

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**KRONİK BÖBREK YETMEZLİĞİ HASTALARINDA
İNFLAMATUVAR DURUMUN BİYOKİMYASAL
DEĞERLENDİRMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. ESİN AVCI ÇİÇEK**

**DANIŞMAN
PROF.DR. SİMİN ROTA**

DENİZLİ - 2013

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**KRONİK BÖBREK YETMEZLİĞİ HASTALARINDA
İNFLAMATUVAR DURUMUN BİYOKİMYASAL
DEĞERLENDİRMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. ESİN AVCI ÇİÇEK**

**DANIŞMAN
PROF. DR. SİMİN ROTA**

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 01/10/2011 tarih ve 2011TPF031 proje nolu kararı ile desteklenmiştir.

DENİZLİ - 2013

Prof. Dr. Simin ROTA danışmanlığında Dr. ESİN AVCI ÇİÇEK tarafından yapılan “Kronik böbrek yetmezliği hastalarında inflamatuvar durumun biyokimyasal değerlendirmesi” başlıklı tez çalışması ... tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir

BAŞKAN: Prof. Dr. Süleyman Demir



ÜYE: Prof. Dr. Simin ROTA



ÜYE: Prof. Dr. Hülya AYBEK



Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.
20.1.05/2013

Prof. Dr. Mustafa KILINÇ

Pamukkale Üniversitesi

Tıp Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

Biyokimya Anabilim Dalında aldığım eğitimim boyunca ilgi ve desteğini aldığım, tez çalışmamın başlangıcından sonuna kadar her adımda bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım danışman hocam Prof. Dr. Simin ROTA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim süresince mesleki deneyimlerinden faydalandığım Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Bünyamin KAPTANOĞLU, Prof. Dr. Diler ASLAN'a, Prof. Dr. Süleyman DEMİR, Prof. Dr. Hülya AYBEK, Doç. Dr. Yaşar ENLİ'ye eğitimime yaptıkları katkılar için teşekkür ederim.

Eğitimim süresince birlikte görev yaptığım ve desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Dr. Dilek İREN EMEKLİ, Dr. Nergiz ZORBOZAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini, yardımlarını esirgemeyen merkez laboratuvarı biyokimya birimi personeline teşekkür ederim.

2011TPF031 nolu tez projemi destekleyen PAÜ Rektörlüğü Bilimsel araştırma Fonu'na teşekkür ederim.

Asistanlığım ve bütün hayatım boyunca beni yalnız bırakmayan, zor dönemlerimde desteklerini hiç esirgemeyen canım annem ve babam, destekleriyle bana yardımcı olan eşim ve hayatımın ışığı, biricik tatlı oğlum Sinan Süleyman; iyi ki varsınız...

İÇİNDEKİLER

SAYFA NO

ONAY SAYFASI.....	III
TEŞEKKÜR.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
KISALTMALAR.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	IX
ÖZET.....	X
ABSTRACT.....	XII
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	2
Kronik Böbrek Yetmezliğinin Tanımı.....	2
Böbrek Hasarının Patofizyolojisi.....	3
İnsidans ve Epidemiyoloji.....	4
Evrelendirme.....	6
İnflamasyon.....	6
Akut İnflamasyon.....	7
Kronik İnflamasyon.....	8
Hasta İle İlişkili Faktörler.....	9
Üremi.....	9
Volüm Yüklenmesi-Kalp Yetmezliği.....	9
Oksidatif Stres.....	10
İnfeksiyonlar.....	10
Kronik Böbrek Yetmezliğinde Kullanılan İnflamasyon Parametreleri	
CRP.....	10
IL-6.....	12
Hepsidin.....	13
NGAL.....	16
GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
BULGULAR.....	31
TARTIŞMA.....	38

SONUÇLAR.....	52
KAYNAKLAR.....	54

KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AHA	: Amerika Kalp Birliği “American Hearth Association”
CDC	: Hastalık Kontrol ve Önlem Merkezi “Central for Disease Control”
CHS	: Koroner Sağlık Çalışması “Coroner Health Study”
CRP	: C-reaktif protein
DM	: Diabetes Mellitus
DMT-1	: Divalan Metal Taşıyıcısı-1
ELISA	: Enzim Bağlı İmmünosorbant Yöntem
GFR	: Glomerüler Filtrasyon Hızı
HAMP	: Hepsidin Antimikrobiyal Peptid
hs-CRP	: Yüksek Duyarlıklı C-reaktif Protein
IL-6	: İnterlökin-6
JAK	: Janus Kinaz
KBY	: Kronik Böbrek Yetmezliği
KDOQI	: Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
KVS	: Kardiyovasküler Sistem
LEAP-1	:Karaciğerde Eksprese Edilen Antimikrobiyal Peptid “Liver-Expressed Antimicrobial Peptide 1”
MAPK	: Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz “Mitogen-activated Protein Kinase”
MDRD	: Modification of Diet in Renal Disease
NGAL	: Nötrofil Jelatinazla İlişkili Lipokalin
NHANES III	: Üçüncü Ulusal Sağlık ve Beslenme Araştırma Çalışması “The National Health and Nutrition Examination Survey III”
NKF	: Ulusal Böbrek Vakfı “National Kidney Foundation”
RT-PCR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SDBK	: Serbest demir bağlama kapasitesi
SDBY	: Son dönem böbrek yetmezliği
STAT	: Sinyal iletici ve transkripsiyonu aktive edici reseptör
Tfr-sat	: Transferrin satürasyonu
TDBK	: Total demir bağlama kapasitesi
VKİ	: Vücut kütle indeksi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1: Glomerüler ve tübüler hasar ve sonuçları	4
Şekil 2: Kronik İnflamasyonun Sistemik Etkileri	9
Şekil 3: CRP'nin kristal yapısı	11
Şekil 4: IL-6'nın kristal yapısının şekli	13
Şekil 5: Hepsidin omurga ve yan zincirleri yapısının gösterimi	14
Şekil 6: Demir yokluğu ve fazlalığında hepsidin rolü.....	15
Şekil 7: Hepsidin sentezinin düzenlenmesi	16
Şekil 8: NGAL'in kristal yapısı	17
Şekil 9: NGAL-aracılı demir düzenlenmesinin şematik gösterimi	18
Şekil 10: NGAL kalibrasyon eğrisi	24
Şekil 11: IL-6 kalibrasyon eğrisi.	26
Şekil 12: Hepsidin kalibrasyon eğrisi.....	28
Şekil 13: Pro-hepsidin kalibrasyon eğrisi.....	29

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1: Kronik böbrek yetmezliği tanı kriterleri-2002.....	2
Tablo 2: Kronik böbrek yetmezliği tanı kriterleri-2013.....	3
Tablo 3: Üremik semptomlar	3
Tablo 4: 2010 yılı sonu itibari ile RRT alan hastaların etiyolojik nedenlere göre dağılımı.	6
Tablo 5: Kronik böbrek yetmezliğinin evreleri.....	6
Tablo 6: Ölçülen analitlerin ölçüm yöntemleri ve ölçümde kullanılan cihazlar...	21
Tablo 7: NGAL çalışma basamakları	24
Tablo 8: IL-6 Çalışma basamakları.....	26
Tablo 9: Hepsidin Çalışma Basamakları.....	27
Tablo 10: Pro-hepsidin çalışma basamakları	29
Tablo 11: Çalışma gruplarının özelliklerinin, ölçülen analitlerin düzeylerinin ve hesaplamalı parametrelerin karşılaştırılması.....	31
Tablo 12: Kontrol grubu için korelasyon tablosu	35
Tablo 13: KBY grubu için korelasyon tablosu.....	36
Tablo 14: İnflamasyon parametrelerinin böbrek fonksiyon göstergeleri ile ilişkileri.....	50
Tablo 15: Hasta grubunda inflamasyon parametrelerinin demir, SDBK, TDBK ve Tfr sat. ile ilişkisi.....	51

ÖZET

Kronik böbrek yetmezliği hastalarında inflamatuvar durumun biyokimyasal değerlendirmesi

Dr. Esin AVCI ÇİÇEK

Etiyolojisinde diyabet, glomerülonefrit, hipertansiyon ve polikistik böbrek hastalıklarının yer aldığı ve dünya çapında önemli bir sağlık sorunu olan KBY’de iskemik, toksik ya da metabolik hasar ile nefronların geri dönüşümü olmayan kaybı söz konusudur. Hemodiyaliz, periton diyalizi ve böbrek nakli geçerli tedavi şekilleridir. Böbrek nakli en sık tercih edilen yöntemdir. Böbrek alıcıları, greft yetmezliği ve aldıkları ilaçların neden olduğu immün sistem baskılanması gibi nedenlerden dolayı KBY hastası gibi değerlendirilmektedirler.

Kronik böbrek yetmezliğinde en önemli ölüm nedeni KVS hastalıklarıdır. bu hastalarda görülen komplikasyonlar üremi, oksidatif stres ve sıvı yüklenmesi gibi nedenlerden kaynaklanmaktadır. Bu nedenlerin temelinde ise inflamasyon bulunmaktadır.

İnflamasyon KBY’nin ilk evrelerinden son dönemine kadar, hastalığın progresyonu ile doğru orantılı olarak artar. İnflamatuvar belirteçlerden olan, hs-CRP ve IL-6’nın inflamasyonu değerlendirmede etkin olduğu bilinmektedir ve serum düzeyleri kreatinin klirensinin azalmasına bağlı olarak artar.

Bilinen inflamasyon belirteçlerine ek olarak NGAL ve hepsidin inflamatuvar durumu değerlendirmede etkili olabileceği düşünülmektedir. Akut ve kronik böbrek yetmezliğinde Serum düzeyi artan NGAL, küçük demir taşıyan moleküllerin taşınmasında etkili olan lipokalin ailesine ait bir proteindir.

Demir metabolizmasının düzenleyicisi olan hepsidin ise IL-6 uyarısı ile karaciğerden sentezlenen bir akut faz proteindir. NGAL ve hepsidin inflamasyondaki rollerinin, böbrek fonksiyon kaybı, demir metabolizmasının veya da başka bir mekanizma üzerinden olup olmadıkları tartışma konusudur. Hepsidin ve NGAL’ın KBY’de birbirleri ile etkileşimi ile ilgili olarak çok az sayıda makale bulunmaktadır. Bu etkileşimin inflamasyonu açıklayabileceği hipotezi üzerine çalışmamız planlanmıştır.

Çalışmamıza kreatinin klirens (GFR) değerlerine göre tanı almış 163 kronik böbrek yetmezliği hastası (nakiller dahil) ve 81 gönüllü katılımcı alınmıştır. Tüm bireylerden alınan serumdan kreatinin, demir, SDBK, TDBK, IL-6, hs-CRP, hepsidin, pro-hepsidin ve NGAL düzeyleri çalışılmıştır.

Hepsidin, NGAL ve IL-6 düzeyleri hasta gruplarında kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Hasta grubunda inflamatuvar bir belirteç olan IL-6 ile hepsidin ve NGAL'ın korele olduğu görülmüştür. Hasta grubunda yapılan korelasyon analizine göre hepsidin ve NGAL birbirleri ile zayıf derecede koreledir. Yapılan çoklu regresyon analizine göre hepsidin için bağımsız belirteçler NGAL, IL-6 ve MDRD iken, NGAL için bağımsız belirteçler ise MDRD, IL-6, kreatinindir.

Sonuçlarımız KBY'de inflamasyon değerlendirmesinde NGAL ve hepsidin önemli olabileceği görüşünü desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: inflamasyon, hepsidin, NGAL

ABSTRACT

Evaluation of the inflammatory state in chronic kidney disease patients

Dr. Esin AVCI ÇİÇEK

In chronic kidney disease (CKD) a major public health problem worldwide with etiologic factors as diabetes mellitus, glomerulonephritis, hypertension and polycystic renal diseases, ischemic, toxic or metabolic damage resulting with irreversible nephron loss is the underlying mechanism. The current treatment modalities are hemodialysis, peritoneal dialysis and kidney transplantation. Kidney transplantation is the first choice among them. The kidney transplant recipients are evaluated as having CKD because of immune deficiency caused by the allograft failure and medications.

Cardiovascular diseases are the major cause of death in CKD patients. The complications are the results of uremia, oxidative stress and volume overload. The underlying reasons of the complications in these patients are mainly uremia, oxidative stress and volume overload which are the triggering factors for inflammation.

Inflammation is related with the progression of disease. IL-6 and hs-CRP are known to be used for the evaluation of inflammation and serum levels increase with decreased creatinin clearance.

NGAL and hepcidin are thought to be valuable in evaluation of inflammation in addition to the traditional inflammatory markers. NGAL, a member of lipocalin protein family carrying small iron transferring molecules increase in acute and chronic renal failure. Heparin which regulates iron metabolism is an acute phase protein synthesized by liver with the stimulation of IL-6. It is still not clear whether the role of NGAL and hepcidin in inflammation is related with the loss of renal function, iron metabolism or with another mechanism.

In our study 163 chronic kidney patients (including transplant patients) diagnosed by the creatinin clearance (GFR) levels and 81 healthy volunteers were included. Serum creatinin, iron, UIBC, TIBC, IL-6, hs-CRP, NGAL, hepcidin and pro-hepcidin levels were measured.

Serum hepcidin, NGAL and IL-6 levels were higher in patient groups compared to control group. In patient groups hepcidin and NGAL levels were correlated with inflammatory marker IL-6. In patient groups hepcidin was weakly correlated with NGAL. In multiple regression analysis; while NGAL, IL-6 and MDRD are independent variables of hepcidin, the independent variables of the NGAL were MDRD, IL-6 and creatinin.

Our results demonstrated that NGAL and hepcidin are may be valuable for the evaluation of inflammation in CKD.

Keywords:inflammation,hepcidin,NGAL

GİRİŞ

Kronik böbrek yetmezliği (KBY), toplumda görülme sıklığı giderek artan yüksek maliyetli ve kötü klinik sonuçları olan dünya çapında bir halk sağlığı problemidir (1,2). Yaş ortalamasının artması, tip II diyabet, hipertansiyon ve metabolik sendromun toplumda görülme sıklığının giderek artması KBY görülme sıklığının da artmasına neden olmaktadır.

Kronik böbrek yetmezliği hastaları, KVS hastalıkları nedeni ile artmış morbidite ve mortaliteye sahiptirler. Kardiyovasküler sistem hastalıklarının temelinde yatan kronik inflamasyonun varlığı, KBY'nin erken evrelerinden son dönem böbrek yetmezliğine kadar olan süreçte de kanıtlanmıştır. Oksidatif stres ve endotel disfonksiyonu ile birlikte inflamasyon da hızlanmış aterosklerozun ilerlemesine neden olmaktadır. İnflamasyonun varlığı aynı zamanda böbrek fonksiyonlarının bozulmasında kolaylaştırıcı bir etkidir ve anemi, eritropoetine cevapsızlık, yaşam kalitesinin azalması ve malnütrisyon/protein enerji açlığı gibi klinik sonuçlara yol açmaktadır (2,3).

İnflamasyon belirteçleri olan C-reaktif protein (CRP) ve interlökin-6 (IL-6) üremik hastalarda semptomatik olsun ya da olmasın kardiyovasküler hastalık riski için öngördürücü olarak kullanılmaktadır (2,4). Son yapılan çalışmalar ile birlikte klinik uygulamaya girmeye başlayan ve konak savunma proteinlerinden olan nötrofil jelatinazla ilişkili lipokalin (NGAL) demir taşıyıcı küçük molekülleri (siderofor) bağlayarak bakteriyel infeksiyon ve böbrek hasarında kritik rol oynamaktadır. Akut faz proteini ve antimikrobiyal bir peptid olan hepsidin, vücuttaki demir homeostazında düzenleyici etkisi bulunmaktadır. Hem hepsidin hem de NGAL'in KBY hastalarında yüksek saptanması, demir metabolizmasında olduğu gibi inflamasyonda da ortak bir yolağı kullandığı görüşünü ortaya koymaktadır (5).

Çalışmamızda kreatinin klirensi değerlerine göre tanı konulan hastalarda, görece yeni parametreler olan NGAL ve hepsidin, inflamasyon sürecindeki ortak etkileşimleri değerlendirilecektir. IL-6 ve yüksek duyarlılıklı CRP'ye (hs-CRP) göre daha özgün olabileceği belirtilen hepsidin ve NGAL'ın bu hastalıkta inflamasyon belirteci olarak kullanılabilmesi veya kullanılamayacağı ortak yolaktaki muhtemel ilişkiden yola çıkılarak ortaya konulmaya çalışılacaktır.

GENEL BİLGİLER:

Kronik Böbrek Yetmezliğinin Tanımı:

Kronik böbrek yetmezliği (KBY) birçok hastalığa bağlı olarak gelişebilen, nefronların ilerleyici ve geri dönüşümü mümkün olmayan kaybı ile karakterize patofizyolojik bir süreçtir. Glomerüler filtrasyon hızı (GFR) genellikle aylar ve/veya yıllar içinde giderek azalmaktadır. Azalma hızı, altta yatan nedenlere göre büyük değişiklik göstermektedir. Bu azalmanın sonucu olarak böbrek, sıvı-solüt ve metabolik-endokrin dengeleri ayarlama fonksiyonunu kaybetmektedir (1–5).

Kronik böbrek yetmezliği için ortak bir tanım kabul edilmiş ve çeşitli kılavuzlarda yayınlanmıştır (4–8). National Kidney Foundation/Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (NKF/KDOQI) kılavuzuna göre KBY tanı kriterleri (2002) tablo 1’de verilmiştir (5).

Tablo 1: Kronik böbrek yetmezliği tanı kriterleri (2002) (5)

<p>1. Azalmış veya normal GFR ile birlikte, ≥ 3 ay süren böbrek hasarı ile birlikte yapısal veya fonksiyonel böbrek patolojisinin</p> <p>a) Patolojik veri veya</p> <p>b) İdrar ya da kan testlerindeki bozukluklar ya da görüntüleme teknikleri ile belirlenen bozukluklar ile ortaya konması</p> <p>2. Böbrek hasarı olup olmamasına bakmaksızın GFR’nin ≥ 3 ay < 60 ml/dk/1.73 m² olması</p>
--

GFR: Glomerüler filtrasyon hızı

National Kidney Foundation/Kidney Disease Improving Global Outcomes (NKF-KDIGO) çalışmasının 2013 yılında yayınlanan kılavuzunda KBY tanı kriterleri daha geliştirilmiş olarak verilmiştir. Bu sınıflamaya göre böbrek nakli yapılmış hastalar da KBY sınıflamasına dahil edilmişlerdir. Tablo 2’de KBY’nin KDIGO çalışmasına göre kriterleri verilmiştir.

Tablo 2: Kronik Böbrek Yetmezliği tanı kriterleri (2013) (2)

KBY tanı kriterleri (herhangi birinin > 3 ay varlığı)	
Böbrek hasarı belirteçleri (bir ya da daha fazla)	<ul style="list-style-type: none"> a) Albuminüri (AER ≥ 30 mg/24 saat; ACR ≥ 30 mg/g [≥ 3mg/mmol]) b) İdrar sediment patolojileri c) Tübül hasara bağlı elektrolit ve diğer bozukluklar d) Histolojik patolojiler e) Görüntüleme ile saptanan yapısal bozukluklar f) Böbrek nakli hikayesi
Azalmış GFR	GFR < 60 ml/dk/1.73 m ²

AER: Albumin atılım oranı ACR: albumin kreatinin oranı GFR Glomerüler filtrasyon hızı

Hastaların semptom ve klinik bulguları altta yatan patoloji, böbrek yetmezliğinin gelişme hızı ve derecesi ile yakından ilişkilidir. Hastalardaki ilk semptomlar noktüri ve anemiye bağlı halsizliktir (9,10). Glomerüler filtrasyon hızı 20-25 ml/dk/1.73 m² olduğunda hastalarda Tablo 3'de örnek olarak verilen üremik semptomlar görülmeye başlamaktadır (1,2,4,5).

