



SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÜREMİK SIÇAN DERİSİNDE FGF23 EKSPRESYONUN VE
FGFR1'İN HİSTOPATOLOJİK DEĞİŞİMLERİNİN
BELİRLENMESİ VE MİNERAL KONSANTRASYONU İLE
İLİŞKİLERİ**

Özge ÖZKAYNAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

SIVAS 2019

**T.C.
SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÜREMİK SIÇAN DERİSİNDE FGF23 EKSPRESYONUN VE
FGFR1'İN HİSTOPATOLOJİK DEĞİŞİMLERİNİN
BELİRLENMESİ VE MİNERAL KONSANTRASYONU İLE
İLİŞKİLERİ**

Özge ÖZKAYNAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. SEMA TULAY KÖZ

SİVAS 2019



“Üremik Sıçan Derisinde FGF23 Ekspresyonun ve FGFR1’in Histopatolojik Değişimlerinin Belirlenmesi ve Mineral Konsantrasyonu ile İlişkileri” adlı **Yüksek Lisans** Tezi, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Fizyoloji** Ana Bilim Dalında **Yüksek lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan Doç. Dr. Ercan ÖZDEMİR _____

Üye Dr.Öğr.Üyesi Gökhan ARSLAN _____

Üye (Danışman) Doç. Dr. Sema TULAY KÖZ _____

ONAY

Bu tez çalışması, Tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zübeyda AKIN POLAT
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MÜDÜRÜ

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 18.02.2015 tarihli ve 4/4 sayılı kararı ile kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna göre hazırlanmıştır.

Canım annem ve babama,



ÖZET

ÜREMİK SIÇAN DERİSİNDE FGF23 EKSPRESYONUNUN VE FGFR1'İN HİSTOPATOLOJİK DEĞİŞİMLERİNİN BELİRLENMESİ VE MİNERAL KONSANTRASYONU İLE İLİŞKİLERİ

Özge ÖZKAYNAK

Yüksek Lisans Tezi

Fizyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Sema TULAY KÖZ

2019, 93 sayfa

Amaç: Üremik sendromda birçok deri bulgusu görülmektedir. Deri bulgularının patogenezi tam olarak bilinmemektedir. FGF-23 üremide artan bir hormon ve üremik bir toksindir. FGF-23 ile deri bozuklukları arasında ilişki olabileceğine dair bulgular bildirilmiştir. Ancak üremide deri FGF-23 ekspresyonu ve FGF reseptör 1 (FGFR1) düzeyi konusunda bilgi eksikliği mevcuttur. Çalışmamızdaki amacımız, üremik sıçanlarda FGF 23 ekspresyonunu ve FGFR1 değişimlerini tespit etmektir.

Materyal ve Metot: Çalışmada erişkin erkek 16 adet Wistar Albino sıçan (12-16 haftalık, 290-310 gr ağırlığında) kullanıldı. Üremik grup (n=8) ve Sham grup (n=8) olarak iki gruba ayrılmıştır. Üremik grup Wistar Albino sıçanların böbreklerinin altında beşi cerrahi olarak eksize edilerek üremiye meyilli hale getirilmiştir. On dört hafta sonra sıçanlar feda edilerek biyokimyasal ve immunohistopatolojik incelemeler yapılmıştır. Verilerin istatistiksel analizleri bağımlı grup ortalamaları Wilcoxon Signed Ranks testi ile bağımsız grupların ortalamaları ise Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı ve anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

Bulgular: Deney sonunda Üremik Grubun kan üre nitrojen [(BUN), $55,2 \pm 8,9$] ve kreatinin düzeyleri ($0,69 \pm 0,08$) Sham Gruba göre (sırasıyla, $29,6 \pm 6,8$ ve $0,3 \pm 0,04$) istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur [Mann Whitney U testi (MWU), sırasıyla, $p = 0,002$ ve $p = 0,003$]. Üremik Grup da serum FGF23 düzeyi Sham Gruba göre daha yüksek ($53,5 \pm 20,9$ karşı $37,2 \pm 9,7$ MWU, $p = 0,072$), $1,25$ (OH)Vit D3 (Kalsitriol) ise düşüktür ($149,4 \pm 33,5$ karşı $213,8 \pm 43,8$, MWU, $p < 0,05$). Deride FGF-23 düzeyi Üremik Grup da Sham Gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($186,3 \pm 16,8$ karşı $148,9 \pm 25,9$, MWU, $p < 0,01$). Üremik grup da FGFR1

yoğunluğunun özellikle epidermis ve kıl foliküllerinde arttığı görülmüştür. Genel olarak, bütün deri elemanlarında, Sham Grup da FGFR1 ekspresyonu Üremik Gruba göre daha azdır.

Sonuç: Üremik sıçanların derisinde FGF 23 ve FGFR1 yoğunluğu artmıştır. Bu bulgunun patogenezdaki yeri ve klinik bulgularla ilişkisinin netleşmesi açısından ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Deri, FGF23, FGFR1, Kronik Böbrek Yetmezliği, Üremi



ABSTRACT

DETERMINATION OF FGF23 EXPRESSION AND HISTOPATHOLOGICAL CHANGES OF FGFR1 IN UREMIC RAT SKIN AND RELATIONSHIP WITH MINERAL CONCENTRATION

Özge ÖZKAYNAK

Master Thesis

Department of Physiology

Supervisor Assoc. Prof. Dr. Sema TULAY KÖZ

2019, 93 pages

Objective: Uremic syndrome shows signs of aged skin. The pathogenesis of these skin manifestations is unknown. The amount of FGF-23 increases in uraemia and it is known as a uremic toxin.

It was envisioned that there may be a relationship. However, there has been no information on the level of FGF-23 and expression of FGF receptor 1 (FGFR1) in uraemia. Our primary aim was to investigate FGF 23 and FGFR1 expression patterns in uremic rats.

Methods: Sixteen adult male Wistar Albino rats (12-16 weeks old, weighing 290-310 g) were used in the study. Uremic group (n = 8) and Sham group (n = 8) were divided into two groups. Uremic group Wistar Albino rats were surgically excised from five-sixths of the kidneys, making it prone to uremia. Fourteen weeks later, rats were sacrificed and biochemical and immunohistopathological examinations were performed. Statistical analysis of the data was performed by using Wilcoxon Signed Ranks test for dependent group means and Mann-Whitney U test for independent groups and the significance level was accepted as $p < 0.05$.

Results: The blood urea nitrogen [(BUN), 55.2 ± 8.9] and creatinine levels (0.69 ± 0.08) of Uremic group were compared to the those of Sham group (29.6 ± 6.8 and $0,3) \pm 0.04$, respectively). Statistically significant changes were recorded for the Uremic group samples [Mann Whitney U test (MWU), where $p = 0.002$ and $p = 0.003$]. Serum FGF23 levels in Uremic group were higher than Sham group (53.5 ± 20.9 versus 37.2 ± 9.7 MWU, $p = 0.072$), and 1,25 (OH) Vit D3 (Calcitriol) was lower ($149.4, 33.5, 213.8 \pm 43.8$, MWU, $p < 0.05$). The FGF-23 level in the skin was significantly higher in the Uremic group (186.3 ± 16.8 versus 148.9 ± 25.9 , MWU, $p < 0.01$). Furthermore,

widening of epidermis and hair follicles were observed in Uremic group. In general, FGFR1 expression in Sham group was significantly lower in all of the skin elements.

Conclusion: Concentrations of both FGF 23 and FGFR1 appeared to have increased in the skin of uremic rats. These findings need to be re-evaluated further in terms of the pathogenesis of uraemia on the basis of accumulated clinical evidence.

Keywords: Chronic Renal Failure, FGF23, FGFR1, Skin, Uremia



TEŞEKKÜR

Tez konusunun belirlenmesinde, çalışmaların planlanması ve yürütülmesi esnasında çok kıymetli destek ve yardımlarını gördüğüm, yapıcı tutumuyla motivasyonumu arttıran tez danışmanım hocam Doç. Dr. Sema TULAY KÖZ' e, yardımını ve desteğini hiç esirgemeyen Doç. Dr. Süleyman KÖZ hocama, çalışmamı destekleyen Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığına (CÜBAP) ve bölüm başkanımız sayın hocam Doç. Dr. Ercan ÖZDEMİR' e müteşekkirim.

Tez çalışmamın uygulama aşamasında bana olanak tanıyan Prof. Dr. Hasan ELDEN hocama, sevgili meslektaşlarım Fzt. Hacer Hicran ÖZTÜRK, Fzt. Selvi ÖZ ve Fzt. Mustafa KARAPINAR' a ayrıca hem akademik tecrübelerini hem de manevi desteklerini benden esirgemeyen Arş. Gör. Serap ÇETİNKAYA ve Arş. Gör. Özgül DOĞAN' a çok teşekkür ederim.

Çalışmamın sonuca ulaşmasında emeklerini esirgemeyen burada adını sayamadığım tüm çalışma arkadaşlarıma, tüm sağlık emekçilerine teşekkürü bir borç bilirim.

Sadece hayatımın bu döneminde değil her zaman yanımda olan bana sonsuz destek veren canımdan çok sevdiğim annem Leyla ÖZKAYNAK, babam Naci ÖZKAYNAK kardeşlerim Müge ÇELİK ve Çağrı ÖZKAYNAK' a teşekkür ederim. Ve hayatımın tadı tuzu Leyla Duru ile Çınar'a çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İÇKAPAK.....	i
ONAY.....	ii
YÖNERGE.....	iii
İTAF.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vii
TEŞEKKÜR	ix
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Böbrek.....	3
2.1.1. Böbrek Anatomisi.....	3
2.1.2. Böbrek İç Yapısı	3
2.1.3. Böbrek Komşulukları	4
2.1.4. Böbrek Damarları	5
2.1.5. Böbrek Dokusunun Mikroskopik Anatomisi.....	5
2.1.5. Böbrek Fizyolojisi	6
2.1.6. Glomerüler Filtrasyon	7
2.2. Böbrek Yetmezliği	9
2.2.1 Akut Böbrek Yetmezliği (ABY)	9
2.2.2.1. ABY Patolojisi	9
2.2.3 Kronik Böbrek Yetmezliği (KBY).....	10
2.2.3.1 Tanım	10

2.2.3.2 KBY nedenleri	12
2.2.3.3.KBY Prevelansı.....	12
2.2.3.4. KBY Fizyopatolojisi	13
2.2.3.5. Kronik Böbrek Yetmezliği Klinik Bulgular	13
2.2.3.6. Kronik Böbrek Yetmezliğinin Klinik Özellikleri	15
2.3. Üremik Sendrom	16
2.3.1. Kardiovasküler Sistem	17
2.3.2. Gastrointestinal Sistem	17
2.3.3. Anemi	18
2.3.4. Deri Bulguları.....	18
2.3.5. Kemik Bulguları	19
2.4. Kalsiyum-Fosfor Metabolizması	20
2.4.1. Kalsiyum	20
2.4.2. Fosfor	22
2.4.3. D vitamini	24
2.5. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF23)	27
2.5.1. Fibroblast Büyüme Faktörü 23 Yapısı ve Sentezi	27
2.5.2. FGF23 Reseptörleri.....	30
2.5.3.Klotho.....	31
2.5.4. FGF23 Etki Mekanizması	33
2.5.5. FGF23 ve Kronik Böbrek Yetmezliği	35
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	37
3.1. Deney Grupları	37
3.2. Cerrahi prosedür	39
3.3. Biyokimya testleri.....	40
3.4. SDS-PAGE ve Western blot analizi	41
3.4.1. Doku örneklerinin hazırlanması	41
3.4.2.Dokudan protein izolasyonu	41

3.4.3. Protein miktarının ölçümü	41
3.4.4. Örneklerin yükleme için hazırlanması.....	42
3.4.5. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE).....	42
3.4.6. Proteinlerin SDS-poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) yürütülmesi.....	42
3.4.7. Amonyum persülfat stok çözeltisinin (10 ml, %10'luk) hazırlanması	43
3.4.8. %10'luk SDS-PAGE jelinin (ayırma jeli) hazırlanması	43
3.4.9. %5' lik SDS-PAGE jelinin hazırlanması;	43
3.4.10. Örneklerin jele yüklenmesi ve elektroforez işlemi.....	43
3.4.11. Elektrobloklama (protein örneklerinin poli-viniliden florür membrana aktarılması). 44	
3.4.12. Proteinlerin işaretlenmesi.....	45
3.4.13. TBS (Tris-tuz 500 ml) çözeltisi	45
3.4.14. TBS-T (Tris-tuz-Tween20 100ml).....	45
3.4.15. Bloklama solüsyonu	45
3.4.16. Primer antikor çözeltisi	45
3.4.17. Sekonder antikor çözeltisi.....	46
3.4.18. Bloklama.....	46
3.4.19. Membran üzerindeki proteinin immünolojik gösterilmesi	46
3.4.20 Film çekimi	46
3.5. FGF23 ve 1,25 (OH) ₂ D ₃ 'ün ELISA ile tayini (Enzyme-linked immunosorbent assay).....	47
3.6. İmmünohistokimya	47
3.7. İstatistiksel analiz	48
4. BULGULAR	49
4.1. Serum 1,25(OH) ₂ D ₃ Düzeyleri.....	52
4.2. Serum FGF23 Düzeyleri.....	53
4.3. Deride FGF23 Düzeyi (Western Blot)	54
4.4. Deri İmmünohistokimya Bulguları	55
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	62
6.1. Sonuçlar	62

6.2. Öneriler	62
7. KAYNAKÇALAR.....	63
8.EKLER.....	73
9.ÖZGEÇMİŞ.....	74



TABLÖLAR DİZİNİ

- Tablo 1.** NKF-K/DOQI Sınıflandırmasına göre KBH evreleri
- Tablo 2.** Albüminüri Evreleri
- Tablo 3.** Molekül ağırlıklarına göre bazı üremik solütler
- Tablo 4.** Deney Grupları ve Sayıları
- Tablo 5.** Bakım süresince izlenecek laboratuvar takipleri
- Tablo 6.** Deney süresince planlanan tetkikler ve zaman çizelgesi
- Tablo 7.** Başlangıç Biyokimya Değerleri
- Tablo 8.** Derideki FGF Reseptör 1 Dağılımı

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.** Nefron Yapısı
- Şekil 2.** Kalsiyum ve fosfat homeostazının PTH, D vitamini ve FGF23 ile düzenlenmesi
- Şekil 3.** Fosfor metabolizması
- Şekil 4.** D3 vitamini (kolekalsiferol) ve D2 vitamini (ergokalsiferol) yapıları ve öncülleri
- Şekil 5.** D vitamini metabolizması
- Şekil 6.** Kalsiyum ve fosfat homeostazının regülasyonu
- Şekil 7.** İnsan FGF23 geni ve protein
- Şekil 8.** FGF filogenetik ağacı
- Şekil 9.** FGF23 regülasyonu ve aktivitesi
- Şekil 10.** Klotho Yapısı ve FGF23 Reseptörü
- Şekil 11.** FGF23 Regülasyonu ve aktivitesi
- Şekil 12.** Cerrahi prosedür öncesi hazırlık ve sonrası
- Şekil 13.** Elektroforez işlemi
- Şekil 14.** Protein örneklerinin Nitroselüloz Membrana Aktarılması ve SEMİ-Dry sistem
- Şekil 15.** ÜG, FGFR 1 ve hemotoksilen eozin boyaması
- Şekil 16.** SG, FGFR 1 ve hemotoksilen eozin boyaması
- Şekil 17.** ÜG ve SG'nin kan üre azotu (BUN) ve kreatinin değerleri
- Şekil 18.** ÜG ve SG'nin deney başlangıç ve son 1,25(OH) vit D düzeyleri
- Şekil 19.** ÜG ve SG'nin deney başlangıç ve son FGF23 düzeyleri
- Şekil 20.** FGF23'ün derideki ekspresyonu

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABY	: Akut böbrek yetmezliği
AT-2	: Anjiotensin 2
APS	: Amonyum Persülfat
BUN	: Kan Üre Azotu
Ca	: Kalsiyum
CaSR	: Kalsiyum duyarlı reseptör
DM	: Diyabetes mellitus
ELİSA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EPO	: Eritropoetin
FGF23	: Fibroblast Büyüme Faktörü 23
FGFR	: Fibroblast büyüme faktör reseptörü
GFR	: Glomerüler filtrasyon hızı
GİS	: Gastrointestinal sistem
HT	: Hipertansiyon
HRP	: Horseradish peroksidaz
KBY	: Kronik böbrek yetmezliği
KC	: Karaciğer
KDIGO	: Kidney Disease Improving Global Outcomes
Kr kl	: Kreatinin klirensi
MDRD	: Modification of Diet in Renal Diseases Study
MS	: Metabolik sendrom
NKF-K/DOQI	: National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
NO	: Nitrik oksit
P	: Fosfor
PTH	: Parathormon
PTHrP-R	: paratiroid hormonu ile ilişkili peptid reseptörü
RAS	: Renin anjiotensin sistemi
SDBY	: Son dönem böbrek yetmezliği
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel Elektroforezi
SG	: Sham Grup

TEMED	: Tetrametiletilendiamin
TBS	: Tris- tamponlu salin
TBS-T	: Tris- tuz- tween 20
TGF-β	: Transforming growth factor beta
TRPV5	: Transient receptor potential vanilloid 5
ÜG	: Üremik Grup
ÜR	: Üremik sendrom
H₂PO₄⁻	: Monovolan fosfat
H₂PO₄⁻²	: Divolan fosfat



1. GİRİŞ

Böbreklerin temel fonksiyonu, vücuttaki normal fizyolojik dengenin devamlılığını sağlamaktır. Bu hayati önem taşıyan dört fonksiyonu; ultrafiltrasyon, su ve elektrolitlerin taşınması, metabolik ve endokrin fonksiyonları olarak sıralanabilir (1). Dengedeki ortam idrar oluşumu ile sonlanır. Kronik böbrek yetmezliği, ilerleyici bir böbrek hastalığı varlığında, böbreğin metabolik ve endokrin fonksiyonlarının kalıcı kaybı olarak tanımlanabilir (2). Kronik böbrek hasarı kanda üre, ürik asit ve kreatinin gibi azotlu maddelerin birikimine yol açmakta ve üremi tablosu ortaya çıkmaktadır (3). Üremi; kronik böbrek yetmezliğinin neden olduğu tüm klinik ve biyokimyasal anormallikleri içeren bir deyimdir ve birçok kaynakta kronik böbrek yetmezliği ile eş anlamda kullanılmaktadır. GFR'deki azalma böbreğin metabolik, endokrin fonksiyonlarında bozukluğa ve vücutta sıvı-solut dengesizliğine neden olmaktadır. Tüm bunlar kliniğe üremik belirtiler olarak yansımaktadır (4). Üremik deri hastalıklarının patogenezinde birçok faktörün sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür. Tüm bu bulguların oluşumunda üremik toksinlerin merkezi bir rolü vardır. Üremik hastalarda dermal mast hücrelerinin sayısı artmakta ve ağır vakalarda yüksek triptaz ve histamin plazma konsantrasyonları bildirilmektedir. Histamin salımı, kaşıntı hissine karışan bir nörotransmitter olan P maddesi ile tetiklenir (5). Fibroblast büyüme faktörü 23 (FGF23), esas olarak osteoblast ve osteositlerden salgılanır ve FGF23'ün hedef organı esas olarak böbreklerdir. Genel olarak, metabolizma, hücre gelişimi ve onarımıyla ilgili fonksiyonları vardır (6). FGF23, 1,25 (OH)₂ vitamin D (kalsitriol) sentezini azaltır. Kronik böbrek yetmezliğinde, GFR azaldıkça, böbrekten fosfat atılımı azalır, hiperfosfatemi görülür, FGF23 düzeyi yükselir, kalsitriol düzeyi azalır, kalsiyum düzeyi azalır ve paratiroid hormon düzeyi yükselir. FGF23'ün, fosfat ve kalsitriol düzeylerini düşürmek dışında da etkileri olduğu gösterilmiştir. FGF23 eksikliği, insanlarda, deri dâhil olmak üzere birçok yumuşak dokuda kalsifikasyona yol açmaktadır. FGF23 eksikliği oluşturulan sıçanların derilerinde erken yaşlanma bulguları görülmüştür. Bu bulgulardan, FGF23 etkilerinin vitamin D aracılığıyla oluştuğu sonucu çıkarılmıştır (7).

Klotho, yaşlanmayı geciktiren bir moleküldür (8). α -Klotho eksikliğinde, memeli yaşlanmasının özelliklerinin görüldüğü bildirilmiştir (9). Doku proteininin antioksidan, antiapoptotik, damar koruyucu ve damar oluşturucu özellikleri bildirilmiştir (10-14). α -Klothonun epidermal hücrelerde, yağ bezleri ve kıl

foliküllerinde yoğun biçimde ortaya çıktığı bildirilmiştir (15). α -Klotho eksikliğinde deri atrofisi de dâhil olmak üzere yaşlanma belirtileri görülmektedir. α -Klotho eksikliği FGF23 rezistansına yol açmakta ve bulgular FGF23 eksikliğini taklit etmektedir (6). Dört çeşit FGF reseptörü mevcuttur. FGF23, 1, 3 ve 4 olarak adlandırılan alt tipleri aktive edebilir; reseptörünü aktive etmesi için α -Klotho'ya ihtiyaç vardır. Böbrekteki etkiler için FGFR1 ve Klotho etkileşiminin ön planda olduğu bildirilmiştir (6). FGF23 normal deride eksprese olmaktadır. FGF23'ün, doku/organlara has etkilerinin ortaya çıkması, o dokulardaki Klotho ve FGF reseptörlerinin birlikte ekspresyon düzeyleriyle ilişkilidir. Kronik böbrek hastalarında FGF23 konsantrasyonu, GFR düşükçe artar ve son dönem böbrek yetmezliğinde, normalin 1000 katına kadar çıkabilir (16,17). FGF23 bir üremik toksin olarak değerlendirilmektedir; yapılan çalışmalarda sol ventrikül hipertrofisi, arteriyel sertlik ve kardiyovasküler mortalite ile ilişkili bulunmuştur (18,19). FGF23 yüksek olduğu halde yaşlılık bulguları görülmektedir. Bu konuyla ilgili net bir açıklama henüz yoktur.

Bu araştırmanın amacı, üremide görülen deri bulgularının patofizyolojisini açıklamak ve deri mineral konsantrasyonu arasındaki ilişkileri araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

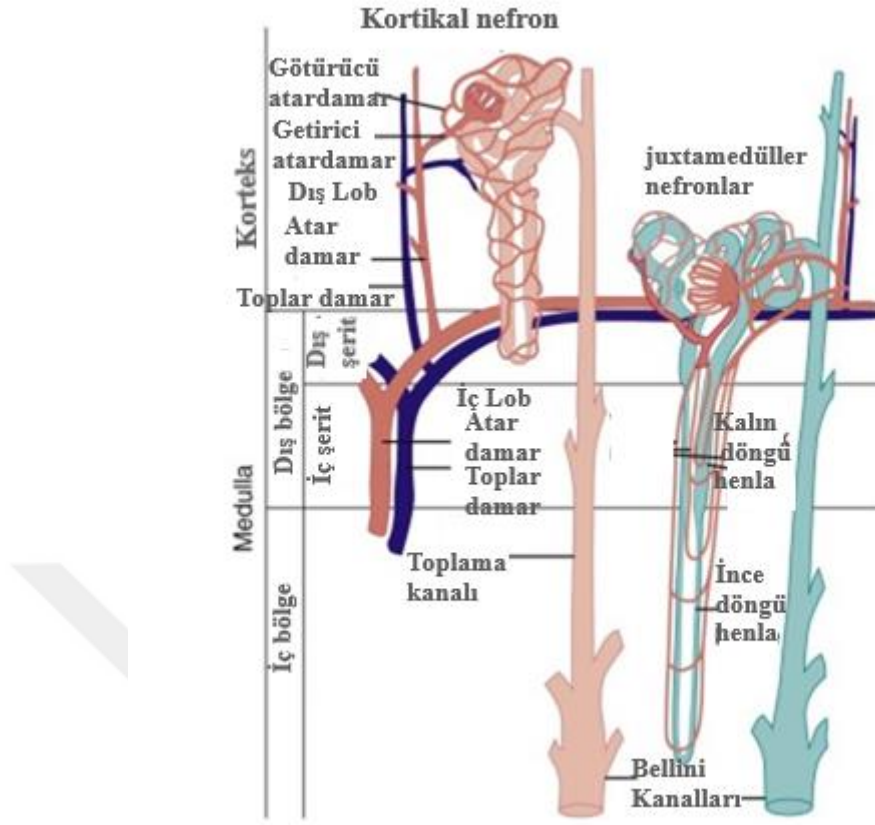
2.1. Böbrek

2.1.1. Böbrek Anatomisi

Böbrekler periton dışı bölgede kahverengi görünümdeki bir çift organdır. Karın arka duvarında omurganın (kolumna vertebralisin) iki yanında ve psoas kasının dış yanında bulunmaktadır. Logitudinal olarak yaklaşık 3 omur uzunluğunda olup genellikle 12. torakal vertebra ile 3. lomber vertebra seviyeleri arasında uzanmaktadır. Sağ böbrek, üst komşusu karaciğer nedeniyle biraz daha aşağıdadır (20). Bir insanın her böbreği yaklaşık 150 gram ve bir yumruk büyüklüğündedir. Her böbreğin iç kısmında, böbrek atar ve topar damarlarının, lenfatiklerinin, sinirlerinin ve idrarın böbrekten boşaltılana kadar beklediği yer olan mesaneye taşıyan üreterlerin girip çıktığı hilum adı verilen bir bölge bulunur. Böbrekler sert ve fibröz bir kapsül ile çevrilidir (21). Böbreğin etrafını tamamen saran fibröz kapsül de perirenal yağ dokusu olarak da adlandırılan yağ (adipoz) kapsülü çevreler.

2.1.2. Böbrek İç Yapısı

Böbrek içi medulla ve dışı korteks olarak ikiye ayrılır (Şekil 1). Böbrek medullası, tabanı periferik ve apeksi renal sinüs ile birleşen soluk, çizgili, koni şeklinde piramitlerden oluşur. Böbrek sinüsleri de, papilla olarak kaliks dönüşürler (22). Böbrek korteksi; böbreğin en dış kısmında daha koyu renkli görünen katmandır. Burada glomerül denilen kapiller yumaklar ağlar bulunmaktadır. Glomerüller kapillerler ise Bowman kapsülü denilen ve proksimal tübülün genişlemiş son kısmı olan yapıya gömülü halde olup, bu ikisinin (Glomerüller kapillerler ve Bowman kapsülü) birlikte oluşturduğu yapıya Malpighi cisimciği ismi verilmektedir. Bir böbrekte yaklaşık olarak 1 milyon glomerül vardır. Böbrek medullasında piramid şeklinde 12-18 adet yapı olarak görülür. Pyramis adı verilen bu piramidler minör kaliks denilen 8-20 adet diğer yapılara açılır. Papilla ise pyramislerin minör kalikslere açıldığı yerlerdir. Pyramislerin medulla alanlarındaki uzanan korteks kısımlarına Bertini kolonları denir. Glomerül görülmeyen medulla, aslında glomerüllerin uzantısı tübüllerden oluşmuştur. Medullanın kan akımı kortekse göre çok daha az olduğundan hasara oldukça duyarlıdır (20).



Şekil 1. Nefron yapısı (23).

