T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Oktay KAYA

FERROPİTOZUN YÜKSEK FRUKTOZLU BESLENMEYE BAĞLI BÖBREK İŞLEV BOZUKLUĞUNDAKİ ROLÜ

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Ecem Büşra DEĞER

EDİRNE-2022

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince her konuda desteğini ve bilgilerini hiçbir zaman esirgemeyen, sabırla ve özveriyle emek veren danışmanım Sayın Doç. Dr. Oktay KAYA'ya, yol göstericiliğini asla esirgemediği ve huzurlu bir çalışma ortamı sağladığı için Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Levent ÖZTÜRK'e, eğitimime katkıları ve yardımlarıyla yanımda olduğu için Prof. Dr. Selma Arzu VARDAR'a, çalışmanın patolojik değerlendirme sorumluluğunu üstlendiği için Doç. Dr. Ebru TAŞTEKİN'e ve asistanlık dönemim boyunca beraber çalıştığım Fizyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Destekleyen Kurum: Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (TÜBAP 2021/149

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ **1**

GENEL BİLGİLER **3**

- **AKUT BÖBREK HASARI** **3**
- **KRONİK BÖBREK HASTALIĞI** **5**
- **FRUKTOZ** **9**
- **FERROPİTOZ** **14**

GEREÇ VE YÖNTEMLER **22**

BULGULAR **32**

TARTIŞMA **54**

SONUÇLAR **59**

ÖZET **60**

SUMMARY **62**

KAYNAKLAR **64**

EKLER

SİMGE VE KISALTMALAR

ABH **:** Akut Böbrek Hasarı

ACSL4 **:** Açil-Coa Sentetaz Uzun Zincirli Aile Üyesi 4

GFH **:** Glomerüler Filtrasyon Hızı

GLUT2 **:** Glikoz Taşıyıcı 2

GLUT5 **:** Glikoz Taşıyıcı 5

GPX4 **:** Glutatyon Peroksidaz 4

GSH **:** Glutatyon

KBH **:** Kronik Böbrek Hastalığı

MDA **:** Malondialdehit

ROS **:** Reaktif Oksijen Türleri

TFR1/TFRC **:** Transferrin Reseptör 1

UA **:** Ürik Asit

GİRİŞ VE AMAÇ

Akut böbrek hasarı (ABH), dünya çapında yaklaşık 10 milyon insanı etkileyen ve yüksek mortalite oranına sahip önemli bir halk sağlığı sorunudur (1). ABH sıklıkla geri dönüşümlü ancak hızlı ilerleyen böbrek fonksiyon kaybı ile karakterizedir ve kronik böbrek hastalığına (KBH) neden olabilir. Yaygınlığı dünya genelinde % 8-16 olarak bildirilen ve en hızlı artan ölüm nedenlerinden biri olan KBH, yıllık ekonomik maliyeti yüksek ve büyük bir sosyal yüke neden olan önemli bir sağlık sorunudur. KBH'ın yaygınlığının artmasında akut böbrek hasarının artışı önemli bir role sahiptir (2,3).

Son yıllarda fruktoz tüketimi hızla artmakta buna paralel olarak metabolik sendrom, obezite ve böbrek hastalılarının hızla arttığı gözlemlenmektedir. Düzenli olarak yüksek fruktozlu içecekler tüketen insanların, kronik böbrek hastalığı geliştirme riskinin ~ % 60 arttığı bildirilmiştir (4). Fruktozun uzun dönem kullanımıyla böbrekteki proksimal tubuller üzerinde proliferatif etkiye sahip olduğu ve proksimal tubullerde mitokondriyal oksidatif strese ardından inflamatuar süreçlerde rol oynadığı belirtilmektedir (5).

Ferropitoz, son yıllarda keşfedilen ve genellikle hücre ölümü sürecinde büyük miktarda demir birikimi ve lipid peroksidasyonunun eşlik ettiği apoptotik olmayan yeni bir hücre ölümü türüdür. Glutatyon (GSH) bağımlı bir enzim olan glutatyon peroksidaz 4 (GPX4) ferropitozu önleyici önemli bir enzimdir. Ferropitozu indükleyen faktörler, glutatyon peroksidazı farklı yollardan doğrudan veya dolaylı olarak etkileyebilir, bu da antioksidan kapasitede bir azalmaya ve hücrelerde lipid reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikmesine ve sonuçta oksidatif hücre ölümüne yol açar.

Yapılan çalışmalara bakıldığında GPX4'ün inaktivasyonunun ferropitotik hücre ölümü indüklediği ve ardından lipid oksidasyonu ile ABH'ya neden olduğu gösterilmiştir.

Ferropitozisin akut tübüler nekroz, iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarı ve nefrotoksik folik asit kaynaklı ABH'da renal tubuler hücrelerin ana ölüm yolu olabileceği bildirilmiştir (6,7). Ancak literatürde yüksek fruktozlu beslenmeye bağlı oluşan böbrek hasarının hangi hücre ölüm şekli ile ilgili olduğu dair bir çalışmaya rastlanmadı.

Çalışmamızda fruktozdan zengin beslenmeye bağlı oluşan böbrek hasarı fizyopatolojisinde ferropitozun rolünü tespit etmeyi amaçladık. Ayrıca yüksek fruktozla besleyeceğimiz sıçanlarda böbrek fonksiyon ve histolojisindeki değişimi zamana bağlı olarak değerlendirmeyi planladık. Bu çalışma, böbrek hastalıklarının önlenmesi ve olası tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi bakımından da önem taşımaktadır.

GENEL BİLGİLER

AKUT BÖBREK HASARI

Böbrek hastalıkları dünya çapında yaygınlığı giderek artan, sağlık harcamalarında önemli paya sahip olan ve mortalite ile ilişkili hastalıklardır. Akut böbrek hasarı (ABH), filtrasyonun kan belirteçlerinde (örneğin kreatinin) hızlı bir artış ve/veya idrar çıkışında bir azalma ile karakterize, sıklıkla geri dönüşümlü ancak hızlı ilerleyen böbrek fonksiyon kaybına sebep olan ve kronik böbrek hastalığına (KBH) ilerleyebilen ciddi bir sorundur. ABH, Avrupa'da her yıl 1000 kişinin ikisinde görülmektedir (8). Dünya çapında yaklaşık 10 milyon insanı etkileyen ABH, yetişkinlerde %23.9, çocuklarda ise %13.8 mortalite ile ilişkilidir (1,9). Bu nedenle ABH büyük bir halk sağlığı sorunudur.

ABH'nin teşhis ve tedavi edilmesi hem mortalitenin azaltılması hem de KBH'ye ilerlemesinin engellenmesi için önemlidir. Bu nedenle ABH'nin teşhisi, şiddetinin sınıflandırılması ve tedavi edilebilmesi için çeşitli sınıflandırmalar kullanılmaktadır. Günümüzde ABH tanısında en yaygın olarak KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) sınıflandırması kullanılmaktadır (10,11)(Tablo 1).

Bu sınıflandırma esas olarak idrar çıkışındaki ve serum kreatinin seviyelerindeki değişikliklere odaklanmaktadır (12). Ancak kreatinin ve idrar çıkışı değerleri yanıltıcı olabilir. Çünkü böbrekler hafif hasarlı dönemde glomerüler filtrasyon hızını (GFH) korumak için hasarlanmamış nefronları kullanabilir. Bu telafi edilemez duruma geldiğinde ise GFH azalmaya başlar. Bu subklinik evre kreatinin düzeyi ile teşhis edilemez. Kreatinin nefronların önemli bir kısmı etkilendikten sonra artar (11). Ayrıca kreatinin düzeyi böbrek dışı birçok

faktörden etkilenebilir ve aşırı sıvı yükü veya etkin dolaşım hacmi azlığı, kas kaybı ve sepsis gibi durumlarda ABH tanısı koymak için ek araçlar kullanmak gerekebilir (12).

Tablo 1. Akut Böbrek Hasarının Sınıflandırılması: KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) Kriterleri (11)

KDIGO	Serum Kreatinin Düzeyi	İdrar Çıkış Miktarı
KDIGO 1	Serum Kreatinin düzeyinin 1.5- 1.9 kat artışı veya Serum Kreatinin düzeyinin ≥0,3 mg/dl artışı	6 -12 saat süreyle idrar çıkışı < 0.5 ml/kg/saat
KDIGO 2	Serum Kreatinin düzeyinin 2.0- 2.9 kat artış	12 saat veya daha uzun süreyle idrar çıkışı < 0.5 ml/kg/saat
KDIGO 3	Serum Kreatinin düzeyinin 3 kat artışı veya Serum Kreatinin düzeyinin ≥4 mg/dl olması veya Renal replasman tedavisi başlanması Veya 18 yaşından küçük hastalarda GFH'de <35 ml/min/1.73m² azalma	24 saat veya daha uzun süreyle idrar çıkışı < 0.3 ml/kg/saat veya 12 saat veya daha uzun süreyle anüri

ABH nedenleri prerenal, renal ve postrenal olarak sınıflandırılmaktadır (13). ABH'nin en sık nedeni prerenal akut böbrek hasarıdır (14). Prerenal ABH böbrek perfüzyon basıncındaki azalma sonucu GFH'nin azalmasıyla karakterizedir. Hipovolemi, sistemik vazodilatasyon, kardiyak çıkışın azalması veya renal vazokonstriksiyon ve glomerüler efferent arteriollerin vazodilatasyonu böbrek perfüzyon basıncını azaltacağından prerenal ABH'ye neden olabilir (15). Böbreğin ana yapılarının (tübül, glomerül, interstisyum ve intrarenal kan damarları) zarar görmesi sonucu ise renal ABH meydana gelir (14,16). İskemi, hipovolemik durumlar, düşük kardiyak output, antimikrobiyal ve nefrotoksik ilaçlar tübüler kaynaklı ABH'ye neden olurken, glomerüllerin ve kan damarlarının inflamasyonuna neden olan sistemik hastalıklar glomerüler kaynaklı ABH'ye neden olmaktadır (13,17). İntrarenal damarların yaralanmasına neden olan malign hipertansiyon, vaskülit, skleroderma gibi hastalıklar sonucu ise vasküler hasar kaynaklı

ABH ortaya çıkmaktadır (17). Postrenal ABH nedenleri ise intratübüler basıncın artmasına sebep olup GFH'yi azaltan benign prostat hiperplazisi, kanserler, üreteral taşlar, nörojenik mesane gibi akut idrar yolu tıkanıklığı yapan durumlardır (14,16).

KRONİK BÖBREK HASTALIĞI

KBH sıklığının dünya genelinde %8-16 olduğu bildirilmektedir (3). KBH gelişimi ve ilerlemesi için ABH bir risk faktörüdür. KBH insidansı ABH'nin şiddeti, sıklığı ve süresi ile ilişkilidir. ABH yaşayan hastalarda KBH gelişme riskinin 8,8 kat arttığı gösterilmiştir (18). KBH, dünya çapında en hızlı artan ölüm nedenlerinden biridir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre dünya genelinde 2012 yılında meydana gelen ölümlerin %1,5'i KBH nedenlidir. Dünya genelinde on dördüncü ölüm nedeni olan KBH'nin 2040 yılına kadar beşinci ölüm nedeni olması beklenmektedir (19,20).

KBH, aylar veya yıllar boyunca yani kronik olarak böbreğin işlev ve yapısının geri dönüşümsüz olarak bozulması sonucu oluşur. KBH tanısı, böbrek fonksiyonunun en iyi göstergesi olan glomerüler filtrasyon hızındaki azalmanın tespiti ile konur. GFH, birim zaman başına tüm işleyen nefronlardan filtrelenen toplam sıvı miktarıdır (21). KBH, altta yatan nedene bakılmaksızın, en az 3 aylık süre boyunca, GFH'nin 1,73 m²'de 60 mL/dk'dan az olması ve/veya böbrek hasarı belirteçleri ile gösterilen azalmış böbrek fonksiyonu olarak tanımlanır (22)(Tablo 2). GFH'nin 1,73m² başına 15 mL/dk'dan az olması son evre böbrek hastalığı (SEBH) olarak tanımlanmaktadır (23)(Tablo 3). SEBH'de böbrekler fonksiyonlarını yerine getiremez durumdadır ve SEBH'li hastalar için seçenekler diyaliz, böbrek nakli veya konservatif bakımdır.

Tablo 2. Kronik Böbrek Hastalığı Sınıflandırılması: KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) Kriterleri (22).

KBH'nin GFH ve Albüminüri'ye göre prognozu				Kalıcı albüminüri kategorileri Tanım ve aralık		
				A1	A2	A3
				Normal-hafif artmış	Orta derecede artmış	Ciddi artmış
				<30 mg/g <3 mg/mmol	30-300 mg/g 3-30 mg/mmol	>300 mg/g >30 mg/mmol
GFH kategorileri (ml/dk/ 1.73 m²)	G1	Normal-yüksek	≥90	Düşük risk	Orta risk	Yüksek risk
	G2	Hafif azalmış	60-89	Düşük risk	Orta risk	Yüksek risk
	G3a	Hafif-orta azalmış	45-59	Orta risk	Yüksek risk	Çok yüksek risk
	G3b	Orta-ciddi azalmış	30-44	Yüksek risk	Çok yüksek risk	Çok yüksek risk
	G4	Ciddi azalmış	15-29	Çok yüksek risk	Çok yüksek risk	Çok yüksek risk
	G5	Böbrek yetmezliği	<15	Çok yüksek risk	Çok yüksek risk	Çok yüksek risk

Düşük risk (başka böbrek hastalığı belirteci yoksa KBH yok); Orta derecede (artan risk)

Tablo 3. KBH Kriterleri (23)

En az 3 ay süreyle aşağıdaki iki kriterden biri veya her ikisi:

1. GFH <60 mL/dk, 1,73m ^{2} (G3a-5 kategorileri)

2. Böbrek hasarı belirteçleri (1 veya daha fazla)

- Albüminüri (albümin : kreatinin oranı [ACR] ≥30mg/g)
- İdrar sedimenti anormalliği
- Tübüler bozukluğa bağlı elektrolit veya diğer anormallikler
- Histolojideki anormallikler
- Görüntüleme ile tespit edilen yapısal anormallikler
- Böbrek nakli öyküsü

KBH'nin birçok nedeni vardır ve küresel olarak değişiklik göstermektedir. Tüm yüksek gelirli, orta gelirli ve birçok düşük gelirli ülkede KBH'nin ana nedeni diyabet ve hipertansiyondur. Diyabet dünyada tüm KBH sebeplerinin %30-50'sini oluşturmaktadır ve bu oranın giderek artması beklenmektedir. Yapılan çalışmalar kan basıncı kontrolündeki kötüleşmenin KBH'nin gelişmesinde önemli bir risk faktörü olduğunu bildirmektedir (24). Öte yandan Asya, Sahra altı Afrika ve Hindistan'da nedeni bilinmeyen ve glomerülonefrite bağlı KBH daha yaygındır. Coğrafi olarak lokalize KBH'de ise suyun ağır metaller, toprağın organik bileşikler ve pestisitler tarafından kirlenmesiyle oluşan çevre kirliliği sorumlu gösterilmektedir (23). KBH'nin genetik ve epigenetik nedenleri de vardır. Böbrek ve idrar yollarındaki doğuştan anormalliklerle sonuçlanan hastalıklar KBH nedenlerindendir. Otozomal dominant polikistik böbrek hastalığı da yaşamın ilerleyen dönemlerinde KBH'ye neden olmaktadır. Genotipte değişiklik yoluyla meydana gelmeyen, kalıtsal olan, gen transkripsiyonunda ve fenotipte ortaya çıkan ifadedeki değişiklikler (epigenetik etkiler) de KBH'ye yatkınlık oluşturur. İnflamasyon, oksidatif stres ve üremi, epigenomda fibroze aracılık eden süreçleri indükleyebilir ve KBH'nin ilerlemesinde rol oynayabilir (25,26).

KBH'nin patofizyolojisine bakıldığında renal fibrozun önemi görülür. Renal fibroz, tekrarlayan kronik yaralanmalar sonucu böbrek dokusunun başarısız yara iyileşmesini gösterir ve glomerüloskleroz , tübüler atrofi ve interstisyel fibroz ile karakterizedir. Glomerülosklerozun tetiklenmesi, düz kas hücrelerinin ve mezengial hücrelerin proliferasyonu, endotel hasarı ve disfonksiyonu ve normalde glomerüler bazal membranı kaplayan podositlerin yıkımı ile gerçekleşir. Hipertansiyon ve dislipidemi glomerülosklerozun ilerlemesi için birer risk faktörüdür. Renal fibrozun diğer karakteristik özellikleri olan tübüler atrofi, interstisyel fibroz ve skar oluşumu ise proteinüri ve GFH ile yakından ilişkilidir. Sitokinler ve albümin başta olmak üzere hasarlanan böbrekte anormal şekilde filtrelenen idrar proteinleri tübüler epitel hücrelerini uyarırlar. Uyarılan tübüler epitel hücreleri, inflamatuar süreçleri tetikleyen reaktif oksijen türleri ve kemokinleri sentezler. Bu ajanlar, inflamatuar hücrelerin renal interstisyuma çekilmesine ve interstisyel miyofibroblastlar ile etkileşimlerin başlamasına neden olur. Fibrozun oluşması ve gelişmesiyle hasarlanan tübüler epitel, rejeneratif kapasitesini kaybeder. Böylece tübüller atrofiye uğrar ve fonksiyonel olmayan glomerüller ortaya çıkar. Tübüler hücre alanı ölçümleri GFH ile yakından ilişkilidir ve histolojik olarak gösterilebilir.

Böbrek fonksiyonundaki değişimi izlemek için basit ve ucuz olan GFH kullanılmaktadır. GFH'nin hesaplanmasında ise yaygın olarak kreatinin kullanılmaktadır. Kreatinin, genellikle sabit bir oranda üretilen ve glomerulus tarafından serbestçe filtrelenen kas

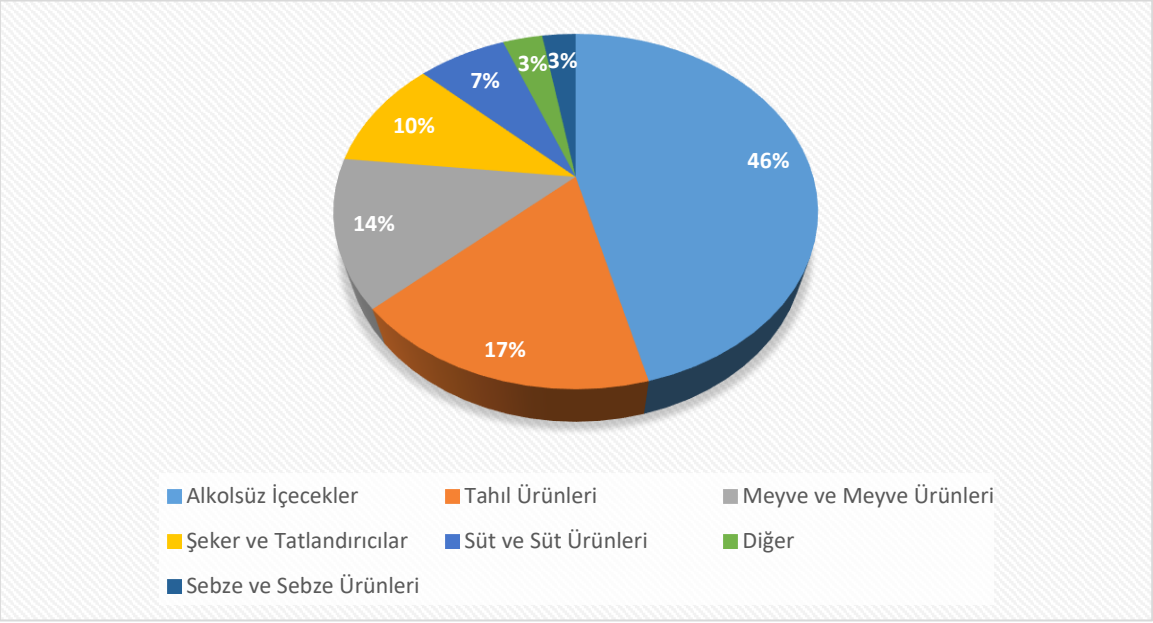
metabolizmasının bir yan ürünüdür. Kreatinin düzeyi böbrek dışı birçok faktörden etkilenebilir. Özellikle aşırı sıvı yüklenmesi veya dolaşım hacminin azalması, kas kaybı ve sepsis gibi durumlarda kreatinin ve idrar çıkış değerleri yanıltıcı olabilir. Ayrıca kreatinin konsantrasyonu ek faktörler olan et tüketimi veya protein takviyelerinin kullanımı ve fiziksel aktiviteden de etkilenmektedir. Bir diğer önemli husus ise kreatininin nefronların önemli bir kısmı etkilendikten sonra yükselmesidir (1,11).

Böbrek hasarının göstergelerinden olan proteinüri, SEBH riskinin artışıyla ve erken ölümle ilişkilidir (27). Sağlıklı bireyler her gün idrarda 150 mg'dan az protein ve 30 mg'dan az albümin kaybederler. Bu değerlerin üzerindeki protein ve albüminin kalıcı kayıpları, artan glomerüler geçirgenlik ile dolaşımda kalması gereken makromoleküllerin süzülmesine izin veren böbrek hasarını göstermektedir (Tablo 3). Ayrıca proteinürinin azalması tedavi yanıtında böbrek hastalığının daha yavaş ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir (27).

ABH ve KBH tanı ve takibinde serum kreatinin, GFH, proteinüri kullanılsa da son yıllarda hastalığın daha erken tespiti, bu belirteçlerin kısıtlamalarının getirdiği gecikmeleri engellemek veya bu belirteçleri desteklemek amacıyla yeni belirteçler saptanmaktadır (28). Bu yeni belirteçlerden biri olan calprotectin, nötrofillerde ve monositlerde bulunan bağışıklık sisteminin aracı bir proteinidir. Calprotectin, inflamasyon sırasında oluşan reaktif oksijen radikallerini temizleyerek oksidatif strese karşı koruma görevi görür (29,30). İnflamasyon bölgesinde yüksek konsantrasyonlarda tespit edilmiştir ve bu nedenle lokal inflamasyon reaksiyonlarının göstergesi olarak görülmektedir (31,32). Böbrek toplayıcı kanal epiteli tarafından da üretilen calprotectin, böbrek hasarı sonrası idrarda tespit edilebilir (29). Yapılan çalışmalar özellikle prerenal ile intrinsik ABH'nin ayırt edilmesinde calprotectinin önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir (33,34). Bir diğer belirteç olan endocan veya endotelyal hücreye özgü molekül 1 (ESM-1), esas olarak akciğerler ve böbrekler olmak üzere vasküler endotelyal hücrelerden kana salınan bir dermatan sülfat proteoglikandır (35,36). Endotel hasarı ile endocanın kana salgılanması artış göstermektedir (37,38). Sayısı az olsa da yapılan çalışmalar ABH'de serum endocan seviyelerindeki artışı göstermektedir (39,40). Glomerüler hasar meydana geldiğinde glomerüllerden yüksek oranda eksprese edilen endocanın, klirensi azalır ve seviyesi artar. Glomerüler hasarın ön planda olduğu KBH hastalarında yüksek endocan seviyelerinin sebebi bu şekilde açıklanmaktadır (41). Bu nedenle serum endocan seviyesi ABH'li hastalarda glomerüler/vasküler-endotelyal hasarın boyutunu yansıtabilir (42). Ayrıca GFH ile ters orantılı olan serum endocan düzeylerinin KBH evresinin tahmininde yardımcı olabileceği düşünülmektedir (43,44).

FRUKTOZ

Fruktoz sebzelerde, meyvelerde ve balda bulunan, yağ ve glikojenin depolanmasında rolü olan bir monosakkarittir. Fruktoz tüketimine bakıldığında, insanlar uzun yıllar boyunca fruktozu ortalama 16-20 g/gün olarak çoğunlukla taze meyveler aracılığıyla tüketirken batılı tarzda beslenmeyle birlikte fruktoz tüketiminde artış görülmüştür. Günümüzde ise yaklaşık 85-100 g/gün fruktozun tüketildiği ve günlük enerjinin %15-20'sinin fruktoz kaynaklı olduğu tespit edilmiştir (45,46). Fruktoz, tatlılığı nedeniyle işlenmiş yiyecek ve içeceklere yaygın olarak eklenmektedir. Fruktozun önemli kaynaklarından biri yüksek fruktozlu mısır şurubudur (HFCS). Enerji veren ve tatlandırıcı olan HFCS, konserve reçeller, kahvaltılık gevrekler, unlu mamüller, gazlı içecekler ve meyve suyu, soğuk çay gibi alkolsüz hazır içeceklerin çoğunda oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Alınan besinlerdeki fruktoz yüzdeleri Şekil 1'de gösterilmiştir (47). Fruktozun gıda üreticileri tarafından yaygın olarak kullanılmasının sebebi olarak fruktozun güçlü bir tatlandırıcı olması, çabuk kristalleşmesi, lezzet artırıcı etkisi ve ucuz olması gösterilmektedir (48-51).