Tablo 3: Üremik semptomlar (1)

SİSTEM	BULGU
Sıvı-Elektrolit Bozuklukları	Hipovolemi, hipervolemi, hipernatremi, hiponatremi,
Sinir Sistemi	Stupor, koma, konuşma bozuklukları, uyku bozuklukları
Gastrointestinal Sistem	Hıçkırık, parotit, iştahsızlık, stomatit, pankreatit, ülser, bulantı
Hematoloji-İmmünoloji	Normokrom normositer anemi, eritrosit fragilitesinde artma
Kardiyovasküler	Perikardit, ödem, hipertansiyon, kardiyomiyopati
Pulmoner	Plevral sıvı, üremik akciğer, pulmoner ödem
Cilt	Kaşınıtı, gecikmiş yara iyileşmesi, solukluk, tırnak atrofisi
Metabolik-Endokrin-Kemik	Glukoz intoleransı, hiperlipidemi, hiperparatiroidi, üremik kemik

Böbrek Hasarının Patofizyolojisi

Böbrek hasarının ilk aşamasında kalp, beyin gibi diğer çok kanlanan dokulardan daha fazla kan akımı (yaklaşık 400 ml/100gr) böbreğe gelmektedir (7). Bunun sonucu olarak gerçekleşen hiperfiltrasyon, glomerül kapillerlerini hemodinamik hasara duyarlı hale getirir ve dolaşımda bulunan zararlı biyomolekül ve ilaçlar kan akımı ile böbreğe daha çok taşınacağından böbrek dokusu belirgin olarak zarar görür (7,11,12). Artan glomerüler basıncın glomerül membran bariyerini hasara uğratmasına bağlı olarak membran, negatif anyonik makromoleküllere karşı geçirgenlik kazanmaktadır. Bunun sonucunda, plazma proteinleri glomerüler filtrata

geçer ve proteinüri tablosu gelişir. Elektrolit, su, küçük molekül ağırlıklı yapıları içeren filtrat, büyük molekül ağırlıklı proteinleri de içeren anormal filtrat haline dönüşmüştür (7,12,13).

Nefron vaskülaritesinde oluşan ardışık yeni yapılanmalar (glomerüllerde kıvrılmalar ve peritubuler kapiller ağ oluşumu) ve glomerüllerden tübüllere doğru olan akım, glomerüler hasarın tübülointerstisyel alana da yayılmasını kolaylaştırır ve tübüler epitel hücreleri de anormal filtrata maruz kalırlar (7). Glomerüllerde oluşan inflamatuvar reaksiyon sonucu ortaya çıkan sitokinler, büyüme faktörleri gibi bazı mediyatörler (7,14), glomerüler dolaşımın temeli olan peritübüler dolaşımı bozarak glomerüllerde interstisyel hasarı başlatır. Bunun yanında glomerüler perfüzyondaki en ufak bir artış, peritübüler kan akımında azalmaya neden olmaktadır. Böylece hasarlı nefron, renal hastalıkların patofizyolojisinde rol oynayan halini almış olmaktadır (7,15).

Glomerüler endotel, mezanşiyal, visseral ve pariyetal epitel hücreleri, podositler ve bu hücrelerin ekstraselüler matriksleri nefronun temel bileşenleridir. Bu bileşenlerin herhangi birinde oluşan hücre-hücre komşuluğu veya kemokin, sitokin, büyüme faktörleri gibi mediyatörler ile diğer bileşende de hasar oluşturur (7).

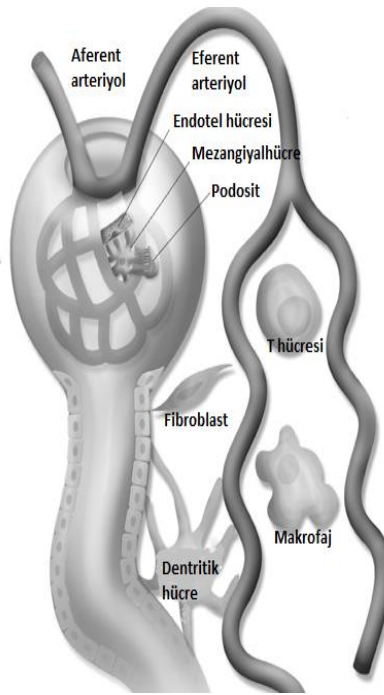
Glomerüler ve tübüler hasarın nedenleri ve sonuçları şekil 1'de gösterilmektedir.

Glomerüler hasarın nedenleri:

- İntrakapiller hipertansiyon;
- İmmünolojik hasar;
- Metabolik hasar: glukoz, lipitler, paraproteinler;
- Genetik bozukluklar

Glomerüler hasarın sonuçları:

- Büyüme faktörlerinin azlığı;
- Bozulmuş hücre-matriks etkileşimleri;
- Mezanşiyal matriks ve bazal membran genişlemesi;
- Mezanşiyal ve endotel hücrelerinin proliferasyonu ya da kaybı;
- Podosit biyolojisinde değişiklikler;
- Podositlerin kaybı;
- Seçicilikte bozulma ve proteinüri;
- Kan akımı ve glomerüler kapiller alanda azalma



Tübüler Hasarın Nedenleri:

- Toksik ya da metabolik hasar: glukoz, lipitler, kompleman faktörleri, sitokinler, proteinler,
- İskemi/hipoksi

Tübüler hasarın sonuçları:

- Endoplazmik retikulum stresi;
- Reaktif oksijen radikali yapımı;
- İnflamasyon mediyatörlerinin yapımı;
- Sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin bozulmuş yapımı;
- Ekstraselüler matriks döngüsündeki değişiklikler.

Şekil 1: Glomerüler ve tübüler hasar ve sonuçları (7)

İnsidans ve Epidemiyoloji:

Kronik böbrek yetmezliği tüm dünyada yaygın hale gelmiş, önemli bir sağlık sorunudur. Batı ülkelerinde erişkin toplumun %10-15'ini etkileyen bu hastalık, tedavi maliyetlerinin giderek artmasına neden olmaktadır. Üçüncü Ulusal Sağlık ve Beslenme Araştırma Çalışması [The National Health and Nutrition Examination Survey III (NHANES III)] ve NKF raporuna göre Amerika Birleşik Devletlerinde (ABD) yaklaşık 26 milyon kişi KBY tanısı almış ve 20 milyon kişi ise başka hastalıklar nedeni ile KBY riski taşımaktadır (4–9,16–22).

Kronik böbrek yetmezliğinin en sık görüldüğü ülkeler Meksika, Tayvan, Japonya ve ABD'dir. Kırkdan fazla ülke ve bölgede yapılan araştırmalara göre Türkiye ilk 10 arasına girmektedir (8).

Türkiye'de yılda ortalama 15000 hastaya son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) tanısı konmaktadır ve prevalansı %15,7'dir (6,23). Türk Nefroloji Derneği'nin kayıtlarına göre Aralık 2010'da renal replasman tedavisi (RRT) gerektiren SDBY nokta prevalansı, milyon nüfus başına (çocuk hastalar dahil) 853 olarak saptanmıştır (6). Renal replasman tedavi insidansı ise 264 olarak hesaplanmıştır. (6).

Son dönem böbrek yetmezliği hastalarına RRT uygulanmaktadır (4–9, 24, 25). Hemodiyaliz ülkemizde en sık uygulanan RRT yöntemidir (6). Bunu izleyen diğer RRT yöntemleri ise periton diyalizi (24) ve böbrek naklidir (26,27). Böbrek nakli, her iki yonteme göre hem maliyet hem de uzun dönem sağ kalım açısından avantajlıdır. Ülkemizde böbrek nakli sayısı önceki yıllara göre artsa da kadavra vericilerinde istenilen artış olamamaktadır (6,26).

Kronik böbrek yetmezliğinde değişik etiyolojiler etken olmaktadır. Türk Nefroloji Derneği'nin 2010 yılı kayıt verilerine göre ülkemizdeki bir yıllık dönemde KBY hastalarının etiyolojileri tablo 2 de gösterilmiştir (6).

Tablo 4: 2010 yılı sonu itibari ile RRT alan hastaların etiyolojik nedenlere göre dağılımı (6)

Tanı		n	%
DM	Tip 1 DM	1744	4,4
	Tip 2 DM	10252	26,1
Hipertansiyon		10681	27,2
Glomerülo nefrit		2939	7,5
Polikistik böbrek hastalıkları		1930	4,9
Pyelonefrit		1236	3,2
Amiloidoz		806	2,1
Renal vasküler hastalık		319	0,8
Diğer		3562	9,1
Etiyolojisi bilinmeyen		5376	9,1
Kayıp (bilgi yok)		392	1,0

Kronik böbrek yetmezliği hastaları, normal topluma göre kardiyovasküler sistem (KVS) hastalıkları nedeniyle artmış ölüm riski taşımaktadırlar (4–9,16,18,19,21,22,28–31). Güney Amerika’da RRT alan hastaların yarısı KVS hastalıkları, Hong Kong’da ise yaklaşık %30-40’ı infeksiyon nedeni ile yaşamlarını kaybetmektedir (8). Ülkemizde ise en sık rastlanan ölüm nedeni kardiyovasküler hastalıklardır (%53.0). Bunu malignite, serebrovasküler hastalık ve infeksiyonlar izlemektedir (6).

Evrelendirme:

Kronik böbrek yetmezliğinin evrelendirmesi, böbrek fonksiyonunun derecesine göre NKF/KDOQI ve KDIGO kılavuzlarında belirtilen kriterlere göre yapılmaktadır (5).

Tablo 5: Kronik böbrek yetmezliğinin evreleri (2,4, 5, 9)

Evre	Tanım	GFR (ml/dk/1.73 m ²)
I	Normal GFR ile birlikte böbrek hasarı varlığı	≥90
II	Hafif azalmış GFR ile birlikte böbrek hasarı	60–89
III	Orta derecede azalmış GFR	30–59
IV	Ciddi azalmış GFR	15–29
V	Böbrek yetmezliği veya diyaliz	< 15

İnflamasyon

İnflamasyon, travma, enfeksiyöz ajanlar ve toksik ürünleri, kimyasal maddeler, sıcak-soğuk gibi fiziksel etkenler, immün cevap ve iskemi gibi uyarıların başlattığı ve dokuya zarar veren etkenin ortadan kaldırılıp, dokunun onarımını hedef alan fizyopatolojik bir süreçtir (32-38). İnflamasyon, hücre zedelenmesini ortadan kaldırırken, hücresel zedelenme sonucu oluşan nekrotik hücreleri ve dokuları da ortamdan uzaklaştırarak dokunun yeniden yapılanmasını ve iyileşmesini başlatır (32, 35, 36). İnflamasyon, akut ve kronik inflamasyon olarak ikiye ayrılır (32, 34).

Akut inflamasyon:

Birkaç dakika ile birkaç gün içinde sonlanan kısa süreli inflamasyondur. Kızarıklık, ısı artışı, ağrı, şişme ve fonksiyon kaybı ile kendini gösterir. Vasküler ve hücresel değişiklikler ile karakterizedir (32, 33, 35, 37).

İnflamasyonun önemli komponentleri hemodinamik değişiklikler, polimorfonükleer lökosit infiltrasyonu (34) ve inflamatuvar mediyatörlerin (örn. prostoglandinler) (37) salgılanmasıdır. Kompleman, kininler, pıhtılaşma faktörleri, plazma kökenli mediyatörler ile, birçok hücre tarafından lokal olarak üretilen histamin, araşidonik asit metabolitleri, sitokinler, nitrik oksit, serbest oksijen radikalleri, lizozomal enzimler gibi kimyasal mediyatörler inflamasyondaki semptomlardan ve doku hasarının sınırlandırılmasından sorumlu tutulmuşlardır.

Uygun olmayan adaptasyon mekanizması olarak düşünülen bu cevabın aslında, hasar kaynaklarının ortadan kaldırılması ve iyileşmeyi başlatıcı etkisi bulunmaktadır. İnflamasyon olmadan, yara iyileşmesi ve infeksiyonun ortadan kalkması gecikir veya başlamaz, bu da ilerleyici hasar ile sonuçlanır. İnflamasyon engellendiğinde belirgin doku yıkımı ortaya çıkar. Bu nedenle iç ve dış uyarılara karşı inflamatuvar cevabın belirli bir dengede olması gerekmektedir. Oluşan akut inflamasyon, karşıt düzenleyici mekanizmalar devreye girene kadar devam eder (36,37).

Hasarın şiddeti, yeri, etkilenen doku ve konağın yanıt oluşturabilme yeteneğine göre akut inflamasyonun seyri değişse de genellikle aşağıda belirtilenlerden herhangi biri ile sonlanır (32, 36, 37, 38).

1.Tam iyileşme: Zedelenme sınırlı veya kısa süreli, doku hasarı az ve dokunun rejenerasyon yeteneği var ise en çok iyileşme ile sonuçlanır.

2.Skar oluşumu veya fibrozis: İnflamasyon rejenere olmayan bir dokuda ise veya belirli miktarda doku kaybı var ise skar dokusu oluşur ve fibrötik bir doku oluşumu ile sonuçlanır.

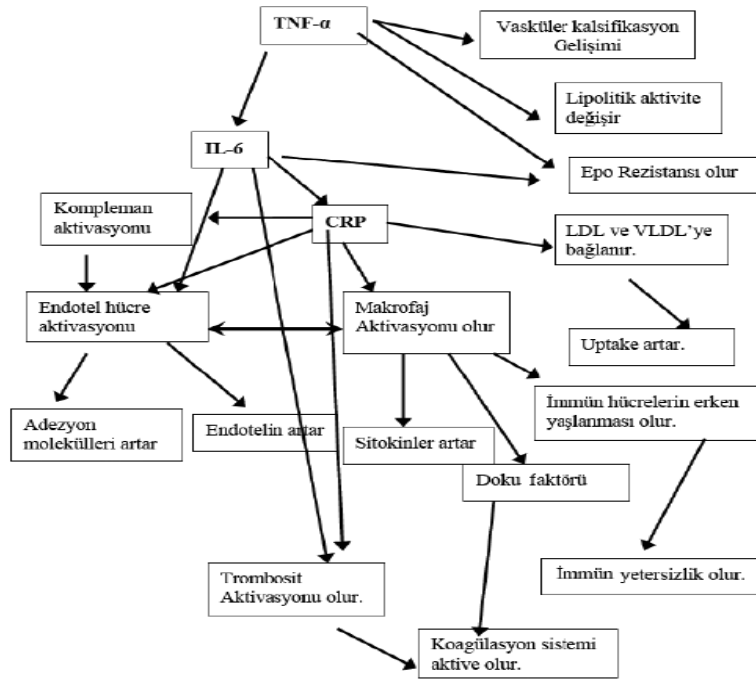
3.Apse oluşumu: Bazı bakteriyel ve fungal infeksiyonlarda meydana gelir.

4.Kronik inflamasyona ilerleme

Kronik İnflamasyon:

Akut inflamasyon ve iyileşme sürecinin birlikte görüldüğü, uzun süreli bir inflamasyon olarak kabul edilir (38). Kronik inflamasyonun hücreleri makrofajlar, lenfositler ve plazma hücreleridir. Kronik inflamasyonda dokuda pro-inflamatuvar mediyatörler birikerek, immün ve vasküler sistemi de içine alan sistemik inflamatuvar yanıtı tetikler. Eş zamanlı olarak farklı mediyatörler (IL-6 vb.) aracılığı ile doku tamiri de gerçekleşmektedir (32, 39, 40, 41).

Kronik böbrek yetmezliği olan hastalar kronik inflamatuvar bir süreçtedirler (42). İnflamasyon, renal hasarın ilerlemesine ve bununla ilişkili olarak anemi, kas kaybı, malnütrisyon, KVS hastalıkları gibi komplikasyonların gelişmesine neden olmaktadır (17,42,43). Şekil 2’de kronik inflamasyonun sistemik etkileri gösterilmektedir.



Şekil 2: Kronik İnflamasyonun Sistemik Etkileri (43)
Epo: Eritropoetin

Bu hastalarda inflamasyonu tetikleyici birçok faktör bulunmaktadır. Tetikleyici etkenlerin arasında altta yatan hastalık, üremi, oksidatif stres, artmış infeksiyon insidansı ve diyaliz tedavisinden kaynaklanan problemler yer almaktadır. Bu faktörler üremik durumu ve buna bağlı olarak inflamasyonun yerleşmesine neden olur (44).

Hasta ile ilişkili faktörler:

Kardiyovasküler sistem hastalıkları, diyabet gibi eşlik eden kronik/metabolik hastalıklar, ilerlemiş yaş inflamasyonun ilerlemesine yardımcı olmaktadır (44). Kronik böbrek yetmezliği hastalarında, infeksiyon insidansındaki artış, eşlik eden diğer hastalıklardan dolayı azalmış immün cevap ve üremiden de kaynaklanmaktadır (45). Kronik böbrek yetmezliği hastalarında eşlik eden hastalıkların sonucu olarak sıklıkla azalmış fiziksel aktivite ve sedanter yaşam görülür. Bu da kronik inflamasyonun gelişmesine ve devamına yardımcı olmaktadır (44,46).

Üremi:

Kronik böbrek yetmezliğinde oksidatif stres ve inflamasyonun ilerlemesindeki etkenlerden biri de üremik metabolitlerin birikimidir. Üremi, (azotemi) protein ve amino asit metabolizmasının son ürünü olan nitrojenin kanda fazla birikmesi olarak tanımlanabilir. Üremik metabolitler ya da toksinler, sağlıklı bireylerde böbrekler tarafından vücuttan uzaklaştırılmaktadır. Ancak KBY'li hastalarda klirens bozulduğundan dolayı atım gerçekleştirilemez ve kanda üre miktarı artar (47).

Üremik toksinlerin kanda birikimi böbrek fonksiyon kaybının daha da hızlanmasına yol açmaktadır (48). İndoksil sülfat ve p-kresil sülfat üremik toksinlerdendir. İndoksil sülfat glomerüler sklerozu ve tübülointerstisyel fibrozisi, inflamatuvar mediyatörler ve kemokinler aracılığı ile artırmaktadır. P-kresil sülfat ise vasküler hasarı lökositlerin ve endotelial toksinlerin inflamasyon alanında artmasına neden olarak glomerüler ve tübüler hasarı ilerletmektedir (49,50).

Volüm Yüklenmesi – Kalp Yetmezliği:

Renal replasman tedavisi alan SDBY olan hastalarında fazla hidrasyon ve sodyum retansiyonu, plazma endotoksin ve sitokin düzeylerini yükselterek, damar hasarını artırarak inflamasyonu ilerletmektedir. Diüretikler ile tedavi sonrası endotoksin düzeylerinin hızla gerilediği saptanmıştır (44).

Oksidatif stres:

Kronik böbrek yetmezliğinde prooksidan ve antioksidan faktörlerin arasındaki dengedeki bozukluk sonucu, reaktif oksijen türlerinin üretim ve yıkımı arasındaki oran bozulmuştur. Artmış reaktif oksijen türlerinin düzeyleri sonuçta oksidatif strese neden olur. Reaktif oksijen ürünleri arasında süperoksit anyonları, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri yer almaktadır. Reaktif oksijen türlerinin protein, lipit ve nükleik asitler ile etkileşerek oluşturduğu hücrel hasar, doku fonksiyonu ve yapısı üzerine olumsuz etkiler ile sonuçlanır (44,51).

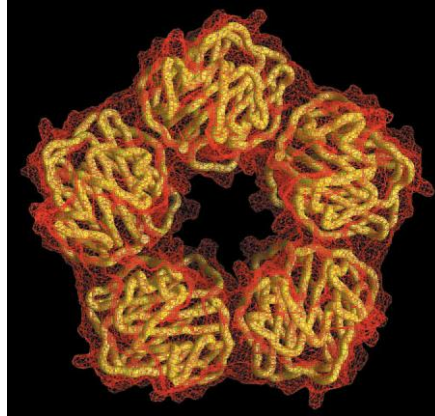
İnfeksiyonlar:

Kronik böbrek yetmezliğinde, fagositoz, B ve T hücre yanıtında azalma gibi önemli immün defektler bulunmaktadır. Akciğer, barsak, periton, üriner sistem ve cilt infeksiyonlarının insidansı artmıştır. Artmış infeksiyon insidansı inflamatuvar sürecin hızlanmasına ve ek hastalıkların gelişmesine neden olmaktadır (44,52).

