, plastik boya, seramik, kozmetik, metal ürünler, mühimmat, kurşun-asit piller, X-ışını koruyucu cihazların yapımı ve ilaçlarda dahil olmak üzere oldukça yaygın bir kullanım alanı vardır. (11) Pb, birçok organ üzerinde yüksek toksik etkiye sahip, zararlı bir çevre kirleticidir. Pb, deriden emilebilmesine rağmen çoğunlukla solunum ve sindirim sistemlerinden emilir. Pb'ye maruz kalma, bağışıklık modülasyonu, oksidatif ve inflamatuvar mekanizmalar nedeniyle nörolojik, solunum, üriner ve kardiyovasküler bozuklukları tetikleyebilir. (14) Pb maruziyeti, vücudun fizyolojik fonksiyonlarında değişikliğe neden olabilir ve birçok hastalıkla ilişkilidir. (15) Ayrıca akyonun, Pb ile karıştırılması son yıllarda insan sağlığına yönelik bir tehdit olarak değerlendirilmektedir. (16)

### 2.3. Cıva (Hg)

Hg, doğada en sık rastlanan zararlı metallere biri olarak bilinir. Özellikle su, toprak ve beklenmedik şekilde gıdalarda yaygın olarak bulunur. (17) Dünya genelinde, sıklıkla deniz ürünleri tüketen insanlar Hg zehirlenmesi açısından yüksek risk altındadır. (18) Düşük Hg seviyelerine maruziyetin, nöronal hasar (19), multipl skleroz (20), Alzheimer (21), hipokampal disfonksiyon ve bilişsel bozukluklara (22) neden olduğu rapor edilmiştir. Hg, mikrotübül polimerizasyonunu inhibe ederek nöronal rejenerasyonu sekteye uğratmaktadır. (23) Özellikle Hg tarafından indüklenen nöronal hasardan en fazla etkilenen hedef bölgenin mitokondriiler olduğu kabul edilir. (24) Ayrıca akut Hg maruziyeti mitokondriyal değişiklik, oksidatif stres, böbrek ve karaciğer dokularında stres proteinlerinin aktivasyonu gibi bazı dikkate değer değişikliklere neden olmaktadır. (25, 26) Özellikle böbrekler inorganik Hg'nin ana hedefi olup maksimum miktarda Hg birikimi rapor edilmiştir. (27, 28)

### 2.4. Kadmiyum (Cd)

Metal endüstrisi, pil üretimi, kontamine gıda ve su, kirli hava veya tütünün solunması yoluyla insan ve diğer canlılar, Cd'ye kolaylıkla maruz kalabilmektedir. (29) Cd, özellikle karaciğer ve böbrek başta olmak üzere akciğer, duodenum, pankreas, kemik, beyin ve testis dokularında birikerek doku hasarına yol açmaktadır. (30-32) Karaciğer ve böbreklerin Cd toksisitesine karşı özellikle hassas olmalarının nedeni, bu dokuların Cd iyonlarını sıkı bir şekilde bağlayarak hücreyi koruyan, Cd ile indüklenebilir proteinler olan metalotiyoneinleri (MT'leri) sentezleme yeteneğinden kaynaklanabilir. MT, serbest radikalleri temizleyerek görev yapabilen çinko konsantre bir proteindir. MT'leri içeren hücreler Cd toksisitesine dirençliyken, MT'leri sentezleyemeyen hücreler Cd zehirlenmesine karşı duyarlıdır. (33) Cd maruziyeti, aşırı reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesine, oksidatif strese, apoptoza, mtDNA mutasyonuna, gen ekspresyonu değişikliklerine, solunum zinciri komplekslerinin ve ATP sentezinin inhibisyonuna ve son olarak iç mitokondriyal geçirgenliğin değişmesine neden olur. (34) Ayrıca Cd maruziyetinin nörotoksositeye (35, 36), nefrotoksositeye (37), kardiyovasküler sistem hastalıklarına (38), hematolojik parametrelerin değişikliğine (39), demir eksikliği anemisine (40), obstrüktif akciğer hastalığı ve pulmoner fibrozis (41, 42) gibi birçok patofizyolojik duruma neden olduğu rapor edilmiştir.

### 2.5. Alüminyum (Al)

Yerkabuğunda en çok bulunan metalik elementtir. (43) Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, belirlenmiş tolere edilebilir günlük Al alımı, vücut ağırlığı kg'ı başına 1 mg'dır. Ancak artık özellikle insanlar ve diğer canlılar çeşitli nedenlerden dolayı Al'ye aşırı maruz kalmaktadır. (44) Al'nin çeşitli hidrasyon derecelerine sahip organik ve mineral kompleksleri oluşturma yeteneği, Al'nin katı fazdan sıvı faza (toprak-su) transferine yardımcı olur. (45) Ayrıca Al, asidik ortamda oldukça çözünür olduğundan asit yağmuru çevredeki suda çözülmüş Al miktarının artmasına neden olabilir. (46) Asit yağmurları aracılığıyla çay yaprakları, kahve çekirdekleri gibi bazı bitkilerde Al seviyesi artmaktadır. (47) Her ne kadar bazı gıda kaynakları doğal olarak Al içerse de yediğimiz kahve, kabartma tozu, bisküvi, pirinç gibi gıdaların çoğunda katkı maddesi olarak Al bulunmaktadır. (48) Bunun yanı sıra, yalnızca gıdalardaki Al değil, aynı zamanda mutfak eşyaları ve pişirme araç gereçleri önemli miktarda Al maruziyetine neden olabilir. (49) Al, bebek mamaları ve bazı aşuların bileşeni olarak insan sağlığını ciddi anlamda tehdit eder. (48) Al maruziyeti özellikle insanlarda Alzheimer hastalığı ile ilişkilendirilmiştir. (50, 51) Ayrıca Al'nin nefrotoksisite (52, 53), hepatotoksisite (54), kardiyotoksisite (55), testiküler hasar (56, 57) ve osteomalazi (58) gibi oldukça geniş yelpazede metabolizma üzerinde olumsuz etkisi olduğu rapor edilmiştir.

Bu çalışmada organizmada bilinen faydalı bir biyolojik fonksiyonu olmayan, çevre ve günlük yaşamda sıklıkla maruz kalınan, maruziyetinin düşük dozlarının bile dokularda birikime ve hasara neden olabileceği As, Pb, Hg, Cd ve Al ağır metallerinin toksik etkilerine odaklanılmıştır.

### 3. N-Asetil Sistein (N-AS)

N-asetilsistein (N-AS), mukolitik özelliklere sahip, sülfhidril içeren bir bileşiktir. N-AS'ın özellikleri arasında glutasyon S-transferaz aktivitesinin artırılması, glutasyonun yenilenmesi, antioksidan, antiinflamatuvar ve mukolitik özelliklerinin yanı sıra sistein disülfür moleküllerini çapraz bağlayarak protein yapılarının stabilize edilmesi yer alır. (59) Şimdiye kadar yapılan çalışmalar özellikle N-AS'ın üç biyolojik etkisi üzerine odaklanmıştır.

#### 3.1. Disülfür İndirgeyici Özelliği

N-AS'ın mukoid salgıların sıvılaştırılmasında etkili bir ajan olduğu fark edilmiştir. İlk klinik çalışma, N-AS'ın bir dizi akut ve kronik obstrüktif akciğer

hastalığından muzdarip hastalarda trakeobronşiyal hava yolunu temizlediğini doğrulamıştır. (60) Başlıca mukus proteinleri olan müsinlerin, sistein (Cys) açısından zengin olup molekül içi ve arası disülfid köprüleri tarafından stabilize edilen büyük agregatlar oluşturdukları bilinmektedir. (61, 62) Ayrıca diğer küçük monotioller gibi N-AS'ın da proteinler veya diğer moleküllerdeki disülfid bağlarını doğrudan azaltma kabiliyeti vardır. Ancak, bu durumun N-AS konsantrasyonunun en azından mM aralığına ulaştığı durumlarla sınırlı kaldığı ileri sürülmüştür. (63)

### 3.2. *Antioksidan Özelliği*

N-AS'ın, özellikle süperoksit ve peroksitler olmak üzere ROS'u doğrudan temizleyerek hücreleri oksidatif hasara karşı koruyabildiği bilinmektedir. Bunun nedeni muhtemelen, tiyol gruplarının in vitro oksidasyona duyarlı olduğunun ve bunların oksidanlarla reaksiyonlarının termodinamik açıdan oldukça olumlu olduğunun uzun süredir bilinmesidir. (64) Ancak kritik parametre reaksiyon kinetiğidir. Örneğin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin N-AS tarafından indirgenmesi, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin tiyol peroksidazlar tarafından indirgenmesinden çok daha yavaştır. (65, 66) Bu durum dikkate alındığında, N-AS'ın sitoprotektif etkilerinin doğrudan N-AS'ın antioksidan özelliğinden mi? yoksa alta yatan farklı mekanizmalar aracılığıyla mı? gerçekleştirildiğinin aydınlatılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

### 3.3. *Glutasyon (GSH) Takviye Edici Özelliği*

N-AS'ın, parasetamol (asetaminofen) zehirlenmesinin neden olduğu ciddi karaciğer hasarına karşı koruma sağladığı klinik çalışmalarla doğrulanmıştır. (67) Parasetamol zehirlenmesinde N-AS, elektrofilik parasetamol metaboliti N-asetil-p-benzokininon imin tarafından tüketilen GSH'ı yenilemek için Cys'in bir ön ilacı olarak görev yapar. (68) Bu mekanizmada, yüksek miktarlarda elektrofil oluşturulur ve karşılık gelen sayıda GSH molekülüne konjuge edilir. GSH-elektrofil konjugatları, ABC taşıyıcıları yoluyla karaciğer hücreleri ve organizmadan atılır. (69) Bu atılımla birlikte karaciğer hücrelerinde önemli miktarda GSH kaybı ortaya çıkar. Bu durumda hücre içi GSH'ın yeniden sentezi gereklidir ve Cys, yeni GSH sentezi için sınırlayıcı substrattır. (70) Sonuç olarak harici Cys tedarikinin kritik olduğu bu dönemde N-AS, akut GSH tükenmesiyle başa çıkmak için bir Cys kaynağı sağlamaktadır.

N-AS'ın doğrudan disülfür azaltıcı ve oksidan temizleme aktiviteleri göstermediği ancak bu aktivitelerin N-AS'dan türetilen metabolitler, GSH

ve H<sub>2</sub>S/sülfan sülfür türleri tarafından kolaylaştırıldığı yakın zamanda rapor edilmiştir. Bu metabolitler, daha önce tükenmiş olan GSH seviyelerinin yenilenmesi, glutaredoksinler (GRX) yoluyla enzimatik disülfid indirgemesini, glutatyon S-transferazlar (GST) ile elektrofil detoksifikasyonunu ve glutatyon peroksidazlar (GPX) ile (lipid) peroksit temizlenmesini desteklemektedir. Ayrıca, sülfan sülfür türleri doğrudan serbest radikal temizleyicileri olarak hareket edebilir ve proteinleri geri dönüşü olmayan oksidatif hasara karşı koruyabilir. (63) Son yıllarda N-AS ile ilgili, psikiyatri ve nörolojide (71), metabolik hastalık (72), akciğer hastalıkları (73), korona virüsü 2 (SARS-CoV-2) gibi akut solunum yolu sendromları (74), infertilite (75) ve metal toksisitesi için şelatör olarak (76) kullanımı da dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda birçok sistematik inceleme yapılmıştır. Metal kalça protezi sıklıkla kanda kromun artmasına neden olurken N-AS, artan krom seviyelerinin güvenli bir şekilde azaltılmasına yardımcı olmuştur. (77) Çift-kör, plasebo kontrollü bir çalışma N-AS ile Pb'nin vücuttan uzaklaştırılmasına ilişkin sağlam kanıtlar sunmuştur. (78) Bununla birlikte N-AS ile ilgili yapılan deneysel hayvan çalışmalarında da karaciğer (79), beyin (80), böbrek (81), kalp (82) gibi önemli yapılarda koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir. Ayrıca N-AS'ın, klinik insan çalışmalarında olduğu kadar deneysel hayvan çalışmalarında da toksik metalleri şelatladığı bildirilmiştir. (59)

Bu çalışma As, Pb, Hg, Cd ve Al ağır metallerinin dokulardaki toksik etkilere karşı N-AS'ın tedavi edici rolünü ve etkinliğini özetlemeyi amaçlamaktadır.

#### **4. Ağır Metaller ve N-Asetil Sistein (N-AS)**

N-AS, bir amino asit olan sisteinin bir türevidir. N-AS, Hg, Cd, As, krom ve altın dahil olmak üzere metalleri uzaklaştırmak için bir şelatör görevi görebilir. (83) Şelatlayıcı maddeler, metal iyonlarıyla kompleks oluşturabilen ve dolayısıyla toksisitelerini azaltabilen bileşikler olarak tanımlanır. N-AS'ın şelatlama kapasitesi, karboksil grubu ile kombinasyon halindeki tiyol grubu tarafından modüle edilir. Bu nedenle N-AS, özellikle Hg, Cd veya As zehirlenmesine karşı akut ağır metal zehirlenmelerini tedavi etmek için kullanılır. (76) Ayrıca N-AS, tiyol içeren doğal bir antioksidandır, sistein ve glutatyonun öncüsüdür ve ağır metal iyonları için potansiyel bir detoksifikasyon maddesidir. (84)

##### **4.1. Arsenik Toksisitesinde N-Asetil Sistein**

As maruziyeti, kardiyovasküler anormalliklere, nörolojik bozukluklara, karaciğer ve böbrek hastalıklarına neden olur. (85) Aynı zamanda As, çeşitli

tümörlerin oluşumunda rol oynamaktadır ve grup I kanserojen olarak sınıflandırılır. (86) Çevrede As hem organik hem de inorganik formlarda bulunur. As'nin başlıca inorganik formları arasında üç değerlikli meta-arsenit ( $As^{+3}$ ) ve beş değerlikli arsenat ( $As^{+5}$ ) bulunur. İki form arasında toksikolojik olarak en güçlü As bileşiği  $As^{+3}$ 'tur. Bunun nedeni,  $As^{+3}$ 'ün proteinlerdeki kükürt ile etkileşimi ve oksidatif stres oluşturma yeteneğidir. Ancak insanlar hem  $As^{+3}$  hem de  $As^{+5}$ 'e maruz kalmaktadır. (12) Spesifik olarak, inorganik As'ler mitokondriyal solunumu inhibe ederek oksidatif stresi indükler ve ROS oluşumunu arttırır. Bunun sonucunda da DNA mutasyonlarına neden olabilir ve kanser gelişimine katkıda bulunabilir. (87)

Yapılan bir çalışma, moleküler formdaki oksijenin dimetilarsin ile reaksiyona girerek dimetilarsinik radikal ve süperoksit anyonu oluşturduğunu göstermiştir. İkinci oksijen molekülü daha sonra birleşerek dimetilarsinik peroksil radikalini oluşturur. Bu As radikallerinin hücrelere zararlı olduğu rapor edilmiştir. (88) Bazı çalışmalar ise, As'nin neden olduğu hücre hasarı, hücre ölümü ve kanserin birincil mekanizmasının, NAD bağlantılı substratlar tarafından desteklenen mitokondriyal solunumun inhibisyonunu içerdiğini ve kofaktör lipoik asidin piruvat dehidrojenaz kompleksi için kullanıldığını bildirmiştir. (87, 89) Üç değerlikli organik As'lerin GSH ve tioredoksin redüktazı inhibe ettiği ve dolayısıyla hücrelerin oksidan kaynaklı toksisiteye karşı koruma yeteneğini azaltabileceği rapor edilmiştir. (90) Tiyoredoksinin ayrıca transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanmasının düzenlenmesindeki rolü nedeniyle gen ekspresyonunu etkilediği de bildirilmiştir. (91)

Tiyol bazlı antioksidan ve indirgenmiş glutatyonun öncüsü olan N-AS, hücresel bileşenlerin oksidatif hasara karşı korunmasında ve birçok elektrofilin detoksifikasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. N-AS'ın koruyucu mekanizması, hücre içinde azaltılmış GSH seviyelerini uyarma ve sürdürme yeteneğinden kaynaklanır, böylece hücre içi GSH seviyelerini korur ve ROS'u detoksifiye eder. (92) N-AS'ın diğer bir avantajı metal şelatlama özelliğine sahip olmasıdır. N-AS'ın çinko ile birlikte takviyesinin, sıçan karaciğer ve böbrek dokularında As kaynaklı oksidatif yükü azalttığı öne sürülmüştür. (93) As maruziyeti sonrası N-AS ve süksimerin kombinasyonunun uygulanması, As'nin organlardan önemli ölçüde uzaklaştırılmasını sağladığı bildirilmiştir. (94) Bir başka çalışmada N-AS'ın, As kaynaklı oksidatif strese karşı koruyucu etkileri rapor edilmiştir. (92) Ayrıca N-AS'ın, mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit (DMSA) ile terapötik kombinasyonu sıçanlarda As şelasyonu sırasında daha fazla etkinlik sağlamaktadır. (95, 96)

As yaygın olarak toksik bir metaloid olarak bilinmesine rağmen, As trioksitini ( $As_2O_3$ ) akut promyelositik lösemi hastalarında hücre farklılaşmasını ve apoptozu indükleyerek terapötik etki göstermiştir. (97) Bununla birlikte  $As_2O_3$ 'ün beyin tümörlerinin tedavisi için güçlü bir potansiyel kemoterapötik ajan olabileceği rapor edilmiştir. (98)

#### 4.2. Kurşun Toksisitesinde N-Asetil Sistein

Pb zehirlenmesinin en önemli endişe kaynağı ve aynı zamanda ana nedeni mesleki maruziyettir. (99) Radyasyon kalkanları, mühimmat, cerrahi ekipmanlar, devre kartları, seramik cilalar gibi Pb içeren ürünlerin çalışma tesisleri toksisite olasılığını artırır. (100) Çalışmalar Pb mesleki maruziyetinin, nefropati gelişiminde önemli tehdit unsuru olabileceğini düşündürmektedir. (101) Kronik Pb nefropatisi, böbrek biyopsisinde orta derecede fokal atrofi, proksimal tübül kaybı ve interstisyel fibrozis ile kendini gösteren, yıllar süren Pb maruziyeti nedeniyle meydana gelmektedir. (102) Pb'nin vasküler yapıların geçirgenliğini ve kollajen sentezini değiştirebildiği de öne sürülmüştür. (99) Pb maruziyeti ile polimorfonükleer lökositler gibi hücrelerinin aktivitesinin azalması, bağışıklık sistemini olumsuz yönde etkilemektedir. (103) Ayrıca Pb kaynaklı oluşan hücre zarı hasarı eritrositlerin kırılma hale gelmesine ve parçalanmasına neden olur. Bunun bir sonucu olarak anemi ortaya çıkabilir. (104) Anemiye neden olan Pb zehirlenmesinin ana nedenlerinden biri, Pb'nin hemoglobinde bulunan kofaktör olan hem biyosentezinde önemli olan delta-aminolevulinik asit dehidrataz veya ALAD adı verilen temel bir enzimin aktivitesine müdahale etmesidir. (100) Aminolevulinik asit gibi hem öncüllerinin, nöronlara doğrudan veya dolaylı olarak zararlı olabilecek Pb ile etkileşime girmeleri nedeniyle biriktiği bulunmuştur. (105) Yapılan bir araştırmada, karaciğerde organik Pb birikiminin oksidatif strese ve protein bozulmasına neden olduğu, bunun da ER stresi ve ardından karaciğer yaralanmalarıyla sonuçlanabileceği bildirilmiştir. (106) Yapılan bir başka çalışma, hem Pb maruziyetinin hem de yüksek yağlı diyetin osteoblastogenezi baskıladığını, progenitor hücre farklılaşmasını değiştirdiğini, osteoklastogenezi teşvik ettiğini ve adipogenezi arttırdığını rapor etmiştir. (107)

Uzun süreli düşük dozda Pb'ye maruz kalmanın, erkek sıçanlarda hipotalamus ve hipofiz bezi arasında ki sinyal iletimini değiştirdiği gösterilmiştir. Bunun bir sonucu olarak, erkek sıçanlarda ki gonadotropin salgılayan hormon sistemi değişmektedir. (108) Hem erkeklerin hem de kadınların üreme sistemi Pb maruziyetinden etkilenir. Erkeklerde, kandaki Pb düzeyi 40  $\mu\text{g/dL}$ 'yi aştığında sperm sayısı azalır ve sperm hacminde değişiklikler meydana gelir. Spermin



genel morfolojisi ve hareketliliği gibi aktiviteler de bu seviyeden sonra olumsuz yönde etkilenir. (109) Toksik Pb seviyeleri kadınlarda ise düşüklere, erken doğuma, düşük doğum ağırlığına ve çocukluk dönemindeki gelişim sorunlarına yol açabilir. (110) Beyin Pb'ye maruz kalmaya en duyarlı organdır. (111) Çocuğun gelişmekte olan beyninde, serebral kortekste, sinaps oluşumu Pb'den büyük ölçüde etkilenir. Pb ayrıca nörotransmitterler dahil nörokimyasalların gelişimine ve iyon kanallarının organizasyonuna da müdahale eder. (112) Pb zehirlenmesi ayrıca nöron sayısının azalmasına, miyelin kılıfının kaybına, nöron büyümesini yavaşlamasına neden olur ve nörotransmisyonu müdahale eder. (113) Pb'ye maruz kalan sıçanlarda beyin öğrenme ve hafızayla ilgili bir parçası olan hipokampüste, düzensiz çekirdekler ve miyelinin denatürasyonu gibi yapısal hasarlar rapor edilmiştir. (114)

Pb zehirlenmesi ciddi bir endişe kaynağıdır, ancak daha da önemlisi önlenelidir. Kuşkusuz en iyi yaklaşım Pb'ye maruz kalmaktan kaçınmaktır. (115) Pb zehirlenmesinin tedavisi dimerkaprol ve süksimerden oluşur. (110) Özellikle çocuklarda Pb zehirlenmesinin neden olduğu bilişsel bozukluklara ilişkin kalıcı bulgular nedeniyle, maruziyetin yaygın şekilde azaltılması zorunlu olmalıdır. (101) Pb zehirlenmesi genellikle etilen-diamin-tetrasetik asitin (EDTA) disodyum tuzunun kalsiyum şelatı olan şelat tuzu disodyum kalsiyum edentat kullanılarak tedavi edilir. Bu tür şelatlayıcı maddeler, uzaklaştırıcı maddeye karşı büyük bir afiniteye sahiptir. Pb için şelatlama maddesinin Pb'ye afinitesi kalsiyumdan daha fazladır ve bu nedenle Pb şelat değişim yoluyla oluşur. Bu daha sonra idrarla atılır ve geride zararsız kalsiyum kalır. Pb'a maruz kalan çocuklarda şelasyon tedavisi olarak kullanılan süksimer tedavisinin, nöropsikolojik gelişimlerini iyileştirmek için kandaki Pb seviyelerini düşürdüğü gösterilmiştir. Her ne kadar süksimerinin kandaki Pb düzeylerini düşürmede başarılı sonuçlar gösterebileceği biliş testlerinde istenilen ölçüde başarı sağlayamamıştır. (116) Yukarıda bahsedildiği gibi N-AS ve süksimerin kombinasyonunun, As'nin organlardan önemli ölçüde uzaklaştırılmasında etkili olduğu gibi (94), benzer şekilde süksimerin ve N-AS kombinasyonu Pb maruziyetinde istenilen sonuçların alınmasına katkı sağlayabilir.

Pb'a mesleki olarak maruz kalan bir grup işçi üzerinde yapılan bir araştırma, N-AS tedavisi ile kandaki Pb seviyelerinin önemli ölçüde azaldığını göstermiştir. Bununla birlikte N-AS verilen tüm grupların glutamat dehidrojenaz aktivitesinin önemli ölçüde arttığı rapor edilmiştir. N-AS tedavisinin homosistein düzeyini normalleştirdiği ve oksidatif stresi azalttığı da bildirilmiştir. Birlikte ele alındığında N-AS tedavisinin insanlarda özellikle kronik Pb toksisitesi için



alternatif bir tedavi olarak önerilebilir. (117) Ayrıca yapılan bir başka araştırma vücuttaki Pb seviyelerinin azaltılması konusunda öne çıkan yöntemlerin şelasyon tedavisi, nano-enkapsülasyon ve N-AS olduğunu bildirmiştir. (101)

### 4.3. Cıva Toksisitesinde N-Asetil Sistein

Hg, volkanik ve jeotermal faaliyetlerden salınan, çevrede doğal olarak bulunan iki değerlikli bir metaldir. Bununla birlikte endüstriyel, tarımsal ve fosil yakıtların yakılması gibi antropojenik faaliyetler çevresel Hg seviyelerinin artmasına neden olur. (118) Mesleki maruziyet haricinde insanlar için özellikle endişe kaynağı olan Hg'nin üç ana formu; metilcıva (MeHg), cıva buharı ( $Hg^0$ ) ve etilcıva (EtHg) bulunur. (119) MeHg içeren balıkların tüketilmesi Hg'ye maruz kalmanın en yaygın yoludur.  $Hg^0$  maruziyeti genellikle diş amalgam dolgularından salınması nedeniyle oluşur. EtHg'ye maruz kalma ise, Thimerosal içeren aşıların kullanımından kaynaklanır. (120) Hg'nin elektrofilik doğası nedeniyle, organizma tarafından emildikten sonra sırasıyla sistein (Cys) ve selenosisteindeki tiyoller ve selenoller gibi nükleofilik grupları bağlar. Bu, bu grupları içeren peptit ve proteinlerin Hg tarafından hedeflendiğini göstermektedir. (121)

Hg bileşiklerinin GSH gibi sistein içeren bileşiklerle konjugasyonu öncelikle detoksifikasyonu kolaylaştırır. (27) Ancak metabolizma sırasında toksisiteyi de tetikleyebilir. MeHg-Cys kompleksinin amino asit metiyonini taklit etmesinden ve dolayısıyla nötr amino asit taşıyıcıları tarafından membranlar boyunca taşındığından, MeHg'nin Cys'deki tiyole bağlanarak merkezi sinir sistemine erişim kazanabileceği gösterilmiştir. (122) Benzer şekilde  $Hg^{+2}$ 'nin, sistin (Cys-Cys) ve glutatyon disülfüre (GSSG) benzer kompleksler oluşturan iki Cys veya GSH molekülünü bağladığı bilinmektedir. Bu tür konjugatların oluşumu, merkezi sinir sistemi, böbrekler, karaciğer, bağırsak ve plasentadan  $Hg^{+2}$  ve MeHg alımı ve atılımında rol oynamaktadır. (27) Ek olarak, Hg'nin kovalent bağlanmasıyla üretilen Cys içeren enzimlerin inhibisyonu, ROS üretiminin ve oksidatif stresin artmasına neden olabilir. (118) Aşırı Hg yükü, hücrenin antioksidan kapasitesinde ciddi sonuçlar doğuracak şekilde azalmış GSH'nin belirgin şekilde tükenmesine neden olabilir. (123)

MT'ler, Cys kalıntıları bakımından zengin düşük molekül ağırlıklı ve aromatik amino asitler içermeyen proteinlerdir. (124) Bu nedenle MT'ler, ağır metal iyonlarıyla kompleks oluşturabilen çeşitli tiyol grupları içerir.  $Hg^0$  ve MeHg'nin dokularda, özellikle böbrek ve karaciğerde  $Hg^{+2}$ 'ya dönüştükten sonra MT sentezini indüklediği bilinmektedir. (125) Böbrekler,  $Hg^0$  ve  $Hg^{+2}$

maruziyetini takiben Hg birikiminin ana organlarıdır ve tüm Hg formları nefrotoksisiteye sebep olur. (27) Bununla birlikte, hem sentezi, önemli bir fizyolojik süreçtir ve başlangıç substratından (Succinil CoA) son hem grubuna kadar çeşitli ara ürünleri ve enzimatik süreçleri içerir. (126) Hg, üroporfirinojen dekarboksilaz (UROD) enzimlerini ve özellikle koproporfirinojen oksidaz (CPOX) enzimlerini hedef alır, böylece bazı porfirinlerin birikmesine ve atılmasına yol açar. (127)

Hg bileşiklerinin hem lizozomal hem de mitokondriyal membranlara verdiği hasar apoptotik hücre ölümüne yol açabilir. (128) Çeşitli çalışmalar insanlarda artan lipit peroksidasyonu ve Hg maruziyeti arasında bir bağlantı olduğunu göstermiştir. Örneğin bir çalışmada, Hg<sup>0</sup>'a maruz kalan madencilerde, serum MDA seviyeleri ile maruz kalma arasında pozitif bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir. (129) Ayrıca Hg maruziyetinden kaynaklanan oksidatif stres, proteinlerin modifikasyonuna yol açabilir. MeHg glutamat, sistin ve sistein alımının inhibisyonunu indükleyerek hücre içi GSH içeriğini ve astrositlerdeki redoks durumu olumsuz yönde etkileyebilir. (130)

Hg detoksifikasyonu için farklı şelasyon ajanları kullanılmaktadır. Bunlar arasında en etkili olanlar 2,3-dimerkapto-1-propansülfonik asit (DMPS) ve 2,3-dimerkaptosüksinik asit iken ayrıca D-penisilamin, N -asetil-D-penisilamin ve 2,3-dimerkapto-1-propanol de yer almaktadır. (83) Deneysel çalışmalar, L-sistein ve glutatyonun öncüsü güçlü bir antioksidan olan N-AS'ın (131), inorganik ve organik Hg gibi ağır metal iyonlarına karşı panzehir görevi görebileceğini göstermiştir. (83)

N-AS oral uygulanmasının, farelerde MeHg'nin idrarla atılımını hızlandırdığı ve N-AS'ın, MeHg'nin böbreklerden atılımını arttırmada DMPS veya D-penisilamin'den daha etkili olabileceği ileri sürülmüştür. (132) Bununla birlikte, N-AS tedavisi ile HgCl<sub>2</sub>'nin atılımı hakkında çelişkili raporlar da vardır. Yapılan bir çalışma, HgCl<sub>2</sub> ve N-AS (veya DMPS) maruziyetinin farelerde renal Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase aktivitesini inhibe ettiğini ve N-AS (veya DMPS) ile Hg komplekslerinin renal Hg birikimini tetikleyerek Hg toksisitesini arttırabileceğini ileri sürmüştür. (133) N-AS kullanılarak insan kanında Hg türlerinin detoksifikasyonuna ilişkin bir in vitro çalışmada, plazma numunelerine CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup>, Hg ve N-AS eklenmiştir. Çalışmada kütle spektrometrisi ile birleştirilmiş sıvı kromatografisi, baskın türlerin sırasıyla CH<sub>3</sub>Hg(NAC) ve Hg(NAC)<sub>2</sub> olduğunu, ancak Hg-GSH eklentisinin gözlenmediği rapor edilmiştir. (134) Dolayısıyla bu komplekslerin vücuttaki Hg seviyesini düşürdüğü ve fizyolojik koşullar altında oluşan Hg-GSH komplekslerinin, N-AS gibi antidotların varlığında kolaylıkla

parçalanarak GSH açığa çıkardığı öne sürülmüştür. (135) Farklı çalışmalar, HgCl<sub>2</sub> toksisitesinin tedavisi için N-AS kullanıldığında GSH sentezinin desteklendiğini ve protein olmayan tiyollerin seviyesinin arttığını bildirmektedir (136, 137). N-AS, fizyolojik pH'ta Hg iyonlarına karşı glutatyon, metaloregülatör protein (MerR) ve MT'lere benzer davranış gösterir ve inorganik Hg'ye karşı bir panzehir görevi görmektedir. (135)

#### **4.4. Kadmiyum Toksisitesinde N-Asetil Sistein**

Cd'den kaynaklanan çevresel kirlenmelerin çoğu, Cd ve diğer ilişkili çinko, bakır, Pb gibi metallerin işleme ve eritme tesislerine yakın alanlarda meydana gelir. Cd toprakta kalma ve birikme eğilimindedir. Bu nedenle bitkilerin metabolizmasına girer. Meyveler ve tohumlar da dahil olmak üzere yenilebilir bitki kısımlarında birikmesi, Cd'nin besin zincirine girmesine yol açar. (138) Genel popülasyonda meydana gelen Cd'ye maruz kalmanın ana yolları, Cd ile kirlenmiş gıdaların tüketilmesi ve sigara içimidir; çünkü tütün bitkileri, çinkoya benzerliği nedeniyle Cd'yi kirli topraktan alır. (139) Sigara içmeyenlerle karşılaştırıldığında, tütün içenlerde Cd düzeyleri böbreklerde iki ila üç kat daha yüksektir. (140)