2.1.3. Böbrek Komşulukları

Sağ ve sol böbrekler oldukça benzer yapılarla komşudur. Sağ böbrek üst kutbunda suprarenal bez ile temastadır. Bunun altındaki periton tabakasıyla ayrılan geniş bir alan ile karaciğerin sağ lobuyla ilişkilidir. Dar bir iç alanda duodenumun periton dışı da desenden kısmı ile direkt olarak ilişkilidir. Daha alt olarak, ön yüzey, periton dışı fleksura koli dekstra ile dış yandan doğrudan temas eder ve periton içi ince bağırsakların bir kısmı ile içten temas eder (22). Sağ böbrekte olduğu gibi sol böbrek de üstten, sol suprarenal bezle ilişkilidir. Sol böbreğin ön yüzeyinin lateral yarısı, periton tabakası ile ayrılan dalakla temastadır. Santral olarak, retroperitoneal pankreas ve splenik damarlarla direkt temas halindedir. Bunun üzerinde, dalak ve suprarenal bölgeler arasındaki küçük bir bölgede, periton tabakasıyla ayrılan, mide ile komşuluk halindedir. Pankreas ve splenik (dalak) alanların altında, doğrudan retroperitoneal fleksura koli sinistra ve kolon desenden'in başlangıcı ile doğrudan komşudur. Geniş içten bir alan jejunumun periton içi kıvrımlarıyla ilişkilidir. Gastrik bölge, omental bursa ile kaplıdır, splenik ve jejunal alanlar peritonu ile örtülüdür. Jejunal bölgeyi

örtün peritonun posteriorunda, sol kolik damar dalları böbrek ile komşuluk yapar. Böbreklerin arka-iç yüzeyi yağ içerisine gömülü olarak bulunur ve peritonla kaplı değildir (22).

2.1.4. Böbrek Damarları

Böbrek atar damarı (arteri), birinci lumbal vertebra seviyesinde arteria mezenterika superior'un hemen altından aorta abdominalis'den ayrılarak genellikle tek bir arter olarak 90°'lik açıyla ayrılır ve renal sinüslerden böbreğe ulaşır. Anatomik pozisyonundan kaynaklı sağ renal arter sola göre daha uzundur ve böbrek parankimine girdikten sonra anterior ve posterior dallara ayrılıp daha sonra üç lob damarlarına ayrılırlar.

Renal venler ise arterlerin önünde bulunmaktadır. Arterin aksine sol renal ven sağa göre 3 misli daha uzundur (yaklaşık olarak sol 7,5, sağ 2,5 cm). Bu iki ven de vena cava inferiora açılırlar (20).

2.1.5. Böbrek Dokusunun Mikroskopik Anatomisi

Bir böbrekte yaklaşık olarak 800.000-1.000.000 nefron bulunur ve her biri idrar yapımında görevlidir. Hayati önemlerine rağmen böbrekler nefronları yenileyemez. Bu sebeple, hastalık veya normal yaşlanma ile birlikte nefron sayısı giderek azalır. Nefron sayısı her 10 yılda bir yaklaşık yüzde 10 azalır (40 yaşından sonra). Yani 80 yaşına gelindiğinde, birçok insan 40 yaşında sahip olduğundan yüzde 40 daha az işlevsel nefrona sahiptir. Her nefronun glomerüler kapiller ve tübül olmak üzere iki temel bölümü vardır. Kandan büyük miktarda sıvının filtre edildiği "glomerüler kapiller" (glomerüler) ve böbrek pelvisi içindeki yolu boyunca, filtre edilen sıvının idrara dönüştüğü bir uzun "tübül" olarak kısaca ifade edilebilirler. Glomerüler, yaklaşık 60 mm Hg'lik yüksek (diğer kılcallarla kıyaslandığında) hidrostatik basınca sahiptir. Glomerüler, Bowman kapsülü ile sarılmıştır ve kılcal damarları, epitel hücreleri ile kaplanmıştır. Glomerüler kılcal damarları tarafından süzülen sıvı, sırası ile önce Bowman kapsülüne ve sonra böbreğin korteksinde bulunan proksimal tübül içine doğru akar. Sıvı buradan renal medullanın derinliklerine doğru inen Henle kulpuna doğru akar. Her Henle kulpunun bir inen ve bir de çıkan kolu bulunur. İnen kolun ve çıkan kolun alt uçlarının duvarları çok incedir ve bu nedenle ince kısım olarak adlandırılır. Henle kulpunun inen kolu kortekse geri döndükten sonra, duvarı kalınlaşır ve bu kısım inen kolun kalın kısmı olarak adlandırılır. Kalın çıkan kısmın sonunda, duvarında özel epitel hücre plakasına "makula densa" adı

verilir. Makula densa'nın önemli görevi nefron fonksiyonunun kontrolünü sağlamaktır. Buradan sonra sıvı proksimal tübül gibi renal korteksin içinde bulunan distal tübüle, ardından birleştirici tübüle geçer ve daha sonra da kortikal toplayıcı tübül ile devam eder. 8-10 kortikal toplama kanalının başlangıç kısımları, medullaya doğru aşağı akan ve medüller toplama kanalı haline gelen daha büyük bir toplama kanalı oluşturmak için bir araya gelir. Bu toplayıcı kanallar, renal papillaların uçları yoluyla sonunda renal pelvis içine boşalan, giderek büyüyen kanallar (yaklaşık 4000 nefrondan idrar toplayan 250 kadar) oluşturmak üzere birleşir (21).

Böbreğin yapısı ve her bir birimin fonksiyonu aşağıdaki maddeler şeklinde sıralanabilir:

1) Renal Kapsül: Böbreği dıştan çevreleyen zar; ince fakat sağlam ve lifli yapıdadır. 2) Renal Korteks: Kortikal yapıların uzantılarını içeren böbreğin dış bölgesi, yaklaşık olarak bir milyon nefron içerir. 3) Medulla: 8-12 renal piramit içeren böbreğin iç bölgesidir; bu piramitler kalikse boşalır. 4) Medüller Piramitler: Toplama kanallarının oluşturduğu böbreğin iç kısmı. 5) Nefron: Böbreklerdeki filtrasyonun gerçekleştiği birimleridir. 6) Renal Arter: Aorttan ayrılan dallar, nefron içinde süzülme üzere böbreğe atık kanı getirirler. 7) Renal Ven: Filtrelenmiş kan böbreklerden vena cava inferior'a ulaştırırlar. 8) Renal Kaliks: Renal pelvisin uzantısıdır; idrarı piramitlerden renal pelvise ulaştırırlar. 9) Renal Pelvis: Nefrondan idrar toplayan ve üst uca doğru daralan ve üretere bağlanan yapı. 10) Üreter: Böbrek pelvisinden mesaneye süzüntüyü ve idrarı ulaştırır (24).

2.1.5. Böbrek Fizyolojisi

Vücut sıvı ve elektrolit dengesini korumak böbreğin temel hayati görevidir. Aynı zamanda metabolizmanın atık ürünlerini uzaklaştırmak, vitamin D aktivasyonu ve eritropoetin yapımı diğer önemli fonksiyonlarıdır.

Sağlıklı bir insanda tam fonksiyonlarını yerine getirebilen böbrek; metabolik atık ürünleri ve yabancı kimyasalların atılması, su ve elektrolit dengelerinin düzenlenmesi, vücut sıvı ozmolalitesi ve elektrolit konsantrasyonlarının düzenlenmesi, arteriyel basıncın düzenlenmesi, asit-baz dengesinin düzenlenmesi, eritrosit üretiminin düzenlenmesi, hormonların salgılanması, metabolizması ve atılımı ve glukoneogenez gibi bir çok görevi üstlenir (21).

Bu görevlerini böbrek; glomerüler ultrafiltrasyon, tübüler geri emilim ve sekresyon işlemleri ile gerçekleştirir.

2.1.6. Glomerüler Filtrasyon

Glomerüler kılcal damarlardan büyük miktarda sıvının Bowman kapsülüne her gün yaklaşık olarak 180 litre süzülmesi idrar oluşumundaki ilk basamaktır. Oldukça değişken olmakla birlikte bu süzüntünün büyük bölümü, her gün sadece 1 litre sıvı atılması için tekrar emilir. Yüksek glomerüler filtrasyon hızı, yüksek oranda böbrek kan akışına ve ayrıca glomerüler kılcal membranların özelliklerine bağlı olarak gerçekleşir (25).

Karşılıklı olarak kılcal duvar boyunca uygulanan kuvvetlerin net sonucu glomerüler filtrasyonu oluşturur. Glomerüler kılcal hidrostatik basınç (ultrafiltrasyon kuvveti), afferent ve efferent arteriyollerin tonusuyla sistemik arteriyel kan basıncındaki değişikliklerin adaptif bir sonucudur. Esas ultrafiltrasyon kuvvetine neden olan, kılcal damar içindeki plazma proteinlerinin yüksek konsantrasyonu ile Bowman kapsülündeki neredeyse protein içermeyen ultrafiltrat arasındaki oluşturulan onkotik basınçtır. Glomerüler plazma akışı, Bowman'ın alanı içindeki hidrostatik basınç veya glomerüler kılcal duvarın geçirgenliği bunu değiştirebilir (26).

Proteinlere, glomerüler kılcal damarlar da nispeten geçirimsizdir, bu nedenle normal koşullarda filtrelenen sıvı protein içermez ve eritrositler de dâhil olmak üzere hücresel elemanların da görülmesi beklenemez. Organik moleküllerin ve çoğu tuzun plazmadaki konsantrasyonları glomerüler filtrattaki konsantrasyonları ile benzerdir. Bu genellemenin istisnaları da vardır. Bu istisnalara örnek kalsiyum (Ca) ve yağ asitleri gibi serbestçe süzülmeleyen birkaç düşük moleküler ağırlıklı madde sayılabilir. Ca ve yağ asitleri plazma proteinlerine kısmen de olsa bağlanır. GFR'yi belirleyen esas mekanizma; kılcal zarı boyunca etki eden hidrostatik ve ozmotik kuvvet dengesi, kılcalların geçirgenliği ve filtrelenen yüzey alanının ürünü olan kılcal filtrasyon katsayısıdır (K f). GFR'nin yaklaşık değeri 125 ml / dak veya 180 L / gündür. Böbrek boyunca akan plazmanın yaklaşık 1/5'i glomerüler kılcal damarlardan filtre edilir. Filtrelenen filtrasyon fraksiyonu ortalama 0,2'dir.

Bunların sonucu olarak süzme oranının hesabı "Filtrasyon fraksiyonu = GFR / Böbrek Plazma Akımı" şeklinde yapılır (25).

GFR elbette çocuklarda ve erişkin insanlarda farklıdır. Bu farkı karşılaştırmak için, GFR vücut yüzey alanı kullanılır. "İdeal" 70 kg'lık bir yetişkin için 1,73 m² standardize edilmiştir. Bir çocuğun GFR değeri 3 yaşına kadar erişkin değerlerine yaklaşmaz. GFR'nin değerini tahmin etmede, serum kreatinin seviyesi kullanılabilir. Kreatinin, kasta enerji kaynağı olarak görev yapan bir kreatin fosfat metaboliti olarak

türetilir. Üretimini belirli sınırlar içinde tutulması oldukça önemlidir ve atılımı, öncelikle glomerüler filtrasyondan geçmesi böbrek yetmezliğinde serum kreatinin değerinin önemini arttırır. Serum kreatinin seviyesi, kas kütlesi ve glomerüler fonksiyon seviyesinden etkilenir. Kan üre azotu ise hidrasyon durumundan ve azot dengesinden etkilenir (26).

Böbrek yetmezliğinde tübüler sekresyon daha önemli duruma gelen kreatinin üretimi normal şartlarda öncelikle kaynak maddenin miktarına, ekskresyonu ise öncelikle glomerüler filtrasyona bağlıdır. GFR normalin %70'inin altına inmedikçe serum kreatinini yükselmez. Akut böbrek yetmezliğinin (ABY) erken döneminde veya anüride böbrek fonksiyonları bozuk olduğu halde serum kreatinini normal olabilir (27).

Serum üre ve kreatinin düzeylerinin kullanılmasına rağmen GFR'nin belirlenmesinde daha sıklıkla üre ve kreatinin klirensi kullanılır.

1. 24 saatlik idrarda; Kreatinin klirensi (Kr kl) (ml/dk)= İdrar kreatinin(mg/dl) x Günlük idrar hacmi (ml)/ Serum Kreatinin (mg/dl) x 1440
2. Yaş, cinsiyet ve vücut ağırlığının dikkate alındığı serum kreatinin değerleri kullanılarak

GFR hesaplama formülleri geliştirilmiştir. Bazı durumlarda pratikte idrar kreatinini ölçmek her zaman mümkün olamayabilir, bu formül ile kan kreatinini ile GFR hesaplanabilmesinde kullanılır.

Cockroft - Gault formülü:

Erkekler için; $Kr\ kl = ((140 - \text{yaş}) \times \text{vücut ağırlığı}) / (\text{serum kreatinin} \times 72)$,

Kadınlar için; $Kr\ kl = ((140 - \text{yaş}) \times \text{vücut ağırlığı}) / (\text{serum kreatinin} \times 72) \times 0,85$.

Hesaplama yapılırken yaşın yıl cinsinden, vücut ağırlığının kilogram cinsinden, serum kreatininin ise mg/dl cinsinden ifade edilmesi gerekir ve bulunan kreatinin klirensinin birimi ml/dk olarak belirlenir.

3. Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) formülü kullanılarak hesaplanan GFR Cockroft-Gault formülü ile hesaplanan değere göre daha düşük bulunur.

$GFR = 186 \times (\text{serum kreatinin(mg/dl)})^{-1,154} \times (\text{yaş})^{-0,203} \times 0,742$ (kadın ise) $\times 1,21$ (siyah ırktan ise) (28).

2.2. Böbrek Yetmezliği

2.2.1 Akut Böbrek Yetmezliği (ABY)

Akut böbrek yetmezliği genellikle geri dönüşümlü olarak glomerüler filtrasyon hızında (GFR) azalma olarak tanımlanır. Akut olarak başlayan, 24 saatlik idrar miktarının, çoğu hastada 400 ml altına düşmesi ve kanda üre – kreatinin yükselmesiyle karakterize bir sendromdur.

ABY'nin klinikte derecesini belirlemek için son günlerde RIFLE (RISK, INJURY, FAILURE, LOSS, ENDSTAGE RENAL DISEASE) ölçeği bulguları yaygın olmasa da kullanılmaktadır. Risk' de 1,5 misli, injury' de 2 misli, failure' da 3 misli yükseliş vardır. GFR, sırasıyla %25, %50, %75 düşmektedir. İdrar miktarında 750/gün altına kademeli iniş vardır. Loss'da böbrek fonksiyonları 4 haftadan, Endstage' de ise 3 aydan uzun tam olarak kaybolmuştur. Oligüri (günlük 400ml altındaki idrar) olmasa dahi akut olarak plazma kreatininin yükselmesi, akut böbrek yetmezliği için iyi bir belirteçtir (1).

ABY sendromu klinikte üç tablo olarak gözlenebilir. (prerenal, intrinsek-renal ve postrenal)

- 1) Yapısal ve fonksiyonel olarak normal olan nefronlarca hipotansiyon ve şiddetli volüm deplesyonuna verilen adaptif bir yanıt olarak
- 2) Renal yapı ve fonksiyonu anormal olan böbreklerin sitotoksik maruziyetine cevap olarak
- 3) İdrarın akım pasajı bloke olduğunda,

Akut böbrek yetmezliğine en sık yol açan nedenleri prerenal, renal ve postrenal olarak inceleyebileceğimiz gibi iskemik ve toksik olarak iki büyük grupta da inceleyebiliriz. İskeminin süresi ve şiddeti oldukça önemlidir. Hayvan deneyleri, 60 dakikadan fazla süren renal arter tıkanmalarının akut tübüler nekroza yol açtığını göstermiştir (29).

2.2.2.1. ABY Patolojisi

Vazomotor bir nefropati olan akut renal yetersizlikte kortikal vazokonstriksiyonla beraber tubuluslarda oluşan (genellikle proksimal tubulus ve henle kulpunda medüller çıkan kısımda) lezyonlar; iyileşebilen hücre hasarından, apoptozis (hücrenin programlı ve telafi edilebilir ölümü) ve tubuler nekroz (hücrenin patolojik ve telafi edilemeyen ölümü)dan oluşmaktadır. Klinikteki seyir ve prognoz bu patoloji türleri ile ilgilidir. Ayrıca akut tubuler nekrozda; idrarda interlökin 18 serum ILG ve böbrek hasarı molekülleri (ELAM1, TNF alfa v.s.) endotelial adezyon

molekölü tümör nekrotizan faktör, ince laboratuvar metotları ile ortaya konulabilmektedir. Akut tubuler nekrozda hipovolemi veya efektif ekstrasellüler sıvı volümü düşüklüğe veya nefrotoksik nedenlere bağlı olarak oligürinin patogenezi iki ana nedene bağlanabilir. Bu nedenler vasküler faktör (glomerüler vazospazm) ve tubuler faktör (hücre hasarı, hücre apoptoz ve nekrozuna bağlı tubuler obstrüksiyon ve sıvının peritubuler bölgeye fazla geri kaçıışı ve tubülüs hücrelerinin şişmesi) olarak adlandırılabilir (29).

2.2.3 Kronik Böbrek Yetmezliği (KBY)

2.2.3.1 Tanım

Kronik böbrek yetmezliği (KBY), GFR’de ve histopatolojik olarak çeşitli hastalıklara bağlı olarak nefronların progresif, geri dönüşü mümkün olmayan kaybı ile kendini gösteren bir sendromdur. GFR, çoğunlukla yıllar içinde giderek azalır ve bu azalma, sürekli ve belirti vermeden son dönem böbrek yetmezliğine (SDBY) kadar ilerleyebilir (30). KBY, Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) 2012 kılavuzunda belirtildiği üzere böbrek yapısında ve fonksiyonunda hasar olması, bu değişikliğin bireyin sağlığına etki etmesi ve 3 aydan uzun sürmesidir. Bu tanımlamaya göre böbrek hasarını gösteren bulgular ise GFR’nin 60ml/dk/1,73 m² den düşük olması, idrar sediment bozuklukları, tübüler bozukluklara bağlı elektrolit bozuklukları, histolojik olarak normal yapıya göre değişikliklerin belirlenmesi, görüntüleme yöntemlerinde böbrek yapısında anormallik gözlenmesi, hastanın böbrek nakli öyküsü olması ve albüminüri olarak sıralanabilir.

KBY, 5 evre ile American National Kidney Foundation’s Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (NKF-K/DOQI), GFR’ye göre değerlendirilebileceğini önermektedir (Tablo 1) (31).

Tablo 1. NKF-K/DOQI Sınıflandırmasına göre KBH evreleri (31).

EVRE	GFH (ml/dk/1,73 m ²)	Tanım
1	≥90	Normal ya da yüksek GFH'li böbrek hasarı
2	60-89	Hafif azalmış GFH'li böbrek hasarı
3	30-59	Orta azalmış GFH'li böbrek hasarı
4	15-29	Ağır azalmış GFH'li böbrek hasarı
5	<15 veya diyaliz	Kronik Böbrek Yetmezliği

Tablo 2. Albüminüri Evreleri (31).

Albüminüri Evresi	AAH (mg/gün)	Terminoloji
A1	<30	Normal-Hafif Artmış
A2	30-30	Orta Artmış
A3	>300	Ciddi Artmış

Kronik Böbrek Yetmezliği Tarama Yöntemleri

1. Serum üre, kreatinin ölçümü dolayısıyla glomerüler filtrasyon hızının saptanması
2. Düzenli olarak idrar analizi
3. İdrarda mikroalbumin ve protein tayini
4. USG ve diğer görüntüleme yöntemleri
5. Serum sistatin-C ölçümü

2.2.3.2 KBY nedenleri

KBY, en sık nedenleri sistemik hastalıklar olan diabetes mellitus (DM) ve hipertansiyon (HT) veya glomerülo nefrit, kistik böbrek hastalığının komplikasyonu olarak da gelişebilmektedir. DM, KBY'nin %35,87'lik oranla en sık karşılaşılan nedenidir. Diyabetik hastaların 20 yıldan uzun süreli takibi boyunca %20-40'ında böbrek hastalığı gelişebilmektedir. Hem Tip I hem de Tip II DM hasta sayısının tüm dünyada yapılan araştırmalarda arttığı göz önüne alındığında, DM' ye bağlı KBY' nin artabileceği global bir sorundur. Tip II DM' de KBY gelişebilme riski genellikle daha fazladır. HT, erişkinlerde %25'lik bir oranla KBY' nin DM' den sonra ikinci en çok rastlanılan sebebidir. Ancak bazı gelişmekte olan ülkelerde, gelişmiş ülkelerdekine aksine, daha genç hastalarda glomerülo nefrit ve idiopatik durumlar etyolojide DM ve HT' ye karşın daha sık rol oynamaktadır. Bu duruma örnek olarak bazı Orta Asya ülkelerini kapsayan bir çalışmada KBY' li hastaların neredeyse yarısında DM veya HT tespit edilememiştir. Ülkemizde, Türk Nefroloji Derneği 2014 registry raporuna göre, hemodiyalize giren hastalarda ilk üç neden: DM, HT ve glomerülo nefrit olarak sıralanırken, periton diyalizine giren hastalarda, birinci HT, ikinci DM ve üçüncü olarak glomerülo nefrit olarak sıralanmaktadır. KBY konusunda tüm dünyayı kapsayan bir registry ve rapor sistemi olmadığından net bir tablo çizilememektedir (20).

2.2.3.3.KBY Prevelansı

KBY tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de oldukça önemli ve hayati bir halk sağlığı problemidir. Chronic Renal Disease in Turkey (CREDiT) değerlendirmesine göre KBY prevelansı erişkin popülasyonda %15,7'lik bir farkla, kadınlarda erkeklerden anlamlı olarak daha sık görülür. KBY olan kişilerin çoğunluğu evre 1-3 arasındadır, KBY evre 1, 2, 3, 4 ve 5 prevelansı sırasıyla %5,4, %5,2, %4,7, %0,3 ve %0,2'dir. KBY sonucu diyaliz tedavisine ihtiyaç duyan hasta sayısı ise 69.815 olarak tespit edilmiştir. CREDiT'e göre KBY hastalarında HT prevelansı %32,7, DM prevelansı %12,7, dislipidemi prevelansı %76,3, obezite prevelansı %20,1 ve metabolik sendrom (MS) prevelansı %31,3 olarak sıralanmıştır. Ülkemizde KBY' nin hayati açıdan oldukça önemli bir sorun olduğunun göstergesi olarak kabul edilebilir (32).

2.2.3.4. KBY Fizyopatolojisi

KBY'nin fizyopatolojisini açıklayabilmek için, böbrek kitlesindeki uzun süreli kayıp sonucu ortaya çıkan ve progresyona bağlı olarak ilerlemeye yol açan mekanizmaları açıklamamız gerekir. Böbrek kitlesindeki azalmanın sebep olduğu böbrek fonksiyon kaybı, geride kalan nefronlar ile karşılanmaya çalışılır. Bu durum başlangıçta adaptif cevap olarak oluşan hiperfiltrasyon, glomeruler kapiller basıncın ve glomeruler akımın artması ile sonuçlanır. Bu değişiklikler nefronda skleroza zemin hazırlayan bozulmuş uyum cevaplarının başlamasına neden olur (30). Belirgin proteinüri ve progresif sistemik hipertansiyon başlangıcı, glomeruler basınç artışının kapiller hasarlanmaya, fokal ve segmental glomeruloskleroza ardından global glomeruloskleroza dönüşmesiyle olur. Bu da beraberinde renin anjiotensin sisteminin (RAS) de artmış aktivitesini getirir ki bunun da hem başlangıçtaki hiperfiltrasyona hem de daha sonra oluşan hipertrofi ve skleroza katkısı olur. Anjiotensin 2 (AT-2)'nin transforming growth factor beta (TGF- β) gibi büyüme faktörlerini uyarma etkisi dışında doğrudan inflamatuvar ve fibrinojenik etkisi yoluyla da yapmaktadır. Nefron kaybının hızlanmasına katkıda bulunan diğer bir mekanizma da tubülointerstiyel fibrozistir.

Progresif böbrek hasarının oluşmasında önem taşıyan diğer faktörler; sistemik HT, nefrotoksinler, azalmış böbrek kanlanması sekonder akut hasarlanmalar, proteinüri, iç hasara bağlı olarak böbrek amonyak sentezindeki artış, kalsiyum (Ca)-fosfat(P) birikimi, nitrik oksit (NO) düzeylerinde azalmadır (33).

2.2.3.5. Kronik Böbrek Yetmezliği Klinik Bulgular

KBY'nin derecesi ve progresyonu hastaların klinik semptom ve bulguları ile değerlendirilir. Genellikle noktüri ve anemiye bağlı halsizlik hastaların ilk semptomları arasında sayılabilir. Ancak hastalarda glomerüler filtrasyon değeri 35-50 ml/dakikanın altına inmedikçe hastalarda semptom görülmebilir. GFR 20-25 ml/dakika olduğunda ise hastada üremiye bağlı semptomların ortaya çıkması beklenir. GFR 15 ml/dakika olduğunda son dönem böbrek hastalığı (SDBY) ifadesi kullanılmaya başlanır ve hastalar için hemodiyaliz, renal transplantasyon ve periton diyalizi gibi renal replasman tedavileri elzem hale gelir (34).

KBY'nin belirtileri sonuç olarak tüm sistemleri etkilemektedir. Bunun sebebi olarak sıvı- elektrolit ve asit-baz dengesi bozuklukları ve protein yıkım ürünlerinin kanda artması gösterilebilir. KBY ile çoğu kaynakta eş anlamlı kullanılan üremik

sendrom; hastalarda bazı özel semptomlar görülmesine rağmen birçok sistemin bozukluğundan kaynaklanmaktadır. Üremik sendrom ayrıca idrarda normalde atılan son ürünlerin kanda birikmesinden kaynaklanan anormallikler olarak kabul edilebilir. Esasen “üremik sendrom” daha ilerlemiş böbrek yetmezliğinin ileriki evrelerinde ortaya çıkan kompleks çoklu organ bozukluğundan kaynaklanan klinik belirtiler toplamıdır.

Üremik sendrom tüm sistemleri etkileyen işlevsel bozukluklara neden olur. Üremik sendromun oluşumundaki temel nedenler, normalde renal atılıma uğraması gereken protein metabolizma ürünlerini içeren toksinlerin birikimi, buna bağlı sıvı ve elektrolit dengesi bozulması, hormonal fonksiyonların bozulması, ilerleyici sistemik inflamasyon ve onun vasküler ve nutrisyonel sonuçları olarak özetlenebilir (35).



2.2.3.6. Kronik Böbrek Yetmezliğinin Klinik Özellikleri

Kronik böbrek yetmezliğinin klinik özellikleri şöyle sıralanabilir (34).