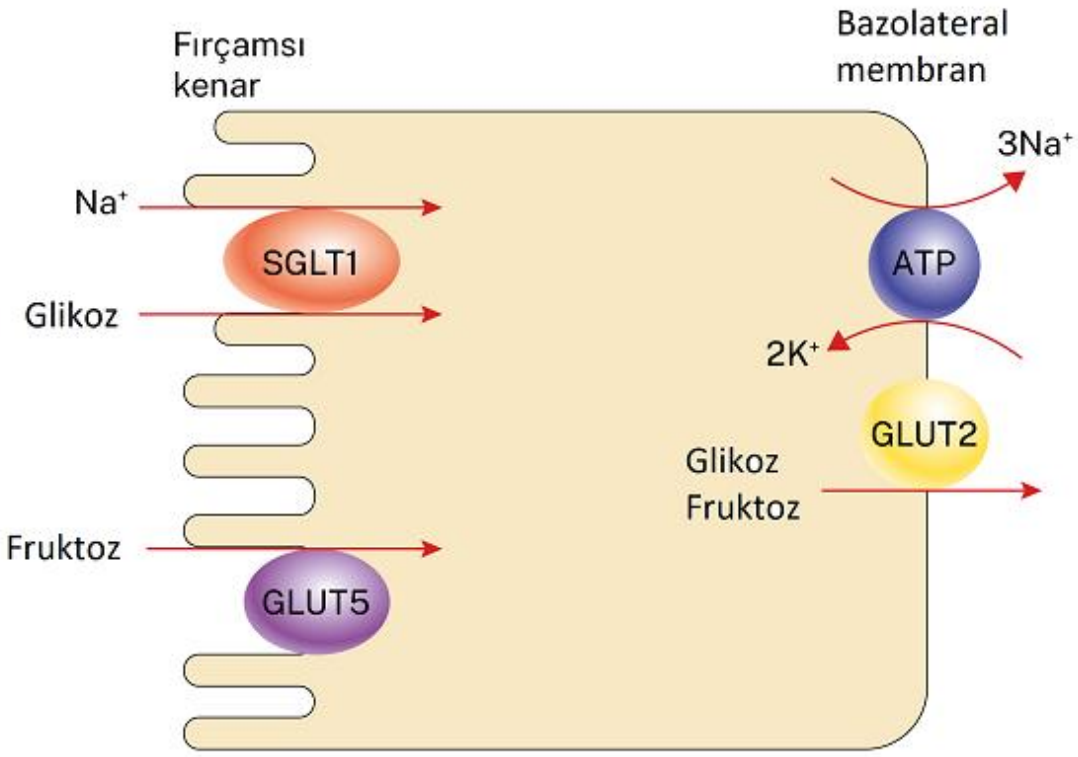


Şekil 1. Alınan besinlerdeki fruktoz yüzdeleri (47).

Fruktozun Emilimi ve Hücreye Girişi

Fruktoz emilim, metabolizma, yıkım, yıkım ürünleri ve düzenleyici mekanizmalarıyla glukozdan oldukça farklıdır. Diyetle alınan fruktoz ince bağırsağın fırça kenarından glukoz

taşıyıcı 5 (GLUT5) ile kolaylaştırılmış difüzyon yoluyla enterosit içine emilir. Glukoz ise bağırsaktan sodyum bağımlı glukoz taşıyıcısı 1 (SGLT) ile aktif olarak emilmektedir. SGLT1'in çalışması için gerekli Na^+ bağırsak epitel hücresinin bazolateral kutbunda bulunan Na^+/K^+- ATPaz tarafından sağlanmaktadır (52)(Şekil 2). Enterosit içine emilen fruktoz ve glukoz, enterositin bazolateral kutbunda bulunan glukoz taşıyıcı 2 (GLUT2) tarafından sistemik dolaşıma taşınır.

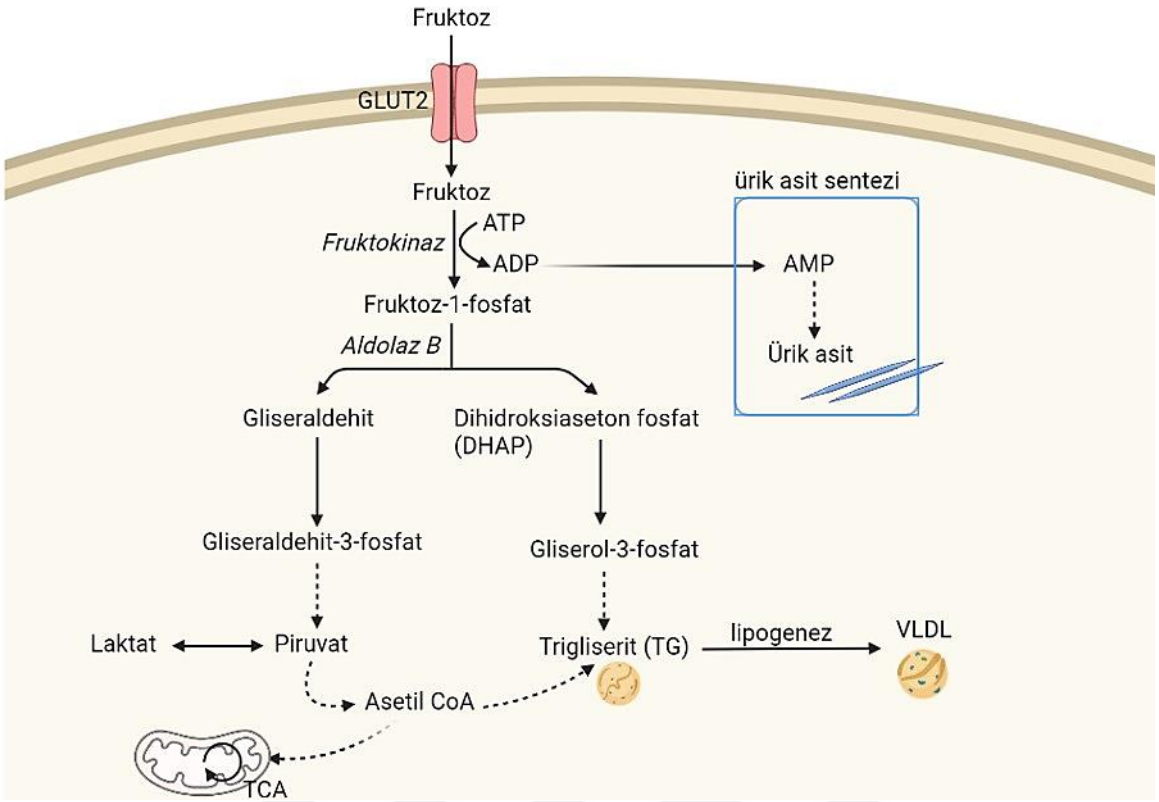


Şekil 2. Glukoz ve fruktozun ince bağırsak epitel hücresinden emilimi (52).
SGLT: Sodyum bağımlı glukoz taşıyıcısı 1; GLUT5: Glukoz taşıyıcı 5; GLUT2: Glukoz taşıyıcı 2

Fruktozun Hücre içi Metabolizması

Sistemik dolaşıma verilen fruktozun %50'den fazlası karaciğerde metabolize edilir (53). Bağırsaktan emilen fruktoz, portal dolaşım yoluyla karaciğere gelir ve GLUT2 ile hepatositlere alınır (54). Ardından fruktoz fruktoliz ile karaciğerde metabolize edilir. Fruktoz glikolitik yolağın düzenleyici basamağını atlayarak glikolitik yolağa girer ve karaciğerde glukoza göre daha hızlı metabolize edilir. Fruktokinaz (KHK) enzimi ilk fosforilasyon reaksiyonunu hızlı bir şekilde katalize eder ve fruktoz-1-fosfat (fruktoz-1-P) üretilir. Böylelikle fruktoz katabolizması başlar (55). Ardından fruktoz-1-P, Aldolaz B enzimi ile trioz fosfatların iki ana bileşeni olan dihidroksiaseton fosfat (DHAP) ve gliseraldehite parçalanır. DHAP ve gliseraldehitin bir kısmı glukoneogenez ile glukoza dönüştürülürken bir kısmı laktata dönüştürülür ve dolaşıma salınır (56). Bir kısmı ise gliserol-3-fosfata (gliserol-3-P) metabolize edilebilir. Bu arada, gliserol-3-P'den lipogenez yoluyla serbest yağ asitleri (FFA) ve trigliserid (TG) yapılır. TG üretimi sırasında lipid ara maddesi olan diaçilgliserol (DAG) üretilir. Daha sonra üretilen TG, çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL)-TG üretimi ve salgılanmasında görevli apolipoprotein B100 (ApoB100) ile paketlenir. Fruktoliz sonucunda birincil ve yan ürünler olarak glukoz, laktat, FFA, VLDL- trigiliserit (TG), ürik asit (UA) ortaya çıkmış olur. Ayrıca gliseraldehit bir dizi enzimle (gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz, fosfogliserat kinaz, fosfogliserat mutaz, enolaz, piruvat kinaz ve piruvat dehidrojenaz tarafından ardışık olarak) katalizlenerek trikarboksilik asit (TCA) döngüsüne katılmak üzere asetil-CoA'ya da dönüştürülebilir (Şekil 3).

Fruktoz ekstrahepatik olarak da metabolize edilir ve emilir. GLUT5'in, yağ dokusu, böbrek, kas iskelet dokusu, testis ve beyinde yaygın olarak bulunması, düşük afiniteli bir fruktoz taşıyıcısı olan GLUT2'nin böbrek ve ince bağırsakta önemli ölçüde bulunması nedeniyle fruktoz ekstrahepatik olarak emilir ve metabolizması gerçekleşir (53). Glomerüllerden süzülen fruktozun bir kısmı GLUT2 ve GLUT5 ile proksimal tübüllerden geri emilerek yıkımı gerçekleşir. Geri kalanı ise idrarla atılır (57).



Şekil 3. Fruktoz metabolizması.

VLDL: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein

Fruktozun Patofizyolojik Etkileri

Fruktolizin hızlı gerçekleşmesinden dolayı ATP tükenmesine yol açar ve bu durum metabolik strese neden olur (58). ATP tükenmesi, oksidatif strese, inflamatuar yanıtlara ve anormal insülin, inflamatuar sitokin, leptin, adiponektin ve endotoksin üretimine neden olur. Bu durum doku ve organlardaki metabolik yükü kötüleştirir, iştahı ve gıda alımını bozar (59).

Fruktoliz sonucu oluşan metabolik ürünler olan glukoz, laktat, FFA, TG, VLDL-TG, DAG, UA aşırı üretilir ve ardından sistemik dolaşıma katılır. Oluşan metabolitlerin ekstrahepatik dokulara iletilmesi ve metabolizmasıyla da enerji hemostazı etkilenir ve doku - organ fonksiyonlarının bozulmasına neden olur. Bu nedenle yüksek fruktoz seviyesi ve fruktoliz sonucu oluşan metabolitlerin yüksek seviyeleri tehlikeli faktörler olarak kabul edilmektedir (59).

Yüksek fruktoz tüketimiyle hepatik lipogenezin artışı metabolik yük oluşturmaktadır. Artan lipogenez sonucu oluşan artan plazma TG ve VLDL-TG seviyeleri, hiperlipidemiye ve ekstrahepatik doku ve organlarda TG birikimine neden olur (60). Ayrıca fruktozla beslenme hepatik karbonhidrat yanıt elemanı bağlayıcı proteini (ChREBP) yukarı regüle ederek glikolitik

akışı artırabilir ve glukoz homeostazını bozucu etki gösterebilir (61). ChREBP'nin yukarı düzenlenmesi de karaciğerde tekli doymamış yağ asitleri ve çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) üretimini artırmak için gerekli enzimleri aktive eder. FFA aşırı üretimi, mitokondriyal işlev bozukluğuna da aracılık eder. Fruktozla beslenen hayvanların farklı dokuları incelendiğinde mitokondriyal kütlede artış, mitokondriyal elektron taşıma kapasitesinde azalma, mitokondriyal membran potansiyeli kaybı ve antioksidan savunmada bozulma ile karakterize edilen mitokondriyal disfonksiyon saptanmıştır (62-65).

Karaciğerdeki kontrolsüz fruktoz katabolizmasının ATP tükenmesine ve sistemik dolaşımda aşırı UA üretimine neden olarak insanlarda ve deney hayvanlarında hiperürisemiye neden olduğu gösterilmiştir (66). Yapılan çalışmalar, Fruktozun neden olduğu serum UA yükselmesinin ekstrahepatik dokularda ROS oluşumuna neden olduğunu ve hiperüriseminin kronik böbrek hastalıklarını tetiklediğini ortaya koymaktadır (59,67).

Fruktoz ve Böbrek Hasarı

Son yüzyılda fruktoz tüketimindeki artışla beraber obezite, diyabet ve böbrek hastalıklarının görülme sıklığında artış saptanmıştır. Yapılan bir kohort çalışmasında, daha yüksek şekerle tatlandırılmış içecek tüketiminin, artmış KBH olasılığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (68). Buna bağlı olarak böbrek hastalığı gelişmesinde yüksek miktarda fruktoz tüketiminin sorumlu olabileceği düşünülmektedir (5). Yapılan çalışmalarda yüksek fruktozlu içecekleri düzenli tüketen insanlarda, KBH gelişme riskinin yaklaşık %60 arttığı bildirilmiştir (4). KBH oluşmasında artan fruktolize bağlı olarak inflamatuar etki gösteren ürik asit üretimindeki artış, mitokondriyal stres ve fibroz sorumlu tutulmaktadır (5). Gersch ve arkadaşları (69) yaptıkları çalışmada %60 fruktoz içeren diyet uygulamasının böbrek fonksiyonlarını kötüleştirdiğini, proteinüriyi alevlendirdiğini ve glomerülosklerozu hızlandırdığını, glukoz içeren diyetle beslenen sıçanlarda ise bu bulguların ortaya çıkmadığını göstermişlerdir. Morfolojik olarak ise, yüksek fruktozlu diyetin böbrek ağırlığında artışa ve sıçan böbreğinde hafif tubulointerstisyel hasara neden olduğu bildirilmiştir. Olası mekanizmanın proksimal tübüler hücre çoğalmasının fruktoz ile doğrudan uyarılması olabileceği düşünülmüştür (70).

Fruktoz katabolizmasını başlatan fruktokinaz enzimi ekstrahepatik olarak böbrekte de eksprese edilir. Ancak gösterilmiştir ki fruktokinaz enzimi nefronun tüm segmentlerinde değil sadece prokismal tübülde eksprese edilmektedir (71,72). Proksimal tübül hücrelerinin apikal tarafında bulanan GLUT5 aracılığıyla sitozole giren fruktoz fruktokinaz enzimiyle metabolize edilir (72). Ardından yine proksimal tübülde eksprese edilen aldolaz B ile Gliserol-3-P, DHAP

ve gliseraldehite yıkılır. Fruktokinaz enziminin fruktozu katalizlemesi ATP tükenmesine yol açarak UA üretimi ile sonuçlanır. Aşırı UA üretimi ise hiperürisemiye neden olur (66). Yüksek fruktoz tüketimi ve metabolize olması sonucu artan UA, oksidatif stresi tetikler. Hiperürisemiye ek olarak fruktoz metabolizması sonucu meydana gelen hiperlipidemi ile birlikte ROS üretimi organ hasarına neden olmaktadır (59). Sonuç olarak lokal meydana gelen oksidatif stres böbrek fonksiyonlarında bozulmaya neden olur (73). Ayrıca UA'nın tübülointerstisyel hasar dışında endotel disfonsiyonuna, glomerüler hipertansiyona yol açan inflamasyona neden olduğu düşünülmektedir (66,67,70,74-76).

Sonuç olarak bakıldığında, fruktozun kronik tüketimi tübülointerstisyel hastalığa neden olur ve renal otoregülasyonu değiştirici rol oynar (70,77).

FERROPİTOZ

Hücre ölümü hücrenin temel yaşam süreçlerinden biridir. Fizyolojik veya patolojik koşullarda hücrenin yaşamının sonunu ifade eder. Tanımlanmış birçok hücre ölüm şekli vardır ve hücre ölüm şekilleri morfolojik, işlevsellik (fizyolojik - patolojik), enzimolojik, immünolojik özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır. Her geçen gün hücre ölüm yollarını düzenleyen yeni mekanizmalar keşfedilmektedir ve bu durum sınıflandırmada karmaşaya neden olmaktadır. Son yıllarda Hücre Ölümü Adlandırma Komitesi (NCCD), hücre ölümünün sınıflandırılması ve yorumlanması için kılavuzlar formüle etmiştir. NCCD, hücre ölümlerini kaza sonucu hücre ölümü (accidental cell death (ACD)) ve düzenlenmiş hücre ölümü (regulated cell death (RCD)) şeklinde iki ana alt başlıkta tanımlamıştır. ACD, plazma zarının parçalanmasıyla meydana gelen ve genellikle anlık olup kontrol edilemeyen hücre ölümünü ifade eder. RCD ise farmakolojik veya genetik olarak düzenlenebilen ve sinyal iletim yolaklarının aktivasyonuyla meydana gelen hücre ölüm şeklini ifade eder (78). RCD'nin bir formu olan ferropitoz, lipid peroksidazyon mekanizması ve demir homeostazındaki değişiklikler sonucunda ortaya çıkmaktadır.

Ferropitozdan ilk olarak 2003 yılında Dolma ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada erastin ile indüklenen apopitotik olmayan hücre ölümü olarak bahsedilmiş ancak ilk olarak 2012 yılında Dixon ve arkadaşları tarafından ferropitoz demirle indüklenen ve apopitotik olmayan hücre ölümü olarak tanımlanmıştır (79,80). Ferropitoz hücre morfolojisi ve biyokimyasal özellikler olarak diğer RCD türleri olan apopitoz, nekroz ve otofajiden farklıdır. Hücre küçülmesi, kromatin yoğunlaşması, apopitotik cisimlerin oluşumu ve ardından hücre iskeletinin parçalanması gibi tipik apopitotik hücre ölümünün morfolojik özellikleri, nekrozun morfolojik

özellikleri olan sitoplazma ve organellerin şişmesi ve hücre zarının yırtılması veya otofajide görülen otofajik vakuoller ferropitozda görülmez. Morfolojik olarak ferropitotik hücre ölümünde mitokondriyal kristanın azalması veya kaybolması, mitokondriyal hacimde azalma, mitokondri membran yoğunluğunda artış görülür. Bu değişiklikler meydana gelirken hücre çekirdeği normal boyuttadır, kromatin kondensasyonu gerçekleşmez ve hücre zarı sağlam kalır. Biyokimyasal olarak ise nekrozda görülen ATP seviyelerinde azalma, otofajide görülen artmış lizozomal aktivite, apopitozda görülen DNA parçalanması ferropitozda görülmez. Ferropitotik hücre ölümünde ferropitoza özgü olarak demir (Fe^{2+}) birikimi ve lipid peroksidasyonu gerçekleşir (80-82).

Ferropitozda Demir Birikimi

Demir, canlılar için önemli bir temel metaldir. DNA replikasyonu, onarımı ve translasyonu, eritropoez, oksidatif metabolizma gibi birçok biyolojik süreç için gereklidir. Demirin Fe^{2+} (ferröz) veya Fe^{3+} (ferrik) olarak iki oksidasyon durumu vardır. Gıdalar genellikle ferrik demir içerir ve emilebilmesi için ferröz demire indirgenmesi gerekir. Fe^{3+} serumdaki transferrine (TF) bağlanarak taşınır. Demire bağlı (Fe^{3+}) transferrin hücre zarındaki transferrin reseptör 1'e (TFR1/TFRC) bağlanır ve ferrik demir hücre içine girer (83). Endozom içinde ferrik demir ferröz demire indirgenir. Ferröz demir endozomdan iki değerlikli metal taşıyıcı 1 (DMT1) yoluyla sitozole bırakılır (81). Hücre içine salınan ferröz demir, mitokondride oksijen taşınması (hem yapımı) ve enerji metabolizması gibi hücresel işlevlerde kullanılır. Aynı zamanda kofaktör olarak demir gerektiren enzimlerin aktivitesini düzenleyerek oksidatif streste rol oynar (84). Hücre içi proteine bağlı olmayan redoks aktif demir (sitozolik ve mitokondriyal kararsız demir havuzu (LIP)) hücresel işlevlerde kullanılabilir veya ferritin olarak depolanabilir. Demir alımı, depolanması veya kullanımı arasındaki dengesizlik sonucu artan hücre içi kararsız demir fenton reaksiyonu ile doğrudan reaktif oksijen radikallerinin (ROS) üretimine rol açar. Oluşan ROS lipid peroksidasyonuna neden olur. Böylece oksidatif hasarı artırabilir (80). Hem hücre içi kararsız demirin artışı hem de demir aracılı ROS üretimi ferropitozis indükleyicilerine duyarlılığı artırır (80,85-90).

TFRC/TFR1 hücre yüzeyinde bulunur ve demir yüklü TF için dimerik bir glikoprotein reseptörüdür. Yüksek demir ihtiyacının karşılanması gereken durumlarda TFR1'in ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (91). TFR1 ekspresyonunun artışı hücreleri hücre içi demir havuzunu artırarak erastin kaynaklı ferropitoza duyarlı hale getirmektedir (81)(Şekil4). TFR1'in yıkılması veya gen ifadesinin azalmasının ise ferropitotik hücre ölümünü inhibe ettiği

gösterilmiştir (92). Feng ve arkadaşları ise TFR1 birikiminin ferropitoza özgü olduğunu göstermiş ve ferropitoz belirteci olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir (93).

Ferropitozda Lipid Peroksidasyonu

Yağ asitleri hücresel lipid metabolizmasının temelini oluşturur. Enerji temini, hücre zarı oluşumu gibi hücresel işlevleri yerine getirirler. Aynı zamanda çeşitli sinyal molekülleri için bir öncü görevi görürler (94). Uzun zincirli yağ asitleri ikiden fazla çift bağ içerdiğinde çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) olarak adlandırılır (95). PUFA'da bulunan yüksek sayıdaki çift bağ, PUFA'nın oksidasyona karşı duyarlılığını artırmaktadır (96). Ayrıca membranlarda bulunan PUFA'lar ROS saldırılarının ilk hedefidir (97). Hücre membranında bulunan PUFA'ların oksidasyon reaksiyonu lipid peroksidasyonu olarak tanımlanmaktadır. PUFA'lar lipid peroksidasyonuna duyarlıdır ve lipid peroksidasyonu ferropitozun ayırt edici özelliğidir (98). PUFA'ların oksitlenmesinde doğrudan demir rol alabildiği gibi demir içeren lipooksijenaz (Lox) enzimi de rol alabilir ve sonucunda lipid ROS'ları oluşur (99). Lipid peroksidasyounun son ürünlerinden biri üç karbonlu bir dialdehit olan malondialdehittir (MDA). Bu önemli son ürün hücre membran geçirgenliğini arttıran enzimlerin aktivitelerinin bozulmasına, DNA yapısındaki baz değişimlerine ve kırılmalara neden olmaktadır. Ayrıca membranlardaki iyon alışverişine etki eder ve lipidlerin çapraz bağlanmasına neden olur. Böylece hücre içi iyon dengisi bozulur. MDA düzeylerindeki artış serbest radikallerin üretimini arttır, antioksidan aktiviteyi ise azaltır. Bu durum hücre içi antioksidanlar ile serbest radikaller arasındaki dengenin bozulmasıyla sonuçlanır (100-102).

Araşidonik asit (AA) ve adrenik asit (AdA) lipid peroksidasyonunun ana substratlarıdır ve bu nedenle ferropitozu indükleyen başlıca PUFA'lardır (103). Açil-CoA sentetaz uzun zincirli aile üyesi 4 (ACSL4) ve lizofosfatidilkolin asiltransferaz 3 (LPCAT3) hücrelerde lipid peroksit substratlarının birikmesine neden olan pro-ferropitotik düzenleyicilerdir. ACSL4 önce serbest AA/AdA'nın CoA'ya biyokimyasal reaksiyonunu katalize ederek AA/AdA-CoA türevlerini oluşturur. Ardından LPCAT3 AA/AdA-CoA ve membran fosfatidiletanolaminin (PE) biyosentezini katalize eder ve AA/AdA-PE oluşturur (103-105). Oluşan AA/AdA-PE'ler enzimatik olarak Lox yoluyla veya otooksidasyon yoluyla PE-AA-OOH oluşumuna ilerleyebilir. Bu reaksiyonlar mitokondriyal zarda ya da hem mitokondriyal hem endoplazmik retikulum zarında gerçekleşebilir (80,98,103). Sonuç olarak oluşan sitotoksik lipid peroksitler (L-OOH) hücre ölümüne neden olur. Ayrıca glukozun Krebs döngüsü ürünleri de lipidlere dönüşerek ROS üretimine katılır (106)(Şekil 4). Tekli doymamış yağ asidi (MUFA) moleküllerinin ise PUFA'ların aksine ferropitozdan kurtarıcı etkiye sahip olduğu, dışardan

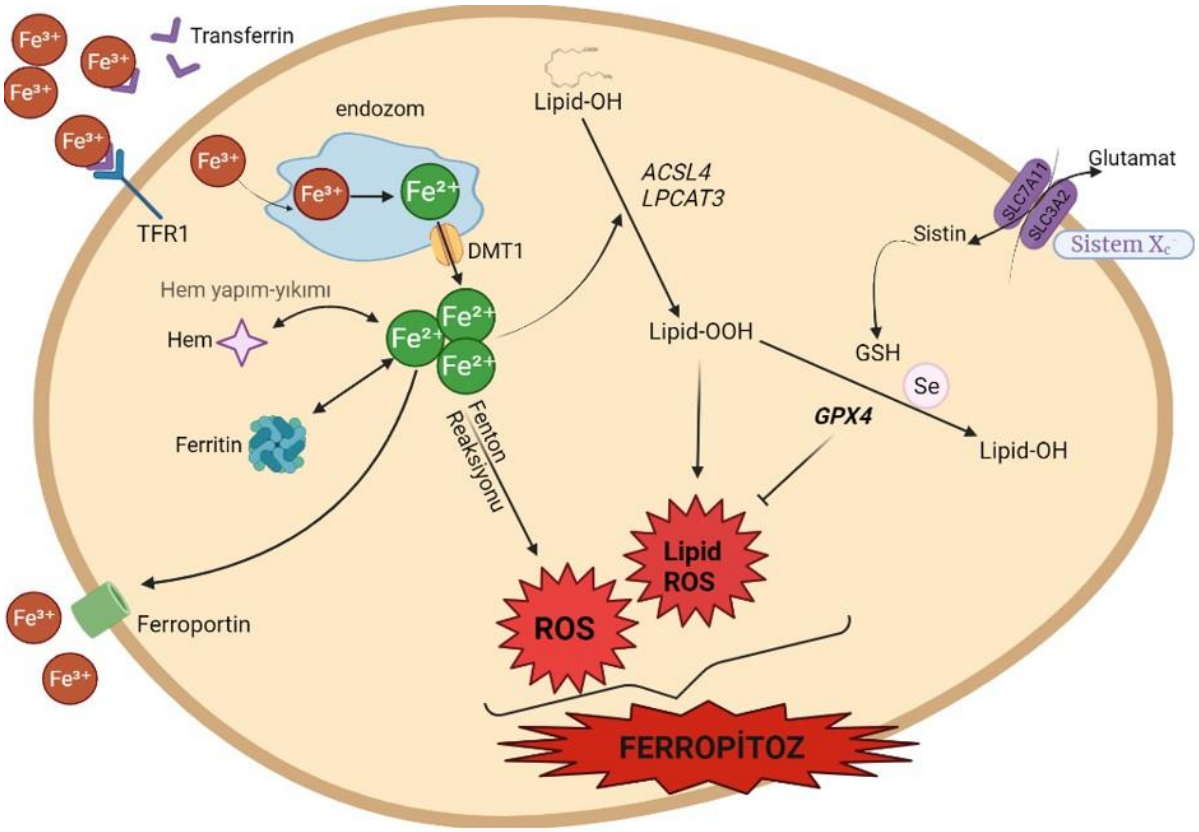
MUFA takviyesinin hücrelerin ferropitoza yenik düşme eğilimini azalttığı bildirilmiştir (98,107,108).