Kronik Böbrek Yetmezliğinde Kullanılan İnflamasyon Parametreleri

C-Reaktif protein (CRP)

C-reaktif protein, kalsiyum bağımlı ligand bağlayıcı plazma proteinlerinden pentraksin ailesinin bir üyesidir (54). Moleküler büyüklüğü 120 kilo daltondur (kDa). İnsan CRP molekülü, beş adet büyüklüğü benzer polipeptid alt ünitesinden oluşur (55). Her bir polipeptid ünitesi 206 aminoasit kalıntısı içerir. Bu beş protomer kovalent olmayan bağlar ile halkasal biçimde bağlanarak pentamerik simetri oluştururlar. Her bir protomer iki katlı β tabakadan oluşan tipik “lektin kıvrımı” içermektedir. İki kalsiyum iyonunun bağlandığı spirallerden oluşan ligand bağlayıcı bölüm konkav yüzde yerleşmiştir. Diğer yüzde bir tek α heliks bulunmaktadır (54, 55, 56). Şekil 3’te her bir protomerin ligand bağlayıcı yerindeki iki kalsiyum atomu ve lektin kıvrımlarını gösteren kristal yapının şerit diyagramı yer almaktadır.



Şekil 3: CRP'nin kristal yapısı (55)

C-reaktif protein'in plazma yarı ömrü yaklaşık 19 saattir (56,57). C-reaktif protein, çoğunlukla IL-6'nın transkripsiyonel kontrolünde muhtemelen sadece hepatositlerden salgılanmaktadır (56,58). Karaciğerde yeni CRP sentezi tek bir uyarı

sonrası hızla başlar, yaklaşık altı saatte serum düzeyleri 5 mg/L üzerine çıkar ve 48 saat sonra da en yüksek düzeye yükselir. Sağlıklı bireylerde beklenen CRP düzeyi <0,5 mg/L'dir (54–58).

Sistemik inflamasyona yanıt veren duyarlı, özgül olmayan bir akut faz reaktanıdır (55). Enfeksiyon ve doku hasarının sistemik bir belirteci olarak kullanılmaktadır. İnflamatuvar hastalıkta artacak olan serumda ilk yükselen akut faz proteinlerinden ve aynı zamanda en dramatik düzey artışı gösterenlerden biridir. Serum CRP düzeyi inflamatuvar, enfeksiyöz ve neoplastik hastalıklarda hastalık aktivitesi ve tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde kullanışlı bir biyolojik belirteçtir (54–59). Artmış CRP düzeyleri kronik böbrek hastalarında yüksek kardiyovasküler hastalık riskini göstermektedir (58,59).

Klinik laboratuvarlarda CRP ölçümlerinde kullanılan testlere göre, daha düşük düzeylerde CRP düzeylerini ölçebilen, yüksek duyarlıklı (hsCRP) testlerin geliştirilmesi, inflamasyon düzeyi düşük olan hastaların da saptanabilmesine (60) ve bu proteinin ateroskleroz gibi kronik hastalıkların inflamatuvar yapısının araştırılmasında giderek artan oranda kullanılmasına olanak sağlamıştır (61, 62).

Hastalık Kontrol ve Önlem Merkezi ve Amerikan Kalp Birliği'nin (CDC/AHA) Ocak 2003 tarihli raporunda, risk tahmininde evrensel olarak kullanılan hsCRP için bir dizi klinik kılavuz yayınlamıştır (63). Bu kılavuza göre; <1 mg/L düşük, 1–3 mg/L orta ve ≥ 3 mg/L yüksek vasküler risk olarak değerlendirilmiştir (61).

Subklinik inflamasyonu belirlemek ölçülen hsCRP immünoradyometrik, immünonefelometrik ve immünotürbidimetrik yöntemler ile ölçülebilmektedir (62).

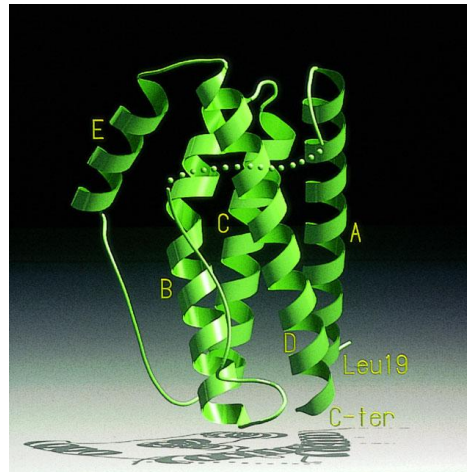
Sistemik inflamatuvar durumların yanında; boy, vücut kütle indeksi, diyabet, sigara ve alkol tüketimi gibi özelliklerin de hsCRP düzeyini etkilediği bilinmektedir. Bu nedenle hsCRP düzeyleri yorumlanırken bu özellikler göz önüne alınmalıdır (61,64).

IL–6:

IL–6, ağırlığı 20 ile 29 kDa (65,66) arasında değişen, 184 aminoasitten oluşan (67) pro-inflamatuvar bir sitokindir (68,40). Hematopoez, inflamasyon ve onkogenez gibi süreçlerde de rol alır (69, 70, 71).

IL-6, T hücreleri ve makrofajlar başta olmak üzere lenfoid ve lenfoid olmayan hücrelerce üretilmektedir (32, 65, 70, 71). Enfeksiyon süresince, travma sonrası, inflamasyona bağlı doku hasarı ve yanık gibi durumlarda düzeyi belirgin olarak artmaktadır (71).

IL-6'nın moleküler yapısı tam olarak bilinmemektedir (65,70). Kristal yapıya sahip molekül, diğer sitokinlerden farklı olarak dört heliks demetinden oluşmaktadır. Bu dört heliks arasında hidrofobik etkileşimleri sağlayan bir kor bulunur. A ve B aynı yönde, C ve D ise ters yönde konumlanmışlardır. Heliksler arası bağlantı E parçası ile gerçekleşmektedir. N-terminal kısmı 18 aminoasitten oluşup elektron dansitesi görüntülenemezken, iki adet C-terminal parçası ise iyi görüntülenebilir ve Gln183 ve Met184'den oluşmaktadır (69,70). IL-6'nın 4 ana heliks yapısı A, B, C ve D olarak adlandırılmıştır. Son uzun parçadaki ekstra heliks yapısı E olarak adlandırılmıştır. Şekil 4'te kristal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 4: IL-6'nın kristal yapısının şekli (65,70)

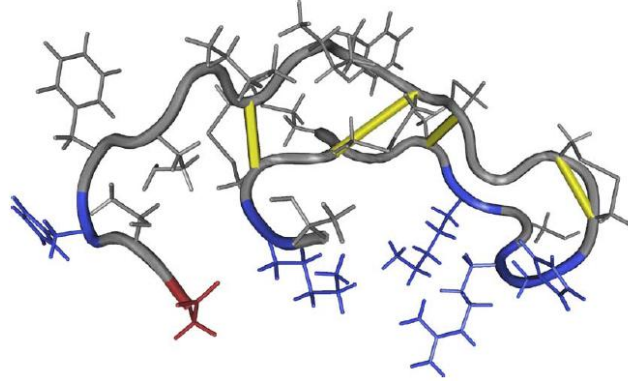
IL-6, inflamasyon sürecinde hepatik akut faz protein cevabının temel düzenleyicisidir. IL-6 artışı, iki ana akut faz proteini olan CRP ve serum amiloid A'nın 1000 kat kadar artmasına neden olmaktadır (72). Sağlıklı kişilerde IL-6 düzeyi genellikle 1 pg/ml altında bulunur. IL-6 etkisini spesifik IL-6 reseptör ve gp 130 olarak adlandırılan alt ünitesinden oluşan reseptör kompleksi üzerinden JAK/STAT ve MAPK aktivasyonu ile göstermektedir (65,71, 72).

IL-6 kronik inflamasyonda anahtar rol oynamaktadır (69, 71, 72). Böbrek fonksiyon kaybı nedeniyle kanda yükselmiş IL-6 düzeyleri, SDBY hastalarında

kardiyovasküler hastalıklar için risk faktörüdür (68,73). Ayrıca böbrek nakline akut rejeksiyon izleminde de kullanılan immün belirteçlerdendir (66).

HEPSİDİN:

İlk olarak insan idrar ve plazmasında tanımlanan hepsidin, sekiz sistin kalıntısı ve dört çapraz disülfid bağı içeren 25 aminoasitten oluşan ve karaciğerde sentezlenen katyonik bir peptiddir (74). Karaciğerde sentezlendiği (75) ve antimikrobiyal etkileri bulunduğundan dolayı karaciğerde sentezlenen antimikrobiyal peptid-1 (LEAP-1) olarak da adlandırılmıştır (76). Serumda biyolojik olarak aktif halde bulunan 25 aminoasitlik (74,77) formuna ek olarak idrarda yıkımından elde edilen 20 ve 22 aminoasitlik formları da bulunur (79). Hepsidin antimikrobiyal peptid (HAMP) adı verilen gen tarafından kodlanmaktadır (75, 74). İdrar hepsidini β -katmanından zengindir ve dört disülfid bağı ile stabilize, basit bir saç tokasına benzetilmektedir (79,80). Şekil 5'te nükleer manyetik rezonans ile elde edilen hepsidin yapısal görüntüsü verilmiştir.



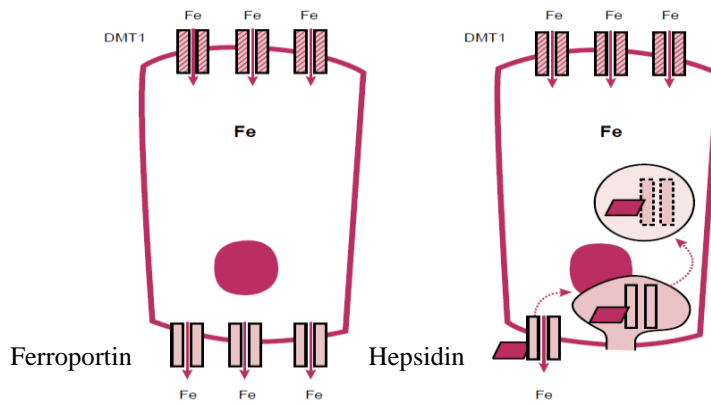
Şekil 5: Hepsidin omurga ve yan zincirleri yapısının gösterimi (80)

Hepsidin daha çok karaciğerde, ancak küçük miktarlarda da olsa böbrek, kalp, iskelet kası ve beyinde de sentezlenmektedir (76). Böbrekler sadece sentezinde değil vücuttan atılımında da etkindir (76,82). Hepsidin, tübüllerdeki epitel hücrelerinde ve toplayıcı kanallarda intrinsik bir peptid olarak sentezlenir ve idrara verilir (74). Renal tübüler sistemdeki hepsidin, demir düzenleyici rolünü demir taşıyıcı protein olan divalan metal taşıyıcısı-1 (DMT-1) ile etkileşerek gerçekleştirmektedir. Divalan

metal taşıyıcısı-1 (DMT-1) sentezinin, hepsidin sentezinin gerçekleştiği bölgelerde etkin olduğu görülmektedir (79).

Hepsidin, demirin intestinal emilimi ve vücuttaki dağılımını kontrol eden anahtar düzenleyici bir proteindir (74-82). Hücre tipine bağlı olarak demir birçok farklı yollarla hücre içine alınmaktadır (79). Diyetle bulunan biyolojik olarak kullanılabilir demir ferrik (Fe^{3+}) formu ya da hem formunda bulunmaktadır (75). Ferrik formundaki demirin alınımı ferrik redüktaz (duedonal sitokrom B) ile gerçekleşmektedir. Demir daha sonra ferröz (Fe^{2+}) forma indirgenir, DMT-1 demiri hücre içine alır (79). Sitoplazmada demir ferritine bağlı olarak depolanır. Farklı hücre tiplerinde (enterosit, makrofaj, hepatosit, plasental trofoblast) demirin hücre dışına gönderilmesi ferroportin ile gerçekleşir. Ferroksidaz (hepastin enterositlerde ve makrofajlarda seruloplazmin) ferrik demirin transferrine verilmesinde gereklidir (75,79).

Organizmada demir düzeyi yeterli ya da gereksinimden fazla olduğunda karaciğer hepsidin üretimine başlar. Hepsidin, ferroportini direkt bağlar, internalize eder ve enterositlerden plazmaya demir transferini bloke eder. Demir depoları azaldığında, hepsidin üretimi baskılanır, ferroportin enterositlerin bazolateral membranında demiri enterositlerin sitoplazmasından plazma transferrinine taşır (74-82). Şekil 6'da demirin enterosite alım ve dolaşıma verilmiş mekanizma şematize edilmiştir.

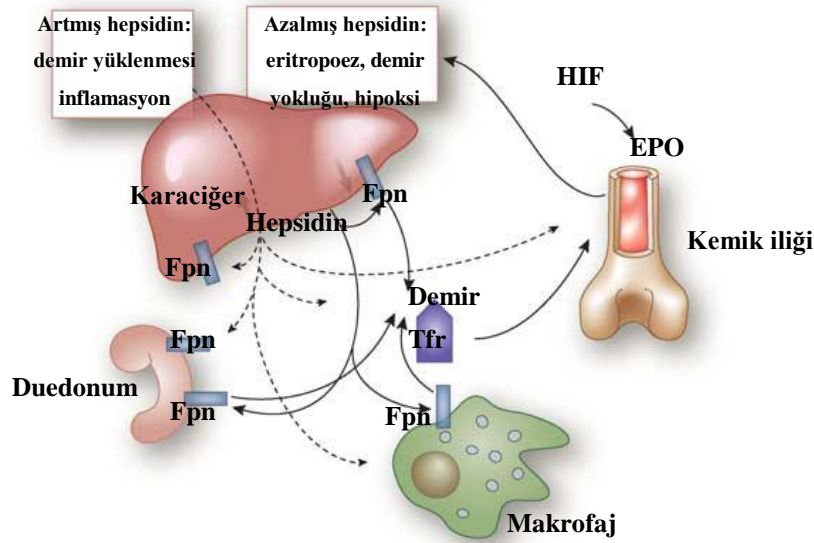


Şekil 6: Demir yoksunluğu ve fazlalığında hepsidin rolü (79)

Hepsidin sentezi, hipoksi, anemi, demir tedavisi (76) ve vücut demir depolarının durumu (76), infeksiyon ve inflamasyon ile düzenlenir (74, 75, 76, 79-82).

Hepsidin promoteri, hipoksi ile indüklenebilen faktör (HIF) için birçok bağlanma bölgesi içermektedir (74, 76, 79, 82). Oksijene duyarlı düzenlenme yolağı aracılığı ile hepsidin hipoksik düzenlenmesinde bu bölgenin transkripsiyonu gerçekleşir. (79, 81, 82). Anemide ise hepsidin düzeyi daha fazla demirin kullanılabilir olması için azaltılır, hepatosit ve makrofajlardaki depo demir ve diyetdeki demir kullanılmaya başlanmaktadır (79). Kronik hastalık anemisinin gelişiminde hepsidin anahtar rol oynamaktadır (76).

Hepsidin sentezi, inflamasyonda, IL-6'nın gp130 reseptörüne bağlanıp, JAK ve STAT3'ü aktive etmesi ile proksimal hepsidin promoteri indüklenerek artar (82). Artan hepsidin düzeyleri ile organizmada toksik reaksiyonları katalizleyen demir hücre içinde tutulur (79, 80, 82). Şekil 7'de demir varlığı ve inflamasyon durumunda karaciğerde hepsidin yapımı edilmiştir.



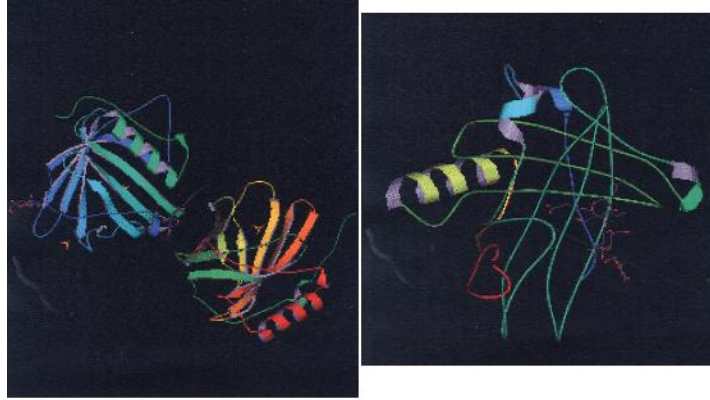
Şekil 7: Hepsidin sentezinin düzenlenmesi (74)

Fpn (ferroportin), HIF (Hipoksi ile indüklenebilen faktör), EPO (Eritropoetin)

NGAL:

Nötrofil jelatinazla ilişkili lipokalin (insan nötrofil lipokalini, lipokalin-2, siderokalin, 24p3, LCN2, NGAL) 25 kd (83) ağırlığında, α_1 -mikroglobulin, retinol bağlayıcı protein-4, prostaglandin D sentaz ve nitroforinleri de içeren (83,89) lipokalin protein ailesinin üyesi küçük bir moleküldür (84-89). Bu proteinler hidrofobik molekülleri bağlama ve taşımada görev almaktadırlar (83,84, 85).

Lipokalinler, kaliks yapısına benzeyen β -silindir kompleksinde 8 adet β -iplikçikten oluşan moleküler bir yapıya sahiptirler. Bu yapı lipokalinlerin bağlama bölgesini oluşturmaktadır (89). Nötrofillerden izole edilen NGAL, MMP-9'a bağlı olarak bulunmaktadır (90). NGAL'in dimer (nötrofilde) ve monomer (idrarda) formları şekil 8'de verilmiştir.



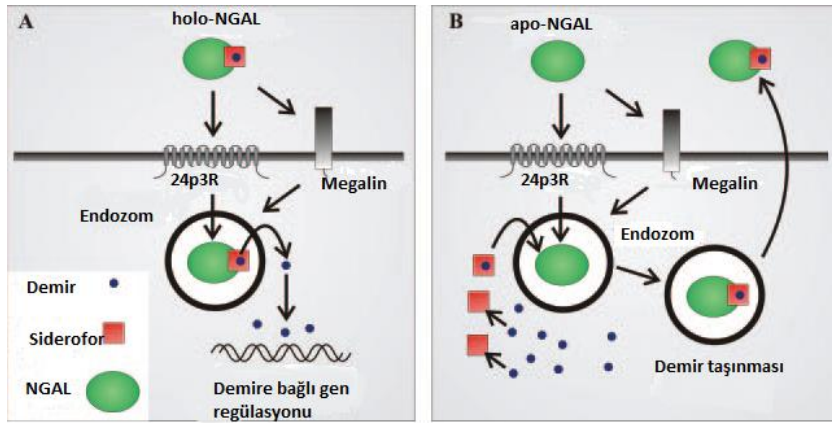
Şekil 8: NGAL'in kristal yapısı (89)

NGAL'in en önemli ligandları sideroforlardır (83, 85). Sideroforlar bakteri, bitki ve memeli hücrelerinde üretilen küçük, peptid yapısında bulunmayan demiri taşıyan ve hücre büyümesi ile yaşamının devamında rol alan ve aynı zamanda bakteriyel infeksiyon ve böbrek hasarı gibi önemli mekanizmalarda rol alan moleküllerdir (83, 85, 89). NGAL, akut böbrek hasarını göstermenin yanında kronik böbrek yetmezliğinde de yol gösterici bir parametredir. Bu protein hasarlı böbrek tübüllerinden birçok etken sonucu üretilmekte ve spesifik demir aracılı yolları aktive ederek hücreyi oksidatif stres ve hücrel apoptozdan korumaktadır (88).

NGAL'in hücrel aktiviteleri spesifik yüzey reseptörleri ile yakından ilişkilidir. En az iki tip hücrel reseptör tanımlanmıştır. Reseptörlerden 24p3R, beyin tipi organik katyon taşıyıcısıdır. Diğer reseptör megalin çöpçü kompleksi diğer

adı ile spesifik olmayan proteik bağlayıcı reseptör, temel olarak renal tübüler hücrelerin fırçası kenar yüzeyinde bulunur. Her iki tip reseptör NGAL'ın endositoz ve hücre döngüsünde rol almaktadır.

Şekil 9'da NGAL'ın iki formu olan holo ve apo-NGAL'ın hücre içine demir taşınması ve düzenlenmesi ile ilgili mekanizması şematik gösterilmiştir (83, 89). Şekil 9'da NGAL aracılı demir düzenlenmesi şematize edilmiştir.