Cd toksisitesinden en çok etkilenen organlar böbreklerdir. Vücuttaki Cd'nin yaklaşık %30'u böbrek tübül bölgesinde birikir ve MT'lere bağlanmayan Cd miktarıyla orantılı olarak tübüler hasara neden olur. (34) Diyabet hastaları üzerinde yapılan bir çalışmada, Cd'ye maruz kalma nedeniyle böbrek tübüler hasarına kontrollere göre daha duyarlı olduğu rapor edilmiştir. (37) Cd maruziyetiyle ilişkilendirilebilecek diğer bir yaygın hastalık ise osteoporoz ve/veya osteomalazidir. Cd, böbreklerde D vitamini alımını bozduğu için kemikler üzerinde zararlı bir etkiye sahiptir. Cd aynı zamanda bağırsaklarda kalsiyum emilimini önleyerek Itai-Itai hastalığı gibi genel kemik hastalığına neden olur. (141) Cd'nin testislerde germ hücrelerinin seminifer epitelyum boyunca normal göçüne müdahale edebildiği gösterilmiştir. Ayrıca, testis büyüme hızının, plazma testosteron düzeyinin, sperm sayısının ve hareketliliğinin azalması, Cd kaynaklı oksidatif stresle ilişkilendirilmiştir. (142) Cd toksisitesinden etkilenen bir diğer yapı kardiyovasküler sistemdir. Cd, endotelial nitrik oksit sentazının inhibisyonu ve asetilkolinin neden olduğu vasküler gevşemenin baskılanması yoluyla hipertansiyona neden olabilir. (38) Akciğerler aynı zamanda Cd toksisitesi için hedef organdır. Kronik Cd maruziyetinde ilerleyici pulmoner fibrozis ve obstrüktif akciğer hastalığıyla birlikte akciğer fonksiyonunda bozulma meydana gelebilir. (41) Cd aynı zamanda karmaşık bir mekanizma ile nörolojik fonksiyon

bozukluğuna ve beyin toksisitesine de neden olur. (35) Çeşitli dokulardaki Cd biyobirikimi, çoğalma ve farklılaşma gibi hücre işlevselliğini etkiler ve serbest radikalleri doğrudan üretememesine rağmen ROS türlerinin değiştirilmesi yoluyla oksidatif stresten sorumludur.  $Fe^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  gibi aktif metal iyonlarını proteinlerdeki metal bağlanma bölgelerinden uzaklaştırır. Ortaya çıkan oksidatif stres, hücre hasarı ve apoptozu indüklebilir. (143) Mitokondriye Cd bağlanması, düşük konsantrasyonlarda bile hem hücre solunumu hem de oksidatif fosforilasyonu inhibe edebilir. (144, 145) Bu oksidatif mekanizmalarla Cd'nin hemen hemen tüm önemli DNA onarım sistemlerine müdahale ettiği gösterilmiştir. (34, 146)

İnsan vücudu tarafından emilen Cd miktarı MT'lerin kompleks oluşturma kapasitesini aşarsa, metalin esas olarak böbrek ve karaciğerde birikmesi, geri kalanının ise diğer organlara dağılması söz konusudur. Cd, insan vücudunda 10-30 yıllık son derece uzun bir yarı ömre sahiptir. (147) İnsanlar, spesifik işlevi çinko metabolizmasını düzenlemek olan, her yerde bulunan küçük, sistein açısından zengin proteinlerden oluşan bir aile olan MT'ler varlığı sayesinde, düşük Cd konsantrasyonlarına kronik maruz kalmaktan korunur. MT'ler çeşitli ağır metallerden kaynaklanan iyon toksisitesine, DNA hasarına ve oksidatif strese karşı korunmada önemli roller oynar. Birçok sülfhidril grubunun (-SH) varlığı sayesinde MT'ler, tolere edilebilir maruziyetler altında, hemen hemen tüm Cd iyonlarını kompleks haline getirebilirler. (148) Böbreklerde ortaya çıkan  $Cd^{+2}$  kompleksleri kısmen idrarla atılır. MT'lerin sistein içeriği %30'a kadar çıkabilir. Bu kalıntılar motifler halinde düzenlenebilir (örn. Cys-x-Cys veya Cys-xx-Cys) ve bu durum metal bağlayıcı kümelerin oluşumu için temeldir. (149) N-AS, MT'lerin biyosentezinde olası bir anahtar role sahip bir sistein grubu donörü olarak araştırılmıştır. Eksojen N-AS'ın MT üretimini artırabildiği ve  $Cd^{+2}$ 'ye bağlanma ve elimine etme olasılığını artırabildiği rapor edilmiştir. (150) Yapılan çalışmalar  $CdCl_2$  uygulamasının antioksidan enzim aktivitelerini önemli biçimde azalttığını (151, 152), ancak N-AS tedavisinin  $CdCl_2$  kaynaklı azalan antioksidan enzimlerinin aktivitesinde önemli bir artışa neden olduğunu bildirmiştir. (153, 154) Yapılan yakın tarihli bir çalışma, düşük konsantrasyonlarda N-AS tedavisinin  $Cd^{+2}$  sitotoksitesini ROS üretiminin beklenmedik bir şekilde artmasıyla önemli ölçüde güçlendiğini öne sürmüştür. Ancak aynı çalışma, yüksek konsantrasyonlarda N-AS tedavisinin ise şelasyon nedeniyle Cd kaynaklı sitotoksik etkileri önlediğini rapor etmiştir. Ayrıca çalışmada  $Cd^{+2}$ 'nin hücre alımının azalmasının muhtemelen N-AS ile şelasyonundan kaynaklandığı bildirilmiştir. (155)

#### 4.5. Alüminyum Toksisitesinde N-Asetil Sistein

Yerkabuğunda bol miktarda bulunması ve günlük yaşamda yaygın olarak kullanılması nedeniyle, insanların mesleki maruziyet, gıdalar, içme suyu, ilaçlar ve kozmetik ürünler yoluyla Al maruziyeti artmıştır. (156) İnsan ve deneysel çalışmalar Al'in çeşitli dokuların yapısında ve fonksiyonunda patolojik değişikliğe yol açtığını göstermiştir. Beyinde, Al'in nörotransmitterlerin sentezi ve sinaptik iletimi, translasyon sonrası modifikasyonu, proteinlerin bozulmasını ve genlerin ekspresyonunu olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir. (157) Al, mitokondriyal elektron taşıma zincirini ve karaciğerdeki enerji üretimini de engelleyebilir. Ayrıca Al maruziyeti antioksidan enzimlerin aktivitesinde önemli bir azalmaya ve oksidatif stresin indüklenmesine neden olmuştur. (158) Kemikteki fosfat ve kalsiyum metabolizmasındaki bozukluklar ve osteomalazinin indüksiyonu (159), renal tübüler hücrelerin dejenerasyonu (160) ve üreme dokuları üzerindeki olumsuz etkiler (161) Al'in rapor edilen diğer toksik etkileridir. (162) Yapılan deneysel çalışmalarda Al kaynaklı nefrotoksisite (52), hepatotoksisite (163), kardiyotoksisite (55) ve testiküler doku toksisitesine (57) karşı N-AS'ın tedavi edici etki gösterdiği rapor edilmiştir.

Çeşitli epidemiyolojik çalışmalar, Al'nin Alzheimer dahil olmak üzere çeşitli nörolojik hastalıklarla etiyolojik olarak bağlantılı olduğunu göstermiştir. (164, 165) Alzheimer hastalarının beyin dokusunda Al düzeylerinin önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir. (51) N-AS'ın glutasyonun yeniden sağlanması ve sinir sistemindeki glutamat seviyelerini koruma yeteneği, beyin sağlığı için birçok fayda sağlayabilir. (166) Amino asit glutamat, memelilerin merkezi sinir sisteminde bulunan ve beyinde yaygın olarak dağıtılan önemli bir uyarıcı nörotransmitterdir. Bunun reseptörleri, memeli nörotransmitter aktivitesinin büyük bir kısmına yardımcı olan iyonotropik glutamat reseptörleri (iGluR)ler olarak bilinir. İnsanlarda sinaptik esneklik, hafıza ve öğrenmede önemli bir rol oynar. iGluR'lerin sayısı Alzheimer, Parkinson ve multipl skleroz dahil olmak üzere çeşitli nörolojik patolojileri tetikleyebilir. (167) N-AS kullanımı nörolojik bozukluklarla mücadelede etkili olabilir çünkü vücuttaki glutamat ve sistein düzeylerini artırabilir. Ayrıca Alzheimer hastalığına neden olan serbest radikalleri ortadan kaldırabilir. N-AS takviyesiyle sistin sağlayarak nörotransmisyonun etkisi araştırılmakta ve Alzheimer üzerine yapılan araştırmalar N-AS kullanımının amino asit dengelemedeki aktivasyonu ile faydalı etkileri olduğu bildirilmektedir (168, 169). Örneğin yapılan bir çalışmada, N-AS'ın hücre içi glutamat ve GSH konsantrasyonlarını artırdığı ve Aβ sinaptik bozulmasını önlediği rapor edilmiştir. (170)

Al fosfit (AIP), gıda taneleri üzerinde çok az kalıntı bırakması ve tohumların canlılığını etkilemeden böcekleri yok etmesi gibi ideal özellikleri nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. (171) AIP'nin yutulmasının ardından midede hidroklorik asit ile reaksiyon, fosfin (PH<sub>3</sub>) adı verilen öldürücü bir gaz üretir. Fosfin, mitokondriyi etkileyerek hücrel hipoksiyi indükler, sitokrom c oksidazı inhibe eder ve oldukça reaktif hidroksil radikallerinin oluşumuna yol açar. (172) AIP ile ilişkili ölüm, sitokrom c oksidazın inhibisyonu, adenzin trifosfat (ATP) üretiminin azalması ve kardiyomyosit bozukluğunun neden olduğu kalp yetmezliğine atfedilir. (173) Oksidatif stresin AIP toksisitesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. (174) N-AS'ın, AIP ile zehirlenmiş hastalarda oksidatif stresi baskılayarak iyileşme sağlayabileceği bildirilmiştir. (175) Bir vaka kontrol çalışmasında, rutin tedaviye N-AS eklenmesinin, AIP'ye atfedilen kardiyak değişiklikler (kreatin kinaz MB, kreatin fosfokinaz, kalp hızı) üzerinde faydalı olduğu gösterilmiştir. (176) Yakın zamanda yapılan bir başka çalışma, akut AIP zehirlenmesinin tedavisinde N-AS'ın, ölüm oranını azaltabildiği ve hayatta kalma süresini artırdığı rapor edilmiştir. (177)

## 5. Sonuç

Ağır metallerin maruziyetini azaltmak için en etkili yöntem maruziyetten kaçınmak ve bu konuda gerekli tedbirlerin alınmasını sağlamaktır. Bu çalışmada organizmada bilinen herhangi bir biyolojik fonksiyonu olmayan ve yaygın olarak maruz kalan As, Pb, Hg, Cd ve Al toksik metallerinin etki mekanizmaları tartışılmıştır. Ayrıca bu toksik etkilere karşı N-AS'ın veya metabolitlerinin hangi olası mekanizmalar aracılığıyla koruyucu veya iyileştirici etki gösterebileceğine değinilmiştir.

Sonuç olarak N-AS kullanımının As, Pb, Hg, Cd ve Al ağır metallerinin toksik etkilerine karşı etkili olabileceği kanaatindeyiz. Gelecekte yapılacak çalışmalar, N-AS'ın doğrudan veya dolaylı olarak ağır metal maruziyetine bağlı göstermiş olduğu olumlu etkilerin altında yatan mekanizmalara ve hücrel sinyal yollarına odaklanmalıdır.

## Kaynakça

1. Wu X, Cobbina SJ, Mao G, Xu H, Zhang Z, Yang L. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2016;23(9):8244-8259.
2. Mitra S, Chakraborty AJ, Tareq AM, Emran TB, Nainu F, Khusro A, Simal-Gandara J. Impact of heavy metals on the environment and human

health: Novel therapeutic insights to counter the toxicity. *Journal of King Saud University-Science*. 2022;34(3):101865.

3. Amadi CN, Ofor SJ, Frazzoli C, Orisakwe OE. Natural antidotes and management of metal toxicity. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2019;26(18):18032-18052. doi:10.1007/s11356-019-05104-2

4. Jaishankar M, Tseten T, Anbalagan N, Mathew BB, Beeregowda KN. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip Toxicol*. 2014;7(2):60-72. doi:10.2478/intox-2014-0009

5. Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ. Heavy metal toxicity and the environment. *Exp Suppl*. 2012;101:133-164. doi:10.1007/978-3-7643-8340-4\_6

6. Duffus JH. “Heavy metals” a meaningless term?(IUPAC Technical Report). *Pure and applied chemistry*. 2002; 74(5):793-807.

7. Kim JJ, Kim YS, Kumar V. Heavy metal toxicity: An update of chelating therapeutic strategies. *J Trace Elem Med Biol*. 2019;54:226-231. doi:10.1016/j.jtemb.2019.05.003

8. Rehman K, Fatima F, Waheed I, Akash MSH. Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. *J Cell Biochem*. 2018;119(1):157-184. doi:10.1002/jcb.26234

9. Asomugha RN, Udowelle NA, Ofor SJ, et al. Heavy metals hazards from Nigerian spices. *Rocz Panstw Zakl Hig*. 2016;67(3):309-314.

10. Reis V, Duarte AC. Occurrence, distribution, and significance of arsenic speciation. *In Comprehensive analytical chemistry*. 2019;85:1-14.

11. Khatun J, Intekhab A, Dhak D. Effect of uncontrolled fertilization and heavy metal toxicity associated with arsenic(As), lead(Pb) and cadmium (Cd), and possible remediation. *Toxicology*. 2022;477:153274. doi:10.1016/j.tox.2022.153274

12. Hughes MF, Beck BD, Chen Y, Lewis AS, Thomas DJ. Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective. *Toxicol Sci*. 2011;123(2):305-332. doi:10.1093/toxsci/kfr184

13. Obeng-Gyasi E. Sources of lead exposure in various countries. *Rev Environ Health*. 2019;34(1):25-34. doi:10.1515/reveh-2018-0037

14. Balali-Mood M, Naseri K, Tahergorabi Z, Khazdair MR, Sadeghi M. Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic. *Front Pharmacol*. 2021;12:643972. Published 2021 Apr 13. doi:10.3389/fphar.2021.643972



15. Kianoush S, Balali-Mood M, Mousavi SR, et al. Clinical, toxicological, biochemical, and hematologic parameters in lead exposed workers of a car battery industry. *Iran J Med Sci.* 2013;38(1):30-37.
16. Kianoush S, Sadeghi M, Balali-Mood M. Recent Advances in the Clinical Management of Lead Poisoning. *Acta Med Iran.* 2015;53(6): 327-336.
17. Pirrone N, Cinnirella S, Feng X, et al. Global mercury emissions to the atmosphere from anthropogenic and natural sources. *Atmospheric Chemistry and Physics.* 2010;10(13):5951-5964.
18. Zahir F, Rizwi SJ, Haq SK, Khan RH. Low dose mercury toxicity and human health. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2005;20(2):351-360. doi:10.1016/j.etap.2005.03.007
19. Cariccio VL, Samà A, Bramanti P, Mazzon E. Mercury Involvement in Neuronal Damage and in Neurodegenerative Diseases. *Biol Trace Elem Res.* 2019;187(2):341-356. doi:10.1007/s12011-018-1380-4
20. Pamphlett R, Kum Jew S. Inorganic mercury in human astrocytes, oligodendrocytes, corticomotoneurons and the locus ceruleus: implications for multiple sclerosis, neurodegenerative disorders and gliomas. *Biometals.* 2018;31(5):807-819.
21. Pigatto PD, Costa A, Guzzi G. Are mercury and Alzheimer's disease linked?. *Sci Total Environ.* 2018;613-614:1579-1580.
22. Aragão WAB, Teixeira FB, Fagundes NCF, et al. Hippocampal Dysfunction Provoked by Mercury Chloride Exposure: Evaluation of Cognitive Impairment, Oxidative Stress, Tissue Injury and Nature of Cell Death. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:7878050.
23. Ynalvez R, Gutierrez J, Gonzalez-Cantu H. Mini-review: toxicity of mercury as a consequence of enzyme alteration. *Biometals.* 2016;29(5):781-788. doi:10.1007/s10534-016-9967-8
24. Carratù MR, Signorella A. Methyl mercury injury to CNS: mitochondria at the core of the matter. *Open Acc Toxicol.* 2015;1(2):1-6.
25. Oliveira VA, Favero G, Stacchiotti A, et al. Acute mercury exposition of virgin, pregnant, and lactating rats: Histopathological kidney and liver evaluations. *Environ Toxicol.* 2017;32(5):1500-1512.
26. Hasan A, Nanakali NMQ, Salihi A, et al. Nanozyme-based sensing platforms for detection of toxic mercury ions: An alternative approach to conventional methods. *Talanta.* 2020;215:120939.



27. Bridges CC, Zalups RK. Transport of inorganic mercury and methylmercury in target tissues and organs. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2010;13(5):385-410. doi:10.1080/10937401003673750

28. Ali S, Hussain S, Khan R, et al. Renal toxicity of heavy metals (cadmium and mercury) and their amelioration with ascorbic acid in rabbits. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2019;26(4):3909-3920. doi:10.1007/s11356-018-3819-8

29. Kanter M, Unsal C, Aktas C, Erboğa M. Neuroprotective effect of quercetin against oxidative damage and neuronal apoptosis caused by cadmium in hippocampus. *Toxicol Ind Health.* 2016;32(3):541-550. doi:10.1177/0748233713504810

30. Gerhardsson L, Englyst V, Lundström NG, Sandberg S, Nordberg G. Cadmium, copper and zinc in tissues of deceased copper smelter workers. *J Trace Elem Med Biol.* 2002;16(4):261-266.

31. Satarug S, Baker JR, Urbenjapol S, et al. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicol Lett.* 2003;137(1-2):65-83. doi:10.1016/s0378-4274(02)00381-8

32. Kısadere İ, Dönmez N. The effects of quercetin on antioxidant system and some blood parameters in rats exposed to acute cadmium toxicity. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences.* 2019;35(2):66-70.

33. Han YL, Sheng Z, Liu GD, et al. Cloning, characterization and cadmium inducibility of metallothionein in the testes of the mudskipper *Boleophthalmus pectinirostris*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2015;119:1-8. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.04.055

34. Peana M, Pelucelli A, Chasapis CT, et al. Biological Effects of Human Exposure to Environmental Cadmium. *Biomolecules.* 2022;13(1):36. Published 2022 Dec 24. doi:10.3390/biom13010036

35. Branca JJV, Morucci G, Pacini A. Cadmium-induced neurotoxicity: still much ado. *Neural Regen Res.* 2018;13(11):1879-1882. doi:10.4103/1673-5374.239434

36. Kısadere İ, Karaman M, Aydın MF, Donmez N, Usta M. The protective effects of chitosan oligosaccharide (COS) on cadmium-induced neurotoxicity in Wistar rats. *Arch Environ Occup Health.* 2022;77(9):755-763. doi:10.1080/1938244.2021.2008852

37. Akesson A, Lundh T, Vahter M, et al. Tubular and glomerular kidney effects in Swedish women with low environmental cadmium exposure. *Environ Health Perspect.* 2005;113(11):1627-1631. doi:10.1289/ehp.8033

38. Gallagher CM, Meliker JR. Blood and urine cadmium, blood pressure, and hypertension: a systematic review and meta-analysis. *Environ Health Perspect.* 2010;118(12):1676-1684. doi:10.1289/ehp.1002077
39. Donmez HH, Donmez N, Kısadere I, Undag I. Protective effect of quercetin on some hematological parameters in rats exposed to cadmium. *Biotech Histochem.* 2019;94(5):381-386. doi:10.1080/10520295.2019.1574027
40. Fujiwara Y, Lee JY, Banno H, et al. Cadmium induces iron deficiency anemia through the suppression of iron transport in the duodenum. *Toxicol Lett.* 2020;332:130-139. doi:10.1016/j.toxlet.2020.07.005
41. Li FJ, Surolia R, Li H, et al. Low-dose cadmium exposure induces peribronchiolar fibrosis through site-specific phosphorylation of vimentin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2017;313(1):L80-L91. doi:10.1152/ajplung.00087.2017
42. Li FJ, Surolia R, Singh P, et al. Fibrinogen mediates cadmium-induced macrophage activation and serves as a predictor of cadmium exposure in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2022;322(4):L593-L606. doi:10.1152/ajplung.00475.2021
43. Keith S, Jones D, Rosemond Z, Ingerman L, Chappell L. Potential for human exposure. *Toxicological Profile for Aluminum.* 2008:175–227.
44. Mohammad FS, Al Zubaidy IAH, Bassioni G. A comparison of aluminum leaching processes in tap and drinking water. *Int J Electrochem Sci.* 2014;9:3118–3129.
45. Barabasz W, Albinska D, Jaskowska M, Lipiec J. Ecotoxicology of Aluminium. *Pol J Environ Stud.* 2002;11(3):199–203.
46. Mold M, Cottle J, King A, Exley C. Intracellular Aluminium in Inflammatory and Glial Cells in Cerebral Amyloid Angiopathy: A Case Report. *Int J Environ Res Public Health.* 2019;16(8):1459.
47. Zhou J, Li Z, Zhou T, et al. Aluminum toxicity decreases the phytoextraction capability by cadmium/zinc hyperaccumulator *Sedum plumbizincicola* in acid soils. *Sci Total Environ.* 2020;711:134591. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.134591
48. Alasfar RH, Isaifan RJ. Aluminum environmental pollution: the silent killer. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2021;28(33):44587-44597. doi:10.1007/s11356-021-14700-0
49. Crisponi G, Fanni D, Gerosa C, et al. The meaning of aluminium exposure on human health and aluminium-related diseases. *Biomol Concepts.* 2013;4(1):77-87. doi:10.1515/bmc-2012-0045

50. Mirza A, King A, Troakes C, Exley C. Aluminium in brain tissue in familial Alzheimer's disease. *J Trace Elem Med Biol.* 2017;40:30-36. doi:10.1016/j.jtemb.2016.12.001

51. Exley C, Clarkson E. Aluminium in human brain tissue from donors without neurodegenerative disease: A comparison with Alzheimer's disease, multiple sclerosis and autism. *Sci Rep.* 2020;10(1):7770.

52. Kaya S, Yalçın T, Boydak M, Dönmez HH. Protective Effect of N-Acetylcysteine Against Aluminum-Induced Kidney Tissue Damage in Rats. *Biol Trace Elem Res.* 2023;201(4):1806-1815. doi:10.1007/s12011-022-03276-6

53. Wei H, Li D, Luo Y, Wang Y, Lin E, Wei X. Aluminum exposure induces nephrotoxicity via fibrosis and apoptosis through the TGF- $\beta$ 1/Smads pathway in vivo and in vitro. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2023;249:114422. doi:10.1016/j.ecoenv.2022.114422

54. Ding Y, Tang J, You X, et al. Study on the mechanism underlying Al-induced hepatotoxicity based on the identification of the Al-binding proteins in liver. *Metallomics.* 2019;11(8):1353-1362. doi:10.1039/c9mt00150f

55. Kaya S. Alüminyum klorür kaynaklı kardiyotoksik sıçan modelinde N-Asetilsistein uygulamasının TRPM2 iyon kanallarına etkisi. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi.* 2023;37(2):105-112.

56. Falade AO, Adewole KE, Adekola AO, Ikokoh HA, Okaiyeto K, Oguntibeju OO. Aqueous extract of bay leaf (*Laurus nobilis*) ameliorates testicular toxicity induced by aluminum chloride in rats. *Vet World.* 2022;15(11):2525-2534. doi:10.14202/vetworld.2022.2525-2534

57. Yalçın T, Kaya S, Kuloğlu T, Yiğın A. N-Acetylcysteine May Regulate Altered Meteorin-Like Levels in Testicular Tissue due to Aluminum Exposure. *Biol Trace Elem Res.* 2023;201(11):5335-5345. doi:10.1007/s12011-023-03656-6

58. Klein GL. Aluminum toxicity to bone: A multisystem effect?. *Osteoporos Sarcopenia.* 2019;5(1):2-5.

59. Schwalfenberg GK. N-Acetylcysteine: A Review of Clinical Usefulness (an Old Drug with New Tricks). *J Nutr Metab.* 2021;2021:9949453. doi:10.1155/2021/9949453

60. Webb WR. Clinical evaluation of a new mucolytic agent, acetylcysteine. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1962;44:330-343.

61. Janssen WJ, Stefanski AL, Bochner BS, Evans CM. Control of lung defence by mucins and macrophages: ancient defence mechanisms with

modern functions. *Eur Respir J.* 2016;48(4):1201-1214. doi:10.1183/13993003.00120-2015

62. Javitt G, Khmelnitsky L, Albert L, et al. Assembly Mechanism of Mucin and von Willebrand Factor Polymers. *Cell.* 2020;183(3):717-729.e16. doi:10.1016/j.cell.2020.09.021

63. Pedre B, Barayeu U, Ezeriņa D, Dick TP. The mechanism of action of N-acetylcysteine (NAC): The emerging role of H<sub>2</sub>S and sulfane sulfur species. *Pharmacol Ther.* 2021;228:107916.

64. Cotgreave IA, Berggren M, Jones TW, Dawson J, Moldéus P. Gastrointestinal metabolism of N-acetylcysteine in the rat, including an assay for sulfite in biological systems. *Biopharm Drug Dispos.* 1987;8(4):377-386. doi:10.1002/bdd.2510080408

65. Winterbourn CC, Metodiewa D. Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med.* 1999;27(3-4):322-328. doi:10.1016/s0891-5849(99)00051-9

66. Trujillo M, Alvarez B, Radi R. One- and two-electron oxidation of thiols: mechanisms, kinetics and biological fates. *Free Radic Res.* 2016;50(2):150-171. doi:10.3109/10715762.2015.1089988

67. Green JL, Heard KJ, Reynolds KM, Albert D. Oral and Intravenous Acetylcysteine for Treatment of Acetaminophen Toxicity: A Systematic Review and Meta-analysis. *West J Emerg Med.* 2013;14(3):218-226. doi:10.5811/westjem.2012.4.6885

68. Van de Straat R, de Vries J, Debets AJ, Vermeulen NP. The mechanism of prevention of paracetamol-induced hepatotoxicity by 3,5-dialkyl substitution. The roles of glutathione depletion and oxidative stress. *Biochem Pharmacol.* 1987;36(13):2065-2070. doi:10.1016/0006-2952(87)90132-8

69. Koenderink JB, van den Heuvel JJMW, Bilos A, Vredenburg G, Vermeulen NPE, Russel FGM. Human multidrug resistance protein 4 (MRP4) is a cellular efflux transporter for paracetamol glutathione and cysteine conjugates. *Arch Toxicol.* 2020;94(9):3027-3032. doi:10.1007/s00204-020-02793-4

70. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med.* 2009;30(1-2):42-59. doi:10.1016/j.mam.2008.05.005

71. Deepmala, Slattery J, Kumar N, et al. Clinical trials of N-acetylcysteine in psychiatry and neurology: A systematic review. *Neurosci Biobehav Rev.* 2015;55:294-321. doi:10.1016/j.neubiorev.2015.04.015

72. Dłudla PV, Mazibuko-Mbeje SE, Nyambuya TM, et al. The beneficial effects of N-acetyl cysteine (NAC) against obesity associated complications:

A systematic review of pre-clinical studies. *Pharmacol Res.* 2019;146:104332. doi:10.1016/j.phrs.2019.104332

73. Fowdar K, Chen H, He Z, et al. The effect of N-acetylcysteine on exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: A meta-analysis and systematic review. *Heart Lung.* 2017;46(2):120-128. doi:10.1016/j.hrtlng.2016.12.004

74. Shi Z, Puyo CA. N-Acetylcysteine to Combat COVID-19: An Evidence Review. *Ther Clin Risk Manag.* 2020;16:1047-1055.

75. Devi N, Boya C, Chhabra M, Bansal D. N-acetyl-cysteine as adjuvant therapy in female infertility: a systematic review and meta-analysis. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2020;32(5):899-910.

76. Rossignol DA. The use of N-acetylcysteine as a chelator for metal toxicity. *The Therapeutic Use of N-Acetylcysteine (NAC) in Medicine.* 2019:169-179.

77. Giampreti A, Lonati D, Ragghianti B, et al. N-Acetyl-Cysteine as Effective and Safe Chelating Agent in Metal-on-Metal Hip-Implanted Patients: Two Cases. *Case Rep Orthop.* 2016;2016:8682737. doi:10.1155/2016/8682737

78. Kasperczyk S, Dobrakowski M, Kasperczyk A, Machnik G, Birkner E. Effect of N-acetylcysteine administration on the expression and activities of antioxidant enzymes and the malondialdehyde level in the blood of lead-exposed workers. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2014;37(2):638-647.

79. Kaya S, Yalcın T, Tektemur A, Kuloğlu T. N-Acetylcysteine may exert hepatoprotective effect by regulating Meteorin-Like levels in Adriamycin-induced liver injury [published online ahead of print, 2023 Sep 5]. *Cell Stress Chaperones.* 2023;10.1007/s12192-023-01376-3. doi:10.1007/s12192-023-01376-3

80. Nazıroğlu M, Senol N, Ghazizadeh V, Yürüker V. Neuroprotection induced by N-acetylcysteine and selenium against traumatic brain injury-induced apoptosis and calcium entry in hippocampus of rat. *Cell Mol Neurobiol.* 2014;34(6):895-903. doi:10.1007/s10571-014-0069-2

81. Sunay M, Karakan T, Aydın A, Koca G, Börcek P, Ögüş E. Do Montelukast Sodium and N-Acetylcysteine Have a Nephroprotective Effect on Unilateral Ureteral Obstruction? A Placebo Controlled Trial in a Rat Model. *J Urol.* 2015;194(4):1132-1137. doi:10.1016/j.juro.2015.03.003

82. Mansour HH, El Kiki SM, Hasan HF. Protective effect of N-acetylcysteine on cyclophosphamide-induced cardiotoxicity in rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2015;40(2):417-422. doi:10.1016/j.etap.2015.07.013

83. Blanusa M, Varnai VM, Piasek M, Kostial K. Chelators as antidotes of metal toxicity: therapeutic and experimental aspects. *Curr Med Chem.* 2005;12(23):2771-2794. doi:10.2174/092986705774462987

84. Sisombath NS, Jalilehvand F. Similarities between N-Acetylcysteine and Glutathione in Binding to Lead(II) Ions. *Chem Res Toxicol.* 2015;28(12):2313-2324. doi:10.1021/acs.chemrestox.5b00323

85. Anetor JI, Wanibuchi H, Fukushima S. Arsenic exposure and its health effects and risk of cancer in developing countries: micronutrients as host defence. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2007;8(1):13-23.

86. Naujokas MF, Anderson B, Ahsan H, et al. The broad scope of health effects from chronic arsenic exposure: update on a worldwide public health problem. *Environ Health Perspect.* 2013;121(3):295-302. doi:10.1289/ehp.1205875

87. Rana SV. Metals and apoptosis: recent developments. *J Trace Elem Med Biol.* 2008;22(4):262-284. doi:10.1016/j.jtemb.2008.08.002

88. Yamanaka K, Hoshino M, Okamoto M, Sawamura R, Hasegawa A, Okada S. Induction of DNA damage by dimethylarsine, a metabolite of inorganic arsenics, is for the major part likely due to its peroxy radical. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;168(1):58-64. doi:10.1016/0006-291x(90)91674-h

89. Liu SX, Davidson MM, Tang X, et al. Mitochondrial damage mediates genotoxicity of arsenic in mammalian cells. *Cancer Res.* 2005;65(8):3236-3242. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0424

90. Lin S, Cullen WR, Thomas DJ. Methylarsenicals and arsinothiols are potent inhibitors of mouse liver thioredoxin reductase. *Chem Res Toxicol.* 1999;12(10):924-930. doi:10.1021/tx9900775

91. Powis G, Mustacich D, Coon A. The role of the redox protein thioredoxin in cell growth and cancer. *Free Radic Biol Med.* 2000;29(3-4):312-322. doi:10.1016/s0891-5849(00)00313-0

92. Reddy PS, Rani GP, Sainath SB, Meena R, Supriya Ch. Protective effects of N-acetylcysteine against arsenic-induced oxidative stress and reprotoxicity in male mice. *J Trace Elem Med Biol.* 2011;25(4):247-253. doi:10.1016/j.jtemb.2011.08.145

93. Modi M, Kaul RK, Kannan GM, Flora SJ. Co-administration of zinc and n-acetylcysteine prevents arsenic-induced tissue oxidative stress in male rats. *J Trace Elem Med Biol.* 2006;20(3):197-204. doi:10.1016/j.jtemb.2006.02.002

94. Flora SJ, Bhadauria S, Kannan GM, Singh N. Arsenic induced oxidative stress and the role of antioxidant supplementation during chelation: a review. *J Environ Biol.* 2007;28(2 Suppl):333-347.