SIVI-ELEKTROLİT BOZUKLUKLARI	Hipovolemi, hipervolemi, hipernatremi, hipermagnezemi, hiponatremi, hipokalsemi, hipopotasemi, hiperfosfatemi, hiperpotasemi, metabolik asidoz
NÖROMUSKULER BULGULAR	Stupor, koma, konuşma bozuklukları, uyku bozuklukları, demans, kramp, konsantrasyon bozuklukları, yorgunluk, meningism, huzursuz bacak (restless leg) sendromu, tik, tremor, myoklonus, ter fonksiyonlarında bozulma, ruhsal bozukluklar, konvülsiyon, polinöropati, başağrısı, sersemlik, irritabilite
GASTROİNTESTİNAL BULGULAR	Hıçkırık, parotit, gastrit, iştahsızlık, stomatit, pankreatit, motilite bozuklukları, özafajit (kandida, herpes...), intestinal obstrüksiyon, perforasyon, asit, ülser, bulantı, kusma, gastrointestinal kanama, kronik hepatit
HEMATOLOJİ- İMMÜNOLOJİ BULGULAR	Normokrom normositer anemi, eritrosit fragilitesinde artış, kanama, lenfopeni, infeksiyonlara yatkınlık, immün hastalıkların yatışması, kanser, mikrositik anemi (alüminyuma bağlı), aşıyla sağlanan immünitede azalma, tüberkülin gibi tanısal testlerde bozulma
KARDİYOVASKÜLER BULGULAR	Perikardit, ödem, hipertansiyon, kardiyomyopati, hızlanmış atheroskleroz, aritmi, kapak hastalığı
PULMONER BULGULAR	Plevral sıvı, pulmoner ödem, üremik akciğer
METABOLİK-ENDOKRİN BULGULAR	Glukoz intoleransı, hiperprolaktinemi, hiperlipidemi, hiperparatiroidi, büyüme geriliği, hipogonadizm, impotans, libido azalması, hiperürisemi, malnütrisyon,

KEMİK BULGULARI	Üremik kemik hastalığı, hiperparatiroidi, amiloidoz (beta2-mikroglobülin), D vitamini metabolizması bozuklukları, artrit
DERMATOLOJİK BULGULAR	Kaşıntı, hiperpigmentasyon, üremik döküntü, ülserasyon, nekroz gecikmiş yara iyileşmesi, solukluk, tırnak atrofisi
DİĞER	Susuzluk, kilo kaybı, hipotermi, üremik ağız kokusu, miyopati, yumuşak doku kalsifikasyonu, akkiz renal kistik hastalık, karpal tünel sendromu, noktüri

2.3. Üremik Sendrom

Üremik sendrom tanımlanırken ciddi böbrek yetmezliğinin klinik belirtileri kastedilir. Kalp-damar, gastrointestinal, kan üretimi, bağışıklık, hormonal ve sinir sistemleri gibi birçok sistemi etkileyen genel toksin birikimi durumudur. Hücrenin düzenleyici mekanizmasını bozan toksik maddelerin birikmesi ile birlikte renal atılım mekanizmalarında azalma sonuçlarındandır. Ayrıca böbreğin endokrin ve metabolik fonksiyonlarının bozulması şeklinde de ifade edilebilir. Üremik sendrom yalnızca toksin birikimiyle değil hormonal değişikliklerle, eritropoietin (EPO) ve aktif vitamin D üretiminin azalmasıyla, azalmış insülin klirensi, insülin ve PTH' da iç organ direnci ve aşırı PTH üretimi ile karakterizedir. Böbrek fonksiyon kaybının hız ve şiddetine göre üremik hastalardaki belirti ve bulgular farklılık gösterir.

Bu farklılıkların daha net anlaşılması için, tek üremik toksinin ortaya konulmasına yönelik birçok araştırma yapılmasına rağmen patogenez de etkili birçok faktörün var olduğu görüşü çok daha etkili bulunmuştur (Tablo 3). Bu araştırmaların ışığında üremik sendromdan özellikle diyalizle uzaklaştırılabilen orta molekül ağırlıklı toksinler ile küçük molekül ağırlıklı olup orta molekül ağırlıklı gibi davranan toksinlerin sorumlu tutulabileceği gösterilmiştir (36).

Tablo 3. Molekül ağırlıklarına göre bazı üremik toksinler (36).

Nitrik oksit 30 Dalton	Hippurat 179 Dalton
Üre 60 Dalton	Myoinozitol 180 Dalton
Fosfat 96 Dalton	Dimetilarginin 202 Dalton
Kreatinin 113 Dalton	Asimetrik dimetilarginin 202 Dalton
Ürat 168 Dalton	Fenilasetil glutamin 264 Dalton
Parathormon 9425 Dalton	β2 Mikroglobulin 11818 Dalton
Guanidosüksinat 175 Dalton	B-endorfin 2465 Dalton
İndol asetat 175 Dalton	Metilguanidin 73 Dalton

2.3.1. Kardiovasküler Sistem

Üremik sendrom dolaylı ya da direkt olarak çoğu sistemi etkiler. En önemlisi hayati açıdan kalp damar sistemi üzerine olan etkileridir. SDBY hastalarının yaklaşık %80’inde su ve tuz retansiyonuna bağlı olarak HT karşımıza çıkar. Kardiyovasküler hastalıkların bu denli önemli oluşu konjestif kalp yetmezliği ve serebrovasküler hastalıklar için önemli risk oluşturmasına bağlıdır. Ayrıca riskin artmasında HT’ye katkıda bulunan RAS aktivasyonu, artmış aldesteron üretimi, vazodilatatör hormonların azalmış üretimi de rol oynamaktadır.

Üremik sendromda görülebilen kalp kaynaklı problemler, elektrolit dengesizliği veya koroner arter, non-aterosklerotik kaynaklı koroner arter hastalığı ve semptomatik miyokard iskemisi. Üremik hastalarda daha önce de belirttiğimiz gibi yüksek risk faktörüne bağlı olarak konjestif kalp yetmezliği de sıklıkla karşımıza çıkar. Üremide gelişen hiperparatiroidizm ve fosfat retansiyonu arteriyel kalsifikasyona neden olabilir ve bunun sonucunda miyokardiyal kalsifikasyon ise üremik kardiyomiyopatiye yol açabilir (37).

2.3.2. Gastrointestinal Sistem

KBY’de sık görülen gastrointestinal semptomlar başlangıçta tek belirti olabilir. Yeme bozukluğu, bulantı, kusma ve üremik olarak belirtilen karakteristik ağız kokusu şeklinde ortaya çıkar. KBY’nin diyaliz ve transplantasyon ile tedavi edilemeyen ya da edilmemiş durumlarında yetmezliğin ilerlemesine bağlı olarak stomatit, gastrit ve enterit gelişebilir. Mukozal ülserasyonlar, gastrointestinal yolun her seviyesinde üremide oluşan gastrointestinal sistem (GİS) kanamadan büyük ölçüde sorumlu olarak

gösterilebilir. Ayrıca bunların yanı sıra petit ülser de üremide yaklaşık 1/4 oranında hastalarda ortaya çıkabilir (37).

2.3.3. Anemi

Böbrek yetmezliği sırasında anemi erken gelişir ve böbrek fonksiyonları kötüleştikçe kendini hasta ve halsiz hissetmenin ana nedenlerindedir (29). Üremideki aneminin patogenezi birçok nedene bağlı olarak ortaya çıkabilir. KBY’de anemi gelişimine katkıda bulunan bu nedenler EPO eksikliği, eritrosit sağ kalımının kısılması, eritrosit yapımında üremik inhibitörlerinin varlığı, hemoliz, kanama, tedavi amaçlı hemodiyaliz esnasındaki kan kaybı ve dolaylı demir eksikliğidir. Normalde, dolaşımdaki EPO düzeyleri yüksek değildir ancak homeostazın devamı için anemiye yanıt olarak hızla artar. Ancak KBY’de bu ilişkiden söz etmek mümkün olmaz çünkü böbrek fonksiyonlarındaki bozulma EPO düzeyini kontrol edemez. Bu sebebe dayanarak KBY’de aneminin olası en önemli sebebi EPO eksikliği olarak açıklanabilir. Serum EPO düzeyleri ve olgunlaşmamış eritrosit sayımı, böbrek yetmezliği olmadan aynı düzey anemisi olan hastaların sonuçları karşılaştırıldığında düşük sonuçlarla karşılaşılır. Demir parametreleri ise normaldir (37).

KBY’de anemi tedavisini rekombinant insan eritropoietin oldukça değiştirmiştir. Aneminin tedavisinde ayrıca kardiyak semptomları, santral sinir sistemi semptomları ve iştahın düzeltilmesi oldukça anlamlıdır (29).

2.3.4. Deri Bulguları

Deri, pek çok sistemi etkileyen hastalık durumunda dolaylı veya direkt olarak yer almaktadır. Özellikle bu durum bizim için böbrek hastalıklarında ayrıca önemlidir (38). Esasen böbrek fonksiyonlarında bozulma birçok organ ve sistemde sorunlara yol açar. Üremik sendromda ise çeşitli deri lezyonlarının görülmesi yüzyıldan fazla zamandan beri dikkatleri çekmektedir. Deri lezyonlarının sıklığı ve şiddeti, genellikle böbrek yetmezliğinin derecesi ile doğru orantılı olmakla beraber ciddi dermatolojik sorunlara da sebep olmaktadır. Deride solukluk, ekimoz, kaşıntı, pigmentasyon ve dehidratasyon genellikle böbrek yetmezliğinin ileri dönemlerinde ortaya çıkar. Deri genellikle kuru ve atrofiktir (29). Son yıllardaki böbrek yetmezliğinin tedavisinde kaydedilen gelişmeler sayesinde hasta ömrünün uzatılmasının yanı sıra yaşam kalitesinde de sistemik olarak ilerleme kaydedilmektedir (39).

Böbrek fonksiyonlarının reversible bozulmasının sebep olduğu üremik sendrom, deride ciddi belirti ve bulgulara yol açarak (özellikle deri kuruluğu-kaşıntı ve bunun

yanı sıra perforan dermatozlar, kalsifik üremik arteriyolopati) hastaların yaşam kalitesini oldukça azaltmaktadır. Üremik hastalardaki bulguların sebepleri konusunda birçok neden varlığı tartışılmakla beraber ileri sürüldüğü gibi kalsiyum, magnezyum ve fosfat, vitamin D ve PTH metabolizması ile arasında ilişkinin kesin kanıtları elde edilememiştir (5).

Üzerinde durulan mekanizmalardan bazıları, paratiroid hormon ve divalan iyon metabolizması bozuklukları ve mast hücrelerle ilgili bozukluklar; histamin, seratonin ve substans P'nin karıştığı olaylarla ilgili düzensizlikler; ter ve yağ glandüler yapılarındaki atrofi, sinirlerin terminal dallanmadaki bozuklukları olarak sıralanabilir. İmmün sistemi ilgilendiren bozukluklar ve opioid reseptör sistemindeki dengesizliklerle ilişkili belirtiler de bildirilmiştir. Üremik toksinlerin tüm bu bulguların oluşumunda merkezi bir rolü bulunmaktadır (5,40-44).

2.3.5. Kemik Bulguları

KBY, kalsiyum ve fosfat homeostaz düzenlemesini değiştirir. Sekonder hiperparatiroidizm, metabolik kemik hastalıkları, yumuşak doku kalsifikasyonları ve morbidite ve mortalitede anlamlı etkileri olan diğer metabolik düzensizliklere yol açar (29). Sağlıklı böbrekleri olan kişilerde, normal fosfor ve kalsiyum düzeyleri üç hormon PTH, 1,25 (OH)₂D₃ (kalsitriol) ve FGF23'ün etkileşimi ile korunur. Mineral metabolizmasındaki değişiklikler KBY'de evre 2'de kendini gösterir ve böbrek fonksiyonlarının azalmasına bağlı olarak kötüleşir (45).

Sekonder hiperparatiroidizm dolaşımdaki PTH konsantrasyonundaki artış olarak adlandırılır. PTH yükselişindeki başlıca anormal metabolik nedenler; azalmış kalsitriol üretimi, serum kalsiyumunda azalma ve serum fosforunda artmasıdır. PTH serum kalsiyumu dar bir aralıkta, böbrek distal tübülleri üzerinde kalsiyum reabsorpsiyonunu arttırıcı ve kemik üzerinde kalsiyum ve fosfat akışını arttırıcı direkt etkisiyle düzenler. Genellikle renal proksimal tübülde 1-alfa-hidroksilaz enzimini uyararak 1,25-(OH)₂D₃ üretimini stimüle eder. Deride 7-dehidrokolesterolün solar radyasyonu almasıyla vitamin D₃ oluşur. Vitamin aynı zamanda somonda ve balıkların karaciğerinde (KC) bulunmaktadır. 1,25-(OH)₂D₃ KC'de hidroksilasyona uğrayarak biyolojik olarak inaktif form 25-hidroksi vitamin D'ye dönüşür. Daha sonra ise renal proksimal tübülde 1-alfa-hidroksilaz enzimi ile aktif forma dönüştürülür. Kalsitriol, GIS'de kalsiyum ve fosfatın emilimini arttırır. Osteoklastların olgunlaşmasını sağlar. Bozulmuş böbrek fonksiyonu, vitamin D ve PTH üzerindeki etkileri de dâhil olmak üzere karmaşık bir kalsiyum ve fosfat metabolizmasının aksamasına neden olur.

KBY'de FGF23 artar ve böbrek fonksiyonlarının kaybına bağlı adaptif cevapta önemli rol oynar. KBY'de karakteristik olarak paratiroid hastalığı ile PTH sekresyonu ve PTH salgılayan hücre miktarındaki artış olur. GFR'nin 60ml/dk/1,73m²'nin altına düşmesi ile serum PTH seviyesindeki artış belirgin hale gelir. Bu durum rutin laboratuvar testleri ile hiperfosfatemi, 1,25(OH)₂ vitamin D₃ düzeyindeki azalma ve hipokalsemi ile saptanabilir.

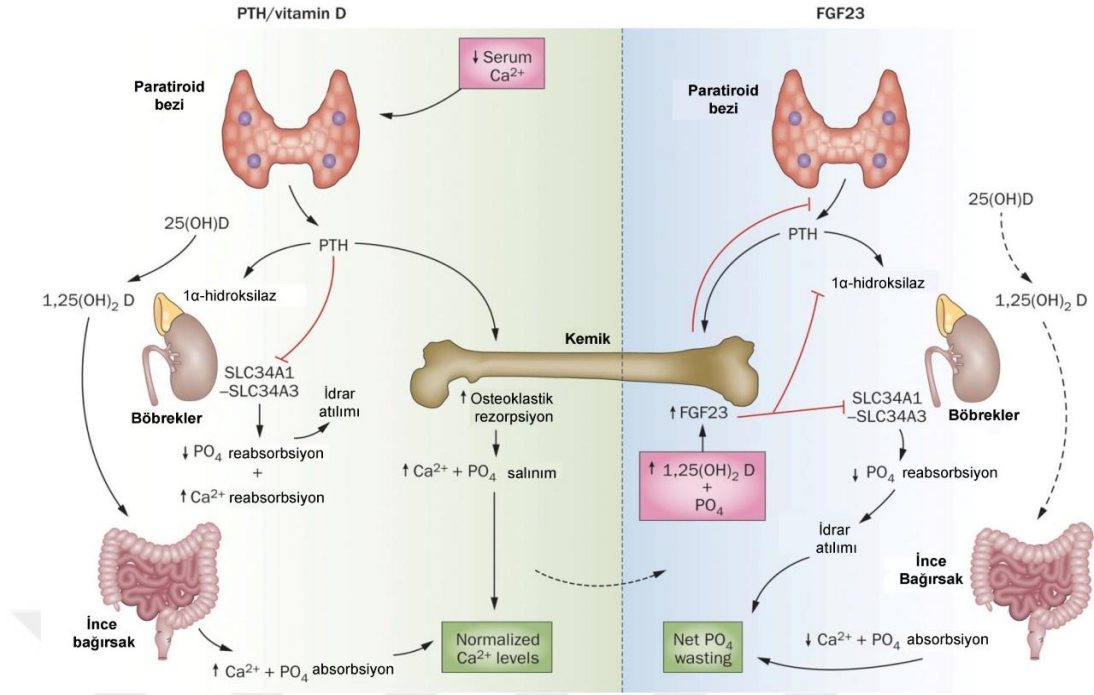
Böbrek fonksiyonu azaldıkça PTH düzeyi progresif olarak artar, evre 5'teki tedavisiz hastaların yüksek PTH düzeylerine sahip olmaları beklenir (29).

2.4. Kalsiyum-Fosfor Metabolizması

2.4.1. Kalsiyum

Kalsiyum, hücre membranının bütünlüğünün korunması, nöromusküler aktivite, endokrin ve ekzokrin salgı aktivitelerinin düzenlenmesi, kanın pıhtılaşması, kompleman sisteminin aktivasyonu ve kemik metabolizması olmak üzere birçok fizyolojik olayda önemli rol oynar (46). Kalsiyum, vücutta en çok bulunan 5. elementtir ve total kalsiyumun yaklaşık %40'ı serum proteinlerine, bunun %80-90'ı ise albümine bağlı olarak bulunur. Sağlıklı bir erişkinde, yaklaşık olarak 1,0-1,3 kg kalsiyum bulunmaktadır (47). Kalsiyum, bu önemli görevleri gerçekleştirirken fosfor (fosfat-HPO₄) ve magnezyumla beraber hareket eder (48). Vücut kalsiyumu kemik dokuda %99 oranında hidroksiapatit formda, geriye kalan %1'i ekstraselüler ve intraselüler sıvıda bulunur (49).

Kalsiyum, kemik mineralizasyonunun yanı sıra pıhtılaşma, sinir iletimi, enzim aktivitesi, endokrin, musküler sistem ve plazma membran potansiyelinin devamlılığını da içine alan fizyolojik süreçlerde önemli rol oynamaktadır. Kalsiyumun kritik önemi nedeniyle, hücre dışı sıvıda iyonize konsantrasyonu belirli bir aralıkta tutulması elzemdir (50). Kalsiyum değerlerinin dengede tutulması iki önemli görevi yerine getirmesinde, normal iskelet gelişimi ve mineralizasyonu için hücre fonksiyonların sağlanması açısından oldukça anlamlıdır (51). Serum kalsiyum konsantrasyonunun belirli bir aralıkta tutulabilmesi pek çok faktöre bağlıdır. Bu faktörler Ca²⁺ duyarlı reseptör (CaSR); PTH ve PTH reseptörü [PTH-related protein (PTHrP)-R]; tiroid parafoliküler C hücrelerinden salınan kalsitonin ve reseptörü ve D vitamindir (52,53).



Şekil 2. Kalsiyum ve fosfat homeostazının PTH, D vitamini ve FGF23 ile düzenlenmesi (54).

Normal bireylerde idrarla atılımı önemli değişkenlik göstermekle beraber, ağızdan alınımının idrarla günlük kalsiyum atılımına etkisi azdır (46). Glomerüllerden günde ortalama 8-10 gram kalsiyum filtre edilir, günlük kalsiyum atılımının üst sınırı erkeklerde 300 mg'dan az kadınlarda ise 250 mg'dan ya da 4mg/kg olarak hesaplanır. Kalsiyumun büyük bir bölümü kandan parasellüler olarak geri emilerek glomerüllerden filtre edilir (proksimal tubüllerde sodyum-potasyum-klor (Na⁺-K⁺-2Cl⁻) taşıyıcısı ile).

Kalsiyumun %20'si Henle kulpunun çıkan kalın kolundaki geri emilimi parasellin-1 adı verilen bir tight-junction proteini ile yine parasellüler yol ile gerçekleşir. Kanda kalsiyum veya magnezyum seviyeleri yükseldiğinde, homeostazı düzenlemek için Henle kulpunun çıkan kalın kolunda CaSR aktif hale gelir, Na⁺-K⁺-2Cl taşıyıcısı inhibe olur ve çıkan kalın kolun lümeninin pozitif voltajı azaltılarak kalsiyumun böbrekteki geri emilimi azaltılmış olur. Böylelikle serum iyonize kalsiyum düzeyi, PTH ve 1,25(OH)₂D'den bağımsız olarak CaSR'nin bu işlevi sonucunda düzenlenmiş olur. Kalsiyumun %10'u ise, distal tubüllerde farklı olarak transsellüler bir mekanizma ile geri emilir.

Transsellüler geri emilimdeki bu farkı intestinal epitel hücrelerinde olduğu gibi, kalsiyumun apikal yüzeyden transient receptor potential vanilloid 5 (TRPV5) ile hücreye içine girişi, kalbindin D'ye bağlanarak bazolateral membrana taşınması, Na⁺-Ca²⁺ pompası ve kalsiyum pompası (Ca-ATPaz) aracılığı ile dolaşıma aktarılması ile gerçekleşir. Bu işlemin uyarıcıları ise PTH, PTHrP ve 1,25(OH)₂D₃'dir (50). Esas olarak ekstrasellüler sıvıda iyonize kalsiyum düzeyi, PTH ve 1,25(OH)₂D₃ tarafından düzenlenmektedir. Paratiroid şef hücrelerinde bulunan CaSR'ler serum iyonize kalsiyum düzeyindeki en küçük değişikliğe oldukça duyarlıdır ve bunun sonucu olarak en kısa sürede PTH düzenlemektedirler. PTH ve 1,25(OH)₂D₃'nin esas etkisi kemik, böbrek ve bağırsaklarda gözlenir (Şekil 2) (55).

2.4.2. Fosfor

İnsan vücudunda total kalsiyum 1,0-1,5 kg, fosfor ise 0,5-0,8 kg arasında değişmektedir. Bu miktarın %85 kadarı, kemik dokuda ve kalsiyum fosfat formunda, total kalsiyum ise %99 oranında kemikte bulunmaktadır. Hem fosforun hem de kalsiyumun %1'lik kısmı ise inorganik fosfat formunda hücre dışı sıvıda ve geri kalanı da hücre içi organik fosfat bileşikleri olarak yumuşak dokuda bulunmaktadır. Kandaki organik fosfat bileşikleri, ağırlıklı olarak eritrositlerde bulunur ve bu da toplam kan fosforunun 2/3'nü oluşturur. İnorganik fosfat ise plazma da bulunmaktadır. Klinik laboratuvarlardaki rutin olarak ölçülen fraksiyon inorganik fosfor olup, bu hücre içi fosfat miktarını doğru olarak göstermeyebilir. Besinle kalsiyum ve fosfor alınımı oldukça değişken olabilir. İnorganik fosforun yaklaşık %85'i filtre olur, serumda mono valan (H₂PO₄⁻) ve di valan (H₂PO₄⁻²) fosfat iyonları şeklinde bulunmaktadır. H₂PO₄⁻: H₂PO₄⁻² oranı da pH'a bağlıdır. Glomerüler filtrat proksimal tubulusların sonuna geldiğinde filtre edilen fosforun %70'i geri emilir. Henle kulpunda hiç fosfor emilmez. Serumdaki fosforun bir kısmı sodyum, kalsiyum ve magnezyum ile kompleks şeklinde, bir kısmı serbest halde, geri kalan 1/10'lük kısmı ise proteinlere bağlı olarak bulunur (56,46).

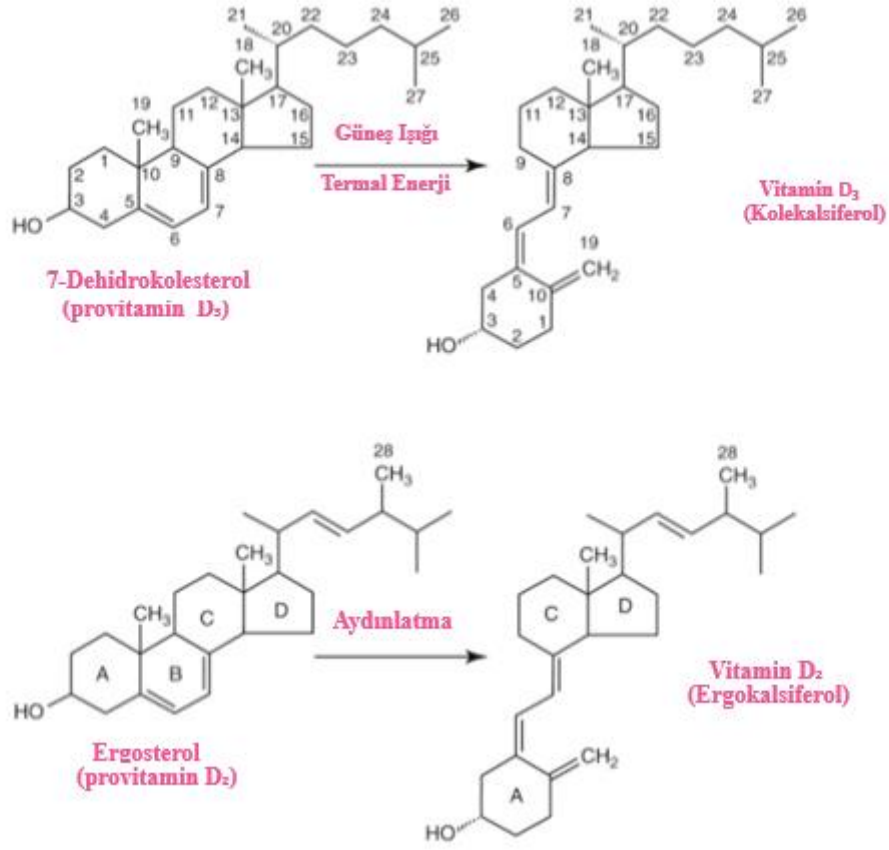
İdrarla fosfor atılımı, büyük ölçüde oral alınımına bağlıdır. Fosfor atılımı yaştan da etkilenir (46). Hem hücre dışı hem de hücre içi dağılımda fosfor, kemiklerin, dişlerin ve DNA/RNA'nın yapısal bir bileşeni olarak işlev görür ve lipid membranlarının ve dolaşımdaki lipoproteinlerin iki kutupluluğunu sağlar. Metabolik olarak fosfor, fosfat bağlarında (ATP) enerji üretmek ve depolamak, kanı tamponlamak, gen transkripsiyonunu düzenlemek, enzim katalizini etkinleştirmek ve böbrek salgısından immün tepkiye kadar çeşitli organ fonksiyonlarını etkileyen

edilen fosforun az bir kısmı distal tubülde, %80'den fazlası ise proksimal tubülde geri emilir. Proksimal tubüldeki geri emilim fırçamsı kenar membranında bulunan sodyum/fosfat ko-transport proteinleri NaPi-2a ve NaPi-2c ve Na⁺/K⁺-ATPaz aracılığı ile gerçekleşir. Renal fosfor geri emiliminin düzenlenmesi, proksimal tubulustaki NaPi-2a ve NaPi-2c'nin miktar ve aktivitesindeki değişikliklere bağlıdır. Na-Pi taşıyıcı proteinlerinin ekspresyonu ise PTH, PTHrP, fosfat düzeyi, büyüme hormonu, tiroid hormonu, insülin ve insülin benzeri büyüme hormonu, FGF23 gibi etkenlerin varlığından bağımsız değildir (Şekil 3) (50,56).

2.4.3. D vitamini

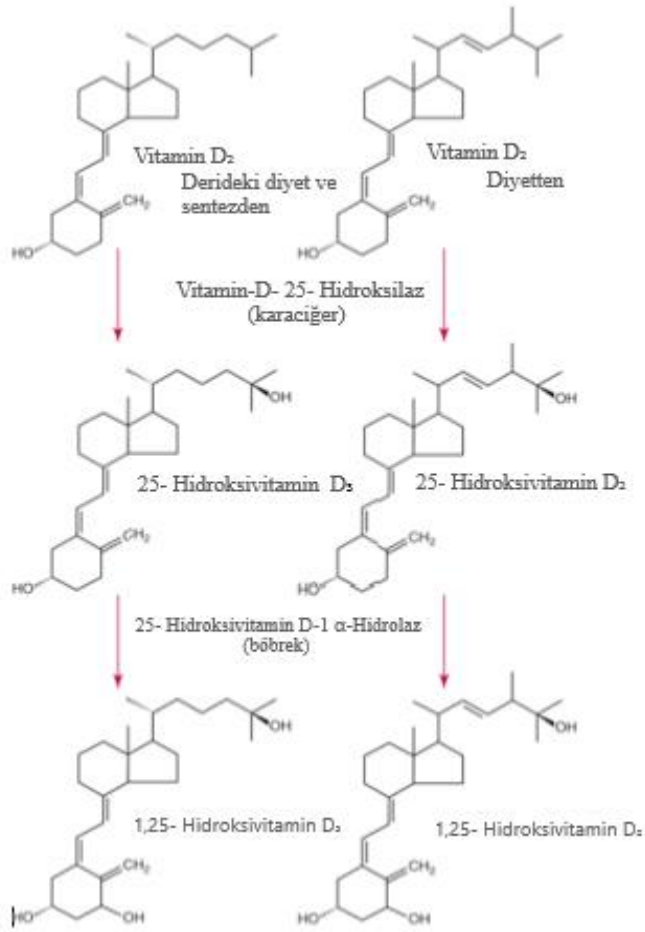
Vitamin D terimi ilk kez, 1922'de McCollum tarafından morina balığından anti-raşitik faktör için kullanılmıştır (60). D vitamininin doğal iki öncüsü vardır: Bitkilerde bulunan ergosterol ve hayvanlarda ve insanda bulunan 7-dehidrokolestrol. Ergosterol, D₂ vitamininin güneş ışığına maruz kalması yoluyla endojen olarak üretilir ve kalsiferol olarak bilinen ergokalsiferole dönüşür. İnsanlarda D vitamininin ana kaynağı deride 7-dehidrokolestrol ultraviyole ışınına maruz kalarak üretilen D₃ vitaminidir. Vitaminin biyolojik olarak aktif formu kalsiyum ve fosfat metabolizmasını düzenler (46).