Yapılan çalışmalarda ACSL4'ün genetik kaybı veya farmakolojik inhibisyonunun uzun zincirli PUFA'ların MUFA'lara dönüşümüne neden olarak ferropitoza gidişi engellediği gösterilmiştir (103,109,110). Tam tersi olarak ACSL4'ün artan ekspresyonu/aktivitesi hücreyi ferropitotik hücre ölümüne götürebilir (111,112). Sonuç olarak ferropitozun düzenlenmesinde rol oynayan ACSL4 veya LPCAT3'ün inhibisyonu veya ekspresyonunun azaltılması hücrelerde lipid peroksit substratlarının birikmesini azaltarak ferroptozu inhibe eder (103).

Ferropitozda Antioksidan Mekanizma

Ferropitozda iki önemli antioksidan mekanizma dikkat çekicidir. Birincisi hücrelerdeki önemli bir antioksidan sistemin parçası olan sistin ve glutatyonun (GSH) hücresel düzenleyicisi sistin-glutamat antiporter X_c^- sistemidir. Sistem X_c^-, fosfolipid çift katmanlarında bulunan transmembran protein kompleksidir ve iki temel alt bileşenden oluşur: hafif zincir alt birimi SLC7A11 ve ağır zincir alt birimi SLC3A2 (113). Bu kompleks sayesinde hücre içine sistin alınırken hücre dışına glutamat atılır ve bu değişim 1:1 oranında gerçekleşir. Hücre dışı glutamat birikimi sistem X_c^-'yi inhibe eder ve hücre içi sistin tükenmesi ferropitozu indükler (80,114). Ayrıca X_c^- sisteminin alt brimi olan SLC7A11'in yukarı düzenlenmesinin, dışardan indüklenen ferropitozu inhibe ettiği bildirilmiştir (115). Hücre içine alınan sistin endojen antioksidan olan GSH üretimine katılır (92,116). GSH üretimi hücre içi sistein varlığına bağlıdır ve glutatyon peroksidazların (GPX) ROS'u azaltmasında görevli kofaktörüdür (117).

İkinci önemli antioksidan mekanizma ise bir glutatyon peroksidaz olan GPX4'tür. GPX4, lipid peroksitlerin azalmasını katalizleyen ferropitozdan koruyucu ana düzenleyici enzim olarak gösterilmektedir (118). GPX4 aktivitesi selenyum ve GSH tarafından kontrol edilir. GPX4'ün kofaktörü olan GSH'ın tükenmesi ferropitozun tetiklenmesine neden olur. Yapılan bir çalışmada selenyumun GPX4'ün ferropitozdan koruyucu aktivitesini artırabileceği gösterilmiştir. (119). Ferropitozun başlaması, dolaylı olarak sistem X_c^-'nin inhibisyonu ile GPX4'ün işlev görememesi ve ferropitoz belirteci olan lipid peroksidlerinin birikimiyle meydana gelir (80). GPX4 ekspresyonunun indüklenmesi ferropitozu inhibe edici etkiye sahiptir (81). GPX4 ekspresyonun azalması ise ferropitozu indükleyici bir etki gösterir (120)(Şekil 4).

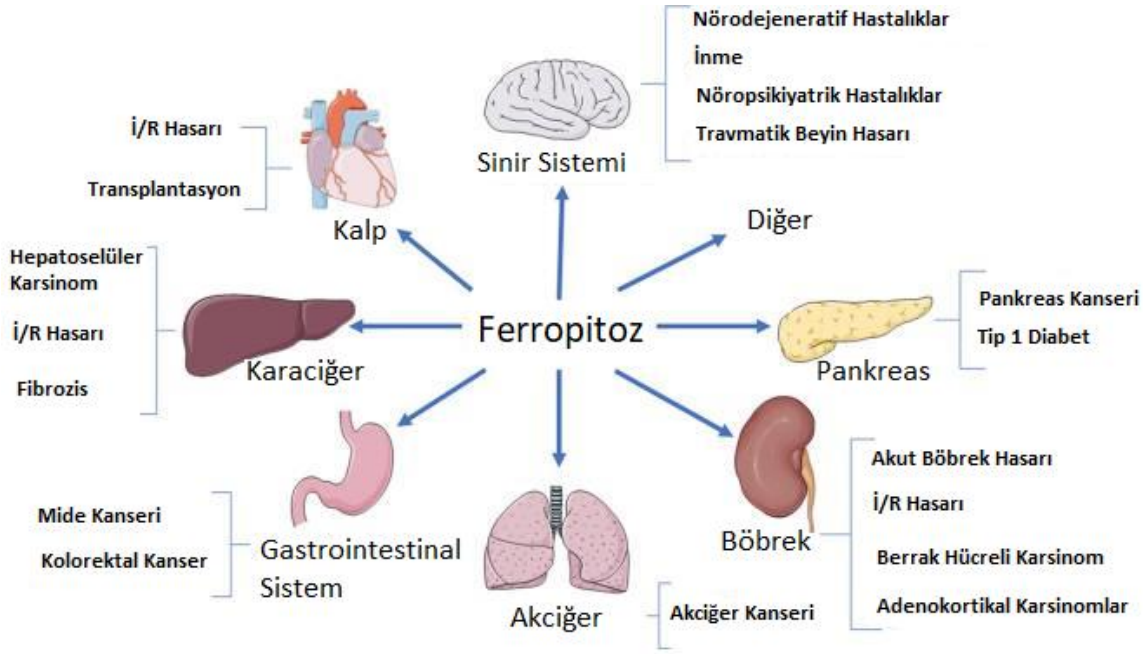


Şekil 4. Ferropitoz mekanizması.

TFR1: Transferrin reseptör 1; DMT1: Endozomdan iki değerlikli metal taşıyıcı 1; ACSL4: Açil-CoA sentetaz uzun zincirli aile üyesi 4; LPCAT3: Lizofosfatidilkolin asiltransferaz 3; GSH: Glutatyon; Se: Selenyum; GPX4: Glutatyon peroksidaz 4.

Ferropitoz ve Böbrek Hasarı

Ferropitozun hastalıklardaki rolü net olmamakla birlikte birçok hastalıkla ilişkilendirilmektedir. Her geçen gün ferropitozun maligniteler, nörodejeneratif hastalıklar, iskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarı, akut böbrek hasarı, karaciğer ve kalp hastalıkları, hemokromatoz, nöropsikiyatrik hastalıklar (bipolar bozukluklar, depresyon, şizofreni ve Huntington hastalığı) ve daha birçok hastalık ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (121-124). Birçok organ hasarında ferropitoz görülse bile ferropitoza en duyarlı organ olarak böbrek gösterilmektedir (125)(Şekil 5).



Şekil 5. Ferropitoz ile ilişkili olan hastalıklar. (124).
İ/R: İskemi/reperfüzyon Hasarı

Son yıllarda ABH ve ABH'nin KBH'ye ilerlemesinin nedeni olarak demir birikimiyle beraber demir metabolizması ile ilgili proteinlerin bozulmuş ekspresyonu ve renal kortekste yüksek hemoglobin maruziyeti gösterilmektedir (126,127). Ayrıca böbrek hastalarındaki lipid metabolizmasındaki bozulma ve ferropitoza gidişte hiperlipidemi, yağ asidi alım bozuklukları, yağ asidi oksidasyonu bozukluğu ve obezite sorumlu tutulmaktadır (128-130). ABH'nin patogenezi oldukça karmaşıktır. Nefronların hasarlanmaya en duyarlı kısmı proksimal tübüllerdir (131). ABH'de böbrek hasarının oluşmasında ana neden ROS oluşumu olarak gösterilmektedir (116,132-134). Yapılan bir çalışmada GPX4'ün yokluğunda yoğun böbrek tübüler hücre ölümü gerçekleşmiş ve ardından farelerin ABH'ye bağlı olarak öldüğü gözlemlenmiştir (125). Başka bir çalışmada ise GPX4'ün indüklenmesiyle iskemi reperfüzyona bağlı oluşan hasar engellenerek ABH gelişiminin önlendiği görülmüştür (135).

ABH progresyonunu belirlemede demir önemli bir rol oynar ve plazma ferröz demir seviyeleri ABH riski ile pozitif ilişkilidir (136,137). Ferroportin hücre içi demirin hücre dışına atılımında görevli tek proteindir. Bu nedenle plazma demir seviyesinin düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. Ferroportin proksimal tübüllerin bazolateral membranında yer alır ve renal demirin geri emiliminde görevlidir. Yapılan bir çalışmada ABH'li farelerde ferroportin geninin susturulması sonucu GPX4 ve ferritin ekspresyonunda artış gözlemlenmiş ve böbrek fonksiyonlarında iyileşme tespit edilmiştir (85). Bu durum hücre içi kararsız demiri sınırlamak

için ferritinin ekspresyonunda artış olduğu ve böylelikle akut böbrek hasarını azalttığı şeklinde yorumlanabilir. Bu görüşü destekler şekilde başka bir çalışmada ise ferritin geninin proksimal tubüllerde susturulduğu ABH'li farelerde hayatta kalma oranı azalmış olarak bulunmuştur (138). Demirin fenton reaksiyonuyla ROS üretebilmesi böbrek proksimal tubüllerinde oksidatif hasar açısından önemlidir. Ayrıca demir yükündeki artış lipid peroksidasyonunuı da şiddetlendireceği için böbrek fonksiyonlarını kötüleştirici etki gösterir (139). Bu nedenle ABH'de kararsız demirin uzaklaştırılması veya şelasyonu ABH tedavisine katkı sağlayabilir.

Böbrekte lipid birikimi ABH ilerlemesine katkıda bulunduğu gibi mevcut ABH'nin kötüleşmesine de neden olur (140-143). Özellikle ABH'nin ana nedenlerinden biri olan iskemi reperfüzyon hasarında böbreklerdeki yağ asidi alım-kullanım dengesi bozulur ve yağ asidi oksidasyonunun düzenlenmesi zorlaşır. Bunun sonucunda lipid birikimi meydana gelir ve bu durum lipid peroksidasyonunu hızlandırarak ROS oluşumuna neden olur (140). Lipid peroksidasyonuyla ortaya çıkan oksidatif hasar böbrek hasarında artışa neden olur. Buna karşın lipid peroksidasyonunu inhibe edecek bir müdahale ise böbrek hasarını hafifletici etki gösterebilir ve ABH'de olası bir tedavi seçeneği olabilir (144).

Bir diğer ABH nedeni olan rabdomyolizde (RM) oluşan böbrek hasarı incelendiğinde miyositlerin parçalanması ile açığa çıkan miyoglobinin (Mb) böbrekte birikmesi görülür. Mb metabolizması tarafından üretilen demir hem proksimal tübüler epitel hücrelerinde doğrudan lipid peroksidasyonunu indükler hem de fenton reaksiyonu ile ROS üretimine neden olur. Yapılan çalışmalarda RM ile indüklenen ABH'de demir şelatörlerinin kullanımının Mb'lerin neden olduğu toksisiteyi azaltabildiği ve böbrek hasarını hafifletebilidiği gösterilmiştir (138,139,145). Guerrero-Hue ve arkadaşları ise RM ile indüklenen ABH'de ferropitozun rolü olduğunu ve ferropitozun inhibe edilebileceğini göstermiştir (146).

Bir başka ABH nedeni folik asit (FA) yüklenmesidir (147). FA böbrek lümeninde ve böbrek tübüler epitel hücrelerinde hasara neden olur (148,149). FA ile indüklenen ABH hayvan modellerinde böbrekte lipid peroksidasyonu oluşmuş ve bir ferropitoz inhibitörü olan ferrostatin-1 ile tedavi edilen hayvanlarda böbrek hasarının azaldığı ve böbrek fonksiyonunun düzeldiği gösterilmiştir (6).

Diğer bir ABH nedeni ise yaygın olarak kullanılan anti-tümör bir ilaç olan sisplatindir. Sisplatin ile indüklenen ABH'de demir düzeylerindeki artış dikkat çekicidir ve demir şelatörü ile muamele böbrek hasarına karşı koruma sağlar (150). Bir başka çalışmada ise proksimal tübülde ferritin ekspresyonu susturulmuş farelerde sisplatin uygulaması sonrası şiddetli böbrek hasarı görülmüştür (138). Bu çalışmalar sisplatine bağlı oluşan böbrek hasarında ferropitozun

rolü olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak birçok ABH modelinde patofizyolojik süreçlerde ferropitozun önemli bir rolü bulunduğu gösterilmiştir.

Kronik böbrek hastalığı (KBH) böbrek fonksiyonlarının kademeli olarak aylar veya yıllar içerisinde kaybı ile giden bir böbrek hastalığıdır. KBH'de uzun süreli yaralanmayı gösteren renal fibroz yaygın görülen bir patolojidir (23). Renal fibrozun meydana gelmesinde uzun süreli renal tübüler hasar sorumludur. Literatürde renal fibroz ile ferropitozun doğrudan ilişkisini gösteren kanıtlar olmasa da KBH'de görülen lipid ve demir metabolizmasındaki bozulma KBH'de ferropitozun rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Sağlıklı bir böbrekte renal demir birikimi görülmezken KBH'de tubüler demir birikimi ROS oluşumuyla oksidatif hasara neden olur (126,151). Biriken demirin uzaklaştırılması oksidatif stresi azaltarak hem ferropitotik hücre ölümüne gidişi durdurur hem de renal fibrozun azalmasına katkıda bulunur (152-154). Bu nedenle KBH'nin ilerlemesini geciktirmek için demir şelasyon tedavileri kullanılması oksidatif hasarı azaltarak fibroz oluşumun engelleyebilir (152).

KBH'de görülen renal lipid birikiminin nedeni hiperlipidemi ve/veya obezite olarak görülmektedir. KBH'nin ilerlemesi lipid birikimi artışı ile koreledir (155-158). Hiperlipidemi ve/veya obezitede adipoz dokudan adipoz olmayan dokulara ektopik lipid birikimi olarak adlandırılan lipid taşınması artar (159). KBH'de hiperlipidemi ve/veya obeziteye bağlı ektopik lipid birikimi ya da kendiliğinden ektopik lipid birikimi görülebilir (159,160). Yüksek yağlı diyetle beslenmeye bağlı olarak da böbreklerde lipid birikimi görülebilir (161). Bu renal lipid birikimi lipid peroksidasyonunu ve ROS oluşumunu artırarak organellere zarar verebilir ve ferropitoz oluşabilir. Oluşan oksidatif stres renal tübüler ve glomerüler yapıların hasarlanmasıyla sonuçlanır (129). Bu nedenle KBH'de doku hasarını hafifletmek için ektopik lipid birikimini önlemek ve lipid metabolizmasını düzenlemek esastır. Ancak KBH'de ferropitozun rolü net değildir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmaya Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan TÜHADYEK-32 protokol no'lu ve 2021.10.03 karar numarası ile etik onay alınmıştır (Ek-1). Çalışmamızda Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Birimi'nde üretilen ve standart laboratuvar koşullarında (22 ± 1 ºC, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda) tutulan 2-2,5 aylık Spraque-Dawley erkek sıçanlar kullanıldı. Tüm deney aşamalarında aynı birimde tutulan sıçanlara standart sıçan yemi verildi.

Çalışmamızda; 34 erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar 4 gruba ayrıldı. Deney süresince kontrol grubu çeşme suyu verilirken yüksek fruktoz grupları %20 fruktoz içeren çeşme suyu verildi.

Kontrol Grubu (n=8) sıçanlara çeşme suyu verildi.

F4 Grubu (n=9) sıçanlara 4 hafta boyunca % 20 fruktoz içeren çeşme suyu verildi.

F8 Grubu (n=8)sıçanlara 8 hafta boyunca % 20 fruktoz içeren çeşme suyu verildi.

F12 Grubu (n=9) sıçanlara 12 hafta boyunca % 20 fruktoz içeren çeşme suyu verildi.

Sıçanlar deney sürelerinin son gününde metabolik kafese alınarak 24 saatlik idrarları toplandı. Sıçanların 10 mg/kg rompun ve 50 mg/kg ketamin anestezisi altında kanları ve her iki böbreği alındı, eksanguinasyon yöntemi ile ötenazi uygulandı. Böbrekler uzunlamasına ikiye bölünerek böbreğin bir yarısı histopatolojik inceleme için %10'lu formalin solüsyonuna konuldu, diğer yarısı ELİSA kitlerine uygun tampon ile soğuk şartlarda homojenize edilip ependorf tüplere konularak analizler yapılıncaya kadar -80°C'de saklandı. Diğer böbrek uzunlamasına ikiye bölünerek yedek olarak -80°C'de saklandı. Kan örnekleri tüplere alınarak soğutmalı santrifüj ile +4°C'de 1000 g'de 15 dk, idrar örnekleri +4°C'de 1000 g'de 20 dk santrifüj edildikten sonra laboratuvar çalışmaları yapılıncaya kadar -80 °C'de saklandı.

Kullanılan Cihazlar

Spektrofotometre	: Spectronic Unicam Helios α, İngiltere
Hassas terazi	: Mettler Toledo, AB204-S, İsviçre
Soğutmalı santrifüj	: MPW 350R, Polonya
Su banyosu	: Nickel Clifton Elektro LTD, İngiltere
Otomatik pipetler	: Biohit Proline, Finlandiya, Mettler Toledo, İsviçre
	Eppendorf Multipipette/Repeate(Xstream), Amerika
Vorteks	: Heidolp, Almanya
Derin dondurucu	: Thermo Elektron Corporation, USA
pH metre	: InoLab, Level 1, Almanya
Manyetik karıştırıcı	: Remi Equipments, Hindistan
Homojenizatör	: Polytron Kinematica AG, İsviçre
Otoanalizör	: C16000, Architect, ABBOTT, Amerika
Distile su cihazı	: Millipore, France
Cam malzemeleri	: Deney tüpleri, beherler vb.
Elisa plaka okuyucu	: Bio Tek Instruments, Inc (USA)
Elisa plaka yıkayıcı	: Bio Tek Instruments, Inc (USA)

Kullanılan Kimyasal Malzemeler

NaOH	: Merck, Almanya
NaCl	: Sigma, Almanya
DTNB	: Sigma, Almanya
EDTA	: Merck, Almanya
KCl	: Merck, Almanya
Na_2HPO_4	: Merck, Almanya
Na_2CO_3	: Riedel de Haen, Almanya
$CuSO_4$	: Panreac, İspanya
GPX4 ELİSA kit	: Bioassay Technology Laboratory Katalog No: E2195Ra-96T
TFR-1 ELİSA kit	: Bioassay Technology Laboratory Katalog No: E1656Ra-96T
CALP ELİSA kit	: Bioassay Technology Laboratory Katalog No: E1210Ra-96T
ESM-1 ELİSA kit	: Bioassay Technology Laboratory Katalog No: E0961Ra-96T
ACSL4 ELİSA kit	: Bioassay Technology Laboratory Katalog No: E2932Ra
Iron Assay kit	: Elabscience Biotechnology Inc. Katalog No: E-BC-K139-M
Fruktoz	: Biomatik D-Fructose Katalog No: A2419

Biyokimyasal Çalışmalar

Serum numunelerinde üre, kreatinin, ürik asit, kalsiyum (Ca^{++}), potasyum (K^{+}) ve demir düzeyleri incelendi. Bu parametreler böbrek fonksiyonlarının değerlendirilmesinde kullanıldı. Ölçümler Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Laboratuvarı'nda bulunan otoanalizör (AU5800; Beckman Coulter Inc., CA, USA) kullanılarak ölçüldü.

İdrar numunelerinde kreatinin ve sodyum (Na^{+}) ölçümleri Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Laboratuvarı'nda bulunan otoanalizör (AU5800; Beckman Coulter Inc., CA, USA) kullanılarak ölçüldü.

Kreatinin klirensi standart klirens formülüne göre hesaplandı (162).

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

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

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

Böbrek Homojenizasyonu

Böbrek dokuları kesilerek tartıldı. Bistüri ile kesilen dokular tüplere konuldu. Malondialdehitin (MDA) ve glutatyon (GSH) düzeyleri için 0.15 M KCl solüsyonu %10'luk (w:v) olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan homojenatlar 1500 g 15 dk +4°C'de santrifüj edildi. Süpernatant kısmı ayrıldı. Ayrılan süpernatantlar MDA ve GSH düzeyi ölçümlerinde kullanıldı. Elisa çalışmalarında kullanılan doku homojenatları ise 0.01 M PBS (pH 7.2) tamponu ile %10'luk (w:v) olacak şekilde hazırlanarak 5000 g 5 dk +4°C'de santrifüj edilerek hazırlandı.

Glutatyon Düzeyinin Ölçümü

Glutatyon içeriğinin belirlenmesi için, doku homojenatlarındaki serbest sülfidril gruplarının Ellman ayıracı ile oluşturduğu renk spektrofotometrik olarak belirlendi (163,164).

Çözeltiler:

1. Proteinsizleştirme çözeltisi: 120 g NaCl, 6.68 g metafosforik asit ve 0.8 g sodyum EDTA tartıldı ve 400 ml distile suda çözüldü.
2. 0.3 M Disodyum fosfat (Na2HPO4)
3. 1 mM Elman ayıracı: 4 mg 5.5-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) (DNTB), 10 ml

%1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözüldü.

Deneyin yapılışı:

300 µL 0.15 M KCI ve 600 µL proteinsizleştirme çözeltisi, 100 µL doku homojenatı üzerine eklendi. Bu karışım 3000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi. Ardından 400 µL süpernatant alınarak üzerine 1600 µL M Na2HPO4 ve 400 µL Ellman ayıracı eklendi. Absorbanslar homojenat içermeyen ayıraç körüne karşı 412 nm'de okundu. GSH düzeyleri ekstinksiyon katsayısı (∑=1.36 104 M-1cm-1) kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar µmol GSH/mg protein olarak belirtildi.

MDA Düzeyinin Ölçümü

Lipit peroksidasyonunun bir belirteci olan MDA'nın sıcak ve asidik ortamda tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girmesi neticesinde ortaya çıkan pembe renk spektrofotometrik yöntemle ölçüldü (163,164).

Çözeltiler:

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

Deneyin yapılışı:

100 µL doku homojenatı; 100 µL %8.1'lik SDS, 750 µL %20'lik asetik asit, 750 µL %0.8'lik TBA ve 300 µL distile su ile karıştırıldı. Karışım 1 saat süre ile 95 °C'deki sıcak su banyosunda tutuldu. Musluk suyu altında soğutulduktan sonra üzerine 500 µL distile su ve 2500 µL butanol/piridin eklenerek 1 dABHka vorteksle karıştırıldı. Organik fazın ayrılması için 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda ayıraç körüne karşı absorbanslar okundu. Sonuçlar MDA nmol/mg protein olarak ifade edildi.

Böbrek Doku Protein Düzeyinin Ölçülmesi

Doku protein düzeyleri, alkali bakır tartarat ayıracının peptid bağları ile kompleks yapması prensibine dayanan Lowry yöntemi ile saptandı (165). Her 7 yada 8 amino asit artığı 1 bakır atomunu bağlar. Fenol ayıracı; bakır ile muamele edilmiş karışıma ilave edildiğinde mavi-mor renk oluşur. Oluşan renk 660 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Çözeltiler:

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

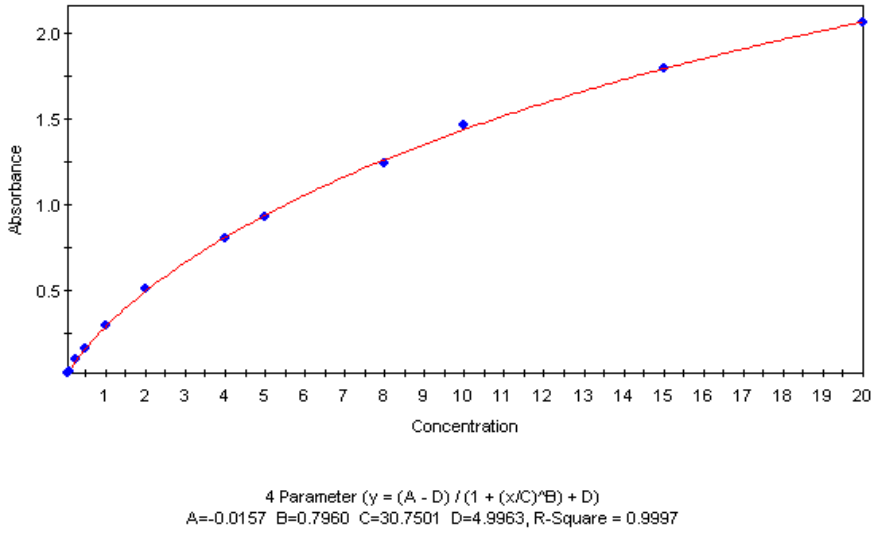
Alkali bakır ayıracı: 10 g Na_2CO_3, 0.25 g Na-K Tartarat, 0.05 g $CuSO_4$; ayrı ayrı tartılarak 0.5 N NaOH içinde balon jojede çözülür ve çözelti 0.5 N NaOH ile 100 ml'ye tamamlanır. Bu çözelti 4ºC'de 1 ay saklanabilir.