95. Flora SJS. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radic Biol Med.* 2011;51:257–81.

96. Ghosh J, Sil PC. Mechanism for arsenic-induced toxic effects. *In Handbook of arsenic toxicology.* 2023: 223-252. Academic Press.

97. Nellessen CM, Janzen V, Mayer K, et al. Successful treatment of acute promyelocytic leukemia in pregnancy with single-agent all-trans retinoic acid. *Arch Gynecol Obstet.* 2018;297(2):281-284. doi:10.1007/s00404-017-4583-6

98. Sun Y, Wang C, Wang L, Dai Z, Yang K. Arsenic trioxide induces apoptosis and the formation of reactive oxygen species in rat glioma cells. *Cell Mol Biol Lett.* 2018;23:13.

99. Needleman H. Lead poisoning. *Annu Rev Med.* 2004;55:209–22.

100. Patrick L. Lead toxicity, a review of the literature. Part 1: Exposure, evaluation, and treatment. *Altern Med Rev.* 2006;11:2–22.

101. Wani AL, Ara A, Usmani JA. Lead toxicity: a review. *Interdiscip Toxicol.* 2015;8(2):55-64. doi:10.1515/intox-2015-0009

102. Benjelloun M, Tarrass F, Hachim K, Medkouri G, Benganem MG, Ramdani B. Chronic lead poisoning: a “forgotten” cause of renal disease. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2007;18(1):83-86.

103. Kosnett MJ. Lead. In: Olson K.R, editor. Poisoning and Drug Overdose. 5th ed. McGraw Hill Professional; 2006.

104. White LD, Cory-Slechta DA, Gilbert ME, et al. New and evolving concepts in the neurotoxicology of lead. *Toxicol App Pharmacol.* 2007;225:1–27.

105. Fujita H, Nishitani C, Ogawa K. Lead, chemical porphyria, and heme as a biological mediator. *Tohoku J Exp Med.* 2002;196(2):53-64. doi:10.1620/tjem.196.53

106. Fang JY, Wang PW, Huang CH, Hung YY, Pan TL. Evaluation of the hepatotoxic risk caused by lead acetate via skin exposure using a proteomic approach. *Proteomics.* 2014;14:2588–2599.

107. Beier EE, Inzana JA, Sheu TJ, Shu L, Puzas JE, Mooney RA. Effects of combined exposure to lead and high-fat diet on bone quality in juvenile male mice. *Environ Health Perspect.* 2015;123(10):935–943.

108. Sokol RZ, Wang S, Wan YY, Stanczyk FZ, Gentschein E, Chapin RE. Long term, low dose lead exposure alters the Gonadotrophin-Releasing Hormone System in the Male Rats. *Environ Health Perspect.* 2002;110:871–874.

109. Navas-Acien A, Guallar E, Silbergeld EK, Rothenberg SJ. Lead Exposure and Cardiovascular Disease--A Systematic Review. *Environ Health Perspect.* 2007;115:472–82.

110. Park SK, O'Neill MS, Vokonas PS, et al. Air Pollution and Heart Rate Variability: Effect Modification by Chronic Lead Exposure. *Epidemiology*. 2008;19:111–120.
111. Cleveland LM, Minter ML, Cobb KA, Scott AA, German VF. Lead hazards for pregnant women and children. *Am J Nurs*. 2008;108:40–49.
112. Casaret LJ, Klaassen CD, Doull J, editors. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. 7th ed. McGraw Hill Professional; 2007. Toxic effects of metals.
113. Pearson HA, Schonfeld DJ. Lead. In: Rudolph CD, editor. Rudolph's Pediatrics. 21st ed. McGraw Hill professional; 2003.
114. Mycyk M, Hryhorcu D, Amitai Y. Lead. In: Erickson TB, Ahrens WR, Aks S, Ling L, editors. Paediatric Toxicology: Diagnostic and management of the Poisoned Child. Mcgraw Hill Professional; 2005.
115. Rossi E. Low Level Environmental Lead Exposure - A Continuing Challenge. *Clin Biochem Rev*. 2008;29:63–70.
116. Rogan WJ, Dietrich KN, Ware JH, et al. The effect of chelation therapy with succimer on neuropsychological development in children exposed to lead. *N Engl J Med*. 2001;344(19):1421–1426.
117. Kasperczyk S, Dobrakowski M, Kasperczyk A, et al. Effect of N-acetylcysteine administration on homocysteine level, oxidative damage to proteins, and levels of iron (Fe) and Fe-related proteins in lead-exposed workers. *Toxicol Ind Health*. 2016;32(9):1607-1618. doi:10.1177/0748233715571152
118. Branco V, Caito S, Farina M, Teixeira da Rocha J, Aschner M, Carvalho C. Biomarkers of mercury toxicity: Past, present, and future trends. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2017;20(3):119-154. doi:10.1080/10937404.2017.1289834
119. Clarkson TW, Magos L, Myers GJ. The toxicology of mercury--current exposures and clinical manifestations. *N Engl J Med*. 2003;349(18):1731-1737. doi:10.1056/NEJMra022471
120. Dórea JG, Farina M, Rocha JB. Toxicity of ethylmercury (and Thimerosal): a comparison with methylmercury. *J Appl Toxicol*. 2013;33(8):700-711. doi:10.1002/jat.2855
121. Silva de Paula E, Carneiro MF, Grotto D, Hernandez LC, Antunes LM, Barbosa F Jr. Protective effects of niacin against methylmercury-induced genotoxicity and alterations in antioxidant status in rats. *J Toxicol Environ Health A*. 2016;79(4):174-183.



122. Simmons-Willis TA, Koh AS, Clarkson TW, Ballatori N. Transport of a neurotoxicant by molecular mimicry: the methylmercury-L-cysteine complex is a substrate for human L-type large neutral amino acid transporter (LAT) 1 and LAT2. *Biochem J.* 2002;367(Pt 1):239-246. doi:10.1042/BJ20020841

123. Farina M, Aschner M, Rocha JB. Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011;256(3):405-417. doi:10.1016/j.taap.2011.05.001

124. Eroglu K, Atli G, Canli M. Effects of metal (Cd, Cu, Zn) interactions on the profiles of metallothionein-like proteins in the Nile fish *Oreochromis niloticus*. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2005;75(2):390-399. doi:10.1007/s00128-005-0766-0

125. Yasutake A, Nakamura M. Induction by mercury compounds of metallothioneins in mouse tissues: inorganic mercury accumulation is not a dominant factor for metallothionein induction in the liver. *J Toxicol Sci.* 2011;36(3):365-372. doi:10.2131/jts.36.365

126. Woods JS, Martin MD, Leroux BG, et al. Urinary porphyrin excretion in children with mercury amalgam treatment: findings from the Casa Pia Children's Dental Amalgam Trial. *J Toxicol Environ Health A.* 2009;72(14):891-896. doi:10.1080/15287390902959557

127. Woods JS, Echeverria D, Heyer NJ, Simmonds PL, Wilkerson J, Farin FM. The association between genetic polymorphisms of coproporphyrinogen oxidase and an atypical porphyrinogenic response to mercury exposure in humans. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;206(2):113-120. doi:10.1016/j.taap.2004.12.016

128. Franco JL, Posser T, Missau F, et al. Structure-activity relationship of flavonoids derived from medicinal plants in preventing methylmercury-induced mitochondrial dysfunction. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2010;30(3):272-278. doi:10.1016/j.etap.2010.07.003

129. Chen C, Yu H, Zhao J, et al. The roles of serum selenium and selenoproteins on mercury toxicity in environmental and occupational exposure. *Environ Health Perspect.* 2006;114(2):297-301. doi:10.1289/ehp.7861

130. Shanker G, Syversen T, Aschner M. Astrocyte-mediated methylmercury neurotoxicity. *Biol Trace Elem Res.* 2003;95(1):1-10. doi:10.1385/BTER:95:1:1

131. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60(1):6-20. doi:10.1007/s000180300001

132. Lund ME, Banner W Jr, Clarkson TW, Berlin M. Treatment of acute methylmercury ingestion by hemodialysis with N-acetylcysteine (Mucomyst) infusion and 2,3-dimercaptopropane sulfonate. *J Toxicol Clin Toxicol.* 1984;22(1):31-49. doi:10.3109/00099308409035080
133. Brandão R, Santos FW, Zeni G, Rocha JB, Nogueira CW. DMPS and N-acetylcysteine induced renal toxicity in mice exposed to mercury. *Biometals.* 2006;19(4):389-398.
134. Trümppler S, Nowak S, Meermann B, et al. Detoxification of mercury species--an in vitro study with antidotes in human whole blood. *Anal Bioanal Chem.* 2009;395(6):1929-1935. doi:10.1007/s00216-009-3105-1
135. Jalilehvand F, Parmar K, Zielke S. Mercury(II) complex formation with N-acetylcysteine. *Metallomics.* 2013;5(10):1368-1376. doi:10.1039/c3mt00173c
136. Becker A, Soliman KF. The role of intracellular glutathione in inorganic mercury-induced toxicity in neuroblastoma cells. *Neurochem Res.* 2009;34(9):1677-1684. doi:10.1007/s11064-009-9962-3
137. Kim JK, Han M, Nili M. Effects of N-acetyl-L-cysteine on fish hepatoma cells treated with mercury chloride and ionizing radiation. *Chemosphere.* 2011;85(10):1635-1638.
138. Chavez E, He ZL, Stoffella PJ, et al. Concentration of cadmium in cacao beans and its relationship with soil cadmium in southern Ecuador. *Sci Total Environ.* 2015;533:205-214. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.06.106
139. Mannino DM, Holguin F, Greves HM, Savage-Brown A, Stock AL, Jones RL. Urinary cadmium levels predict lower lung function in current and former smokers: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Thorax.* 2004;59(3):194-198. doi:10.1136/thorax.2003.012054
140. Barregard L, Fabricius-Lagging E, Lundh T, et al. Cadmium, mercury, and lead in kidney cortex of living kidney donors: Impact of different exposure sources. *Environ Res.* 2010;110(1):47-54. doi:10.1016/j.envres.2009.10.010
141. Kjellström T. Mechanism and epidemiology of bone effects of cadmium. *IARC Sci Publ.* 1992;(118):301-310.
142. Thompson J, Bannigan J. Cadmium: toxic effects on the reproductive system and the embryo. *Reprod Toxicol.* 2008;25(3):304-315. doi:10.1016/j.reprotox.2008.02.001
143. Rani A, Kumar A, Lal A, Pant M. Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. *Int J Environ Health Res.* 2014;24(4):378-399. doi:10.1080/09603123.2013.835032

144. Branca JJV, Pacini A, Gulisano M, Taddei N, Fiorillo C, Becatti M. Cadmium-Induced Cytotoxicity: Effects on Mitochondrial Electron Transport Chain. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:604377. Published 2020 Nov 30. doi:10.3389/fcell.2020.604377

145. Gasmi A, Peana M, Arshad M, Butnariu M, Menzel A, Bjørklund G. Krebs cycle: activators, inhibitors and their roles in the modulation of carcinogenesis. *Arch Toxicol.* 2021;95(4):1161-1178. doi:10.1007/s00204-021-02974-9

146. Koedrith P, Seo YR. Advances in carcinogenic metal toxicity and potential molecular markers. *Int J Mol Sci.* 2011;12(12):9576-9595. doi:10.3390/ijms12129576

147. Bernhoft RA. Cadmium toxicity and treatment. *ScientificWorldJournal.* 2013;2013:394652. Published 2013 Jun 3. doi:10.1155/2013/394652

148. Zoroddu MA, Aaseth J, Crisponi G, Medici S, Peana M, Nurchi VM. The essential metals for humans: a brief overview. *J Inorg Biochem.* 2019;195:120-129. doi:10.1016/j.jinorgbio.2019.03.013

149. Nordberg M, Nordberg GF. Metallothionein and Cadmium Toxicology-Historical Review and Commentary. *Biomolecules.* 2022;12(3):360. Published 2022 Feb 24. doi:10.3390/biom12030360

150. Deng X, Xia Y, Hu W, Zhang H, Shen Z. Cadmium-induced oxidative damage and protective effects of N-acetyl-L-cysteine against cadmium toxicity in *Solanum nigrum* L. *J Hazard Mater.* 2010;180(1-3):722-729. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.04.099

151. Mumtaz F, Albeltagy RS, Diab MSM, Abdel Moneim AE, El-Habit OH. Exposure to arsenite and cadmium induces organotoxicity and miRNAs deregulation in male rats. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2020;27(14):17184-17193. doi:10.1007/s11356-020-08306-1

152. Ezedom T, Asagba S, Tonukari NJ. Toxicological effects of the concurrent administration of cadmium and arsenic through the food chain on the liver and kidney of rats. *J Basic Appl Zool.* 2020;81(1):16. <https://doi.org/10.1186/s41936-020-00146-2>

153. Atagana OS, Asagba SO. Protective effects of honey against cadmium-induced alteration of some biochemical parameters in rats. *Toxicol Environ Chem.* 2014;96(10):1557-1563.

154. Albeltagy RS, Dawood SM, Mumtaz F, Abdel Moneim AE, El-Habit OH. Antioxidant capacity of N-acetylcysteine against the molecular and cytotoxic implications of cadmium chloride leading to hepatotoxicity and vital

progression. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2023;30(9):23237-23247. doi:10.1007/s11356-022-23823-x

155. Mlejnek P, Dolezel P, Maier V, Kikalova K, Skoupa N. N-acetylcysteine dual and antagonistic effect on cadmium cytotoxicity in human leukemia cells. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2019;71:103213. doi:10.1016/j.etap.2019.103213

156. Klotz K, Weistenhöfer W, Neff F, Hartwig A, van Thriel C, Drexler H. The Health Effects of Aluminum Exposure. *Dtsch Arztebl Int.* 2017;114(39):653-659. doi:10.3238/arztebl.2017.0653

157. Saberzadeh J, Arabsolghar R, Takhshid MA. Alpha synuclein protein is involved in Aluminum-induced cell death and oxidative stress in PC12 cells. *Brain Res.* 2016;1635:153-160. doi:10.1016/j.brainres.2016.01.037

158. Han S, Lemire J, Appanna VP, Auger C, Castonguay Z, Appanna VD. How aluminum, an intracellular ROS generator promotes hepatic and neurological diseases: the metabolic tale. *Cell Biol Toxicol.* 2013;29(2):75-84. doi:10.1007/s10565-013-9239-0

159. Chappard D, Bizot P, Mabileau G, Hubert L. Aluminum and bone: Review of new clinical circumstances associated with Al(3+) deposition in the calcified matrix of bone. *Morphologie.* 2016;100(329):95-105. doi:10.1016/j.morpho.2015.12.001

160. Belaïd-Nouira Y, Bakhta H, Haouas Z, Flehi-Slim I, Ben Cheikh H. Fenugreek seeds reduce aluminum toxicity associated with renal failure in rats. *Nutr Res Pract.* 2013;7(6):466-474. doi:10.4162/nrp.2013.7.6.466

161. Cheraghi E, Golkar A, Roshanaei K, Alani B. Aluminium-Induced Oxidative Stress, Apoptosis and Alterations in Testicular Tissue and Sperm Quality in Wistar Rats: Ameliorative Effects of Curcumin. *Int J Fertil Steril.* 2017;11(3):166-175. doi:10.22074/ijfs.2017.4859

162. Zangeneh AR, Takhshid MA, Ranjbaran R, Maleknia M, Meshkibaf MH. Diverse Effect of Vitamin C and N-Acetylcysteine on Aluminum-Induced Eryptosis. *Biochem Res Int.* 2021;2021:6670656. Published 2021 Jan 12. doi:10.1155/2021/6670656

163. Mohamed HZ. The effect of N-acetylcysteine on the liver following aluminium chloride exposure in adult male albino rat: a histological and immunohistochemical study. *Egyptian Journal of Histology.* 2016;39(2); 150-161.

164. Solfrizzi V, Colacicco AM, D'Introno A, et al. Macronutrients, aluminium from drinking water and foods, and other metals in cognitive decline and dementia. *J Alzheimers Dis.* 2006;10(2-3):303-330. doi:10.3233/jad-2006-102-314

165. Santibáñez M, Bolumar F, García AM. Occupational risk factors in Alzheimer's disease: a review assessing the quality of published epidemiological studies. *Occup Environ Med.* 2007;64(11):723-732. doi:10.1136/oem.2006.028209

166. Czapski GA, Strosznajder JB. Glutamate and GABA in Microglia-Neuron Cross-Talk in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 2021;22(21):11677. Published 2021 Oct 28. doi:10.3390/ijms222111677

167. Chang CH, Lin CH, Lane HY. d-glutamate and Gut Microbiota in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 2020;21(8):2676. Published 2020 Apr 11. doi:10.3390/ijms21082676

168. Raghu G, Berk M, Campochiaro PA, et al. The Multifaceted Therapeutic Role of N-Acetylcysteine (NAC) in Disorders Characterized by Oxidative Stress. *Curr Neuropharmacol.* 2021;19(8):1202-1224. doi:10.2174/1570159X19666201230144109

169. Da Conceição Fernandes I, Leite DRB, Dias JDFG, et al. Evaluation of the potential of N-acetylcysteine in Alzheimer's disease. *Revista Eletrônica Acervo Saúde.* 2023;23(3):e12117-e12117.

170. Zhang D, Jin B, Ondrejcek T, Rowan MJ. Opposite in vivo effects of agents that stimulate or inhibit the glutamate/cysteine exchanger system xc<sup>-</sup> on the inhibition of hippocampal LTP by Aβ. *Hippocampus.* 2016;26(12):1655-1665. doi:10.1002/hipo.22667

171. Meena MC, Mittal S, Rani Y. Fatal aluminium phosphide poisoning. *Interdiscip Toxicol.* 2015;8(2):65-67. doi:10.1515/intox-2015-0010

172. Gurjar M, Baronia AK, Azim A, Sharma K. Managing aluminum phosphide poisonings. *J Emerg Trauma Shock.* 2011;4(3):378-384. doi:10.4103/0974-2700.83868

173. Mehrpour O, Jafarzadeh M, Abdollahi M. A systematic review of aluminium phosphide poisoning. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2012;63(1):61-73. doi:10.2478/10004-1254-63-2012-2182

174. Kariman H, Heydari K, Fakhri M, et al. Aluminium phosphide poisoning and oxidative stress: serum biomarker assessment. *J Med Toxicol.* 2012;8(3):281-284. doi:10.1007/s13181-012-0219-1

175. Agarwal A, Robo R, Jain N, Gutch M, Consil S, Kumar S. Oxidative stress determined through the levels of antioxidant enzymes and the effect of N-acetylcysteine in aluminum phosphide poisoning. *Indian J Crit Care Med.* 2014;18(10):666-671. doi:10.4103/0972-5229.142176

176. Taghaddosinejad F, Farzaneh E, Ghazanfari-Nasrabad M, Eizadi-Mood N, Hajhosseini M, Mehrpour O. The effect of N-acetyl cysteine (NAC) on aluminum phosphide poisoning inducing cardiovascular toxicity: a case-control study. *Springerplus*. 2016;5(1):1948. Published 2016 Nov 10. doi:10.1186/s40064-016-3630-2

177. Hussien S, Al Teftazany E, Hagraas A, Elhelaly H, Abdelhamed W. N-acetylcysteine Use in Treatment of Acute Aluminium Phosphide Poisoning: Systematic Review and Meta-Analysis. *Ain Shams Journal of Forensic Medicine and Clinical Toxicology*. 2023;41(2):50-62.



## BÖLÜM VII

# KRONİK BÖBREK HASTALIĞINDA YENİ TERAPÖTİK YAKLAŞIMLAR: NÖROPEPTİDLER

### *New Therapeutic Approaches in Chronic Kidney Disease: Neuropeptides*

Zarife Nigâr ÖZDEMİR KUMRAL

(Dr), Marmara Üniveristesi, Tıp Fakültesi,  
Fizyoloji Anabilim Dalı, zarifeozdemir@gmail.com,  
znozdemir@marmara.edu.tr,  
ORCID: 0000-0002-9485-0174

#### 1. Kronik böbrek hastalığı: Semptom ve tedavi seçenekleri

Böbrek hastalıkları, böbrek yapısındaki anormallikler, böbrek yetmezliğine ve üremik ölüme gidebilen böbrek fonksiyon kaybı olarak tanımlanabilir. (1) Böbreklerin düzgün çalışma yeteneğinin zamanla kademeli olarak azaldığı KBH, artan diyabet, hipertansiyon ve obezite prevalansının yanı sıra nüfusun yaşlanması nedeniyle salgın seviyelere ulaşan yaygın bir durumdur. (2) Altta yatan etiolojiden bağımsız olarak KBH, yavaş ilerleyen, glomerüloskleroz, tübüler atrofi, inflamasyon ve interstisyel fibrozis ile karakterize edilen böbrek fibrozisidir ve geri dönüşümsüz nefron kaybına, son dönem böbrek hastalığına (SDBH) ve/veya erken ölüme yol açar. (3) Hastalığın ilerlemesine katkıda bulunan faktörler arasında parankimal hücre kaybı, kronik inflamasyon, fibroz ve böbreğin rejeneratif kapasitesinin azalması yer almaktadır. Mevcut tedavilerin etkinliği sınırlıdır ve yalnızca hastalığın ilerlemesini geciktirecek stratejileri öne süren ajanlar yerine, ilerlemeyi durdurmak veya tersine çevirmek için yeni terapötik yaklaşımlar geliştirme ihtiyacı devam etmektedir. Klinik öncesi deneysel modellerle gerçekleştirilen çalışmalar, sitokinleri, transkripsiyon faktörlerini, sinyal yollarını ve epigenetik



modülatörleri, özellikle mikroRNA'ları hedefleme dahil olmak üzere fibrozu azaltan çeşitli yaklaşımlar ortaya koymaktadır. Deneysel anlamda yapılan bu çalışmaların bir kısmı nefroprotektif stratejilere işaret ettiğinden şu anda klinik deneylerde test edilmektedir.

KBH için hastalığın ilerlemesini yavaşlatan, SDBH ve kalp yetmezliği (KY) dahil olmak üzere KVH gelişimini önleyen ve KBH'li hastaların sağkalımını uzatan ek etkili tedavilere yönelik bir ihtiyaç vardır. (4) Son 20 yılda, anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri ve anjiyotensin reseptör blokerleri (ARB'ler), Tip 2 diyabetli (T2D) veya T2D'siz KBH ve hipertansiyonu olan hastalar için önerilen tek ajan sınıfı olmuştur. (5) Hem T2D'si olan ve hem de T2D'si olmayan hastalarda ACE inhibitörleri plaseboya kıyasla KBH progresyon riskinde azalma ile ilişkilendirilmiştir. (6, 7) ACE inhibitörü ile birlikte ARB kombinasyonları veya renin inhibitörleri ile ilgili yürütülen çalışmalarda, KBH ilerlemesi açısından ek fayda göstermemekle birlikte ciddi yan etkileri (akut böbrek hasarı, böbrek fonksiyon bozukluğu, inme ve/veya hiperkalemi) nedeniyle erken sonlandırılmıştır. (8)

KBH ilerlemesinin altında yatan mekanizmalar çok faktörlüdür ve üç ana başlık altında toplanabilir, bunlar: hemodinamik, metabolik ve inflamatuvar veya fibrotik faktörlerdir. (9) Glomerüler hiperfiltrasyon, glomerüler hipertansiyona, glomerüler hücre ve mezangiyal hücre proliferasyonuna, makrofaj infiltrasyonuna, hücre dışı matrisin birikmesine ve podosit hasarına yol açar. (10) Ek olarak, başlangıçtaki nefron kaybı, kalan nefronlarda telafi edici bir hiperfiltrasyona neden olur. Tüm bu faktörler glomerüloskleroz, tubülointerstisyel fibroz ve eGFR'nin daha da azalmasına katkıda bulunur. (10)

Kronik böbrek hastalığında diyabet tedavisi için klinik uygulama (KDIGO) 2022 kılavuzunda KBH; 3 aydan uzun süredir mevcut olan ve sağlığa etkileri olan böbrek yapısı veya işlevindeki anormallikler olarak tanımlanır ve hem eGFR'yi (serum kreatinin seviyeleri kullanılarak) hem de albüminüriyi en az yılda bir kez veya daha sık olarak ilerleme riski yüksek olan veya değerlendirmenin tedaviyi etkileyeceği kişilerde değerlendirerek KBH ilerlemesinin izlenmesini önerecek şekilde kararlar alınmıştır. Albüminürinin varlığı, böbrek fonksiyonunda daha hızlı bir düşüş ile ilişkilidir. KBH ilerlemesinin derecesi birçok faktöre bağlıdır: albüminüri, eGFR düzeyi, yaş, cinsiyet, ırk/etnisite, obezite, sigara içme durumu, hipertansiyon varlığı ve kontrolü, hiperglisemi, dislipidemi, alta yatan KVH ve nefrotoksik ilaçlara maruz kalma (nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar) gibi.

ARB'lerin T2D olmayan KBH hastalarında kullanımına ilişkin kanıtlar ve KBH hastalarında tüm nedenlere bağlı ölüm oranı bilgileri nispeten sınırlıdır.

Diyabetik olan veya olmayan hastalarda belirlenmiş böbrek çalışmalarından elde edilen veriler de dahil olmak üzere, KBH hastalarında sodyum-glikoz kotransporter 2 (SGLT2) inhibitör tedavisinin rolünü destekleyen artan kanıtlar vardır. Bu çalışmalar, sırasıyla canagliflozin (11) (T2D hastalarında) veya dapagliflozin (12) (T2D'si olan/olmayan hastalarda) ile KBH ilerleme riskinde önemli bir azalma olduğunu göstermiştir. Bu verilere dayanarak, SGLT2 inhibitörleri ile bireyselleştirilmiş tedavide, diyabetik olan ve olmayan KBH'li hastalarda hastalığın ilerlemesini yavaşlatmak için umut verici bir terapötik seçeneği temsil etmektedir. T2D'in bir komplikasyonu olarak KBH'nin prevalansı ABD'de yaklaşık %40'tır. (13, 14) Diyabette KBH gelişiminin altında yatan temel mekanizmalardan biri, hipergliseminin indüklediği glomerüler hiperfiltrasyondur. (15) Diyabet, esas olarak proksimal tübüler büyüme ve SGLT2 taşıyıcılarının yukarı regülasyonu yoluyla böbrek hipertrofisine neden olur, bu da SGLT2 taşıyıcıları tarafından glikoz ve sodyumun proksimalde yeniden emiliminin artmasına yol açar. Bu, distal tübülde (Henle kulpunda) makula densaya sodyum klorür iletiminin azalmasıyla sonuçlanır ve tübülo-glomerüler geri besleme yoluyla afferent (preglomerüler) vazodilatasyona ve glomerüler hiperfiltrasyona neden olur. Glomerüler hiperfiltrasyon ve hipertansiyon, glomerulusta (oksijen ihtiyacının artmasına yol açar) ve tübüler hücrelerde fiziksel strese (barotravma) neden olur, bu da proinflatuar ve profibrotik bir fenotip ile hipertrofiye ve ardından tübülointerstisyel hasara yol açar. (15) Proksimal tübüler anjiyotensinojen üretimi ve jukstaglomerüler renin salınımı dahil sistemik ve intrinsik renal renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminin (RAAS) yukarı regülasyonu, anjiyotensin II ve aldosteron düzeylerinin artmasına neden olur [36]. Anjiyotensin II ayrıca sodyumun proksimal tübüler geri emilimini uyarır ve glomerüler hipertansiyonu artıran efferent arteriyolar vazokonstriksiyonu indükler. (16) Böbrek hastalığı, diyabetli hastalar arasında önemli bir ölüm nedenidir ve diyabetik böbrek hastalığı (DBH), tüm KBH vakalarının yaklaşık yarısından sorumludur. DBH genellikle zayıf metabolik (glisemik) kontrolün bir sonucu olarak genetik olarak duyarlı bireylerde geliştiği gösterilirken moleküler ve genetik çalışmalar, podositlerin ve endotel hücrelerinin diyabette albüminüri ve erken böbrek hastalığına yol açmadaki kilit rolünü işaret etmektedir. Proksimal tübül değişiklikleri, glomerüler filtrasyon hızı ile güçlü bir ilişki gösterir. Hiperglisemi, endotel hücreleri ve podositlerdeki hücresel metabolizmayı değiştirerek ve proksimal tübül hücreleri için enerji ve oksijen gerektiren aşırı bir iş yükü uygulayarak böbrekte önemli bir hücresel stresi temsil eder. Metabolizmadaki değişiklikler, erken adaptif hücresel hipertrofiye

ve aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesine neden olur. (17, 18) Daha sonra, mitokondriyal kusurlar artan oksidatif strese ve enflamatuar yolların aktivasyonuna katkıda bulunarak ilerleyici böbrek fonksiyonunda düşüşe ve fibroza neden olur. Sodyum-glikoz yardımcı taşıyıcısının veya RAAS'nin blokajı, hücre koruma ve yavaşlayan böbrek fonksiyonu düşüşü ile ilişkilidir. Yeni tanımlanan moleküler yollar, çok ihtiyaç duyulan yeni terapötiklerin geliştirilmesi için temel sağlayabilir. Son 20 yılda, DBH'nin klinik belirtilerinde, diyabet tedavilerinin ve RAAS inhibitörlerinin (ACE inhibitörleri, ARB'ler) daha fazla kullanılmasına bağlı olduğu tahmin edilen albüminüri prevalansının azalmasıyla birlikte bir fenotip değişikliği olmuştur. (14)

Hipertansiyon, çeşitli mekanizmalarla KBH'nin yeni başlangıcına veya ilerlemesine neden olur. Bunlar, kontrolsüz hipertansiyondan (sistemik kan basıncının renal otoregülasyonuna rağmen) glomerulusa doğrudan barotravmayı ve iskemik glomerüloskleroza ve glomerüler hipertansiyon ve hiperfiltrasyon ile efferent vazokonstriksiyona neden olan RAAS ve anjiyotensin II'nin sistemik ve renal aktivasyonunu içerir. (19) KBH'de hipertansiyon gelişimi veya hızlanması, aşırı hacim yüklemesi ile tuz tutulması, sempatik sinir sisteminin aktivasyonu, endotel disfonksiyonu ve oksidatif stres ile ilişkilidir. (20) KBH olan hastalarda KVH için risk faktörleri "geleneksel" ve "geleneksel olmayan" olarak sınıflandırılabilir. Geleneksel kardiyovasküler risk faktörleri, genel popülasyonda olduğu gibi KBH'de aynı prediktif değere sahip değildir (21) ama kardiyovasküler risk faktörleri KBH ilerleme riskini de artırabilir. KBH ve ESKD için bu artmış riskin altında yatan potansiyel mekanizmalar, obezite aracılı hipertansiyon, inflamasyon, glomerüler hiperfiltrasyon, RAAS aktivasyonu (yüksek aldosteron seviyeleri dahil), insülin direnci, adipositokinlerin düzensizliğini içerir. (22) Hiperglisemi, hipertansiyon, obezite ve diğer komorbiditeleri ele alan tedavi stratejilerine ek olarak, SGLT2 inhibitörleri de dahil olmak üzere KBH ilerlemesini yavaşlatmak ve KBH hastalarında sonuçları iyileştirmek için diğer terapötik ajanların faydalarına dair ortaya çıkan kanıtlar vardır. (23, 24) MRA'lar ve GLP1-RA'lar dahil olmak üzere diğer ilaç sınıfları, KBH'li hastalarda daha iyi sonuçlar için potansiyel göstermiştir. (25, 26)

## 2. KBH'a karışan olası nöropeptid aileleri

Nöropeptitler, nöronlar tarafından düzenlenmiş salgı yolu yoluyla üretilen ve salınan ve nöral substratlar üzerinde etki gösteren küçük proteinli maddelerdir. (27) Hem nöropeptit hem de peptit hormonları, aynı enzim setleri tarafından sentezlenir, değiştirilir ve parçalanır. Ayrıca, her ikisi de yakınlarda otokrin

ve parakrin ajanlar olarak ve uzaktan endokrin ajanlar olarak hareket edebilir. Nöropeptid tanımındaki anahtar kelime “nöronlar”dır çünkü nöropeptitler ile peptid hormonları gibi diğer peptitler arasındaki tek fark, bir nöropeptidin bir nöron tarafından sentezlenmesi ve kullanılmasıdır. Aslında, neredeyse tüm nöropeptitler aynı zamanda peptid hormonları olarak bulunur ve bunun tersi de geçerlidir. Bu nedenle, nöropeptid terimini kullanırken, nöropeptitlerin sadece sinir sisteminde olmadığını, merkezi sinir sisteminin hem içinde hem de dışında hareket ettiğini akılda tutmak önemlidir.