D vitamini gerçek bir vitaminden ziyade daha çok bir "öncü hormon"dur. D vitamini steroid yapıda bir öncü hormon olup, kemik metabolizması ve sinir-kas fonksiyonları açısından önemli bir role sahiptir. D vitamini, kan Ca ve P seviyelerinin düzenlenmesinde, kemik döngüsünün uygun biçimde devamının sağlanmasında gerekli olmakla birlikte birçok fizyolojik fonksiyonda görev alır (Şekil 6). Kolekalsiferol temel formudur ve daha önce de belirtildiği üzere güneş ışığının ultraviyole B kısmına maruz kalındığında deride 7-dehidrokolesterolden doğal olarak üretilmektedir. Bunun yanı sıra bu iki öncü birbirinden; D₂ vitamini, 22. ve 23. karbon arasındaki çift bağ ve karbon üzerindeki bir metil grubu ile D₃ vitamininden ayrılır (Şekil 4) (47).



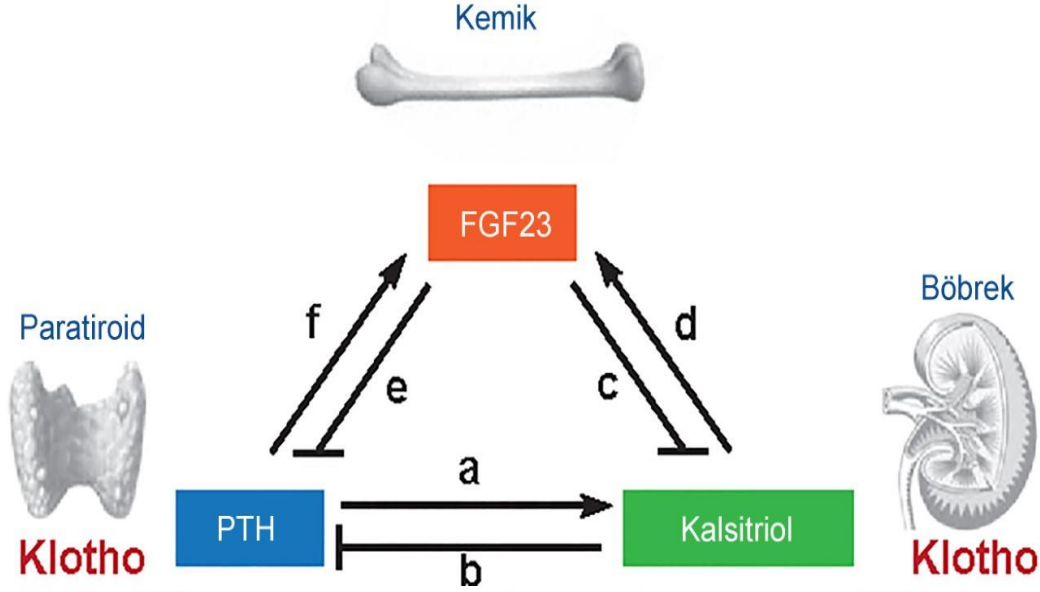
Şekil 4. D3 vitamini (kolekalsiferol) ve D2 vitamini (ergokalsiferol) yapıları ve öncülleri (47).

Deride ultraviyole ışını ile sentezlenen veya beslenmeyle alınan D vitaminleri biyolojik olarak aktif durumda değildir. Dolaşımdaki D vitamini, vitamin D bağlayıcı protein ile KC'ye taşınır ve buradaki enzim 25-hidroksilaz ile 25-hidroksivitamin D'ye [25(OH)D] dönüştürülür. Ayrıca D vitaminin aktif formuna dönüşebilmesi için gereken diğer bir aşama böbreklerde 1 α -hidroksilaz enzimi ile 1,25-dihidroksivitamin D'ye [1,25(OH)₂D₃] (aktif olan form) dönüştürülmesi ile gerçekleşmektedir (Şekil 5) (61).



Şekil 5. D vitamini metabolizması D2 vitamini ve D3 vitamini karaciğerde 25-hidroksivitamin D'ye ve ayrıca böbrekler tarafından 1,25-dihidroksivitamin D'ye enzimatik olarak hidroksile edilir. 1,25-Dihidroksivitamin D2 ve 1,25-dihidroksivitamin D3, D vitamininin biyolojik olarak aktif formlarıdır (47).

1,25(OH)₂D₃'ün konsantrasyonunun düzenlenmesi de sentezi kadar multifaktöriyeldir, özellikle PTH olmak üzere, fosfat, kalsiyum, FGF23 ve 1,25(OH)₂D₃ seviyeleri ile sıkı bir şekilde kontrol edilir (62,63). FGF23'ün vitamin D metabolizmasındaki etkili rolünü 1-alfa-hidroksilaz enzim aktivitesini azaltarak ve 24-alfa-hidroksilaz aktivitesini artırarak gösterir. Dolayısıyla FGF23 etkisi, kalsitriol düzeylerini azaltma yönündedir olarak ifade edilebilir (64). FGF23'ün D vitamini üzerine olan bu etkisi ile hipofosfateminin oluşmasında da rolü olduğu söylenebilir (65). Buna karşılık kalsitriol, osteositlerde FGF23 ekspresyonunu arttırmaktadır (66).



Şekil 6. Kalsiyum ve fosfat homeostazının regülasyonu (67). Paratitoid hormon (PTH) kalsitriol (1,25-dihidroksivitamin D3) sentezini böbrekte artırmaktadır (a). Kalsitriol negatif feedback ile PTH'yi azaltmaktadır (b). FGF23 kemikten salınmakta ve kalsitriol sentezini azaltmak için böbrekte etki göstermektedir (c). Kalsitriol kemikte FGF23 ekspresyonunu arttırmaktadır (d). FGF23 böbrekten PTH salınımını azaltmaktadır (e). PTH, FGF23 ekspresyonunu arttırmaktadır (f).

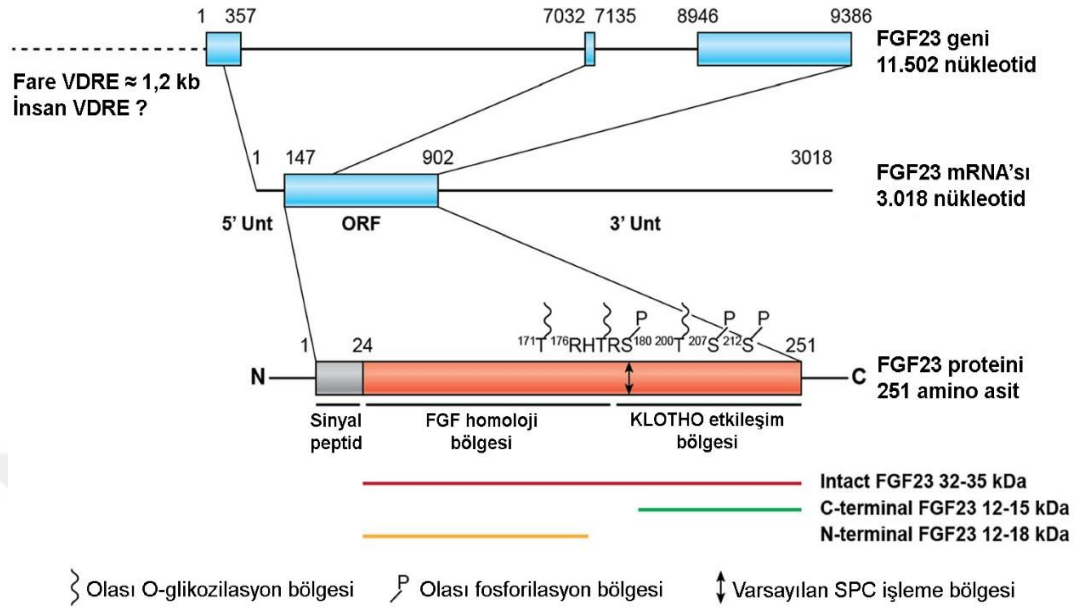
2.5. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF23)

2.5.1. Fibroblast Büyüme Faktörü 23 Yapısı ve Sentezi

FGF23, FGF ailesine mensup olup, diğer aile elemanlarından ayrı tutulur. FGF-19 ve FGF-21 ile birlikte endokrin FGF'ler olarak adlandırılır. Böbrek fonksiyonlarını düzenleyerek mineral iyonu homeostazını koruyan, kemik dokuda osteositler ve osteoblastlardan üretilmiş bir hormon olan FGF23, fosfor metabolizmasını düzenleyen temel hormondur ve FGF23 geninin 12p13.3 lokusundan ekspresyon edilmektedir (68-69-70). Yaklaşık olarak 32 kDa olan bu protein bir N-terminal sinyal peptid parçası (18 kDa) ve bir de C-terminal parçasından (12 kDa) oluşmaktadır. (Şekil 7).

2001 yılında Yamashita ve arkadaşları tarafından ilk kez tümör kaynaklı osteomalazide renal fosfat kaybının neden olduğu hipofosfatemi araştırılırken farelerde klonlanmıştır (71). Osteoblast ve osteositler tarafından üretilmekle beraber son zamanlarda ayrıca tükürük bezi, kas, beyin, meme glandı, dalak, karaciğer ve kalp

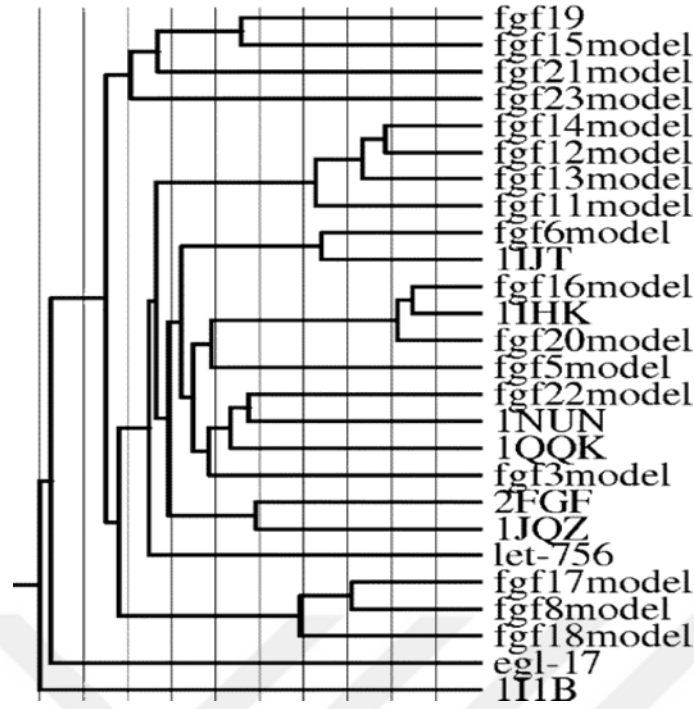
olmak üzere birçok dokuda da eksprese olduğu yönünde çalışmalar bulunmaktadır (68,6,72).



Şekil 7. İnsan FGF23 geni ve proteini (73).

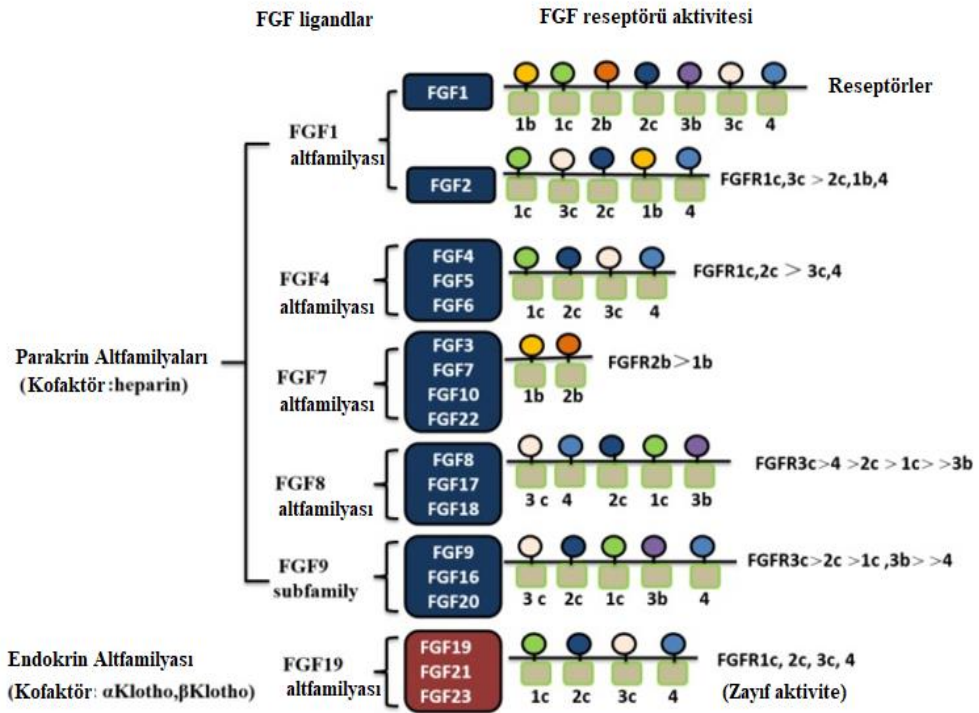
FGF23, FGF filogenetik ailesinin bir üyesidir (Şekil 8). İlk Fibroblast büyüme faktörü (FGF), 1973'te Armelin tarafından hipofiz ekstraktlarında tanımlanmıştır (74). Fibroblast büyüme faktörleri (FGF) geniş bir büyüme faktörü ailesine aittir. FGF' ler, anjiyogenez, yara iyileşmesi, embriyonik gelişim ve metabolizma düzenlemesi dâhil olmak üzere sayısız biyolojik ve patofizyolojik sürece aracılık etmek için parakrin veya endokrin sinyalini kullanır (75).

FGF' ler, beş parakrin alt ailesi ve bir endokrin alt ailesi olmak üzere altı alt aile olarak sınıflandırılır (76). Klasik FGF ailesi üyeleri embriyonik gelişim sırasında doku ve organların oluşumunu düzenleyen parakrin faktörler olarak kabul edilir. FGF19 alt ailesi üyeleri (FGF19, FGF21 ve FGF23), endokrin FGF' lerdir (77). Endokrin FGF' ler olarak adlandırılan bu üçünün endokrin fonksiyonlarına karşı diğer FGF' lerin parakrin veya otokrin fonksiyonu vardır (78).



Şekil 8. FGF filogenetik ağacı (79).

Ekstrasellüler alana salınan FGF'ler heparin sülfata (HS) bağımlı proteinlerdir. FGF'lerin 12 antiparalel β dizisinden oluşan heparan sülfat bağlanma bölgesi vardır, $\beta 1 - \beta 2$ döngü yapısı ve genişletilmiş $\beta 10 - \beta 12$ bölge ile tanımlanır ve HS'ye bağlanma için çözücüye maruz kalan basit amino asitleri ve temel atomlarını tanıtır (76). Parakrin FGF'lerde, heparan sülfatın bağlanması, FGF ligandıyla sonuçlanır ve pozitif yüklerle sürekli bir yüzey oluşturur. Farklı olarak, bir kofaktör olarak HS kullanmayan endokrin FGF alt aile üyelerinde (FGF19, FGF21 ve FGF23) FGF'lerin heparin veya heparan sülfat ile bağlanması bir kofaktör işlevi görür ve bunu ligand-reseptör etkileşimini kolaylaştırarak ve reseptör sinyal iletim yollarını aktive ederek yapar (80). Ancak FGF19, FGF21 ve FGF23'ün heparan sülfata afinitesi azdır. Afinitedeki bu zayıflık endokrin FGF'lerin HS zengin ekstrasellüler matrisle bağlanmadan sistemik dolaşımda bulunmalarına sebep olur (79,81).



Şekil 9. FGF ligandları ve FGF reseptörleri ailesi (82).

FGFR'ler ya heparan sülfat ya da Klotho'ya bağlı yollardan FGF sinyal transdüksiyonuna aracılık eden transmembran tirozin kinaz reseptörleridir (83). Heparan sülfat FGF ile FGFR etkileşimine katılır ve FGFR tirozin kinaz aktivasyonu için gerekli olan FGF-FGFR sinyal kompleksi oluşumunu uyarırlar (84). Bu nedenle endokrin FGF'ler FGFR'nin etkin dimerizasyon ve aktivasyonunu sağlamak için heparan sülfata ilaveten başka bir kofaktör α -Klotho proteinine ihtiyaç duyar (85).

2.5.2. FGF23 Reseptörleri

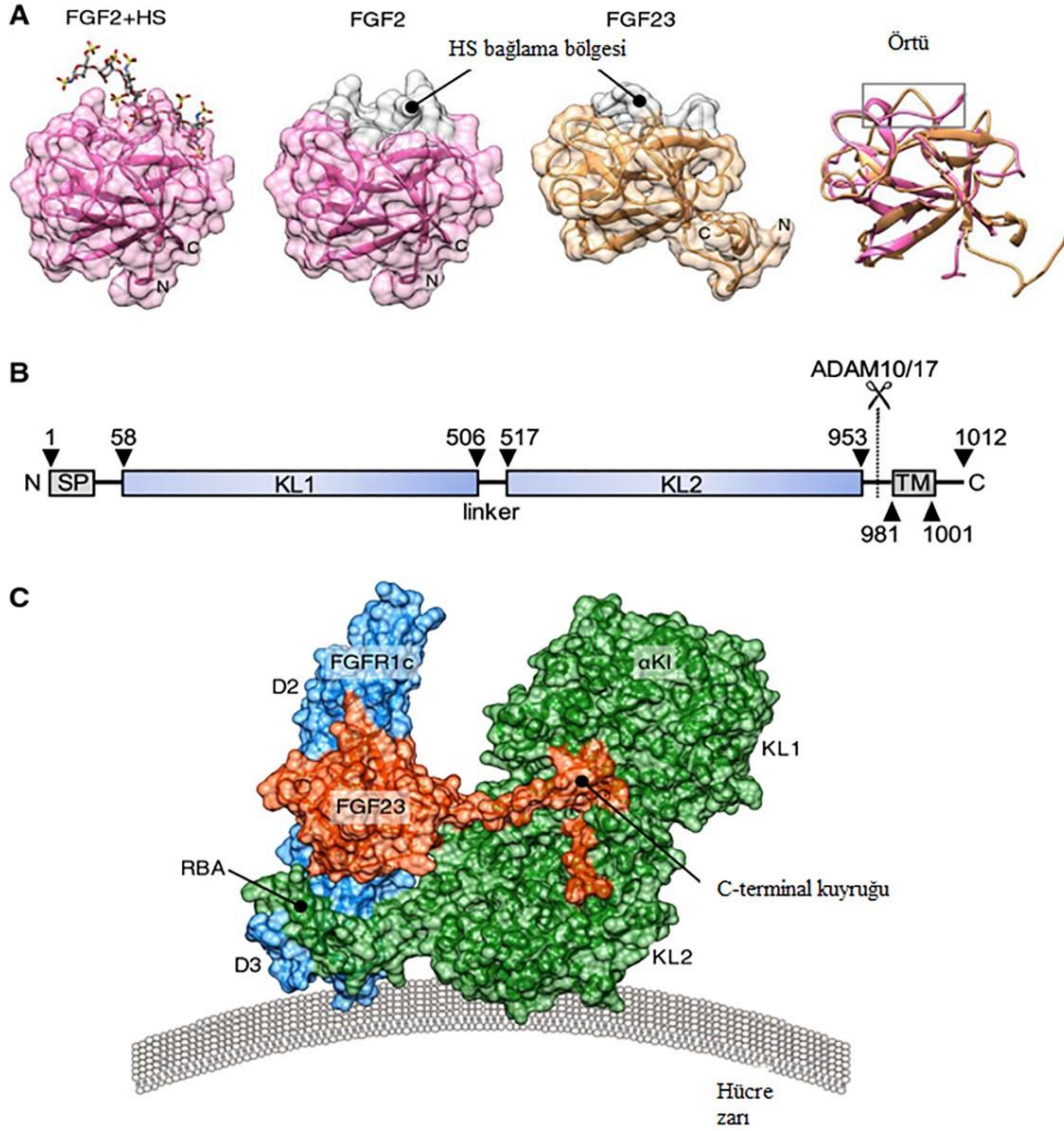
FGF'ler ve reseptörleri (FGFR'ler), gelişim ve yetişkin yaşamı boyunca hücre çoğalmasını, hayatta kalma, göç ve farklılaşmayı sıkı bir şekilde düzenlemek için temel rol oynar (82). FGFR'ler gelişim ve doku onarımı sırasında hücre çoğalması ve farklılaşması dâhil olmak üzere önemli biyolojik süreçleri düzenler. Geçtiğimiz on yıllar boyunca, FGFR'lerin sinyal ağının anlaşılması için yapılan çalışmaların bir sonucu olarak sayısız patolojik koşul ve gelişimsel sendrom ortaya çıkmıştır (83). Reseptör tirozin kinazların (RTK'ler) bir alt ailesi olan insan FGFR ailesi, dört aile üyesinden oluşur - FGFR1, FGFR2, FGFR3 ve FGFR4. FGF sinyal tirozin kinaz alanı olan FGFR5'ten (FGFRL1 olarak da bilinir) yoksun olan yakından ilişkili bir reseptör, yakın zamanda FGF'ler olarak bilinen FGFR bağlayıcı ligandlarla etkileşime

dayanarak keşfedilmiştir (86). Fibroblast büyüme faktörlerinin etkilerini göstermeleri FGF reseptörlerine (FGFR) bağlanmaları ile olur (69). FGF19 alt familya üyesi, FGF19, FGF21 ve FGF23, heparan sülfata zayıf yakınlıklarından ötürü, ko-reseptörlerini heparan sülfata bağlı bir şekilde aktive etmemektedir. Bunun yerine, reseptörlerini aktive etmek ve dimerize etmek için α -Klotho' ya bağlanırlar (82). Dört tip bağımsız gen tarafından kodlanan FGFR tanımlanmıştır: FGFR1, FGFR2, FGFR3 ve FGFR4. Bu FGFR' ler; hücre dışı bir bölge, bir zar ötesi bölge ve hücre içi bir bölgeden oluşan tek zincirli glikoproteinlerdir (87). Böbrek tubulus hücreleri tarafından eksprese edilen FGFR1 ile FGF23 yüksek afinitede bağlanır (88). FGFR1 distal tübül tarafından salgılanır; ancak temel FGF reseptörü olan FGFR3, proksimal tübül tarafından salgılanır ve fosfat regülasyonunda görev alır (89,90). Tümü tirozin kinaz ailesine ait olan FGF reseptörleri doku ekspresyonu, aktivite ve ligand bağlama açısından farklılıklar gösterirler. Dört FGF reseptörü (FGFR 1-4) ve bunların alternatif eklenmelerin sonucu olan çok sayıda izoformu (FGFR 1a, 1b, 1c, 2b, 2c, 3b, 3c ve 4) bulunmaktadır (Şekil 9). Her FGFR, ekstrasellüler ligand bağlanma bölgesi, bir transmembran parça ve intrasellüler tirozin kinaz bölgesi oluşturur (91,92). FGFR' ler, üç immüoglobulin (Ig) benzeri alandan (I-III), bir transmembran alandan ve bir hücre içi tirozin kinaz alanından oluşan hücre dışı bir alan içerir. IgI ve IgII kıvrımları arasında, reseptör oto-inhibisyonunda önemli bir rol oynayan bir bağlayıcı bölge görevi gören asitten zengin bir alan (asidik kutusu olarak adlandırılır) bulunmaktadır (93). FGFR1, 2 ve 3'ü kodlayan 19 ekson vardır. Ayrıca FGF reseptörleri bu 19 eksona, ekson 8 veya 9'un eklenmesi ile oluşur. mRNA transkriptine ekson 8'in eklenmesi ile FGFR'nin b izoformu oluşurken; ekson 9'un eklenmesi ile FGFR'nin c izoformu oluşur. Ve FGF23 birçok FGFR'nin c izoformuna bağlanmaktadır (53,94,95). FGF23 N-terminal bölgesi ile FGFR'lere bağlanırken, C-terminal kısmı ile de kofaktörü olan α -Klothoya bağlanır (81).

2.5.3.Klotho

Klotho, beta-glukuronidaz enzimleri ile homoloji gösteren bir transmembran protein olup, ilk olarak Kuro ve arkadaşları tarafından, yaşlanmanın bazı fenotipik özelliklerini baskılayan bir gen olarak tanımlanmıştır. Bu protein aynı zamanda FGF23 için zorunlu ko-reseptör işlevi gören bir proteindir. Farelerde Klotho gen ekspresyon defektinin, azalmış yaşam süresi, infertilite, deri atrofisi ve osteoporoz gibi yaşlanma belirtilerine neden olduğu görülmüştür (9). Klotho geni başlıca böbrek distal tübül epiteli ve beyin koroid pleksuslarından, ayrıca osteositler, osteoblastlar, böbrekler,

paratiroid bezleri, endotel hücreleri, timus, lenf bezleri, ventrolateral talamik çekirdeklerde eksprese edilmektedir (6).



Şekil 10. Klotho yapısı ve FGF23 reseptörü

KL geni, insanlarda 1012 amino asit tek geçişli bir transmembran proteinini kodlayan 5 ekzon içerir; bunlar, çok kısa bir hücre içi zinciri (9aa)- bilinen bir fonksiyonel alan olmadan- bir transmembran bölgesi (20aa) ve oluşan daha kapsamlı bir ektodomain içerir, iki tandem homolog β -glikosidaz benzeri alana KL1 ve KL2 adı verilir (70). α -Klotho, 130 kDa ağırlığında bir transmembran proteindir. Sitoplazmada ve membran yüzeyinde olmak üzere hücre dışında bulunan iki kısımdan oluşur.

Klothonun membrana bağlı ve çözünür olmak üzere iki türevi vardır. FGF23 için ko-reseptör görevi yapan membrana bağlı α -Klotho, fibroblast büyüme faktörü reseptörleri (FGFR) ile kompleks oluşturur (Şekil 10). Membran yüzeyindeki parçası proteazlar tarafından dolaşıma salınmakta, bu da α -Klotho'nun vücut sıvılarında saptanabilen çözünür şeklini oluşturmaktadır (96). Klotho yokluğunda FGF23'ün kendi reseptörüne afinitesi oldukça azalmakta ve biyolojik fonksiyonlarını yerine getirememektedir (97,98).