Albumin standardının hazırlanması: 20 mg/ml standart albümin stoğu hazırlandı. Ardından 20 mg/ml, 15 mg/ml, 10 mg/ml, 7,5 mg/ml, 5 mg/ml, 4 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,025 mg/ml olacak şekilde standartlar hazırlandı. Elde edilen standartlar 660 nm dalga boyunda okundu.

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

Protein Düzeyinin Hesaplanması

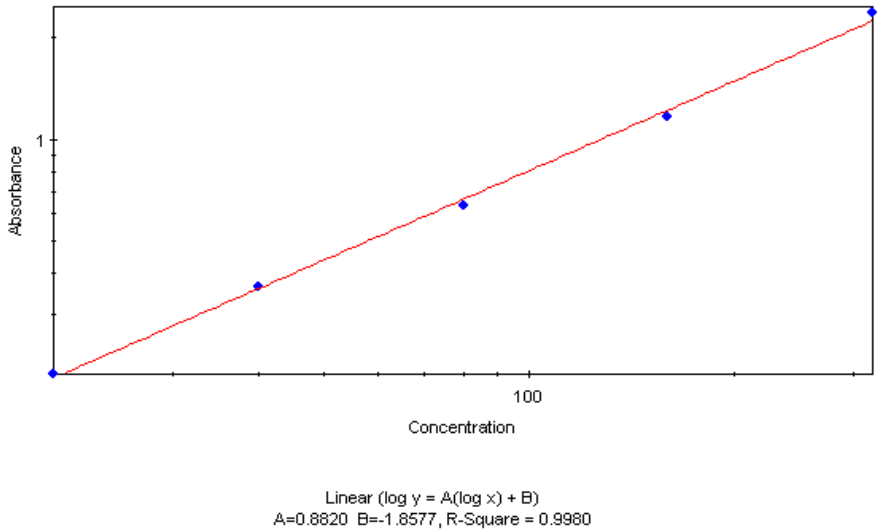
Örneklerden elde edilen absorbans değerleri standart albümin grafiğine göre okunmuştur (Şekil 6).



Şekil 6. Lowry standart grafiği

GPX4 Miktar Tayini

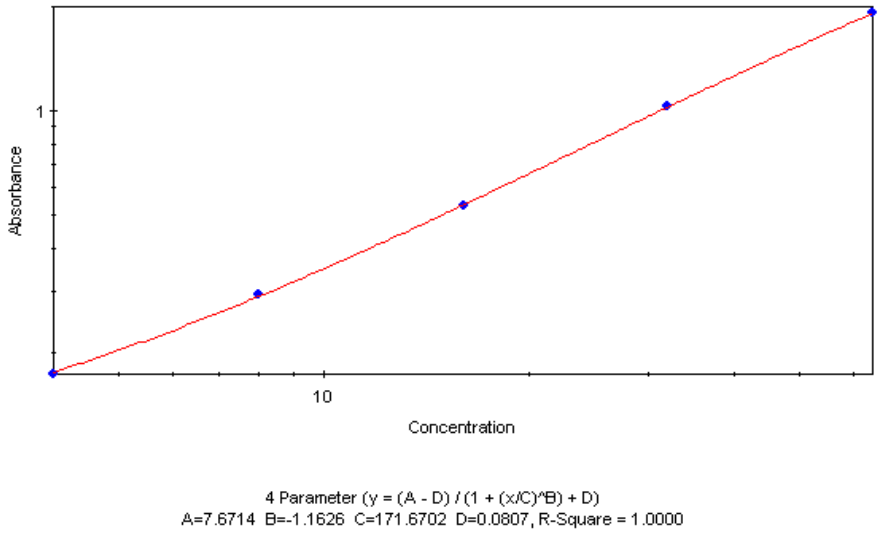
Böbrek homojenat örneklerinde yapılan GPX4 ölçümleri Bioassay Technology Laboratory Rat GPX4 ELISA Kit (Katalog No: E2195Ra) ticari test kiti kullanılarak yapıldı. Prosedürde belirtildiği gibi çalışıldı. Çalışmanın standart regresyon grafiği Şekil 7'de verilmiştir. Doku örneklerinin sonuçları µU/mg protein olarak verildi.



Şekil 7. GPX4 standart çalışması regresyon grafiği

ACSL4 Miktar Tayini

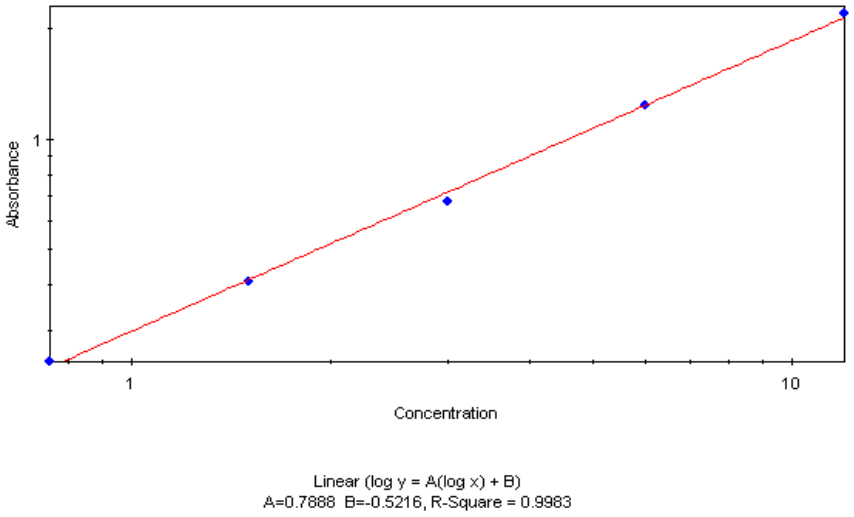
Böbrek homojenat örneklerinde yapılan ACSL4 ölçümleri Bioassay Technology Laboratory Rat ACSL4 ELISA Kit (Katalog No: E2932Ra) ticari test kiti kullanılarak yapıldı. Prosedürde belirtildiği gibi çalışıldı. Çalışmanın standart regresyon grafiği Şekil 8'de verilmiştir. Doku örneklerinin sonuçları ng/mg protein olarak verildi.



Şekil 8. ACSL4 standart çalışması regresyon grafiği

TFR-1 Miktar Tayini

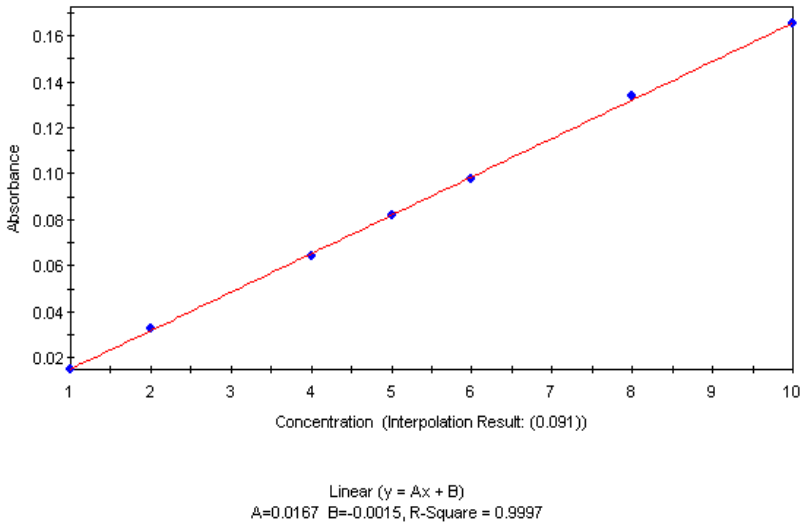
Böbrek homojenat örneklerinde yapılan TFR-1 ölçümleri Bioassay Technology Laboratory Rat TFR-1 ELISA Kit (Katalog No: E1656Ra) ticari test kiti kullanılarak yapıldı. Prosedürde belirtildiği gibi çalışıldı. Çalışmanın standart regresyon grafiği Şekil 9'da verilmiştir. Doku örneklerinin sonuçları ng/mg mg protein olarak verildi.



Şekil 9. TFR1 standart çalışması regresyon grafiği

Demir Miktar Tayini

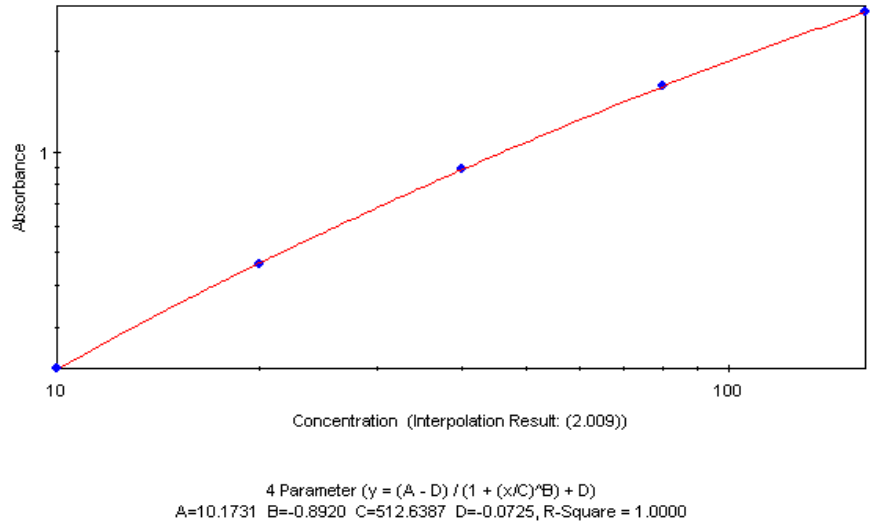
Böbrek homojenat örneklerinde yapılan demir ölçümleri Elabscience Biotechnology Inc. Iron Assay Kit (Katalog No: E-BC-K139-M) ticari test kiti kullanılarak yapıldı. Prosedürde belirtildiği gibi çalışıldı. Çalışmanın standart regresyon grafiği Şekil 10'da verilmiştir. Doku örneklerinin sonuçları ng/mg protein olarak verildi.



Şekil 10. Doku demir standart çalışması regresyon grafiği

Calprotectin Miktar Tayini

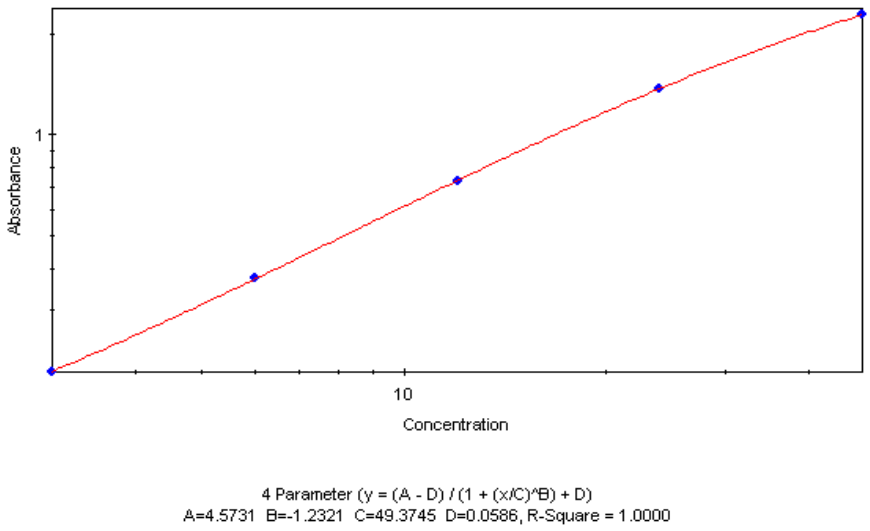
Böbrek homojenat örneklerinde yapılan Calprotectin ölçümleri Bioassay Technology Laboratory Rat CALP ELISA Kit (Katalog No: E1210Ra) ticari test kiti kullanılarak yapıldı. Prosedürde belirtildiği gibi çalışıldı. Çalışmanın standart regresyon grafiği Şekil 11'de verilmiştir. Doku örneklerinin sonuçları ng/mg protein olarak verildi.



Şekil 11. Calprotectin standart çalışması regresyon grafiği

Endocan Miktar Tayini

Böbrek homojenat örneklerinde yapılan Endocan ölçümleri Bioassay Technology Laboratory Rat ESM-1 ELISA Kit (Katalog No: E0961Ra) ticari test kiti kullanılarak yapıldı. Prosedürde belirtildiği gibi çalışıldı. Çalışmanın standart regresyon grafiği Şekil 12'de verilmiştir. Doku örneklerinin sonuçları ng/mg protein olarak verildi.



Şekil 12. Endocan standart çalışması regresyon grafiği

Histopatolojik Değerlendirme

Işık mikroskobik inceleme: Sagital olarak ikiye bölünen sağ böbrek dokularının birer yarısı %10'luk tamponlu formalin solüsyonunda 24 saat boyunca fikse edildi. Dokular parafin bloklara gömülerek, 4 µm kalınlığında kesitler alındı. 70 cc'lik etüvde 1 saat, oda sıcaklığındaki ksilen içerisinde 45 dakika bekletilerek deparafinizasyon işlemi gerçekleştirildi. Lamlar Leica ST 5020 marka otomatik boyama cihazına alınarak şu prosedürler uygulandı. Kesitler alçalan dereceli etil alkolden geçirildi. (%96, %80, %70) Su ile durulandı. Mayer hematoksilende 5 dakika bekletildi. Musluk suyunda durulandı. %1'lik asit alkolde diferansiye edildi. Su ile durulandı. %96'lık etil alkolden geçirildi. %1'lik alkol bazlı eozinde 20 saniye bekletildi. Yükselen dereceli etil alkolden geçirildi. (%70, %80, %96) Lamlar kurutuldu. Ksilende 1 dakika bekletildi. Leica CV 5030 otomatik lam kapama cihazında ksilen bazlı kapatıcıyla kapatıldı. Renal hasarın derecesini değerlendirmek için semikantitatif bir skala ile skorlama yapıldı. Renal hasarın derecesi; tübüler epitel hücrelerinin dejenerasyonu, tübüler dilatasyon, tıkanık dilate glomerüler ile peritübüler genişleme ve kapillerde tıkanıklık, kapillerde

inflamatuar infiltrasyon ve tubüler cast formasyonu değerlendirilerek belirlendi (166). Ayrıca glomerüler çap ölçüldü. Skala değerlendirmesi:

0: Normal böbrek

1: Hafif hasar

2: Şiddetli hasar olarak değerlendirilmiştir.

İmmünohistokimyasal çalışmalar: Lamlar Ventana Medical System -Benchmark XT/ISH Staining modülüne yerleştirildi ve UltraView Universal DAB Detection kit ((ROCHE/Ventana; R 05269806001) kullanılarak şu prosedür uygulandı. Parafin bloklardan kesitler 4 mikron kalınlığındaki pozitif şarjlı lamlara alındı. 70°C'lik etüvde 1 saat bekletildi. Lamlar Benchmark XT marka immünohistokimya cihazına alındı. Etilen diamin tetraasetik asit (EDTA) ile ph:8'de (CC1) antijen geri kazanım yapıldı. Antikor inkübasyonu 48 dakika boyunca uygulandı. Arka plan boyama için mayer hematoksilen 8 dakika boyunca uygulandı. Bluing reagent (mavileştirme solüsyonu) 4 dakika uygulandı. Lamlar deterjanlı suyla yıkandı. Lamlar absolü alkolde 2 kez çalkalandı. Lamlar tekrar deterjanlı suyla yıkandı. Lamlar tekrar absolü alkolde 2 kez çalkalandı. Lamlar kurutulup ksilol bazlı kapatıcıyla kapatıldı. GPX4 ve ACSL4 ekspresyonu için immünohistokimyasal boyama, GPX4 antikoru (Santa Cruz sc-166570; GPX4 [E-12] C. Liq. 1ml (1:50-500)), ACSL4 antikoru (Santa Cruz sc- 365230; ACSL4 [F4] C. Liq. 1ml (1:50-500)) kullanılarak parafin kesitlerinde yapıldı (125). Boyanma yoğunluğunu, düşük-zayıf boyanma 1, yüksek dereceli- yaygın ve şiddetli boyanma 2 olarak skorlandı.

İstatistiksel Analiz

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak gösterildi. Gruplar arası karşılaştırmalarda Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve Tukey testi kullanıldı. $P<0.05$ değeri istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Sıçanlarda yüksek fruktozdan zengin beslenmeyle oluşturulan böbrek hasarı modeli, 4 grupta 34 sıçan üzerinde çalışıldı. Deney süresinde çeşme suyu alan kontrol grubu ve %20 fruktoz içeren çeşme suyu alan gruplardaki sıçanlar deney sürelerinin son gününde metabolik kafese alındı. 24 saatin sonunda idrar hacimleri ölçüldü ve idrar örnekleri alındı. Ardından anestezi altında kan ve böbrek doku örnekleri alındı. Gruplarda herhangi bir ölüm görülmedi.

Tüm gruplardaki sıçanlara ait serum kreatinin düzeyi mg/dl, serum üre düzeyi mg/dl, serum ürik asit düzeyi mg/dl, serum potasyum düzeyi mmol/l, serum kalsiyum düzeyleri mg/dl, serum demir düzeyi µg/dl ölçüldü. FeNa düzeyi % ve kreatinin klirensi ml/dk hesaplandı. Böbrek dokularında MDA düzeyi nmol/ml mg protein, GSH düzeyi µmol/mg protein, GPX4 düzeyi µU/mg protein, ACSL4 düzeyi ng/mg protein, TFR1 düzeyi ng/mg protein, demir düzeyi µg/L/mg doku ağırlığı, calprotectin düzeyi ng/mg protein, endocan düzeyi ng/mg protein olarak hesaplandı. Grupların serum, idrar ve böbrek dokularına ait bulgular ve istatistiki değerlendirmeler sırasıyla Tablo 4, 5 ve 6'da verilmiştir.

Tablo 4. Grupların serumlarına ait parametreler

Parametreler	**Kontrol**	**F4**	**F8**	**F12**	**P değeri**	
	ORT±SD	ORT±SD	ORT±SD	ORT±SD	One way anova	Çoklu karşılaştırmalar
Serum Kreatinin mg/dL	0,266 ± 0,023	0,281 ± 0,024	0,293 ± 0,029	0,338 ± 0,035	<0,0001	K-F4: p=0,698 K-F8: p=0,261 K-F12: p<0,0001 F4-F8: p=0,837 F4-F12: p=0,001 F8-F12: p=0,012
Serum Üre mg/dL	47,63 ± 3,926	17,11 ± 4,314	19,75 ± 4,833	18,78 ± 5,63	<0,0001	K-F4: p<0,0001 K-F8: p<0,0001 K-F12: p<0,0001 F4-F8: p=0,665 F4-F12: p=0,878 F8-F12: p=0,974
Serum Ürik asit mg/dL	1,113 ± 0,323	1,022 ± 0,156	0,975 ± 0,139	1,111 ± 0,145	p=0,433	K-F4: p=0,795 K-F8: p=0,534 K-F12: p>1,00 F4-F8: p=0,963 F4-F12: p=0,788 F8-F12: p=0,519
Serum Potasyum mmol/L	6,075 ± 0,565	5,867 ± 0,240	6,088 ± 0,356	6,089 ± 0,588	p=0,690	K-F4: p=0,788 K-F8: p>1,00 K-F12: p>1,00 F4-F8: p=0,758 F4-F12: p=0,737 F8-F12: p>1,00

Tablo 4. Devamı Grupların serumlarına ait parametreler

Serum Kalsiyum mg/dL	10,35 ± 0,49	10,06 ± 0,643	9,713 ± 0,352	10,06 ± 0,283	p= 0,078	K-F4: p=0,569 K-F8: p=0,048 K-F12: p=569 F4-F8: p=0,440 F4-F12: p<1,00 F8-F12: p=0,440
Serum Demir µg/dL	156,9 ± 18,01	176,9 ± 39,39	154,8 ± 16,08	145,7 ± 19,43	p= 0,119	K-F4: p=0,400 K-F8: p=0,998 K-F12: p=0,838 F4-F8: p=0,313 F4-F12: p=0,102 F8-F12: p=0,906

Tablo 5. Grupların idrarlarına ait parametreler

Parametreler	**Kontrol**	**F4**	**F8**	**F12**	**P (p<0,05 ise anlamlı)**	
	ORT±SD	ORT±SD	ORT±SD	ORT±SD	One way anova	Çoklu karşılaştırmalar
İdrar Hacmi mL	13,310 ± 1,999	30,610 ± 7,210	17,000 ± 5,874	23,830 ± 8,993	p<0,0001	K-F4: p<0,0001 K-F8: p=0,688 K-F12: p=0,014 F4-F8: p=0,001 F4-F12: p=0,159 F8-F12: p=0,173
FeNa %	0,619 ± 0,077	0,436 ± 0,058	0,403 ± 0,100	0,290 ± 0,096	p<0,0001	K-F4: p=0,001 K-F8: p=0,0002 K-F12: p<0,0001 F4-F8: p=0,868 F4-F12: p=0,009 F8-F12: p=0,067
Kreatinin Klirensi mL/dk	1,999 ± 0,096	2,164 ± 0,375	2,360 ± 0,283	2,199 ± 0,252	p=0,162	K-F4: p=0,642 K-F8: p=0,115 K-F12: p=0,493 F4-F8: p=0,550 F4-F12: p=0,994 F8-F12: p=0,693
Kreatinin Klirensi/Vücut ağırlığı mL/dk/g	8,628 ± 0,949	7,586 ± 1,258	7,792 ± 1,271	6,251 ± 0,726	p=0,001	K-F4: p=0,211 K-F8: p=0,417 K-F12: p=0,0004 F4-F8: p=0,979 F4-F12: p=0,059 F8-F12: p=0,029

FeNa: Fraksiyonel sodyum atılımı

Tablo 6. Grupların böbrek dokularına ait parametreler

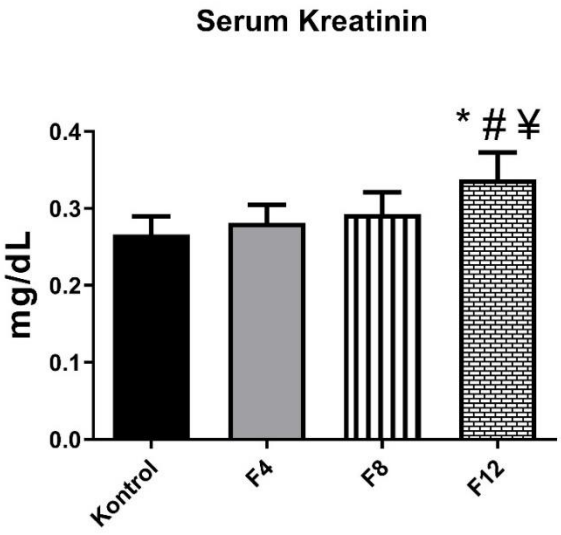
Parametreler	**Kontrol**	**F4**	**F8**	**F12**	**P (p<0,05 ise anlamlı)**	
	ORT±SD	ORT±SD	ORT±SD	ORT±SD	One way anova	Çoklu karşılaştırmalar
GSH µmol/mg protein	5,877 ± 1,53	4,914 ± 0,958	4,12 ± 0,656	4,149 ± 0,612	p=0,005	K-F4: p=0,276 K-F8: p=0,009 K-F12: p=0,010 F4-F8: p=0,441 F4-F12: p=0,472 F8-F12: p>1
MDA nmol/ml mg protein	1,678 ± 0,272	1,940 ± 0,327	2,082 ± 0,327	2,275 ± 0,372	p=0,027	K-F4: p=0,501 K-F8: p=0,168 K-F12: p=0,020 F4-F8: p=0,815 F4-F12: p=0,187 F8-F12: p=0,655
GPX4 µU/mg protein	7,903 ± 1,022	6,031 ± 0,940	6,394 ± 0,628	6,14 ± 0,810	p=0,002	K-F4: p=0,002 K-F8: p=0,019 K-F12: p=0,003 F4-F8: p=0,835 F4-F12: p=0,993 F8-F12: p=0,935
ACSL4 ng/mg protein	2,112 ± 0,392	1,67 ± 0,317	1,778 ± 0,4	1,828 ± 0,262	p=0,141	K-F4: p=0,106 K-F8: p=0,295 K-F12: p=0,434 F4-F8: p=0,923 F4-F12: p=0,796 F8-F12: p=0,991

Tablo 6. Devamı Grupların böbrek dokularına ait parametreler

TFR1 ng/mg protein	0,263 ± 0,111	0,168 ± 0,047	0,237 ± 0,039	0,22 ± 0,028	p=0,108	K-F4: p=0,081 K-F8: p=0,917 K-F12: p=0,887 F4-F8: p=0,339 F4-F12: p=0,809 F8-F12: p=0,993
Demir µg/L/mg doku ağırlığı	35,83 ± 23,15	33,78 ± 31,92	30,20 ± 25,00	29,28 ± 18,14	p=0,955	K-F4: p=0,999 K-F8: p=0,972 K-F12: p=0,961 F4-F8: p=0,992 F4-F12: p=0,987 F8-F12: p=1,000
Calprotectin ng/mg protein	2,991 ± 0,674	2,324 ± 0,340	2,435 ± 0,312	2,291 ± 0,256	p=0,007	K-F4: p=0,014 K-F8: p=0,059 K-F12: p=0,009 F4-F8: p=0,948 F4-F12: p=0,998 F8-F12: p=0,895
Endocan ng/mg protein	1,103 ± 0,291	0,956 ± 0,391	0,991 ± 0,433	0,971 ± 0,285	p=0,836	K-F4: p=0,832 K-F8: p=0,924 K-F12: p=0,882 F4-F8: p=0,997 F4-F12: p=1,000 F8-F12: p=1,000

GSH: Glutatyon**; MDA:** Malondialdehit**; GPX4:** Glutatyon peroksidaz 4**; ACSL4:** Açil-CoA sentetaz uzun zincirli aile üyesi 4**; TFR1:** Transferrin reseptör 1

Gruplar arası serum kreatinin düzeylerinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlendi (p<0,0001). Serum kreatinin düzeylerinin gruplara göre dağılımı Şekil 13'te gösterildi.