Bir dizi nöropeptid potansiyel olarak KBH’da rol oynayabilir ve tanımlanmış nöropeptitlerin sayısı ürkütücü olsa da, tüm peptitler düşünüldüğünde durum daha da etkileyici bir hal almaktadır. Nöropeptidler, peptid hormonları, sitokinler, büyüme faktörleri, antimikrobiyal peptitler, toksinler ve zehir peptitleri ve antifriz proteinlerinin genom homologilerine dayalı olarak Homo sapiens’te toplamda 1000’den fazla tanımlanmış peptid vardır. Bu peptitlerin birçoğunun insan sağlığı ve hastalığındaki işlevleri henüz ortaya çıkmamış olsa da, peptitlerin ve reseptörlerinin güçlü evrimsel korunumu, bu binlerce peptid dizisinin muhtemelen KBH da dahil olmak üzere birçok hastalıkta keşfedilmemiş önemli roller oynayabileceğini öne sürmektedir.

Nöropeptidlerin ortak özellikleri: (1) öncü proteinlerden translasyon sonrası işlem ve yoğun çekirdek veziküllerinden salınma, (2) nispeten büyük bir mesafede hücre yüzeyi reseptörlerinin aktivasyonu ve (3) modülasyonu olmak üzere üç kategoride gruplandırılabilir.

Nöropeptidler, nöropeptid öncüllerinin (prepro-peptid) ve kodlayıcı genin işlenmiş, biyolojik olarak aktif ürünleri olarak sunulurlar. Nöropeptid genleri, yapısal benzerlikleri veya işlevsel benzerlikleri paylaşan ailelerde sınıflandırılırlar.

### **2.1. Pro-enkephalin geni (PENK)**

Çeşitli hasta popülasyonlarında plazma PENK konsantrasyonlarının GFR ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu gösterilmiştir. Plazma PENK konsantrasyonundaki yükselmelerin, serum kreatinin konsantrasyonlarındaki artıştan önce geldiği görülmektedir (28, 29), bu da bu yeni biyobelirteçi özellikle böbrek fonksiyonları hızla değişen kritik hastalarda yararlı kılabilir. Yeni hassas tübüler hasar belirteçleri ile kombinasyon halinde, GFR’deki hızlı değişiklikler ile gerçek böbrek hasarı arasındaki ayırım birleştirilebilir. Bununla birlikte, enkefalinlerin sinyal fonksiyonu veya enkefalin üretiminin artmasına yol açan (patofizyolojik) durumlar da renal modülasyonda olası kafa karıştırıcı

faktörlerdir. Geniş, ileriye dönük, popülasyona dayalı bir kohort çalışmasında pro-ENK'in, KBH riskini öngörmeye klinik uygulama potansiyeli olan bir biyobelirteç olduğu vurgulanmaktadır. PENK'teki genetik varyasyona göre KBH riskinin analiz edildiği genom çapında analizlerin sonucunun, pro-ENK ile böbrek fonksiyonundaki bozulma arasındaki ilişkinin nedensel olabileceğini düşündürmektedir. (30) Bu bilgilere ilave olarak kararlı durum dışı böbrek fonksiyonu olan kritik hastalarda gerçek GFR'yi değerlendirmek için doğru bir yöntem bulma arayışında, mevcut kanıtlar PENK'in GFR'yi tahmin etmek veya akut böbrek hasarını tespit etmede kreatinin bazlı yöntemlerle karşılaştırıldığında daha doğru ve kesin bir vekil belirteç olduğunu göstermektedir. Ayrıca PENK, çeşitli hasta popülasyonlarında böbrek fonksiyonunda gelecekte bozulma ve kötü sonuçların kesin tahminiyle de ilişkilendirilmektedir. (31-33)

## ***2.2. Pro-opiomelanokortin (POMC)***

Melanokortin sistemi, beş melanokortin reseptörünü (MC1R~MC5R), dört pro-opiomelanokortin (POMC) türevi melanokortin peptidini (ACTH,  $\alpha$ -MSH,  $\beta$ -MSH ve  $\gamma$ -MSH), endojen antagonistleri; yani agouti sinyal veren protein (ASP veya ASIP) ve agouti ile ilişkili protein (AGRP) ve melanokortin reseptör yardımcı proteinleri (MRAP) kapsayan vücudumuzdaki en karmaşık ve önemli hormonal sistemlerden biri olan bir nöroimmün endokrin hormon sistemidir. (34, 35) Çok sayıda kanıt, melanokortinlerin hem kemirgen modellerinde hem de insan hastalarda çeşitli böbrek hastalıklarında koruyucu bir aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Özellikle, steroidojenik melanokortin peptidi adrenokortikotropik hormonun (ACTH), muhtemelen steroidojenik aktivitesinden bağımsız bir mekanizma yoluyla, bir dizi böbrek hastalığında yararlı bir etki gösterdiği gösterilmiştir. (36) Steroide dirençli nefrotik glomerülopatili hastalarda ACTH monoterapisi proteinüri remisyonunun indüklenmesinde hala etkilidir ve bu etki melanokortin sisteminin glomerüler hastalıklardaki potansiyel etkileri üzerine araştırmalara ilham kaynağı olmuştur. (37, 38) Ancak melanokortinerjik yolun böbrek hastalığındaki rolüne ilişkin veriler çok sınırlıdır ve hala keşfedilmeyi bekleyen çok büyük bilinmeyenler vardır. Bunlar arasında en tartışmalı olanı, böbrekteki efektör hücrelerin yanı sıra böbrek koruyucu etkinin iletilmesinden sorumlu melanokortin reseptörlerinin tanımlanmasıdır. (39, 40) Melanokortinlerin ilerleyici KBH üzerindeki etkisi, renal tübül atrofisinin temel özelliklerini özetleyen Siklosporin A (CsA) nefropatisi modeli de dahil olmak üzere, renal interstisyel hasar ve fibrozisin in vivo veya in vitro modelleri kullanılarak klinik

öncesi çalışmalarda araştırılmıştır ki bu çalışmalar insanlarda CsA kullanımıyla ortaya çıkan renal tübüler atrofi ve interstisyel fibrozisin temel özelliklerini yüksek doğrulukla özetlemektedir. (41)

Son yıllarda araştırmacılar, a-MSH tedavisinin, kültürlenmiş insan tübüler hücrelerinde CsA kaynaklı apoptozu önemli ölçüde zayıflattığını göstermiştir. (42) Lee ve ark. (43), CsA nefrotoksitesinin sıçan modelinde in vivo, a-MSH'nin, CsA'nın indüklediği tübülointerstisyel fibrozisin yanı sıra tübüler hücre apoptozunu da azaltabildiğini göstermiştir. Bu iki çalışmanın sonuçları melanokortin tedavisinin klinik endikasyonların genişletilmesinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

### 2.3. Dynorfinin

Dynorfinin, peptidin opioid doğasını bildiren Goldstein ve meslektaşları tarafından tanımlanmıştır. (44) İnsanlarda pro-dinorfin (PDYN) geni dört eksondan oluşur. (45) Şimdiye kadar, aktivasyonu nöronal sinyallemede spesifik çeşitli değişikliklere yol açacak olan üç ana opioid reseptörü (OR) kesin olarak tanımlanmış ve açıklanmıştır. Bunlar  $\delta$ -opioid reseptörü (DOR),  $\mu$ -opioid reseptörü (MOR) ve  $\kappa$ -opioid reseptörüdür (KOR). (46) Opioid reseptörlerinin her biri, sinyallemenin aktivasyonuna veya inhibisyonuna yol açan endojen maddelerin fizyolojik etkisine tabidir. Bu noktada endojen agonistlerin bir reseptöre tamamen spesifik olmadığı ve diğer reseptörler üzerinde de etki gösterdiği, ancak daha az ölçüde karmaşık bir klinik tepkiye yol açtığı unutulmamalıdır. DOR esas olarak endojen enkefalinler, MOR endorfinler ve KOR dinorfinler (A ve B) tarafından aktive edilir. (47) Klinik gözlemler ve hayvan çalışmaları, opioid agonistleri veya antagonistlerinin kullanımıyla CKD-aP tedavisi için yeni seçeneklerin keşfedilmesine yol açmıştır. Örneğin, nalfurafin gibi KOR agonistlerinin KBH-aP'li hastalara uygulandığında kaşıntı şiddetini azalttığı gösterilmiştir. (48) Aynı zamanda OR agonisti - seçici ve periferik etkili difelikefalin, CKD-aP tedavisi için FDA ve EMA tarafından onaylanan ilk ilaçtır. (49) KBH olan hastalarda, morfin, oksikodon ve kodein gibi test edilen opioidlerin konsantrasyonlarında değişikliklere yol açabilecek metabolizma veya madde atılımında bozulma olmaktadır. (50) Yakın zamanlı bir başka çalışmada da, diyaliz hastalarında gelişen kaşıntıya opioid sisteminin bireysel bileşenlerinin konsantrasyonları arasındaki dengedeki bozuklukların katkıda bulunabileceği öne sürülmüştür. (51, 52) Endojen KOR agonistleri olan dinorfinlerin omurilik seviyesinde kaşıntının inhibitör nöromodülatörleri olarak çalıştıkları, akut kaşıntıya

yönelik bir fare modelinde, belirli KOR antagonistlerinin kaşınmaya neden olduğu, akut veya kronik kaşınıtıya sahip fare modellerinde, KOR agonistlerinin (örn., U50, 488, nalfurafine, CR 845, nalbuphine) farklı pruritogenlerin neden olduğu kaşınmayı baskıladığı gösterilmiştir. Bu bağlamda; nalfurafin, CR 845 ve nalbuphine, KBH ile ilişkili kaşınıtı için klinik çalışmalarda yerini almaktadır. (52)

#### 2.4. *Vazopressin*

Diyabetik olmayan (5/6 nefrektomi) ve diyabetik KBH'yi (streptozotosin kaynaklı diyabet) hayvan çalışmalarında modelleyen araştırmalarla, hasarı başlatan etkenden bağımsız olarak ilerleyici böbrek hasarının ortak bir yolunun tanımlanması çok önemlidir. (53) Bu yol, afferent ve daha az derecede efferent arteriyolar tonusta azalmaları içerir. Tek nefron perfüzyonunda, glomerüler kılcal hidrolik basınçta ve filtrasyon hızında artışlar ve kalıcı glomerüler hiperfiltrasyona yol açan tübüloglomerüler geribildirim sınırlanması ve glomerüler kılcal damarları sistemik hipertansiyona maruz bırakan otoregülasyon başarısızlığı sayılabilir.

Yeterince tanınmamasına rağmen, çok sayıda kanıt AVP'nin diyabetik olmayan ve diyabetik KBH ilerlemesine katkıda bulunduğunu göstermektedir. Hayvan modellerinde ve diyabetik olmayan KBH'li hastalarda, streptozotosin kaynaklı ve genetik diyabetli hayvan modellerinde ve tip I ve tip II diyabetli hastalarda plazma AVP düzeyleri artmıştır. (54, 55) Su alımının artırılmasıyla AVP'nin baskılanması, 5/6 nefrektomize sıçanlarda kan basıncını, proteinüriyi, böbrek hipertrofisini, glomerüloskleroza ve tübülointerstisyel fibrozisi azaltmıştır. (56) AVP salgılamayan Brattleboro sıçanlarında 5/6 nefrektomiyi takiben telafi edici böbrek hipertrofisi ve KBH ilerlemesi zayıflamıştır (57) ancak daha kısa süreli bir çalışmada (3 hafta- 13 hafta karşılaştırması ile) bu etki tespit edilememiştir. (58) Yakın zamanda yapılan bir çalışma, en az üç gün boyunca dolaşımında devam eden yüksek AVP'nin (uzun süreli ozmotik uyarı veya sürekli infüzyonla), V2RA tarafından bloke edilen ancak V1a veya tarafından bloke edilmeyen V2 reseptörlerini (TAL ve toplama kanalı) eksprese eden hücrelerde proliferatif bir tepkiye neden olduğunu göstermiştir. V1bRA, uzun süreli uyarımın bu hücreleri cAMP'ye bağımlı proliferatif fenotipe dönüştürebileceğini düşündürmektedir. (59) Özetle, AVP'nin KBH ilerlemesine katkıda bulunduğuna dair çok sayıda kanıt vardır. Vasopressin reseptör antagonistlerinin, eğer varsa, ne dereceye kadar KBH'nin mevcut tedavisine katkı sağlayabileceği önemli bir araştırma konusudur.



### 2.5. Oksitosin

Oksitosinerjik sistem, merkezi sinir sistemi dışındaki birçok organ sisteminde fizyolojik fonksiyonları etkiler. Oksitosin (OT) kalpte sentezlenir ve rahim ve beyinde bulunanlara benzer şekilde OT reseptörü memeli kardiyak miyositlerinde, kardiyak fibroblastlarında ve kan damarlarında tanımlanmıştır. (60-62) OT'nin ilk kardiyak spesifik rolü, memeli kalplerinden atriyal natriüretik peptidin (ANP) salınmasını tetikleme yeteneği ile gösterilmiştir (63), bu da natriüze ve kan basıncında düşüğe neden olur. (64) Ayrıca, OT'in anti-oksidan etkileri yoluyla, akut E. coli piyelonefriti sırasında nötrofillerin aşırı infiltrasyonunu ve aktivasyonunu içeren serbest radikallere zarar veren basamakları önleyerek ve pro-inflamatuar sitokinlerin salınımını inhibe ederek böbrek parankiminin bütünlüğünü desteklediğini ve böbrek fonksiyonlarını iyileştirdiği gösterilmiştir. (65) Bir başka çalışmada eksojen OT'in böbrek dokusunu İ/R kaynaklı oksidatif hasara karşı böbrek fonksiyonunu ve mikroskobik hasarı iyileştirerek ve oksidan doku tepkilerini hafifleterek koruduğu görülmektedir. (66)

### 2.6. Gastrin

Gastrin, mide antrumunun G hücreleri tarafından üretilir. (67) Farklı bağırsak hormonları arasında gastrin, renal proksimal tübül (RPT) hücreleri tarafından en fazla alınan hormondur. (68) Klinik veriler ve hayvan deneyleri KBH'nin artan serum gastrin seviyeleri ile ilişkili olduğunu göstermiştir (69); GFR ile serum gastrin düzeyleri arasında ters bir ilişki vardır. Ancak GFR'nin azalmasıyla birlikte serum gastrin seviyesindeki artışın KBH'nin mi yoksa vücudun böbrek hasarına karşı koruma girişiminin mi olduğu net değildir. Gastrin, kan basıncını normalleştirerek, renal tübül hücre apoptozunu azaltarak ve makrofaj eferositozunu artırarak hipertansif nefrotiye karşı koruma sağlar. Gastrin aracılı CCKBR nükleer translokasyonu, yeni bir sinyal yolu olan PPAR-a'nın bir transkripsiyon faktörü olarak hareket etmesini sağlayabilir. (70) Yapılan yeni araştırmalar, mide-böbrek ekseninin varlığını kanıtlamaktadır (71), gastrointestinal kanalda üretilen hormonlar ve peptitler, sodyum atılımı gibi böbrek fonksiyonlarını etkileyerek böbrek hormonlarının otokrin fonksiyonunu düzenleyebilir. (67, 72) Yemek sırasında gastrin ve CCK gibi çok sayıda gastrointestinal hormonu salgılanır. Kan dolaşımında dolaşan gastrin seviyesi, yemekten sonra CCK'den yaklaşık 10 ila 20 kat daha fazla olacak şekilde belirgin artış gösterir. (73) Gastrinin sıçan kalplerinde miyokardiyal iskemi/reperfüzyon



hasarına karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu daha önce bildirilmiştir. (74) Yine bir başka çalışma gastrinin önceden uygulanmasının, PI3K/Akt/Bad aracılı anti-apoptoz sinyalinin aktive etmek için CCKBR aracılığıyla böbrek I/R hasarını hafifletebileceği ve gastrinin, klinikte akut böbrek hasarını önlemek için potansiyel etkili bir araç olabileceğini düşündürmektedir. (75)

### **2.7. Kolesistokinin**

Kolesistokinin (CCK), ince bağırsakta keşfedilen bir peptid hormonudur ve yemekten sonra duodenum ve jejunumun endokrin hücrelerinden kan dolaşımına salgılanır. (76) CCK, sindirim sisteminde bir düzenleyici ve sinir sisteminde bir nörotransmitter olarak iyi bilinmektedir. (77) CCK'nın bu iyi bilinen etkilerine ek olarak, CCK'nın antiinflamatuvar etkileri de rapor edilmiştir. (78) CCK'nın böbrekte eksprese edildiği ve CCK reseptörlerinden olan CCK-1R ve CCK-2R eksikliğinin, diyabetin indüklenmesinden sonra böbreklerdeki inflamasyonun artmasıyla albüminüri gelişimini hızlandırdığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, CCK-8S'nin uygulanması böbrek iltihabına karşı koruma sağlayarak diyabetik sıçanlarda albüminürinin azalmasına yol açtığı ve kültürlenmiş THP-1 hücrelerinde yüksek glikozun neden olduğu TNF-a ekspresyonunu ve göçünü doğrudan inhibe ettiği gösterilmiştir. (79) CCK'in diyabetik nefropatinin ve diğer inflamatuvar böbrek hastalıklarının erken evresi için yeni bir tedavi stratejisi sağlayabileceği düşünülmektedir.

### **2.8. Nöropeptid Y**

Nöropeptid Y (NPY), merkezi sinir sisteminden kardiyovasküler sisteme, kemik ve böbreğe kadar çeşitli organ sistemlerinde geniş kapsamlı etkileri olan sempatik bir nörotransmitterdir. (80) NPY'yi eksprese eden ana sistemler sempatik nöronları, enterik nöronları ve çeşitli beyin yollarını içerir. (81) Ana sempatik verici olan norepinefrin gibi, NPY de sodyum (82) ve potasyumun (83) renal taşıma mekanizmalarını modüle eder ve inflamasyon ve immün fonksiyon regülasyonu (84, 85) üzerinde önemli etkileri vardır. Dolaşımdaki NPY esas olarak bağırsak dolaşımından kaynaklanır (86) ve bu nöropeptid, sağlık ve hastalıkta mikrobiyota bağırsak-beyin eksenini yöneten nöroendokrin verici olarak görev yapan bağırsak mikrobiyotası ile beyin arasındaki etkileşimde kritik bir oyuncu olarak ortaya çıkmaktadır. (81) NPY, nörodejeneratif hastalıklar (87), gastrointestinal hastalıklar (88), obezite (89) ve KV hastalıklar (90, 91) ile ilişkilendirilmiştir.

Aşırı sempatik aktivitenin, yaklaşık yirmi yıl önce böbrek hastalığının ilerlemesinde rol oynadığından şüpheleniliyordu. (92, 93) Kalp hızı gibi bir sempatik aktivite belirteci, yaşlı KBH olan hastalarda diğer risk faktörlerinden bağımsız olarak böbrek yetmezliğinde ilerlemeyi tahmin etmede belirteçtir. (94) Sempatik sistemin ayrılmaz bir parçası olmasının yanı sıra, NPY doğuştan gelen bağımsızlık ve inflamasyonda kendi başına yerleşik bir role sahiptir (84, 85) ve inflamatuvar fenomenler KBH'nin böbrek yetmezliğine doğru ilerlemesinde önemli bir rol oynar. (95, 96) NPY'nin KBH ilerlemesinde yer alma olasılığı, sistemik lupuslu farelerde böbrek inflamasyonu (97) ve sıçanlarda doğum sonrası erken hiperalbuminüremide böbrek fibrozu ve böbrek işlev bozukluğu (98) gibi çeşitli deneysel modellerde ortaya konmaya çalışılmıştır. Ayrıca, NPY'nin prekürsör molekülündeki genetik bir polimorfizm, preproNPY, proteinüri ve tip 2 diyabetiklerde nefropati riski ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu gösterilmiştir. (99) Dolaşımdaki NPY seviyeleri, ilerlemiş KBH'de sol ventrikül hipertrofisi (100) ve ani KV olaylar (101) ve ayrıca kemik hastalığı (102) ile de ilişkilendirilmiştir. Dolaşımdaki NPY ile glomerüler filtrasyon hızının (GFR) ilerlemesi ve proteinüri arasındaki ilişkinin aydınlatılmasının hedeflendiği kohort çalışmasında kombine renal sonlanım noktası riski araştırılmış ve NPY'nin, proteinüri ve daha hızlı KBH ilerlemesinin yanı sıra daha yüksek böbrek yetmezliği riski ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur. (103) Toparlayacak olursak elde edilen literatür bilgisi sempatik sistemin ve/veya NPY molekülüne özgü özelliklerin KBH ilerlemesinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

### ***2.9. Kalsitonin geniyle ilişkili peptid***

37-aa'lik bir nöropeptid olan kalsitonin geniyle ilişkili peptid (CGRP), kalsitonin (CT)/CGRP geninin birincil transkriptinin dokuya spesifik eklenmesinden türetilir. (104) İmmünoreaktif CGRP ve reseptörleri sinir ve kardiyovasküler sistemlerde geniş çapta dağılmıştır. (105) Potent bir vazodilatör olduğu gösterilmiş olan CGRP, tüm damar yataklarındaki kan damarlarının çevresinde yoğun bir şekilde bulunmaktadır. (106) Peptid aynı zamanda hipertansiyonun neden olduğu böbrek hasarını da engeller. (107) Li ve ark. 2013 yılında yaptıkları bir çalışmada, a-CGRP yokluğunun aracılık ettiği duyuşal sinirlerin yeni tanımlanan "efferent fonksiyonu"ndaki bozulmanın, DOC-tuz hipertansiyon modelinde böbrek hasarını önemli ölçüde artırdığını göstermiştir. Bu etki öncelikle oksidatif stres ve inflamasyonda belirgin bir artış yoluyla sağlanmaktadır ve kan basıncına hem bağımsız hem de bağımlı mekanizmaları içerir. Çalışma CGRP analoglarının kullanımı yoluyla duyuşal

sinir fonksiyonunun hedeflenerek hipertansiyonun neden olduğu böbrek hasarının tedavisini öngörmektedir. (108) Son dönem KBH olan hastalarda, hiperkalseminin yokluğunda üremik fazdan önce yüksek kalsitonin düzeyleri rapor edilmiştir. (109) Farmakolojik ajanlar olan nitrogliserin ve rutaekarpinin farmakolojik etkilerinin, CGRP'nin sentezi ve salınımındaki artışla ilişkili olduğu gösterilmiştir. (110, 111) Ek olarak, bir klinik çalışma Ang II tip 1 reseptör blokleri olmesartan ile tedaviyi takiben hipertansiyonu olan hastaların sistolik ve diyastolik kan basıncı düzeylerinin normale döndüğünü ve CGRP düzeylerinin de arttığını göstermiştir. (112) Birlikte ele alındığında bu bulgular, sartanların kan basıncını düşürmesinin moleküler mekanizmasının CGRP yolu ile de ilişkili olabileceği hipotezini de desteklemektedir.

### **2.10. Amilin**

Amilin, 37 amino asit uzunluğunda bir pankreas hormonudur ve beta hücrelerinden insülin ile birlikte salgılanır. (113) Çalışmalarda, amilin'in böbrek fonksiyonu ve yolak fizyolojisinde ve ayrıca diğer organlarda yeni işlevlere sahip olduğu gösterilmiştir. (114) Yakın zamanda yapılan bir çalışma, kırmızı kan hücreleri-kılcal etkileşiminin, diyabetik böbrek hasarında renal hipoksiye katkıda bulunan potansiyel bir faktör olabilecek amilin prediyabetik hipersekresyonu tarafından değiştirildiğini göstermiştir. (114) Başka çalışmalardan elde edilen bulgular da amilin ile böbrek fizyolojisi arasında bir bağlantı olduğunu göstermiştir: 1) renal kortekste yüksek afiniteli amilin bağlanma bölgelerinin varlığı (115), 2) radyoaktif işaretli amilin'in in vivo enjeksiyonu böbreğin proksimal tübüllerinde amilin bağlanma bölgesinin varlığını göstermiştir (116), 3) amilin peptidinin insanda ve sıçanlarda uygulanması, plazma renininin artışı uyarır (117), 4) Amilin, böbrekte sodyum ve su geri emiliminin güçlü bir uyarıcısıdır (116), 5) Amilin mitojen olarak davranır ve proksimal tübüllerin epitel hücrelerinin hiperplazisini uyarır. (116)

### **2.11. Adrenomedullin**

ADM, halka yapısına ve C-terminal amidasyonuna sahip 52 amino asitli bir peptiddir. 1993 yılında Kitamura ve ark. insan feokromositomasından ekstrakte edilmiş fraksiyonlarının trombosit siklik adenozin 3',5'-monofosfatı (cAMP) artırma yeteneğini izleyerek yeni bir hipotansif faktör keşfetti. (118) ADM, cAMP ve nitrik oksit aracılığıyla damar genişletici özelliklere aracılık eder. (119) İmmünoreaktivitesi ve gen ekspresyonları, böbrek de dahil olmak

üzere memeli organlarında yaygın olarak dağılmıştır. (120) Vazodilatatif etkisine ek olarak, GFR'deki artışlar ve distal tübüler sodyum yeniden emilimindeki azalmanın aracılık ettiği diüretik ve natriüretik etkilere de sahiptir. (120) Klinik olarak kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda plazma ADM seviyelerinin arttığı gösterilmiştir. (121) Adrenomedullin 2 (122)/intermedin (123) (AM2/IMD), organ koruyucu etkileri olan güçlü bir vazodilatör peptiddir ve böbrekte bol miktarda eksprese edilir. (124) ADM'nin damar tonusunu ve böbrek homeostazisini düzenlemek için vazodilatör ve natriüretik özellikleri nedeniyle önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. ADM araştırmaları henüz yeni başlamıştır ve çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik koşullar altında ADM'nin önemini ele almak için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

### ***2.12. Natriüretik peptidler***

Tüm natriüretik peptidler preprohormonlar olarak sentezlenirler. Atriyal natriüretik peptit'I (ANP) kodlayan yaklaşık 2 Kb uzunluğunda ve 3 ekson ve 2 introndan oluşan NPPA genidir. Ortaya çıkan mRNA, preproANP olarak bilinen 151 amino asitli bir polipeptide yol açar. İlk 25 amino asit, atriyal granüllerde depolanan ANP'nin ana formu olan proANP adı verilen 126 amino asitlik bir peptidi verecek şekilde bölünen bir sinyal dizisini oluşturur. (125) Bu granüllerden salındıktan sonra proANP, bir transmembran kardiyak serin proteazı olan korin tarafından hızla parçalanır. Korin'in atriyal kardiyomyositlerin hücre dışı yüzeyinde yüksek oranda eksprese edildiği ve proANP'yi in vitro olarak ANP'nin biyolojik olarak aktif 28 amino asit formuna böldüğü gösterilmiştir. (126) Fonksiyonel korin içermeyen farelerin kalplerinde ANP düzeylerinin azaldığı ve hafif derecede hipertansif oldukları gösterilmiştir. (127) ProANP'nin böbreklerde bilinmeyen bir proteaz tarafından alternatif şekilde işlenmesi, urodilatin adı verilen ve dört ek amino terminal kalıntısı içeren 32 amino asitlik bir peptitle sonuçlanır. (128) Fare ANP geni NPPA'nın bozulması, başlangıçta tuza duyarlı olarak tanımlanan, ancak daha sonra diyeteki tuz alımıyla ilişkili olmadığı anlaşılan belirgin hipertansiyonla sonuçlanır. (129) ANP (130) veya ürodilatinin (131) infüzyonu, deneysel iskemik akut böbrek yetmezliğinde (ABY), özellikle doğrudan renal artere verildiğinde böbrek dokusu hasarını hafifletmiş ve glomerüler filtrasyon hızını korumuştur (132) ABY'si olan insanlarda ANP uygulaması, böbrek fonksiyonunda önemli bir iyileşmeye neden olmaz ve diyaliz ihtiyacını azaltmazken mortaliteyi de etkilemediği gösterilmiştir. (133) ANP'lerin hipotansiyon ve bradikardi gibi olumsuz olayları tetiklemesinden dolayı ABY hastalarının tedavisi açısından yararlı olmaktan

çok zararlı olabileceğini düşündürmektedir. (134) Ancak proANP<sub>1-30</sub> (uzun etkili natriüretik peptid), proANP<sub>31-67</sub> damar dilatörü ve proANP<sub>79-98</sub> (kaliüretik peptid), sağlıklı insanlarda veya hayvanlarda hiçbir zaman hipotansif bir olaya neden olmamışlardır. (135) Böbrek nakli alıcılarının nakil sonrası geç döneminde proANP<sub>1-30</sub> ve proANP<sub>31-67</sub> 'nin plazma konsantrasyonu ve idrarla atılımı böbrek yetmezliği, proteinüri, hipertansiyon ve immünsüpresyondan etkilenir. Damar dilatörü akut böbrek yetmezliği olan hayvanlarda kan üre nitrojenini, serum kreatininini ve mortaliteyi azaltırken damar dilatörü olmayanların aksine sürekli olarak proANP<sub>31-67</sub> ile tedavi edilen akut böbrek yetmezliği hayvanlarında glomerulus ve renal tübülün korunduğu gözlenmiştir. (136)

Başlangıçta domuz beyin dokusu ekstraktlarından saflaştırıldığı ve dizilendiği için "beyin natriüretik peptidi" (BNP) olarak adlandırılan ikinci tür natriüretik mevcuttur. (137) Kalp dokularında daha yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu ortaya konan BNP'yi insanda kodlayan gen, NPPB, kromozom 1 üzerinde bulunurken fare genomunda, kromozom 4 üzerinde yer almaktadır. (138) Kalp yetmezliği (KY) ve buna bağlı ani kalp ölümü, KBH hastalarındaki ölümün ana nedenleridir. KBH hastalarında KY'nin erken teşhisi ve doğru prognozu, tedavi sürecinin iyileştirilmesine yardımcı olabilir. Biyobelirteçler bu süreçte önemli rol oynar. BNP ve NT-proBNP gibi bazı klasik KY biyobelirteçleri KBH hastalarında kullanıldığında böbrek yetmezliği nedeniyle tanı ve prognoz değerlendirmesi bozulur ve cut off değerinin uygun şekilde ayarlanması gerekir. BNP, KY tanısı ve prognozu için sınıf IA endikasyonu olarak önerilmektedir ve bu, tahmin ve etkinlik değerlendirmesinde büyük öneme sahipken aynı zamanda hastalığın nedeninin belirlenmesinde ek role sahiptir.