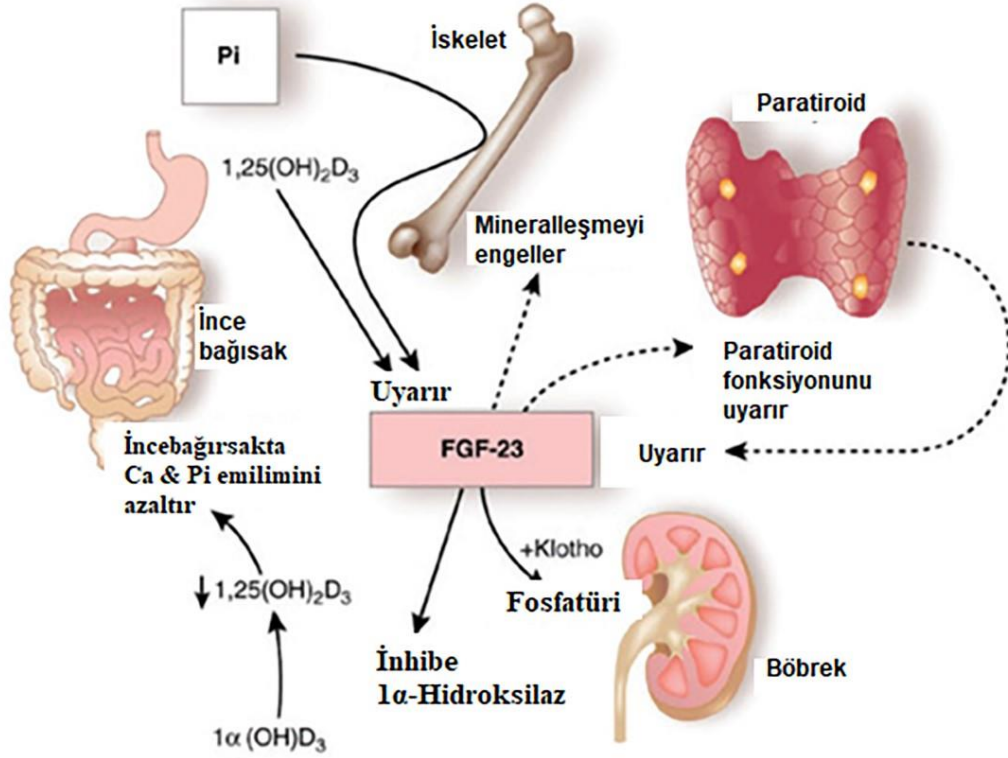
Son çalışmalar, FGF23-FGFR- α -Klotho sinyal kompleksi oluşumunu ve aktivitesini destekleyen yapısal etkileşimler konusundaki anlayışımızı büyük ölçüde ilerletmiş olsa da, çözünür α -Klotho'nun fizyolojik fonksiyonları ve doğrudan FGF23 olmadan hareket edip etmeyeceği ile ilgili tartışmalar devam etmektedir (99,70).

2.5.4. FGF23 Etki Mekanizması

FGF23, ko-faktörü Klotho'nun bulunduğu böbrek, paratiroid bezi, koroid pleksus ve hipofiz bezi üzerinde fizyolojik etkileri görülmektedir. FGF23'ün ana hedef organı ise böbrektir. FGF23'ün salgılanması özellikle 1-25(OH)₂D₃ (kalsitriol), PTH, diyetle fosfat alımı ve inflamasyonla stimüle edilmektedir (100). D vitamini ve fosfor homeostazında, FGF23 önemli bir rol oynamaktadır. Serum fosfat düzeylerinin artması PTH ve FGF23 sekresyonunun artmasıyla sonuçlanır (Şekil 11). Bu artış, böbrek proksimal tübül hücrelerinin apikal membranında fosfor reabsorbsiyonundan sorumlu NaPi2a ve NaPi-2c kotransporter ekspresyonu azalırken fosfat reabsorbsiyonu azalır ve dolayısıyla üriner atılımı artar. PTH, 1-alfa hidroksilazı uyarak 1-25(OH)₂D₃ üretimini artırır, FGF23 üretim ve salınımını uyarır. FGF23 de PTH sentez inhibitörü olan 1-25(OH)₂D₃ üretimini azaltır ve ayrıca PTH sekresyonunu azaltır. 1-alfa hidroksilazı kodlayan *Cyp27b1* geninin ekspresyonunu baskılayıp, 1-25(OH)₂D₃'ü inaktive eden 24-hidroksilaz enzimini kodlayan *Cyp24* geninin ekspresyonunu artırarak D vitamini üzerine etkilerini gösterir (101). D vitamini yüksek seviyelerinde ise, nükleer retinoid X reseptörü (RXR) ile nükleer vitamin D reseptörü (VDR)'ne bağlanarak kemikte FGF23 gen ekspresyonunu uyarır (102). FGF23'ün mitojen ile aktive olan protein kinazı (MAPK) aktive ederek PTH gen ekspresyonu ve PTH sekresyonunu azalttığı *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir (103,104). PTH'nin etkisi ise kemik dokuda FGF23 üretiminin uyarılmasıdır.

PTH seviyeleri yükseldiğinde osteositlerde PTH reseptörleri uyarılmakta ve FGF23 ekspresyonu artmaktadır (105,106). FGF23 ve kalsiyum arasındaki ilişkiyi

araştıran çalışmalarda ise primer hiperparatiroidili hastalarda kontrol gruplarına göre FGF23 düzeyleri daha yüksek olarak belirlenirken, paratidektomi yapıldığında ise FGF23 düzeyleri düşmüş ve postoperatif FGF23 düzeyleri düzeltilmiş kalsiyum düzeyleri arasında ilişki bulunmuştur (107). Ayrıca diğer bir çalışmada Vitamin D reseptörü olmayan sıçanlarda bazal FGF23 düzeyleri çok düşük iken diyetle kalsiyum verilmesi sonrasında kemikte FGF23 mRNA düzeyi ve dolaşımda FGF23 düzeylerinde artış gözlenmiştir (108). Bu çalışmalardaki sonuçları göz önüne aldığımızda kalsiyumun vitamin D'den bağımsız olarak FGF23 üretimi üzerine etkisi olabileceği düşünülebilir.



2.5.5. FGF23 ve Kronik Böbrek Yetmezliği

Hiperfosfatemi KBY' nin en önemli bulgularından biridir. GFR azaldıkça nefron başına düşen fosfat ekskresyonu artacak ve GFR düştükçe tübüler fosfat reabsorpsiyonu %10-20'ye düşerken filtre edilen yükün %80-90' ı ekskresyona uğramış olacaktır. Bununla birlikte toplam nefron sayısının azalmasından dolayı serum fosfatı yükselir (110). KBY' deki FGF23' ün düzenleme mekanizmaları hala tam olarak anlaşılmış değildir. FGF23, fosfat homeostazisini düzenler ve kronik böbrek yetmezliği (KBY) olan hastalarda erken yükselişi, tüm nedenlere bağlı ölümlerle bağımsız olarak ilişkilidir. İnflamasyon KBY'nin karakteristik özelliği olduğundan ve artmış plazma FGF23 ile ilişkili olduğundan, inflamasyonun doğrudan FGF23' ü teşvik edip etmediği hala merak konusudur (111).

FGF23'ün, böbrek yetmezliği nedeniyle fosfat tutulmasına karşı bir telafi edici cevap olarak yükseldiği ilk olarak düşünülmektedir. Ancak FGF23 artışı, serum fosfatındaki artıştan önce gelir. KBY' nin ilerlemesinde kilit rol oynayan Klotho' nun azaltılmasının, FGF23'ün inhibitör etkisine paratiroid direncinin KBY' de FGF23'teki ilk artıştan sorumlu olabileceği öne sürülmüştür. Ancak KBY' li hastalar böyle bir durumda, 1-25(OH)₂D₃, serum fosfat ve kalsiyum seviyelerinde hafif bir artış gibi Klotho azalması göstermelidir. Fakat bu erken KBY' de gözlenmemektedir (112). Ayrıca, Kronik Böbrek Yetersizliği Topluluğu (CRIC) çalışmasında, T. Isakova ve arkadaşları (2011), "Metabolik değişikliklerin (...) artmış FGF23' ün Klotho eksikliğinden önce geldiğini" öne sürmüşlerdir (5). Bu bilim insanları, böbrek hasarının kendisinin KBY' li hastalarda FGF23 salgılanması için ilk uyarıcı olabileceği ileri sürmüştür. Hayvan çalışmaları bu fikri destekleme yönündedir, bunun da nedeni serum fosfatın yükselmesinden önce FGF23 böbrek hasarından hemen sonra ve doğrudan artmış olmasıdır. Diğer bir başka hipotez, sistatin C'nin FGF23 üzerine büyük bir etkisi olabileceğinden, renal klirensin KBY'nin erken evrelerinde FGF23 yükselmesinden sorumlu olduğunu öne sürmektedir (113).

Kronik böbrek yetmezliğinde yapılan diğer çalışmalarda, ileri evre KBY' de fosfor retansiyonunun önlenemediği ve artan FGF23 düzeylerine direnç geliştiği, 1-25(OH)₂D₃'ün azaldığı böbrek hasarının arttığı gösterilmiştir. Diğer çalışmalarda KBY' li hastalarda böbrek hasarının ilerlemesiyle ve tüm nedenlere bağlı ölümlerle FGF23'ün ilişkili olduğu ortaya konmuştur (6,7). Kronik böbrek yetmezliğinde bozulan fosfat dengesinden FGF23-Klotho yolundaki aksaklıkların sorumlu olabileceği düşünülmektedir (109,116).

Kronik böbrek yetmezliğinde böbrekte Klotho ekspresyonu ilerleyici olarak azalırken serum FGF23 düzeyleri artmaktadır (110). FGF23, 1-25(OH)₂D₃ seviyelerini azaltarak hipokalsemiye ve PTH' nin artmasına neden olur (FGF23'ün artması ile) (117). Düşük serum 1-25(OH)₂D₃ seviyeleri Klotho ekspresyonunu daha da bozarak kısır döngü yaşanır. PTH sentezini, fosfat retansiyonu ve düşük 1-25(OH)₂D₃ konsantrasyonu iyonize kalsiyum seviyelerinden bağımsız olarak artırır (118).



3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu tez çalışması, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında etik kurul izni (Etik No: 2018-113) alındıktan sonra gerçekleştirilmiştir. Çalışmada strese maruz kalmamış ve standarda uygun kafeslerde bakılan erişkin 32 adet Wistar Albino sıçan kullanılmıştır. Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Hayvan Laboratuvarından elde edilen her biri 12-16 haftalık ve yaklaşık 290-310 gram ağırlığında olan sıçanlar kullanılmıştır.

Tüm deney hayvanları 22 ± 20 °C oda sıcaklığında, 12 saatlik aydınlık/karanlık döngünün sağlandığı, sesten yalıtılmış odada ve 53 ± 5 bağıl nem oranına sahip ortamda tutulmuştur. Yeterli ve uygun oranlarda beslenmeleri sağlanan deney hayvanlarıyla çalışmalar 09:00-15:00 saatleri arasında yapılmış, ışık ve ses düzeyi sürekli kontrol altında tutulmuştur. Tüm sıçanların kuyrukları, gruplarını ve hangi hayvan olduğunu belirtecek şekilde numaralandırılmıştır. Hayvanlar kafeslere beşerli olarak dağıtılmıştır.

Hayvanlar 14 hafta (5/6 nefrektomi prosedüründen itibaren) takip edildikten sonra feda edilmiştir. Feda etme işlemi hayvanlar derin anestezi altında iken ekssanguinasyon (kansızlaştırma) ile gerçekleştirilmiştir. Hayvanlarda böbrek fonksiyon testleri, serum biyokimyasal incelemeleri, deri immünohistopatolojik incelemeleri ve Western Blot yöntemiyle protein tayini yapılmıştır.

3.1. Deney Grupları

Toplam 30 Wistar Albino cinsi sıçan, rastgele iki gruba [Sham Grup (SG, n=8) ve Üremik Grup (ÜG, n=22)] ayrılmıştır. Daha sonra ÜG'ye 5/6 nefrektomi modeli oluşturulmak üzere cerrahi yöntem uygulanmıştır. Cerrahi prosedür sırasında bir sıçan anestezi nedeniyle (%3,3), bir sıçan ise cerrahi prosedürün hemen akabinde, deneyin takibi sırasında ise beş sıçan daha kaybedilmiştir (%16,6). Deney sonunda ÜG'de üremi düzeyi en düşük olan yedi sıçan deney dışında bırakılmıştır. Son haliyle tüm analizler 8 SG (n=8) ve 8 ÜG (n=8) olmak üzere 16 sıçan üzerinden gerçekleştirilmiştir (Tablo 4).

Tablo 4. Deney Grupları ve Sayıları

Deney ve kontrol grupları	Grup başına hayvan adedi
Üremik Grup (ÜG)	8
Sham Grubu (SG)	8

Standart şartlar altında bakımı yapılan sıçanlar 14 hafta boyunca haftalık olarak izlenmiştir. Hayvanların beslemesi özel olarak hazırlanan %6 tuz-%40 protein içerikli sıçan yemi ile yapılmıştır. İzlem sırasında haftalık klinik muayene ve ağırlık ölçümü yapılmıştır. Laboratuvar izlemi, daha önceden programlandığı gibi üremi kontrolü için serum üre, kreatinin değerlerine deney başlamadan, 6. Haftada ve 14 haftasonunda; kalsiyum, fosfor, magnezyum düzeylerine cerrahi prosedürün tamamlanmasının ardından, 6. haftada ve 14. haftada bakılarak gerçekleştirilmiştir (Tablo 5). Tam kan sayımı, immünohistokimyasal incelemesi, deri FGF23 tayini (Western Blot tekniği) ve FGF23-1,25(OH)₂D₃ ELİSA testi 14. haftanın sonunda gerçekleştirilmiştir (Tablo 6). Laboratuvar testleri için alınan kanlar santrifüj edilip serumları ayrılmış ve daha sonraki analizler için -80 °C’de muhafaza edilmiş.

Tablo 5. Bakım süresince izlenen laboratuvar takipleri

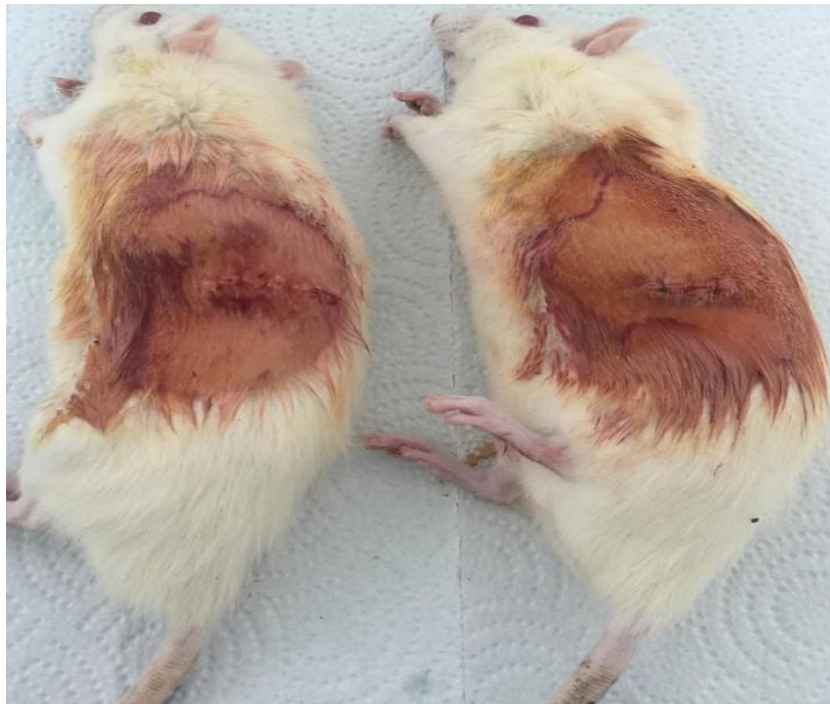
Yapılan takip	Takip sıklığı
Kan üre düzeyi	Başlangıç -6.-14. haftada
Kan kreatinin düzeyi	Başlangıç -6.-14. haftada
Ağırlık ölçümü	Haftada bir

Tablo 6. Deney süresince yapılan tetkikler ve zaman çizelgesi

Serum biyokimyasal tetkikler	Tarih
Tam kan sayımı	14. hafta
Serum kreatinin	Başlangıç - 6 hafta – 14. hafta
Serum üre	Başlangıç - 6 hafta – 14. hafta
Serum kalsiyum	6 hafta – 14. hafta
Serum fosfat	6 hafta – 14. hafta
Serum magnezyum	6 hafta – 14. hafta
FGFR1 İmmünohistokimya	14. hafta
Deri FGF23 tayini (<i>Western Blot tekniği</i>)	14. hafta
FGF23 ve 1,25(OH) ₂ D ₃ ELİSA testi	14. hafta

3.2. Cerrahi prosedür

Nefrektomi prosedürü, 5/6 nefrektomi adı verilen sub-total nefrektomi, insanlarda böbrek kitlesi kaybını takiben ilerleyici böbrek yetmezliğini taklit eder. Tüm operasyonlar, ksilazin (5 mg/kg) ve ketaminin (80 mg/kg) bir karışımının intra-peritoneal (i.p) enjeksiyonu ile total anestezi altında gerçekleştirilmiştir. Cerrahi sırasında tıraş makinesi, terazi, steril gazlı bez 5x5 ve 10x10, %0,9 NaCl çözeltisi, jel köpük yastıkları: spongostan, Vicryl 4.0 ve 5.0, 1 ml şırınga, doku forsepsi, Olsen-Hegar makaslı iğne tutucu, Semken forseps, iris makası, mayo makası, standart desen forseps ve ameliyat sonrası sıçanlar için temiz kafes kullanılmıştır.



Şekil 12. Cerrahi prosedür öncesi hazırlık ve sonrası.

İki basamaklı bir prosedür uygulanmıştır (Şekil 12):

1. Genel anestezi altında [ksilazin (5mg/kg, ip) ve ketamin (80 mg/kg, i.p) uygulanarak] sol paravertebral 5-8 mm'lik kesi ile sol böbrek açığa çıkarılarak, kapsülü sıyrılarak böbreküstü bezi korunmaya dikkat edilerek böbreğin her iki ucundan 2/3' lük kısmı kesilmiş ve jel köpük pedlerle kanama kontrolü sağlandıktan sonra tekrar batın içine yerleştirilerek anatomik yapılar usulüne uygun biçimde kapatılmıştır. Sıçanlar kafeslerine konarak standart şartlar altında iyileşmeleri beklenmiştir.

2. İlk operasyondan yedi gün sonra genel anestezi altında [ksilazin (5mg/kg, ip) ve ketamin (80 mg/kg, i.p) uygulanarak] sağ paravertebral 5-8 mm'lik kesi ile sağ böbrek açığa çıkarılarak, kapsülü sıyrılarak böbreküstü bezi korunmaya dikkat edilerek böbreğin tamamı çıkarılmıştır. Anatomik yapılar usulüne uygun şekilde kapatılmıştır. Her iki böbrek hesaba katıldığında ikinci operasyon sonunda tüm böbrek dokusunun altında beşi çıkarılmıştır. Bu model literatürde 5/6 nefrektomi modeli olarak bilinmektedir. Sıçanlar kafeslerine konarak deney süresince takip edilmiştir.

Sham Grup, nefrektomi (böbrek çıkarma ameliyatı) hariç olmak üzere, ÜG'de yapılan tüm işlemler aynı şekilde yapılmış; yani böbrek dokusunun tamamı (6/6) hayvanda kalmıştır.

Standart şartlar altında bakımı yapılacak olan sıçanlar 14 hafta süreyle izlenmiştir. İzlem sırasında haftalık klinik muayene ve ağırlık ölçümü yapılmıştır. Üremi kontrolü için kan üre ve kreatinin düzeylerine bakılmıştır. Üremik gruptaki deneklerin izlemi sırasında üremi gelişmediği tespit edilen denekler çalışma dışı bırakılarak itlaf edilmiştir. Cerrahi vb. nedenlerle ölen ya da model oluşmayan sıçanların yerine yedek sıçanlar kullanılmıştır (nefrektomi yapılan sıçanların yaklaşık %60'ında ölüm veya model oluşmama durumu beklenebilir).

Sıçanlar üç ay sonunda feda edilmiştir. Kan örnekleri alınıp santrifüj edilerek serumları ayrılmış ve -20 °C'de saklanmıştır. Sıçanların deri dokusu ve diğer organları da alınarak immünohistokimyasal çalışmalar için %10'luk formaldehit içine konulmuş, Western blot analizleri içinde deri doku numuneleri sıvı azotta derhal dondurulmuş ve analiz için -80 ° C'de muhafaza edilmiştir.

3.3. Biyokimya testleri

Sıçanların kan numuneleri EDTA'lı tüpler ve serum jelli tüplere cerrahiden altı hafta ve 14. haftanın sonunda sakrifiye edilmeden alınarak Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Biyokimya Laboratuvarında NUVE NF800 santrifüj cihazı ile 4000 rpm'de

10 dk santrifüj edildikten sonra serum BUN, serum kalsiyum, serum kreatinin, serum fosfor düzeyleri Roche Hitachi Cobas 8000 cihazı ile spektrofotometrik yöntemle ölçülmüştür. Hemogram değerleri Mindray BC6800 cihazı ile ölçülmüştür. İdrar protein tayini ise Labu Mat Uriset cihazı ile damlatma yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

3.4. SDS-PAGE ve Western blot analizi

3.4.1. Doku örneklerinin hazırlanması

Hayvanların feda edilmesinden sonra, deri doku numuneleri sıvı azotta derhal dondurulmuş ve daha fazla analiz için -80 ° C’de saklanmıştır. Daha sonra analizler için numuneler çıkarılıp, porselen havan içinde ezilerek toz haline getirilmiş, tartılmış ve homojenleştirildikten sonra, Bradford metodu kullanılarak protein konsantrasyonları belirlenmiştir.

3.4.2. Dokudan protein izolasyonu

100 mg doku örneği üzerine 1000 µl X Tractor Buffer (Cat. No 635671) lizis (parçalama) çözeltisi ve 10 µl TaKaRa ProteoGuard™ EDTA-Free (Cat. No 635673) proteinaz inhibitör kokteyli eklenmiştir. Doku örnekleri homojenizatör yardımıyla 10 sn boyunca buz üzerinde parçalanmıştır ve bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Örnekler +4 °C’de, 20 dk 16.000 rpm’de Centrifuge 5415 R santrifüj cihazı ile santrifüj edilerek süpernatantlar örnekler için ayrıca adlandırılmış temiz mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve protein miktar tayini gerçekleştirilmiştir.

3.4.3. Protein miktarının ölçümü

Elde edilen total protein miktarının ölçümünde BİO-RAD RC DC™ Protein Assay kiti kullanılmıştır. Kit protokolüne uygun olacak şekilde konsantrasyonları 20 µl reagent s çözeltisi 1 ml DC Reagent A eklenerek Reagent A’ çözeltisi olarak adlandırılmıştır. 5 adet protein standart dilüsyonları 0,2 mg/ml ile 1,5 mg/ml olarak hazırlanmıştır. Her tüpe 100 µl standart pipet yardımıyla alınarak 500 µl Reagent II eklenip vorteks yardımıyla karıştırılmıştır. Daha sonra her tüp 15.000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir. 510 µl Reagent A’ tüplere eklenip vortekslenmiş, 5 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir ve tamamen çözülmesi için tekrar vortekslenmiştir. 4 ml DC Reagent B her tüpe eklenerek vortekslenmiş ve tekrar 15 dk oda sıcaklığında inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda standartların konsantrasyonları GF-M3000 Microplate Reader marka cihazla 750 nm dalga boyunda ölçülerek standart eğri hazırlanmıştır. Dokudan izole edilen protein örnekleri de benzer şekilde

hazırlandıktan sonra absorbans değerleri ölçölüp oluşturulan standart eğri yardımıyla protein miktarları belirlenmiştir.

3.4.4. Örneklerin yükleme için hazırlanması

Daha önceden total protein konsantrasyonları belirlenmiş olan örneklerin her birinden 40 µg olacak şekilde protein karışımı alınmış ve üzerine aynı hacimde 4x laemmlı (BIO-RAD 4X Laemmlı Sample Buffer Cat. No 161-0747) SDS jel yükleme tamponu eklenmiştir. Daha sonra 4x laemmlı tamponunun kullanım protokolüne göre 2-merkaptoethanol (BIO-RAD 2-Mercaptoethanol Cat. No 1610710) eklenmiştir. Bu karışım ile 100 °C’de 5 dk bekletilerek proteinlerin denatürasyonu sağlandıktan sonra yükleme işlemi gerçekleştirilinceye kadar +4 °C’ de bekletilmiştir.

3.4.5. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Elektroforez, protein ve nükleik asitler gibi yüklü taneciklerin belirli bir pH’da elektriksel bir alanda ve iyonize ortamda moleköl büyüklüğü veya yük farklarına göre ayrılması ve saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Elektroforez sırasında kullanılan jel matriksi çeşitli büyüklükteki makromoleküllerin göçünü engelleyen bir moleköler elek özelliği gösterir. Jel matriksi nispeten hareketsiz olup ayrılacak olan moleküllerle etkileşmez.

SDS-PAGE, denatüre edici maddeler kullanılarak proteinlerin poliakrilamid jelde ayrılmasını sağlayan bir tekniktir. Bu teknikte proteinler denatürasyona uğrayarak üç boyutlu yapıdan linear yapıya dönüşerek jelde ayrılırlar. Protein moleköl ağırlıklarına göre jel yüzdeleri belirlenir.

3.4.6. Proteinlerin SDS-poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) yürütülmesi

Jelin dökülmesi sırasında kullanılacak olan camlar önce %70’lik etil alkol, daha sonra distile su ile temizlenmiş ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Üzerinde toz parçası kalmayacak şekilde temizlenmiş olmasına özen gösterilmiştir. Cam plakalar arasına 0,75 mm kalınlığında spacer adı verilen boşluk oluşturucular yerleştirilmiş ve dik vaziyette plaka tutucuya yerleştirilmiştir. Büyük camın üzerine ayıraçlar yerleştirilip üstüne küçük cam kapatılmış ve hava kabarcığı kalmayacak şekilde bantlanarak kıskaçlar ile sabitlenmiştir. Ayırma jelinin döküleceği seviyeyi belirlemek için camların arasına tarak yerleştirilerek tarakların 1,5 cm aşağısı işaretlenmiştir. Bundan sonra ayırma jeli dökülmüştür.

3.4.7. Amonyum persulfat stok çözeltisinin (10 ml, %10'luk) hazırlanması

1 gr amonyum persulfat (APS), distile su ile 10 ml'ye tamamlanarak çözülmüştür. Her kullanım için taze hazırlanmış, karanlık ve soğuk ortamda muhafaza edilmiştir.

3.4.8. %10'luk SDS-PAGE jelinin (ayırma jeli) hazırlanması

TGX stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit, 10% kullanım protokolüne göre 3 ml Resolver A, 3 ml Resolver B ve daha önceden hazırlanan %10'luk APS'den 30 µL (amonyum persulfat, BIO-RAD Ammonium Persulfate Cat. No 161-0700) karıştırılıp, 3 µL N, N, N', N'-tetrametil-etilendiamin (TEMED) (BIO-RAD TEMED Cat. No 161-0800) eklenmiştir.