Şekil 9: NGAL-aramılı demir düzenlenmesinin şematik gösterimi (A) Siderofor: demir ile ilişkili NGAL (holo-NGAL) demiri hücre içine taşır, reseptör aracılı girişten sonra, NGAL asidik endozoma alınır, demir sitoplazmada birikir ve demir aracılı gen düzenlenmesi gerçekleşir. (B) Siderofor: demir kompleksi taşımayan NGAL (apo-NGAL) hücre içinde demiri bağlar ve ekstraselüler alana taşır (89).

GEREÇ VE YÖNTEM

ÇALIŞMA GRUBU

Hasta Grubu

Şubat 2012 – Haziran 2012 tarihleri arasında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Nefroloji Bilim Dalı tarafından takip edilen henüz diyalize alınmamış KBY evre I-V tanısı ile izlenen 18-75 yaş arası 43 erkek, 38 kadın, Nefroloji Bilim Dalı Organ nakli ünitesi tarafından takibi yapılan böbrek nakli yapılmış 18-75 yaş arası 44 erkek, 38 kadın toplam 163 hasta çalışmaya dahil edildi. Bilinen malignitesi, aktif enfeksiyonu olan ve diyabeti olan bireyler çalışma grubuna alınmadı. Hasta grubu klinik değerlendirmesi 2002 yılında yayımlanan NKF/KDOQI kılavuzuna göre yapılmıştır.

Kontrol Grubu

Kontrol grubu, hasta grubuna yaş ve cinsiyet olarak benzer, bozulmuş böbrek fonksiyon testi, bilinen kronik/metabolik hastalığı, malignitesi, aktif enfeksiyon ve diyabeti olmayan sağlıklı 82 bireyden oluşturuldu.

Etik kurul onayı

Çalışma öncesi Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Etik Kurulu'nun 03.05.2011 tarihinde 08 sayılı kararı ile onayı alındı. Ayrıca çalışmaya dahil edilen tüm katılımcılara sözlü ve yazılı olarak "Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu" ile yapılacaklar hakkında bilgi verildi ve gönüllü olduklarına ilişkin imzaları ile izinleri alındı.

Hasta Örneklerinin Toplanması ve Analiz Örneklerinin Hazırlanması

Tüm bireylerden diyet alışkanlıklarını değiştirmeden ve ağır fiziksel aktivitede bulunmadan 24 saatlik idrar örneği toplamaları istendi. İdrar örneğininin hacmi ölçüldükten sonra örnekten 10 mL alındı. Bu örnekte aynı gün kreatinin düzeyleri ölçüldü. Çalışmaya dahil edilen tüm katılımcılardan eş zamanlı olarak, sabah 8.30-10.30 saatleri arasında, 8-12 saatlik açlık sonrası iki adet jelli vakumlu tüpe venöz kan örnekleri alındı.

Kanlar alındıktan hemen sonra laboratuvara ulaştırıldı. Vakumlu jelli tüpe alınan kan pıhtılaşması için 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bekletilen kan 2000 g'de 7 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serum örneğinden aynı gün demir, serbest demir bağlama kapasitesi (SDBK) çalışıldıktan sonra hs-CRP, NGAL, IL-6, hepsidin ve pro-hepsidin düzeylerinin ölçümü için kullanılmak üzere 5 ayrı ependorf tüpe ayrılarak analiz yapılana kadar -20°C'de saklandı.

Kullanılan cihazlar

Masa üstü santrifüj (NF 1215, Nüve, Türkiye), -20 °C Derin dondurucu (Beko, Türkiye), +4 °C Buzdolabı (Vestel, Türkiye) , ayarlanabilir otomatik pipet seti (1-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL) (Eppendorf, ABD), çok kanallı otomatik pipet (20-300 µL) (CAPP, Almanya), ELISA okuyucu (RT-2100C, Rayto, Çin), otoanalizör (Roche Cobas 6000, Roche-Hitachi Diagnostics, Japonya) çalışmamızda kullanılan cihazlardır.

Kullanılan sarf malzemeler

20-200 µL, 100-1000 µL'lik pipet uçları (Eppendorf, ABD), 1.5 mL'lik mikro tüpler (ISOLAB, Almanya), jelli vakumlu düz tüpler (VACUTEST, İtalya) çalışmamızda kullanılan sarf malzemelerdir.

Kullanılan kitle

Hepsidin ELISA Kit (DRG, ABD), hepsidin prohormon ELISA Kit (DRG, ABD), human Lipocalin-2/NGAL Elisa Kit (Biovendor, ABD), human IL-6 Platinum ELISA Kit (eBioscience, Avusturya), hs-CRP kiti (Roche, Cobas 6000 Otoanalizör) kullanılan reaktiflerdir.

BİYOKİMYASAL ÖLÇÜMLER

Ölçülen analitler

Çalışmaya alınan bireylerin serumlarından NGAL, hepsidin, pro-hepsidin, IL-6, hs-CRP, kreatinin, demir ve serbest demir bağlama kapasitesi (SDBK) ölçümü yapıldı. Alınan 24 saatlik idrar örneklerinden kreatinin ölçümü yapıldı. Tablo 5’de analitlerin hangi örnekten, hangi ölçüm yöntemi ile hangi cihazlarda çalışıldığı belirtilmiştir.

TABLO 6: Ölçülen analitlerin ölçüm yöntemleri ve ölçümde kullanılan cihazlar

Analit	Analiz örneği	Ölçüm yöntemi	Kullanılan cihaz
hs-CRP	Serum	İmmünotürbidimetrik	Roche Cobas 6000 otoanalizör
Demir	Serum	Kolorimetrik	Roche Cobas 6000 otoanalizör
SDBK	Serum	Kolorimetrik	Roche Cobas 6000 otoanalizör
Kreatinin	Serum, idrar	Kinetik enzimatik	Roche Cobas 6000 otoanalizör
NGAL	Serum	ELISA	Rayto RT-2100C ELISA okuyucu
IL-6	Serum	ELISA	Rayto RT-2100C ELISA okuyucu
Hepsidin	Serum	ELISA	Rayto RT-2100C ELISA okuyucu
Pro-hepsidin	Serum	ELISA	Rayto RT-2100C ELISA okuyucu

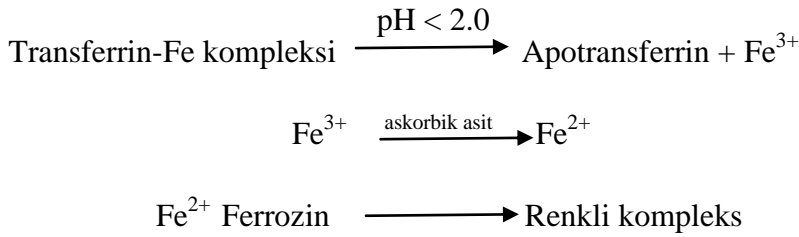
Ölçüm Yöntemleri

Yüksek Duyarlılık C-Reaktif Protein

Yüksek duyarlılıkta C-reaktif protein (hsCRP) immünotürbidimetrik ölçüm yöntemi ile ölçüldü. Lateks partiküllere emdirilmiş olan poliklonal anti-C reaktif protein antikörleri ile örnekteki CRP arasında antijen-antikor reaksiyonu meydana gelir. Oluşan antijen-antikor kompleksi çöker. Bu çökme absorbans değişimi olarak belirlenir. 572 nm dalga boyunda absorbansdaki değişikliğin büyüklüğü ile örnekteki hsCRP düzeyi orantılıdır. Yüksek duyarlılıkta C-reaktif protein ölçümü için öncelikle hsCRP kiti, Roche Cobas 6000 otoanalizörüne uyarlandı. Referans değerler: 0- 5 mg/L

Demir

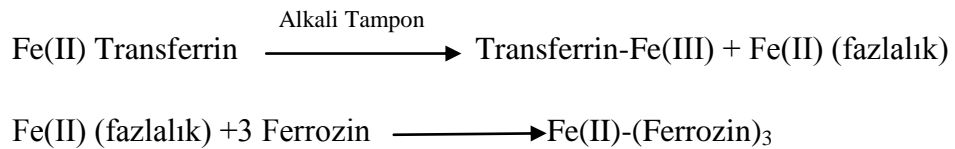
Demir düzeyi kolorimetrik ölçüm yöntemi ile belirlendi. Örnekte transferrin ile kompleks halde bulunan demir iyonları asidik pH koşulları altında transferrinden ayrılır. Askorbik asit +3 değerlikli demir iyonunu +2 değerlikli demire yükseltir. +2 değerlikli demir ferrozin ile reaksiyona girerek renkli kompleks oluşturur. Oluşan rengin yoğunluğu demir düzeyi ile doğru orantılıdır.



Referans değerler: 33–193 µg/dl

Serbest Demir Bağlama Kapasitesi (SDBK)

Serbest demir bağlama düzeyi ferrozin ile direkt tayin yöntemi ile belirlenmektedir. +2 değerlikli demir ile birlikte bulunan transferrin alkalik ortamda +3 demir ile kompleks yapar. Ortamda fazla bulunan +2 değerlikli demir ferrozin ile reaksiyona girerek kompleks oluşturur. Rengin yoğunluğu bağlı olmayan demir düzeyi ile doğru orantılıdır ve doymamış demir bağlama kapasitesi ile indirekt orantılıdır. Absorbanstaki artış fotometrik ölçüme bağlı olarak saptanmaktadır.



Referans değerler: 112–347 µg/dl

Total Demir Bağlama Kapasitesi (TDBK)

Total demir bağlama kapasitesi (TDBK), demir düzeyi ile SDBK toplamından elde edilmektedir. Bu değer hastalardaki transferrin saturasyonu yüzdesinin belirlenmesi için hesaplanmıştır.

Transferrin Satürasyonu (Tfr sat.)

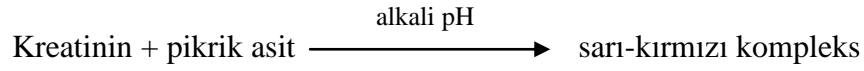
Transferin satürasyonu % değer olarak, demir düzeyinin TDBK'ye oranı olarak hesaplanmıştır.

$$\text{Tfr sat} = (\text{Serum demir düzeyi} \times \%100) / \text{TDBK}$$

Referans değerler: %15–45

Kreatinin

Örnekteki kreatinin alkali pH'da pikrat ile reaksiyona girerek sarı-kırmızı renkli bir kompleks oluşturur.



Bu kompleksin 505 nm dalga boyundaki absorpsiyonunun artma derecesi örnekteki kreatinin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Kreatinin için erkeklerde beklenen normal değerler 0,7–1,2 mg/dl iken kadınlarda 0,5–0,9 mg/dl'dir. 24 saatlik idrarda beklenen kreatinin atılımı erkeklerde 1040–2350 mg/gün iken kadınlarda 740–1570 mg/gündür.

Kreatinin Klirensi

Kreatinin klirensi (GFR) 24 saatlik idrar hacmi, idrar kreatinin düzeyi ve kan kreatinin düzeyi kullanılarak hesaplanan bir formülden elde edilmektedir.

$$\text{GFR} = 24 \text{ saatlik idrar hacmi} \times \text{idrar kreatinin düzeyi} / 1440 \times \text{kan kreatinin düzeyi}$$

Referans değerler: Kadın 88–128 ml/dk, Erkek 97–137 ml/dk

$$\text{MDRD} = 186 \times (\text{serum kreatinin düzeyi})^{-1.154} \times (\text{yaş})^{-0.203} \times 0.742 \text{ (kadın ise)}$$

NGAL

NGAL düzeyleri “Biovendor Human NGAL/Lipocalin-2 ELISA” (Çek Cumhuriyeti) kiti kullanılarak serumdan Sandwich ELISA yöntemi ile çalışıldı. Standartlar, kalite kontrol ve hasta örneklerinin, poliklonal NGAL antikoru ile kaplı mikropakta inkübasyonunun ardından yıkama yapılarak bağlanmayan antikorlar uzaklaştırıldı ve biyotinle işaretli anti-insan NGAL antikoru eklenerek tekrar yıkama gerçekleştirildi. Streptavidin-HRP konjugat solüsyonunun ilave edilmesinin ardından

son yıkama basamağı gerçekleştirilerek, yıkamanın ardından kalan konjugat ile reaksiyona giren substrat solüsyonu eklendi. Reaksiyona asidik durdurma solüsyonu eklenerek mavi rengin sarıya dönüştüğü görülerek spektrofotometrede 450 nm’de okutularak deneye son verildi.

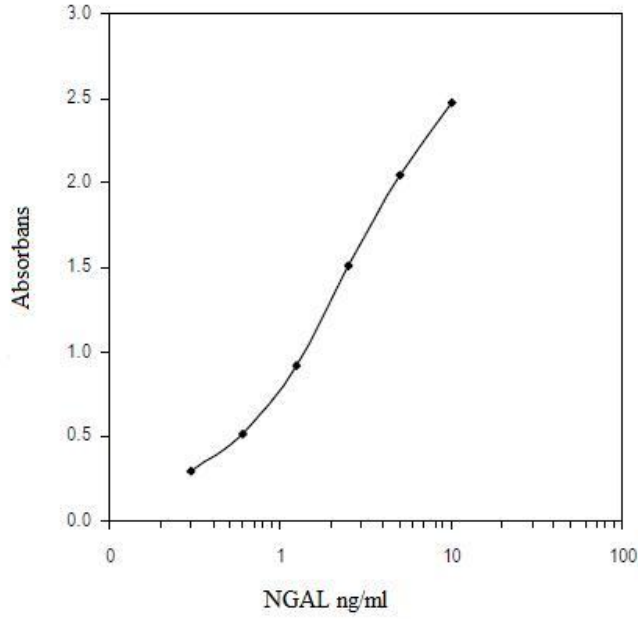
Reaktiflerin ve Örneklerin Hazırlanması:

Kit analiz öncesi 2-8 °C’de saklandığı için, tüm reaktifler ölçüm öncesi 18-28 °C’ye getirildi. Çalışmada kullanılan 10X yıkama tamponu ve 20x biyotinle işaretlenmiş liyofilize antikor kit propektüsünde belirtildiği gibi dilüe edildi. Yüksek ve düşük düzey kontrollarda belirtilen hacimde distile su ile dilüe edildi. Liyofilize haldeki 10 ng/ml stok standarttan 5 ng/ml, 2.5 ng/ml, 1.25 ng/ml, 0.6 ng/ml , 0.3 ng/ml düzeyinde standartlar hazırlandı. -20 C°de saklanan serumlar çalışmadan hemen önce oda ısısına getirildi. Serumlar dilüsyon tamponu ile 1:30 dilüe edildi.

Tablo 7: NGAL çalışma basamakları

	Kör	Standard	Kontrol	Örnek
Dilüsyon tamponu	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Standard	-	100 µl	-	-
Kontrol	-	-	100 µl	-
Örnek	-	-	-	100 µl
1 saat 300 rpm de çalkala				
3 kez 350 µl yıkama solüsyonu ile yıka				
Biotin konjugat	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
1 saat 300 rpm de çalkala				
3 kez 350 µl yıkama solüsyonu ile yıka				
Streptavidin-HRP	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
30 dk 300 rpm de çalkala				
3 kez 350 µl yıkama solüsyonu ile yıka				
TMB Substrat	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Karanlıkta 10 dk oda ısısında beklet				
Durdurma solüsyonu	100µl	100 µl	100 µl	100 µl
5 dakika içinde 450 nmde oku				

Çalışılan NGAL standartları ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi şekil 10’da verilmiştir.



Şekil 10: NGAL kalibrasyon eğrisi

Bu kalibrasyon eğrisi kullanılarak hasta serumlarındaki NGAL düzeyleri ng/ml olarak hesaplandı.

IL-6:

IL-6 düzeyleri “eBioscience Human IL-6 Platinum ELISA” (Avusturya) kiti kullanılarak serumdan ELISA yöntemi ile çalışıldı. Anti-insan IL-6 kaplı antikor ile kaplı mikroyağla eklenen standart ya da örnekteki IL-6, antikorlarca adsorbe edilir. Biyotin ile konjuge anti-insan IL-6 antikor eklenir ve ilk basamakta antikor tarafından tutulan insan IL-6 bağlar. İnkübasyonun ardından bağlı olmayan biyotin konjugatlı anti-insan IL-6 antikor yıkama basamağı ile uzaklaştırılır. Streptavidin-HRP eklenir ve bu da biyotin konjugatlı anti-insan IL-6 antikorunu bağlar. İnkübasyonu takip eden basamakta bağlı olmayan streptavidin-HRP yıkama ile uzaklaştırılır. HRP ile reaksiyon gösterebilen substrat solüsyonu kuyucuklara eklenir. Örnek ya da standarttaki var olan IL-6 düzeyine göre renk değişimi gözlenir. Deney

asit yapıdaki durdurma solüsyonunun eklenmesi ile sonlandırılır ve absorbansı 450 nm dalga boyunda okuma yaptırılır

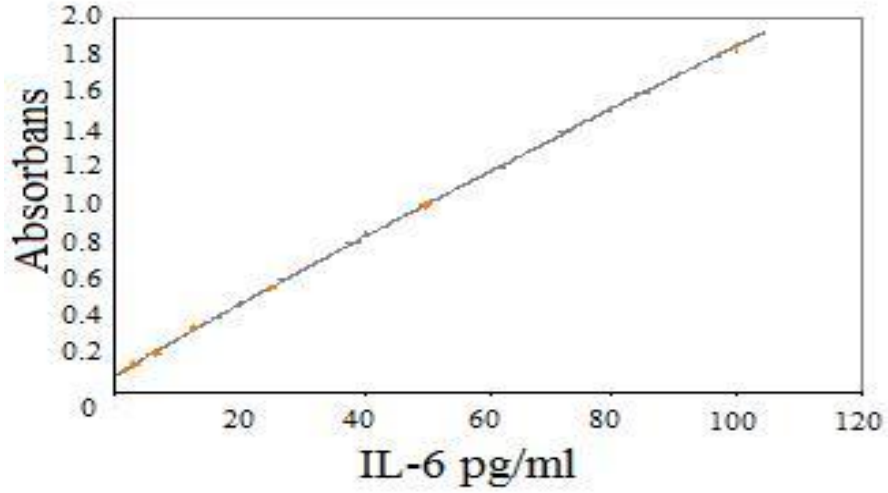
Reaktiflerin Hazırlanması:

Kit analiz öncesi 2-8 °C’de saklandığı için, tüm reaktifler ölçüm öncesi oda sıcaklığına getirildi. Çalışmanın yapılacağı 24 saat içinde 20X yıkama tamponu ve 20x çalışma tamponu prospektüste belirtildiği gibi dilüe edildi. Biyotin konjugat ve streptavidin-HRP, dilüsyondan sonra 30 dakika içinde kullanılacak şekilde çalışma tamponu ile kit prospektüsünde belirtildiği gibi dilüe edildi. Kontroller belirtilen hacimde distile su ile dilüe edildi. Liyofilize haldeki 200 pg/ml stok standarttan 100 pg/ml, 50 pg/ml, 25 pg/ml, 12.5 pg/ml , 6.25 pg/ml, 3.75 pg/ml düzeyinde standartlar hazırlandı.

Tablo 8: IL–6 Çalışma basamakları

	Kör	Standard	Kontrol	Örnek
Yıkama tamponu	2 kere 400 µl ile yıkanır			
Deney tamponu	100 µl	-	-	50 µl
Standard	-	100 µl	-	-
Kontrol			100 µl	
Örnek	-	-	-	50 µl
Biyotin konjugat	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Üstü örtülür, 2 saat 100 rpm de çalkalanır				
4 kere 400 µl ile yıkanır				
Streptavidin-HRP	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Üstü örtülür, 1 saat 100 rpm de çalkalanır				
4 kere 400 µl ile yıka				
TMB Substrat	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Karanlıkta 10 dk oda ısısında bekletilir				
Durdurma solüsyonu	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
450 nmde okuma yapılır				

Çalışılan IL–6 standartları ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi şekil 11’de verilmiştir.