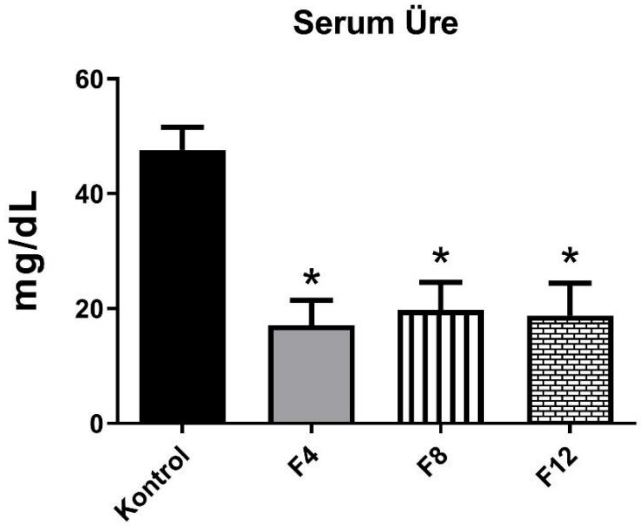
Şekil 13. Gruplar arası serum kreatinin düzeylerinin dağılımı

*Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında p<0,05

F4 ile karşılaştırıldığında p<0,05

¥ F8 ile karşılaştırıldığında p<0,05

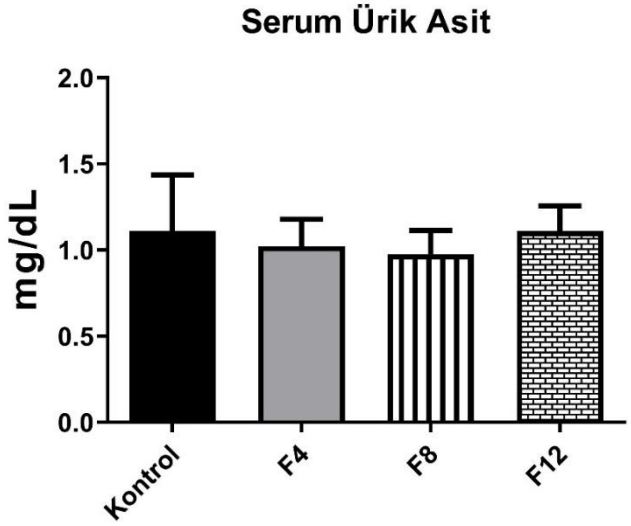
Gruplar arası serum üre düzeylerinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlendi (p<0,0001). Serum üre düzeylerinin gruplara göre dağılımı Şekil 14'te gösterildi.



Şekil 14. Gruplar arası serum üre düzeylerinin dağılımı

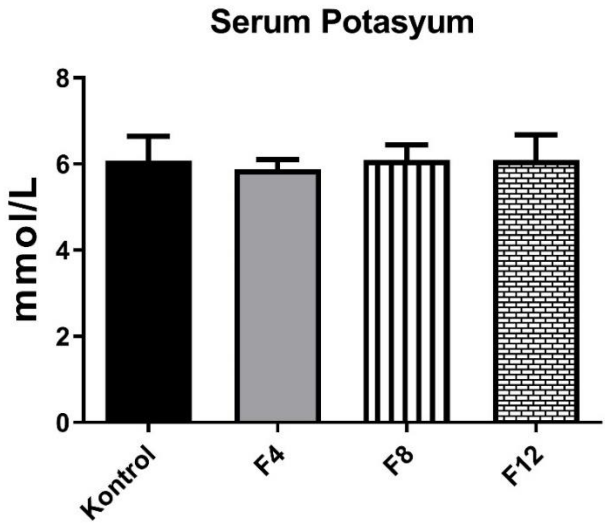
*Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında p<0,05

Gruplar arası serum ürik asit düzeylerinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmedi (p=0,433). Serum ürik asit düzeylerinin gruplara göre dağılımı Şekil 15'de gösterildi.



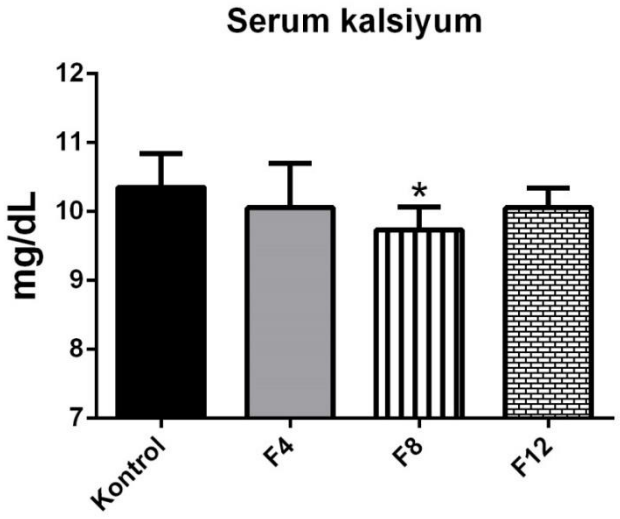
Şekil 15. Gruplar arası serum ürik asit düzeylerinin dağılımı

Gruplar arası serum potasyum düzeylerinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmedi (p=0,690). Serum potasyum düzeylerinin gruplara göre dağılımı Şekil 16'da gösterildi.



Şekil 16. Gruplar arası serum potasyum düzeylerinin dağılımı

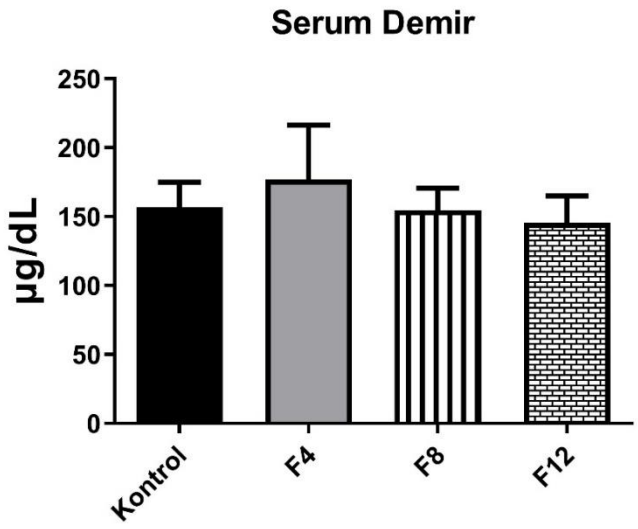
Gruplar arası serum kalsiyum düzeylerinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlendi (p=0,078). Serum kalsiyum düzeylerinin gruplara göre dağılımı Şekil 17'de gösterildi.



Şekil 17. Gruplar arası serum kalsiyum düzeylerinin dağılımı

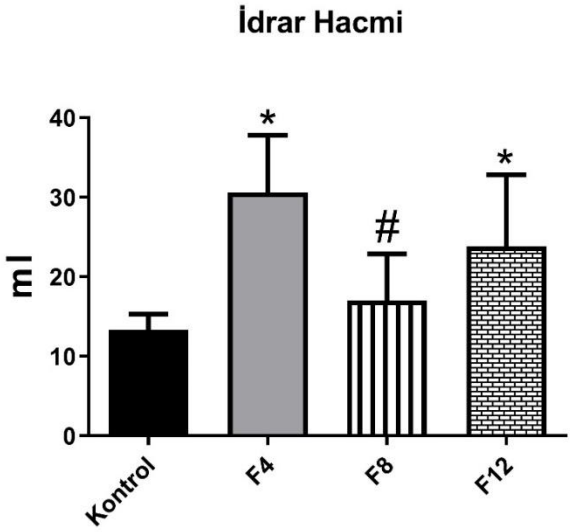
*Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında p<0,05

Gruplar arası serum demir düzeylerinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmedi (p=0,119). Serum demir düzeylerinin gruplara göre dağılımı Şekil 18'de gösterildi.



Şekil 18. Gruplar arası serum demir düzeylerinin dağılımı

Gruplar arası idrar hacim düzeylerinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlendi (p<0,0001). İdrar hacim düzeylerinin gruplara göre dağılımı Şekil 19'da gösterildi.

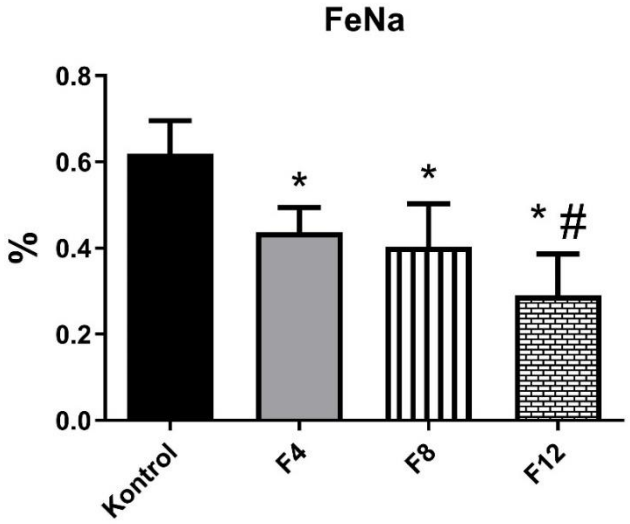


Şekil 19. Gruplar arası idrar hacim düzeylerinin dağılımı

*Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında p<0,05

F4 ile karşılaştırıldığında p<0,05

Gruplar arası fraksiyonel sodyum atılımı (FeNa) düzeylerinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlendi (p<0,0001). FeNa düzeylerinin gruplara göre dağılımı Şekil 20'de gösterildi.

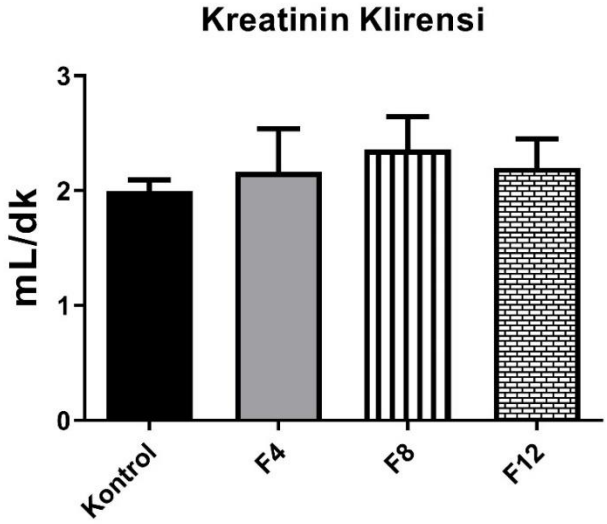


Şekil 20. Gruplar arası FeNa düzeylerinin dağılımı

*Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında p<0,05

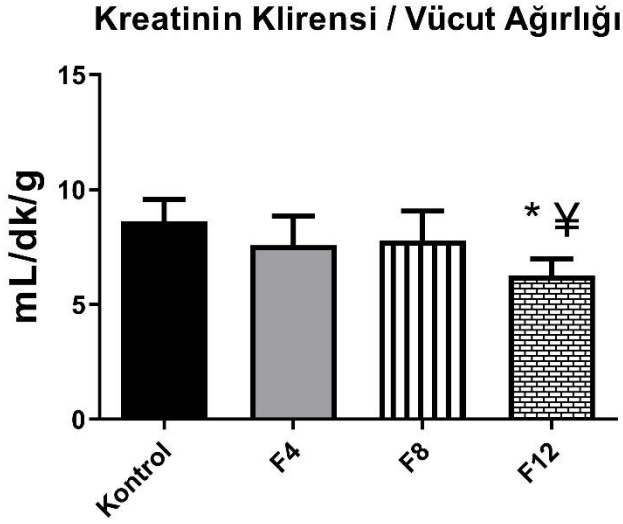
F4 ile karşılaştırıldığında p<0,05

Gruplar arası kreatinin klirensi düzeylerinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmedi (p=0,162). Kreatinin klirensi düzeylerinin gruplara göre dağılımı Şekil 21'de gösterildi.



Şekil 21. Gruplar arası kreatinin klirensi düzeylerinin dağılımı

Gruplar arası kreatinin klirensi düzeylerinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlendi (p=0,001). Kreatinin klirensi düzeylerinin gruplara göre dağılımı Şekil 22'de gösterildi.

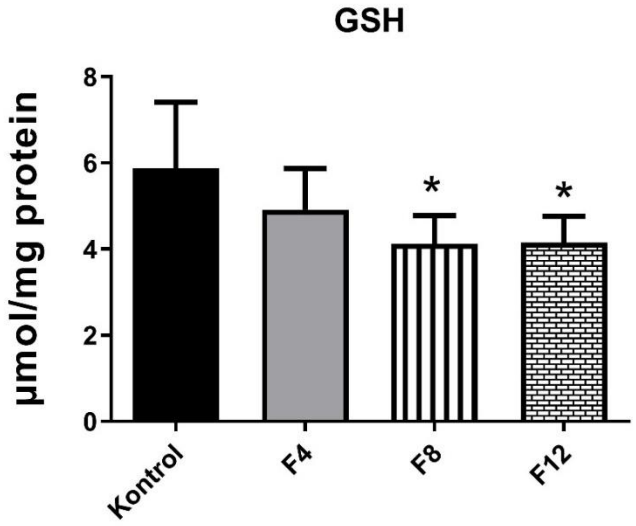


Şekil 22. Gruplar arası kreatinin klirensi/ vücut ağırlığı düzeylerinin dağılımı

*Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında p<0,05

¥ F8 ile karşılaştırıldığında p<0,05

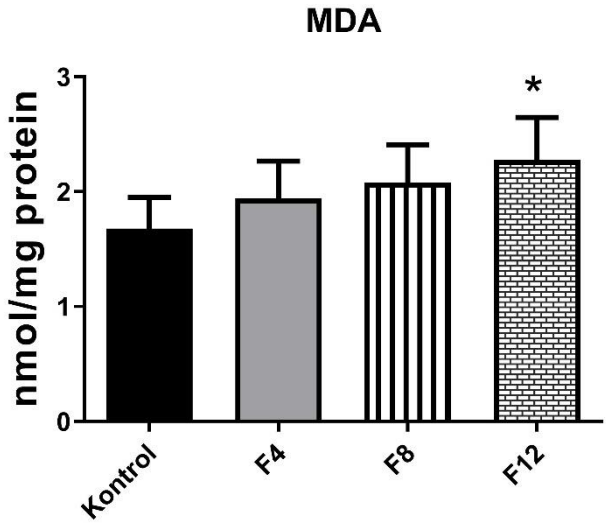
Gruplar arası GSH düzeylerinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlendi (p=0,005). GSH düzeylerinin gruplara göre dağılımı Şekil 23'te gösterildi.



Şekil 23. Gruplar arası GSH düzeylerinin dağılımı

*Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında p<0,05

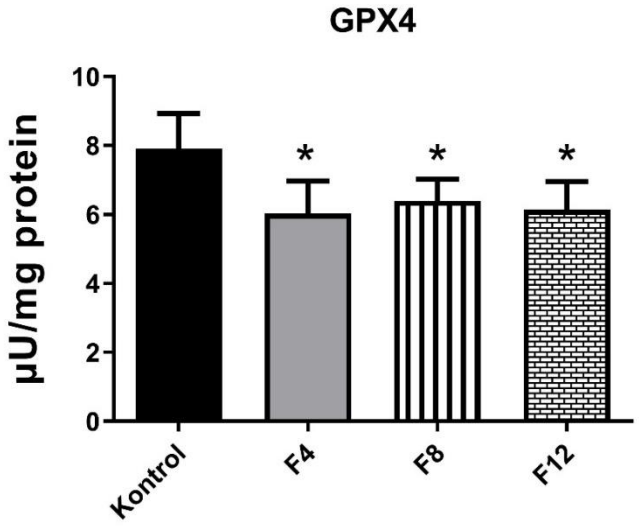
Gruplar arası MDA düzeylerinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlendi (p=0,027). MDA düzeylerinin gruplara göre dağılımı Şekil 24'te gösterildi.



Şekil 24. Gruplar arası MDA düzeylerinin dağılımı

*Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında p<0,05

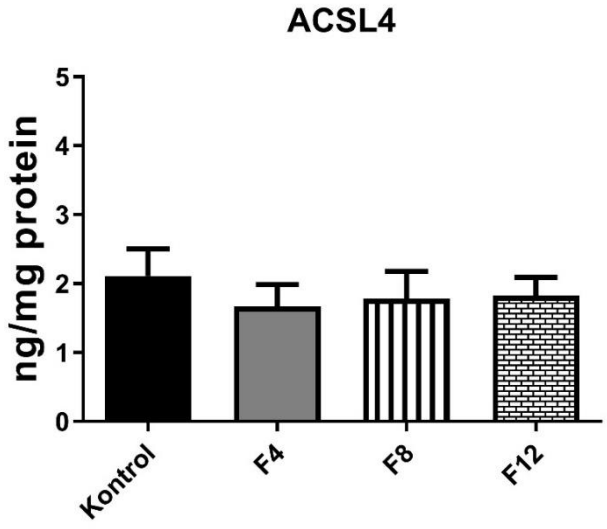
Gruplar arası GPX4 düzeylerinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlendi (p=0,002). GPX4 düzeylerinin gruplara göre dağılımı Şekil 25'de gösterildi.



Şekil 25. Gruplar arası GPX4 düzeylerinin dağılımı

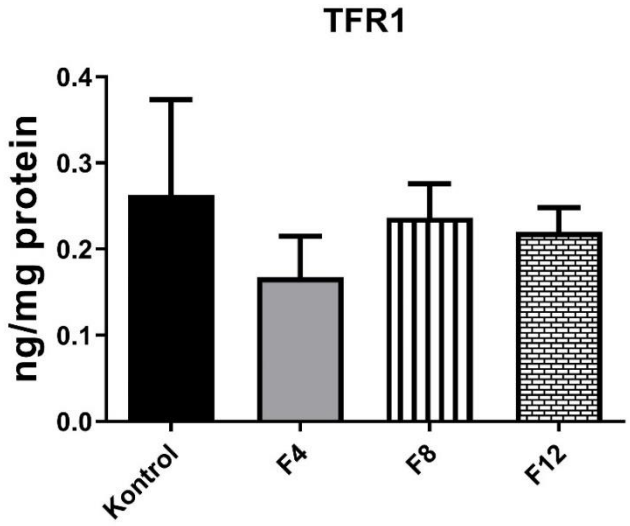
*Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında p<0,05

Gruplar arası ACSL4 düzeylerinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmedi (p=0,140). ACSL4 düzeylerinin gruplara göre dağılımı Şekil 26'da gösterildi.



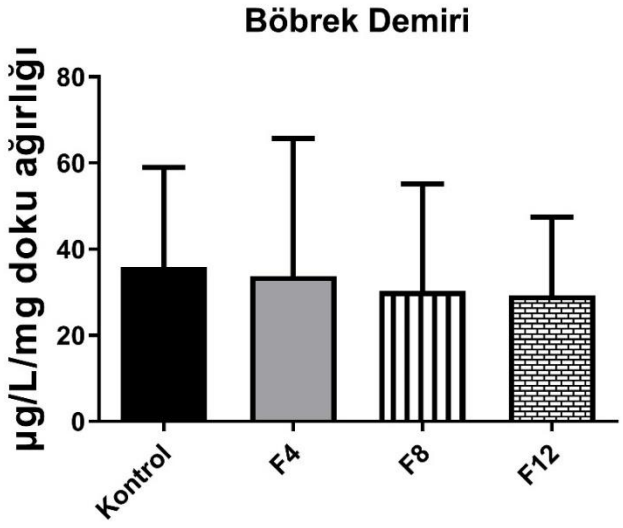
Şekil 26. Gruplar arası ACSL4 düzeylerinin dağılımı

Gruplar arası TFR1 düzeylerinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmedi (p=0,108). TFR1 düzeylerinin gruplara göre dağılımı Şekil 27'de gösterildi.



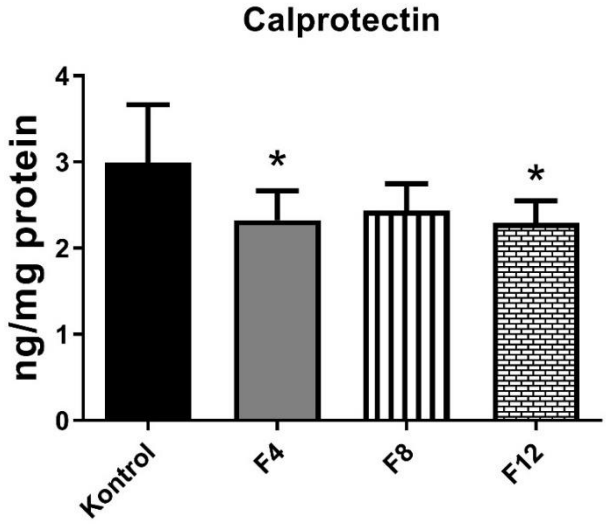
Şekil 27. Gruplar arası TFR1 düzeylerinin dağılımı

Gruplar arası böbrek dokusundaki demir düzeylerinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmedi (p=0,955). Böbrek dokusundaki demir düzeylerinin gruplara göre dağılımı Şekil 28'de gösterildi.



Şekil 28. Gruplar arası böbrek doku demir düzeylerinin dağılımı

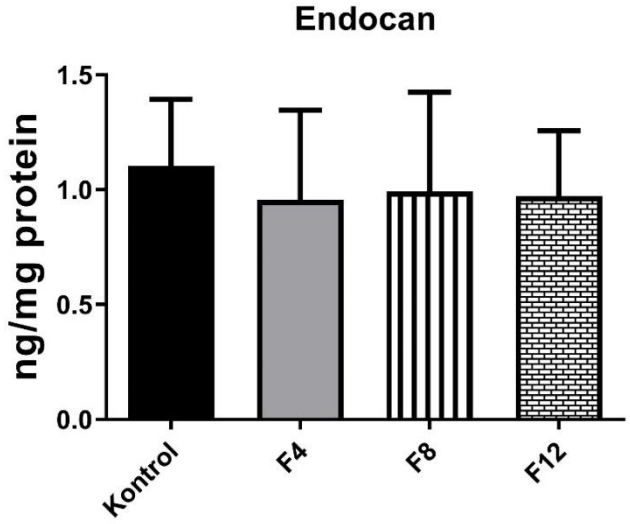
Gruplar arası calprotectin düzeylerinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlendi (p=0,007). Calprotectin düzeylerinin gruplara göre dağılımı Şekil 29'da gösterildi.



Şekil 29. Gruplar arası calprotectin düzeylerinin dağılımı

*Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında p<0,05

Gruplar arası endocan düzeylerinin dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmedi (p=0,836). Endocan düzeylerinin gruplara göre dağılımı Şekil 30'da gösterildi.



Şekil 30. Gruplar arası endocan düzeylerinin dağılımı

Histopatolojik Bulgular

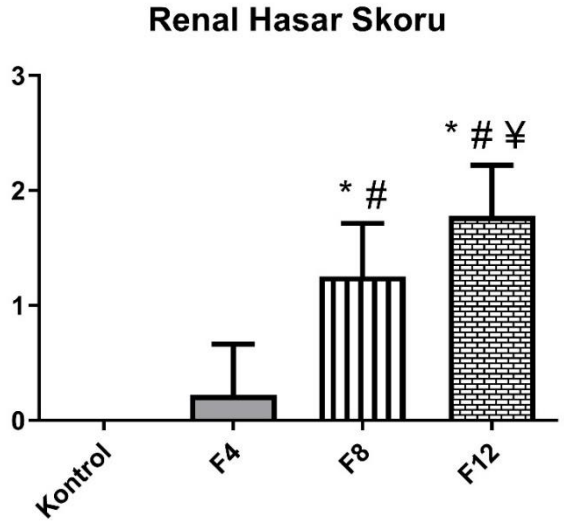
Işık Mikroskobik İnceleme

Çalışmamızda sıçanların böbrek kesitlerinin histopatolojik incelemesi, tübüler epitel hücrelerinin dejenerasyonu, tübüler dilatasyon, tıkanık dilate glomerüler ile peritübüler genişleme ve kapillerde tıkanıklık, kapillerde inflamatuar infiltrasyon ve tubüler cast formasyonu değerlendirilerek semikantitatif bir skala ile skorlama yapıldı. Renal hasar 0 ile 2 arasında skorlanarak hesaplanırken; glomerüler çap ölçüldü. Hesaplanan bu değerler Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 7. Grupların histopatolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmesi

Parametreler	**Kontrol**	**F4**	**F8**	**F12**	**P (p<0,05 ise anlamlı)**	
	ORT±SD	ORT±SD	ORT±SD	ORT±SD	One way anova	Çoklu karşılaştırmalar
Renal Hasar Skoru	0 ± 0	0,222 ± 0,441	1,250 ± 0,462	1,778 ± 0,441	p<0,0001	K-F4: p=0,652 K-F8: p<0,0001 K-F12: p<0,0001 F4-F8: p<0,0001 F4-F12: p<0,0001 F8-F12: p=0,045
Glomerüler Çap µm	116,0 ± 1,069	116,2 ± 0,667	117,3 ± 0,707	118,2 ± 0,972	P<0,0001	K-F4: p=0,952 K-F8: p=0,035 K-F12: p<0,0001 F4-F8: p=0,092 F4-F12: p=0,00 F8-F12: p=0,120
GPX4 (Boyanma yoğunluğu)	2,00 ± 0,000	2,00 ± 0,000	1,875 ± 0,354	1,889 ± 0,333	p=0,576	K-F4: p>1 K-F8: p=0,733 K-F12: p=0,782 F4-F8: p=0,715 F4-F12: p=0,766 F8-F12: p=0,999
ACSL4 (Boyanma yoğunluğu)	1,125 ± 0,354	1,00 ± 0,00	1,125 ± 0,354	1,111 ± 0,333	p=0,779	K-F4: p=0,821 K-F8: p>1 K-F12: p=1,00 F4-F8: p=0,822 F4-F12: p=0,856 F8-F12: p=1,000

Gruplar arası renal hasar skoru dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlendi (p<0,0001). Renal hasar skor düzeylerinin gruplara göre dağılımı Şekil 31'de gösterildi.