### **2.13. Endotelin**

Endotelin (ET), insanlarda benzersiz izoformlar olan ET-1, ET-2, ET-3'e sahip 3 farklı gen ile karakterize edilen 21 amino asitli bir peptiddir ve bunların üçü de güçlü vazokonstriktör olmakla birlikte pro-fibrotik büyüme faktörleridir. (139) Bununla birlikte ET-1, vasküler ton üzerinde en büyük düzenleyici etkiye sahip olan baskın vasküler izoformdur ve renal/kardiyovasküler patofizyolojinin düzenlenmesinde tamamlayıcıdır. ET-1, otkrin, parakrin ve endokrin sinyal yolları aracılığıyla etki gösterir ve hem katekolaminleri hem de RAAS'yi düzenler. (140) ET-1 aktive edildikten sonra, vasküler düz kas hücreleri ve endotel dahil olmak üzere vücudun birçok bölgesinde geniş kapsamlı etkiler gösterir. (141) ET-1, klatrin aracılı endositoz yoluyla hücresel alımın ardından vasküler düz kas hücrelerini etkileyerek akciğer ve böbrekteki reseptörler

tarafından temizlenir. (142) ET sentezi, anjiyotensin, vazopressin, IL-1, düşük hücre dışı pH ve siklosporin A tarafından indüklenen gen transkripsiyonu ile artış gösterirken ve prostasiklin, NO ve natriüretik peptidler tarafından azaltılabilir. Böbrekte ET-1, vasküler endotel, mesangial hücreler ve tübüler epitel tarafından üretilen, medüller toplayıcı kanaldaki ana hücreler tarafından ifade edilen en büyük aktiviteye sahip, stres kaynaklı bir düzenleyicidir. (143) ET aktivasyonu, ET-1 ve ET<sub>A</sub> aracılı pro-fibrotik yollar yoluyla KBH ilerlemesini hızlandırabilir ve diyabetik nefropati (DN), hipertansif nefropati, fokal segmental glomerüler skleroz (FSGS) ve polikistik böbrek hastalığı gibi otozomal hastalıklarda rol oynayabilir. İlk veriler ET'i antagonize etmenin umut verici bir terapötik yol olabileceğini düşündürmektedir. Klinik öncesi ve erken faz klinik çalışmaları, ET antagonistlerinin glomerüler hasarı, podosit silinmesini, proteinüriyi ve nihai skarlaşmayı ve sklerozu geciktirebileceğini göstermektedir. (144) Diyabet ve insülin direnci, obezite ve dislipidemi dahil olmak üzere KBH ile ilişkili birçok hastalıkta ET-1 üretiminin arttığı bulunmuştur ve renal ET-1 üretimi aynı zamanda yaşlanma süreci, büyüme faktörleri, inflamatuvar sitokinler ve proteinüri tarafından da arttırılmaktadır. (145) ET-1'in ET<sub>A</sub>'ya bağlanması böbrek fibroblastlarını uyarır, hücre dışı matriks sentezinin artmasına neden olur, kollajen üretimini indükler ve fibronektin ve tip IV kollajenin salgılanmasıyla skar oluşumunu ilerleten mesangial hücre çoğalmasını sağlar. Sistemik asit miktarı artışı, renal ET-1 üretimini uyarır ve telafi edici bir yanıt olarak proksimal ve distal nefronda asit salgılanmasına yol açar. Progresif böbrek fonksiyon bozukluğu, metabolik asidozu daha da kötüleştirir ve ET-1 salgılanması, ET-1 ve ET<sub>A</sub> aracılı pro-fibrotik yollar yoluyla KBH ilerlemesine katkıda bulunur. Ayrıca çalışmalar ET-1'in renal damar yatakları üzerindeki güçlü vazokonstriktif etkisini göstermiştir. Ekzojen ET-1'in, GFR'nin azalmasına, filtrasyon fraksiyonunun artmasına, ayrıca sodyum ve sıvı tutulmasına neden olduğu gösterilmiştir. (146) Son yıllarda, endoplazmik retikulumun (ER) stresi, ET-1 aracılı renal tübüler hasarın bir mekanizması olarak öne sürülmüştür. Katlanmamış proteinler ER'de birikir ve katlanmamış protein yanıtını (UPY) tetikler. ER'nin UPY'ı, proteinlerin transkripsiyonunu ve translasyonunu sınırlar ve halihazırda toplanmış proteinleri katlamak amacıyla ER şaperon ekspresyonunu yukarı doğru düzenler. Zamanla bu yol, böbrek hastalığında olduğu gibi organ hasarına ve hücre ölümüne yol açabilir. Araştırmalar, diyabetik nefropati gibi böbrek hastalıklarında ve kontrast, iskemi/reperfüzyon veya septik şoka bağlı akut böbrek hasarında hem ET-1 hem de ER stresinde artış olduğunu göstermiştir. Günümüzde, ET-1'in UPR'yi arttırdığı mı yoksa tam tersi bir etki mi gösterdiği netlik kazanmamıştır. (147)

### 2.14. Glukagon

Glukagon, geni 2. kromozom üzerinde bulunan 29 aminoasiten oluşan tek zincirli bir polipeptiddir. Gastrointestinal hormonlardan sekretin ve gastrik inhibitör peptidi (GIP) içerir. KBH ve Tip 2 diyabeti tedavi edici ajanlar sıklıkla böbrek yetmezliği olan hastalarda kullanım kısıtlamaları nedeniyle sınırlıdır, dolayısıyla bu grup için karşılanmamış büyük bir ihtiyaç bulunmaktadır. Kan glukozunun, vücut ağırlığının ve kan basıncının kontrol edilmesi hastalık yönetiminin temel hedefleridir. (148) Daha yakın zamanlarda, tip 2 diyabet için yerleşik tedaviler olan SGLT-2 inhibitörleri böbrek hastalığının ilerlemesini geciktirmede glukozu düşürmenin ötesinde faydalar göstermiştir. Bu durum, T2DM'li ve KBH olan hastalara bu sınıftaki ilaçlarla tedavinin yönlendirilmesi yönünde kılavuzlarda değişikliklere yol açmıştır. (149) Benzer şekilde, glukagon benzeri peptid-1 reseptör agonistleri ile (GLP-1 RA'lar), T2DM ve obezite için onaylanmış tedavilerin, tahmini glomerüler filtrasyon hızı (eGFR) <60 ml/dak/1,73 m<sup>2</sup> olan hasta alt grupları da dahil olmak üzere tip 2 diyabetli hastalarda makroalbuminüriye ilerlemeyi geciktirdiği gösterilmiştir. (150) Bununla birlikte, GLP-1 RA'ların son dönem böbrek hastalığına ilerleme üzerindeki etkisi KBH hastalarında tam olarak araştırılmamıştır. GLP-1 RA'ların güvenliği ve tolere edilebilirliği, klinik geliştirme programlarının yanı sıra kapsamlı pazarlama sonrası deneyime dayanarak iyi bir şekilde belirlenmiştir. Kusmayı da içerebilen gastrointestinal olaylar dehidrasyona neden olabilir ve özellikle önceden KBH'sı olan kişilerde dehidrasyon ABNH'na yol açabilir, bu da GLP-1 RA'ların reçeteleme bilgilerinde yer almaktadır. Klinik geliştirme programındaki (SUSTAIN) deneme çalışmalarından toplanan semaglutid verilerinin analizi, bu GLP-1 RA ile AB riskinde artış bulunmazken; LEADER (Liraglutid Etkisi ve Diyabetteki sonuçları: Kardiyovasküler Sonuçlarının Değerlendirilmesi) çalışması verilerinde liraglutid için de benzer bulgular tespit edilmiştir. (151) İnflamasyon ve oksidatif stresin azalması ve böbrek oksijenasyonunun veya perfüzyonunun iyileştirilmesi olası iyileştirici mekanizmalar arasında sayılabilir ancak birkaç küçük klinik ve klinik dışı çalışma bu konuya eğilmiştir. Ayrıca, bu çalışmalar öncelikle diyabetli veya diyabetsiz normal böbrek fonksiyonu ortamında GLP-1'e maruz kalmanın hemen ardından akut faz yanıtlarına odaklanmıştır, KBH adına veriler kısıtlıdır. Bunun yanında, GLP-1 RA'ların sistemik inflamasyonu azalttığını ve semaglutidin özellikle bazı pro-ekspresyonun ekspresyonunu aşağı doğru düzenlediğini öne süren birikmiş kanıtlar mevcuttur. (152) Böbrek hemodinamiklerinde GLP-1 RA'ların neden olduğu değişiklikler, başlangıçtaki böbrek fonksiyonuna bağlı olabilir ve bu



gözlemler çalışmalar arasında tutarlı değildir. Akut fazda, GLP-1 RA tedavisinin natriüresi tetiklediği ve distal nefronda artan tuz dağıtımının, tübüler glomerüler geri bildirim yoluyla intraglomerüler basıncı azaltabildiği gösterilmiştir. (153) Üstelik bileşiklerin aynı zamanda ATII ve renin'i de baskılayarak RAAS'ni modüle ettiği ortaya konmuştur. GLP-1 reseptör agonizmasının potansiyel antiinflamatuvar etkilerinin, GLP-1 RA ilaç sınıfının potansiyel böbrek koruyucu faydasında gerçekten bir rol oynayıp oynamadığını araştırmak için ek çalışmalara ihtiyaç vardır. (154)

### **2.15. Glukoz-bağımlı insülinotropik polipeptid**

Tirzapatid, T2DM'lu yetişkinlerde glisemik kontrolü iyileştirmek için Mayıs 2022'de Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Kasım 2022'de Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından onaylanan bir ikiz-inkretindir. (155) İkiz-inkretinler glikoza bağımlı insülinotropik polipeptid (GIP) ve GLP1 reseptörlerinin ikili agonistidir. Obezite ve ilişkili rahatsızlıkları olan kişilerde yapılan son randomize klinik çalışmalarda, tirzepatidin vücut ağırlığını azalttığı ve diğer kardiyorenal risk faktörlerini (kan basıncı, glikozillenmiş hemoglobin, düşük yoğunluklu lipoprotein, kolesterol ve albüminüriyi iyileştirdiği gösterilmiştir. (155)

### **2.16. Nesfatin**

Son yıllarda, nükleobindin-2 (NUCB2) proteininin bir öncüsü olan 82 amino asitli bir peptid olan nesfatin-1 (156), pleiotropik özelliklerinden dolayı büyük ilgi görmüştür. Nesfatin-1 peptidi ilk olarak supraoptik çekirdek, paraventricüler çekirdek, zona incerta ve lateral çekirdek dahil olmak üzere sıçan hipotalamusunda keşfedilmiştir. Hipotalamusun yanı sıra kalp, akciğer, karaciğer, mide, pankreas ve testislerde de nesfatin-1 ekspresyonu rapor edilmiştir ve kan-beyin bariyerini saturasyon olmadan geçer. (157) Nesfatin-1'in, GLUT-4 membran translokasyonu ve Akt fosforilasyonu yoluyla glukoz homeostazisi, insülin sekresyonu ve insülin duyarlılığında düzenleyici bir role sahip olduğu bildirilmektedir. (158) Tezcan ve ark., tek taraflı üreteral obstrüksiyonlu sıçan modelinde antioksidan ve antiinflamatuvar mekanizma yoluyla nesfatin-1 peptidinin fibrozisi azalttığını bildirmişlerdir. (159) Lahane ve ark., nesfatin-1'in, oksidatif stres, apoptoz ve fibrozisin inhibisyonu yoluyla sıçan böbrek epitel hücrelerini yüksek glukoz ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kaynaklı hasara karşı koruduğunu ortaya koymuşlardır ki bu mekanizmaların hepsi KBH'da karşılaşılan basamaklardır. (160)



### 2.17. *Apelin*

Apelin peptidleri, 77 amino asitlik bir öncü olan pre-pro-apelinin C-terminal bölünmesiyle üretilir. Değişen uzunluklardaki peptid fragmanları in vivo olarak dolaşmaktadır; başlıca izoformlar apelin-36, apelin-17 ve apelin-13'tür. (161) Apelin sistemi, apelin reseptörünü ve onun iki endojen ligandını; apelin ve ELABELA/toddler'ı (ELA; apelin reseptörü erken endojen ligandı olarak da bilinir) içerir. Apelin-13'ün piroglütamatlı formu olan [Pyr1]apelin-13, yapısal olarak aminopeptidazlar tarafından metabolize edilmeye apelin-13'ten daha dirençlidir ve kardiyovasküler sistemde ve insan plazmasında en bol bulunan apelin izoformudur. (162) Vasküler ve kardiyak etkileri üzerinden ele alındığında, KBH medial vasküler kalsifikasyon ve arteriyel sertliğin gelişimi ile karakterizedir ve endotel hasarın yanı sıra damar yapısındaki değişiklikler endotel disfonksiyonuna yol açar. Klinik öncesi ve klinik çalışmalar apelinin vazodilatör etkisinin endotel disfonksiyonu durumlarında bile devam ettiğini göstermektedir ve bu etkinin NO'den bağımsız olduğu görünmektedir. (163) Bu bilgiler ışığında apelin'in, prostanoid bağımlı bir mekanizma yoluyla etki edebileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, belki de farklı siklooksijenaz inhibitörlerinin kullanımı ve bunların sinyalleme üzerindeki farklı etkileri nedeniyle elde edilen veriler sınırlıdır. Klinik çalışmalarda, kalp yetmezliği olan hastalar ve sağlıklı gönüllülerde, [Pyr1]apelin-13'e yanıt olarak önkol damarlarında doza bağlı vazodilatasyon görülmüştür. (164) Kalp transplantasyonundan sonra immün aracılı vasküler hasarın olduğu bir fare modelinde apelin, vasküler onarımı ve endotel hücre farklılaşmasını teşvik etmiş ve immün hücre adezyonunu azaltmıştır. (165) Bu bulgu, böbrek transplantasyonunu takiben benzer immün aracılı damar hasarı için terapötik potansiyele sahip bir ajan olabileceğinin düşündürmektedir. Apelin-13 aynı zamanda hem in vitro hem de in vivo gen transkripsiyonunda hasara bağlı değişiklikleri de etkileyerek apelin mRNA'nın aşağı regülasyonunu ve HIF1a'nın yukarı regülasyonunu ve ilerleyici hasarın önemli araçları olan transforme edici büyüme faktörü  $\beta$ 'nin (TGF $\beta$ ) düzenlenmesini önlemiştir. (166) Hücre içi yapışma molekülü 1 ve monosit kemokin proteini 1 gibi inflamatuvar belirteçlerin yukarı regülasyonu da azalmıştır. Apelin, iskemi/reperfüzyon hasarından önce uygulandığında koruyucu olmakla birlikte, bu bulgu böbrek nakli veya kardiyotorasik cerrahi dahil ABH'nın beklenebileceği ortamlarda potansiyel klinik uygulamaları akla getirmektedir. (167) Apelinin böbrek koruyucu etkileri, siklosporin A kaynaklı tübüler hasar gibi diğer ABH modellerinde de rapor edilmiştir; bu, apelinin ilaca bağlı hasar dahil olmak üzere çeşitli böbrek hasarlarına karşı koruma

sağlayabileceğini düşündürmektedir. Apelin, anti-fibrotik etkilere sahiptir ve ELA aşırı ekspresyonu veya ELA-32 peptid uygulaması, tuza duyarlı sıçanlarda renal fibrozis ve inflamasyonu azaltmıştır. (168) Böbrek fibrozunun tek taraflı üreter tıkanıklığı modelinde, apelin sistemi tıkalı böbrekte yukarı doğru düzenlenir ve apelin tarafından uyarılan AKT-endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) yolunun aktivasyonuna dair kanıtlar bulunmuştur ve bu çalışmada AT1 reseptörlerini bloke eden losartan, böbrek fibrozisini azaltırken AKT-eNOS yollarının aktivasyonunu ve apelin mRNA'sının ekspresyonunu teşvik etmiştir. (169) Şaşırtıcı bir şekilde, apelin sisteminin bir apelin reseptör antagonisti veya L-NAME kullanılarak inhibisyonu, losartanın anti-fibrotik etkisini ortadan kaldırmıştır. L-NAME'in losartan ile birlikte uygulanması, kontrollere kıyasla fibrozis arttırmıştır. (169) Ek olarak, AT1 reseptör blokörü telmisartan, T2DM bir fare modelinde apelin reseptörünü ve pre-pro-apelin mRNA ekspresyonunu restore etmiştir. (170) Bu gözlemler ARB'lerin anti-fibrotik etkilerinin kısmen apelin sistemi ile çapraz etkileşim yoluyla, muhtemelen NO oluşumu yoluyla aracılık ettiğini göstermektedir. Bir miyokardiyal I/R hasarı modelinde görüldüğü gibi, ARB ve apelin ile kombine tedavinin böbrekte sinerjistik etki gösterip gösteremeyeceğini araştırmak büyük ilgi uyandıracaktır. Klinik çalışmalara aktarılırsa, bu tür sinerjistik faydalar KBH hastaları için dikkate değer bir terapötik ilerlemeyi temsil edecektir.

### 3.Sonuç

Sebebi ne olursa olsun KBH, azalmış renal rejenerasyon kapasitesi, mikrovasküler hasar, oksidatif stres ve inflamasyonla karakterize olup, fibrozise ve ilerleyici ve geri dönüşü olmayan nefron kaybına neden olur. Bu nedenle KBH ilerlemesiyle ilişkili çeşitli süreçleri ve biyolojik bağlamları hedef alan bütünsel bir yaklaşım benimsenmelidir. KBH'nin klasik optimal yönetimi, kan basıncı kontrolünü, albüminürinin anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri veya anjiyotensin II reseptör blokerleriyle tedavisini, potansiyel nefrotoksinlerden ve obeziteden kaçınmayı, ilaç dozaj ayarlamalarını ve kardiyovasküler riskin azaltılmasını içerir. Diyabet, KBH yükünün yarısından fazlasını oluşturabilir ve obezite, bu hastalığa yol açan en önemli faktördür. SGLT2 inhibitörleri gibi yeni antihiperlipidemik ilaçların GFR'deki düşüşü yavaşlattığı, kilo kaybı, kardiyovasküler ve diğer böbrek sonuçlarında ek fayda sağladığı gösterilmiştir. Öte yandan, hiperkalemi gibi yan etkileri azaltan ve böylece ilaçları KBH hastalarına uygulanmaya uygun hale getiren seçici bir reseptör inhibisyonu elde etmek için yakın zamanda yeni nesil steroidal olmayan mineralokortikoid

reseptör antagonisti de geliştirilmiştir. Ayrıca, iki yeni potasyum düşürücü tedavinin toleransı arttırdığı, RAAS inhibitörlerinin daha yüksek dozajına izin verdiği ve dolayısıyla bunların nefroprotektif etkisini arttırdığı gösterilmiştir. Bugüne kadar, tübülointerstisyel fibrozun zaten olduğu durumlarda terapötik müdahalelerin yetersiz olduğu kanıtlanmıştır, bu nedenle araştırma çabaları erken hastalık mekanizmalarını çözmeye odaklanmalıdır. Epigenetik düzenleyicileri hedef alan bir dizi yeni terapötik yaklaşım şu anda faz II veya faz III denemelerinden geçmektedir ve KBH ilerlemesinin farklı yönlerini koordineli olarak düzenleyen eş zamanlı bir düzenleyici aktivite sağlayabilir. İlave olarak yukarıda bahsi geçen literatürlerde yeni keşfedilen peptidlerin de KBH prognozu ve mortalitesi üzerine hafifletici ve iyileştirici olası etkileri ortaya koyulmuştur.

### Kaynakça

1. Levey AS, Eckardt KU, Dorman NM, et al. Nomenclature for kidney function and disease: report of a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Consensus Conference. *Kidney Int.* Jun 2020;97(6):1117-1129. doi:10.1016/j.kint.2020.02.010
2. Meguid El Nahas A, Bello AK. Chronic kidney disease: the global challenge. *Lancet.* 2005 Jan 22-28 2005;365(9456):331-40. doi:10.1016/S0140-6736(05)17789-7
3. Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. *Lancet.* Mar 25 2017;389(10075):1238-1252. doi:10.1016/S0140-6736(16)32064-5
4. Zen K, Tamaki N, Nishimura M, et al. Cardiac event risk stratification in patients with end-stage renal disease: Sub-analysis of the B-SAFE study. *Int J Cardiol.* Jan 01 2016;202:694-700. doi:10.1016/j.ijcard.2015.09.119
5. Burgess E, Muirhead N, Rene de Cotret P, et al. Supramaximal dose of candesartan in proteinuric renal disease. *J Am Soc Nephrol.* Apr 2009;20(4):893-900. doi:10.1681/ASN.2008040416
6. Maschio G, Alberti D, Janin G, et al. Effect of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor benazepril on the progression of chronic renal insufficiency. The Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibition in Progressive Renal Insufficiency Study Group. *N Engl J Med.* Apr 11 1996;334(15):939-45. doi:10.1056/NEJM199604113341502
7. Ruggenti P, Perna A, Gherardi G, et al. Renoprotective properties of ACE-inhibition in non-diabetic nephropathies with non-nephrotic proteinuria. *Lancet.* Jul 31 1999;354(9176):359-64. doi:10.1016/S0140-6736(98)10363-X

8. Parving HH, Brenner BM, McMurray JJ, et al. Cardiorenal end points in a trial of aliskiren for type 2 diabetes. *N Engl J Med*. Dec 06 2012;367(23):2204-13. doi:10.1056/NEJMoa1208799
9. Toth-Manikowski S, Atta MG. Diabetic Kidney Disease: Pathophysiology and Therapeutic Targets. *J Diabetes Res*. 2015;2015:697010. doi:10.1155/2015/697010
10. Metcalfe W. How does early chronic kidney disease progress? A background paper prepared for the UK Consensus Conference on early chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. Sep 2007;22 Suppl 9:ix26-30. doi:10.1093/ndt/gfm446
11. Perkovic V, Jardine MJ, Neal B, et al. Canagliflozin and Renal Outcomes in Type 2 Diabetes and Nephropathy. *N Engl J Med*. Jun 13 2019;380(24):2295-2306. doi:10.1056/NEJMoa1811744
12. Heerspink HJL, Stefánsson BV, Correa-Rotter R, et al. Dapagliflozin in Patients with Chronic Kidney Disease. *N Engl J Med*. Oct 08 2020;383(15):1436-1446. doi:10.1056/NEJMoa2024816
13. de Boer IH, Rue TC, Hall YN, Heagerty PJ, Weiss NS, Himmelfarb J. Temporal trends in the prevalence of diabetic kidney disease in the United States. *JAMA*. Jun 22 2011;305(24):2532-9. doi:10.1001/jama.2011.861
14. Afkarian M, Zelnick LR, Hall YN, et al. Clinical Manifestations of Kidney Disease Among US Adults With Diabetes, 1988-2014. *JAMA*. Aug 09 2016;316(6):602-10. doi:10.1001/jama.2016.10924
15. Vallon V, Thomson SC. The tubular hypothesis of nephron filtration and diabetic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. Jun 2020;16(6):317-336. doi:10.1038/s41581-020-0256-y
16. Yang R, Smolders I, Dupont AG. Blood pressure and renal hemodynamic effects of angiotensin fragments. *Hypertens Res*. Jun 2011;34(6):674-83. doi:10.1038/hr.2011.24
17. Vallon V, Komers R. Pathophysiology of the diabetic kidney. *Compr Physiol*. Jul 2011;1(3):1175-232. doi:10.1002/cphy.c100049
18. Alicic RZ, Rooney MT, Tuttle KR. Diabetic Kidney Disease: Challenges, Progress, and Possibilities. *Clin J Am Soc Nephrol*. Dec 07 2017;12(12):2032-2045. doi:10.2215/CJN.11491116
19. Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JF. Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Circulation*. Jul 03 2007;116(1):85-97. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.678342

20. Six I, Flissi N, Lenglet G, et al. Uremic Toxins and Vascular Dysfunction. *Toxins (Basel)*. Jun 18 2020;12(6)doi:10.3390/toxins12060404

21. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*. May 12 1998;97(18):1837-47. doi:10.1161/01.cir.97.18.1837

22. Weiner DE, Tighiouart H, Elsayed EF, et al. The Framingham predictive instrument in chronic kidney disease. *J Am Coll Cardiol*. Jul 17 2007;50(3):217-24. doi:10.1016/j.jacc.2007.03.037

23. Verma S, McMurray JJV. SGLT2 inhibitors and mechanisms of cardiovascular benefit: a state-of-the-art review. *Diabetologia*. Oct 2018;61(10):2108-2117. doi:10.1007/s00125-018-4670-7

24. Lan NSR, Fegan PG, Yeap BB, Dwivedi G. The effects of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors on left ventricular function: current evidence and future directions. *ESC Heart Fail*. Oct 2019;6(5):927-935. doi:10.1002/ehf2.12505

25. Pitt B, Kober L, Ponikowski P, et al. Safety and tolerability of the novel non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonist BAY 94-8862 in patients with chronic heart failure and mild or moderate chronic kidney disease: a randomized, double-blind trial. *Eur Heart J*. Aug 2013;34(31):2453-63. doi:10.1093/eurheartj/ehf187

26. Bakris GL, Agarwal R, Chan JC, et al. Effect of Finerenone on Albuminuria in Patients With Diabetic Nephropathy: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. Sep 01 2015;314(9):884-94. doi:10.1001/jama.2015.10081

27. Burbach JP. What are neuropeptides? *Methods Mol Biol*. 2011;789:1-36. doi:10.1007/978-1-61779-310-3\_1

28. Matsue Y, Ter Maaten JM, Struck J, et al. Clinical Correlates and Prognostic Value of Proenkephalin in Acute and Chronic Heart Failure. *J Card Fail*. Mar 2017;23(3):231-239. doi:10.1016/j.cardfail.2016.09.007

29. ESICM LIVES 2019 : Berlin, Germany. 28 September - 2 October 2019. *Intensive Care Med Exp*. Sep 27 2019;7(Suppl 3):55. doi:10.1186/s40635-019-0265-y

30. Schulz CA, Christensson A, Ericson U, et al. High Level of Fasting Plasma Proenkephalin-A Predicts Deterioration of Kidney Function and Incidence of CKD. *J Am Soc Nephrol*. Jan 2017;28(1):291-303. doi:10.1681/ASN.2015101177

31. Hollinger A, Wittebole X, François B, et al. Proenkephalin A 119-159 (Penkid) Is an Early Biomarker of Septic Acute Kidney Injury: The Kidney in

Sepsis and Septic Shock (Kid-SSS) Study. *Kidney Int Rep.* Nov 2018;3(6):1424-1433. doi:10.1016/j.ekir.2018.08.006

32. Caironi P, Latini R, Struck J, et al. Circulating Proenkephalin, Acute Kidney Injury, and Its Improvement in Patients with Severe Sepsis or Shock. *Clin Chem.* Sep 2018;64(9):1361-1369. doi:10.1373/clinchem.2018.288068

33. Emmens JE, Ter Maaten JM, Damman K, et al. Proenkephalin, an Opioid System Surrogate, as a Novel Comprehensive Renal Marker in Heart Failure. *Circ Heart Fail.* May 2019;12(5):e005544. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.118.005544

34. Cone RD. Studies on the physiological functions of the melanocortin system. *Endocr Rev.* Dec 2006;27(7):736-49. doi:10.1210/er.2006-0034

35. Gantz I, Fong TM. The melanocortin system. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* Mar 2003;284(3):E468-74. doi:10.1152/ajpendo.00434.2002

36. Gong R. The renaissance of corticotropin therapy in proteinuric nephropathies. *Nat Rev Nephrol.* Dec 06 2011;8(2):122-8. doi:10.1038/nrneph.2011.190

37. Prasad B, Giebel S, McCarron MCE, Leung N. Use of synthetic adrenocorticotrophic hormone in patients with IgA nephropathy. *BMC Nephrol.* May 23 2018;19(1):118. doi:10.1186/s12882-018-0915-4

38. Bomback AS, Tumlin JA, Baranski J, et al. Treatment of nephrotic syndrome with adrenocorticotrophic hormone (ACTH) gel. *Drug Des Devel Ther.* Mar 14 2011;5:147-53. doi:10.2147/DDDT.S17521

39. Lindskog A, Ebefors K, Johansson ME, et al. Melanocortin 1 receptor agonists reduce proteinuria. *J Am Soc Nephrol.* Aug 2010;21(8):1290-8. doi:10.1681/ASN.2009101025

40. Voisey J, Carroll L, van Daal A. Melanocortins and their receptors and antagonists. *Curr Drug Targets.* Oct 2003;4(7):586-97. doi:10.2174/1389450033490858

41. Shihab FS, Andoh TF, Tanner AM, Yi H, Bennett WM. Expression of apoptosis regulatory genes in chronic cyclosporine nephrotoxicity favors apoptosis. *Kidney Int.* Dec 1999;56(6):2147-59. doi:10.1046/j.1523-1755.1999.00794.x

42. Jo SK, Lee SY, Han SY, et al. alpha-Melanocyte stimulating hormone (MSH) decreases cyclosporine a induced apoptosis in cultured human proximal tubular cells. *J Korean Med Sci.* Oct 2001;16(5):603-9. doi:10.3346/jkms.2001.16.5.603

43. Lee SY, Jo SK, Cho WY, Kim HK, Won NH. The effect of alpha-melanocyte-stimulating hormone on renal tubular cell apoptosis and tubulointerstitial fibrosis in cyclosporine A nephrotoxicity. *Transplantation*. Dec 27 2004;78(12):1756-64. doi:10.1097/01.tp.0000144332.44435.ab

44. Goldstein A, Tachibana S, Lowney LI, Hunkapiller M, Hood L. Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 1979;76(12):6666-70. doi:10.1073/pnas.76.12.6666

45. Schwarzer C. 30 years of dynorphins--new insights on their functions in neuropsychiatric diseases. *Pharmacol Ther*. Sep 2009;123(3):353-70. doi:10.1016/j.pharmthera.2009.05.006

46. Schricker S, Kimmel M. Unravelling the pathophysiology of chronic kidney disease-associated pruritus. *Clin Kidney J*. Dec 2021;14(Suppl 3):i23-i31. doi:10.1093/ckj/sfab200

47. Stein C. Opioid Receptors. *Annu Rev Med*. 2016;67:433-51. doi:10.1146/annurev-med-062613-093100

48. Kumagai H, Ebata T, Takamori K, Muramatsu T, Nakamoto H, Suzuki H. Effect of a novel kappa-receptor agonist, nalfurafine hydrochloride, on severe itch in 337 haemodialysis patients: a Phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Nephrol Dial Transplant*. Apr 2010;25(4):1251-7. doi:10.1093/ndt/gfp588

49. Wala K, Szepietowski JC. Difelikefalin in the Treatment of Chronic Kidney Disease-Associated Pruritus: A Systematic Review. *Pharmaceuticals (Basel)*. Jul 28 2022;15(8)doi:10.3390/ph15080934

50. Böger RH. Renal impairment: a challenge for opioid treatment? The role of buprenorphine. *Palliat Med*. 2006;20 Suppl 1:s17-23.