Şekil 11: IL-6 kalibrasyon eğrisi

Bu kalibrasyon eğrisi kullanılarak hasta serumlarındaki IL-6 düzeyleri belirlendi

Hepsidin:

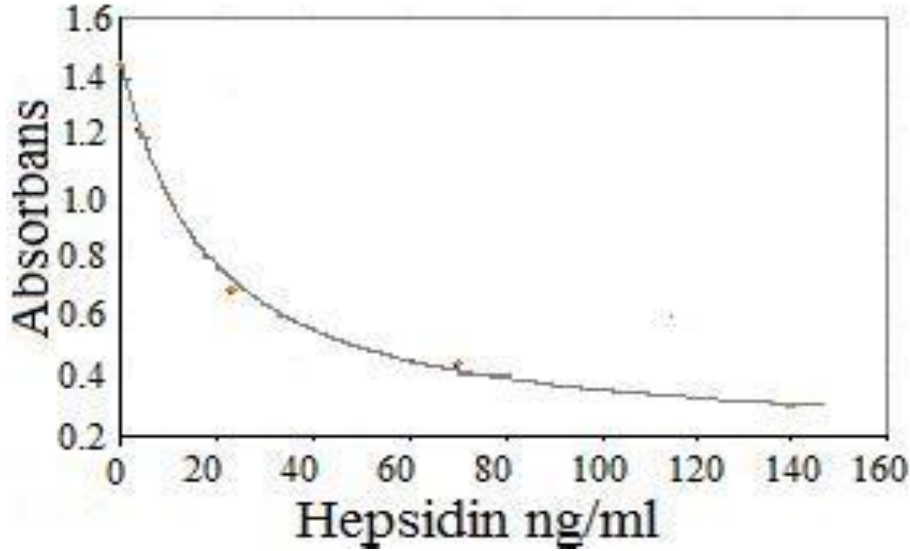
Hepsidin düzeyleri “ DRG Hepsidin ELISA” (ABD) kiti kullanılarak serumdan enzim immün ölçüm yöntemi ile çalışıldı. Bu kit solid faz enzim bağlı immün sorbent yöntemine dayalı olarak, yarışmalı bağlanma temeline dayalı olarak ölçüm yapmaktadır. Mikroplak, biyoaktif hepsidin 25 molekülünün antijenik sitesinedirekt bağlanabilen monoklonal antikor ile kaplıdır. Hasta serumundaki endojen hepsidin ile eklenen hepsidin-biyotin konjugat, kaplı antikorlar için yarışmaya girer. İnkubasyon sonrası bağlı olmayan konjugat yıkama ile uzaklaştırılır. Streptavidin-peroksidaz enzim kompleksi ile inkübasyonun ardından ikinci yıkama basamağı uygulanır. Substrat solüsyonunun eklenmesi ile renk değişimi gözlenir. Rengin yoğunluğu hastadaki hepsidin düzeyleri ile doğru orantılıdır.

Reaktiflerin Hazırlanması:

Kit analiz öncesi 2-8 °C’de saklandığı için, tüm reaktifler ölçüm öncesi 18-28 °C’ye getirildi. Bütün liyofilize kontroller ve standartlar 0.5 ml distile su ile dilüe edildi. 40x yıkama solüsyonu kit prospektüsünde belirtildiği gibi dilüe edildi. Örneklerin dilüsyonu 1:100 oranında gerçekleştirildi.

Tablo 9: Hepsidin Çalışma Basamakları

	Standard	Kontrol	Örnek
Örnek tamponu	10 µl	10 µl	10 µl
Standard	20 µl	-	-
Kontrol		20 µl	
Örnek	-	-	20 µl
30 dakika 500 rpm de çalkalanır			
Deney tamponu	150 µl	150 µl	150 µl
Enzim konjugat	100 µl	100 µl	100 µl
180 dk 500 rpm de çalkalanır			
5 kez 400 µl yıkama solüsyonu ile yıkanır			
Oda ısısında 30 dk inkübasyona bırakılır			
Durdurma solüsyonu	100 µl	100 µl	100 µl
10 dk içinde 450 nmde okuma yapılır			



Şekil 12: Hepsidin kalibrasyon eğrisi

Bu kalibrasyon eğrisi kullanılarak hasta serumlarındaki hepsidin düzeyleri belirlendi

Pro-hepsidin:

Pro-hepsidin düzeyleri “DRG Hepsidin prohormon ELISA” (ABD) kiti kullanılarak serumdan enzim immün ölçüm yöntemi ile çalışıldı. Bu kit solid faz enzim bağlı immün sorbent yöntemine dayalı olarak, yarışmalı bağlanma temeline dayalı olarak ölçüm yapmaktadır. Mikroplak, hepsidin prohormon molekülünün (28-47 aminoasit) antijenik bölgesine direkt bağlanabilen monoklonal antikor ile kaplıdır. Hasta serumundaki endojen hepsidin, ile eklenen hepsidin-biyotin konjugat, kaplı

antikorlar için yarışmaya girer. İnkübasyon sonrası bağlı olmayan konjugat yıkama ile uzaklaştırılır. Bağlı biyotin konjugat miktarı, örnekteki hepsidin prohormon düzeyi ile ters orantılıdır. Substrat solüsyonunun eklenmesinin ardından görülen renk yoğunluğu hasta örneğindeki hormon düzeyi ile orantılıdır.

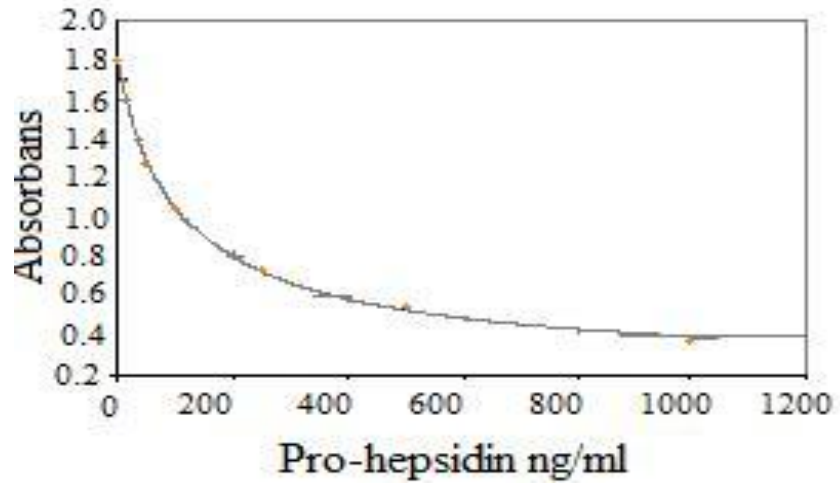
Reaktiflerin Hazırlanması:

Kit analiz öncesi 2-8 °C’de saklandığı için, tüm reaktifler ölçüm öncesi 18-28°C’ye getirildi. Bütün liyofilize standartlar ve kontrol 1 ml distile su ile dilüe edildi. 40x yıkama solüsyonunun kit prospektüsünde belirtildiği gibi dilüe edildi. Örneklerin dilüsyonu 1:100 oranında gerçekleştirildi.

Tablo 10: Pro-hepsidin çalışma basamakları

	Standard	Kontrol	Örnek
Deney tamponu	100 µl	100 µl	100 µl
Standard	50 µl	-	-
Kontrol		50 µl	
Örnek	-	-	50 µl
Biyotin konjugat	100 µl	100 µl	100 µl
120 dakika oda ısısında inkübasyona bırakılır			
5 kez 400 µl yıkama solüsyonu ile yıkanır			
Enzim kompleks	100 µl	100 µl	100 µl
60 dakika oda ısısında inkübasyona bırakılır			
5 kez 400 µl yıkama solüsyonu ile yıkanır			
Substrat solüsyonu	100 µl	100 µl	100 µl
30 dakika oda ısısında inkübasyona bırakılır			
Stop solüsyonu	100 µl	100 µl	100 µl
10 dk içinde 450 nmde okuma yapılır			

Çalışılan pro-hepsidin standartları ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi şekil 13’te verilmiştir.



Şekil 13: Pro-hepsidin kalibrasyon eğrisi

Bu kalibrasyon eğrisi kullanılarak hasta serumlarındaki hepsidin düzeyleri belirlendi

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirmesinde SPSS 17.0 (Chicago, ABD) paket programı kullanıldı. Çalışmadaki değişkenlerin normal dağılıma uygun olup olmadığı Kolmogorov-Smirnov testi ile değişkenlerin varyansların homojen olup olmadığı da Levene testi ile değerlendirildi.

Normal dağılıma uyan ölçümsel değişkenlerin, KBY ve kontrol grubu arasındaki fark, bağımsız örneklem t-testi ile analiz edildi ve ortalama \pm standart sapma ($X \pm SD$) olarak gösterildi. Normal dağılıma uymayan ölçümsel değişkenlerin, kontrol, KBY ve böbrek nakli grupları arasındaki fark Mann-Whitney U testi ile analiz edildi ve ortanca çeyrekler arası fark (çeyrekler arası dağılım aralığı) olarak ifade edildi.

KBY, böbrek nakli ve kontrol grubu arasında parametrik koşulları sağlayan değişkenlerde fark olup olmadığı, One-way Anova testi (Bağımsız Gruplarda Varyans Analizi) ile değerlendirildi. Bu iki grup arasında parametrik koşulları sağlamayan değişkenlerde fark olup olmadığı ise Kruskal-Wallis testi ile analiz edildi. Bu farkın hangi gruplardan kaynaklandığını belirlemek için, parametrik koşulları sağlayan değişkenlere post-hoc testlerden (çoklu karşılaştırma testleri) Tukey testi, karşılamayan değişkenlere de Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi yapıldı.

Değişkenler arasındaki ilişkinin gücünü belirlemek amacı ile basit korelasyon ve çoklu regresyon analizi yapıldı ($y=ax+b$). Korelasyon analizinde rho (Spearman korelasyon katsayısı) değeri 0.000-0.49 aralığında iken zayıf ilişki, 0.50-0.69 aralığında iken orta ilişki, ≥ 0.70 olanlar ise güçlü ilişki olarak kabul edildi. Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testinde anlamlılık sınırı $p < 0.05/3 = 0.016$ kabul edildi. Ancak tüm diğer istatistiksel analizler için anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR:

Çalışmaya grubunun özellikleri, serumda ölçülen analitlerin düzeyleri ve hesaplanmış değerler tablo 11’de verilmiştir.

Tablo 11: Çalışma gruplarının özelliklerinin, ölçülen analitlerin düzeylerinin ve hesaplamalı parametrelerin karşılaştırılması

Değişken	Kontrol (n=81)	KBY (n=81)	Böbrek nakli (n=82)
Yaş (yıl)	46,73±10,50 ^f	50,29±15,68 ^h	41,79±11,66
VKİ (kg/cm ²)	23,33±0,24 ^d	23,11±0,22 ⁱ	24,22±0,22
Kreatinin (mg/dl)	0,74(0,25) ^{a,g}	2,47(0,90) ^h	1,01(0,10)
GFR (ml/dk)	108,79(29,62) ^{a,c}	36,6(29) ^h	55,94(35,10)
MDRD	97,2±1,58 ^{a,c}	34,2±22,28 ^h	65,7±21,70
Demir (µg/dl)	89,49±33,17 ^b	68,53±28,53 ^h	90,76±45,37
SDBK(µg/dl)	245(98,2) ^{a,e}	188,5(91,3)	212(114,6)
TDBK(µg/dl)	345,53±62,12 ^{a,c}	262,74±41,90 ^h	308,12±65,04
Tfr sat. (%)	27,34±12,20	27,24±12,49	31,64±19,40
hs-CRP (mg/L)	1,02(1,06) ^a	3,94(7,46)	1,61(3,81)
IL-6 (pg/ml)	1,75(1,88) ^{a,c}	48,6(27,52) ^h	10,33(4,64)
Hepsidin (ng/ml)	3,28(5,12) ^{a,c}	81(53,03) ^h	30,18(14,57)
Pro-hepsidin (ng/ml)	43,65(7,04) ^{a,c}	773,72(536,07)	581,4(490,95)
NGAL (ng/ml)	1,66(1,15) ^{a,c}	4,01(1,32) ^h	2,96(1,96)

Dağılımlara göre değerler ortalama ± SD ve ortanca (çeyrekler arası fark) olarak gösterildi

^aKontrol ile KBY grupları arası fark p=0,000

^bKontrol ile KBY grupları arası fark p=0,001

^cKontrol ile böbrek nakli grupları arası fark p=0,000

^dKontrol ile böbrek nakli grupları arası fark p=0,002

^eKontrol ile böbrek nakli grupları arası fark p=0,005

^fKontrol ile böbrek nakli grupları arası fark p=0,037

^gKontrol ile böbrek nakli grupları arası fark p=0,043

^hKBY ile böbrek nakli grupları arası fark p=0,000

ⁱKBY ile böbrek nakli grupları arası fark p=0,018

Hasta grupları ile kontrol grubu arasında Tfr sat. (p=0,107), kontrol grubu ile KBY grubu arasında VKİ (p=0,766) ve yaş (p=0,182), kontrol ile böbrek nakli grubu arasında hs-CRP (p=0,052) ve demir (p=0,973), KBY ile böbrek nakli grubu arasında

hs-CRP ($p=0,107$), SDBK ($p=0,149$) ve prohepsidin ($p=1,000$) açısından anlamlı fark bulunamamıştır.

KBY grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hs-CRP düzeyleri belirgin yüksek olarak saptanırken ($p=0,000$), kontrol ile böbrek nakli ve KBY ile böbrek nakli grupları karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunamadı (sırası ile $p=0,052$, $p=0,107$). Bütün çalışma grupları arasında hepsidin açısından anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,000$)

KBY ile böbrek nakli grubu arasında prohepsidin açısından fark bulunmazken ($p=1,000$), kontrol grubu ile sırası ile KBY ve böbrek nakli grubu arasında anlamlı fark saptanmıştır (sırasıyla $p=0,000$, $p=0,000$)

IL-6 düzeyleri her üç grup arasında anlamlı olarak farklı saptanmıştır ($p=0,000$). NGAL düzeyleri her üç grupta da anlamlı olarak farklı saptanmıştır ($p=0,000$).

Üç ayrı çalışma grubumuz için korelasyon hesaplaması dağılımlar non-parametrik olduğundan ve örneklem grubu çok büyük olmadığından, spearman korelasyon testi ile gerçekleştirildi. Tablo 12 ve 13'te analitlerin, hesaplamalı parametrelerin ve çalışma grubuna ait özelliklerin korelasyonu kontrol ve hasta grubu (KBY+böbrek nakli) için verilmiştir. Korelasyonun gücünü gösteren rho katsayısı tablolarda belirtilmiştir.

Tablo 12: Kontrol grubu katılımcılarındaki parametrelerin birbirleri korelasyonlarını gösteren tablo

	NGAL	Pro-hepsidin	Yaş	Kreatinin	MDRD	GFR	Demir	SDBK	TDBK	Tfr sat.	hs-CRP	IL-6	VKİ
Hepsidin	0,101	-0,065	-0,213	-0,160	0,098	0,030	-0,288**	0,071	-0,069	-0,212	0,230*	0,053	0,042
NGAL		0,164	-0,119	-0,039	-0,003	0,048	-0,028	0,143	0,177	-0,088	0,081	0,041	-0,035
Pro-hepsidin			-0,090	0,107	-0,112	0,095	0,247*	-0,047	0,028	0,162	0,044	-0,050	-0,112
Yaş				0,150	-0,451**	-0,223	0,081	-0,133	-0,113	0,121	0,297**	0,393**	-0,147
Kreatinin					-0,704**	0,087	0,449**	-0,466**	-0,390**	0,487**	-0,086	-0,181	0,010
MDRD						0,075	-0,149	0,241*	0,247*	-0,212	-0,131	-0,205	0,076
GFR							0,060	-0,016	-0,016	0,034	-0,141	-0,194	0,069
Demir								-0,726**	-0,438**	0,929**	-0,189	-0,199	-0,070
SDBK									0,914**	-0,916**	0,217	0,175	0,063
TDBK										-0,704**	0,150	0,127	0,024
Tfr sat.											-0,230	-0,222*	-0,071
hs-CRP												-0,230	-0,222*
IL-6													-0,229*

Sayılar rho katsayı değerlerini vermektedir. **p=0,001 *p=0,05

Tablo 13: Hasta grubunda (KBY +böbrek nakli) parametreler arası korelasyon analizi

	NGAL	Pro-hepsidin	Yaş	Kreatinin	MDRD	GFR	Demir	SDBK	TDBK	Tfr sat.	hs-CRP	IL-6	VKİ
Hepsidin	0,229**	0,195*	0,285**	0,432**	-0,466**	-0,342**	-0,128	-0,198	-0,337**	-0,005	0,126	0,571**	-0,195*
NGAL		0,133	0,161*	0,347**	-0,360**	-0,295**	-0,176	0,039	-0,089	-0,128	0,200*	0,343**	-0,078
Pro-hepsidin			-0,007	0,080	-0,125	-0,053	-0,003	-0,146	-0,214**	0,069	0,018	0,192*	-0,179*
Yaş				0,085	-0,157*	-0,087	-0,097	-0,029	-0,078	-0,045	0,135	0,235**	-0,018
Kreatinin					-0,947**	-0,719**	-0,274**	0,041	-0,129	-0,184*	0,261**	0,528**	-0,125
MDRD						0,770**	0,335**	-0,051	0,158	0,229**	-0,309**	-0,578**	0,144
GFR							0,382**	-0,138	0,082	0,303**	-0,392**	-0,398**	0,068
Demir								-0,659**	-0,175*	0,941**	-0,293**	-0,250**	0,085
SDBK									0,827**	-0,860**	0,171*	-0,101	0,051
TDBK										-0,467**	0,021	-0,309**	0,156
Tfr sat.											-0,241**	-0,111	0,021
hs-CRP												0,261**	-0,032
IL-6													-0,212**

Sayılar rho katsayı değerlerini vermektedir. **p=0,001 *p=0,05

Çalışmamızda hasta grupları ile kontrol grubu arasında yaş ve VKİ bakımından anlamlı farklılık saptandığından bu iki faktörün etkisi sabit tutularak parsiyel korelasyon analizi yapıldı. Parsiyel korelasyon analizi sonucu korelasyon katsayılarının (rho, Spearman korelasyon katsayısı) anlamlı olarak değişmediği görüldü . Hepsidin ile NGAL'ın hasta grubunda korelasyonu rho=0,229 bulunurken yaş etkisi kontrol edildiğinde rho=0,194, VKİ ie birlikte yaş etkisi kontrol edildiğinde rho=0,190 olarak bulunmuştur.

Yapılan çoklu regresyon analizine göre hepsidin için bağımsız belirteçler NGAL (beta=5,64, p=0,016) ve IL-6 (beta=0,75, p=0,000), MDRD (beta=-0,454, p=0,000), NGAL için bağımsız belirteçler ise MDRD (beta=-0,015, p=0,000) IL-6 (beta=0,011, p=0,012), kreatinin (beta=0,203, p=0,006)dir.

TARTIŞMA

Toplumda yaygın olarak görülen KBY, önemli bir halk sağlığı problemidir. Erken dönemde tanı konarak, tedavisi başladığında istenmeyen klinik sonuçları önlenebilen bu hastalığın, insidans ve prevalansı giderek artmaktadır. Bu hastaların tamamına yakınında (%90) SDBY gelişir. Son dönem böbrek yetmezliği ise böbrek fonksiyonunun geri dönüşümsüz kaybı ile karakterize, hayatı tehdit eden üremiden korumak için hastaya devamlı diyaliz (hemodiyaliz, periton diyalizi) veya nakil gibi RRT'nin uygulandığı klinik bir tablodur (1,91). Son dönem böbrek yetmezliği olan hastalarda tercih edilen RRT şekli sıklıkla böbrek naklidir (26).

Diyaliz tedavisi gören hastalar ile kıyaslandığında, böbrek nakli yapılmış olan hastaların sağ kalımı ve yaşam kalitesi daha iyi, sağlık harcamaları ile ilgili giderleri ise daha azdır (92). Öte yandan, böbrek naklinin sağlamış olduğu bu avantajlar sürekli değildir; immün süpresif tedaviler allograft ömrünü uzatmakta ancak nakil hastaları normal yaşam süresine sahip olamamaktadırlar. Bir süre sonra hastaların büyük çoğunluğunda allograft yetmezliği ortaya çıkar. Bir yıllık hasta yaşamı % 90-98, 5 yıllık hasta yaşamı ise % 80-90 civarındadır (26). Kadavra ve canlı donörlerden yapılan böbrek nakli sonrasında 5 yıllık graft sağkalımı sırası ile %66 ve %67'dir (92). Böbrek nakli hastaları KBY kliniğine ait semptomları ve özellikleri taşıdığından, GFR derecesine ve böbrek hasarı belirteçleri varlığına bakılmaksızın KBY olarak değerlendirilmeleri önerilmektedir. Bu hastalarda, azalmış GFR ya da albuminüri olmamasına rağmen, yapılan biyopsilerde patolojik tanı konulabilen bozuklukların varlığı buna gerekçedir (2).