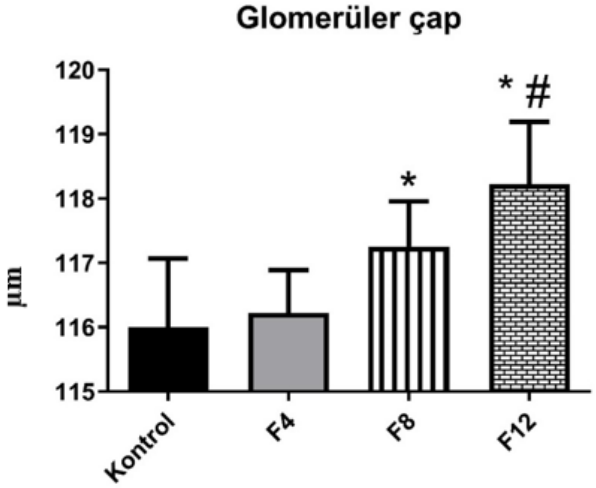
Şekil 31. Gruplar arası renal hasar skorlaması

*Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında p<0,05

F4 ile karşılaştırıldığında p<0,05

¥ F8 ile karşılaştırıldığında p<0,05

Gruplar arası glomerüler çap (µm) dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlendi (p<0,0001). Glomerüler çap düzeylerinin gruplara göre dağılımı Şekil 32'de gösterildi.

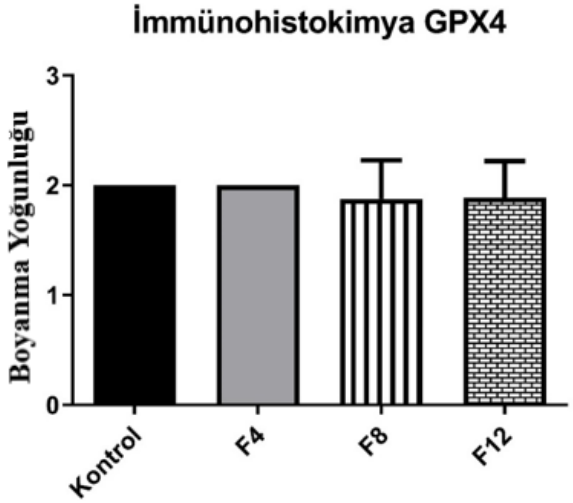


Şekil 32. Gruplar arası glomerüler çap düzeylerinin dağılımı

*Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında p<0,05

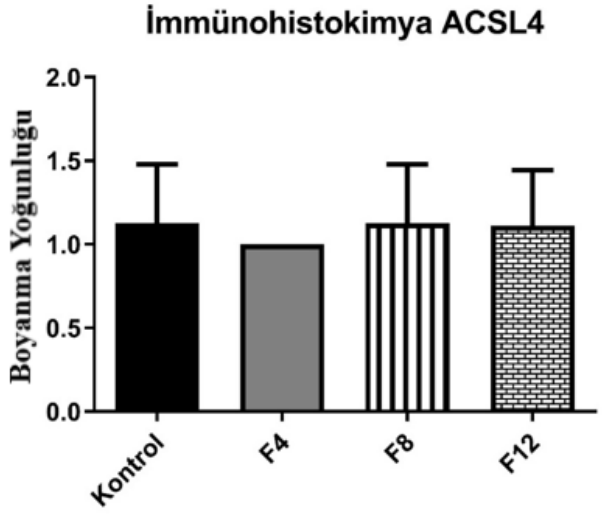
F4 ile karşılaştırıldığında p<0,05

Gruplar arası immünohistokimyasal GPX4 boyanma yoğunluğu istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmedi (p=0,576). İmmünohistokimyasal GPX4 boyanma düzeylerinin gruplara göre dağılımı Şekil 33'te gösterildi.



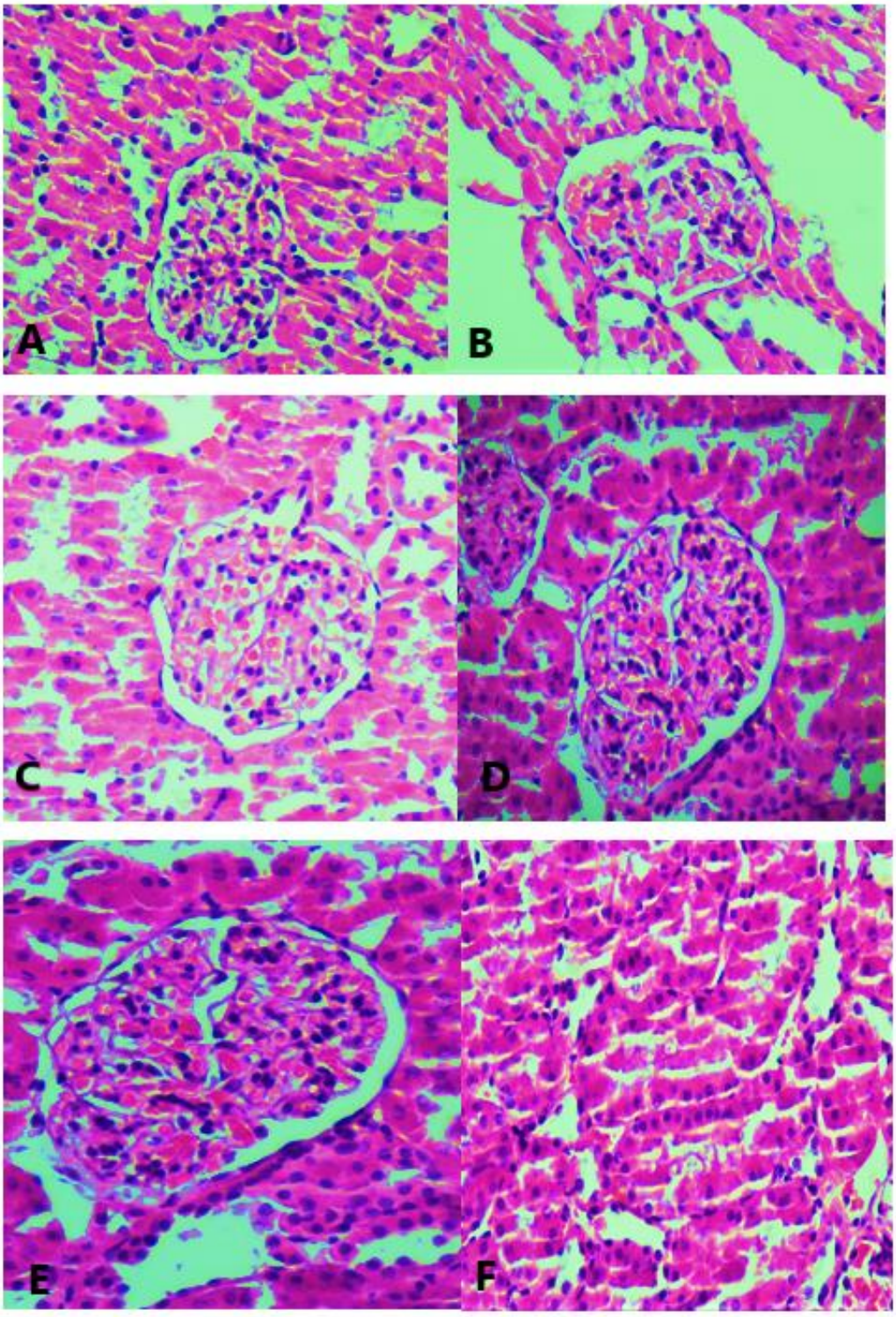
Şekil 33. Gruplar arası immünohistokimyasal GPX4 boyanma düzeylerinin dağılımı

Gruplar arası immünohistokimyasal ACSL4 boyanma yoğunluğu istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmedi (p=0,779). İmmünohistokimyasal ACSL4 boyanma düzeylerinin gruplara göre dağılımı Şekil 34'te gösterildi.



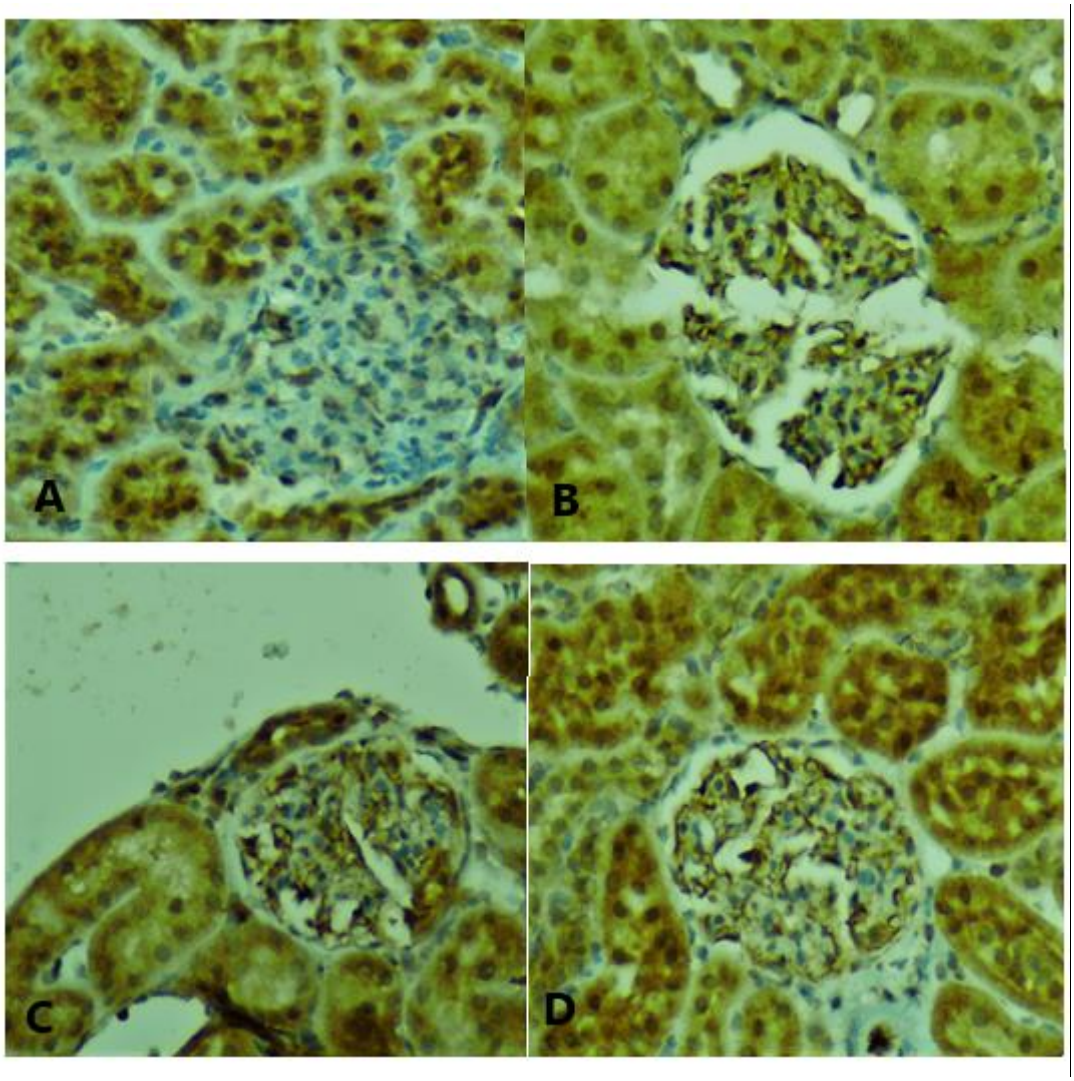
Şekil 34. Gruplar arası immünohistokimyasal ACSL4 boyanma düzeylerinin dağılımı

Glomerül ve tübul hasarı görüntüleri Şekil 35, immünohistokimyasal GPX4 görüntüleri Şekil 36 ve immünohistokimyasal ACSL4 görübtüleri Şekil 37'de gösterilmiştir.



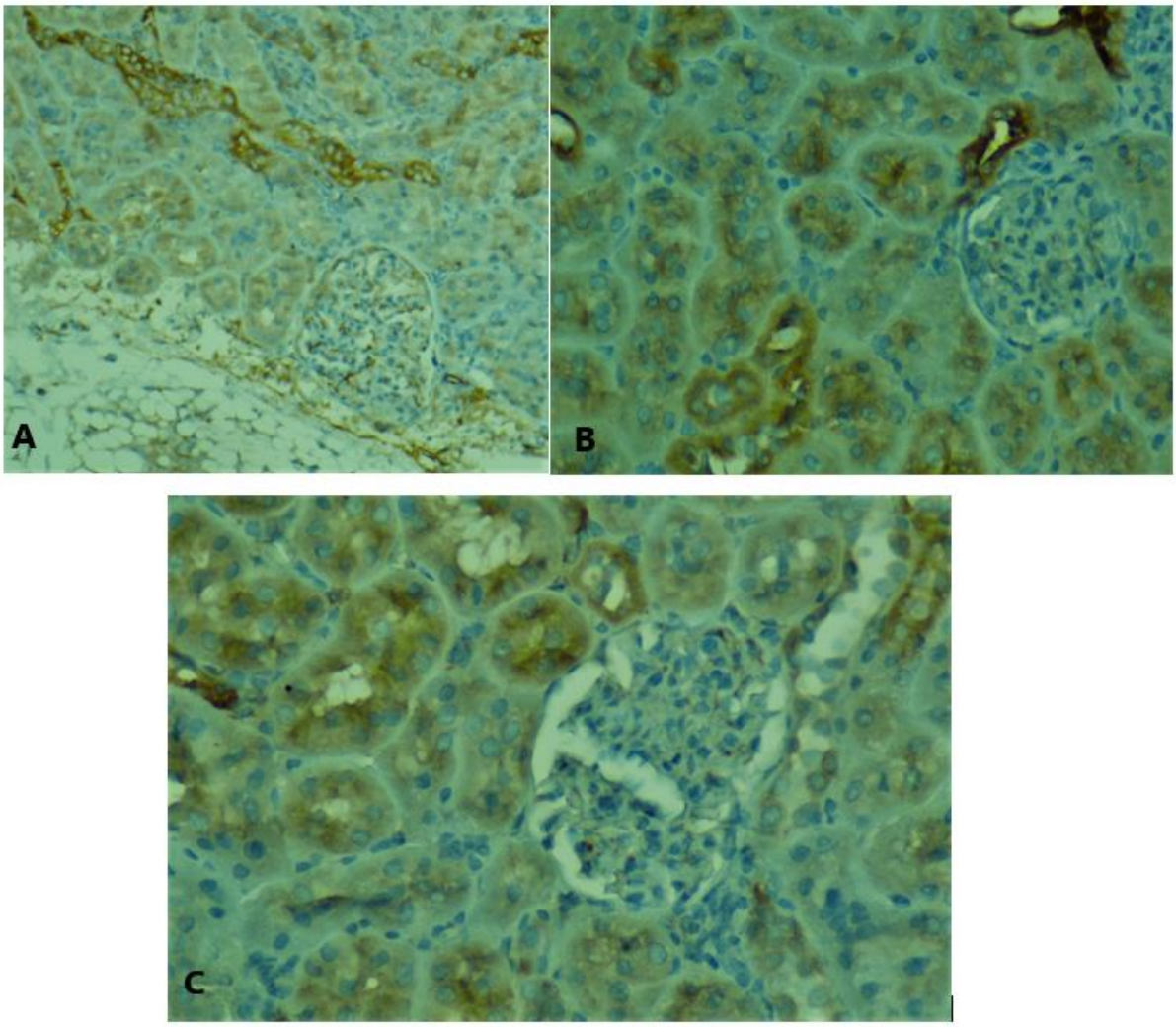
A: Glomerül çapı: 115 µm (normal), B:Glomerül çapı: 115 µm (normal), C:glomerül çapı: 116 µm (hafif dilate), D: Glomerül çapı: 150 µm (dilate), E: Glomerül çapı: 150 µm (dilate), F: Tubül hasarı

Şekil 35. Böbrek kesitleri (x400).



A: Zayıf-orta şiddetli boyanma, B: Kuvvetli boyanma, C: Kuvvetli boyanma, D: Kuvvetli boyanma

Şekil 36. İmmünohistokimyasal GPX4 boyanma (x400)



A: Zayıf-orta şiddette boyanma (x200), B: Zayıf-orta şiddette boyanma (x400), C: Zayıf-orta şiddette boyanma (x400)

Şekil 37. İmmünohistokimyasal ACSL4 boyanma

Çalışmamızda kullandığımız hayvanlara ait genel veri dökümü Ek 2'de (CD halinde) verilmiştir.

TARTIŞMA

Akut böbrek hasarı ve kronik böbrek hastalığının dünya genelinde yaygınlığı gün geçtikçe artmaktadır. Bu nedenle bu hastalıkların mekanizmalarını aydınlatmak üzere çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Çalışmamızda fruktozdan zengin beslenmeye bağlı olarak böbrek hasarı geliştiği biyokimyasal ve histolojik olarak gösterildi. Böbrek hasarının gelişim süreci ve şiddeti 4, 8 ve 12. haftalarda zamana bağlı olarak karşılaştırıldı. Oluşan böbrek hasarının olası mekanizması olarak ferropitoz belirteçleri değerlendirildi.

Çalışmamız fruktozdan zengin beslenmeye bağlı böbrek hasarı oluştuğunu ve bu hasarın oluşmasında ferropitozun rol oynayabileceğini göstermiştir.

Böbrek fonksiyonlarının değerlendirilmesinde serum kreatinin seviyesi önemli bir belirteçtir. Grupların serum kreatinin seviyesine bakıldığında 12 hafta fruktozla beslenen grupta kontrol, F4 ve F8 gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulundu (Tablo 4, Şekil 13). Serum kreatinin düzeyi sonuçlarımız deneysel modelin başarıyla uygulandığını göstermektedir. Çalışmamızın bulguları mevcut edebiyat bulgularıyla ve daha önce laboratuvarımızda bu modelde yapılan çalışmalarla uyumludur (167-170). Diğer gruplarda zamana bağlı olarak yüksek tespit edilen serum kreatinin düzeyleri istatistiksel anlamlılık göstermemiştir. Böbrek fonksiyonlarını değerlendirmek için kullandığımız diğer bir parametre olan serum üre düzeyi incelendiğinde fruktozla beslenen gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük, F4, F8, F12 grupları arasında benzer bulunmuştur (Tablo 4, Şekil 14). Serum üre düzeyindeki bu bulguların fruktozla beslenen gruplardaki su tüketiminin artmasına bağlı olduğu düşünülmüştür. Fruktozla beslenmeye bağlı böbrek hasarının gösterildiği Kaya ve ark. (170) yaptığı çalışmaya bakıldığında çalışmamızla benzer şekilde 8 hafta %20 fruktozlu suyla beslenen grupta serum üre düzeyleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Bir

başka çalışmada 8 hafta %60 fruktozlu su ile beslenen grup ile kontrol grubu arasında serum üre düzeyi bakımından fark saptanmamıştır (167). Başka bir çalışmada 8 hafta boyunca %30 fruktozlu su ile beslenen sıçanlarda serum üre düzeylerinde anlamlı bir değişiklik görülmemiştir (171). Bilim ve ark.'nın (168) yaptığı benzer bir çalışmada ise 15 hafta boyunca %20 fruktozlu su içen grupta kontrol grubuna göre serum üre seviyeleri düşme eğiliminde olsa da istatiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır. Serum üre düzeyindeki bu farklılıklar hayvan türünün ve verilen fruktoz yüzdelerinin farklı olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Böbrek fonksiyonlarını değerlendirmek için kullandığımız diğer bir parametre olan serum ürik asit düzeyleri incelendiğinde bulgularımız benzer çalışmalarla uyumlu olarak gruplar arasında benzerdi (167,168)(Tablo 4, Şekil 15).

Çalışmamızda serum kalsiyum düzeyleri F4 ve F12 gruplarında kontrolle benzer, F8 grubunda ise kontrole göre düşüktü (Tablo 4, Şekil 17). Hiperglisemik koşullarda (Tip 2 Diabetes Mellitus gibi) serum kalsiyumunda düşüş görülebilmektedir (172). İnsülin salgılanmasını kalsiyum tarafından düzenlenmektedir. Glikozun hücre içine girişiyle artan metaboliza olarak ATP üretilir. Hücre içi ATP artışı, potasyumu içine dışına çıkaran potasyum iyon kanallarını kapatır ve bunun sonucunda hücre zarı potansiyeli değişir. Bu durum voltaj kapılı kalsiyum iyon kanalları aktifleşir. Bu kanalların aktifleşmesiyle hücre içine kalsiyum akışı olur ve insülin salgılanması için çekirdekte insülin gen ifadesini uyarır (173). Fruktozdan zengin beslenene hayvanlarımızda olası hiperglisemik durum, insülin salgılanma mekanizmasında kalsiyumun rolü düşünüldüğünde serum kalsiyum düzeyinde düşüşe neden olmuş olabilir.

Çalışmamızda serum potasyum düzeyleri incelendiğinde gruplar arası anlamlı fark görülmemiştir (Tablo 4, Şekil 16). Hiperkalemi KBH ile ilişkilidir ve KBH'de idrar potasyum atılımı azalması hiperkalemi ile sonuçlanabilir. Çalışmamızda hiperkalemi görülmemesi ileri seviyede böbrek hasarı olmadığını veya potasyum homeostazında bozulma olmadığını düşündürmektedir (174).

Serum demir seviyeleri gruplar arasında benzerdi (Tablo 4, Şekil 18). Serum demir seviyelerinde farklılık olmaması demirin büyük çoğunluğunun transferrine bağlanarak taşınması ya da ferropitozun etkin olduğu bir durumda doku içine alınması nedeniyle olabilir (105,175).

İdrar hacmi ABH tanısında kullanılan parametrelerden biri olmasına karşın duyarlılığı düşüktür. ABH'de idrar hacminde azalma görülebildiği gibi idrar hacminde herhangi bir değişiklik görülmeyebilir ve bu durum tanı koymada idrar çıkış miktarının yetersiz olduğunu

göstermektedir (176). Literatür incelendiğinde fruktozdan zengin beslenmeye bağlı oluşturulan böbrek hasarı modellerinde idrar çıkışının artışı dikkat çekicidir ve verilerimizle uyumludur (177-179). Fruktozun tadı nedeniyle artan su tüketimi idrar çıkışını arttırmış olabilir. Fruktozun veriliş şekli (suya katılarak veya fruktozdan zenginleştirilmiş yem olarak verilmesi), fruktozun yüzdesi veya çalışmanın süresi ile ilişkili olarak İdrar çıkış miktarlarında dalgalanmalar oluşabilir. Bu durum fruktozdan zengin beslenmeyle oluşturulan modellerde ABH tanısı için idrar hacminin değerlendirilmesinin yanıltıcı olabileceğini göstermektedir. (180). Poliüri, KBH'de sık görülen bir durumdur (181). F4 ve F12 gruplarında anlamlı şekilde artmış gözüken idrar hacmi, KBH gelişiminin göstergesi olarak da değerlendirilebilir (Tablo 5, Şekil 19). KBH geliştiğini gösteren diğer bir parametre ise kreatinin klirensi/vücut ağırlığıdır. Zamansal olarak böbrek hasarının şiddetini incelediğimiz çalışmamızda hayvanlarımızın yaş ve kilolarının başlangıç değerlerine göre artmış olması ve kreatinin düzeylerinin yaş ve kiloya bağlı değişim göstermesi nedeniyle kreatinin klirensinin vücut ağırlığına bölünmesiyle bulunan sonucu dikkate aldık (69,182). F12 grubunda bu parametrenin düşük bulunması 12 hafta %20 fruktozlu suyla beslenen sıçanlarda böbrek fonksiyonlarının bozulduğunu göstermektedir (Tablo 5, Şekil 22).

FeNa böbrek fonksiyonlarının değerlendirilmesinde önemli parametrelerden biridir. Çalışmamızda F4, F8 ve F12 gruplarında kontrole göre, F12 grubunda F4'e göre anlamlı olarak düşük bulundu (Tablo 5, Şekil 20). FeNa düzeylerindeki düşüş literatürle uyumludur (180,183). Diyetle alınan fruktoz, bağırsakta ve böbrekte tuz emilimini artırıcı etki gösterir (184). Fruktoz böbrek proksimal tübüllerinde sodyum hidrojen değiştirici 3 (NHE3) aktivitesini artırarak sodyum emilimini artırır (185). Bunun sonucunda idrarla sodyum atılımını azaltır ve vücutta sodyum tutulmasına neden olur (180,186).