51. Wala-Zielińska K, Świerczyńska-Mróż K, Krajewski PK, Nowicka-Suszko D, Krajewska M, Szepietowski JC. Endogenous Opioid Imbalance as a Potential Factor Involved in the Pathogenesis of Chronic Kidney Disease-Associated Pruritus in Dialysis Patients. *J Clin Med*. Mar 24 2023;12(7) doi:10.3390/jcm12072474

52. Inan S, Cowan A. Antipruritic Effects of Kappa Opioid Receptor Agonists: Evidence from Rodents to Humans. *Handb Exp Pharmacol*. 2022;271:275-292. doi:10.1007/164\_2020\_420

53. Brenner BM. AMGEN International Prize: the history and future of renoprotection. *Kidney Int*. Oct 2003;64(4):1163-8. doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00249.x

54. Bardoux P, Bruneval P, Heudes D, Bouby N, Bankir L. Diabetes-induced albuminuria: role of antidiuretic hormone as revealed by chronic V2



receptor antagonism in rats. *Nephrol Dial Transplant*. Sep 2003;18(9):1755-63. doi:10.1093/ndt/gfg277

55. Bardoux P, Martin H, Ahloulay M, et al. Vasopressin contributes to hyperfiltration, albuminuria, and renal hypertrophy in diabetes mellitus: study in vasopressin-deficient Brattleboro rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 31 1999;96(18):10397-402. doi:10.1073/pnas.96.18.10397

56. Bouby N, Bachmann S, Bichet D, Bankir L. Effect of water intake on the progression of chronic renal failure in the 5/6 nephrectomized rat. *Am J Physiol*. Apr 1990;258(4 Pt 2):F973-9. doi:10.1152/ajprenal.1990.258.4.F973

57. Brooks DP, Solleveld HA, Contino LC. Vasopressin and the pathogenesis of chronic renal failure. *Br J Pharmacol*. May 1990;100(1):79-82. doi:10.1111/j.1476-5381.1990.tb12055.x

58. Bouby N, Hassler C, Bankir L. Contribution of vasopressin to progression of chronic renal failure: study in Brattleboro rats. *Life Sci*. 1999;65(10):991-1004. doi:10.1016/s0024-3205(99)00330-6

59. Alonso G, Galibert E, Boulay V, et al. Sustained elevated levels of circulating vasopressin selectively stimulate the proliferation of kidney tubular cells via the activation of V2 receptors. *Endocrinology*. Jan 2009;150(1):239-50. doi:10.1210/en.2008-0068

60. Gimpl G, Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev*. Apr 2001;81(2):629-83. doi:10.1152/physrev.2001.81.2.629

61. Jankowski M, Hajjar F, Kawas SA, et al. Rat heart: a site of oxytocin production and action. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 24 1998;95(24):14558-63. doi:10.1073/pnas.95.24.14558

62. Thibonnier M, Conarty DM, Preston JA, Plesnicher CL, Dweik RA, Erzurum SC. Human vascular endothelial cells express oxytocin receptors. *Endocrinology*. Mar 1999;140(3):1301-9. doi:10.1210/endo.140.3.6546

63. Gutkowska J, Jankowski M, Lambert C, Mukaddam-Daher S, Zingg HH, McCann SM. Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 14 1997;94(21):11704-9. doi:10.1073/pnas.94.21.11704

64. Haanwinckel MA, Elias LK, Favaretto AL, Gutkowska J, McCann SM, Antunes-Rodrigues J. Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 15 1995;92(17):7902-6. doi:10.1073/pnas.92.17.7902

65. Biyikli NK, Tuğtepe H, Sener G, et al. Oxytocin alleviates oxidative renal injury in pyelonephritic rats via a neutrophil-dependent

mechanism. *Peptides*. Sep 2006;27(9):2249-57. doi:10.1016/j.peptides.2006.03.029

66. Tuğtepe H, Sener G, Biyikli NK, et al. The protective effect of oxytocin on renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Regul Pept*. May 03 2007;140(3):101-8. doi:10.1016/j.regpep.2006.11.026

67. Michell AR, Debnam ES, Unwin RJ. Regulation of renal function by the gastrointestinal tract: potential role of gut-derived peptides and hormones. *Annu Rev Physiol*. 2008;70:379-403. doi:10.1146/annurev.physiol.69.040705.141330

68. Melis M, Krenning EP, Bernard BF, de Visser M, Rolleman E, de Jong M. Renal uptake and retention of radiolabeled somatostatin, bombesin, neurotensin, minigastrin and CCK analogues: species and gender differences. *Nucl Med Biol*. Aug 2007;34(6):633-41. doi:10.1016/j.nucmedbio.2007.05.002

69. McLeland SM, Lunn KF, Duncan CG, Refsal KR, Quimby JM. Relationship among serum creatinine, serum gastrin, calcium-phosphorus product, and uremic gastropathy in cats with chronic kidney disease. *J Vet Intern Med*. 2014;28(3):827-37. doi:10.1111/jvim.12342

70. Gu D, Fang D, Zhang M, et al. Gastrin, via activation of PPAR $\alpha$ , protects the kidney against hypertensive injury. *Clin Sci (Lond)*. Jan 29 2021;135(2):409-427. doi:10.1042/CS20201340

71. Jose PA, Felder RA, Yang Z, Zeng C, Eisner GM. Gastrorenal Axis. *Hypertension*. Jun 2016;67(6):1056-63. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06424

72. Yang J, Jose PA, Zeng C. Gastrointestinal-Renal Axis: Role in the Regulation of Blood Pressure. *J Am Heart Assoc*. Mar 06 2017;6(3)doi:10.1161/JAHA.117.005536

73. Rehfeld JF, Friis-Hansen L, Goetze JP, Hansen TV. The biology of cholecystokinin and gastrin peptides. *Curr Top Med Chem*. 2007;7(12):1154-65. doi:10.2174/156802607780960483

74. Yang X, Yue R, Zhang J, et al. Gastrin Protects Against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury via Activation of RISK (Reperfusion Injury Salvage Kinase) and SAFE (Survivor Activating Factor Enhancement) Pathways. *J Am Heart Assoc*. Jul 12 2018;7(14)doi:10.1161/JAHA.116.005171

75. Liu C, Chen K, Wang H, et al. Gastrin Attenuates Renal Ischemia/Reperfusion Injury by a PI3K/Akt/Bad-Mediated Anti-apoptosis Signaling. *Front Pharmacol*. 2020;11:540479. doi:10.3389/fphar.2020.540479

76. Jorpes E, Mutt V. Cholecystokinin and pancreozymin, one single hormone? *Acta Physiol Scand*. 1966;66(1):196-202. doi:10.1111/j.1748-1716.1966.tb03185.x

77. Crawley JN, Corwin RL. Biological actions of cholecystokinin. *Peptides*. 1994;15(4):731-55. doi:10.1016/0196-9781(94)90104-x

78. Luyer MD, Greve JW, Hadfoune M, Jacobs JA, Dejong CH, Buurman WA. Nutritional stimulation of cholecystokinin receptors inhibits inflammation via the vagus nerve. *J Exp Med*. Oct 17 2005;202(8):1023-9. doi:10.1084/jem.20042397

79. Miyamoto S, Shikata K, Miyasaka K, et al. Cholecystokinin plays a novel protective role in diabetic kidney through anti-inflammatory actions on macrophage: anti-inflammatory effect of cholecystokinin. *Diabetes*. Apr 2012;61(4):897-907. doi:10.2337/db11-0402

80. Zoccali C. Neuropeptide Y as a far-reaching neuromediator: from energy balance and cardiovascular regulation to central integration of weight and bone mass control mechanisms. Implications for human diseases. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. Jan 2005;14(1):25-32. doi:10.1097/00041552-200501000-00005

81. Holzer P, Reichmann F, Farzi A. Neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide in the gut-brain axis. *Neuropeptides*. Dec 2012;46(6):261-74. doi:10.1016/j.npep.2012.08.005

82. Bischoff A, Erdbrügger W, Smits J, Michel MC. Neuropeptide Y-enhanced diuresis and natriuresis in anaesthetized rats is independent of renal blood flow reduction. *J Physiol*. Sep 01 1996;495 ( Pt 2)(Pt 2):525-34. doi:10.1113/jphysiol.1996.sp021612

83. Bischoff A, Michel MC. Neuropeptide Y enhances potassium excretion by mechanisms distinct from those controlling sodium excretion. *Can J Physiol Pharmacol*. Feb 2000;78(2):93-9.

84. Wheway J, Herzog H, Mackay F. NPY and receptors in immune and inflammatory diseases. *Curr Top Med Chem*. 2007;7(17):1743-52. doi:10.2174/156802607782341046

85. Chandrasekharan B, Nezami BG, Srinivasan S. Emerging neuropeptide targets in inflammation: NPY and VIP. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. Jun 01 2013;304(11):G949-57. doi:10.1152/ajpgi.00493.2012

86. Morris MJ, Cox HS, Lambert GW, et al. Region-specific neuropeptide Y overflows at rest and during sympathetic activation in humans. *Hypertension*. Jan 1997;29(1 Pt 1):137-43. doi:10.1161/01.hyp.29.1.137

87. Duarte-Neves J, Pereira de Almeida L, Cavadas C. Neuropeptide Y (NPY) as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. *Neurobiol Dis*. Nov 2016;95:210-24. doi:10.1016/j.nbd.2016.07.022

88. El-Salhy M, Hausken T. The role of the neuropeptide Y (NPY) family in the pathophysiology of inflammatory bowel disease (IBD). *Neuropeptides*. Feb 2016;55:137-44. doi:10.1016/j.npep.2015.09.005

89. Loh K, Herzog H, Shi YC. Regulation of energy homeostasis by the NPY system. *Trends Endocrinol Metab*. Mar 2015;26(3):125-35. doi:10.1016/j.tem.2015.01.003

90. McDermott BJ, Bell D. NPY and cardiac diseases. *Curr Top Med Chem*. 2007;7(17):1692-703. doi:10.2174/156802607782340939

91. Shanks J, Herring N. Peripheral cardiac sympathetic hyperactivity in cardiovascular disease: role of neuropeptides. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. Dec 15 2013;305(12):R1411-20. doi:10.1152/ajpregu.00118.2013

92. Remuzzi G. Sympathetic overactivity in hypertensive patients with chronic renal disease. *N Engl J Med*. Apr 29 1999;340(17):1360-1. doi:10.1056/NEJM199904293401711

93. Ligtenberg G, Blankestijn PJ, Oey PL, et al. Reduction of sympathetic hyperactivity by enalapril in patients with chronic renal failure. *N Engl J Med*. Apr 29 1999;340(17):1321-8. doi:10.1056/NEJM199904293401704

94. Zoccali C, Leonardis D, Enia G, et al. Heart rate, age and the risk of progression to kidney failure in patients with CKD. *J Nephrol*. 2012;25 Suppl 19:S20-7. doi:10.5301/jn.5000229

95. Gupta J, Mitra N, Kanetsky PA, et al. Association between albuminuria, kidney function, and inflammatory biomarker profile in CKD in CRIC. *Clin J Am Soc Nephrol*. Dec 2012;7(12):1938-46. doi:10.2215/CJN.03500412

96. Amdur RL, Feldman HI, Gupta J, et al. Inflammation and Progression of CKD: The CRIC Study. *Clin J Am Soc Nephrol*. Sep 07 2016;11(9):1546-1556. doi:10.2215/CJN.13121215

97. Bracci-Laudiero L, Aloe L, Stenfors C, Theodorsson E, Lundeberg T. Development of systemic lupus erythematosus in mice is associated with alteration of neuropeptide concentrations in inflamed kidneys and immunoregulatory organs. *Neurosci Lett*. May 29 1998;248(2):97-100. doi:10.1016/s0304-3940(98)00342-5

98. Alcazar MA, Boehler E, Rother E, et al. Early postnatal hyperalimantation impairs renal function via SOCS-3 mediated renal postreceptor leptin resistance. *Endocrinology*. Mar 2012;153(3):1397-410. doi:10.1210/en.2011-1670

99. Jaakkola U, Pesonen U, Vainio-Jylhä E, Koulu M, Pöllönen M, Kallio J. The Leu7Pro polymorphism of neuropeptide Y is associated with younger age of onset of type 2 diabetes mellitus and increased risk for nephropathy in subjects

with diabetic retinopathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. Apr 2006;114(4):147-52. doi:10.1055/s-2006-924079

100. Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G, et al. Neuropeptide Y, left ventricular mass and function in patients with end stage renal disease. *J Hypertens*. Jul 2003;21(7):1355-62. doi:10.1097/00004872-200307000-00025

101. Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G, et al. Prospective study of neuropeptide y as an adverse cardiovascular risk factor in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol*. Oct 2003;14(10):2611-7. doi:10.1097/01.asn.0000089026.28617.33

102. Panuccio V, Cutrupi S, Pizzini P, Mallamaci F, Tripepi G, Zoccali C. Neuropeptide Y and markers of osteoblast activity in dialysis patients: a cross-sectional study. *Am J Kidney Dis*. Dec 2007;50(6):1001-8. doi:10.1053/j.ajkd.2007.09.001

103. Zoccali C, D'Arrigo G, Leonardis D, et al. Neuropeptide Y and chronic kidney disease progression: a cohort study. *Nephrol Dial Transplant*. Oct 01 2018;33(10):1805-1812. doi:10.1093/ndt/gfx351

104. Wimalawansa SJ. Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials. *Endocr Rev*. Oct 1996;17(5):533-85. doi:10.1210/edrv-17-5-533

105. Marti E, Gibson SJ, Polak JM, et al. Ontogeny of peptide- and amine-containing neurones in motor, sensory, and autonomic regions of rat and human spinal cord, dorsal root ganglia, and rat skin. *J Comp Neurol*. Dec 15 1987;266(3):332-59. doi:10.1002/cne.902660304

106. Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature*. 1985 Jan 3-9 1985;313(5997):54-6. doi:10.1038/313054a0

107. Supowit SC, Rao A, Bowers MC, et al. Calcitonin gene-related peptide protects against hypertension-induced heart and kidney damage. *Hypertension*. Jan 2005;45(1):109-14. doi:10.1161/01.HYP.0000151130.34874.fa

108. Li J, Carnevale KA, Dipette DJ, Supowit SC. Renal protective effects of  $\alpha$ -calcitonin gene-related peptide in deoxycorticosterone-salt hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol*. Apr 01 2013;304(7):F1000-8. doi:10.1152/ajprenal.00434.2012

109. Silva OL, Becker KL, Shalhoub RJ, Snider RH, Bivins LE, Moore CF. Calcitonin levels in chronic renal disease. *Nephron*. 1977;19(1):12-8. doi:10.1159/000180860

110. Li YJ, Du YH. CGRP-mediated cardiovascular effect of nitroglycerin. *Med Hypotheses*. May 2003;60(5):693-8. doi:10.1016/s0306-9877(03)00024-0

111. Zhou ZH, Peng J, Ye F, Li NS, Deng HW, Li YJ. Delayed cardioprotection induced by nitroglycerin is mediated by alpha-calcitonin gene-related peptide. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. Apr 2002;365(4):253-9. doi:10.1007/s00210-002-0537-y

112. Ravarotto V, Pagnin E, Maiolino G, et al. The blocking of angiotensin II type 1 receptor and RhoA/Rho kinase activity in hypertensive patients: Effect of olmesartan medoxomil and implication with cardiovascular-renal remodeling. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. Dec 2015;16(4):1245-50. doi:10.1177/1470320315594324

113. Johnson KH, O'Brien TD, Hayden DW, et al. Immunolocalization of islet amyloid polypeptide (IAPP) in pancreatic beta cells by means of peroxidase-antiperoxidase (PAP) and protein A-gold techniques. *Am J Pathol*. Jan 1988;130(1):1-8.

114. Verma N, Liu M, Ly H, et al. Diabetic microcirculatory disturbances and pathologic erythropoiesis are provoked by deposition of amyloid-forming amylin in red blood cells and capillaries. *Kidney Int*. Jan 2020;97(1):143-155. doi:10.1016/j.kint.2019.07.028

115. Wookey PJ, Tikellis C, Du HC, Qin HF, Sexton PM, Cooper ME. Amylin binding in rat renal cortex, stimulation of adenylyl cyclase, and activation of plasma renin. *Am J Physiol*. Feb 1996;270(2 Pt 2):F289-94. doi:10.1152/ajprenal.1996.270.2.F289

116. Harris PJ, Cooper ME, Hiranyachattada S, et al. Amylin stimulates proximal tubular sodium transport and cell proliferation in the rat kidney. *Am J Physiol*. Jan 1997;272(1 Pt 2):F13-21. doi:10.1152/ajprenal.1997.272.1.F13

117. Cooper ME, McNally PG, Phillips PA, Johnston CI. Amylin stimulates plasma renin concentration in humans. *Hypertension*. Sep 1995;26(3):460-4. doi:10.1161/01.hyp.26.3.460

118. Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, et al. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun*. Apr 30 1993;192(2):553-60. doi:10.1006/bbrc.1993.1451

119. Chini EN, Chini CC, Bolliger C, et al. Cytoprotective effects of adrenomedullin in glomerular cell injury: central role of cAMP signaling pathway. *Kidney Int*. Oct 1997;52(4):917-25. doi:10.1038/ki.1997.413

120. Jougasaki M, Wei CM, Aarhus LL, Heublein DM, Sandberg SM, Burnett JC. Renal localization and actions of adrenomedullin: a natriuretic



peptide. *Am J Physiol.* Apr 1995;268(4 Pt 2):F657-63. doi:10.1152/ajprenal.1995.268.4.F657

121. Ishimitsu T, Nishikimi T, Saito Y, et al. Plasma levels of adrenomedullin, a newly identified hypotensive peptide, in patients with hypertension and renal failure. *J Clin Invest.* Nov 1994;94(5):2158-61. doi:10.1172/JCI117573

122. Takei Y, Inoue K, Ogoshi M, Kawahara T, Bannai H, Miyano S. Identification of novel adrenomedullin in mammals: a potent cardiovascular and renal regulator. *FEBS Lett.* Jan 02 2004;556(1-3):53-8. doi:10.1016/s0014-5793(03)01368-1

123. Roh J, Chang CL, Bhalla A, Klein C, Hsu SY. Intermedin is a calcitonin/calcitonin gene-related peptide family peptide acting through the calcitonin receptor-like receptor/receptor activity-modifying protein receptor complexes. *J Biol Chem.* Feb 20 2004;279(8):7264-74. doi:10.1074/jbc.M305332200

124. Hirose T, Totsune K, Mori N, et al. Expression of adrenomedullin 2/intermedin, a possible reno-protective peptide, is decreased in the kidneys of rats with hypertension or renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol.* Jul 2010;299(1):F128-34. doi:10.1152/ajprenal.00679.2009

125. Oikawa S, Imai M, Ueno A, et al. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a precursor for human atrial natriuretic polypeptide. *Nature.* 1984 Jun 21-27 1984;309(5970):724-6. doi:10.1038/309724a0

126. Yan W, Wu F, Morser J, Wu Q. Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 18 2000;97(15):8525-9. doi:10.1073/pnas.150149097

127. Chan JC, Knudson O, Wu F, Morser J, Dole WP, Wu Q. Hypertension in mice lacking the proatrial natriuretic peptide convertase corin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 18 2005;102(3):785-90. doi:10.1073/pnas.0407234102

128. Forssmann WG, Richter R, Meyer M. The endocrine heart and natriuretic peptides: histochemistry, cell biology, and functional aspects of the renal urodilatin system. *Histochem Cell Biol.* Oct 1998;110(4):335-57. doi:10.1007/s004180050295

129. John SW, Veress AT, Honrath U, et al. Blood pressure and fluid-electrolyte balance in mice with reduced or absent ANP. *Am J Physiol.* Jul 1996;271(1 Pt 2):R109-14. doi:10.1152/ajpregu.1996.271.1.R109

130. Conger JD, Falk SA, Yuan BH, Schrier RW. Atrial natriuretic peptide and dopamine in a rat model of ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* May 1989;35(5):1126-32. doi:10.1038/ki.1989.100



131. Meyer M, Pfarr E, Schirmer G, et al. Therapeutic use of the natriuretic peptide ularitide in acute renal failure. *Ren Fail*. Jan 1999;21(1):85-100. doi:10.3109/08860229909066972

132. Shaw SG, Weidmann P, Hodler J, Zimmermann A, Paternostro A. Atrial natriuretic peptide protects against acute ischemic renal failure in the rat. *J Clin Invest*. Nov 1987;80(5):1232-7. doi:10.1172/JCI113197

133. Allgren RL, Marbury TC, Rahman SN, et al. Anaritide in acute tubular necrosis. Auriculin Anaritide Acute Renal Failure Study Group. *N Engl J Med*. Mar 20 1997;336(12):828-34. doi:10.1056/NEJM199703203361203

134. Brenner RM, Chertow GM. The rise and fall of atrial natriuretic peptide for acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. Sep 1997;6(5):474-6. doi:10.1097/00041552-199709000-00011

135. Vesely DL, Douglass MA, Dietz JR, et al. Negative feedback of atrial natriuretic peptides. *J Clin Endocrinol Metab*. May 1994;78(5):1128-34. doi:10.1210/jcem.78.5.8175968

136. Clark LC, Farghaly H, Saba SR, Vesely DL. Amelioration with vessel dilator of acute tubular necrosis and renal failure established for 2 days. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. May 2000;278(5):H1555-64. doi:10.1152/ajpheart.2000.278.5.H1555

137. Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature*. Mar 03 1988;332(6159):78-81. doi:10.1038/332078a0

138. Ogawa Y, Itoh H, Tamura N, et al. Molecular cloning of the complementary DNA and gene that encode mouse brain natriuretic peptide and generation of transgenic mice that overexpress the brain natriuretic peptide gene. *J Clin Invest*. May 1994;93(5):1911-21. doi:10.1172/JCI117182

139. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. Mar 31 1988;332(6163):411-5. doi:10.1038/332411a0

140. Kohan DE, Rossi NF, Inscho EW, Pollock DM. Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin. *Physiol Rev*. Jan 2011;91(1):1-77. doi:10.1152/physrev.00060.2009

141. Dhaun N, Goddard J, Webb DJ. The endothelin system and its antagonism in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. Apr 2006;17(4):943-55. doi:10.1681/ASN.2005121256

142. Culshaw GJ, MacIntyre IM, Dhaun N, Webb DJ. Endothelin in nondiabetic chronic kidney disease: preclinical and clinical studies. *Semin Nephrol*. Mar 2015;35(2):176-87. doi:10.1016/j.semnephrol.2015.03.002

143. Kitamura K, Tanaka T, Kato J, Ogawa T, Eto T, Tanaka K. Immunoreactive endothelin in rat kidney inner medulla: marked decrease in spontaneously hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun*. Jul 14 1989;162(1):38-44. doi:10.1016/0006-291x(89)91958-x
144. Speed JS, Pollock DM. Endothelin, kidney disease, and hypertension. *Hypertension*. Jun 2013;61(6):1142-5. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.00595
145. Kohan DE, Barton M. Endothelin and endothelin antagonists in chronic kidney disease. *Kidney Int*. Nov 2014;86(5):896-904. doi:10.1038/ki.2014.143
146. Wesson DE. Endothelin role in kidney acidification. *Semin Nephrol*. Sep 2006;26(5):393-8. doi:10.1016/j.semnephrol.2006.07.006
147. De Miguel C, Hamrick WC, Hobbs JL, Pollock DM, Carmines PK, Pollock JS. Endothelin receptor-specific control of endoplasmic reticulum stress and apoptosis in the kidney. *Sci Rep*. Feb 23 2017;7:43152. doi:10.1038/srep43152
148. Tuttle KR, Bakris GL, Bilous RW, et al. Diabetic kidney disease: a report from an ADA Consensus Conference. *Diabetes Care*. Oct 2014;37(10):2864-83. doi:10.2337/dc14-1296
149. Davies MJ, D'Alessio DA, Fradkin J, et al. Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes, 2018. A consensus report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetologia*. Dec 2018;61(12):2461-2498. doi:10.1007/s00125-018-4729-5
150. Mann JFE, Ørsted DD, Buse JB. Liraglutide and Renal Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. Nov 30 2017;377(22):2197-2198. doi:10.1056/NEJMc1713042
151. Mann JFE, Fonseca VA, Poulter NR, et al. Safety of Liraglutide in Type 2 Diabetes and Chronic Kidney Disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. Apr 07 2020;15(4):465-473. doi:10.2215/CJN.11881019
152. Savchenko LG, Digtar NI, Selikhova LG, et al. Liraglutide exerts an anti-inflammatory action in obese patients with type 2 diabetes. *Rom J Intern Med*. Sep 01 2019;57(3):233-240. doi:10.2478/rjim-2019-0003
153. Muskiet MHA, Tonneijck L, Smits MM, et al. GLP-1 and the kidney: from physiology to pharmacology and outcomes in diabetes. *Nat Rev Nephrol*. Oct 2017;13(10):605-628. doi:10.1038/nrneph.2017.123

154. Lin Y, Wang TH, Tsai ML, et al. The cardiovascular and renal effects of glucagon-like peptide 1 receptor agonists in patients with advanced diabetic kidney disease. *Cardiovasc Diabetol*. Mar 17 2023;22(1):60. doi:10.1186/s12933-023-01793-9

155. Jastreboff AM, Aronne LJ, Ahmad NN, et al. Tirzepatide Once Weekly for the Treatment of Obesity. *N Engl J Med*. Jul 21 2022;387(3):205-216. doi:10.1056/NEJMoa2206038

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

157. Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, et al. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature*. Oct 12 2006;443(7112):709-12. doi:10.1038/nature05162

158. Li Z, Gao L, Tang H, et al. Peripheral effects of nesfatin-1 on glucose homeostasis. *PLoS One*. 2013;8(8):e71513. doi:10.1371/journal.pone.0071513

159. Tezcan N, Ozdemir-Kumral ZN, Ozkan Yenel N, et al. Nesfatin-1 treatment preserves antioxidant status and attenuates renal fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction. *Nephrol Dial Transplant*. Jun 23 2022;37(7):1238-1248. doi:10.1093/ndt/gfac053

160. Lahane GP, Dhar A. Nesfatin-1 peptide protects rat renal epithelial cells against high glucose and H. *Peptides*. Jul 2023;165:171013. doi:10.1016/j.peptides.2023.171013

161. Read C, Nyimamu D, Williams TL, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CVII. Structure and Pharmacology of the Apelin Receptor with a Recommendation that Elabela/Toddler Is a Second Endogenous Peptide Ligand. *Pharmacol Rev*. Oct 2019;71(4):467-502. doi:10.1124/pr.119.017533

162. Zhen EY, Higgs RE, Gutierrez JA. Pyroglutamyl apelin-13 identified as the major apelin isoform in human plasma. *Anal Biochem*. Nov 01 2013;442(1):1-9. doi:10.1016/j.ab.2013.07.006

163. Salcedo A, Garijo J, Monge L, et al. Apelin effects in human splanchnic arteries. Role of nitric oxide and prostanoids. *Regul Pept*. Dec 04 2007;144(1-3):50-5. doi:10.1016/j.regpep.2007.06.005

164. Japp AG, Cruden NL, Barnes G, et al. Acute cardiovascular effects of apelin in humans: potential role in patients with chronic heart failure. *Circulation*. Apr 27 2010;121(16):1818-27. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.911339

165. Masoud AG, Lin J, Azad AK, et al. Apelin directs endothelial cell differentiation and vascular repair following immune-mediated injury. *J Clin Invest.* Jan 02 2020;130(1):94-107. doi:10.1172/JCI128469
166. Chen H, Wan D, Wang L, et al. Apelin protects against acute renal injury by inhibiting TGF- $\beta$ 1. *Biochim Biophys Acta.* Jul 2015;1852(7):1278-87. doi:10.1016/j.bbadis.2015.02.013
167. Sagioglu T, Torun N, Yagci M, Yalta T, Sagioglu G, Oguz S. Effects of apelin and leptin on renal functions following renal ischemia/reperfusion: An experimental study. *Exp Ther Med.* May 2012;3(5):908-914. doi:10.3892/etm.2012.499
168. Schreiber CA, Holditch SJ, Generous A, Ikeda Y. Sustained ELABELA Gene Therapy in High-salt Diet-induced Hypertensive Rats. *Curr Gene Ther.* 2017;16(5):349-360. doi:10.2174/1566523217666161121111906
169. Nishida M, Okumura Y, Oka T, et al. The role of apelin on the alleviative effect of Angiotensin receptor blocker in unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis. *Nephron Extra.* Jan 2012;2(1):39-47. doi:10.1159/000337091
170. Müller T, Kalea AZ, Marquez A, et al. Apelinergic system in the kidney: implications for diabetic kidney disease. *Physiol Rep.* Dec 2018;6(23):e13939. doi:10.14814/phy2.13939



## BÖLÜM VIII

# DİŞİ VE ERKEK RATLARDA KASTRASYONUN (ORŞİEKTOMİ VE OVARİEKTOMİ) MESANE DUVARI, MESANE TRİGONU VE PROKSİMAL ÜRETRADA ENDOTELYAL, İNDÜKLENEN VE NÖRONAL NİTRİK OKSİT DÜZEYLERİNE ETKİLERİ VE ÜRİNER SİSTEM FONKSİYONLARI İLE İLİŞKİSİ

*Relations Between Castration and Male and Female Rat's  
Bladder Wall, Trigon and Proximal Urethra On Endothelial,  
Inducible and Neuronal Nitric Oxide Levels*

Selim YAZAR<sup>1</sup> & Hakkı UZUN<sup>2</sup> & Yıldırım Kalkan<sup>3</sup>  
& İbrahim Şehitoğlu<sup>4</sup> & Tolga MERCANTEPE<sup>5</sup> & Eyüp DİL

<sup>1</sup>(Dr. Öğr. Üyesi), Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Rize, Türkiye.  
selim.yazar@erdogan.edu.tr,  
ORCID: 0000-0002-9843-9008

<sup>2</sup>(Prof. Dr.), Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Rize, Türkiye.  
hakkı.uzun@erdogan.edu.tr,  
ORCID: 0000-0002-5189-3166

<sup>3</sup>(Doç. Dr.), Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji  
Anabilim Dalı, Rize, Türkiye.  
ykalkan53@hotmail.com,

<sup>4</sup>(Doç. Dr.), Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Rize.  
sehitogluibrahim@gmail.com,

<sup>5</sup>(Doç. Dr.), Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji  
Anabilim Dalı, Rize, Türkiye,  
tolga.mercantepe@erdogan.edu.tr  
ORCID: 0000-0002-8506-1755

<sup>6</sup>Dr. Öğretim Üyesi, Recep Tayyip  
Erdoğan Üniversitesi, Tıp Fakültesi,  
Üroloji Anabilim Dalı, Rize, Türkiye.  
eyup.dil@erdogan.edu.tr,  
ORCID: 0000-0001-7739-4253

## 1. Giriş

**S**on farmakolojik ve nörokimyasal çalışmalar, nitrik oksidi (NO) ürogenital sisteme giden nöral yollarda bir nörotransmitter olarak göstermiştir (1-5). NO peniste ve üretrada sentezlenir ve sinir stimülasyonu ile indüklenen düz kas gevşemesine aracılık eder görünmektedir(4-10). Testosteron, endotelden bağımsız mekanizmalar ve NO yoluyla vazodilatasyona neden olur, ancak endotelden NO salınımına bağlı mekanizmalar da rat mezenterik arterlerinde rapor edilmiştir. (12-17).

Alt üriner sistem semptomları toplumda en sık görülen semptomlar arasındadır. Klinik olarak NO bazındaki mekanizmalar normal miksiyonun korunmasında ve üriner inkontinanstaki önemli olabilir. Nitrik oksit- siklik guanozin mono fosfat (cGMP) kaskatında görev alan fosfodiesteraz enzimini inhibe eden ilaçlar (fosfodiesteraz inhibitörler; tadalafil) alt üriner sistem semptomlarının tedavisinde klinik olarak uygulanmaktadır. Bu mekanizmaların pelvik cerrahi veya spinal yaralanmalar sonrası gelişen işeme disfonksiyonu ve inkontinansın kısmi sorumlusu olabilir. Bu sorumluluk ileri çalışmalar ile daha da desteklenirse bu alanlardaki tedavi seçeneği olarak NOS agonistleri veya NO donörleri tedavideki yerini bulabilir.

Kastrasyon (ovariektomi veya orşiektomi) klinik uygulamada sık yapılan bir ameliyattır. Ayrıca hipogonadizm (testosteron veya östrojen düşüklüğü)



ileri yaş insanlarda metabolik sendroma bağlı olarak gelişmekte ve çok sık görülmektedir. Kastrasyonun hipogonadizmin alt üriner sistem dokuları (mesane, trigon ve üretra) zerinde olan etkilerini nitrik oksit düzeyinde araştırmak ve daha sonra kastrasyon uygulanan hastalarda fosfodiesteraz inhibitörleri ile ilgili yapılacak klinik çalışmalara ışık tutmak ve alt üriner sistem semptomlarının gelişiminde belirgin rolü olan testosteron ve nitrik oksit arasındaki muhtemel iliŐkilere kapı aralamaktır.

## 2. Gereç ve Yöntem

### 2.1. Deney hayvanları ve deney grupları

Bu deneysel alıŐma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi yerel etik kurulu tarafından onaylandı ve Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma ve Hayvan Laboratuvarında yapıldı.

Ortalama ağırlıkları 200-275 g olan, 16 erkek, 16 dişi toplam 32 adet 7-8 aylık albino Sprague Dawley rat kullanıldı. Kontrol gruplarındaki hayvanlara yaş, cinsiyet ve ağırlıklarına göre alındıktan sonra çalışma grubu ratlara orşiektomi/ovariektomi yapıldı. Kontrol grubundakiler de dahil olmak üzere tüm hayvanlar, deney hayvanı nitesi ortamında, 12 saat aydınlık-karanlık döngüsünde, %55-60 nemde ve kontrollü (22±0,5 C) oda sıcaklığında tutuldu ve beslendi. Tüm gruplardaki hayvanlara adlibitum olarak sınırsız yem ve musluk suyu tüketme imkn sağlandı. Hayvanlar 3 hafta süreyle bakıldıktan sonra sakrifiye edilerek mesane ve retraları çıkarıldı. Hayvan deneyleri için kullanılan yöntemler, Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı için Ulusal Sağlık Enstitüsü protokollerine göre düzenlenmiŐtir.

Bu çalışmada oluŐturulan gruplar Şu Őekildedir;

1. grup ovariektomi yapılmayan dişi kontrol grubu (DK). Bu hayvanlardan aynı gün içinde alınan mesane ve proksimal üretra dokuları, konvansiyonel ışık mikroskopik yöntemlerin yanı sıra immün histokimyasal ve histopatolojik olarak değerlendirildi.

2. grup orşiektomi yapılmamıŐ erkek kontrol grubu (EK). Bu hayvanlardan aynı gün içinde alınan mesane ve proksimal üretra dokuları, konvansiyonel ışık mikroskopik yöntemlerin yanı sıra immün histokimyasal ve histopatolojik olarak değerlendirildi.

3. grup orşiektomi uygulanan erkek çalışma grubu (EÜG), orŐiektomiden 3 hafta sonra alınan mesane ve proksimal üretra dokuları, konvansiyonel ışık

mikroskopik yöntemlerin yanı sıra immün histokimyasal ve histopatolojik olarak değerlendirildi.