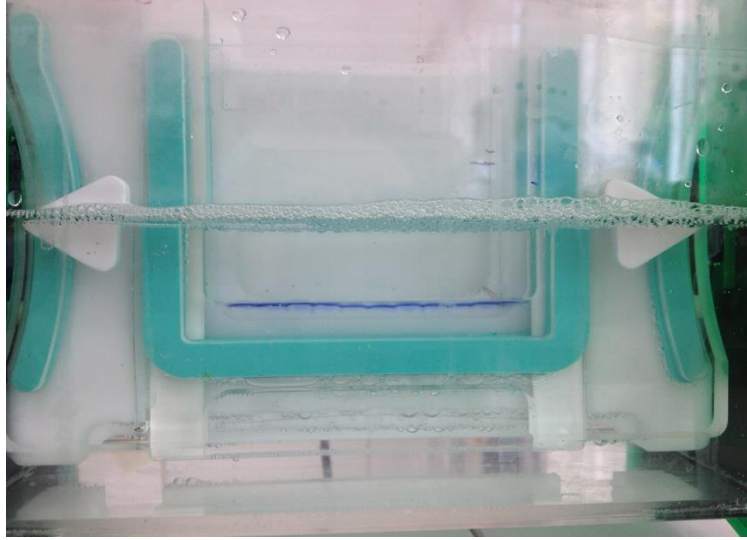
Bu jel karışımı daha önceden hazırlanan camların arasına hava kabarcığı kalmayacak şekilde işaretlenen düzeye kadar dökülmüştür. Jel dik konumda yaklaşık bir saat tutularak polimerizasyonun gerçekleşmesi beklenmiştir. Polimerize olduktan sonra üst kısımdaki %5'lik SDS-PAGE jelinin dökülmesi aşamasına geçilmiştir.

3.4.9. %5' lik SDS-PAGE jelinin hazırlanması;

TGX stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit, 10% kullanım protokolüne göre 1ml Stacker A, 1 ml Stacker B, %10'luk APS (amonyum persulfat, BIO-RAD Ammonium Persulfate Cat. No 161-0700) çözeltisinden 10 µL ve 2 µL TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamin) (BIO-RAD TEMED Cat. No 161-0800) eklenmiştir. Jel karışımı daha önceden polimerize olmuş olan ayırma jelinin üzerine hava kabarcığı kalmayacak şekilde dökülmüş ve tarak yerleştirilerek kısıkaçlar ile sabitlenmiştir. Jel dik konumda yaklaşık bir saat tutularak polimerizasyonun gerçekleşmesi beklenmiştir.

3.4.10. Örneklerin jele yüklenmesi ve elektroforez işlemi

Taraklar çıkartılarak oluşan kuyucuklara, yüklenmeye hazır olan eşit konsantrasyondaki protein örnekleri (40 µL) yüklenerek dikey olacak şekilde elektroforez tankına yerleştirilmiş ve 5X Tris-Glisin elektroforez tamponundan (BIO-RAD Trans-Blot® Turbo™ 5X Transfer Buffer Cat. No 10026938) 1X tampon hazırlanarak (200 ml 5X Transfer Buffer, 600 ml distile su ve 200 ml ethanol ile karıştırılarak hazırlanır) jel tankına dökülmüştür. Elektroforez işlemi 100 V ve 300 mA akım uygulanarak başlatılmış, örnekler ayırma jeline geçtiğinde ise voltaj 150 V'a çıkartılmış ve yükleme boyası jelin alt kısmına gelince işlem sonlandırılmıştır (yaklaşık 1,5-2 saat sonra) (Şekil 13).



Şekil 13. Elektroferez İşlemi.

3.4.11. Elektrobloklama (protein örneklerinin poli-viniliden florür membrana aktarılması)

Bu amaçla yarı-kuru transfer yöntemi kullanılmıştır. Elektroferez işlemi bittikten camların ayrılması ile çıkarılan jelin üst kısmı ve alt kısımları poli-viniliden florür (PVDF) membran büyüklüğüne uygun olacak şekilde kesilip atılmış ve jel 10X TGS (BIO-RAD 10X TGS Cat no 161-0772) ve 1X transfer tamponu (Transfer tamponu son konsantrasyonu %0,1 (w/v) SDS, pH 8,3 olacak şekilde 1 L'e tamamlanmıştır; 100ml 10X TGS Buffer 900ml distile su ile karıştırılarak hazırlanmıştır) içeren kabın içerisine alınmıştır. Başka bir kabın içerisinde PVDF membran (BIO-RAD TransBlo® Turbo™ Mini-size PVDF Membrane) transfer tamponu içerisinde ıslatılmıştır. Önceden transfer tamponu ile ıslatılan filtre kâğıtları kullanıldı. Membran filtre kâğıtları ve jel 15 dk transfer tamponu içinde bekletilmiştir. Elektroforetik transfer için membran ve protein içeren jel filtre kâğıtları ile (iki filtre kağıdı arasına üstte jel altta ise membran olacak şekilde) BIO-RAD TRANS-BLOT® SD SEMI-DRY TRANSFER CELL marka transfer cihazının iki elektrodu arasına hava kabarcıkları kalmamasına dikkat edilerek yerleştirilerek transfer işlemi 200 mA' de 18 V akımda 20 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir (Şekil 14).



Şekil 14. Protein Örneklerinin Nitroselüloz Membrana Aktarılması ve Semi-Dry Sistem.

3.4.12. Proteinlerin işaretlenmesi

Membrana aktarımdan sonra protein immünolojik etkileşimlerle saptamak için sırasıyla bloklama, primer antikor ile inkübasyon, yıkama, sekonder antikor ile inkübasyon ve tekrar yıkama işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Bu işlemler için TBS (Tris-tuz 500ml), TBS-T (Tris-tuz-Tween20 100ml), bloklama solüsyonu, primer antikor ve sekonder antikor çözeltileri hazırlanmıştır.

3.4.13. TBS (Tris-tuz 500 ml) çözeltisi

10 mM Tris-HCL ve 50 mM sodyum klorür olacak şekilde distile su ile 500 mL'e tamamlanarak hazırlanabilen çözeltilerden (BIO-RAD 10X TBS (CAT. No 64170411)) 100 ml alınarak distile su ile 1 L'e tamamlanarak hazırlanmıştır.

3.4.14. TBS-T (Tris-tuz-Tween20 100ml)

TBS-T, 100 ml TBS çözeltisi içine 100 µL Tween-20 BIO-RAD Tween-20 (Cat. No 170-5017) eklenerek her Western blot işlemi için taze olacak şekilde hazırlanmıştır.

3.4.15. Bloklama solüsyonu

2,5 gr yağsız süt tozu (BIO-RAD Blotting-Grade Bloker Cat. No 170-6404) 50 ml TBS-T çözeltisi ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

3.4.16. Primer antikor çözeltisi

%5 yağsız süt tozu içeren 10 ml TBS-T çözeltisi SinoGenecClon biotech co.,Ltd marka HRP Linked Polyclonal Goat Anti-rabbit IgG (H+L) Antibody (Cat. No SG-30212G) primer antikor 1:1000 oranında sulandırılarak hazırlanmıştır.

3.4.17. Sekonder antikor çözeltisi

%5 yağsız süt tozu içeren 20 ml TBS-T çözeltisi SinoGenecClon biotech co.,Ltd marka Rabbit Anti-FGF23 antibody antikorunu (cat no. SG-15768R) sekonder antikor 1:2000 oranında sulandırılarak hazırlanmıştır. Sekonder antikor seçilirken primer antikorun hangi türde üretildiğine dikkat edilmiştir. Primer antikor tavşandan olduğu için sekonder antikor anti-rabbit olarak seçilmiştir.

3.4.18. Bloklama

Membran yüzeyine antikorun özgül olmayan bağlanma yapmasını engellemek için (TBS) bloklama tamponu kullanılmıştır. Bu tampona kullanmadan hemen önce Tween20 eklenmiştir. Daha sonra yağsız süt tozu eklenerek hazır hale getirilmiştir. Tampon ile bloklama işlemi 1 saat oda sıcaklığında otomatik karıştırıcı üzerinde gerçekleştirilmiştir.

3.4.19. Membran üzerindeki proteinin immünolojik gösterilmesi

Dokuda ifade edilen proteininin gösterilmesi için primer antikor bloklama amaçlı kullanılan tamponun içerisinde 1:1000 oranında seyreltilmiştir. Membran 4°C'de otomatik karıştırıcı kullanılarak bir gece inkübe edilmiştir. Süre sonunda membran TBS-T içerisinde 15 dk otomatik karıştırıcı ile yıkanmış ve yıkama işlemi iki kez tekrar edilmiştir. Sonra proteinleri görünür hale getirebilmek için, primer antikorları tanıyacak olan 1:1000 oranında sulandırılan SinoGenecClon biotech co.,Ltd marka Rabbit Anti-FGF23 antibody antikorunu (cat no. SG-15768R) ile tekrar 60 dk inkübe edilmiştir. Süre sonunda tekrar TBS-T içerisinde 15 dk 3 tekrarlı olacak şekilde yıkanarak film çekimine geçilmiştir.

3.4.20 Film çekimi

Membran üzerine üretici firma talimatına uygun olarak reaktifleri 1:1 oranında karıştırılan BIO-RAD Clarity™ Western ECL Substrate Peroxide solution ve BIO-RAD Clarity™ Western ECL Substrate Luminol/ enhancer solution ile kaplandı ve 5 dakika bekletilmiştir. Sonra kaset içerisine membran ve KODAK Film yerleştirilerek 1-3 dk bekletilmiş ve film banyosu aşamasına geçilmiştir. Bunun için KONIX® Manuel Developer ve Fixer çözeltileri kullanılmıştır. Bu solüsyonlarda ikişer dakika bekletildikten sonra film distile su ile yıkanmış ve protein bantları analiz edilmiştir. Daha sonra elde edilen bu protein bantları, Ulusal Sağlık Enstitüleri ve Optik ve Hesaplamalı Enstrümantasyon Laboratuvarı'nda geliştirilen Java tabanlı bir görüntü işleme programı olan ImageJ ile analiz edilmiştir.

3.5. FGF23 ve 1,25 (OH)₂ D₃'ün ELISA ile tayini (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Tez kapsamında, FGF23 ve 1,25(OH)₂ vitD parametrelerine yönelik her denekten biyokimya tüpüne kan alınmıştır. Biyokimya tüpüne alınan kanlar 10'ar dk süreyle 4000 devirde santrifüj edilerek serumları ayrılmış, bu serumlar -80 °C'de muhafazaya alınmıştır. Çalışmada kullanılan ELISA kitleri de benzer şekilde kullanım gününe kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. -80 °C'de muhafaza edilmiş olan serumlar laboratuvarında işlemde 4 saat önce 2 °C'lik bölmeye alınmış ve çözülen bu serumlardan aynı gün, eş zamanlı olarak FGF23 ve 1,25(OH)₂ vitD düzeyleri çalışılmıştır.

Çalışmamızda GF-M3000 Microplate Reader marka cihazla uygun olarak SinoGeneClon Biotech Co.,Lth Sıçan 1,25-dihidroxyvitamin D₃ (DHVD₃) ELISA kit 1,25-OH vit D düzeyleri sensitivitesi 3,9 pg/ml normal aralığı 37,5 pg/ml -1200 pg/ml (Cat. No.: SG-21413); Sıçan Fibroblast Growth Factor-23 (FGF23) düzeyleri sensitivitesi 0,19 pg/ml normal aralığı 1,56 pg/ml-100 pg/ml (Cat. No.: SG-20380) ELISA kitleri kullanılmıştır. Tüm uygulamalar kitlerin protokollerine uygun şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.6. İmmünohistokimya

Çalışmamızda FGFR1'in immünohistokimyasal belirteçleri Üremik ve Sham Grup sıçan derilerinde boyanmıştır.

Fiksasyon amacıyla %10'luk formaldehitte 24 saat bekletilen doku örnekleri doku takip işlemine alınmıştır. Sacura marka Doku Takip Cihazı ile 15 saat süren doku takip işleminde alkol, ksilen ve parafin aşamalarından geçirilerek dehidratasyon, şeffaflandırma ve doku sertleştirme yapılmıştır. Daha sonra Thermo Shandon marka doku gömme cihazında parafine gömme işlemi yapılarak dokular blok haline getirilmiştir. Bloklar buzdolabında soğutulduktan sonra Leica marka mikrotom cihazında 2,5 mikron kalınlığında kesitler alınmıştır. İmmünohistokimya boyaması yapılacak olanlar pozitif yüklü lama, Hematoksilen-Eozin boyama yapılacak olanlar normal lama alınmıştır. Kesit alınan preparatlar deparafinizasyon işlemi için etüve kaldırılarak 65 °C'de 1,5 saat bekletilmiştir. Etüvden çıkarılan hematoksilen-eozin boyaması yapılacak preparatlar ksilende 20 dakika bekletilmiştir. Etil alkol serilerinde (%100, %90, %80) 10 dk tutularak çeşme suyunda yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra Hematoksilen boyasında (Facepath marka) 2,5 dk bekletilmiştir. Tekrar çeşme

suyunda yıkandıktan sonra asit alkol solüsyonuna 1 defa batırılıp tekrar çeşme suyuna alınmıştır. Amonyaklı suya 3 defa batırılarak tekrar çeşme suyunda yıkamaya alınmıştır. Yıkama işleminden sonra Eozin solüsyonunda 1,5 dk bekletilmiş ve alkol serilerine (%80, %90, %10) 4-5 defa batırılarak boyama işlemi tamamlanmıştır.

İmmünohistokimya boyaması yapılacak preparatlar etüvden çıkarılarak Ventana Benchmark XT cihazına alınmıştır. FGFR-1 (SinoGeneClon, Concentrate,1/25 Dilüsyon, polyclonal, Ventana Benchmark XT (2013, Arizona) immünohistokimya cihazında 32 dk inkübasyon işlemine alınmıştır. Yaklaşık 4,5 saat süren işlemin ardından preparatlar cihazdan çıkarılarak yıkamaya alınmış ve kuruması için etüve kaldırılmıştır.

Boyaması tamamlanan preparatlar etüvden çıkarılarak ksilende şeffaflanması için 10 dk bekletilmiştir. Ksilenden çıkarılan preparatlara entellan damlatılarak lam üzerine lamel kapatılmış ve ardından mikroskopik incelemeye geçilmiştir.

3.7. İstatistiksel analiz

Tüm deney sonuçları sayısal verilere dönüştürüldükten sonra SPSS programı (Windows vers. 17.0) kullanılarak istatistiksel değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir. Tanımlayıcı veriler sayı, yüzde, ortalama±standart sapma (ort±ss), minimum ve maksimum olarak verilmiştir. Bağımlı grup ortalamalarının (aynı grubun başlangıç ve son değerlerinin) karşılaştırılmasında Wilcoxon Signed Ranks Testi kullanılmıştır. Bağımsız grupların (Üremik Grup ve Sham Grup) ortalamalarının değerlendirilmesinde Mann-Whitney U Testi (MWU) kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak alınmıştır.

4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında, 5/6 nefrektomi kronik böbrek yetmezliği modeli uygulanarak üremi oluşturulan Wistar Albino cinsi sıçanlar kullanılmıştır. Toplam 30 Wistar Albino cinsi sıçan, 8 Sham Grup (SG) ve 22 Üremik Grup (ÜG) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Deney süresince toplam bir sıçan anestezi nedeniyle kaybedilmiştir (%3,3). Deneyin takibi sırasında beş sıçan (%16,6), bir sıçan ise cerrahi prosedürün hemen akabinde kaybedilmiştir. Deney sonunda ÜG'de üremi düzeyi en düşük olan yedi sıçan analizlerden dışlanmıştır. Son analizler sekiz Sham Grup ve sekiz Üremik Grup olmak üzere 16 sıçan üzerinden gerçekleştirilmiştir.

Deney süresince üremik grupta vücut ağırlığı kaybı, Sham Grupta ise vücut ağırlığı artışı görülmüştür. Üremik Grup başlangıç ağırlığı ortalama $308,0 \pm 16,8$ gr; deney sonu ağırlığı ise ortalama $281,3 \pm 14,3$ gr olarak bulunmuştur (Wilcoxon Signed Ranks Testi, $p < 0,05$). Sham Grup başlangıç ağırlığı ortalama $306,9 \pm 16,0$ gr; deney sonu ağırlığı ise ortalama $340,0 \pm 19,5$ gr olarak bulunmuştur (Wilcoxon Signed Ranks Testi, $p < 0,05$). Deney başlangıcında grupların ağırlıkları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değil iken (MWU Testi, $p > 0,05$) deney sonu ağırlıkları anlamlı şekilde farklı olarak bulunmuştur (MWU Testi, $p < 0,001$). Deney sonlarına doğru ÜG'deki sıçanlarda belirgin şekilde kaşınma davranışında artış gözlenmiştir (skorlanmadı).

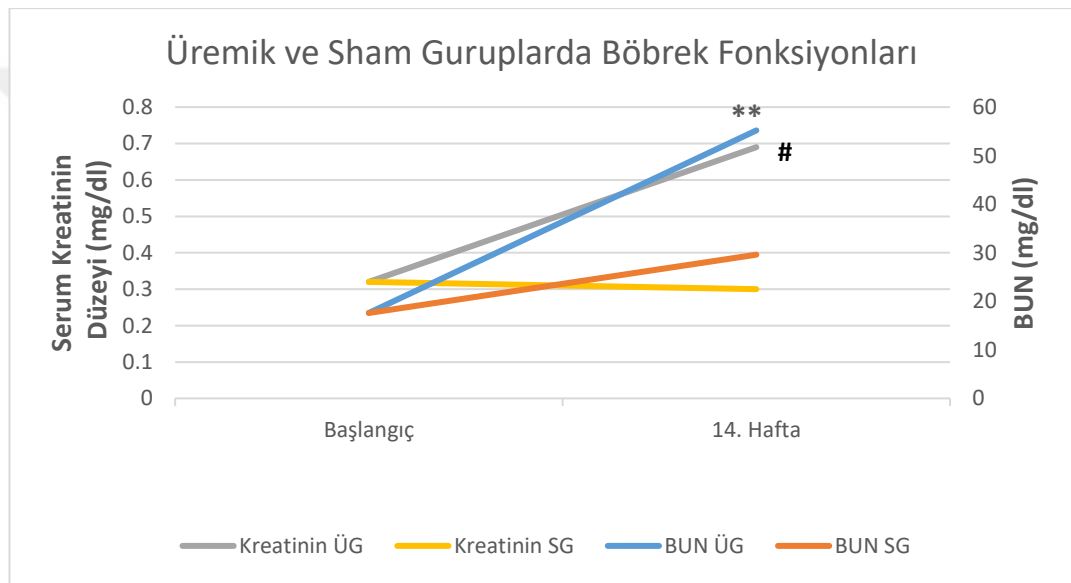
Sıçanlar gruplara ayrılmadan önce, başlangıç değeri olarak, körleme olarak seçilen sekiz tanesinden kan alınarak biyokimyasal analizler yapılmıştır (Tablo 7). Model oluşumunu tespit etmek amacıyla, deneyin altıncı haftasında ÜG'den alınan kanlarda kan üre azotu ($48,7 \pm 7$) ve kreatinin ($0,66 \pm 0,12$) değerlerinin başlangıç değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı görülmüştür (Wilcoxon Signed Ranks Testi, $p < 0,05$).

Tablo 7. Biyokimya Değerleri.

	*Başlangıç Değerleri (n=8)	SG**(n=8)	ÜG** (n=8)	p ₁	p ₂	p ₃
BUN (mg/dl, ort±ss)	17,6±2,6	29,6±6,8	55,2±8,9	0,002	0,008	0,063
Kreatinin (mg/dl, ort±ss)	0,32±0,08	0,3±0,04	0,69±0,08	0,003	0,031	1,00
P (mg/dl, ort±ss)	7,9±1,3	5,7±1,4	7,3±1,1	0,093	0,125	0,063
Ca (mg/dl, ort±ss)	11,7±1,5	9,9±0,5	9,9±0,4	0,833	0,016	0,375
Mg (mg/dl, ort±ss)	2,3±0,2	2,6±0,2	3,0±0,3	0,019	0,016	0,375
<p>*Sıçanlar gruplara ayrılmadan önce alınmış olan serum değerleri</p> <p>** Deneyin 14. Haftasında alınan serum değerleri</p> <p>p₁ değeri ÜG ve SG'nin deney sonu biyokimya değerlerinin karşılaştırılmasını temsil etmektedir (MWU Testi)</p> <p>p₂ değeri ÜG ile Başlangıç Değerleri karşılaştırılıyor (Wilcoxon Signed Ranks Test)</p> <p>p₃ değeri SG ile Başlangıç Değerleri karşılaştırılıyor (Wilcoxon Signed Ranks Test)</p>						

Ayrıca hayvanların deney başlangıç ve deney sonu kalsiyum, fosfor ve magnezyum değerleri de karşılaştırılmıştır. Buna istinaden sonuçlar sırasıyla; kalsiyum ($11,7\pm1,5/9,9\pm0,4$) ÜG ile başlangıç değerleri arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Aynı zamanda fosfor değeri ($7,9\pm1,3/7,3\pm1,1$) ($p>0,05$) ve magnezyum değeri ($2,3\pm0,2/3,0\pm0,3$) anlamlı bulunmuştur. ($p<0,05$)

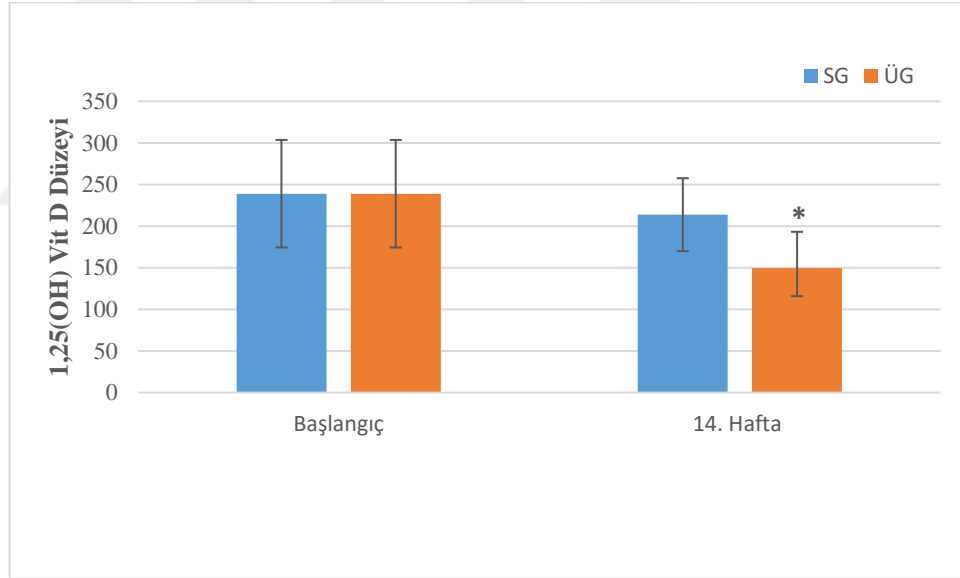
Hayvanlarda ÜG için deney başlangıç ve deney sonu hemoglobin $16,2\pm0,3$ ve $15,5\pm2,0$, lökosit $9,0\pm1,7$ ve $6,6\pm2,5$ ve trombosit 609 ± 219 ve 852 ± 119 şeklinde bulunmuştur.



Şekil 17. ÜG ve SG'nin kan üre nitrojeni (BUN) ve kreatinin değerleri. **Serum kreatinin ve BUN düzeyleri başlangıç değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksektir (Wilcoxon Signed Ranks Testi, sırasıyla, $p=0,031$ ve $p=0,008$). #Deney sonu ÜG'nin BUN ve Kreatinin düzeyleri SG'ye göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksektir (Mann Whitney U Testi, sırasıyla, $p=0,002$ ve $p=0,003$).

4.1. Serum 1,25(OH)₂ D₃ Düzeyleri

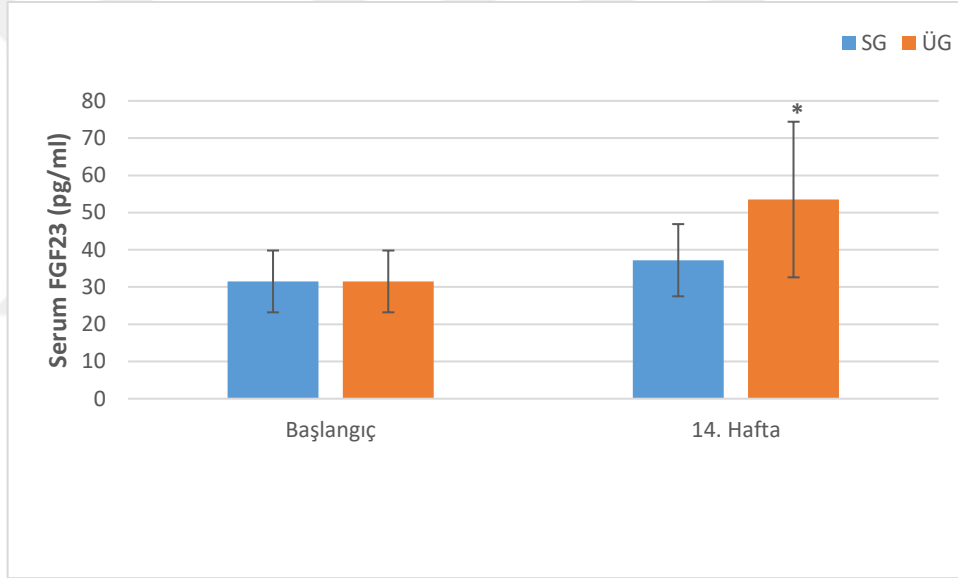
SG' de deney başlangıcı 1,25(OH)₂ D₃ düzeyleri 239,0 ±64,6, deney sonunda 213,8±43,8 olarak bulunmuştur (Wilcoxon Signed Ranks Testi, p>0,05). ÜG' nin deney sonu 1,25(OH)₂ D₃ düzeyi (149,4±33,5) SG' ye göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (MWU Testi, p<0,05). ÜG' nin deney sonundaki 1,25(OH)₂D₃ düzeyi başlangıç düzeyine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük bulunmuştur (Wilcoxon Signed Ranks Testi, p<0,05).



Şekil 18. Üremik (ÜG) ve Sham Gruplarının (SG) deney başlangıcı ve sonu 1,25(OH) vit D düzeyleri. *ÜG'nin deney sonu 1,25(OH) vit D düzeyi SG'ye göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüktür ((Mann Whitney U Testi, p<0,05).