Çalışmamızda böbrek dokusunda oksidatif stresi değerlendirmek için MDA düzeyini inceledik. Gruplar arası MDA düzeyleri karşılaştırıldığında F12 grubunda kontrole göre artış tespit edildi (Tablo 6, Şekil 24). F12 grubunda MDA artışı oksidatif stresin bu grupta arttığını göstermektedir. Mevcut literatürle ile karşılaştırıldığında fruktozdan zengin beslenmeye bağlı oluşan böbrek hasarı modellerinde MDA artışı mevcut olup çalışmamızla uyumludur (187,188). Çalışmamızda böbrek dokusundaki antioksidan özellikleri değerlendirmek amacıyla GSH düzeylerini inceledik. GSH, hücreleri oksidan stresten doğrudan ve/veya glutatyon peroksidaz enzimlerinin kofaktörü olarak koruyan bir peptittir (189). Fruktoz tüketiminin böbrekteki antioksidan enzimlerin aktivitesini azalttığı bildirilmiştir (178,190). Bu bilgilerle uyumlu olarak F8 ve F12 grubunda kontrole göre anlamlı olarak GSH seviyelerinde düşüş tespit

edildi (Tablo 6, Şekil 23). Sonuçlarımız literatürle uyumlu olarak fruktozdan zengin beslenmeye bağlı antioksidan kapasitenin azaldığını göstermektedir (191).

Böbrek hasarını erken tespit etmek için her geçen gün yeni biyobelirteçler saptanmaktadır. Biz de çalışmamızda bu yeni biyobelirteçlerden olan endocan ve calprotectini fruktozdan zengin beslenmeye bağlı böbrek hasarı modelinde böbrek dokusunda değerlendirdik. Calprotectin böbrek toplayıcı kanallarında üretilir ve böbrek hasarında idrarda tespit edilebilir (29). F4 ve F12 gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı azalma tespit edilmesi, böbrekte oluşan hasar nedeniyle böbrek dokusundan idrara salınması sonucu olmuş olabilir (Tablo 6, Şekil 29). Böbrek dokusunda incelediğimiz endocan düzeylerinde ise gruplar arası anlamlılık tespit edilmedi (Tablo 6, Şekil 30). Endotel hasarı sonrası kana salgılanmasında artış görülen endocanın böbrek dokusu düzeylerinde değişiklik göstermemesi oluşturduğumuz deneysel modelin süresinin yetersiz olmasından olabilir (37). Bu durum fruktozdan zengin beslenme modelinde endocanın biyobelirteç olarak kullanılabilmesi için serum endocan düzeyinin de değerlendirilmesi gerektiğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda böbrek dokusunun histolojik incelemesinde renal hasar skoru F8 ve F12 gruplarında hem kontrol grubuna göre hem de F4 grubuna göre yüksek tespit edildi (Tablo 7, Şekil 31). Ayrıca F12 grubunda, F8 grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. Fruktozdan zengin beslenme tübüler epitel hücrelerinde dejenerasyona ve tübüler dilatasyona neden olmuştur. Ayrıca glomerüllerde dilatasyon, peritübüler genişleme ve tübüler cast formasyonu oluşumu gözlenmiştir. Yapılan bir başka histolojik değerlendirme ise glomerüler çaptır. F8 ve F12 gruplarında kontrole göre, F12 grubunda F4 grubuna göre glomerüler çapta anlamlı artış görülmüştür (Tablo 7, Şekil 32). Renal hasar skoru ve glomerüler çaptaki özellikle F8 ve F12 gruplarındaki anlamlı artış fruktoza bağlı böbrek hasarı modelinin başarılı olduğunu göstermiş ve bu bulgu diğer labaratuvar bulgularıyla uyumluluk göstermiştir. Fruktozdan zengin beslenmenin süresi uzadıkça histolojik hasarın arttığı tespit edilmiştir. Bulgularımız mevcut literatürle uyumluluk göstermektedir (70,170,192).

Çalışmamızda ferropitoz belirteçlerinden GPX4 ve ACSL4 böbrek dokusunda incelendi. GPX4 düzeyi, yüksek fruktoz alan gruplarda kontrole göre düşük bulundu (Tablo 6, Şekil 25). Wu ve arkadaşlarının sıçanlara %10 fruktoz içeren su verdikleri çalışmada da 12 ve 16. haftada GPX4 düzeyi düşük bulunmuştur (169). Yüksek fruktoz verdiğimiz gruplarda ferropitozun anahtar aracıları olan GSH ve GPX4 düzeylerindeki düşüklük, bu gruplarda biyokimyasal ve histolojik olarak gösterilen böbrek hasarında ferropitozun rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Çalışmamızda incelediğimiz bir diğer ferropitoz göstergesi olan ACSL4

düzeyi gruplar arasında benzerdi (Tablo 6, Şekil 26). Magtanong ve ark. ACSL4'ün sadece belirli durumlarda ferroptoz için gerekli olduğunu ve ACSL4'den bağımsız yolaklarla da ferropitozun oluşabileceğini bildirmişlerdir (193). Böbrek dokularındaki ferroptozu değerlendirmek için incelediğimiz demir ve TFR1 düzeyi gruplar arasıda benzer tespit edildi (Tablo 6, Şekil 27, Şekil 28). Böbrek dokusundaki GPX4 ve ACSL4'ün immünohistokimyasal boyanmaları da gruplar arasında benzerdi (Tablo 7, Şekil 33, Şekil 34). Çalışmamızın süresi ve kullanılan fruktoz dozu immünolojik boyanma için yetersiz kalmış olabilir. Çalışmamızın ferroptozla ilişkili bulguları toplu olarak değerlendirildiğinde çelişkili olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar ışığında ve literatürde Wu ve ark.'nın (169) çalışması dışında fruktozdan zengin beslenmeye bağlı oluşan böbrek hasarında ferropitozun rolünü araştıran başka çalışma olmaması nedeniyle ferropitozun fruktoza bağlı oluşan böbrek hasarındaki rolünün tespiti için değişen fruktoz dozlarının daha uzun süreyle kullanılacağı ve daha detaylı moleküler analizlerin yapılacağı araştırmalara ihtiyaç olduğu düşünüldü.

SONUÇLAR

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek fruktozlu beslenmeye bağlı oluşan böbrek hasarında ferropitozun rolünü araştırdığımız çalışmamızda şu sonuçlar elde edilmiştir:

1- Çalışmamız ile fruktozdan zengin beslenmenin böbrek fonksiyon ve histolojisini olumsuz etkilediği ve fruktozdan zengin beslenme süresinin uzamasının bu etkileri arttırdığı gösterilmiştir.

2- Yüksek fruktoz alımına bağlı oluşan böbrek hasarında ferropitozun anahtar aracıları olan GSH ve GPX4 düzeylerindeki düşüklük, biyokimyasal ve histolojik olarak gösterilen böbrek hasarında ferropitozun rol oynayabileceğini düşündürmüştür.

3- Diğer ferropitoz belirteçleri olan ACSL4, demir ve TFR1 düzeylerinde değişiklik olmaması uyguladığımız modelde ferropitozun rolü konusunda net bir sonuca ulaşılamamasına neden olmaktadır.

ÖZET

Çalışmamızda yüksek fruktozlu beslenmeye bağlı oluşan böbrek hasarında ferropitozun rolünü ve yüksek fruktozlu beslenmenin böbrek fonksiyon ve histolojisindeki değişimini zamana bağlı olarak incelemeyi amaçladık.

Etik onay alındıktan sonra 4 grupta toplam 34 adet Spraque-Dawley erkek sıçan kullanıldı. Deney süresince kontrol grubuna çeşme suyu, diğer gruplara %20 fruktoz içeren çeşme suyu verildi. Kontrol grubu 1 hafta, F4 grubu 4 hafta, F8 grubu 8 hafta ve F12 grubu 12 hafta takip edildi. Deney sürelerinin son gününde sıçanlar metabolik kafese alınarak 24 saatlik idrarları toplandı. Ardından anestezi altında kan örnekleri ve böbrekleri alındı. Serum numunelerinde üre, kreatinin, ürik asit, kalsiyum ve potasyum düzeyleri, idrar numunelerinde kreatinin klirensi ve FeNa düzeyleri, böbrek dokusunda glutatyon (GSH), malondialdehit MDA, glutatyon peroksidaz 4 (GPX4), açil-coa sentetaz uzun zincirli aile üyesi 4 (ACSL4), transferrin reseptör 1 (TFR1), doku demir düzeyleri, histopatolojik değişiklikler ve immünohistokimyasal GPX4 ve ACSL4 boyanma düzeyleri incelendi.

Çalışmamızda 12 hafta fruktozla beslenen grupta tüm gruplara göre serum kreatinin seviyesinde anlamlı artış gözlenirken serum üre seviyesinde kontrol grubuna göre tüm gruplarda anlamlı düşüş gözlendi. Serum kalsiyum düzeyinde F8 grubunda kontrole göre anlamlı azalma görüldü. Kreatinin klirensi / vücut ağırlığı seviyelerinde F12 grubunda, FeNa seviyelerinde ise kontrol grubuna göre tüm gruplarda anlamlı azalma gözlendi. 24 saatlik idrar hacminde F4 ve F12 gruplarında kontrole göre anlamlı artış, F8 grubunda F4 grubuna göre anlamlı azalma gözlendi. Böbrek dokusunda GSH düzeylerinde F8 ve F12 gruplarında kontrole göre anlamlı azalma görülürken MDA seviyelerinde gruplar arası farklılık gözlenmedi. Ferropitoz belirteçlerinden GPX4 seviyelerinde kontrole göre tüm gruplarda

anlamlı azalma, diğer ferropitoz belirteçlerinde anlamlı farklılık gözlenmedi. Histolojik olarak renal hasar skoru ve glomerüler çap F8 ve F12 gruplarında anlamlı yüksekti.

Tüm bu sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde fruktozdan zengin beslenmenin böbrek fonksiyon ve histolojisini olumsuz etkilediği ve fruktozdan zengin beslenme süresinin uzamasının bu etkileri arttırdığı görüldü. Yüksek fruktoz alımına bağlı olumsuz etkilerde ferropitozun rolünü incelediğimizde bulgularımızın çelişkili olması sebebiyle yüksek fruktozlu beslenmeye bağlı oluşan hasarda ferropitozun rolü konusunda net bir sonuca ulaşılamadı. Uygulanan modelde fruktoz dozunda çeşitlilik ve çalışma süresi artırılarak ek çalışmalar yapılmasının uygun olacağı düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: Ferropitoz, fruktozlu, beslenme, oksidatif stres

THE ROLE OF FERROPTOSIS IN HIGH FRUCTOSE DIET-INDUCED RENAL DYSFUNCTION

SUMMARY

In our study, we aimed to examine the role of ferroptosis in kidney damage caused by high fructose nutrition and the change of high fructose nutrition in kidney function and histology over time.

After ethical approval, a total of 34 Spraque-Dawley male rats were used in 4 groups. During the experiment, tap water was given to the control group and tap water containing 20% fructose was given to the other groups. The control group was followed for 1 week, the F4 group for 4 weeks, the F8 group for 8 weeks, and the F12 group for 12 weeks. On the last day of the experimental period, the rats were taken into the metabolic cage and their 24-hour urine was collected. Then, blood samples and kidneys were taken under anesthesia. Urea, creatinine, uric acid, calcium and potassium levels in serum samples, creatinine clearance and FeNa levels in urine samples, glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), malondialdehyde (GPX4), acyl-coa synthetase long chain family member 4 (ACSL4), transferrin receptor 1 (TFR1), and tissue iron levels in kidney tissue samples, histopathological changes and immunohistochemical GPX4 and ACSL4 staining levels in kidney tissue were examined.

In our study, a significant increase was observed in serum creatinine level in the group fed with fructose for 12 weeks compared to all groups, while a significant decrease was observed in serum urea level in all groups compared to the control group. There was a significant decrease in serum calcium level in the F8 group compared to the control. A significant decrease was observed in creatinine clearance / body weight levels in the F12 group, and in FeNa levels in all groups compared to the control group. A significant increase

in 24-hour urine volume was observed in the F4 and F12 groups compared to the control group, and a significant decrease was observed in the F8 group compared to the F4 group. There was a significant decrease in GSH levels in the kidney tissue in the F8 and F12 groups compared to the control, but no difference was observed between the groups in MDA levels. A significant decrease was observed in GPX4 levels, one of the ferroptosis markers, in all groups compared to the control, and no significant difference was observed in other ferroptosis markers. Histologically, renal injury score and glomerular diameter were significantly higher in the F8 and F12 groups.

When all these results were evaluated collectively, it was seen that fructose-rich diet negatively affected kidney function and histology, and prolonged fructose-rich diet increased these effects. When we examined the role of ferroptosis in the negative effects of high fructose intake, we could not reach a clear conclusion about the role of ferroptosis in the damage caused by high fructose nutrition, since our findings were contradictory. In the applied model, it was thought that it would be appropriate to carry out additional studies by increasing the diversity and working time in fructose dose.

Keywords: Ferroptosis, fructose, diet, oxidative stress

KAYNAKLAR

1. Mehta RL, Burdmann EA, Cerdá J, Feehally J, Finkelstein F, García-García G, et al. Recognition and management of acute kidney injury in the International Society of Nephrology 0by25 Global Snapshot: a multinational cross-sectional study. Lancet 2016;387(10032):2017-25.

2. Siew ED, Davenport A. The growth of acute kidney injury: a rising tide or just closer attention to detail? Kidney Int 2015;87(1):46-61.

3. Zhong J, Yang HC, Fogo AB. A perspective on chronic kidney disease progression. Am J Physiol Renal Physiol 2017;312(3):F375-84.

4. Chapman CL, Grigoryan T, Vargas NT, Reed EL, Kueck PJ, Pietrafesa LD, et al. High-fructose corn syrup-sweetened soft drink consumption increases vascular resistance in the kidneys at rest and during sympathetic activation. Am J Physiol Renal Physiol 2020;318(4):1053-65.

5. Nakagawa T, Johnson RJ, Andres-Hernando A, RoncalJimenez C, Sanchez-Lozada LG, Tolan DR, et al. Fructose production and metabolism in the kidney. J Am Soc Nephrol 2020;31(5):898-906.

6. Martin-Sanchez D, Ruiz-Andres O, Poveda J, Carrasco S, Cannata-Ortiz P, Sanchez-Niño MD, et al. Ferroptosis, but not necroptosis, is important in nephrotoxic folic acid-induced AKI. J Am Soc Nephrol 2017;28(1):218-29.

7. Linkermann A, Skouta R, Himmerkus N, Mulay SR, Dewitz C, De Zen F, et al. Synchronized renal tubular cell death involves ferroptosis. Proc Natl Acad Sci U S A 2014;111(47):16836-41.

8. Alscher MD, Erley C, Kuhlmann MK. Acute Renal Failure of Nosocomial Origin. Dtsch Arztebl Int 2019;116(9):149-58.

9. Ostermann M, Cerdá J. The Burden of acute kidney injury and related financial issues. Contrib Nephrol 2018;193:100-12.

10. Celebi N, Arikan AA. Acute kidney injury: definitions and epidemiology. In: Sethi S, Raina R, McCulloch M, Bunchman T (Eds). Critical care pediatric nephrology and dialysis: a practical handbook. Singapore: Springer; 2019. p. 3-10.

11. Roy JP, Devarajan P. Acute kidney injury: diagnosis and management. Indian J Pediatr 2020;87(8):600-7.

12. Ostermann M, Joannidis M. Acute kidney injury 2016: diagnosis and diagnostic workup. Crit Care 2016;20(1):299.

13. Rahman M, Shad F, Smith MC. Acute kidney injury: a guide to diagnosis and management. Am Fam Physician 2012;86(7):631-9.

14. Tanrıverdi MH. Akut böbrek yetmezliği. Konuralp Tıp Dergisi 2010;2(1):46-52.

15. Goyal A, Daneshpajouhnejad P, Hashmi MF, Bashir K. Acute kidney injury. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022

16. Basile DP, Anderson MD, Sutton TA. Pathophysiology of acute kidney injury. Compr Physiol 2012;2(2):1303-53.

17. Awdishu BL, Wu SE. Acute Kidney Injury. 2nd ed. Lenexa: CCSAP, 2017:7-26.

18. Coca SG, Singanamala S, Parikh CR. Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. Kidney Int 2012;81(5):442-8.

19. World Health Organization (WHO.) Mortality and global health estimates: Causes of death; Projections for 2015-2030; Projection of death rates. World Health Organization; 2018.

20. Jiang M, Bai M, Lei J, Xie Y, Xu S, Jia Z, et al. Mitochondrial dysfunction and the AKI-to-CKD transition. Am J Physiol Renal Physiol 2020;319(6):1105-16.

21. Levey AS, Becker C, Inker LA. Glomerular filtration rate and albuminuria for detection and staging of acute and chronic kidney disease in adults: a systematic review. JAMA 2015;313(8):837-46.

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

23. Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P. Chronic kidney disease. Lancet 2017;389(10075):1238-52.

24. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. Lancet 2005;365(9455):217-23.

25. Smyth LJ, Duffy S, Maxwell AP, McKnight AJ. Genetic and epigenetic factors influencing chronic kidney disease. Am J Physiol Renal Physiol 2014;307(7):F757-76.

26. Reddy MA, Natarajan R. Recent developments in epigenetics of acute and chronic kidney diseases. Kidney Int 2015;88(2):250-61

27. Inker LA, Levey AS, Pandya K, Stoycheff N, Okparavero A, Greene T; Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI). Early change in proteinuria as a surrogate end point for kidney disease progression: an individual patient meta-analysis. Am J Kidney Dis 2014;64(1):74-85.

28. Değer EB, Arslan E, Değer MD, Kaya O. Biomarkers of acute kidney injury and their role in clinical patient management. Biomed Rev 2020;31:11-29.

29. van den Bergh FA, Kolkman JJ, Russel MG, Vlaskamp RT, Vermes I. Calprotectin: a fecal marker for diagnosis and follow-up in patients with chronic inflammatory bowel disease. Ned Tijdschr Geneeskd 2003;147(48):2360-5.

30. Fujiu K, Manabe I, Nagai R. Renal collecting duct epithelial cells regulate inflammation in tubulointerstitial damage in mice. J Clin Invest 2011;121(9):3425-41.

31. Gisbert JP, McNicholl AG. Questions and answers on the role of faecal calprotectin as a biological marker in inflammatory bowel disease. Dig Liver Dis 2009;41(1):56-66.

32. Heller F, Frischmann S, Grünbaum M, Zidek W, Westhoff TH. Urinary calprotectin and the distinction between prerenal and intrinsic acute kidney injury. Clin J Am Soc Nephrol 2011;6(10):2347-55.

33. Seibert FS, Pagonas N, Arndt R, Heller F, Dragun D, Persson P, et al. Calprotectin and neutrophil gelatinase-associated lipocalin in the differentiation of pre-renal and intrinsic acute kidney injury. Acta Physiol (Oxf) 2013;207(4):700-8.

34. Westhoff JH, Seibert FS, Waldherr S, Bauer F, Tönshoff B, Fichtner A, et al. Urinary calprotectin, kidney injury molecule-1, and neutrophil gelatinase-associated lipocalin for the prediction of adverse outcome in pediatric acute kidney injury. Eur J Pediatr 2017;176(6):745-55.

35. Kali A, Shetty KS. Endocan: a novel circulating proteoglycan. Indian J Pharmacol 2014;46(6):579-83.

36. Lassalle P, Molet S, Janin A, Heyden JV, Tavernier J, Fiers W, et al. ESM-1 is a novel human endothelial cell-specific molecule expressed in lung and regulated by cytokines. J Biol Chem 1996;271(34):20458-64.

37. Zhang SM, Zuo L, Zhou Q, Gui SY, Shi R, Wu Q, et al. Expression and distribution of endocan in human tissues. Biotech Histochem 2012;87(3):172-8.

38. Sarrazin S, Maurage CA, Delmas D, Lassalle P, Delehedde M. Endocan as a biomarker of endothelial dysfunction in cancer. J Cancer Sci Ther 2010;2(2):47-52.

39. Gunay M, Mertoglu C. Increase of endocan, a new marker for inflammation and endothelial dysfunction, in acute kidney injury. North Clin Istanb 2018;6(2):124-8.

40. Gaudet A, Parmentier E, De Freitas Caires N, Portier L, Dubucquoi S, Poissy J, et al. Impact of acute renal failure on plasmatic levels of cleaved endocan [letter]. Crit Care 2019;23(1),55.

41. Li S, Wang L, Wang C, Wang Q, Yang H, Liang P, et al. Detection on dynamic changes of endothelial cell specific molecule-1 in acute rejection after renal transplantation. Urology 2012;80(3):738.e1-8.

42. Azimi A. Could "calprotectin" and "endocan" serve as "Troponin of Nephrologists"? Med Hypotheses 2017;99:29-34.

43. Su YH, Shu KH, Hu CP, Cheng CH, Wu MJ, Yu TM, et al. Serum Endocan correlated with stage of chronic kidney disease and deterioration in renal transplant recipients. Transplant Proc 2014;46(2):323-7.

44. Yilmaz MI, Siriopol D, Saglam M, Kurt YG, Unal HU, Eyileten T, et al. Plasma endocan levels associate with inflammation, vascular abnormalities, cardiovascular events, and survival in chronic kidney disease. Kidney Int 2014;86(6):1213-20.

45. Drewnowski A, Bellisle F. Liquid calories, sugar, and body weight. Am J Clin Nutr 2007;85(3):651-61.

46. Campos VC, Tappy L. Physiological handling of dietary fructose-containing sugars: implications for health. Int J Obes (Lond) 2016;40 Suppl 1:S6-11.

47. Cozma AI, Sievenpiper JL. The Role of fructose, sucrose and high-fructose corn syrup in diabetes. Eur Endocrinol 2014;10(1):51-60.

48. White JS. Straight talk about high-fructose corn syrup: what it is and what it ain't. Am J Clin Nutr 2008;88:1716-21.

49. Rizkalla SW. Health implications of fructose consumption: A review of recent data. Nutr Metab (Lond) 2010;7:82.

50. Johnson RJ, Sánchez-Lozada LG, Andrews P, Lanaspa MA. Perspective: a historical and scientific perspective of sugar and its relation with obesity and diabetes. Adv Nutr 2017;8(3):412-22.

51. Bray GA. Fructose: should we worry? Int J Obes (Lond) 2008;32 (Suppl 7):127-31.

52. Riby JE, Fujisawa T, Kretchmer N. Fructose absorption. Am J Clin Nutr 1993;58(5 Suppl):748S-53S.

53. Jones HF, Butler RN, Brooks DA. Intestinal fructose transport and malabsorption in humans. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2011;300(2):G202-6.

54. Madero M, Perez-Pozo SE, Jalal D, Johnson RJ, Sánchez-Lozada LG. Dietary fructose and hypertension. Curr Hypertens Rep 2011; 13(1):29-35.

55. Mayes PA. Intermediary metabolism of fructose. Am J Clin Nutr 1993;58(5 Suppl):754S-65S.

56. Jang C, Hui S, Lu W, Cowan AJ, Morscher RJ, Lee G, et al. The Small intestine converts dietary fructose into glucose and organic acids. Cell Metab 2018;27(2):351-61.e3.

57. Ares GR, Ortiz PA. Direct renal effects of a fructose-enriched diet: interaction with high salt intake. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2015;309(9):R1078-81.

58. Abdelmalek MF, Lazo M, Horska A, Bonekamp S, Lipkin EW, Balasubramanyam A, et al; Fatty Liver Subgroup of Look AHEAD Research Group. Higher dietary fructose is associated with impaired hepatic adenosine triphosphate homeostasis in obese individuals with type 2 diabetes. Hepatology 2012;56(3):952-60.

59. Zhang DM, Jiao RQ, Kong LD. High Dietary Fructose: Direct or indirect dangerous factors disturbing tissue and organ functions. Nutrients 2017;9(4):335.

60. Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer AA, Graham JL, et al. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity

and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. J Clin Invest 2009;119(5):1322-34.

61. Kim MS, Krawczyk SA, Doridot L, Fowler AJ, Wang JX, Trauger SA, et al. ChREBP regulates fructose-induced glucose production independently of insulin signaling. J Clin Invest 2016;126(11):4372-86.

62. Crescenzo R, Bianco F, Falcone I, Coppola P, Liverini G, Iossa S. Increased hepatic de novo lipogenesis and mitochondrial efficiency in a model of obesity induced by diets rich in fructose. Eur J Nutr 2013;52(2):537-45.

63. Crescenzo R, Bianco F, Coppola P, Mazzoli A, Tussellino M, Carotenuto R, et al. Fructose supplementation worsens the deleterious effects of short-term high-fat feeding on hepatic steatosis and lipid metabolism in adult rats. Exp Physiol 2014;99(9):1203-13.

64. Jaiswal N, Maurya CK, Arha D, Avisetti DR, Prathapan A, Raj PS, et al. Fructose induces mitochondrial dysfunction and triggers apoptosis in skeletal muscle cells by provoking oxidative stress. Apoptosis 2015;20(7):930-47.

65. Kovačević S, Nestorov J, Matić G, Elaković I. Fructose-enriched diet induces inflammation and reduces antioxidative defense in visceral adipose tissue of young female rats. Eur J Nutr 2017;56(1):151-60.

66. Nakagawa T, Hu H, Zharikov S, Tuttle KR, Short RA, Glushakova O, et al. A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. Am J Physiol Renal Physiol 2006;290(3):F625-31.

67. Nakagawa T, Tuttle KR, Short RA, Johnson RJ. Hypothesis: fructose-induced hyperuricemia as a causal mechanism for the epidemic of the metabolic syndrome. Nat Clin Pract Nephrol 2005;1(2):80-6.

68. Rebholz CM, Young BA, Katz R, Tucker KL, Carithers TC, Norwood AF, et al. Patterns of beverages consumed and risk of incident kidney disease. Clin J Am Soc Nephrol 2019;14(1):49-56.