4. grup ovariektomi uygulanan dişi çalışma grubu (DÇG), ovariektomiden 3 hafta sonra bu hayvanlardan alınan mesane ve proksimal üretra dokuları, konvansiyonel ışık mikroskopik yöntemlerin yanı sıra immün histokimyasal ve histopatolojik olarak değerlendirildi.

## **2.2. Deneysel yöntemler**

Ratlar operasyondan önce 6 saat aç bırakıldı. Ratlara intraperitoneal 1 mg/100 g (Alfazyne 2%, Ege-Vet®) ve ketamin 8 mg/100gr (Alfamine, Ege-Vet®) ile anestezi ve analjezi sağlandı. Hayvanlar sırtüstü yatırıldı ve erkek ratlara skrotal orta hattan yapılan 1 cm'lik vertikal kesiden bilateral orşiektomi yapıldı. Dişi ratlara ovariektomi için linea alba'nın sağ ve solundan 2 cm'lik suprapubik insizyon hattından karın boşluğuna girilerek ovariektomi yapıldı. Kanama kontrolü sonrası cilt 4/0 vicryl ile suture edildi ve povidon iyodür ile pansuman yapıldı. Ameliyattan sonra her bir olgu ait olduğu kutuya konularak anestezinin etkisi geçene kadar gözlemlendi.

3 haftalık gözlemin ardından çalışma grubundaki ratlara ksilazin ve ketamin ile tekrar anestezi uygulanarak mesane ve proksimal üretra dokuları eksize edildi.

Tüm gruplardaki ratlardan alınan mesane ve üretra dokuları erkek-dişi kontrol ve çalışma grubu olarak 4 gruba ayrıldı, etiketli kod numaraları verildi ve %10'luk nötral formaldehit solüsyonuna yerleştirildi. 24 saat fiksatifte bekletildikten sonra yaklaşık 6 saat akan suda yıkandı ve otomatik doku takibinde (Citadel 2000, Thermo Fisher Scientific Shandon, England) etanol (%50-100) ve ksilen serilerinden geçirilerek parafine gömüldü. Hematoksilin-eozin boyaması için dokulardan 4-6 µm kalınlığında kesitler alındı ve boyama öncesi etüvde bekletildi. Boyandıktan sonra ışık mikroskopunda incelendi ve uygun yerler farklı büyütme oranlarında fotoğraflandı.

İmmüno histokimyasal boyama için 3-4 µm kalınlığında kesitler seçildi. Ksilen içinde iki kez 10 dakika bekletilip alkol serisinden (%50-100) geçirildikten sonra %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonunda 30 dakika bekletildi. PBS ile 2 kez yıkandıktan sonra Antigen Retrieval-Citrate tampon solüsyonunda 700-800 Watt güçte 4 kez 5 dakika ısıtıldı ve 30 dakika ikincil bloke edici ajanda bekletildi. Her hazırlık Anti-eNOS(kod: ab5589, Abcam plc, Cambridge CB4 0FL UK), Anti- nNOS(kod: ab3511, Abcam plc, Cambridge

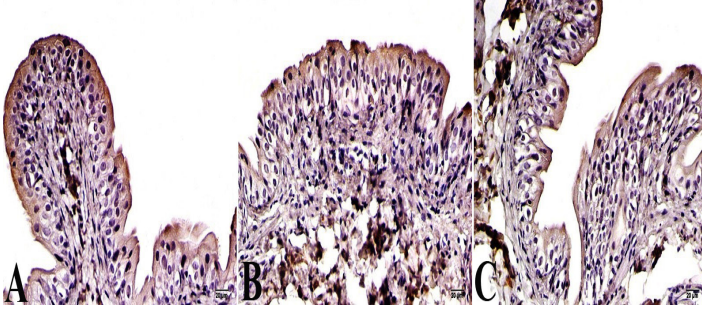
CB4 0FL UK) ve Anti-iNOS(kod: ab3523, Abcamplc, Cambridge CB40FL UK) birincil antikoru farklı dilüsyonlarında [Anti-eNOS, Anti-nNOS ve Anti-iNOS]ta; Sırasıyla 1/100, 1/200 ve 1/200] 75 dakika tutuldu. Kromojen olarak diaminobenzidin (DAB) solüsyonu kullanıldı ve karşıt boyama için Mayershematoksilin ile 3-5 dakika boyandı. Negatif kontroller olarak PBS kullanıldı. Müstahzarların üzeri uygun örtü malzemeleri ile kapatılarak fotoğrafları çekildi. İmmüno histokimyasal boyama sonucunda bölgeye göre dokulardaki immünopozitif reaksiyonların % değerlerine göre çok az (negatif, -), hafif (1 pozitif, +), orta (2 pozitif, ++), şiddetli (3 pozitif, +++) ve çok şiddetli (4 pozitif, +) +++) olmak üzere 4 kategoriye ayrıldı. Her preparasyondaki kesitlerden ikisi rastgele seçildi. Seçilen kesitlerin her birinde 15'er alan belirlenerek histolog ve patolog tarafından körleme yöntemi kullanılarak yukarıda belirtilen kategorilere göre histopatolojik ve İmmüno histokimyasal skorlamalar yapılarak yüzdeleri belirlendi. Verilerin değerlendirilmesi sırasında elde edilecek tüm bilgilerin grup içi ve gruplar arası istatistiksel karşılaştırmaları Kruskal Wallis testi kullanılarak değerlendirildi.

### 3. Sonuçlar

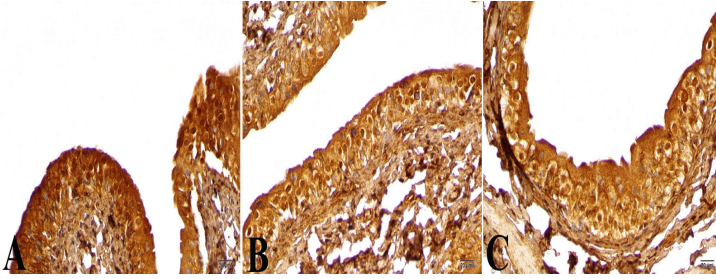
Mesane dokusunun trigon bölümünde yapılan histopatolojik incelemede epitel hücre dejenerasyonu, vakuolizasyon, ödem ve dilatasyon, endotel hücre şişmesi ve karyolizis ve apoptotik hücreleri üzerinde yapılan Kruskal Wallis Testine göre Grup 1 ile Grup 4 ve Grup 2 ile 3 arasında istatistiksel anlamlı farklılıklar bulundu ( $p < 0.05$ ).

Mesane dokusunun trigon bölümünde anti-nNOS, anti-eNOS ve anti-iNOS ile yapılan immunhistokimyasal boyamanın histopatolojik incelemesinde Kruskal Wallis Testine göre Grup 1 ile grup 4 arasında anti-nNOS ve anti-eNOS yönünden istatistiksel anlamlı farklılıklar saptanırken ( $p < 0,05$ ), anti-iNOS yönünden anlamlı farklılık bulunamadı ( $p:0,336$ , Şekil -1, 2,3).

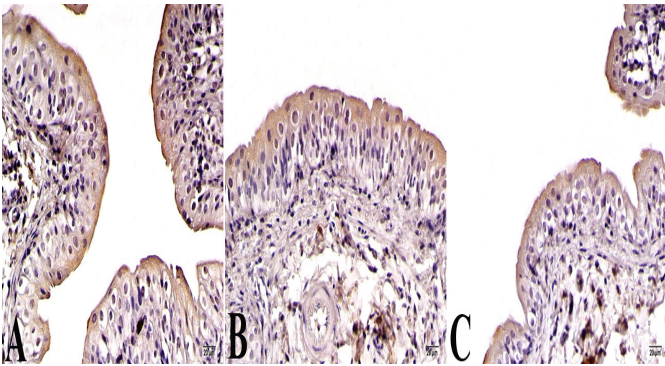
Mesane dokusunun trigon bölümünde anti-nNOS, anti-eNOS ve anti-iNOS ile yapılan immunhistokimyasal boyamanın histopatolojik incelemesinde Kruskal Wallis Testine göre Grup 2 ile grup 3 arasında anti-Nnos ( $p:0,001$ ) ve anti-eNOS ( $p:0,003$ ) yönünden istatistiksel anlamlı farklılıklar saptanırken, anti-iNOS yönünden anlamlı farklılık bulunamadı ( $p:0,148$ , Şekil-1, 2, 3).



**Şekil 1.** Mesane dokusunun trigon bölümünün immunhistokimyasal metodlarla boyanmasıyla ışık mikroskopik incelemesi; A: Erkek ve Dişi Kontrol grubu, B: Orşiektomili Erkek Mesane Grubu, C: Ovariektomili Dişi Mesane Grubu, nNOS-antibody immunoperoksidaz boyası, X40



**Şekil 2.** Mesane dokusunun trigon bölümünün immunhistokimyasal metodlarla boyanmasıyla ışık mikroskopik incelemesi; A: Erkek ve Dişi Kontrol grubu, B: Orşiektomili Erkek Mesane Grubu, C: Ovariektomili Dişi Mesane Grubu, eNOS-antibody immunoperoksidaz boyası, X40

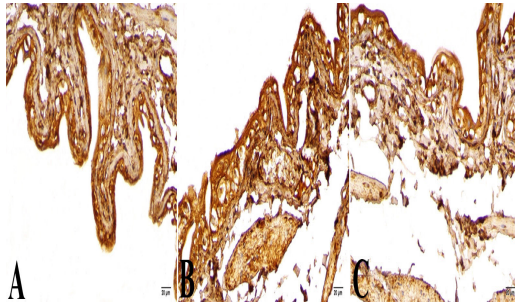


**Şekil 3.** Mesane dokusunun trigon bölümünün immunhistokimyasal metodlarla boyanmasıyla ışık mikroskopik incelemesi; A: Erkek ve Dişi Kontrol grubu, B: Orşiektomili Erkek Mesane Grubu, C: Ovariektomili Dişi Mesane Grubu, iNOS-antibody immunoperoksidaz boyası, X40

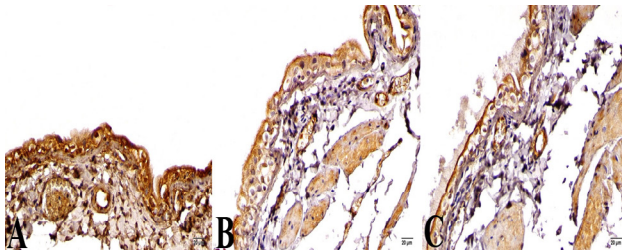
Mesane dokusunun gövde bölümünde yapılan histopatolojik incelemede epitel hücre dejenerasyonu, vakuolizasyon, ödem ve dilatasyon, endotel hücre şişmesi ve karyolizis ve apoptotik hücreleri üzerinde yapılan Kruskal Wallis Testine göre Grup 1 ile Grup 4 ve Grup 2 ile 3 arasında istatistiksel anlamlı farklılıklar bulundu ( $p < 0.05$ ).

Mesane dokusunun gövde bölümünde anti-nNOS, anti-eNOS ve anti-iNOS ile yapılan immunhistokimyasal boyamanın histopatolojik incelemesinde Kruskal Wallis Testine göre Grup 1 ile grup 4 arasında anti-nNOS ve anti-eNOS yönünden istatistiksel anlamlı farklılıklar saptanırken ( $p < 0,05$ ), anti-iNOS yönünden anlamlı farklılık bulunamadı ( $p: 0,935$ , Şekil- 4, 5, 6).

Mesane dokusunun gövde bölümünde anti-nNOS, anti-eNOS ve anti-iNOS ile yapılan immunhistokimyasal boyamanın histopatolojik incelemesinde Kruskal Wallis Testine göre Grup 2 ile grup 3 arasında anti-nNOS ( $p: 0,001$ ) ve anti-eNOS ( $p: 0,007$ ) yönünden istatistiksel anlamlı farklılıklar saptanırken, anti-iNOS yönünden anlamlı farklılık bulunamadı ( $p: 0,651$ , Şekil- 4, 5, 6).

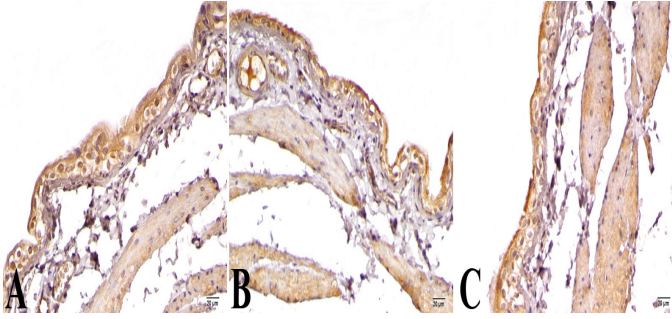


**Şekil 4.** Mesane dokusunun gövde bölümünün immunhistokimyasal metodlarla boyanmasıyla ışık mikroskopik incelemesi; A: Erkek ve Dişi Kontrol grubu, B: Orşiektomili Erkek Mesane Grubu, C: Ovariektomili Dişi Mesane Grubu, eNOS-antibodyimmun-peroksidaz boyası, X40



**Şekil 5.** Mesane dokusunun gövde bölümünün immunhistokimyasal metodlarla boyanmasıyla ışık mikroskopik incelemesi; A: Erkek ve Dişi Kontrol grubu, B: Orşiektomili Erkek Mesane Grubu, C: Ovariektomili Dişi Mesane Grubu, nNOS-antibodyimmun-peroksidaz boyası, X40



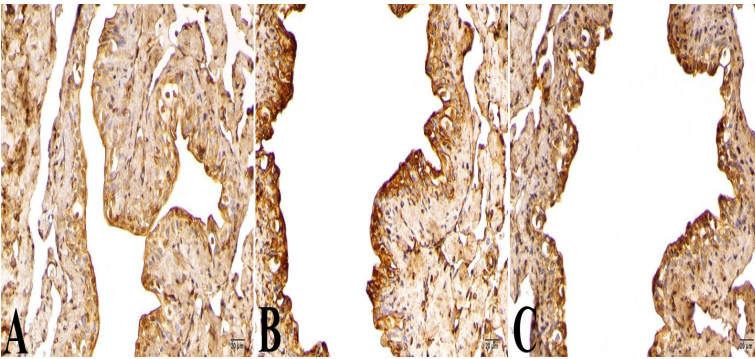


**Şekil 6.** Mesane dokusunun gövde bölümünün immunhistokimyasal metodlarla boyanmasıyla ışık mikroskopik incelemesi; A: Erkek ve Dişi Kontrol grubu, B: Orşiektomili Erkek Mesane Grubu, C: Ovariektomili Dişi Mesane Grubu, iNOS-antibodyimmunperoksidaz boyası, X40

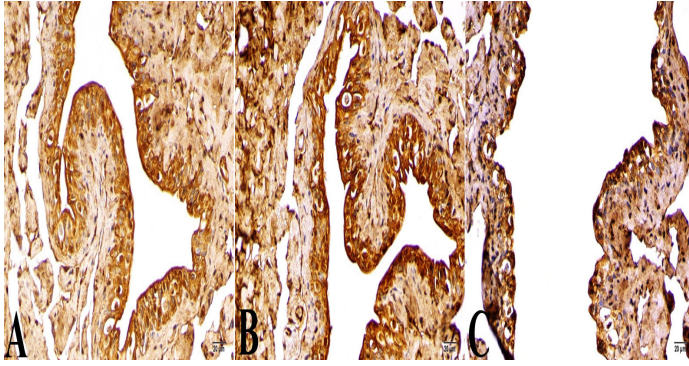
Üretra dokusunun proksimal bölümünün yapılan histopatolojik incelemede epitel hücre dejenerasyonu, vakuolizasyon, ödem ve dilatasyon, endotel hücre şişmesi ve karyolizis ve apoptotik hücreleri üzerinde yapılan Kruskal Wallis testine göre grup 2 ve 3 arasında istatistiksel anlamlı farklılıklar bulundu ( $p < 0,05$ ).

Üretra dokusunun proksimal bölümünde anti-nNOS, anti-eNOS ve anti-iNOS ile yapılan immunhistokimyasal boyamanın histopatolojik incelemesinde Kruskal Wallis Testine göre grup 2 ile grup 3 arasında anti-nNOS ( $p: 0,006$ ) ve anti-eNOS ( $p: 0,009$ ) yönünden istatistiksel anlamlı farklılıklar saptanırken, anti-iNOS yönünden anlamlı farklılık bulunamadı ( $p: 0,855$ , Şekil 7, 8, 9).

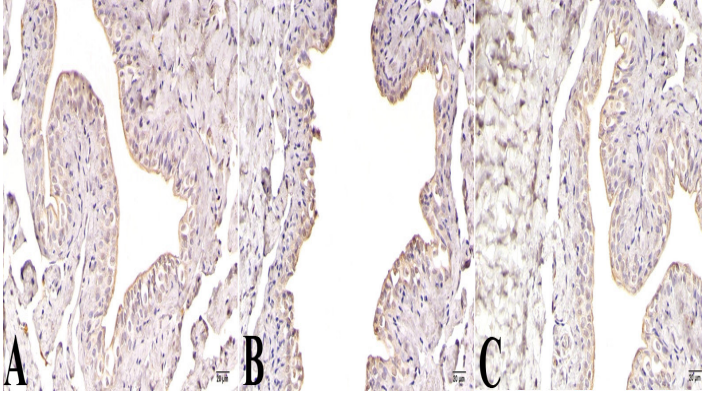
Dişi rat grubunda üretra kısa olması nedeniyle net olarak eksize edilememiş ve dolayısıyla çalışmaya yeterli doku sağlanamadığından histolojik ve immün histokimyasal olarak boyanamamıştır



**Şekil 7.** Penil üretra proksimal bölümünün immunhistokimyasal metodlarla boyanmasıyla ışık mikroskopik incelemesi; A: Orşiektomisiz Erkek Kontrol grubu, B-C: Orşiektomili Erkek Çalışma Grubu, nNOS-antibodyimmunperoksidaz boyası, X40



**Şekil 8.** Penil üretranın proksimal bölümünün immunhistokimyasal metodlarla boyanmasıyla ışık mikroskopik incelemesi; A: Orşiektomisiz Erkek Kontrol grubu, B-C: Orşiektomili Erkek Çalışma Grubu, eNOS-antibodyimmunperoksidaz boyası, X40



**Şekil 9.** Penil üretranın proksimal bölümünün immunhistokimyasal metodlarla boyanmasıyla ışık mikroskopik incelemesi; A: Orşiektomisiz Erkek Kontrol grubu, B-C: Orşiektomili Erkek Çalışma Grubu, iNOS-antibodyimmunperoksidaz boyası, X40

#### 4. Tartışma

Bu araştırmada mesane dokusunun gövde ve trigon bölümünde kontrol ve orşiektomize rat grupları arasında anti-nNOS ve anti-eNOS aktivitesi yönünden istatistiksel anlamlı farklılıklar saptanırken, anti-iNOS yönünden anlamlı farklılık bulunamadı.

Akingba ve Burnett immün histokimyasal olarak rat penil vasküler ve sinüsoidal endotelinde eNOS belirlemiştir. Western blot analizi ile rat penil shaftında nNOS ve eNOS mevcudiyetini göstermiş; nNOS için protein ekspresyonu öncelikle nöronal dokuda lokalize, eNOS kavernal düz kas ve



endotele lokalize bulunmuştur (18). NOS izoform ekspresyonlarının birçok kimyasal ve fiziksel stimülasyonla değiştiği belirtilmiştir (19). Orşiektomiye takiben ve androjen replasmanı ile nNOS ve eNOS içeriklerinde değişiklik gözlenmiştir (20,21).

Bazı çalışmalar androjen ve mesane fonksiyonu arasındaki ilişkiyi araştırmış ve androjenler ile vasküler yapılar arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur. Düşük testesteron düzeyine bağlı olarak kan damarı duvarlarında belirgin artmış kalsifikasyon ile birlikte vasküler endotelial büyüme faktörünün baskılandığı gösterilmiştir (22). Ayrıca kastrasyon sonrası mesanedeki histolojik ve fonksiyonel değişiklikler ve mesane kan akımı ratlarda araştırılmış ve kastre ratlarda kan akımında ve mesane fonksiyonunda anlamlı değişiklikler saptanmamasına karşın, kan damarlarında histolojik değişiklikler olduğu görülmüştür (23).

NO / NOS yolağı vajinal düz kas kontraktilesi ve vajinal kan akımına etki ettiği bilinmektedir (24,25). NOS enzimini östrojen ve androjenlerle düzenlenmektedir. Testosteron tedavisinin proksimal vajinada total NOS aktivitesini artırdığı Traish ve arkadaşlarının araştırmasında rapor edilmiştir. Fakat testosteron tedavisi distal vajinadaki total NOS aktivitesini değiştirmemektedir. DHT tedavisi ile hem proksimal hem de distal vajinadaki NOS aktivitesi artmıştır (24-27).

NO için fizyolojik bir rol kurmak için in vivo ürodinamik girişim yapılmıştır. Ratlarda, NOS inhibitörleri veya metilen mavisinin sistemik infüzyonu, mesane hiperaktivitesi ve azalmış mesane kapasitesi ortaya çıkarmıştır (24, 30) Bir fetal kuzu modelinde benzer manipülasyonlar yapıldığında inhibe edilemeyen mesane kasılmalarının eşlik ettiği artmış mesane kapasitesi ve tam boşalmayan mesane tespit edilmiştir (31). Kuzu modeli ve diğer çalışmalarda mesane kapasitesi arasındaki farklar fetal kuzularda yetersiz üretral sfinkter ile bağdaştırılmıştır (31). Nitekim önceki veriler NO detrusor kasılma cevaplarını etkileyen bir inhibitör faktör olarak hizmet edebilmesine karşın, bu analiz NO'nun üretrada daha baskın rol oynadığını işaret etmektedir.

Çalışmanın sınırlılığı açısından rat gruplarına ürodinamik incelemeler yapılabilir ve bu sonuçların NO ile arasındaki ilişkinin ortaya konulması sonraki çalışmalara daha fazla yol gösterici olabileceği öngörülebilir.

Bu çalışmada mesane gövde ve trigon bölgesinde kontrol ve ovariektomize grup arasında anti-nNOS ve anti-eNOS aktivitesi yönünden istatistiksel anlamlı farklılıklar saptanırken, anti-iNOS yönünden anlamlı farklılık bulunamadı.

Traish ve arkadaşları yaptıkları hayvan araştırmasında total NOS aktivitesinin proksimal vajinada, distal vajinadan daha fazla olduğunu bildirmiştir. Ovariektominin proksimal vajinada total NOS aktivitesini artırdığı belirtilmektedir. Bunun nedeni ise hormonların bu enzimler üzerindeki kontrolünün anatomik bölgelere bağlı olarak değişebileceği düşüncesi ile açıklanmaktadır (32).

Mesane ve üretradaki NOS aktivitesinde östrojen etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada ovariektomize ratlarda eNOS ve nNOS aktivitesinin anlamlı arttığı gösterilmiştir. Yine bu çalışmada östrojen ile desteklenen ovariektomize ratlarda NOS aktivitelerinin azaldığı görülmüştür (33).

Hem eNOS hem de nNOS östrojen kontrolü altındadır ve overleri çıkarılan hayvanlarda her iki enziminde azaldığı, vajinal apoptoz, vajinal duvar kalınlığında azalma ve intramural kollajen birikimi, vasküler duvar kalınlaşması olduğu bilinmektedir (34).

Bu araştırmada penil üretra dokusunun proksimal bölümünde kontrol ve orşiektomize rat grupları arasında anti-nNOS ve anti-eNOS aktivitesi yönünden istatistiksel anlamlı farklılıklar saptanırken, anti-iNOS yönünden anlamlı farklılık bulunamadı.

Son çalışmalar NO biyosentezini ve mekanizmasını etkileyen olayların in vitro olarak tavşan, koyun, köpek, domuz, rat ve insanlardan izole edilen üretral düz kas şeritlerinin gevşemesini değiştirdiğini göstermektedir (2, 3,7, 10, 35-41).NO aracılı gevşeme sadece düz kas yapıları sınırlı değildir. Benzer in vitro yanıtların üretral lamina propriya ve eksternal üretral sfinkterde de ilişkili olduğu gösterilmiştir (10,42,43).

Biyokimyasal, immün histokimyasal, enzim histokimyasal tekniklerle üretrada NOS bulunduğu doğrulanmıştır (4,35,43-48). Bu çalışmalarda NOS aktivitesi lokalizasyonları, arterler etrafındaki sinir liflerinde, ürotelyumun altında ve düz kas demetleri ve arteryel endotelyum arasında gösterilmiştir.

Son yıllarda eNOS enzimini kodlayan gende ekson, intron ve promotor bölgelerinde pek çok polimorfizm ve çeşitli mutasyonlar saptanmıştır. Bu mutasyonların gen ekspresyonunda ve Enos enziminde çeşitli yapısal ve fonksiyonel değişikliklere neden olduğu ve bunlara bağlı olarak da NO dengesinin bozulduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (49, 50). eNOS gen polimorfizminde NO metabolizmasının bozulması ve endotel disfonksiyonuna bağlı olarak; hızlanmış ateroskleroz, vasküler remodelingde bozulma, aort anevrizma gelişimi ve çeşitli kardiyovasküler hastalıkların gelişebildiği yapılan araştırmalarda gösterilmiştir (51-53)

NO genital organlar dahil birçok dokuda nonadrenerjik nonkolinerjik sistemin haberci bir molekülüdür. Organ banyosu çalışmalarında NO/cGMP yolağının vajinal düz kas gevşemesi için anahtar bir role sahip olduğu bilinmektedir (54). Vajinal düz kasın bir PDE5 inhibitörü olan sildenafille gevşeyerek yanıt vermesi de NO/cGMP sisteminin vajinadaki cinsel yanıt cevabının önemini göstermektedir (55).

Yapılan rat deneylerinde, e-NOS eksikliğinin geç menarş, ovulasyon oranlarında azalma doğum sayısının azlığı, intrauterin gelişme geriliği ve erken menapoz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (56,57). İnsanlarda da e-NOS overe lokal etki ile ovulasyona yön vermek gibi reproduktif fonksiyonları düzenlemektedir.

Bu bilgiler ışığında mesane ve üretrada NOS varlığı ve NO'ın bu bölgedeki fonksiyonel rolü ortaya çıkmaktadır. Klinik olarak NO bazındaki mekanizmalar normal miksiyonun korunmasında ve üriner inkontinansda önemli olabilir. Bu mekanizmaların pelvik cerrahi veya spinal yaralanmalar sonrası gelişen işeme disfonksiyonu ve inkontinansın kısmi sorumlusu olabilir. Bu sorumluluk ileri çalışmalar ile daha da desteklenirse bu alanlardaki tedavi seçeneği olarak NOS agonistleri veya NO donörleri tedavideki yerini bulabilir. Bu alanlardaki NO mekanizmalarının temeli gelişmeye devam ettikçe, klinik uygulamaların devamında gelmesi muhtemeldir.

Ayrıca NO-cGMP kaskadını etkileyen PDEi'nin mesane ve üretra bazındaki etkileri araştırılarak aşırı aktif mesane tedavisindeki yeri değerlendirilebilir.

Yapılan çalışmada istatistiksel anlamlı sonuçlar elde edilmiş olup NO ve NOS enzim çeşitlerinin mesane ve üretrada kastrasyondan etkilendiği gözlenmiştir. Sonuç olarak aşırı aktif mesane veya alt üriner sistem semptomlarının tedavisinde yer alması için bu çalışmalar ürodinamik verilerle desteklenmeli ve sonrasında tedavi yolunda umut ışığı olmaya devam etmelidir.

### **Kaynakça**

1. Andersson, K.E. and Persson, K., The L-arginine/nitric oxide pathway and non-adrenergic, non-cholinergic relaxation of the lower urinary tract, *Gen. Pharmacol.*, 24 (1993) 833-839.
2. Andersson, K.E., Garcia -Pascual, A. and Tottrup, A., Nonadrenergic, non-cholinergic nerve-mediated relaxation of rabbit urethra is caused by nitric oxide, *Acta. Physiol. Scand.*, 141(1991) 133-134
3. Andersson, K.E., Garcia-Pascual, A., Persson, K., Forman, A. and Tottrup, A., Electrically induced, nerve-mediated relaxation of rabbit urethra involves nitric oxide, *J. Urol.*, 147 (1992) 253-259

4. Burnett, A.L., Lowenstein, C.J., Bredt, D.S., Chang, T.S.K. and, Snyder, S.H., Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection, *Science*, 257 (1992) 401-403
5. Pickard, R.S., Powell, P.H. and Zar, M.A., The effect of inhibitors of nitric oxide biosynthesis and cyclic GMP formation on nerve-evoked relaxation of human cavernosal smooth muscle, *Br. J. Pharmacol.*, 104 (1991) 755-759
6. Dokita S., Morgan, W.R., Wheeler, M.A., Yoshida, M, Latifpour, J. and Weiss, R.M., N-g-nitro-L-arginine inhibits nonadrenergic, non-cholinergic relaxation in rabbit urethral smooth muscle, *Life Sci.*, 48 (1991) 2429-2436
7. Finberg, J.P.M., Levy, S and Vardi, Y., Inhibition of nerve stimulation induced vasodilatation in corpora cavernosa of the pithed rat by blockade of nitric oxide synthase, *Br. J. Pharmacol.*, 108 (1993) 1038-1042.
8. Hashimoto, S., Kigoshi, S. and Muramatsu, I., Nitric oxide-dependent and independent neurogenic relaxations of isolated dog urethra, *Eur. J. Pharmacol.*, 231 (1993) 209-214,
9. Parlani, M., Conte, B. and Manzini, S., Nonadrenergic, noncholinergic inhibitory control of the rat external urethral sphincter: involvement of nitric oxide, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 265 (1993) 713-719
10. Persson, K., Igawa, Y., Mattiasson, A. and Andersson, K.E., Effects of inhibition of the L-arginine/nitric oxide pathway in the rat lower urinary tract in vivo and in vitro, *Br. J. Pharmacol.* 107 (1992) 178-184
11. Verge, V.M.K., Xu, Z., Xu, X.J., Wiesenfeld-Hallin, Z. and Hökfelt, T., Marked increase in nitric oxide synthase mRNA in dorsal root ganglia after peripheral axotomy: in situ hybridization and functional studies, *Proc. NatL Acad. Sci.*, 89 (1992) 11617-11621
12. Jones RD, Pugh PJ, Jones TH, Channer KS. The vasodilatory action of testosterone: a potassium-channel opening or a calcium antagonistic action? *Br J Pharmacol* 2003;138(5):733-44
13. Deenadayalu VP, White RE, Stallone JN, Gao X, García AJ. Testosterone relaxes coronary arteries by opening the large-conductance, calcium-activated potassium channel. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281(4):H1720-7,
14. Perusquía M, Villalón CM. Possible role of Ca<sup>2+</sup> channels in the vasodilating effect of 5beta-dihydrotestosterone in rat aorta. *Eur J Pharmacol* 1999 ;371(2-3):169-78.
15. Crews JK, Khalil RA. Antagonistic effects of 17 beta-oestradiol, progesterone, and testosterone on Ca<sup>2+</sup> entry mechanisms of coronary vasoconstriction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19(4):1034-40,

16. Crews JK, Khalil RA. Gender-specific inhibition of Ca<sup>2+</sup> entry mechanisms of arterial vasoconstriction by sex hormones. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999;26(9):707–15

17. Tep-areenan P, Kendall DA, Randall MD. Testosterone-induced vasorelaxation in the rat mesenteric arterial bed is mediated predominantly via potassium channels. *Br J Pharmacol* 2002;135(3):735–40

18. Akinga AG, Burnett AL. Endothelial nitric oxide synthase protein expression, localization, and activity in penis of alloxan induced diabetic rat. *Mol Urol* 5, 189-197, 2001.

19. Vernet, D., Cai, L., Garban, H., Babbitt, M. L., Murray, F. T., Rajfer, J., et al. Reduction of penile nitric oxide synthase in diabetic BB/WORdp (type 1) and BBZ/WORdp (type II) rats with erectile dysfunction. *Endocrinology* 136, 5709–5717, 1995.

20. El-Sakka, A. I., Lin, C. S., Chui, R. M., Dahiya, R., & Lue, T. F. Effects of diabetes on nitric oxide synthase and growth factor genes and protein expression in an animal model. *Int J Impot Res* 11, 123– 132, 1999.