Bu nedenle biz de çalışmamıza hem nakil hem de henüz diyalize alınmamış KBY tanısı almış hastaları dahil ederek böbrek yetmezliğinin farklı evrelerinin özelliklerini taşıyan bireylerdeki inflamasyon durumunu değerlendirmeye çalıştık.

Kronik böbrek yetmezliği ve böbrek nakil hastaları genel toplum ile karşılaştırıldığında hızlanmış ateroskleroz ile birlikte kardiyovasküler sistem hastalıkları için yüksek morbidite ve mortalite riski taşıdığı bildirilmektedir (2,93). KBY hastalığı olanlarda olmayanlara göre mortalitenin rölatif riski 0.94-5'e kadar değişmektedir. 41 kohort çalışması ele alındığında çalışmaların %93'ünde rölatif riskin birden fazla olduğu bulunmuştur (94). Diyaliz hastaları ile karşılaştırıldığında

nakil hastalarında kardiyovasküler mortalite her ne kadar daha düşük olsa da, hala belirgin bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır (95,96).

Fernánde ve arkadaşlarının 1981–2008 yılları arasında 2059 böbrek nakli hastasında yürüttüğü prospektif kohort çalışmasında, uzun dönemde böbrek fonksiyonunda azalma ile birlikte artmış kardiyovasküler risk ile karşı karşıya geldiği görülmüştür. Cox regresyon modeline göre böbrek nakli hastalarının KVS hastalıklarından rölatif ölüm riski sağlıklı katılımcılara göre 1.33'dür(95).

Vanholder ve arkadaşlarının, 18 yılı kapsayan 85 yayın verilerini değerlendirdiklerinde GFR değerindeki düşüş ile birlikte kardiyovasküler sistem hastalıklarında artış görüldüğü belirtilmiştir (97). Çalışmada, yazarlar bulgularını şu şekilde belirtmişlerdir; i) artmış serum kreatinini veya azalmış GFR varlığında, morbidite ve mortalite KVS hastalıkları nedeniyle belirgin olarak artmış ayrıca vasküler yıkım da hızlanmıştır; ii) böbrek yetmezliğinde diyaliz basamağından çok önceleri kardiyovasküler hasar başlar; iii) böbrek hasarı ile KVS hastalıkları arasındaki ilişki ile DM ile KVS hastalıkları arasındaki ilişki epidemiyolojik olarak kıyaslanabilir; iv) bilinen kardiyovasküler risk faktörlerinin yanında özgün olarak böbrek yetmezliği ile ilgili olan diğer bazı faktörlerin etkili olabileceği, v)KVS hastalıklarına karşı uygun koruyucu yaklaşımların böbrek disfonksiyonu oluşumunda erken evrelerde başlanmalı ancak böbrek fonksiyon parametrelerinin yanlış yorumlanması, böbrek yetmezliğinin geç tanınması ve hastanın çok daha gecikmiş konsültasyonu nedeni ile başlanamamaktadır (97).

Kronik böbrek yetmezliğinde, morbidite ve mortalite nedeni oluşturan KVS ve diğer sistem hastalıklarının temelinde kronik inflamasyonun yattığı ortaya konmuştur. Kronik inflamatuvar süreç, böbrek yetmezliğinin erken evrelerinden SDBY'ne kadar olan bütün evrelerde hakimdir (2,40). Oksidatif stres ve endotel disfonksiyonu ile birlikte inflamasyon, hızlanmış aterosklerozun ilerlemesine önemli katkıda bulunmaktadır. Bu da KBY ile KVS hastalıkları arasındaki ilişkinin anlaşılmasını sağlamaktadır (44).

Kronik böbrek yetmezliği olan kişilerde artmış oksidatif stres, azalmış sitokin klirensi, kronik infeksiyonların varlığı, hipertansiyon, aşırı sıvı yüklenmesi, metabolik bozukluklar (hiperglisemi) ve üremik durumun neden olduğu toksik tablo bazı sinyal yollarını hareket geçirerek IL–6 düzeylerinin kanda yükselmesine neden

olmaktadır. Yükselen IL-6 düzeyleri ise, CRP gibi birçok akut faz reaktanının sentezine, katabolizmanın artmasına, hiperkoagulabiliteye, iştah azalmasına, kemikte yeniden düzenlenmeye, hızlanmış ateroskleroz gibi kronik inflamatuvar süreçlere neden olmaktadır (40,44).

Birçok çalışma, vasküler hastalıkların gelişimine immün sistemin aktif olarak katkıda bulunduğunu göstermektedir. Aterosklerozun erken evrelerinde inflamatuvar hücrelerin, vasküler duvara infiltrasyonu gerçekleşmektedir. İnflamatuvar hücrelerden salınan CRP, kompleman sistemini aktifleyerek köpük hücrelerinin oluşumuna katılarak aterosklerotik lezyon oluşumuna katkıda bulunmaktadır (98).

İnflamasyonun bilinen belirteçlerinden olan, CRP ve IL-6'nın yüksek düzeylerinin, ani kardiyak ölümler ile normal düzeylerine sahip olanlara oranla daha fazla ilişkili olduğu bilinmektedir (40).

Çok merkezli prospektif myokard enfarktüsü kohort çalışmasına 50-59 yaş arası 9771 erkek katılımcının izlendiği çalışmayı yürüten, Jean-Philippe Empana ve arkadaşları koroner kalp hastalıkları için risk faktörlerini tanımlamışlardır. IL-6 düzeyleri düşükten yükseğe doğru üç grupta sınıflandırılmış ve üst gruptaki IL-6 düzeylerine sahip olan katılımcılarda, alt grup IL-6 düzeylerine sahip kişilere göre ani kardiyak ölüm riskinin üç kat artmış olduğu saptanmıştır. Risk modeline hs-CRP düzeylerinin eklenmesi riski değiştirmemiş ani kardiyak ölüm riski aynı oranda kalmıştır (99).

Bizim çalışmamızda IL-6'nın hs-CRP'den daha güçlü olarak böbrek fonksiyon parametreleri ile ilişkili olduğu görülmektedir. Bu sonuç kronik inflamasyonda etken sitokinin ağırlıklı olarak IL-6 olduğu ve böbrek fonksiyon kaybı ile paralel olarak komplikasyon riskini göstermede etkin olacağı görüşünü desteklemektedir.

Parekh ve arkadaşlarının, 1041 KBY hastası ile yürüttüğü kohort çalışmasında inflamasyonun ani kardiyak ölümü, prematüre aterosklerozu ve sitokinle indüklenen plak instabilitesini hızlandırdığı gösterilmiştir. Çalışmada CRP ve IL-6'nın, inflamatuvar süreç ile birlikte olan miyokardiyal fibrozisi, ventriküler repolarizasyonu geciktirerek etkilediği ileri sürülmüştür (100).

Shlipak ve arkadaşlarının 5808 KBY hastası ve kontrol grubunda, çeşitli inflamatuvar ve prokoagulan analit düzeylerini çalışarak gerçekleştirdiği Cardiovascular

Health Study (CHS), inflamatuvar belirteçlerden, IL-6 ve CRP düzeyleri KBY hastalarında sağlıklılara göre belirgin yüksek saptanmıştır. CRP düzeyleri kontrol grubunda 3,5 mg/L bulunurken KBY grubunda 5,1 mg/L saptanmıştır ($p<0,0001$). IL-6 düzeyleri ise, kontrol grubunda 2,4 pg/ml iken KBY grubunda 3,2 pg/ml olarak bulunmuştur($p<0,0001$) (101).

Çalışmamızda hasta grubu, henüz diyalize alınmamış son beş yıl içinde tanı almış, evre I-V KBY hastası 81 kişi ile son beş yıl içinde böbrek nakli yapılmış 82 kişiden oluşmaktadır. Çalışmamızda hs-CRP düzeyleri, kontrol grubu ile KBY grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek saptanmıştır ($p=0,000$). KBY hastalarında, sağlıklı gruba göre daha yüksek saptanan hs-CRP düzeyleri, bu hastaların KVS hastalıkları açısından daha yüksek morbidite ve mortalite riskine sahip olduklarını desteklemektedir.

KDOQI'nın MDRD çalışmasında evre III-IV KBY hastalarında diğer bilinen kardiyovasküler risk faktörlerinin de risk modeline eklenmesi ile birlikte düzeyi yüksek CRP düzeylerinin kardiyovasküler mortalite riski ile ilişkili olduğu görülmüştür. (44).

Evre III-IV KBY hastalığı olan 1678 hastanın katılımcı olarak alındığı ve 108 ay boyunca izlendiği Weiner ve arkadaşlarının yürüttüğü çalışmada CRP ve fibrinojen düzeyleri Mİ ve strok ve diğer mortalite nedenleri ile bağımsız olarak ilişkilidir (102).

Evre IV-V henüz diyalize alınmamış 25, periton diyalizi tedavisi gören 22 ve hemodiyaliz tedavisi gören 23 hastayı kapsayan 70 KBY hastası ile 69 sağlıklı katılımcının katıldığı, Gómez ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada CRP'nin, KBY hastalarında RRT alan hastalara göre belirgin yüksek olduğu ancak ikisi arasındaki korelasyonun net olmadığı gösterilmiştir. Çalışmada kardiyovasküler hastalıklarda ateroskleroz için öngördürücü olan diğer inflamasyon belirteçlerinin de KBY ve böbrek nakil hastalarında kontrol grubuna göre belirgin yüksek saptanmıştır ve bu belirteçlerin düzeylerinin, GFR düşüşü ile orantılı olduğu gösterilmiştir (103).

Böbrek nakli grubunda hs-CRP düzeyleri, sağlıklı gruba göre daha yüksek bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlılık yoktu ($p=0,052$). Böbrek nakli grubumuzun VKİ'si kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmasına rağmen literstür bilgileri doğrultusunda yüksek olması beklenen hs-CRP düzeylerinin

beklendiği gibi yüksek olmadığı gözlenmiştir. Bunun nedeninin farklı bir etkinin örnek olarak hastaların aldıkları ilaçların (immünsüpresifler, antihipertansifler vs.) olabileceği öne sürülebilir.

Çalışmamızda IL-6 düzeyleri her üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,000$). Kontrol grubunda VKİ ile IL-6 ve hs-CRP düzeyleri arasında zayıf bir korelasyon (sırası ile $\rho=-0,229$, $\rho=-0,222$) bulunurken, hasta grubunda aynı düzeyde korelasyon sadece VKİ ile IL-6 arasında saptanmıştır. hs-CRP ile anlamlı korelasyon bulunamamasının nedeni hasta grubunun kullandığı ilaçlardan (diüretikler, steroid gibi yüksek dozda alınan immünsüpresif ilaçlar) kaynaklı olduğu düşünülebilir (44). Yine her iki gruba bakıldığında bu iki iyi bilinen inflamasyon belirtecinin birbirleri ile korelasyon gösterdiği görülmektedir.

CRP, IL-6 ve albumin düzeylerini 103 diyaliz öncesi KBY hastasında çalışan Panichi ve arkadaşları, kreatinin klirensi değerleri azaldıkça CRP ve IL-6 düzeylerinin de arttığını tespit etmişlerdir. CRP ve IL-6'nın birbirleri ile ilişkili olduğu ($r = 0.35$, $p < 0.0004$). CRP and IL-6 düzeylerinin renal fonksiyona bağlı olarak değiştiğini (CRP vs. kreatinin klirensi, $r = -0.56$, $p < 0.0001$; IL-6 vs. kreatinin klirensi, $r = -0.55$, $p < 0.0001$, Spearman korelasyon katsayısı) ortaya koymuşlardır (104).

Çalışmamızda her iki hasta grubunda yüksek saptanan, hs-CRP ile IL-6 düzeylerinin GFR ve MDRD ile negatif yönde korele olduğu görülmektedir. Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda, hsCRP ile IL-6 düzeylerini ile böbrek fonksiyon belirteci olarak kullanılan kreatinin, GFR, MDRD ile ilişkili olduğunu gösterdik. Özellikle IL-6'nın hs-CRP'ye göre fonksiyon göstergeleri ile olan ilişkisi daha güçlüdür. Bulgular kreatinin klirensi azaldıkça ya da renal fonksiyon kaybına bağlı olarak inflamatuvar belirteçlerin düzeylerinin kanda yükseldiğini kanıtlar niteliktedir. İnflamatuvar belirteçlerinin düzeylerinin hem MDRD hem de GFR ile korelasyonlarının birbirleri ile benzer olması, katılımcıların idrar toplama ile ilgili uyumsuzluklarının olmadığını bize göstermektedir. Her iki hesaplamalı parametrenin de azalan böbrek fonksiyonunu evrelendirme ile ilgili doğru yön çizebileceğini düşünmekteyiz.

Laboratuvarlarda rutin kullanıma girmiş ve birçok hastalığın kardiyovasküler sistem hastalık komplikasyonları için öngördürücü olarak kullanılan hs-CRP ve IL-6

gibi bilinen inflamasyon belirteçlerinin yanında, henüz literatürde az sayıda çalışma yapılmış olan ve inflamasyon patogeneğinde rol aldığı düşünülen hepsidin ile öncül proteini olan pro-hepsidinin ve NGAL'ın, KBY ve böbrek nakli hastalarındaki ilişkisini araştırmak amacı ile yapılan çalışmamızda, bu üç parametrenin ilişkisi araştırılmıştır.

Komplike bir mekanizma üzerinden etkili olduğunu düşündüğümüz bu ilişkinin, hem demir metabolizmasındaki görevleri, hem de hs-CRP ve IL-6 gibi inflamasyon belirteçleri ile birlikte rol aldıkları inflamasyon süreci üzerinden olup olmadığı ortaya konulmaya çalışılmıştır. Hepsidin ve NGAL'ın inflamasyonla ilişkisi incelenirken, bu analitlerin düzeylerinin vücuttaki demir metabolizmasından etkilenip etkilenmediğini araştırmak amacı ile katılımcıların serumlarından, demir, serbest demir bağlama kapasitesi, total demir bağlama kapasitesi düzeyleri çalışılmış ve transferrin saturasyonu hesaplanmıştır.

Demir yer kabuğunda dördüncü sıklıkta ve insan vücudunda en fazla bulunan geçiş elementidir. Bütün aerobik organizmaların büyüme ve yaşamının sürdürmesinde, oksijen taşıyıcısı ya da elektron transfer reaksiyonlarının katalizörü, nitrojen fiksasyonu ya da DNA sentezinde gereklidir (105).

Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda demir metabolizması genellikle bozulmuştur. Bu hastalara demir tedavisi ve eritropoezi uyaran ajanlar ile tedavi sıklıkla uygulanmaktadır (105).

Son dönem böbrek yetmezliği olan hastalarda görülen kardiyovasküler hastalıkların patogeneğinde, demirin rolü henüz çok iyi anlaşılamamıştır. Ancak demir düzeyi yüksek olan hastaların (demir tedavisi alan) hastaneye yatma oranları ve mortalite oranları daha yüksek bulunmuştur (106). Demir, reaktif oksijen radikallerinin yapımını Haber-Weiss gibi oksidatif reaksiyonların katalizörlüğünü (107) yaparak artırmakta ve ortaya çıkan serbest radikaller, kardiyomyopati gibi KVS hastalıklarına yol açmaktadır (106). Bu yüzden bu hastalarda anemi tanısı konulması ve demir metabolizmasının düzenlenmesi çok önemlidir.

Diyabetik olmayan 102 periton diyaliz hastası ve serum kreatinin düzeyleri <1,5 mg/dl olan 102 sağlıklı katılımcıyla yürütülen bir çalışmada kalpte iletim fonksiyon bozukluğunu gösteren QTc dağılımının ortalama değeri kontrol grubuna belirgin uzun bulunmuştur ($69,8 \pm 40,0$ ms ve $55,2 \pm 33,6$ ms, $p < 0.01$). Demir

satürasyonu >%35,2 olan hastalarda QTc'nin 74 ms'den daha uzun olması için bağımsız bir risk faktörü olarak alınmıştır. Demir yüksekliği iletim yollarında anormalliklere neden olduğundan ani kalp ölüm riskini SDBY hastalarında artırmaktadır (106)

KBY hastalarında demir eksikliği tanısını koymada en değerli testler transferin satürasyonu ve ferritindir. Ferritin bilinen bir akut faz reaktanıdır ve inflamasyonda düzeyleri genellikle yüksek olarak saptanmaktadır. Ancak transferin satürasyonu inflamasyondan etkilenmediğinden kronik hastalık anemisini saptamada değerlidir (108).

Biz de çalışmamıza transferrin satürasyonunu hesaplayarak hastalardaki gerçek demir eksikliği varlığını saptayıp, demirin inflamasyondaki rolünü tanımlamaya çalıştık. Çalışmamızda demir düzeyi, kontrol grubu ile KBY grubu arasında ve KBY ile böbrek nakli grubu arasında anlamlı olarak farklı saptanmıştır (sırası ile $p=0,001$ ve $p=0,000$). Transplant grubunda diğer gruplara göre daha yüksek demir düzeyleri mevcuttur. Her ne kadar anemi tedavisi (oral/iv/im demir preparatları, eritropoetin analogu preparatlar) alma oranı (%68) en yüksek olan grup KBY grubu olsa da en düşük demir düzeyi ortalaması bu grupta saptanmıştır. İnflamasyon mekanizmalarının, toksik olan demiri dolaşımdan uzak tutmaya çalışmasının bu sonuçta etkili olabileceğini düşünüyoruz.

İnflamasyondan etkilenmeyen bir parametre olarak transferin satürasyonu düzeylerinde, her üç grup birbiri ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptanmamıştır. Bu sonuç her iki hasta grubunun aldıkları anemi tedavisinin etkin olduğunu ya da henüz kronik hastalık anemisi tablosunun, hastaların birçoğunda gelişmediğini öne sürebilir.

Son 10 yıldaki çalışmalar ile moleküler yapısı ve kontrol mekanizmaları daha iyi anlaşılan hepsidinin, sistemik demir metabolizmasının temel düzenleyicisi olduğu net olarak ortaya konulmuştur. 25 aminoasitten oluşan küçük peptid yapıdaki bu hormonun çoğunlukla hepatositlerce üretildiği, vücuttan ise böbrekler tarafından uzaklaştırıldığı bilinmektedir (85, 86, 105).

Kulaksız ve arkadaşları, hepsidin sentezinin karaciğer yanında böbreklerde de gerçekleştiğini ayrıca vücuttan uzaklaştırılmasında da hepsidinin rol aldığını öne sürmüşlerdir. Hemi-hepatektomi yapılan yedi karaciğer metastazı olan hastadan

alından karaciğer örneklerinde immünohistokimyasal, RT-PCR, western blot ve immünfloresan analiz incelemeleri gerçekleştirilmiş ve hepsidin sentez ve regülasyonunun karaciğer hepatositlerinde gerçekleştiği görülmüştür. Aynı hastaların idrar örneklerinden ELISA ile hepsidin düzeylerinin yüksek olduğu saptanmış ve hepsidinin vücuttan uzaklaştırılmasında böbreğin etkin olduğu öne sürülmüştür (109).

Yalnız demir metabolizmasının düzenleyicisi olarak bilinen hepsidinin, inflamatuvar süreçte IL-6 kontrolünde salınan akut faz proteini olduğu son yıllardaki çalışmalarca ortaya konulmaktadır. İnflamasyon ve infeksiyonlar süresince, hepsidin artışı ekstraselüler demir düzeylerini düşürerek mikroorganizmalar için gerekli olan demirin kullanımını engellemektedir. Hepsidinin öncül proteini olan ve 60 aminoasitten oluşan prohepsidin hepatositin bazolateral membranından dolaşıma verilir.

Nemeth ve arkadaşlarının yılında yaptığı çalışmada, kanda hepsidin düzeyinin artışının IL-1 ya da TNF- α uyarısı ile değil sadece IL-6 injeksiyonu ile gerçekleştiğinden, hepsidin tip II akut faz reaktanı olarak sınıflandırılmıştır (110).