69. Gersch MS, Mu W, Cirillo P, Reungjui S, Zhang L, Roncal C, et al. Fructose, but not dextrose, accelerates the progression of chronic kidney disease. Am J Physiol Renal Physiol 2007;293(4):1256-61.

70. Nakayama T, Kosugi T, Gersch M, Connor T, Sanchez-Lozada LG, Lanaspa MA, et al. Dietary fructose causes tubulointerstitial injury in the normal rat kidney. Am J Physiol Renal Physiol 2010;298(3):F712-20.

71. Hallfrisch J. Metabolic effects of dietary fructose. FASEB J 1990;4(9):2652-60.

72. Burch HB, Choi S, Dence CN, Alvey TR, Cole BR, Lowry OH. Metabolic effects of large fructose loads in different parts of the rat nephron. J Biol Chem 1980;255(17):8239-44.

73. Wang W, Ding XQ, Gu TT, Song L, Li JM, Xue QC, et al. Pterostilbene and allopurinol reduce fructose-induced podocyte oxidative stress and inflammation via microRNA-377. [Published erratum appears in: Free Radic Biol Med 2022;186:113-117]. Free Radic Biol Med 2015;83:214-26.

74. Glushakova O, Kosugi T, Roncal C, Mu W, Heinig M, Cirillo P, et al. Fructose induces the inflammatory molecule ICAM-1 in endothelial cells. J Am Soc Nephrol 2008;19(9):1712-20.

75. Kang DH, Nakagawa T, Feng L, Watanabe S, Han L, Mazzali M, et al. A role for uric acid in the progression of renal disease. J Am Soc Nephrol 2002;13(12):2888-97.

76. Khosla UM, Zharikov S, Finch JL, Nakagawa T, Roncal C, Mu W, et al. Hyperuricemia induces endothelial dysfunction. Kidney Int 2005;67(5):1739-42.

77. Sánchez-Lozada LG, Tapia E, Jiménez A, Bautista P, Cristóbal M, Nepomuceno T, et al. Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. Am J Physiol Renal Physiol 2007;292(1):F423-9.

78. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. Cell Death Differ 2018;25(3):486-541.

79. Dolma S, Lessnick SL, Hahn WC, Stockwell BR. Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. Cancer Cell 2003;3(3):285-96.

80. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. Cell 2012;149(5):1060-72.

81. Yang WS, Stockwell BR. Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells. Chem Biol 2008;15(3):234-45.

82. Xie Y, Hou W, Song X, Yu Y, Huang J, Sun X, et al. Ferroptosis: process and function. Cell Death Differ 2016;23(3):369-79.

83. Andrews NC, Schmidt PJ. Iron homeostasis. Annu Rev Physiol 2007;69:69-85.

84. Outten FW, Theil EC. Iron-based redox switches in biology. Antioxid Redox Signal 2009;11(5):1029-46.

85. Wang X, Zheng X, Zhang J, Zhao S, Wang Z, Wang F, et al. Physiological functions of ferroportin in the regulation of renal iron recycling and ischemic acute kidney injury. Am J Physiol Renal Physiol 2018;315(4):F1042-57.

86. Hou W, Xie Y, Song X, Sun X, Lotze MT, Zeh HJ 3rd, et al. Autophagy promotes ferroptosis by degradation of ferritin. Autophagy 2016;12(8):1425-8.

87. Li Q, Han X, Lan X, Gao Y, Wan J, Durham F, et al. Inhibition of neuronal ferroptosis protects hemorrhagic brain. JCI Insight 2017;2(7):e90777.

88. Masaldan S, Bush AI, Devos D, Rolland AS, Moreau C. Striking while the iron is hot: Iron metabolism and ferroptosis in neurodegeneration. Free Radic Biol Med 2019;133:221-33.

89. Kuhn H, Banthiya S, van Leyen K. Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. Biochim Biophys Acta 2015;1851(4):308-30.

90. Muckenthaler MU, Rivella S, Hentze MW, Galy B. A Red carpet for iron metabolism. Cell 2017;168(3):344-61.

91. Drecourt A, Babdor J, Dussiot M, Petit F, Goudin N, Garfa-Traoré M, et al. Impaired transferrin receptor palmitoylation and recycling in neurodegeneration with brain iron accumulation. Am J Hum Genet 2018;102(2):266-77.

92. Gao M, Monian P, Quadri N, Ramasamy R, Jiang X. Glutaminolysis and Transferrin Regulate Ferroptosis. Mol Cell 2015;59(2):298-308.

93. Feng H, Schorpp K, Jin J, Yozwiak CE, Hoffstrom BG, Decker AM, et al. Transferrin receptor is a specific ferroptosis marker. Cell Rep 2020;30(10):3411-23.e7.

94. DeBose-Boyd RA. Significance and regulation of lipid metabolism. Semin Cell Dev Biol 2018;81:97.

95. Gill I, Valivety R. Polyunsaturated fatty acids, Part 2: Biotransformations and biotechnological applications. Trends Biotechnol 1997;15(11):470-8.

96. Rouzer CA, Marnett LJ. Mechanism of free radical oxygenation of polyunsaturated fatty acids by cyclooxygenases. Chem Rev 2003;103(6):2239-304.

97. Yin H, Xu L, Porter NA. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. Chem Rev 2011;111(10):5944-72.

98. Yang WS, Stockwell BR. Ferroptosis: death by lipid peroxidation. Trends Cell Biol 2016;26(3):165-76.

99. Yan HF, Zou T, Tuo QZ, Xu S, Li H, Belaidi AA, et al. Ferroptosis: mechanisms and links with diseases. Signal Transduct Target Ther 2021;6(1):49.

100. Dikker O, Şahin M, Atar S, Bekpınar S. Postmenopozal osteoporozlu kadınlarda oksidatif stres belirteçlerinin incelenmesi. Turk J Osteoporos 2018;24(1):15.

101. Erçin U, Bilgihan A, Erkan AF, Yücel H. Koroner arter hastalığında yeni parametreler: oksidatif stres belirteçleri. Türk Klinik Biyokimya Derg 2019;17(1):48-56.

102. Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. YYU Vet Fak Derg 2004;15(1):91-6.

103. Kagan VE, Mao G, Qu F, Angeli JP, Doll S, Croix CS, et al. Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis. Nat Chem Biol 2017;13(1):81-90.

104. Yuan H, Li X, Zhang X, Kang R, Tang D. Identification of ACSL4 as a biomarker and contributor of ferroptosis. Biochem Biophys Res Commun 2016;478(3):1338-43.

105. Doll S, Conrad M. Iron and ferroptosis: A still ill-defined liaison. IUBMB Life 2017;69(6):423-34.

106. Ju J, Song YN, Wang K. Mechanism of ferroptosis: a potential target for cardiovascular diseases treatment. Aging Dis 2021;12(1):261-76.

107. Magtanong L, Ko PJ, To M, Cao JY, Forcina GC, Tarangelo A, et al. Exogenous monounsaturated fatty acids promote a ferroptosis-resistant cell state. Cell Chem Biol 2019;26(3):420-32.e9.

108. Tesfay L, Paul BT, Konstorum A, Deng Z, Cox AO, Lee J, et al. Stearoyl-CoA desaturase 1 protects ovarian cancer cells from ferroptotic cell death. Cancer Res 2019;79(20):5355-66.

109. Doll S, Proneth B, Tyurina YY, Panzilius E, Kobayashi S, Ingold I, et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition. Nat Chem Biol 2017;13(1):91-8.

110. Kim JH, Lewin TM, Coleman RA. Expression and characterization of recombinant rat Acyl-CoA synthetases 1, 4, and 5. Selective inhibition by triacsin C and thiazolidinediones. J Biol Chem 2001;276(27):24667-73.

111. Li Y, Feng D, Wang Z, Zhao Y, Sun R, Tian D, et al. Ischemia-induced ACSL4 activation contributes to ferroptosis-mediated tissue injury in intestinal ischemia/reperfusion. Cell Death Differ 2019;26(11):2284-99.

112. Lei G, Zhang Y, Koppula P, Liu X, Zhang J, Lin SH, et al. The role of ferroptosis in ionizing radiation-induced cell death and tumor suppression. Cell Res 2020;30(2):146-62.

113. Sato H, Tamba M, Ishii T, Bannai S. Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. J Biol Chem 1999;274(17):11455-8.

114. Cao JY, Dixon SJ. Mechanisms of ferroptosis. Cell Mol Life Sci 2016;73(11-12):2195-209.

115. Shimada K, Stockwell BR. tRNA synthase suppression activates de novo cysteine synthesis to compensate for cystine and glutathione deprivation during ferroptosis. Mol Cell Oncol 2015;3(2):e1091059.

116. Dixon SJ, Patel DN, Welsch M, Skouta R, Lee ED, Hayano M, et al. Pharmacological inhibition of cystine-glutamate exchange induces endoplasmic reticulum stress and ferroptosis. Elife 2014;3:e02523.

117. Stockwell BR, Friedmann Angeli JP, Bayir H, Bush AI, Conrad M, Dixon SJ, et al. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease. Cell 2017;171(2):273-85.

118. Maiorino M, Conrad M, Ursini F. GPX4, Lipid peroxidation, and cell death: discoveries, rediscoveries, and open issues. Antioxid Redox Signal 2018;29(1):61-74.

119. Ingold I, Berndt C, Schmitt S, Doll S, Poschmann G, Buday K, et al. Selenium utilization by gpx4 is required to prevent hydroperoxide-induced ferroptosis. Cell 2018;172(3):409-22.e21.

120. Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, Shimada K, Skouta R, Viswanathan VS, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. Cell 2014;156(1-2):317-31.

121. Han C, Liu Y, Dai R, Ismail N, Su W, Li B. Ferroptosis and its potential role in human diseases. Front Pharmacol 2020;11:239.

122. Romano A, Serviddio G, Calcagnini S, Villani R, Giudetti AM, Cassano T, et al. Linking lipid peroxidation and neuropsychiatric disorders: focus on 4-hydroxy-2-nonenal. Free Radic Biol Med 2017;111:281-93.

123. Muller M, Leavitt BR. Iron dysregulation in Huntington's disease. J Neurochem 2014;130(3):328-50.

124. Li J, Cao F, Yin HL, Huang ZJ, Lin ZT, Mao Net al. Ferroptosis: past, present and future. Cell Death Dis 2020;11(2):88.

125. Friedmann Angeli JP, Schneider M, Proneth B, Tyurina YY, Tyurin VA, Hammond VJ, et al. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. Nat Cell Biol 2014;16(12):1180-91.

126. van Raaij S, van Swelm R, Bouman K, Cliteur M, van den Heuvel MC, Pertijs J, et al. Tubular iron deposition and iron handling proteins in human healthy kidney and chronic kidney disease. Sci Rep 2018;8(1):9353.

127. Baek JH, Yalamanoglu A, Brown RP, Saylor DM, Malinauskas RA, Buehler PW. Renal toxicodynamic effects of extracellular hemoglobin after acute exposure. Toxicol Sci 2018;166(1):180-91.

128. Ferro CJ, Mark PB, Kanbay M, Sarafidis P, Heine GH, Rossignol P, et al. Lipid management in patients with chronic kidney disease [retracted in Nat Rev Nephrol 2018;14(12):727-749] Nat Rev Nephrol 2019;15(2):121.

129. Gai Z, Wang T, Visentin M, Kullak-Ublick GA, Fu X, Wang Z. Lipid accumulation and chronic kidney disease. Nutrients 2019;11(4):722.

130. Bugarski M, Ghazi S, Polesel M, Martins JR, Hall AM. Changes in NAD and lipid metabolism drive acidosis-induced acute kidney injury. J Am Soc Nephrol 2021;32(2):342-56.

131. Sancho-Martínez SM, López-Novoa JM, López-Hernández FJ. Pathophysiological role of different tubular epithelial cell death modes in acute kidney injury. Clin Kidney J 2015;8(5):548-59.

132. Agarwal A, Nick HS. Renal response to tissue injury: lessons from heme oxygenase-1 GeneAblation and expression. J Am Soc Nephrol 2000;11(5):965-73.

133. Nath KA. Heme oxygenase-1: a provenance for cytoprotective pathways in the kidney and other tissues. Kidney Int 2006;70(3):432-43.

134. Xu D, Chen M, Ren X, Ren X, Wu Y. Leonurine ameliorates LPS-induced acute kidney injury via suppressing ROS-mediated NF-κB signaling pathway. Fitoterapia 2014;97:148-55.

135. Zhang J, Bi J, Ren Y, Du Z, Li T, Wang T, et al. Involvement of GPX4 in irisin's protection against ischemia reperfusion-induced acute kidney injury. J Cell Physiol 2021;236(2):931-45.

136. Leaf DE, Rajapurkar M, Lele SS, Mukhopadhyay B, Waikar SS. Plasma catalytic iron, AKI, and death among critically ill patients. Clin J Am Soc Nephrol 2014;9(11):1849-56.

137. Swaminathan S. Iron Homeostasis pathways as therapeutic targets in acute kidney injury. Nephron 2018;140(2):156-59.

138. Zarjou A, Bolisetty S, Joseph R, Traylor A, Apostolov EO, Arosio P, et al. Proximal tubule H-ferritin mediates iron trafficking in acute kidney injury. J Clin Invest 2013;123(10):4423-34.

139. Paller MS, Hedlund BE. Role of iron in postischemic renal injury in the rat. Kidney Int 1988;34(4):474-80.

140. Zager RA, Johnson AC, Becker K. Acute unilateral ischemic renal injury induces progressive renal inflammation, lipid accumulation, histone modification, and "end-stage" kidney disease. Am J Physiol Renal Physiol 2011;301(6):F1334-45.

141. Erpicum P, Rowart P, Defraigne JO, Krzesinski JM, Jouret F. What we need to know about lipid-associated injury in case of renal ischemia-reperfusion. Am J Physiol Renal Physiol 2018;315(6):1714-19.

142. Zager RA, Andoh T, Bennett WM. Renal cholesterol accumulation: a durable response after acute and subacute renal insults. Am J Pathol 2001;159(2):743-52.

143. Johnson AC, Stahl A, Zager RA. Triglyceride accumulation in injured renal tubular cells: alterations in both synthetic and catabolic pathways. Kidney Int 2005;67(6):2196-209.

144. Mata-Miranda MM, Bernal-Barquero CE, Martinez-Cuazitl A, Guerrero-Robles CI, Sanchez-Monroy V, Rojas-Lopez M, et al. Nephroprotective effect of embryonic stem cells reducing lipid peroxidation in kidney ınjury ınduced by cisplatin. Oxid Med Cell Longev 2019;2019:5420624.

145. Zager RA, Burkhart K. Myoglobin toxicity in proximal human kidney cells: roles of Fe, Ca2+, H2O2, and terminal mitochondrial electron transport. Kidney Int 1997;51(3):728-38.

146. Guerrero-Hue M, García-Caballero C, Palomino-Antolín A, Rubio-Navarro A, Vázquez-Carballo C, Herencia C, et al. Curcumin reduces renal damage associated with rhabdomyolysis by decreasing ferroptosis-mediated cell death. FASEB J 2019;33(8):8961-75.

147. Long DA, Price KL, Ioffe E, Gannon CM, Gnudi L, White KE, et al. Angiopoietin-1 therapy enhances fibrosis and inflammation following folic acid-induced acute renal injury. Kidney Int 2008;74(3):300-9.

148. Schmidt U, Torhorst J, Huguenin M, Dubach UC. Acute renal failure after folate: NaK ATPase in isolated rat renal tubule. Ultramicrochemical and clinical studies. Eur J Clin Invest 1973;3(3):169-78.

149. Fink M, Henry M, Tange JD. Experimental folic acid nephropathy. Pathology 1987;19(2):143-9.

150. Baliga R, Zhang Z, Baliga M, Ueda N, Shah SV. In vitro and in vivo evidence suggesting a role for iron in cisplatin-induced nephrotoxicity. Kidney Int 1998;53(2):394-401.

151. Wang H, Nishiya K, Ito H, Hosokawa T, Hashimoto K, Moriki T. Iron deposition in renal biopsy specimens from patients with kidney diseases. Am J Kidney Dis 2001;38(5):1038-44.

152. Tamura K, Uneda K, Azushima K, Wakui H, Haruhara K. Possible therapeutic impact of the iron chelation on renal fibrosis. Hypertens Res 2015;38(7):455-6.

153. Naito Y, Fujii A, Sawada H, Oboshi M, Iwasaku T, Okuhara Y, et al. Association between renal iron accumulation and renal interstitial fibrosis in a rat model of chronic kidney disease. Hypertens Res 2015;38(7):463-70.

154. Ikeda Y, Ozono I, Tajima S, Imao M, Horinouchi Y, Izawa-Ishizawa Y, et al. Iron chelation by deferoxamine prevents renal interstitial fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction. PLoS One 2014;9(2):e89355.

155. Dai D, Chang Y, Chen Y, Chen S, Yu S, Guo X, et al. Visceral adiposity index and lipid accumulation product index: two alternate body indices to identify chronic kidney disease among the rural population in Northeast China. Int J Environ Res Public Health 2016;13(12):1231.

156. Yamagata K, Ishida K, Sairenchi T, Takahashi H, Ohba S, Shiigai T, et al. Risk factors for chronic kidney disease in a community-based population: a 10-year follow-up study. Kidney Int 2007;71(2):159-66.

157. Herman-Edelstein M, Scherzer P, Tobar A, Levi M, Gafter U. Altered renal lipid metabolism and renal lipid accumulation in human diabetic nephropathy. J Lipid Res 2014;55(3):561-72.

158. Vaziri ND, Bai Y, Ni Z, Quiroz Y, Pandian R, Rodriguez-Iturbe B. Intra-renal angiotensin II/AT1 receptor, oxidative stress, inflammation, and progressive injury in renal mass reduction. J Pharmacol Exp Ther 2007;323(1):85-93.

159. Kim HS, Ren G, Kim T, Bhatnagar S, Yang Q, Bahk YY, Kim JA. Metformin reduces saturated fatty acid-induced lipid accumulation and inflammatory response by restoration of autophagic flux in endothelial cells. Sci Rep 2020;10(1):13523.

160. Kim HJ, Moradi H, Yuan J, Norris K, Vaziri ND. Renal mass reduction results in accumulation of lipids and dysregulation of lipid regulatory proteins in the remnant kidney. Am J Physiol Renal Physiol 2009;296(6):1297-306.

161. Yamamoto T, Takabatake Y, Takahashi A, Kimura T, Namba T, Matsuda J, et al. High-fat diet-induced lysosomal dysfunction and impaired autophagic flux contribute to lipotoxicity in the kidney. J Am Soc Nephrol 2017;28(5):1534-51.

162. Datta D, Foley RJ, Wu R, Grady J, Scalise P. Renal function, weaning, and survival in patients with ventilator-dependent respiratory failure. J Intensive Care Med 2019;34(3):212-7.

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

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

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

166. Bancroft JD, Gamble M. Theory and Practice of Histological Techniques. 6th ed. China: Elsevier-Churchill Livingstone, 2008.

167. Orhan B. Ratlarda Fruktoz İle Oluşturulmuş Metabolik Sendrom Modelinde Enalaprilin Böbrek Fonksiyonları Üzerine Koruyucu Etkisi (tez). Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2016.

168. Bilim E. Diyet İçinde Fruktoz Verilmesinin Sıçanlarda Böbrek Fonksiyon Belirteçleri, Glukoz Taşıyıcıları, İnsülin Ve İnflamasyon Yolakları Üzerine Etkisinin İncelenmesi (tez). Ankara: Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü; 2019.

169. Wu WY, Wang ZX, Li TS, Ding XQ, Liu ZH, Yang J, et al. SSBP1 drives high fructose-induced glomerular podocyte ferroptosis via activating DNA-PK/p53 pathway. Redox Biol 2022;52:102303.

170. Kaya O, Erçetin D, Aydın MA, Sapmaz M. İstemli egzersizin sıçanlarda fruktozdan zengin beslenmeyle uyarılan böbrek fonksiyon bozukluğu ve oksidan durumu düzeltici etkisi. Uludağ Tıp Derg 2021;47(2):181-87.

171. Iskender H, Yenice G, Dokumacioglu E, Hayirli A, Sevim C, Dokumacioglu A, et al. Astaxanthin alleviates renal damage of rats on high fructose diet through modulating

NFκB/SIRT1 pathway and mitigating oxidative stress. Arch Physiol Biochem 2020;126(1):89-93.

172. Meerza D, Naseem I, Ahmed J. Effect of 1, 25$(OH)_2$ vitamin D_3 on glucose homeostasis and DNA damage in type 2 diabetic mice. J Diabetes Complications 2012;26(5):363-8.

173. Wollheim CB, Sharp GW. Regulation of insulin release by calcium. Physiol Rev 1981;61(4):914-73.

174. Sarnowski A, Gama RM, Dawson A, Mason H, Banerjee D. Hyperkalemia in chronic kidney disease: links, risks and management. Int J Nephrol Renovasc Dis 2022;15:215-28.

175. Latunde-Dada GO. Ferroptosis: Role of lipid peroxidation, iron and ferritinophagy. Biochim Biophys Acta Gen Subj 2017;1861(8):1893-1900.

176. Alkhairy S, Celi LA, Feng M, Zimolzak AJ. Acute kidney injury detection using refined and physiological-feature augmented urine output. [retraction in Sci Rep 2021;11(1):19561]. Sci Rep 2021;11(1):22249.

177. Flisiński M, Brymora A, Skoczylas-Makowska N, Stefańska A, Manitius J. Fructose-rich diet is a risk factor for metabolic syndrome, proximal tubule injury and urolithiasis in rats. Int J Mol Sci 2021;23(1):203.

178. Palanisamy N, Viswanathan P, Anuradha CV. Effect of genistein, a soy isoflavone, on whole body insulin sensitivity and renal damage induced by a high-fructose diet. Renal failure 2008;30(6):645-54.

179. Kizhner T, Werman MJ. Long-term fructose intake: biochemical consequences and altered renal histology in the male rat. Metabolism 2002;51(12):1538-47.

180. Gordish KL, Kassem KM, Ortiz PA, Beierwaltes WH. Moderate (20%) fructose-enriched diet stimulates salt-sensitive hypertension with increased salt retention and decreased renal nitric oxide. Physiol Rep 2017;5(7):e13162.

181. Wieliczko M, Matuszkiewicz-Rowińska J. Polyuria. Wiad Lek 2013;66(4):324-8.

182. Delanaye P, Cavalier E, Pottel H. Serum creatinine: not so simple! Nephron 2017;136(4):302-8.

183. Hayasaki T, Ishimoto T, Doke T, Hirayama A, Soga T, Furuhashi K, et al. Fructose increases the activity of sodium hydrogen exchanger in renal proximal tubules that is dependent on ketohexokinase. J Nutr Biochem 2019;71:54-62.

184. Soleimani, M. Dietary fructose, salt absorption and hypertension in metabolic syndrome: towards a new paradigm. Acta Physiol 2011;201:55-62.

185. Cabral PD, Hong NJ, Hye Khan MA, Ortiz PA, Beierwaltes WH, Imig JD, Garvin JL. Fructose stimulates Na/H exchange activity and sensitizes the proximal tubule to angiotensin II. Hypertension 2014;63(3):e68-73.

186. Brown IJ, Stamler J, Van Horn L, Robertson CE, Chan Q, Dyer AR, et al. International Study of Macro/Micronutrients and Blood Pressure Research Group. Sugar-sweetened beverage, sugar intake of individuals, and their blood pressure: international study of macro/micronutrients and blood pressure. Hypertension 2011;57(4):695-701.

187. Maithili Karpaga Selvi N, Sridhar MG, Swaminathan RP, Sripradha R. Curcumin attenuates oxidative stress and activation of redox-sensitive kinases in high fructose- and high-fat-fed male Wistar Rats. Sci Pharm 2014;83(1):159-75.

188. Chen L, Yang J, Zhao SJ, Li TS, Jiao RQ, Kong LD. Atractylodis rhizoma water extract attenuates fructose-induced glomerular injury in rats through anti-oxidation to inhibit TRPC6/p-CaMK4 signaling. Phytomedicine 2021;91:153643.

189. Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. Biochem Pharmacol 2003;66(8):1499-503.

190. Nandhini AT, Thirunavukkarasu V, Ravichandran MK, Anuradha CV. Effect of taurine on biomarkers of oxidative stress in tissues of fructose-fed insulin-resistant rats. Singapore Med J 2005;46(2):82-7.

191. Choi HN, Park YH, Kim JH, Kang MJ, Jeong SM, Kim HH, et al. Renoprotective and antioxidant effects of Saururus chinensis Baill in rats fed a high-fructose diet. Nutr Res Pract 2011;5(4):365-9.

192. Abdel-Kawi S, Hassanin K, Hashem K. The effect of high dietary fructose on the kidney of adult albino rats and the role of curcumin supplementation: A biochemical and histological study. Beni Suef Univ J Basic Appl Sci 2016;5:52-60.

193. Magtanong L, Mueller GD, Williams KJ, Billmann M, Chan K, Armenta DA, et al. Context-dependent regulation of ferroptosis sensitivity. Cell Chem Biol 2022;29(9):1409-1418.e6.

EKLER

EK-1

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

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Oturum Sayısı: 2021/10 **Karar Tarihi**: 27.10.2021
Karar No: 2021.10.03
Hayvan Sayısı ve Cinsi: Sıçan 32 adet

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi, Dr.Öğr.Üyesi Oktay KAYA'nın yaptığı, Arş.Gör.Dr.Ecem Büşra DEĞER'in uzmanlık tezi olarak planlanan,TÜHADYEK-32 protokol no'lu, **"Ferropitozisin yüksek fruktozlu beslenmeye bağlı böbrek işlev bozukluğundaki rolü"** başlıklı çalışma isteği görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri etik kurullarının çalışma usul ve esaslarına dair yönetmelik ve Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

EK-2