21. Böger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res* 2003; 59: 824–33.

22. Hak AE, Wittman JC, de Jong FH, Geerlings MI, Hofman A, et al. Low levels of endogenous androgens increase the risk of atherosclerosis in elderly men: the Rotterdam study. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3632–9.

23. Tomohiro M. Yasuhiro S., Seiji A., Bunzo K., Keiji S., Kazuhiro S. Time dependent effects of castration on the bladder function and histological changes in the bladder and blood vessels *Asian Journal of Andrology* (2014) 16, 457–460.

24. Nishizawa O, Kawahara T, Shimoda N, Suzuki K, Fujieda N, Kudo T, Suzuki T, Noto H, Harada T, and Tsuchida S: Effect of methylene blue on the vesicourethral function in the rats. *Tohoku J Exp Med* 168: 621-622, 1992.

25. Majid DS, Kopkan L. Nitric oxide and superoxide interactions in the kidney and their implication in the development of salt-sensitive hypertension *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007 Sep;34(9):946-52.

26. Al-Hijji J, Larsson B, Batra S: Nitric oxide synthase in the rabbit uterus and vagina: hormonal regulation and functional significance. *Biol Reprod* 2000;62: 1387-1392.

27. Al-Hijji J, Batra S: Downregulation by estrogen of nitric oxide synthase activity in the female rabbit lower urinary tract. *Urology* 1999;53: 637-641.

28. Al-Hijji J, Larsson I, Batra S: Effect of ovarian steroids on nitric oxide synthase in the rat uterus, cervix and vagina. *Life Sci* 2001;69: 1133-1142.
29. Kim SW, Jeong SJ, Munarriz R, Kim NN, Goldstein I, Traish AM: Role of the nitric oxide-cyclic GMP pathway in regulation of vaginal blood flow. *Int J Impot Res* 2003;15:355-361.
30. Persson K, Igawa Y, Matsson A, and Andersson KE: Inhibition of the arginine/nitric oxide pathway causes bladder hyperactivity in the rat. *Acta Physiol Stand* 144: 107-108,1991.
31. Mevorach RA, Bogaert GA, and Kogan BA: Role of nitric oxide in fetal lower urinary tract function. *J Urol* 152: 510-514,1994.
32. Traish AM, Kim NN, Huang YH, Min K, Munarriz R, Goldstein I: Sex steroid hormones differentially regulate nitric oxide synthase and arginase activities in the proximal and distal rabbit vagina. *Int J Impot Res* 2003;15:397-404.
33. Youngjun Seo, Sung-Woo Park, Joo-Yeong Kim, Sang Don Lee Expression of alfa 1 Receptor and Nitric Oxide Synthase in Oophorectomized and Estrogen- Supplemented Rat Bladder and Urethra *Korean J Urol* 2014;55: 677-686.
34. Berman JR, McCarthy MM, Kyprianou N: Effect of estrogen withdrawal on nitric oxide synthase expression and apoptosis in the rat vagina. *Urology* 1998;51: 650-656.
35. Leone AM, Wiklund NP, Hokfelt T, Brundin L, Moncada S: Release of nitric oxide by nerve stimulation in the human urogenital tract. *Neuroreport*; 5: 733-736, 1994.
36. Zygmunt PM, Zygmunt PK, Hogestatt ED, and Andersson KE: Effect of omega-conotoxin on adrenergic, cholinergic and NANC neurotransmission in the rabbit urethra and detrusor. *Br J Pharmacol* 110: 1285-1290, 1993.
37. Garcia-Pascual A, Costa G, Garcia-Sacristan A, and Andersson KE: Relaxation of sheep urethral muscle induced by electrical stimulation of nerves: involvement of nitric oxide. *Acta Physiol Stand* 141: 531-539, 1991.
38. Thornbury KD, Hollywood MA, and McHale NG: Mediation by nitric oxide of neurogenic relaxation of the urinary bladder neck muscle in sheep. *J Physiol* 451: 133-144, 1992.
39. Hashimoto S, Kigoshi S, and Muramatsu I: Nitric oxide-dependent and independent neurogenic relaxation of isolated dog urethra. *Eur J Pharmacol* 231: 209-214, 1993.

40. Bridgewater M, Macneil HF, and Brading AF: Regulation of tone in pig urethral smooth muscle. *J Urol* 150: 223-228, 1993.

41. Persson K, Alm P, Johansson K, Larsson B, and Andersson KE: Nitric oxide synthase in pig lower urinary tract: immunohistochemistry, NADPH diaphorase histochemistry and functional effects. *Br J Pharmacol* 110: 521-530, 1993.

42. Mattiasson A, Andersson KE, and Sjogren C: Contractant and relaxant properties of the female rabbit urethral submucosa. *J Urol* 133: 304-310, 1985.

43. Zygumt PK, Persson K, Alm P, Larsson B, and Andersson KE: The L arginine/nitric oxide pathway in the rabbit urethral lamina propria. *Acta Physiol Stand* 148: 431-439, 1993

44. Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, and Snyder SH: Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351: 714-718, 1991.

45. Alm P, Larsson B, Ekblad E, Sundler F, and Andersson KE: Immunohistochemical localization of peripheral nitric oxide synthase-containing nerves using antibodies raised against synthesized C- and N- terminal fragments of a cloned enzyme from rat brain. *Acta Physiol Stand* 148: 421-429, 1993.

46. Vizzard MA, Erdman SL, Forstermann U, and de Groat WC: Differential distribution of nitric oxide synthase in neural pathways to the urogenital organs (urethra, penis, urinary bladder) of the rat. *Brain Res* 646: 279-291, 1994.

47. Grozdanovic Z, Baumgarten HG, and Bruning G: Histochemistry of NADPH-diaphorase, a marker for neuronal nitric oxide synthase, in the peripheral autonomic nervous system of the mouse. *Neuroscience* 48: 225-235, 1992.

48. Dokita S, Smith SD, Nishimoto T, Wheeler MA, and Weiss RM: Involvement of nitric oxide and cyclic GMP in rabbit urethral relaxation. *Eur J Pharmacol* 266: 269-275, 1994.

49. Wattanapitayakul SK, Mihm MJ, Young AP, Bauer JA. Therapeutic implications of human endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism. *Trends Pharmacol Sci.* 2001 Jul;22(7):361-8.

50. Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, et al. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation.* 1999 Oct 5;100(14):1515-20.

51. Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS, Sessa WC. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest.* 1998 Feb 15;101(4):731-6.



52. Khurana VG, Sohni YR, Mangrum WI, McClelland RL, O’Kane DJ, Meyer FB, et al. Endothelial nitric oxide synthase T-786C single nucleotide polymorphism: a putative genetic marker differentiating small versus large ruptured intracranial aneurysms. *Stroke*. 2003 Nov;34(11):2555-9.

53. Kuhlencordt PJ, Gyurko R, Han F, Scherrer-Crosbie M, Aretz TH, Hajjar R, et al. Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. *Circulation*. 2001 Jul 24;104(4):448-54.

54. Giraldi A, Alm P, Werkstrom V, Myllymaki L, Wagner G, Andersson KE: Morphological and functional characterization of a rat vaginal smooth muscle sphincter. *Int J Impot Res* 2002;14: 271-282.

55. Min K, Kim NN, McAuley I, Stankowicz M, Goldstein I, Traish AM: Sildenafil augments pelvic nerve-mediated female genital sexual arousal in the anesthetized rabbit. *Int J Impot Res* 2000;12 Suppl 3:S32-39.

56. Tempfer C, Moreno RM, O’Brian WE, Gregg AR. Genetic contributions of the endothelial nitric oxide synthase gene to ovulation and menopause in amouse model. *Fertil Steril*2000;73: 1025–31.

57. Hefler LA, Reyes CA, O’Brien W.E. and Gregg A.R. Perinatal development of endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Biol. Reprod.* 2001;64: 666–673.



## BÖLÜM IX

# YENİ KEŞFEDİLMİŞ BİR MOLEKÜL; SUPRABASİN

### *A Newly Discovered Molecule; Suprabasin*

**Nevin KOCAMAN**

*(Doç. Dr.) Fırat Üniversitesi Tıp  
Fakültesi Histoloji & Embriyoloji ABD.  
E-mail: drnkocaman@gmail.com  
ORCID: 0000-0002-6682-6345*

### **1. Giriş**

**S**uprabasin (SBSN), ilk olarak fare ve insan dokularındaki katmanlı epitelyumun bazal katmanında eksprese edildiği tespit edilen ve keratinize epitelin potansiyel bir öncüsü olduğu düşünülen yeni bir proteindir. Üç boyutlu yapısı, moleküler mekanizması ve kesin fizyolojik ve patolojik işlevi hala belirsiz olan SBSN'nin, hücresel süreçleri etkileyen çoklu moleküler sinyal yolları, AKT, Wnt ve MAPK yollarını düzenlediği gösterilmiştir. Son yıllarda, SBSN'nin aşırı ekspresyonunun, hücre proliferasyonunu, invazyonunu ve bazı malign tümörlerin metastazını teşvik ettiği ve SBSN'nin tümör oluşumu ve gelişimini arttıran bir onkogen olabileceği gösterilmiştir. (1, 2). Ayrıca *nöropsikiyatrik sistemik lupus eritematozus* ve atopik dermatit dahil, diğer bazı hastalıklarda da önemli rol tespit edilmiştir. (3, 4, 5)

### **2. SBSN'nin temel özellikleri**

İnsan SBSN'si beş ekson ve dört introndan oluşan kromozom 19'un q13 bölgesinde bulunur. Kodlanan proteini, N terminalinde SBSN'nin hücre dışı lokalizasyonuna yardımcı olan bir sinyal peptidi içerir. Son çalışmalar SBSN'nin transglutaminaz enzimi ve O-glikosilasyon ile translasyon sonrası modifikasyonunun gerçekleştiği gösterildi. (6, 7, 8)

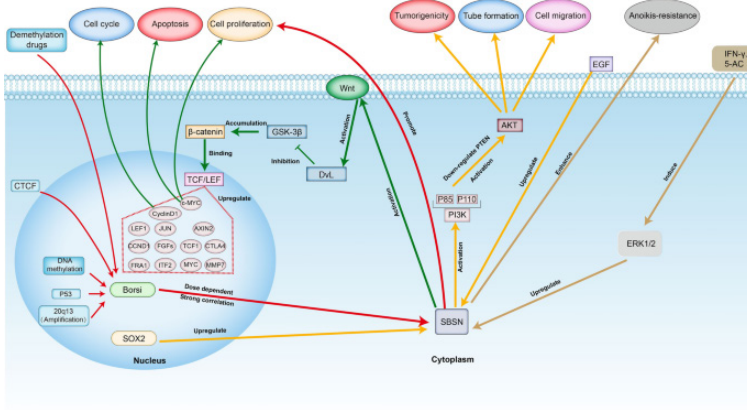
SBSN ekspresyonu çoğunlukla keratinositlerin kornifiye zarfında gözlenir ve derinin koruyucu fonksiyonu ile ilişkilidir. SBSN sadece epidermiste ifade edilmekle kalmaz aynı zamanda insanlarda epidermis, yemek borusu, rahim, bademcikler, vajina ve timusta da eksprese edilir. SBSN eksikliğinin farelerin sindirim sistemi epitelinde anormal değişikliklere yol açtığı tespit edilmiş ve SBSN transkriptlerinin keratinositlerin farklılaşmasını arttırdığı gösterilmiştir. (1, 9, 10) Bununla birlikte, canlı insan derisi eşdeğeri (LSE) modelinde, SBSN eksikliği stratum granülozum hücrelerinin olgunlaşmamasına ve keratinositlerin apoptozunun artmasına ve ayrıca kusurlu cilt bariyer fonksiyonuna yol açtığı belirlenmiştir. (4) Ek olarak, insan epidermisinin organotipik bir modelinde BCR-RHOA-MAL/SRF yolunun inhibisyonu, JUNB ve SBSN transkriptlerinde bir azalmaya ve keratinosit granülasyonunun bozulmasına neden olduğu, böylece stratum korneum gelişimini etkilediği tespit edilmiştir ve SBSN'nin epidermal farklılaşma ve cilt bariyeri düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı yönündeki bulguları destekleyen kanıtları sağlanmıştır. (4, 11)

### 3. SBSN ile ilgili sinyal yolları

Karsinogenezle ilgili birçok yol vardır. Wnt/ $\beta$ -katenin yolu normalde embriyogenez ve gelişim üzerinde etkili olmasına rağmen, sinyal mekanizmalarından birinin bozulması durumunda organ malformasyonları, kanserler, metabolik ve nörodejeneratif bozukluklar dahil olmak üzere çeşitli hastalıklara yol açabilir. (12) Yine Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/protein kinaz B (Akt) sinyal yolu, anjiyogenez ve metabolizmanın yanı sıra hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve göçünü düzenler. Ek olarak cilt gelişimine ve homeostaziye aracılık edebilir. PI3K/Akt yolunun düzensizliğinin sıklıkla malign melanom, bazal hücreli karsinom (BCC) ve kutanöz skuamöz hücreli karsinom (SCC) gibi çeşitli insan kutanöz maligniteleri ve bunların kötü sonuçlarıyla ilişkili olduğunu gösteren çok sayıda kanıt vardır. (13) Birkaç çalışma, suprabasinin kanser hücrelerinin fonksiyonel davranışını PI3K/AKT, Wnt/ $\beta$ -katenin yolları aracılığıyla düzenlediğini ve suprabasin ekspresyonunun kanser, hücre sinyalleme ve bağışıklık tepkisi ile ilgili yollarla ilişkili olduğunu gösterdi. (14)

SBSN'nin, özofagus skuamöz hücreli karsinom (ESCC) hücre hatlarında Wnt/ $\beta$ -katenin yolunun aktivitesini artırarak onkogenik etkiler gösterdiği, bunun da  $\beta$ -katenin ve TCF/LEF transkripsiyon aktivitesinin nükleer birikimine yol açtığı bildirilmiştir. SBSN; AXIN2, CTLA4, CCND1, FGF'ler, LEF1,

MYC JUN, ITF2, TCF1, MMP7 ve FRA1 gibi Wnt/ $\beta$ -katenin yolunun aşağı basamaklarındaki hedef genlerin ekspresyonunu artırmakta olup Wnt/ $\beta$ -katenin yolu üzerindeki etkisi, GSK-3 $\beta$ 'nin fosforilasyonunun arttırılmasıyla gerçekleşmektedir. (1)



**Şekil 1:** SBSN ve ilgili sinyal yollarının önerilen biyolojik fonksiyonları: SBSN, PI3K/ AKT, Wnt/ $\beta$ -katenin ve diğer yollar yoluyla kanser hücrelerinin biyolojik fonksiyonel davranışının düzenlenmesi. (15).

SOX2'nin SBSN ekspresyonunu artırdığı, AKT ve P38MAPK sinyallemesinin aktivasyonu ile birlikte anjiyogenezi teşvik ettiği gözlemlenmiş, epidermal büyüme faktörü (EGF), endotel hücrelerinde SBSN ekspresyonunu önemli ölçüde artırdığı belirlenmiştir. SBSN salınımının bloke edilmesi, AKT fosforilasyonunu azaltarak fare tümör endotel hücrelerinin (mTEC)ler) göç ve tüp oluşumu yeteneklerini kısıtlamaktadır. Bu sonuçlar SBSN'nin mTEC'lerin PI3K/AKT yoluyla göçünü ve tüp oluşumunu düzenleyebildiğini göstermektedir. (16)

Ek olarak IFN-y ile in vitro indüksiyonun meme, prostat ve serviks kanseri hücre hatlarında ERK1/2 aktivitesini arttırdığını, dolayısıyla artan SBSN ekspresyonuna ve düşük yapışkanlı hücrelerin apoptozuna karşı artan dirence aracılık ettiği bulunmuş ve SBSN'nin Wnt ve PI3K/AKT gibi sinyal yollarının indüksiyonu yoluyla tümör ilerlemesini desteklediği gösterilmiştir. (17)

## 4. SBSN' nin hastalıklarla ilişkisi

### 4.1. SBSN ve kanser

Son yıllarda proteomik ve biyobelirteç araştırmalarının gelişmesi nedeniyle, artan sayıda çalışma SBSN'yi potansiyel bir tümör belirteci olarak

tanımlandı. SBSN'nin genellikle tümör hücrelerinin proliferasyonu, invazivliği, metastazı ve anjiyogenezinde rol oynadığı ve bunun da tümörlerin oluşumunda ve gelişiminde önemli bir bağlantı olabileceği gösterildi. (2) Yapılan çalışmalar SBSN'nin akciğer adeno kanseri, derinin skuamöz hücreli karsinomlarında arttığını ve bir biyobelirteç olabileceğini gösterdi. (1, 18)

SBSN, DNA demetilasyonunu indükler, bu da SBSN transkripsiyonunun önemli ölçüde artmasına yol açar. (19) Anormal SBSN ekspresyonunun, in vivo onkogenik etkileri teşvik etmek için DNA metilasyonu ile düzenlendiği gösterilmiştir. *Özefagus skuamöz hücreli karsinomda(ESCC) SBSN'nin onkogenik rolü tanımlanmış ve SBSN ekspresyonunun artmasının, ESCC'nin ilerlemesi ve kötü prognozu ile ilişkili olabileceği ve ESCC'nin prognozunu değerlendirmede bağımsız bir faktör olduğu belirtilmiştir.* (1, 20) Ek olarak, SBSN aşırı ekspresyonuna sahip ESCC hücrelerinin in vivo ve in vitro proliferasyon kapasitesinin artırılmasına ve in vivo/in vitro tümör oluşumuna neden olduğu tespit edilmiştir. (1) Ancak tümörlerde grade artışına paralel olarak SBSN'nin salınımının azaldığı yönündeki çalışmalarda oldukça önem arz etmektedir. (2)

Tümör büyümesinin, tümör kan damarındaki kanın sağladığı beslenme desteğinden ayrılamayacağı iyi bilinmektedir. Tümör dokularındaki endotel hücreleri, normal endotel hücrelerinden (NEC'ler) farklı olan tümör endotel hücreleri (TEC'ler) olarak bilinir. Tümör mikroçevresinde, endotel hücreleri, TGF- $\beta$  tarafından düzenlenen endotelyal mezenkimal transformasyon yoluyla kanserle ilişkili fibroblastlara dönüşebilirken, kanserle ilişkili fibroblastlar, çeşitli büyüme faktörleri ve kemokinler salgılayarak tümör büyümesinde ve ilerlemesinde önemli bir rol oynar. Ayrıca TEC'lerin, yavaş tümör hücrelerinin agresifliğini artırarak onları daha tümörjenik ve kemorezistan hale getirdiği ve aynı zamanda anjiyogenez teşvik etmek için tümör baskılayıcı genleri (SLIT2 gibi) aşağı regüle ederek tümör oluşumuna aracılık ettikleri de gösterilmiştir. Tümörlerdeki endotel hücrelerinin çoğalması ve göçü aynı zamanda mikrovasküler filizlenme oluşumu ve kanser metastazı ile ilişkili anjiyogenez için de kritik öneme sahiptir. (21-26) SBSN'nin anjiyogenez ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. (5, 16) SBSN, mRNA ekspresyonu, insan böbrek ve kolon kanserlerinin yanı sıra fare böbrek kanseri ve melanomlarından gelen TEC'lerde (NEC'lere kıyasla) yukarı doğru düzenlendiğinden potansiyel bir TEC işaretçisi olabilir. Ayrıca, SBSN yıkımı, VEGF-A aracılı mTEC tüpü oluşumunu ve göçünü inhibe eder. Bu, SBSN'nin tümörlerde anti-anjiyogenik tedavi için yeni bir hedef olabileceğini düşündürür.

## 4.2. SBSN ve diğer hastalıklar

### 4.2.1. Nöropsikiyatrik Lupus Eritematozus (NPSLE)

Sistemik lupus eritematozus (SLE), birden fazla organ ve sistemi kapsayan otoimmün bir hastalıktır. SLE’li bazı hastalar NPSLE adı verilen sinir ve zihinsel sistemlerde semptom ve bulgular gösterirler. SBSN immün kompleksleri NPSLE grubundaki hastaların BOS’unda ve hipokampal astrositlerinde bulunmakta ve doğrudan anti-SBSN antikorlarına bağlandığı, bunun da dejenerasyona ve diğer patofizyolojik işlev bozukluklarına yol açtığı bilinmektedir. Bu hastaların astrositleri lipopolisakkarit içeren anti-SBSN antikorlarına maruz bırakıldığında, astrosit yaşlanması ve otofaji yollarının aktive olduğu görülmüştür. Yine NPSLE hastalarının BOS’unda anti-SBSN’deki artışla birlikte; interlökin-10, interlökin-13, granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör, indüklenebilir protein-10 ve monosit kemotaktik protein-1 konsantrasyonlarında önemli ölçüde artmış, bunların a-Klotho geninin seviyelerinin azalmasına yol açtığı ve böylece hücre yaşlanmayı teşvik ettiği gösterilmiş ve BOS’taki anti-SBSN antikorlarının, şüpheli NPSLE’nin değerlendirilmesinde yeni otoantikorlar olarak kullanılabileceği belirtilmiştir . (27, 28, 3, 29)

### 4.2.2. Atopik Dermatit (AD)

AD, hastanın yaşam kalitesini ciddi şekilde etkileyen, kaşıntı ve egzama benzeri dermatit ile karakterize, kronik, tekrarlayan, inflamatuvar bir deri hastalığıdır. AD’nin ana nedeni cilt bariyeri ve bağışıklık sistemindeki bozukluktur. Yapılan çalışmalar AD hastalarının SBSN ekspresyon seviyesinin sağlıklı insanlarından daha düşük olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, düzensiz SBSN salınımının hastalık üzerindeki rolünü göstermektedir. T-yardımcı-2 hücreleri (Th2), AD’li hastalarda cilt hasarına neden olabilir. Th2’den salgılanan sitokinler, keratinositlerdeki SBSN ekspresyonunu etkilemez, ancak SBSN eksikliğinin neden olduğu apoptozu teşvik eder. Nakavt fare modelinde SBSN kaybının doğum sonrası cilt bariyeri fonksiyonunu etkilemediği ancak sindirim sistemi epitelinde anormal değişikliklere yol açacağı gösterilmiştir. Bu bulgular SBSN eksikliğinin AD hastalığının ilerlemesinde de rol oynayabileceğinin de kanıtını sunmaktadır. (30, 31, 32, 4, 17)

### 4.2.3. Miyelodisplastik Sendrom (MDS)

MDS, hematopoietik kök hücrelerin klonal bir hastalığıdır ve aynı zamanda lösemi öncesi bir hastalıktır. Mevcut çalışmalar, SBSN’nin MDS hastalarının



periferik kanında mevcut olduğunu ve serumdaki lösin açısından zengin alfa-2-glikoprotein 1 reseptörü ile etkileşime girdiğini belirlemiş ve MDS'li hastaların kemik iliğinde SBSN'nin anormal şekilde eksprese edildiğini, bunun esas olarak mRNA seviyesine yansıdığını ve kötü klinik prognozla ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu durum SBSN'nin potansiyel olarak MDS'nin bir biyolojik belirteci olabileceğini düşündürmekte ve bu yöndeki çalışmaların önünü açmaktadır. (33, 34, 35)

## 5. Sonuç

SBSN ekspresyonunun, kanser ve bağışıklık hastalıkları da dahil olmak üzere pek çok hastalığın ilerlemesinde rol oynadığı ve birçok insan hastalığının potansiyel bir biyobelirteci olabileceği düşünülmektedir. SBSN, tümör hücresi proliferasyonu, metastazı, anjiyogenezi ve ilaç direnci gibi patolojik süreçlerde rol alan bir onkogen olabilir. SBSN hedefli anti -kanser tedavileri için yeni bir strateji olabilir. Hastalıkların gelişimi, birden fazla yollardan oluşan karmaşık sinyal ağları tarafından düzenlenir. SBSN ile ilişkili sinyal yollarının Wnt/ $\beta$ -katenin ve PI3K/AKT yollarını içerdiği rapor edilmiştir. Ancak SBSN'nin işlevi ve etki mekanizması hala belirsizdir. SBSN'nin çeşitli hastalıkların gelişiminde küçük bir rolden daha fazlasını oynadığı tahmin edilmekte ve potansiyel bir tümör biyobelirteci olarak kullanılabilirliği vurgulanmaktadır.

## Kaynaklar

1. Zhu J, Wu G, Li Q, et al. Overexpression of Suprabasin is Associated with Proliferation and Tumorigenicity of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Sci Rep.* 2016;6:21549. Published 2016 Feb 22. doi:10.1038/srep21549.
2. Ucer O, Kocaman N. Role of suprabasin, a new biomarker in squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma. *Tissue Cell.* 2022;78:101875. doi:10.1016/j.tice.2022.101875.
3. Ichinose K, Ohyama K, Furukawa K, et al. Novel anti-suprabasin antibodies may contribute to the pathogenesis of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol.* 2018;193:123-130. doi:10.1016/j.clim.2017.11.006.
4. Aoshima M, Phadungsaksawasdi P, Nakazawa S, et al. Decreased expression of suprabasin induces aberrant differentiation and apoptosis of epidermal keratinocytes: Possible role for atopic dermatitis. *J Dermatol Sci.* 2019;95(3):107-112. doi:10.1016/j.jdermsci.2019.07.009.

5. Takahashi K, Asano N, Imatani A, et al. Sox2 induces tumorigenesis and angiogenesis of early-stage esophageal squamous cell carcinoma through secretion of Suprabasin. *Carcinogenesis*. 2020;41(11):1543-1552. doi:10.1093/carcin/bgaa014.

6. Matsui T, Hayashi-Kisumi F, Kinoshita Y, et al. Identification of novel keratinocyte-secreted peptides dermokine-alpha/-beta and a new stratified epithelium-secreted protein gene complex on human chromosome 19q13.1. *Genomics*. 2004;84(2):384-397. doi:10.1016/j.ygeno.2004.03.010.

7. Moffatt P, Salois P, St-Amant N, Gaumond MH, Lanctôt C. Identification of a conserved cluster of skin-specific genes encoding secreted proteins. *Gene*. 2004;334:123-131. doi:10.1016/j.gene.2004.03.010.

8. Steentoft C, Vakhrushev SY, Joshi HJ, et al. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO J*. 2013;32(10):1478-1488. doi:10.1038/emboj.2013.79.

9. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015;347(6220):1260419. doi:10.1126/science.1260419.

10. Li J, Zheng L, Uchiyama A, et al. A data mining paradigm for identifying key factors in biological processes using gene expression data. *Sci Rep*. 2018;8(1):9083. Published 2018 Jun 13. doi:10.1038/s41598-018-27258-8.

11. Dubash AD, Koetsier JL, Amargo EV, Najor NA, Harmon RM, Green KJ. The GEF Bcr activates RhoA/MAL signaling to promote keratinocyte differentiation via desmoglein-1. *J Cell Biol*. 2013;202(4):653-666.

12. Yüksel EI, Balta H, Kocaman N. Wnt1 and  $\beta$ -Catenin Expression in Lobular Capillary Hemangioma: Immunohistochemical Study. *İstanbul Med J* 2023; 24(3): 261-6.

13. Teng Y, Fan Y, Ma J, et al. The PI3K/Akt Pathway: Emerging Roles in Skin Homeostasis and a Group of Non-Malignant Skin Disorders. *Cells*. 2021;10(5):1219.

14. Tan KB, Tan SH, Aw DC, et al. Simulators of squamous cell carcinoma of the skin: diagnostic challenges on small biopsies and clinicopathological correlation. *J Skin Cancer*. 2013;2013:752864.

15. Tan H, Wang L, Liu Z. Suprabasin: Role in human cancers and other diseases. *Mol Biol Rep*. 2022;49(2):1453-1461. doi:10.1007/s11033-021-06897-7

16. Alam MT, Nagao-Kitamoto H, Ohga N, et al. Suprabasin as a novel tumor endothelial cell marker. *Cancer Sci*. 2014;105(12):1533-1540.

17. Nakazawa S, Shimauchi T, Funakoshi A, et al. Suprabasin-null mice retain skin barrier function and show high contact hypersensitivity to nickel upon oral nickel loading. *Sci Rep.* 2020;10(1):14559. Published 2020 Sep 3. doi:10.1038/s41598-020-71536-3.

18. Ucer O, Kocaman N. New candidates in the differential diagnosis of malignant mesothelioma from benign mesothelial hyperplasia and adenocarcinoma; DARS2 and suprabasin. *Tissue Cell.* 2022;79:101920. doi:10.1016/j.tice.2022.101920.

19. Shao C, Tan M, Bishop JA, et al. Suprabasin is hypomethylated and associated with metastasis in salivary adenoid cystic carcinoma. *PLoS One.* 2012;7(11):e48582. doi:10.1371/journal.pone.0048582.

20. Jiang S, Zhang Q, Su Y, Pan L. Network-Based Differential Analysis to Identify Molecular Features of Tumorigenesis for Esophageal Squamous Carcinoma. *Molecules.* 2018;23(1):88. Published 2018 Jan 1. doi:10.3390/molecules23010088.

21. Lopes-Coelho F, Martins F, Pereira SA, Serpa J. Anti-Angiogenic Therapy: Current Challenges and Future Perspectives. *Int J Mol Sci.* 2021;22(7):3765. Published 2021 Apr 5. doi:10.3390/ijms22073765.

22. Dudley AC. Tumor endothelial cells. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(3):a006536. doi:10.1101/cshperspect.a006536

23. Sobierajska K, Ciszewski WM, Sacewicz-Hofman I, Niewiarowska J. Endothelial Cells in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1234:71-86. doi:10.1007/978-3-030-37184-56.

24. Cao Z, Scandura JM, Inghirami GG, Shido K, Ding BS, Rafii S. Molecular Checkpoint Decisions Made by Subverted Vascular Niche Transform Indolent Tumor Cells into Chemoresistant Cancer Stem Cells. *Cancer Cell.* 2017;31(1):110-126. doi:10.1016/j.ccell.2016.11.010.

25. Brantley-Sieders DM, Dunaway CM, Rao M, et al. Angiocrine factors modulate tumor proliferation and motility through EphA2 repression of Slit2 tumor suppressor function in endothelium. *Cancer Res.* 2011;71(3):976-987. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3396.

26. Cheng HW, Chen YF, Wong JM, et al. Cancer cells increase endothelial cell tube formation and survival by activating the PI3K/Akt signalling pathway. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017;36(1):27. Published 2017 Feb 7. doi:10.1186/s13046-017-0495-3.

27. Oku K, Atsumi T. Systemic lupus erythematosus: nothing stale her infinite variety. *Mod Rheumatol.* 2018;28(5):758-765. doi:10.1080/14397595.2018.1494239.

28. Kivity S, Agmon-Levin N, Zandman-Goddard G, Chapman J, Shoenfeld Y. Neuropsychiatric lupus: a mosaic of clinical presentations. *BMC Med.* 2015;13:43. Published 2015 Mar 4. doi:10.1186/s12916-015-0269-8.
29. Ushigusa T, Ichinose K, Sato S, et al. Soluble  $\alpha$ -klotho is a potential biomarker associated with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol.* 2016;165:29-34. doi:10.1016/j.clim.2016.03.001.
30. Drucker AM, Wang AR, Li WQ, Severson E, Block JK, Qureshi AA. The Burden of Atopic Dermatitis: Summary of a Report for the National Eczema Association. *J Invest Dermatol.* 2017;137(1):26-30. doi:10.1016/j.jid.2016.07.012.
31. Sakabe J, Kamiya K, Yamaguchi H, et al. Proteome analysis of stratum corneum from atopic dermatitis patients by hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;134(4):957-60.e8. doi:10.1016/j.jaci.2014.07.054.
32. David Boothe W, Tarbox JA, Tarbox MB. Atopic Dermatitis: Pathophysiology. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1027:21-37.
33. Winter S, Shoaie S, Kordasti S, Platzbecker U. Integrating the “Immunome” in the Stratification of Myelodysplastic Syndromes and Future Clinical Trial Design. *J Clin Oncol.* 2020;38(15):1723-1735. doi:10.1200/JCO.19.01823.
34. Chrastinová L, Pastva O, Bocková M, et al. A New Approach for the Diagnosis of Myelodysplastic Syndrome Subtypes Based on Protein Interaction Analysis. *Sci Rep.* 2019;9(1):12647. Published 2019 Sep 2. doi:10.1038/s41598-019-49084-2.
35. Chu LY, Peng YH, Weng XF, Xie JJ, Xu YW. Blood-based biomarkers for early detection of esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2020;26(15):1708-1725. doi:10.3748/wjg.v26.i15.1708.