Wrighting and Andrews grubunun ve Truksa ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda inflamasyon uyarısına yanıt olarak hepsidin düzeyinin düzenlenmesinin, IL-6'nın Jak/STAT sinyal yolağı ile gerçekleştiği ortaya konmuştur (111,112).

Bizim çalışmamızda, hepsidinin IL-6 ile hasta grubunda orta derecede korelasyon ($\rho=0,571$) göstermesi, hepsidinin IL-6 kontrolünde sentezlenip salgılandığını ve kronik inflamatuvar süreci değerlendirmede etkin olabileceği görüşünü desteklemektedir.

Hepsidinin keşfinden bu yana yapılan çalışmalar, genellikle hayvan ve in vitro ortamda gerçekleştirilen deneylerdir. Serum prohepsidin tayini için kantitatif yöntemler kullanılırken, birçok teknik problem güvenilir ve rutin aktif 25 aminoasitlik hepsidin ölçümünü önlemektedir (113).

Küçük ve kompakt yapıda bir peptid olması, parçalar arası sıkı bütünlük, antijen uygunsuzlukları uygun bir immünokimyasal yöntemin geliştirilmesine engel olmaktadır (114). Prohepsidin ölçüm sonuçları ile birçok klinik çalışma gerçekleştirilmekte ancak prohepsidinin hepsidin ile biyolojik ilişki ve uygunluğu net

değildir (115) Prohepsidin, demir metabolizması değişikliklerinden çok inflamasyon uyarıcıları ile düzeyi değişen bir parametredir. Hem teknik problemler nedeniyle hem de hepsidin inflamasyon süreci ile birlikte demir metabolizması kontrolünde rol almasından dolayı, inflamasyon değerlendirmesinde prohepsidin ek olarak çalışılması bu süreç hakkında bilgi verebilmesi açısından değerlidir.

Bizim çalışmamızda hepsidin düzeyini saptamadaki bahsedilen sıkıntılar nedeni ile hepsidin yanında prohepsidin düzeylerinin tayini de gerçekleştirilmiştir ve birbirleri ile anlamlı ilişki ($\rho=0,195$) bulunamamıştır. Bu da birbirleri ile olan zayıf biyolojik ilişkiyi destekleyen bir bulgudur. Hepsidin düzeyleri, her üç grup birbirleri ile karşılaştırıldığında birbirinden anlamlı olarak farklı bulunurken ($p=0,000$), prohepsidin KBY grubunda kontrol ve böbrek nakli gruplarına göre yüksek bulunmuştur.

Hasta gruplarında, prohepsidin düzeylerinin hem demir parametreleri hem de sitokinler ile zayıf ya da yok denecek kadar korelasyon göstermesi klinik izlem ve araştırma açısından yararlı bir biyobelirteç olmadığı kanısını ortaya koymuştur.

Lipokalinler, immün yanıt, hücre büyümesi, proliferasyon ve metabolizması, demir transportını ve prostaglandin sentezi gibi birçok farklı fonksiyona sahip proteinlerdir. Lipokalin protein ailesinin bir üyesi olan NGAL, farklı inflamatuvar süreçlerde sentezi uyarılan bir akut faz proteindir. NGAL, akut böbrek hasarında düzeyi dramatik olarak yükseldiği, özellikle de böbrek nakli sonrası erken dönemde düzey takibi ile hiperakut ve akut red durumlarında izlem belirteci olarak laboratuvar rutinine girmiş olan bir parametredir. Böbrek tübüllerinin hasar görmesinin ardından geçen birkaç saat içinde, NGAL mRNA'sı uyarılarak sentezi artmaya başlar (84).

Mishra ve arkadaşlarının sisplatin (nefrotoksik ajan) intraperitoneal olarak vererek, farelerde gerçekleştirdiği çalışmada, üç saat içinde farelerin idrarında NGAL düzeylerinin artmış olarak bulunduğu Western analizi yöntemi ile saptanmıştır. İmmüno floresan yöntemi ile incelenen böbrek dokusunun en çok proksimal tübüllerinde NGAL sentezinin gerçekleştiği görülmüştür. NGAL ile birlikte düzeyi izlenen serum kreatinin ve idrar n-asetil- β -D-glukozaminidazın, 96 saat sonra artmış düzeylere ulaştığı görülmüştür. Bu nedenle NGAL böbrek hasarı belirlenmesinde hassas bir belirteç olarak kabul edilmektedir (116).

Aynı çalışma grubunun izlediği, 13'ü kadavradan, 12'si canlı vericiden böbrek nakli yapılan hastanın, ameliyat sonrası idrar ve serum NGAL seviyelerinin, iskemi süresi ($\rho = 0.87$; $p = 0.001$) ve serum kreatinini ($\rho = 0.86$; $p = 0.001$) ile güçlü korelasyon gösterdiği ortaya konulmuştur (117).

Son yıllarda yapılan çalışmalar NGAL'ın küçük demir taşıyan molekülleri (sideroforlar) bağladığını ve bunun da bakteriyel infeksiyon ve böbrek hasarı gibi süreçlerde önemli yer tuttuğunu göstermiştir. NGAL bir bakteriyostatik ajan gibi davranarak bakterinin gelişme ve büyümesi için gerekli olan demiri hapsederek, demirin kullanılmasını engellediği öne sürülmektedir. NGAL sadece hem yapısında olmayan demiri bağlar (117, 118).

Goetz ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada inflamasyon/infeksiyon bölgesinde NGAL'ın nötrofiller tarafından salgılandığı ve bakteriyel ferrik sideroforları hapsederek kullanımını engellediğini öne sürmüşlerdir. (118)

Flo ve arkadaşlarının NGAL defektli farelerde yürüttükleri çalışmada, deneklerin gr(-) bakteriyel infeksiyonlarına olan duyarlılıklarının ve sepsisten ölüm risklerinin arttığı görülmüştür (119).

NGAL'ın ekzojen bakteriyel infeksiyonlara karşı immün sistemin önemli bir parçası olduğu ileri sürülmektedir. Schmidt ve arkadaşları distal nefron-üriner NGAL'ın alt üriner infeksiyonlardan kaynaklanan infeksiyonların üst üriner sisteme taşınmasını önleyen profilaktik antimikrobiyal bir molekül olduğunu, akut ve kronik böbrek yetmezliğinde sentezlendiğini ortaya koymuşlardır. NGAL hapsediği demiri canlı hücrelere büyüme ve gelişme için transfer edebilmektedir. Hasar bölgesinden demiri uzaklaştırarak NGAL, demir aracılı ortaya çıkan sitotoksisteyi engellemiş olabileceği düşünülmektedir. Bu koruyucu etkiler, demirin ve sideroforların proksimal tübüle taşınması ile etkin olabilmektedir (85, 86, 87).

Son yapılan çalışmalar NGAL'ın, KBY'ne adaptasyon sürecindeki rolünü ortaya koymaktadırlar. Hipotezlere göre kronik böbrek hasarı, bu proteinin fizyolojik dengesini akut hasardakine benzer şekilde etkilemektedir. Kronik olarak hasar gören böbrek tübülleri çok miktarda NGAL üretir. Sonuç olarak artan NGAL düzeyleri azalmış klirensten dolayı vücuttan uzaklaştırılamamasının değil, artmış yapımının bir sonucudur (87).

Çalışmamızda, her üç grup birbiri ile karşılaştırıldığında, NGAL düzeyleri gruplar arasında anlamlı farklılık göstermektedir ($p=0,000$). En yüksek düzey ortalamasına sahip grup KBY grubudur. Bu bulgu, kronik hasarın bu proteinin yapımını artırdığını desteklemektedir. Böbrek nakli grubunda ise beklenen değerlerden daha yüksek düzeyde saptanan NGAL'ın sürekli alınan kalsinörün inhibitörü ilaçların toksik hasarından ve kronik böbrek allograft yetmezliğinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (87).

Hasta grubunda, NGAL ile kreatinin ile pozitif yönde ($\rho=0,347$), GFR ($\rho=-0,295$) ve MDRD ($\rho=-0,360$) değerleri ile negatif yönde korele bulduk.

Davide Bolignano ve arkadaşlarının farklı derecelerde böbrek fonksiyon kaybına sahip 96 KBY hastası ve 14 sağlıklı katılımcı ile yürüttüğü çalışmada, NGAL düzeylerinin KBY hastalarında kontrol grubuna göre yüksek bulmuşlardır. KBY grubunda hesaplanmış GFR değerinin NGAL ile negatif yönde korele olduğu görülmüştür ($\rho=-0,41$) (120).

Malyszko ve arkadaşlarının 32 sağlıklı, 80 diyabetik olmayan böbrek nakli yapılmış hasta ile 80 diyabetik olmayan evre II-IV KBY hastası ile yürüttüğü çalışmada NGAL düzeyleri, nakil ve KBY grubunda sağlıklı katılımcılara göre anlamlı olarak yüksek saptamıştır. Korelasyon analizinde NGAL'ın güçlü olarak kreatinin ile korele olduğu bulunmuştur (KBY grubu için $r=0,41$ ve böbrek nakli grubu için $r=0,78$) (102).

Hem NGAL hem de hepsidinin antimikrobiyal etkileri mevcuttur. NGAL sideroforları bağlayarak bakterinin, enteroşelin-spesifik demir alım ve kullanımını engellerken; bir akut faz reaktanı olarak hepsidinin bakteriler ile temas halinde antibakteriyel fonksiyon görmektedir. Bakteri kökenli sideroforlar konaktan demiri transferin ya da laktoferrinden geri almaktadır. Laktoferrin demiri direkt olarak şelatlar, NGAL ferrik siderofor kompleksindeki demiri bağlar. Konak, demir bağlayan proteinlerin (transferin) sentezini artırarak, diyetdeki demirin absorpsiyonunu azaltarak, demir depo eden proteinlerin düzeyini artırarak ve nötrofillerden apolaktoferrin salgılama yolu ile demirin hapsolmasını sağlayarak savunma mekanizmaları geliştirmektedir. Hepsidinin, demirin makrofajlarda tutulmasını uyararak bakterinin bu elementten mahrum kalmasını sağladığı düşünülmektedir. Akut faz proteini olan hepsidin hipoferremiye neden olarak

antimikrobiyal aktivite gösterebileceği düşünülmektedir. Hem NGAL hem de hepsidin inflamasyon ile ilişkilidir. Benzer olarak NGAL'ın da, bakteriyel katekolat tip ferrik sideroforları bağlayarak demiri hapsediği ve bakteriyostatik bir rol oynadığı düşünülmektedir. NGAL'ın, hepsidin gibi bir doğal antibakteriyel faktör olarak davranabileceği düşünülmektedir. Mikroorganizmalar kendi demir desteklerini kaybetmemek için birçok mekanizma barındırmaktadırlar. En iyi bilinen mekanizma, en güçlü demir şelatörleri ve demiri laktoferrin ve transferinden geri alabilme kabiliyetinde olan sideroforların sentezidir. Bir antibakteriyel defensin olan ve karaciğerde IL-6 stimülasyonuna yanıt olarak salınan hepsidin, barsaklardan demir emilimini engeller ve makrofajlardan demir salınımını kısıtlar(122).

Çalışmamızda hepsidinin de demir metabolizmasında düzenleyici rol oynaması ve inflamatuvar süreçle birlikte böbrek hasarını tetiklemesi göz önünde bulundurularak NGAL ile arasındaki ilişkiyi ortaya koymayı amaçladık. Hepsidin ve NGAL, böbrek fonksiyon göstergeleri ile ilişkili bulunmuştur. GFR ve MDRD ile negatif ilişkili olarak artan bu parametreler KBY evreleri ilerledikçe inflamasyon durumunu yansıtabilecekleri görüşünü desteklemektedir. Ayrıca IL-6 ile olan orta derecedeki korelasyonları (hepsidin vs. IL-6 $\rho=0,571$) (NGAL vs. IL-6 $\rho=0,343$) da inflamatuvar durumla ilişkili olduklarına bir kanıt niteliğindedir.

Hem NGAL hem de hepsidin için, validasyonu gerçekleştirilmiş yöntemlerin ve yeterli, güvenilir verilerin yokluğu; bu iki parametre arasındaki ilişkinin tartışma konusu olmasını sağlamaktadır. Yapılacak yeni araştırmalar ile bu potansiyel etkileşimi daha da aydınlatılabileceği ümit vericidir. Hepsidinin ölçümü için hem serum hem de idrarda görüş birliği sağlanmış bir yöntem yoktur.

Son yıllarda yapılan çalışmalar birçok farklı hepsidin çalışma yöntemini karşılaştırmaktadır. Kütle spektrofotometrisi (SELDI-TOF MS, MALDI-TOF MS, LC-MS/MS, IC-TOF-MS) ve immünokimyasal yöntemler geliştirilen yöntemlerdir. Halen, standart ya da referans yöntem mevcut değildir. Bununla birlikte kütle spektrofotometre yöntemi biyoaktif hepsidin-25 tayininde diğer formları ayırdığı için üstündür. Bu özellikle KBY gibi farklı hepsidin izoformlarının bulunduğu durumlar için uygundur (113). ELISA ve RIA yöntemleri hepsidin tayininde kullanılabilir. NGAL düzeyinin hem idrar hem de serumda belirlenmesi için

ticari kitler bulunmaktadır. Ayrıca hasta başı testler ile tam kan ya da plazmadan 15 dakika içinde mikrolitre hacmindeki örnekler ile kolayca ölçüm yapılabilmektedir.

Yüzsekseniki kronik hemodiyaliz hastası ile 30 sağlıklı katılımcı ile Jolanta Malyszko ve arkadaşlarının yürüttüğü çalışmada NGAL, hsCRP ($r = 0.32$, $p = 0.001$), IL-6 ($r = 0.26$, $p = 0.01$), prohepsidin ($r = 0.17$, $p = 0.05$), hepsidin ($r = -0.28$, $p = 0.01$) ile korelasyonları sırasıyla verilmiştir.

Bizim çalışmamızda da benzer korelasyonlar bulunmuştur. NGAL ile hepsidin arasında pozitif yönde zayıf derecede korelasyon ($\rho = 0,229$) saptanırken, pro-hepsidin arasındaki ilişki daha zayıftır ($\rho = 0,195$).

Sonuç olarak KBY’de subklinik bir inflamatuvar durum söz konusudur. Ayrıca fonksiyonunu kaybetmiş bir immün sistem de bu duruma eşlik etmektedir. Hem NGAL hem de hepsidin, KBY’de yükselmiş düzeylerinin; sadece demir metabolizmasındaki ortak fonksiyonlarından değil ayrıca inflamasyon ile ilişkilerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Tablo 14 ve 15’te daha önce verilen korelasyon analiz tablosundan inflamasyon parametreleri ile böbrek fonksiyonu ve demir metabolizması arasındaki ilişkilerin önemlileri özetlenerek verilmiştir.

Tablo 14: İnflamasyon parametrelerinin böbrek fonksiyon göstergeleri ile ilişkileri

	Hepsidin	Prohepsidin	NGAL	IL-6	hs-CRP
Kreatinin	$r = 0,432$ $p = 0,000$	$r = 0,080$ $p = 0,314$	$r = 0,347$ $p = 0,000$	$r = 0,528$ $p = 0,000$	$r = 0,261$ $p = 0,001$
GFR	$r = -0,342$ $p = 0,000$	$r = -0,053$ $p = 0,503$	$r = 0,295$ $p = 0,000$	$r = -0,398$ $p = 0,000$	$r = -0,392$ $p = 0,000$
MDRD	$r = -0,466$ $p = 0,000$	$r = -0,125$ $p = 0,112$	$r = -0,360$ $p = 0,000$	$r = -0,578$ $p = 0,000$	$r = -0,309$ $p = 0,000$

Tablo 15: Hasta grubunda inflamasyon parametrelerinin demir, TDBK ve Tfr sat. ile ilişkisi

	Hepsidin	Pro-hepsidin	NGAL	IL-6	hs-CRP
Demir	$r = -0,128$ $p = 0,106$	$r = -0,003$ $p = 0,965$	$r = -0,176$ $p = 0,025$	$r = 0,250$ $p = 0,001$	$r = -0,293$ $p = 0,000$
TDBK	$r = -0,337$ $p = 0,000$	$r = -0,214$ $p = 0,006$	$r = -0,089$ $p = 0,262$	$r = -0,309$ $p = 0,000$	$r = -0,241$ $p = 0,002$
Tfr sat.	$r = -0,005$ $p = 0,947$	$r = 0,069$ $p = 0,383$	$r = -0,128$ $p = 0,106$	$r = -0,111$ $p = 0,159$	$r = 0,021$ $p = 0,787$

Tablolar incelendiğinde inflamasyon parametrelerinin böbrek fonksiyon göstergeleri ile olan ilişkilerinin, demir metabolizması belirteçleri ile olan ilişkilerinden daha kuvvetli olduğu anlaşılmaktadır. Yapılan çoklu regresyon analizinde ise hepsidin için NGAL,IL-6 ve MDRD'nin, NGAL için ise MDRD, IL-6 ve kreatinin öngördürücüler olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar, inflamasyonun değerlendirmesinde böbrek fonksiyon kaybının önemini belirtmektedir.

Demir, muhtemelen kronik hastalık anemisinin gelişiminde de inflamasyon aracılıklı yolları kullanarak etkili olmaktadır. Fare modelinde oluşturulan inflamasyonla indüklenen aneminin, anti-hepsidin antikorları ile tedavi edilmesi sonucu demir metabolizmasının düzenlendiğini Sasu ve arkadaşları 2010 yılında yürüttükleri çalışmada göstermişlerdir. (121). Belki de bu tedavi şeklinin insanlarda da etkili olabileceği, aynı etkinin NGAL'ın demir metabolizması düzenlenmesi ve anemiye katkısı göz önüne alınarak tedaviye yön verebileceği tartışma konusudur.

Çalışmamız sonucu elde ettiğimiz verilere göre, hepsidin, ngal, IL-6 prohepsidin ve hs-CRP KBY hastalarında inflamasyonu değerlendirmede değerli parametreler olabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızın KBY hastalarında inflamasyonu değerlendirmesi konusunda yeni çalışmalar için örnek veri yönünden destek olacağını umuyoruz.

SONUÇLAR

- Kontrol ile KBY grubu arasında anlamlı fark olmayanlar yaş ($p=0,182$), VKİ ($p=0,766$) ve transferrin saturasyonudur ($p=0,999$).
- Kontrol ile böbrek nakli grubu arasında anlamlı fark olmayanlar demir ($p=0,973$), transferrin saturasyonu ($p=0,165$), hs-CRP'dir ($p=0,052$).
- KBY ile böbrek nakli grubu arasında anlamlı fark olmayanlar SDBK ($p=0,149$), transferrin saturasyonu ($p=0,155$), hs-CRP ($P=0,107$) ve pro-hepsidin ($p=1,000$).
- Kontrol ile KBY arası anlamlı farklı olanlar kreatinin ($p=0,000$), GFR ($p=0,000$), MDRD ($p=0,000$), demir ($p=0,001$), SDBK ($p=0,000$), TDBK ($p=0,000$), hs-CRP ($p=0,000$), IL-6 ($p=0,000$), pro-hepsidin ($p=0,000$), hepsidin ($p=0,000$) ve NGAL ($p=0,000$) dir.
- Kontrol ile böbrek nakli arasında anlamlı farklı olanlar yaş ($p=0,037$), VKİ ($p=0,002$), kreatinin ($p=0,043$), GFR ($p=0,000$), MDRD ($p=0,000$), SDBK ($p=0,005$), TDBK ($p=0,000$), IL-6 ($p=0,000$), pro-hepsidin ($p=0,000$), hepsidin ($p=0,000$) ve NGAL'dır ($p=0,000$).
- KBY ile böbrek nakli arasında anlamlı farklı olanlar yaş ($p=0,000$), VKİ ($p=0,018$), kreatinin ($p=0,000$), GFR ($p=0,000$), MDRD ($p=0,000$), demir ($p=0,000$), TDBK ($p=0,000$),), IL-6 ($p=0,000$), hepsidin ($p=0,000$) ve NGAL'dır ($p=0,000$).
- Hasta grubunda (KBY+böbrek nakli) hepsidin ile NGAL, pro-hepsidin, yaş, kreatinin, MDRD, GFR, SDBK, TDBK ve VKİ zayıf ilişkili (ρ 0.000-0.49 aralığında), IL-6 ile orta derecede ilişkili bulunmuştur ($\rho=0,571$).
- Hasta grubunda (KBY+böbrek nakli) NGAL ile hepsidin, yaş, kreatinin, MDRD, GFR, demir, hs-CRP ve IL-6 zayıf ilişkili bulunmuştur (ρ 0.000-0.49 aralığında).