4.2. Serum FGF23 Düzeyleri

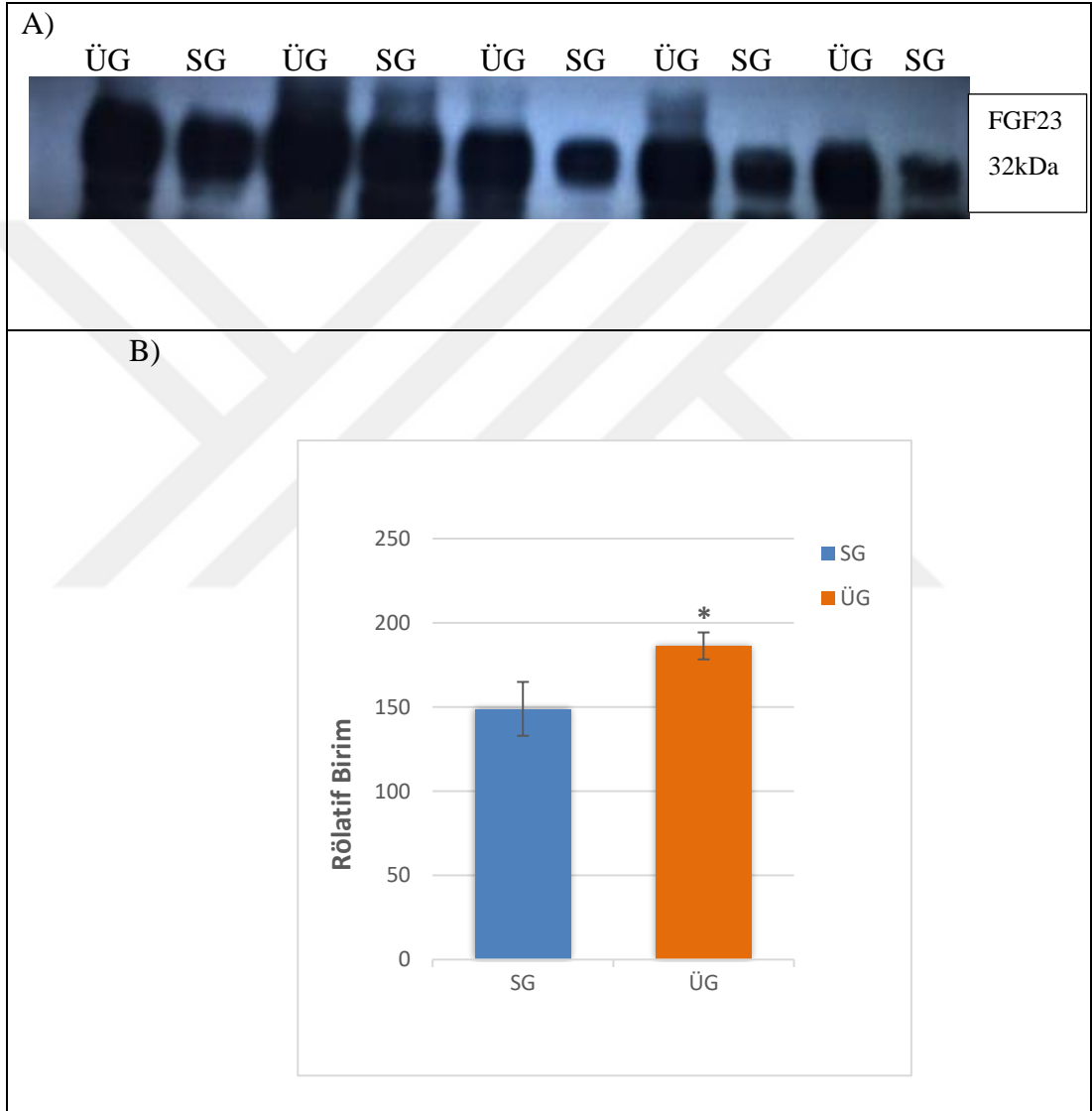
SG' de deney başlangıcı FGF23 düzeyleri $31,5 \pm 8,3$, deney sonunda $37,2 \pm 9,7$ olarak bulunmuştur (Wilcoxon Signed Ranks Testi, $p > 0,05$). ÜG' nin deney sonu FGF23 düzeyi ($53,5 \pm 20,9$) deney başlangıç düzeyine göre ($31,5 \pm 8,3$) istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olarak bulunmuştur (Wilcoxon Signed Ranks Testi, $p < 0,05$). Deney sonunda ÜG' nin FGF23 düzeyi SG' ye göre daha yüksek bulunmuştur, ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (MWU Testi, $p = 0,072$).



Şekil 19. Üremik (ÜG) ve Sham Gruplarının (SG) deney başlangıcı ve sonu serum FGF23 düzeyleri. * ÜG' nin deney sonu FGF23 düzeyi deney başlangıç düzeyine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksekti (Wilcoxon Signed Ranks Testi, $p < 0,05$). Deney sonunda ÜG' nin FGF23 düzeyi SG' ye göre daha yüksekti, ancak aradaki fark istatistiksel olarak önemli değildi (MWU Testi, $p = 0,072$).

4.3. Deride FGF23 Düzeyi (Western Blot)

Sıçanların sırt derisinde FGF23 ekspresyonu Western Blot ile belirlenmiştir. Dansitometrik analizde, deride FGF23 protein düzeyi ÜG' de $186,3 \pm 16,8$; SG' de ise $148,9 \pm 25,9$ olarak bulunmuştur (MWU Testi, $p < 0,01$).



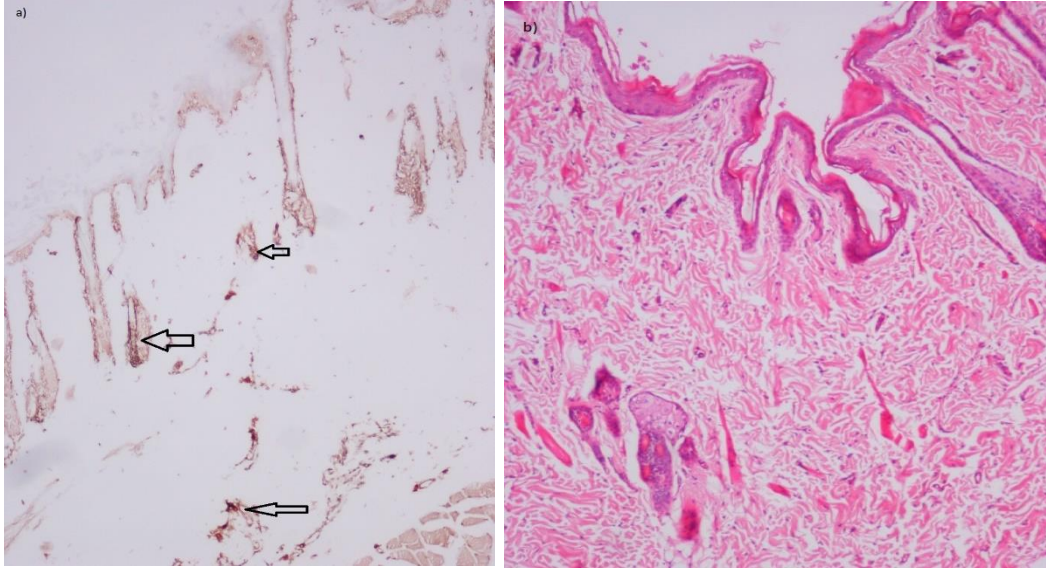
Şekil 20. FGF-23' ün derideki ekspresyonu (Western Blot analizi). A) Üremik Grup (ÜG) ve Sham Gruplarının (SG) derideki temsili FGF-23 protein bantları. B) *Dansitometrik analizde, ÜG' deki FGF23 protein ekspresyonu SG' ye göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksektir (Mann Whitney U Testi, $p < 0,01$).

4.4. Deri İmmünohistokimya Bulguları

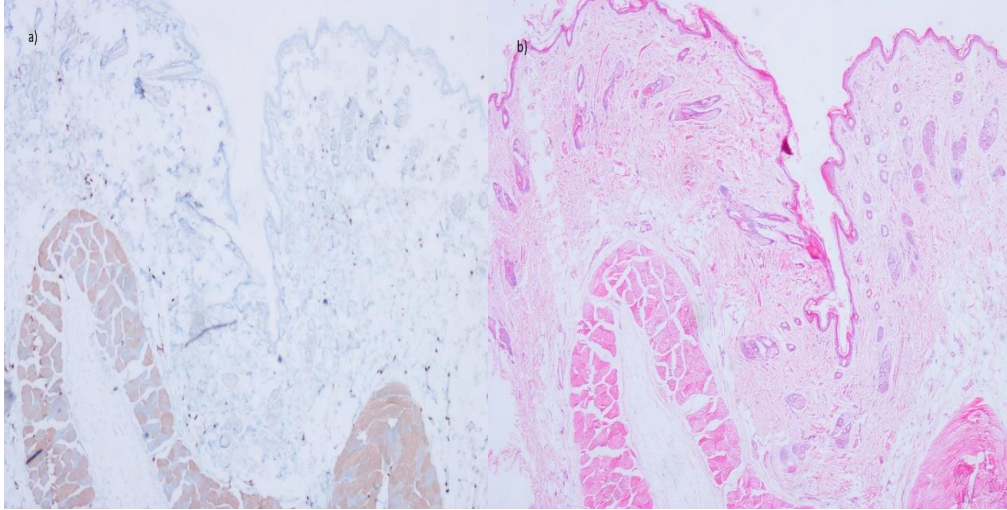
Ayrıntılı FGFR1 immünohistokimya boyanma özellikleri Tablo 8'de gösterilmiştir. FGFR1 yoğunluğunun üremik sıçanlarda sham sıçanlara göre tüm deri elemanlarında daha fazla olduğu görülmüştür. SG' de, FGFR1 boyanması çoğu sıçanda hiç tespit edilmemiş, boyanma tespit edilen birkaç sıçanda ise, azami 1+ (zayıf boyanma) şeklinde gözlenmiştir. SG' deki pozitif boyanmalar bütün deri elemanlarında birbirine benzer şekildedir. ÜG' de ise en yoğun boyanma kıl folliküllerinde ve epidermiste görülmüştür; boyanmalar çoğunlukla "2+" veya "net boyanma" olarak değerlendirilmiştir. Kıl foliküllerinin elemanları olan sebese bezler ve erekör pili kasındaki boyanmalar diğer kıl folikülü elemanlarına göre daha zayıf şekilde gözlenmiştir. ÜG' nin ter bezleri ve kan damarlarındaki boyanmalar, SG' ye göre daha belirgin olmakla beraber, kendi grubundaki epidermis ve kıl foliküllerine göre zayıftır.

Tablo 8. Deride FGF Reseptör 1 Dağılımı.

	FGF reseptör 1 yoğunluğu	
	SG	ÜG
Epidermis		
Suprabazal katmanlar	0 (0-1)	2 (1-2)
Bazal katman	0 (0-1)	1,5 (1-2)
Pilosebese aygıt	0 (0-1)	1,5 (1-2)
Kıl Folikülleri		
Matriks	0 (0-1)	2 (1-2)
İç kök kılıfı	0 (0-1)	2 (1-2)
Dış Kök Kılıfı	0 (0-1)	2 (1-2)
Dermal papilla	0 (0-1)	2 (0-2)
Sebese bezler	0 (0-1)	0 (0-2)
Erekör pili kası	0 (0-1)	0 (0-2)
Ter Bezleri	0 (0-1)	0 (0-2)
Kan Damarları	0 (0-1)	0 (0-2)
Reseptör yoğunluğu, görsel olarak şu şekilde değerlendirildi: Yok (0); Zayıf boyanma (1); Net boyanma (2); Güçlü boyanma (3). Tabloda verilen rakamlar medyan (minimum-maksimum) boyanma derecesini temsil etmektedir.SG: Sham Grup ÜG: Üremik Grup		



Şekil 15. Üremik Grup, FGFR 1 IHK ve hemotoksilen eozin boyaması a) FGFR-1. ÜG'da epidermiste bazal ve suprabazal boyanma. IHKx100 büyütme b) FGFR-1 ÜG'da epidermiste bazal ve suprabazal boyanma. HEx100 büyütme



Şekil 16. Sham Grup, FGFR 1 IHK ve hemotoksilen eozin boyaması a) SG, FGFR1 epidermiste bazal ve suprabazal boyanma. IHKx40 büyütme b) SG, FGFR1 epidermiste bazal ve suprabazal boyanma. HEx40 büyütme

5. TARTIŞMA

Bulgularımızı özetleyecek olursak, Üremik Grupta GFR anlamlı şekilde azalmıştır. Üremik Grupta 1,25(OH)₂D₃ düzeyi Sham Gruba göre anlamlı şekilde düşmüştür. Serum FGF23 düzeyi Üremik Grupta belirgin şekilde artmıştır. Western Blot ile tespit edilen deri FGF23 düzeyi istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır. Rutin histopatolojik ve immünohistopatolojik incelemede ise, üremik sıçanların birçok deri elemanlarında FGFR1 yoğunluğunun arttığı tespit edilmiştir.

Kronik böbrek yetmezliği (KBY), böbreklerin yavaş yavaş işlevini kaybettiği uzun ve genellikle yavaş bir süreçtir. KBY bazı kişilerde son dönem böbrek yetmezliğine (SDBY) kadar ilerlemektedir. SDBY, hematopoetik bozukluklar, kemik-mineral dengesi bozuklukları, yüksek kardiyovasküler hastalık riskleri ve yüksek ölüm oranlarıyla karakterize bir sendromdur (üremik sendrom). Üremik sendromda deri ile ilgili bozukluklar sıklıkla görülmektedir (5).

Üremik hastalardaki deri bulgularının patogenezi konusundaki bilgiler yetersizdir. Kalsiyum, fosfor ve parathormon metabolizmasındaki bozuklukların deri bozukluklarına neden olabileceği bildirilmiş, fakat bozuklukların tamamını açıklamaktan uzaktır. Bildiğimiz kadarıyla FGF23'ün üremik bir toksin olarak deri bulgularıyla ilişkili olabileceğine dair bir hipotez İngilizce ve Türkçe literatürde mevcut değildir.

Üremik deri hastalıklarının patogenezinde birçok faktörün sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür. Paratiroid hormon ve divalan iyon metabolizması bozuklukları ve mast hücrelerle ilgili bozukluklar; histamin, seratonin ve substans P'nin karıştığı olaylarla ilgili düzensizlikler; ter ve yağ glandüler yapılarındaki atrofi, sinirlerin terminal dallanmadaki bozuklukları, üzerinde durulan mekanizmalardan bazılarıdır. İmmün sistemi ilgilendiren bozukluklar ve opioid reseptör sistemindeki dengesizlik ile ilgili bulgular da bildirilmiştir. Kalsifik üremik arteriyolopatide divalan iyon metabolizması yanında kalsifikasyon inhibitör moleküllerdeki dengesizliğin rolü olabileceği ileri sürülmüştür (5). Tüm bu bulguların oluşumunda üremik toksinlerin merkezi bir rolü vardır.

Üremik toksin birikimi inflamasyon artışı ve çeşitli metabolik yolları etkilemek yoluyla deri bulgularının ortaya çıkışına yol açabilir. Nitekim üremik kaşıntısı olan bazı diyaliz hastalarında kullanılan diyalizör membranı değiştirildiğinde kaşıntının azaldığını bildiren çalışmalar vardır; membran değişikliğine bağlı olarak

kaşıntının azalması, membranın kaşıntıyla ilgili üremik toksinleri uzaklaştırma kapasitesiyle ilişkilendirilmiştir (119).

Daha önceki çalışmalarda, üremide görülen kemik mineral bozukluğu ile deri bulguları arasında bir bağ üzerinde durulmuştur. Üremik kaşıntısı olan hemodiyaliz hastalarında yapılan bir çalışmada deri kalsiyum içeriğinin arttığı bildirilmiştir (41). Kaşıntı patogenezinde kalsiyum, fosfor, PTH ve D-vitamini ile ilişkili bozuklukların rolüyle ilgili bulgular olmasına rağmen, aralarında her zaman yüksek korelasyon tespit edilememektedir (42,43). Deri kalsiyum içeriğiyle ilgili olarak yapılan başka bir çalışmada, deri kalsiyum içeriğinin serum kalsiyum, serum fosfor ve diyaliz süresiyle ilişkili olmadığı bildirilmiştir.

Bu çalışmada aşikar hiperparatiroidi olmadıkça deri kalsiyum içeriğinin genelde normal olduğu, paratiroidektomi yapıldığında deri kalsiyum içeriğinin çoğunlukla azaldığı, ama bazı hastalarda değişmediği bildirilmiştir. Yüksek diyalizat kalsiyumu kullanıldığında deri kalsiyum içeriğinin de arttığı gözlenmiştir (44).

FGF23 artışı ile fosfor, kalsiyum ve D vitamini arasındaki ilişki göz önüne alındığında, bulgularımız; kemik-mineral bozukluğu 'hipotezine' yeni bir boyut katmaktadır. Yani FGF23 artışının lokal olarak kalsiyum, fosfor ve D vitamin metabolizmasını değiştirip deri bulgularına katkıda bulunma olasılığından söz edebiliriz.

FGF23 esas olarak osteoblast ve osteositlerden salgılanır ve hedef organı esas olarak böbreklerdir; bir yandan kemik fosfat akışına göre böbrekten fosfat atılımını sağlarken diğer yandan vitamin D sentezini engellemek ve yıkımını arttırmak suretiyle aşırı fosfat birikimine engel olur. Genel olarak, hücre gelişimi, metabolizma ve onarımıyla ilgili fonksiyonları vardır. FGF23 molekülünün aşırı fonksiyonu çocuklarda otozomal dominant hipofosfatemik riketse, fonksiyon kaybı ise yumuşak doku kalsifikasyonuna neden olur (familyal tümöral kalsinosis). FGF23 geni 12. kromozomda lokalizedir ve böbrek dışındaki organlarda eksprese olmaktadır (6).

Klotho, yaşlanmayı geciktiren bir moleküldür; kemirgen çalışmalarında Klotho eksikliğinin yaşam süresini azalttığı, buna karşılık aşırı ekspresyonunun da yaşam süresini %30 arttırdığı bildirilmiştir (8). α -Klotho eksikliğinde, memeli yaşlanmasının özellikleri olan organ atrofisi, infertilite, vasküler kalsifikasyon, ateroskleroz, osteomalazi ve osteoporoz gibi sorunların oluşabildiği bildirilmiştir (9). İki tür α -Klotho proteini vardır: Birincisi, 140 kDa ağırlığında, 1012 aminoasit uzunluğunda, membrana bağlı form, membranı bir kez geçen, intrasitoplazmik uzantısı olan bir

proteindir. İkincisi, 62 kDa, 549 aminoasit uzunluğunda, serumda bulunan salgılanmış proteindir (120). Doku proteininin antioksidan, antiapoptotik, damar koruyucu ve damar oluşturuıcı özellikleri bildirilmiştir (10-12,121). α -Klotho birçok dokunun yanı sıra deride de açığa çıkmaktadır; epidermal hücrelerde, yağ bezleri ve kıl foliküllerinde yoğun biçimde ortaya çıktığı bildirilmiştir (15).

β -Klotho geni, FGF23'ün dokuya spesifik etkiler kazanmasını sağlayan faktörlerin sentezini sağlar. α -Klotho geni ise α -Klotho proteininin sentezini sağlar. α -Klotho eksikliğinde deri atrofisi de dahil olmak üzere yaşlanma belirtileri görülmektedir. Protein ekspresyonu birçok organda gerçekleşmektedir. FGF23 etkinliği için FGF reseptörleri ve α -Klotho protein ko-ekspresyonu gereklidir. α -Klotho eksikliği FGF23 rezistansına yol açmakta ve bulgular FGF23 eksikliğini taklit etmektedir (6) .

Klotho gen delesyonu yapılan sıçanlarda yara iyileşmesinde zorluk ve deri atrofisi gözlenmiştir (yaşlı deri özellikleri) (14). Vücut sıvılarında da serbest α -Klotho tespit edilebilmektedir. Serbest α -Klotho, insülin like growth factor 1 aktivasyonunu engellediği ve hücre yaşam süresini uzatmasının bununla ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür. Salgılanmış α -Klotho, temel görevi böbrekte kalsiyumun hücre içine geçişini sağlamak olan transient reseptör potansiyel katyon kanal alt aile V üyesi 5 (TRPV5) proteininin internalize edilmesini engeller. α -Klotho infüzyonu kalsiyum reabsorbsiyonunu ve Vitamin D konsantrasyonunu artırır, öte yandan fosfat atılımını da artırır. Kronik böbrek yetmezliği durumunda α -Klotho konsantrasyonu azalır, bununla ilişkili olarak kalpte hipertrofi ve vasküler kalsifikasyon görülür. İnsan aortik endotel hücrelerinde yapılan deneylerde, Klotho eksikliği nedeniyle oluşan endotel disfonksiyonu, serbest Klotho infüzyonuyla düzeltilememiştir. Dolayısıyla doku Klotho ekspresyonunun sayesinde FGF23'ün bazı etkilerinin oluşabileceği ileri sürülebilir. Yine bu çalışmada, vasküler endotel hücrelerin fosfatla muamele edilmesi de α -Klotho ekspresyonunu azaltmıştır (122).

Dört çeşit FGF reseptörü mevcuttur. FGF23, 1, 3 ve 4 olarak adlandırılan alt tipleri aktive edebilir; reseptörünü aktive etmesi için α -Klothoya ihtiyaç vardır. Böbrekteki etkiler için FGFR1 ve Klotho etkileşiminin ön planda olduğu bildirilmiştir (6). Sol ventrikül hipertrofisi oluşumunda FGFR4 aktivasyonunun rol oynadığı bildirilmiştir (123). Üremik sıçanlarda FGF ekspresyonundaki artış ile birlikte FGFR1 ekspresyonunun artış deri bulguları ile FGF 23 arasında bağ olabileceğine dair tezi güçlendirmektedir.

Takenaka ve ark., insanlarda yaptığı çalışmada, yaralanmış insan derisinde FGFR1 yoğunluğunun özellikle epidermiste bazal tabakada arttığını göstermişlerdir (124). İnsanda ve hayvanlarda sentezlenen çok sayıda FGF çeşidi vardır; bunlardan bir kısmının deride yara iyileşmesi, çeşitli hücrelerin proliferasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (125). Ancak, özel olarak, FGF-23 ve FGFR1'in normal derideki rolüne ilişkin fazla literatür bulunmamaktadır. Üremik insan veya hayvanlarda FGF-23 ve FGFR1'in derideki rolü bilinmemektedir. Bu bakımdan çalışmamız bu tür çalışmalar için bir başlangıç olarak alınabilir.

FGF23 regülasyonunda $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ konsantrasyonu önemlidir; $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ konsantrasyonundaki artış FGF23'ü artırır. FGF23 sentezi Vitamin D reseptörü (VDR) aktivasyonu aracılığıyla olmakla beraber, VDR dışı aktivasyon yolları da bildirilmiştir. Hayvan çalışmalarında serum fosfat düzeyindeki dalgalanmalar ile FGF23 düzeylerini kısa vadede etkilemediği, FGF konsantrasyonlarındaki artış ve azalışların gecikmeli olarak ortaya çıktığı bildirilmiştir.

PTH artışı FGF23 düzeyini arttırmaktadır, fakat PTH etkisi de kısmen Vitamin D ile ilişkilidir. Leptin ve östrojen FGF23 sentezini arttırmaktadır (6). Elde ettiğimiz bulgularda kalsitriol düşüklüğü ve FGF23 düzeyi yüksekliği bu modelde (5/6 nefrektomi modeli) daha önce bildirilmiş bulgularla uyumludur. Fakat deride FGF23 ekspresyonunun artışı ilk olarak bizim çalışmamızda elde edilmiş bir bulgudur. FGF23 artışı ile deri bulguları arasında nedensel bir ilişki olduğunu kesin olarak ispat etmez. Üremik sıçanların derisinde FGF23 artışı ile deri bulguları arasındaki bağ ve varsa bu bağın nasıl oluştuğu konusu tartışmaya açık bir konudur.

FGF23 normal deride eksprese olmaktadır. Genç kemirgenlerde yapılan bir çalışmada, yaralanan deri bölgesinde FGF23 ekspresyonunun ikinci günde, başlangıca göre 32 kat arttığı bildirilmiştir. Yaşlı kemirgenlerde de FGF23 mRNA ekspresyonu artmış, ancak gençlere göre daha az. Ayrıca yaşlıların normal derisinde daha düşük düzeyde eksprese olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada, FGF23'ün hangi hücreden kaynaklandığı tespit edilememiş, yara bölgesine toplanan inflamatuvar hücrelerden veya diğer komşu hücrelerden kaynaklanabileceği speküle edilmiştir. Aynı çalışmada FGFR1 ve 4 ekspresyonu artmış, FGFR2 ve 3 ekspresyonu artmamıştır (125). FGF23 geni susturulan sıçanların derilerinde erken yaşlanma bulguları görülmüştür. Bu sıçanlarda kalsitriol düzeyi çok yüksek bulunmuş; *fgf23* *-/-* ve 1α Hidroksilaz *-/-* şeklinde çift susturulmuş geni olan hayvanlar kullanıldığında, vitamin D düzeyi normalleşmiş, *fgf23* *-/-* ve 1α Hidroksilaz *+/+* hayvanlara göre yaşlılık belirtileri

azalmıştır. Bu bulgulardan, FGF23 etkilerinin Vitamin D aracılığıyla oluştuğu sonucu çıkarılmıştır (7).

Yukarıdaki çalışmalarda FGF23 eksikliği ile ‘yaşlı deri’ özellikleri, yani üremik deri bulgularının oluştuğu belirtilmektedir. Üremik insanlarda (ve sıçanlarda) FGF23 artışı olmasına rağmen, yaşlı deri özellikleri görülmesi bir çelişki gibi görünmektedir. Eğer FGF23 artışı ile deri bulguları arasındaki bağ kanıtlanabilirse, bu bağın nasıl oluştuğu sorusu ortada kalacaktır. Kanımızca, üremide α -Klotho düzeyinin azalması bu durumun nedeni olabilir. Yani FGF23 derideki olumlu etkilerini α -Klotho varlığında gösterdiği şeklinde bir iddia ileri sürülebilir.

Kronik böbrek hastalarında FGF23 konsantrasyonu, GFR düştükçe artar ve son dönem böbrek yetmezliğinde, normalin 1000 katına kadar çıkabilir (16,17). FGF23 bir üremik toksin olarak değerlendirilmektedir; yapılan çalışmalarda sol ventrikül hipertrofisi, arteriyel sertlik ve kardiyovasküler mortalite ile ilişkili bulunmuştur (126,127). Bu bulgular, böbrek yetmezliği olmayan kişilerdeki FGF23 düşüklüğü bulgularıyla örtüşmektedir. Yani FGF23 yüksek olduğu halde yaşlılık bulguları görülmektedir. Bu konuyla ilgili net bir açıklama henüz yoktur.

Klotho yetersizliği, reseptör ve post-reseptör olaylar nedeniyle bu bulguların oluşabileceği speküle edilebilir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

Bu çalışmada, aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

1. Üremik Grup GFR değeri anlamlı şekilde azalmıştır.
2. Elde ettiğimiz bulgularda kalsitriol düşüklüğü ve FGF23 düzeyi yüksekliği bu modelde (5/6 nefrektomi modeli) daha önce bildirilmiş bulgularla uyumludur.
3. Üremik Grupta $1,25(OH)_2D_3$ düzeyi Sham Gruba göre anlamlı şekilde düşmüştür.
4. Western Blot ile tespit edilen deri FGF23 düzeyi istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır.
5. Rutin histopatolojik ve immünohistopatolojik incelemede ise, üremik sıçanların birçok deri elemanlarında FGFR1 yoğunluğunun arttığı tespit edilmiştir.

Üremik insan veya hayvanlarda FGF-23 ve FGFR1'in derideki rolü bilinmemektedir.

Üremik sıçanların derisinde FGF23 artışı ile deri bulguları arasındaki bağ ve varsa bu bağın nasıl oluştuğu konusu tartışmaya açık bir konudur. Üremik insan ve hayvanların derisinde FGF23 ve FGFR1'nin rolü bilinmemekle beraber çalışmamız bu bakımdan bir başlangıç olabilir. Deride FGF23 ve FGFR1'in ekspresyonunun artışı ilk defa bizim çalışmamız ile elde edilmiş bir bulgudur. FGF23 ile deri bulguları arasındaki nedensel ilişkiyi ispat etmesede; bu ilişkinin varlığı ve varsa nasıl oluştuğuyla ilgili bir tartışmaya açmış olur. Üremik insanlarda (ve sıçanlarda) FGF23 artışı olmasına rağmen, yaşlı deri özellikleri görülmesi bir çelişki gibi görünmektedir. Kanımızca, üremide α -Klotho düzeyinin azalması bu durumun nedeni olabilir. Yani FGF23 derideki olumlu etkilerini α -Klotho varlığında gösterdiği şekilde bir iddia ileri sürülebilir.

Çalışmamızda ki bulgular ile üremide görülen deri bulgularının oluşmasında FGF23 artışı ile klotho eksikliği, reseptör ve post-reseptör olaylarının neden olabileceği speküle edilmiştir.

6.2. Öneriler

FGF23 yüksek olduğu halde yaşlılık bulguları görülmektedir. FGF23 yüksekliğine rağmen deri bulgularını açıklamada klothonun rolünün ne olduğu sorusu ortada kalmaktadır. Bu konuyla ilgili net bir açıklama henüz yoktur. Bu alanda daha fazla çalışma yapılması önerilmektedir.

7. KAYNAKÇALAR

1. Ereğ E. (2010) Nefroloji 6. Baskı. Nobel Tıp Kitabevi
2. Jaradat MI, Molitoris BA. (2002) Cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. *Semin Nephrol.*;22(6):459–473. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12430090>.
3. İliçin G, Biberoglu K, Süleymanlar G. (2003) Temel İç Hastalıkları 3. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi
4. Greenberg A.(2001) Section X: Chronic Kidney Disease and its Therapy, Pathophysiology of Chronic Kidney Disease. Primer on Kidney Diseases. 5. Edition.
5. Evenepoel P, Kuypers DR. (2010) Dermatologic Manifestations of Chronic Kidney Disease. İçinde: *Comprehensive Clinical Nephrology.*:1001–1009.
6. Martin A, David V, Quarles LD. (2012) Regulation and Function of the FGF23/Klotho Endocrine Pathways. *Physiol Rev.*;92(1):131–155.
7. Razzaque MS, Sitara D, Taguchi T, St-Arnaud R, Lanske B. (2006) Premature aging-like phenotype in fibroblast growth factor 23 null mice is a vitamin D-mediated process. *FASEB J.* 20(6):720–722.
8. Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, (2005) Physiology: Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science* (80-).309(5742):1829–1833.
9. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, (1997) Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature.* 390(6655):45–51.
10. Yamamoto M, Clark JD, Pastor J V, Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho. *J Biol Chem.* 2005;280(45):38029–38034.
11. Ikushima M, Rakugi H, Ishikawa K, (2006) Anti-apoptotic and anti-senescence effects of Klotho on vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.*339(3):827–832.
12. Fukino K, Suzuki T, Saito Y, (2002) Regulation of angiogenesis by the aging suppressor gene klotho. *Biochem Biophys Res Commun.*293(1):332–337.
13. Kenneth Lim, MD; Tzong-Shi Lu, PhD; Guerman Molostvov, MD, PhD; Christina Lee, BS; F.T. Lam, MD; Daniel Zehnder, MD, PhD; Li-Li Hsiao, MD P. (2012) Vascular klotho deficiency potentiates the development of human artery calcification and mediates resistance to fibroblast growth factor 23. *Circulation.* 125(18):2243–2255.
14. Yamashita K, Yotsuyanagi T, Yamauchi M, Young DM. (2014) Klotho mice: A novel wound model of aged skin. *Plast Reconstr Surg.* 2(1).

15. Lim K, Groen A, Molostvov G, (2015) vd. A-Klotho Expression in Human Tissues. *J Clin Endocrinol Metab.* 100(10):E1308–E1318.
16. Isakova T, Wahl P, Vargas GS, (2011) vd. Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. *Kidney Int.*79(12):1370–1378.
17. Wolf M. (2012) Update on fibroblast growth factor 23 in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 82(7):737–747.
18. Gutiérrez OM, Mannstadt M, Isakova T, (2008) vd. Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med.*359(6):584–592.
19. Gutiérrez OM, Januzzi JL, Isakova T, (2009) Fibroblast growth factor 23 and left ventricular hypertrophy in chronic kidney disease. *Circulation.* 119(19):2545–2552.
20. Koçyiğit İ, Arınsoy T, Güngör Ö. (2017) Böbrek Patofizyolojisi. <http://www.nefroloji.org.tr/folders/file/bobrek-fizyopatolojisi-kitabi.pdf>.
21. PhD JEH. (2018) The Urinary System: Functional Anatomy and Urine Formation by the Kidneys- ClinicalKey. <https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9781455770052000263>.
22. Susan Standring MBE, PhD, DSc, FKC, Hon FAS HF. Gray's Anatomy Kidney and ureter. <https://www.clinicalkey.com/#!/browse/book/3-s2.0-C20110053139>.
23. PhD JEH. (2019) The Urinary System: Functional Anatomy and Urine Formation by the Kidneys- ClinicalKey. İçinde: Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology.2016:Chapter26,323-333. <https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9781455770052000263>.
24. Akan E. (2018) Yüksek Lisans tezi, Sıçanlarda kronik böbrek yetmezliğinin progresyonunda adiponektin etkisi ve bu mekanizma üzerine plasenta kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin etkisi.
25. Hall JE. (2016) Glomerular Filtration, Renal Blood Flow, and Their Control- ClinicalKey. İçinde: Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. 335–346. <https://www-clinicalkey-com.ezproxy.lib.ucalgary.ca/#!/content/book/3-s2.0-B9781455770052000275>.
26. Pan CG, Avner E. (2016) Chapter 508 - Introduction to Glomerular Diseases.
27. Köse K. (2010) Uzmanlık tezi, Kronik böbrek yetmezliğinde etiyolojisi ve böbrek fonksiyonlarının değerlendirilmesi. 22(2).

28. Özdemir N.(2014). Uzmanlık Tezi.
29. Greenberg A. (2011). Böbrek Hastalıkları. 4th baskı (ed.). Güven Bilimsel.
30. Yandal K, (2013). Uzmanlık Tezi. Kronik Böbrek Yetmezliği hastalarında Serum FGF-23 Seviyeleri İle Sol Ventrikül Kitle indeksi Ve Karotis İntima Media Kalınlığı Arasındaki İlişki.
31. Official Journal Of the international Society Of nephrology KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. KDIGO. 2017;3(1). www.publicationethics.org. Erişim Ocak 26, 2019.
32. Süleymanlar G, Uta C, Arinsoy T, (2011). A population-based survey of Chronic RENal Disease in Turkey-the CREDIT study. Nephrol Dial Transplant.;26(6):1862–1871.
33. Ersoy F. (2013). Kronik Böbrek Hastalığı. Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri; 2013.
34. Yalçın AU, Akpolat T. (2019). Kronik böbrek yetmezliği. http://www.nefroloji.org.tr/folders/file/kronik_bobrek_yetmezligi.
35. Karl Skorecki, Jacob Green BMB. (2014). Chronic Renal Failure. İçinde: Harrison, ed. Harrison's Principles of Internal Medicine. 15th Editi. The McGraw-Hill Companies, Inc.2001:3096–3118.
36. Akoğlu E. SG. (1996). Kronik Böbrek Yetmezliği. Temel İç Hastalıkları. (İliçin, Ünal, Biberoglu, Akalin S, ed.
37. Selamet DU. (2005). Uzmanlık Tezi. Üremik Hastalarda Görsel Uyarılmışlık Potansiyeller Ve Elektoretinogram Değişiklikler.
38. Mazuryk HA, Brodtkin RH. Cutaneous clues to renal disease. Cutis. 1991;47(4):241–248. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2070644>.
39. Utaş S. (2019). Kaşıntı Ve Diğer Cilt Sorunları. http://www.nefroloji.org.tr/folders/file/cilt_sorunlari.pdf.
40. Saito A (Isehara), Kawanishi H (Hiroshima), Yamashita AC (Fujisawa), Mineshima M (Tokyo), (2011). High-performance membrane dialyzers. Basel, Karger
41. Momose A, Kudo S, Sato M, (2004). Calcium ions are abnormally distributed in the skin of haemodialysis patients with uraemic pruritus. Nephrol Dial Transplant.19(8):2061–2066.
42. Cho YL, Liu HN, Huang TP, Tarng DC. (1997). Uremic pruritus: Roles of parathyroid hormone and substance P. J Am Acad Dermatol. 36(4):538–543.
43. Kyriazis J, Glotsos J.(2000) Dialysate Calcium Concentration of ≤ 1.25 mmol/l: Is It Effective in Suppressing Uremic Pruritus? Nephron. 84(1):85–86.

44. Massry SG, Coburn JW, Hartenbower DL. (1971). The effect of calcemic disorders and uremia on the mineral content of skin. *Isr J Med Sci* .7(3):514–517. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5567541>.
45. Jessica Kendrick MD,(2019). Mineral Bone Disorders in Chronic Kidney Disease. İçinde: *Chronic Kidney Disease, Dialysis, and Transplantation*. Fourth Edi. Elsevier,inc:145–161.
46. Schrier RW. (2005) Böbrek ve Elektrolit Hastalıkları. (Prof. Dr. Gültekin Süleymanlar, ed.). Güneş Kitabevi.
47. Endres DB RR. (2001) Mineral and bone metabolism. İçinde: Brutis CA AE, ed. *Tietz Fundamentals Of Clinical Chemistry*. 5th Editio. Saunders Elsevier; 2001:795–821.
48. Favus, Murray J, David A. (2006) Regulation of Calcium, Magnesium, and Phosphate Metabolism. *Am Soc Bone Miner Res*.76–83.
49. Bringhurst R,(2002). Demay MB KH. Hormones and disorders of mineral metabolism. İçinde: Larsen P, Kronenberg H, Melmed S, Polonsky K, ed. *Williams Textbook of Endocrinology*. 10 edition. Saunders; 2002.
50. Bringhurst FR, Demay MB, Krane SM KH. (2008) Bone and Mineral Metabolism in Health and Disease. İçinde: Fauci AS, Braunwald E K, DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson, JL LJ, ed. *Harrison’s Principles of Internal Medicine*. 17th editi. New York: McGraw-Hil; 2008:2365–2376.
51. Behrman RE, Kliegman RM JH. (2008) *Nelson Textbook of Pediatrics*. 17. Basım. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2008.
52. Bushinsky DA, Monk RD. (1998) Electrolyte quintet: Calcium. *Lancet* (London, England). 1998;352(9124):306–311. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9690425>.
53. Deplewski D. (2014) Pediatric Endocrinology. *Pediatr Ann*. 2014;43(3):107–107.
54. DiGirolamo DJ, Clemens TL, Kousteni S. (2012) The skeleton as an endocrine organ. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8(11):674–683.
55. Rinsler M. (2007) Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. İçinde: *Journal of Clinical Pathology*. C 34. ; 2007:228–228.
56. Klein KMK and MJ.(2017) Biochemical Markers of Bone Metabolism. İçinde: Richard A. McPherson MD, MSc and Matthew R. Pincus MD P, ed. *Henry’s Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 23th baskı Elsevier Inc.; 2017:188–204.

57. Calvo MS, Lamberg-Allardt CJ. (2015) Phosphorus. *Adv Nutr.* 2015;6(6):860–862.
58. Moe S. (2016) Chronic Kidney Disease-Mineral Bone Disorder. İçinde: Skorecki, Karl, MD, FRCP(C), FASN; Chertow, Glenn M, MD; Marsden, Philip A., MD; Taal, Maarten W., MBChB, MMed, MD, FCP(SA), FRCP; Yu, Alan S.L. M, ed. *Brenner and Rector's The Kidney.* 10th baskı Elsevier; 2016:1822–1852.
59. Ersoy F. (2014) Klotho ve FGF23: Karanlığın ikilisi mi kurtarıcı mı? (<http://www.nefroloji.org.tr/folders/file/ersoy.pdf>)
60. McCollum EV. (2009) The Paths to the Discovery of Vitamins A and D. *Nutr Rev.* 2009;44(7):242–244.
61. Öngen B, Kabaroğlu C, Parıldar Z, (2019) D Vitamini'nin Biyokimyasal ve Laboratuvar Değerlendirmesi *Biochemical and Laboratory Evaluation of Vitamin D.* http://tkb.dergisi.org/pdf/pdf_TKB_99.pdf. Erişim Mayıs 4, 2019.
62. DeLuca HF. (2004) Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(6 Suppl):1689S–96S.
63. Portale AA, Halloran BP, Morris RC. (1989) Physiologic regulation of the serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D by phosphorus in normal men. *J Clin Invest.* 1989;83(5):1494–1499.
64. Saito H, Kusano K, Kinoshita M, (2003). Human fibroblast growth factor-23 mutants suppress Na⁺-dependent phosphate co-transport activity and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ production. *J Biol Chem.* 2003;278(4):2206–2211.
65. Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, (2004) FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res.* 2004;19(3):429–435.
66. Liu S, Tang W, Zhou J, (2006) Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(5):1305–1315.
67. Kuro-o M. (2011) Klotho and the aging process. *Korean J Intern Med.* 2011;26(2):113–122.
68. Sargent JD, Stukel TA, Kresel J, Klein RZ.(1993) Normal values for random urinary calcium to creatinine ratios in infancy. *J Pediatr.* 1993;123(3):393–397. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8355114>.
69. Fibroblast growth factor 23 [Homo sapiens].

70. Smith ER, Holt SG, Hewitson TD.(2019) α Klotho-FGF23 interactions and their role in kidney disease: a molecular insight. *Cell Mol Life Sci*.
71. Shimada T, Mizutani S, Muto T, (2001) Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(11):6500–6505.
72. Flamme I, Ellinghaus P, Urrego D, Krüger T.(2017) FGF23 expression in rodents is directly induced via erythropoietin after inhibition of hypoxia inducible factor proline hydroxylase. *Jelkmann WEB, ed. PLoS One*. 2017;12(10):e0186979.
73. Blau JE, Collins MT. (2015)The PTH-Vitamin D-FGF23 axis. *Rev Endocr Metab Disord*. 2015;16(2):165–174.
74. Armelin HA. (1973)Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973;70(9):2702–2706.
75. Hui Q, Jin Z, Li X, Liu C, Wang X. (2018)FGF Family: From Drug Development to Clinical Application. *Int J Mol Sci*. 2018;19(7):1875.
76. Belov AA, Mohammadi M. (2013) Molecular mechanisms of fibroblast growth factor signaling in physiology and pathology. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(6).
77. Olsen SK, Garbi M, Zampieri N, (2003) Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors share structural but not functional homology with FGFs. *J Biol Chem*. 2003;278(36):34226–34236.
78. Itoh N, Ornitz DM.(2008) Functional evolutionary history of the mouse Fgf gene family. *Dev Dyn*. 2008;237(1):18–27.
79. Harmer NJ, Pellegrini L, Chirgadze D, Fernandez-Recio J, Blundell TL. (2004)The crystal structure of fibroblast growth factor (FGF) 19 reveals novel features of the FGF family and offers a structural basis for its unusual receptor affinity. *Biochemistry*. 2004;43(3):629–640.
80. Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. (2000) Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer*. 2000;7(3):165–197. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11021964>.
81. Goetz R, Beenken A, Ibrahimi OA, (2007) Molecular insights into the klotho-dependent, endocrine mode of action of fibroblast growth factor 19 subfamily members. *Mol Cell Biol*. 2007;27(9):3417–3428.
82. Hui Q, Jin Z, Li X, Liu C, Wang X. (2018) FGF Family: From Drug Development to Clinical Application. *Int J Mol Sci*. 2018;19(7).

83. Tiong KH, Mah LY, Leong C-O.(2013) Functional roles of fibroblast growth factor receptors (FGFRs) signaling in human cancers. *Apoptosis*. 2013;18(12):1447–1468.
84. Schlessinger J, Plotnikov AN, Ibrahimi OA, (2000) Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol Cell*. 2000;6(3):743–750. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11030354>.
85. Kovesdy CP, Quarles LD.(2013) Fibroblast growth factor-23: what we know, what we don't know, and what we need to know. *Nephrol Dial Transplant*. 2013;28(9):2228–2236.
86. Trueb B.(2011) Biology of FGFR1, the fifth fibroblast growth factor receptor. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(6):951–964.
87. Kettunen P, Karavanova I, Thesleff I. (1998) Responsiveness of developing dental tissues to fibroblast growth factors: expression of splicing alternatives of FGFR1, -2, -3, and of FGFR4; and stimulation of cell proliferation by FGF-2, -4, -8, and -9. *Dev Genet*. 1998;22(4):374–385.
88. Cancilla B, Davies A, Cauchi JA, Risbridger GP, Bertram JF.(2001) Fibroblast growth factor receptors and their ligands in the adult rat kidney. *Kidney Int*. 2001;60(1):147–155.
89. Wesseling-Perry K, Tsai EW, Ettenger RB, Jüppner H, Salusky IB. (2011) Mineral abnormalities and long-term graft function in pediatric renal transplant recipients: a role for FGF-23? *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(11):3779–3784.
90. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, (2006) Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature*. 2006;444(7120):770–774.
91. Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, (1997) Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem*. 1996;271(25):15292–15297. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8663044>.
92. Mason I.(2007) Initiation to end point: the multiple roles of fibroblast growth factors in neural development. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(8):583–596.
93. Hierro C, Rodon J, Tabernero J. (2015) Fibroblast Growth Factor (FGF) Receptor/FGF Inhibitors: Novel Targets and Strategies for Optimization of Response of Solid Tumors. *Semin Oncol*. 2015;42(6):801–819.
94. White KE, Larsson TE, Econs MJ.(2006) The roles of specific genes implicated as circulating factors involved in normal and disordered phosphate homeostasis:

frizzled related protein-4, matrix extracellular phosphoglycoprotein, and fibroblast growth factor 23. *Endocr Rev.* 2006;27(3):221–241.

95. Yu X, Ibrahimi OA, Goetz R, (2005) Analysis of the biochemical mechanisms for the endocrine actions of fibroblast growth factor-23. *Endocrinology.* 2005;146(11):4647–4656.

96. Imura A, Iwano A, Tohyama O, (2004) Secreted Klotho protein in sera and CSF: Implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane. *FEBS Lett.* 2004;565(1–3):143–147.

97. Nakatani T, Sarraj B, Ohnishi M, (2009) In vivo genetic evidence for klotho-dependent, fibroblast growth factor 23 (Fgf23) -mediated regulation of systemic phosphate homeostasis. *FASEB J.* 2009;23(2):433–441.

98. Nakatani T, Ohnishi M, Razzaque MS.(2009) Inactivation of klotho function induces hyperphosphatemia even in presence of high serum fibroblast growth factor 23 levels in a genetically engineered hypophosphatemic (Hyp) mouse model. *FASEB J.* 2009;23(11):3702–3711.

99. Smith ER.(2018) Untangling the thread of life spun by α Klotho. *J Mol Med (Berl).* 2018;96(9):857–859.

100. Bär L, Feger M, Fajol A, (2018) Insulin suppresses the production of fibroblast growth factor 23 (FGF23). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(22):5804–5809.

101. Bergwitz C, Jüppner H.(2010) Regulation of Phosphate Homeostasis by PTH, Vitamin D, and FGF23. *Annu Rev Med.* 2010;61(1):91–104.

102. Kuro-o M.(2010) A potential link between phosphate and aging-Lessons from Klotho-deficient mice. *Mech Ageing Dev.* 2010;131(4):270–275.

103. Ben-Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V. (2007) The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J Clin Invest.* 2007;117(12):4003–4008.

104. Komaba H, Fukagawa M.(2010) FGF23-parathyroid interaction: Implications in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2010;77(4):292–298.

105. Rhee Y, Bivi N, Farrow E, (2011) Parathyroid hormone receptor signaling in osteocytes increases the expression of fibroblast growth factor-23 in vitro and in vivo. *Bone.* 2011;49(4):636–643.

106. Kawata T, Imanishi Y, Kobayashi K, (2007) Parathyroid hormone regulates fibroblast growth factor-23 in a mouse model of primary hyperparathyroidism. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(10):2683–2688.

107. Kobayashi K, Imanishi Y, Miyauchi A, (2006) Regulation of plasma fibroblast growth factor 23 by calcium in primary hyperparathyroidism. *Eur J Endocrinol.* 2006;154(1):93–99.
108. Shimada T, Yamazaki Y, Takahashi M, (2005) Vitamin D receptor-independent FGF23 actions in regulating phosphate and vitamin D metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;289(5):F1088-95.
109. Emmett M. (2008) What does serum fibroblast growth factor 23 do in hemodialysis patients? *Kidney Int.* 2008;73(1):3–5.
110. Kuro-O M.(2011) Phosphate and Klotho. *Kidney Int Suppl.* 2011;(121):S20-3.
111. Egli-Spichtig D, Imenez Silva PH, Glaudemans B, (2019) Tumor necrosis factor stimulates fibroblast growth factor 23 levels in chronic kidney disease and non-renal inflammation. *Kidney Int.* May 15 2019.
112. Fauconnier C, Roy T, Gillerot G, Roy C, Pouleur AC, Gruson D. (2019) FGF23: Clinical usefulness and analytical evolution. *Clin Biochem.* 2019;66:1–12.
113. Filler G, Liu D, Huang S-HS, Casier S, Chau LA, Madrenas J. (2011) Impaired GFR is the most important determinant for FGF-23 increase in chronic kidney disease. *Clin Biochem.* 2011;44(5–6):435–437.
114. Fliser D, Kollerits B, Neyer U, (2007) *vd.* Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) Predicts Progression of Chronic Kidney Disease: The Mild to Moderate Kidney Disease (MMKD) Study. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(9):2600–2608.
115. Jean G, Terrat J-C, Vanel T, (2009) High levels of serum fibroblast growth factor (FGF)-23 are associated with increased mortality in long haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24(9):2792–2796.
116. Slatopolsky E. (2011) The intact nephron hypothesis: the concept and its implications for phosphate management in CKD-related mineral and bone disorder. *Kidney Int Suppl.* 2011;(121):S3-8.
117. Farrow EG, Davis SI, Summers LJ, White KE. (2009) Initial FGF23-mediated signaling occurs in the distal convoluted tubule. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(5):955–960.
118. Hasegawa H, Nagano N, Urakawa I, (2009) Direct evidence for a causative role of FGF23 in the abnormal renal phosphate handling and vitamin D metabolism in rats with early-stage chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2010;78(10):975–980.
119. Sakai Y. (2011) Polymethylmethacrylate membrane with a series of serendipity. *Contrib Nephrol.* 2011;173:137–147.

120. Di Bona D, Accardi G, VIRRUSO C, Candore G, Caruso C. (2014) Association of Klotho polymorphisms with healthy aging: a systematic review and meta-analysis. *Rejuvenation Res.* 2014;17(2):212–216.
121. Lim K, Lu T-S, Molostvov G, (2012) Vascular Klotho deficiency potentiates the development of human artery calcification and mediates resistance to fibroblast growth factor 23. *Circulation.* 2012;125(18):2243–2255.
122. Chung C-P, Chang Y-C, Ding Y, (2017) α -Klotho expression determines nitric oxide synthesis in response to FGF-23 in human aortic endothelial cells. *PLoS One.* 2017;12(5):e0176817.
123. Leifheit-Nestler M, Siemer RG, Flasbart K, (2016) Induction of cardiac FGF23/FGFR4 expression is associated with left ventricular hypertrophy in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2016;31(7):1088–1099.
124. Takenaka H, Yasuno H, Kishimoto S.(2002)Immunolocalization of fibroblast growth factor receptors in normal and wounded human skin. *Arch Dermatol Res.* 2002;294(7):331–338.
125. Komi-Kuramochi A, Kawano M, Oda Y, (2005) Expression of fibroblast growth factors and their receptors during full-thickness skin wound healing in young and aged mice. *J Endocrinol.* 2005;186(2):273–289.
126. Gutiérrez OM, Mannstadt M, Isakova T, (2008) Fibroblast Growth Factor 23 and Mortality among Patients Undergoing Hemodialysis. *N Engl J Med.*(2008);359(6):584–592.
127. Gutiérrez OM, Januzzi JL, Isakova T, (2009) Fibroblast growth factor 23 and left ventricular hypertrophy in chronic kidney disease. *Circulation.* 119(19):2545–2552.

8. EKLER

Ekler 1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Kararı

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU


01.03.2018

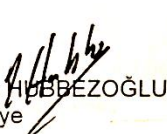
Sayı : 65202830-050.04.04- (S)
Konu : Etik Kurul Kararı.

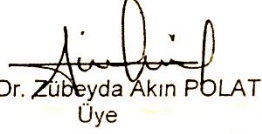
Sayın Doç.Dr.Sema Tulay KÖZ
Tıp Fakültesi
Fizyoloji AD


Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 01.03.2018 tarihinde Prof. Dr. Haki KARA başkanlığında toplanarak aşağıdaki kararları almıştır.

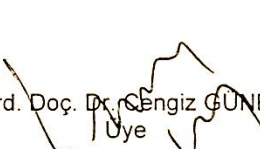
Doç.Dr.Sema Tulay KÖZ'ün yürütücülüğünü yapmış olduğu ve yardımcıları Yüksek.Lisans Öğrenci.Özge ÖZKAYNAK'ın 27.02.2018 tarih ve 113 sayılı "Üremik Sıçanların Derisinde FGF-23 ve FGF Reseptör Ekspresyonu, Histopatolojik Değişiklikler ve Mineral Konsantrasyonu Arasındaki İlişkiler." İsimli Yüksek Lisans Tezi Projesi Etik Kurulumuzca kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Bülent SARAÇ
Üye

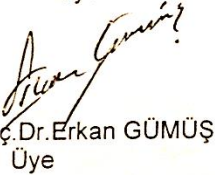

Prof. Dr. İhsan HUBBEZOĞLU
Üye

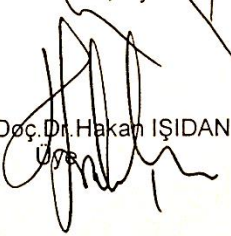

Prof. Dr. Zübeyda Akın POLAT
Üye

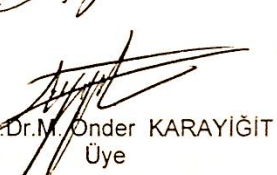

Yrd.Doç.Dr.Ahmet Duran ATAŞ
Üye



Yrd. Doç. Dr. Cengiz GÜNEY
Üye

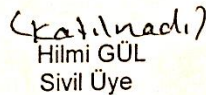

Yrd.Doç.Dr.Erhan YÜKSEL
Üye


Yrd.Doç.Dr.Erkan GÜMÜŞ
Üye

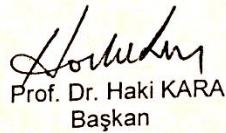

Yrd.Doç.Dr.Hakan İŞİDAN
Üye


Yrd.Doç.Dr.M. Onder KARAYİĞİT
Üye


Uz.Vet.Hek.Yücel YALMAN
Üye – Başkanvekili


Hilmi GÜL
Sivil Üye


Özcan KARATAŞ
Sivil Üye


Prof. Dr. Haki KARA
Başkan

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Adı Soyadı	Özge Özkaynak
Doğum Yeri ve Tarihi	Sivas-1981
Medeni Hali	Bekar
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi Hastanesi Fizik Tedavi A.B.D 58140-Sivas
E-posta Adresi	fztozkaynak@cumhuriyet.edu.tr

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise	Sivas Kongre Lisesi, 1999
Lisans	Hacettepe Üniversitesi, 2004
Ünvan	Fizyoterapist

İş Tecrübesi

Cumhuriyet Üniversitesi	Fizyoterapist 2013 Eylül-
Sivas Anadolu Hastanesi	Fizyoterapist 2013 Şubat-Eylül
Ankara İlk Akım Özel Eğitim Merkezi	Fizyoterapist 2009-2013
Ankara Magnet Tıp Merkezi	Fizyoterapist 2009-2004