- Regresyon analizine göre hepsidin için öngördürücüler NGAL (beta=5,64, p=0,016) ve IL-6 (beta=0,75, p=0,000), MDRD (beta=-,454, p=0,000), NGAL için ise MDRD (beta=-0,015, p=0,000) IL-6 (beta=0,011,p=0,012), kreatinin (beta=0,203, p=0,006)dir.

KAYNAKLAR:

1. Akpolat T, Utaş C, Süleymanlar G. Nefroloji El Kitabı, Akpolat T, Yalçın A. U. ed. Kronik Böbrek Yetmezliği İstanbul, Güzel Sanatlar Matbaası, 2011:273–305
2. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease, 2013(3);1
3. Yağcı N, Ağırcan D. Son Dönem Böbrek Yetersizliğinin Mobilite ve Denge Üzerine Etkisinin İncelenmesi: Kontrollü Bir Çalışma, Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi 2012; 21 (3): 262–266
4. Levey A. S, Eckardt K, Tsukomoto Y, Levin A, Coresh J, Rossert J et. al. Definition and classification of chronic kidney disease : A position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO), Kidney International, 2005;67: 2089–2100
5. Clinical Practice Guidelines For Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification, National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (NKF/DOQI),2002:43-45
6. Serdengeçti K, Süleymanlar G, Altıparmak M. Türkiye’de Nefroloji- Diyaliz ve Transplantasyon Raporu, İstanbul, Türk Nefroloji Derneği Yayınları, 2011: 61–70
7. Matovinović M.S. Pathophysiology and Classification of Kidney Diseases - eJIFCC <http://www.ifcc.org>, 03 Mart 2013 tarihinde ulařılmıştır.
8. Atlas of Chronic Kidney Disease in The United States, United States Renal Data System 2011 ANNUAL DATA REPORT Volume One, Chapter twelve, 2011:291–302
9. KDOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Anemia in Chronic Kidney Disease American Journal of Kidney Diseases, 2006;47(5):16–21
10. Agarwal R, Light R. P., Bills J. E., Hummel L. A. Nocturia, Nocturnal Activity, and Nondipping, Hypertension, 2009;54(3): 646–651.
11. Choudhury D., Ahmed Z. Drug-associated renal dysfunction and injury, Nature Clinic Practice Nephrology, 2006;2(2):80–91
12. Palatini P., Glomerular hyperfiltration: a marker of early renal damage in pre-diabetes and pre-hypertension [Editorial] Nephrol Dial Transplant (2012) 0: 1–7

13. Menon M. C., Chuang P. Y, He C. J. The Glomerular Filtration Barrier: Components and Crosstalk, *International Journal of Nephrology* 2012:1-9
14. Kalman S. Renal zedeelenmede sitokinler ve büyüme faktörleri, *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 2002;11(3):140-143
15. Pillebout E, Burtin M, Yuan H. T, Briand P, Woolf S. A, Friedlander G. et. al. Proliferation and Remodeling of the Peritubular Microcirculation after Nephron Reduction, *American Journal of Pathology*, 2001;(159)2:547-558
16. Levey AS, Atkins R, Coresh J, Cohen EP, Collins AJ, Eckardt K-U, Chronic kidney disease as a global public health problem: Approaches and initiatives- a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes, *Kidney International* 2007; 72(3):247-259
17. Aydın Z, Gürsu M, Uzun S, Karadağ S, Tatlı E, Şumnu A. Periton Diyalizi Hastalarında Hepsidin ile Anemi ve İnflamasyon Belirteçleri Arasındaki İlişkinin İncelenmesi: Kontrol Gruplu Çalışma *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 2012; 21(1): 66-71
18. DuBose T. D. Jr. American Society of Nephrology Presidential Address 2006: Chronic Kidney Disease as a Public Health Threat—New Strategy for a Growing Problem, *J Am Soc Nephrol* 2007;(18): 1038–1045
19. Hallan S. I Dahl K.I, M Oien C., Grootendorst D. C, Aasberg A., Holmen J., Screening strategies for chronic kidney disease in the general population: follow-up of cross sectional health survey *bmj* 2006; 333(7577):1047
20. Schoolwerth A C, ,Engelgau M.M, MD, Hostetter T. H, Rufo K. H Chianchiano D, McClellan W. M, Chronic Kidney Disease: A Public Health Problem That Needs a Public Health Action Plan, *Preventing chronic disease*, 2006;3(2):57
21. Zhang Q, Rothenbacher D. Prevalence of chronic kidney disease in population-based studies: Systematic review, *BMC public health* 2008;8:117
22. Hebert K. , Dias A., Delgado M. C, Franco E, Tamariz L, Steen D. Epidemiology and survival of the five stages of chronic kidney disease in a systolic heart failure population, *European Journal of Heart Failure* 2010;(12):861–865
23. Süleymanlar G,Utaş C, Arinsoy T, Ateş K, Altun B, Altiparmak M.R. A population -based survey of Chronic RENal Disease In Turkey—the CREDIT study *Nephrol Dial Transplant* 2011 (26): 1862–1871

24. Yalçinkaya F, Turner N, Günlemez A, Ekim M, Özkaya N, Çakmak M. Kronik böbrek yetmezlikli çocuklarda sürekli ayaktan periton diyaliz (sapd) uygulaması, Türk nefroloji diyaliz ve transplantasyon dergisi, 1997;3(4):154-158
25. Fleming G. M, Renal replacement therapy review, Organogenesis 2011;7(1):2-12
26. Akpolat T, Utaş C, Süleymanlar G. Nefroloji El Kitabı, Akpolat T, Yalçın A. U. ed. Renal Transplantasyon ve hasta seçimi, İstanbul, Güzel Sanatlar Matbaası, 2011:263–265
27. Abecassis M, , Bartlett S. T, , Collins A. J, Davis C. L., Delmonico F. L., Friedewald J. J. et. al. Kidney Transplantation as Primary Therapy for End-Stage Renal Disease: NKF/KDOQI Conference, Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN 2008;3(2):263-265
28. Coresh J, Selvin E, Stevens A. L, Manzi J, Kusek W. J, Eggers P, Lente V. F. et.al, Prevalance of Chronic Kidney Disease in the United States JAMA, 2007;298(17):2038-2045
29. Vanholder R, Massy Z, Argiles A, Spasovski G, Verbeke F, Lameire N. Chronic kidney disease as cause of cardiovascular morbidity and mortality, Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association, 2005; 20: 1048–1056
30. London G. Cardiovascular Disease in Chronic Renal Failure:Pathophysiologic Aspects, Seminars in Dialysis 2003;16(2):85-94
31. Mitja Lainščak, Cardiovascular risk in Chronic Kidney Disease , The Journal Of The International Federation Of Clinical Chemistry And Laboratory Medicine 2009; 20(1):72-75
32. Kumar V, Cotran R. S, Robbins S. L. Pathologic Basis of Disease. Philadelphia: W.B Saunders Company 2012:30-56
33. Scott A, Khan K M, Cook J L, Duronio V. What is ‘inflammation’ ? Are we ready to move beyond Celsus?, British Journal of Sports Medicine 2004 ; 38(3):248-249
34. Ferrero-Miliani L, Nielsen O. H, Andersen P. S, Girardin S. E. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1b generation , Clinical and Experimental Immunology 2006;147: 227–235

35. Martin P, Leibovich S. J. Inflammatory cells during wound repair : the good, the bad and the ugly, Trends in Cell Biology 2005;15(11):599-607
36. Punchard N. A, Whelan C. J, Adcock I. The Journal of Inflammation, Journal of Inflammation 2004;1(1):1
37. Ricciotti E, FitzGerald A. G. Prostaglandins and Inflammation, Journal of The American Herath Association, 2011;31:986-1000
38. Feghali C. A, Wright M. T. Cytokines in acute and chronic inflammation, Frontiers in bioscience: a journal and virtual library, 1997 (2): 12-26
39. Duffield S. J. The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde, Clinical Science 2003; 104, 27–38
40. Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation, Arthritis Research & Therapy,2006;8(2):53
41. Széles L, Töröcsik D , Nagy L. PPAR γ in immunity and inflammation: cell types and disease, Biochimica et Biophysica Acta ,2007 ;1771:1014-1030
42. Lam W. K. C, Inflammation, Cytokines and Chemokines in Chronic Kidney Disease The Journal Of The International Federation Of Clinical Chemistry And Laboratory Medicine 2009;2007:11-19
43. Demirçin M., Diyaliz hastalarında hepsidinin diğer inflamasyon belirteçleri ile ilişkisi (Uzmanlık Tezi); Elazığ, Fırat Üniversitesi, 2007
44. Filiopoulos V, Vlassopoulos D. Inflammatory Syndrome in Chronic Kidney Disease: Pathogenesis and Influence on Outcomes, Inflammation & Allergy - Drug Targets, 2009; 8, 369-382
45. Lim WH, Kireta S, Russ GR, Coates PT, Uremia impairs blood dendritic cell function in hemodialysis patients, Kidney International 2007;71(11):1122-1131
46. Jofre R, Rodriguez-Benitez P, Lo'pez-Go'mez M. J, Pe'rez-Garcia R. Inflammatory syndrome in patients on hemodialysis, Journal American Society Nephrology, 2006;17: 274–280
47. Cachofeiro V, Goicochea M , Vinuesa S. G, Oubin P, Lahera V , Luno J. Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease, Kidney international. Supplement, 2008;74(111):4-9
48. Meyer TW, Hostetter TH, Uremia, N Engl J Med 2007;357:1316-25

49. Meijers K.I. B, Van kerckhoven S, Verbeke K, Dehaen W, Vanrenterghem Y, Hoylaerts F. M. et. al. The uremic retention solute p-cresyl sulfate and markers of endothelial damage, American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation, 2009;54(5):891-901
50. Barreto C. F, Barreto V. D, Liabeuf S, Meert N, Glorieux G, Temmar M. et. al. Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease patients, Clinical Journal American Society Nephrology 2009;4(10):1551-1558
51. Cottone S, Lorito C. M, Riccobene R, Nardi E, Mule G, Buscemi S. et al. Oxidative stress, inflammation and cardiovascular disease in chronic renal failure, Journal of nephrology,2008;21(2):175-179
52. Naqvi B. S, Collins J. A ,Infectious complications in chronic kidney disease, Advances in chronic kidney disease, 2006;13(3):199–204
53. Johnson AM, Rohlfs EM, Silverman LM. Proteinler. Çeviren; Demir S. In: Burtis CA, Ashwood ER. Çev Editörleri; Aslan D. Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler. Beşinci Baskıdan Çeviri. Ankara: Palme Yayıncılık, 2005: 332-333.
54. Thompson D, Pepys MB, Wood SP. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine, Structure 1999; 7: 169–177.
55. Ledue B. T, Rifai N. Preanalytic and analytic sources of variations in C-reactive protein measurement: implications for cardiovascular disease risk assessment, Clinical Chemistry 2003;49(8):1258–1271
56. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. The Journal of Clinical Investigation, 2003; 111: 1805–1812.
57. Aygün G. Akut ateşle gelen hastada laboratuvarın akılcı kullanımı, Toplumdan edinilmiş enfeksiyonlara pratik yaklaşımlar sempozyum dizisi, 2008;61:31–42
58. Ünal H.Ü, Korkmaz M, Selçuk H. Kronik Böbrek Hastalarında Malnütrisyon Patogenezi ve Değerlendirilmesi, Güncel gastroenteroloji dergisi, 2009;14(2):103–111
59. Ortega O. Biomarkers in Chronic Kidney Disease-The Linkage Between Inflammation, Ventricular Dysfunction and Overhydration, Progress in Hemodialysis – From Emergent Biotechnology to Clinical Practice,2003;14:265-280

60. KDOQI Clinical Practice Guidelines for Cardiovascular Disease in Dialysis Patients, *American Journal of Kidney Diseases*, 2005;45(4):82
61. Hancı T, Türkön H, Çolak Aydoğdu A, Yıldız Ö, Karademirci İ, Çoker I. Yüksek Duyarlılıklı C-reaktif Protein (hsCRP) ve Obezite İlişkisi *Türk Klinik Biyokimya Dergisi* 2012; 10(1): 1–7
62. Yıldırım A. Yeni bir risk faktörü olarak yüksek duyarlılıklı C-reaktif protein (hs-CRP), *Türk Kardiyoloji Derneği* 2005;33: 360–371
63. Ridker P. M, Cook N. Clinical Usefulness of Very High and Very Low Levels of C-Reactive Protein Across the Full Range of Framingham Risk Scores; *Circulation* 2004;109(16):1954–1959
64. Frohlich M, Boeing H, Imhof A, Muehler R, Berg G, Brenner H. et. al. Association Between C-Reactive Protein and Features of the Metabolic Syndrome; *Diabetes Care* 2000;23:1835–1839
65. Heinrich P C., Behrmann I, Muller-newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin–6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway, *Biochemical Journal*, 1998;334: 297–314
66. Chen G, Mi J, Xiao M. Z, Fu Y. R. PDIA3 mRNA expression and IL-2, IL-4, IL-6, and CRP levels of acute kidney allograft rejection in rat, *Molecular Biology Reports*, 2012; 39(5):5233–5238
67. Varghese J. N, Moritz R. L, Lou M.-Z. , Van Donkelaar A, Ji H, Ivancic N, Branson K. M. et. al. Structure of the extracellular domains of the human interleukin–6 receptor-chain, *PNAS*, 2002;99(25):15959–15964
68. Okada R, Wakai K, Naito M, Morita E, Kawai S, Hamajima N. et al. Pro/anti-inflammatory cytokine gene polymorphisms and chronic kidney disease a cross-sectional study, *BMC Nephrology* 2012; 13(1):2
69. Tadimitsu Kishimoto, IL–6: from its discovery to clinical applications, *International Immunology*, 2010;22;347–352
70. Somers W, Stahl M, Sehra S. J. 1,9 A crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling, *The EMBO journal*;1997;(16)5: 989–997
71. Smith J. P. A, D’Aluto F, Palmieri J, Cooper A. J, Samuel J, Thompson S. et. al. Association of serum interleukin-6 concentration with a functional IL6 -6331T>C polymorphism. *Clinical chemistry* 2008;54(5):841-850

72. Memoli B, Procino A, Calabro P, Esposito P, Grandaliano G, Pertosa G. et. al. Inflammation may modulate IL-6 and C-reactive protein gene expression, *American Journal of Physiology. Endocrinology Metabolism* 2007;293(4): 1030–1035
73. Pecoits-Filho R, Lindholm B, Axelsson J, Stenvinkel P. Update on interleukin-6 and its role in chronic renal failure, *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2003;18(6):1042-1045
74. Coyne W. D. Heparin: clinical utility as a diagnostic tool and therapeutic target *Kidney International* 2011; 80(3):240–244
75. Tüzün Y, Yakut M. Demir Metabolizması ve Herediter Hemokromatozis, *Güncel Gastroenteroloji dergisi*, 2009;13(2):94-101
76. Kwapisz J, Slomka A, Zekanowska E. Heparin and its Role in Iron Homeostasis-eJIFCC <http://www.ifcc.org>, 04 Mart 2013 tarihinde ulaşılmıştır.
77. Macdougall C. I, Malyszko J, Hider C. R, Bansal S. S, Current Status of the Measurement of Blood Heparin Levels in Chronic Kidney Disease, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2010;5(9): 1681–1689
78. Ganz T, Olbina G, Girelli D, Nemeth E, Westerman M. Immunoassay for human serum heparin, *Blood*, 2008;112(10):4292-4297
79. Ganz T. Heparin- a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages, *Best Practice & Research Clinical Haematology* , 2005;18(2):171–182
80. Malyszko J, Mysliwiec M. Heparin in Anemia and Inflammation in Chronic Kidney Disease, *Kidney Blood Press Res* 2007;30(1):15–30
81. Zaritsky J, Young B, Wang H, Westerman M, Olbina G, Nemeth E. et. al. Heparin-a potential novel biomarker for iron status in chronic kidney disease *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4(6):1051-1056
82. Babitt L. J, Lin Y. H. Molecular Mechanisms of Heparin Regulation: Implications for the Anemia of CKD, *American Journal of Kidney Diseases*. 2010; 55(4): 726–741
83. Bolignano D, Lacquaniti A, Coppolino G, Donato V, Campo S, Fazio R. M. et. al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and progression of chronic kidney disease, *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 2009;4(2):337-344

84. Bolignano D, Donato V, Coppolino G, Campo S, Buerni A, Lacquaniti A et. al. Neutrophil Gelatinase–Associated Lipocalin (NGAL) as a Marker of Kidney Damage, *American Journal of Kidney Diseases*, 2008;52(3):595-605
85. Malyszko J, Kozminski P, Malyszko S. J, Koc-Zorawska E, Mysliwiec M, Macdougall I. Possible relationship between neutrophil gelatinase-associated lipocalin, hepcidin, and inflammation in haemodialysed patients, *Nephron. Clinical practice* 2010;115(4):268-275
86. Malyszko J, Kozminski P, Malyszko S. J, Koc-Zorawska E, Mysliwiec M. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in Dialyzed Patients Is Related to Residual Renal Function, and Inflammation Type of Renal Replacement Therapy *Kidney Blood Press Res* 2009;32:464–469
87. Poniatowski B, Malyszko J, Malyszko S, Bachorzewska-Gajewska H, Dobrzycki S. Serum NGAL as a marker of renal function in patients with Coroner Hearth Failure and Coronary Artery Disease *Kidney Blood Press Res* 2009;32: 77–80
88. Bolignano D, Coppolino G, Campo S, Coppolino G, Arena A, Buemi M. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Reflects the Severity of Renal Impairment in Subjects Affected by Chronic Kidney Disease *Kidney Blood Press Res* 2008;31:255–258
89. Schmidt-Ott M. K, Mori K, Yi Li J, Kalandadze A, Cohen J. D, Devarajan P. et. al. Dual Action of Neutrophil Gelatinase–Associated Lipocalin, *J Am Soc Nephrol* 2007;18:407–413
90. Devarajan P. Review: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin:A troponin-like biomarker for human acute kidney injury, *Nephrology* 2010;15: 419–428
91. Skorecki K, Green J, Brenner BM. Kronik Böbrek Yetmezliği (Çev edit: Yahya Sağlıkler), Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, et al (eds) *Harrison İç Hastalıklar Prensipleri Nobel Tıp Kitabevleri Ltd.Şti, McGraw Hill Co, İstanbul* 2004:1551– 1562
92. Akagün T, Sever M. Ş, Nakledilmiş Böbreğini Kaybetmiş Olan Hastalar, *Türk Nefroloji ve Diyaliz Transplantasyon Dergisi* 2012; 21 (3): 205-210
93. Morel O, El Ghannudi S, Jesel L, Radulescu B, Meyer N, Wiesel M. L. et. al. Cardiovascular Mortality in Chronic Kidney Disease Patients Undergoing Percutaneous Coronary Intervention Is Mainly Related to Impaired P2Y12 Inhibition by Clopidogrel, *JACC* 2011 2011;57(4):399–408

94. Tonelli M, Wiebe N, Culleton B, House A, Rabbat C, Fok M. et. al. Chronic kidney disease and mortality risk: a systematic review, *J Am Soc Nephrol* 2006;17: 2034–2047
95. Pita-Fernández S, Pértega-Díaz S, Valdés-Cañedo F, Seijo-Bestilleiro R, Seoane-Pillado T, Fernández- Rivera C. et. al. Incidence of cardiovascular events after kidney transplantation and cardiovascular risk scores: study protocol *BMC Cardiovascular Disorders* 2011;11:2
96. Shirali C. A, Bia J. M, Management of Cardiovascular Disease in Renal Transplant Recipients *Clin J Am Soc Nephrol*, 2008;3:491-504
97. Vanholder R, Massy Z, Argiles A, Spasovski G, Verbeke F, Lameire N Chronic kidney disease as cause of cardiovascular morbidity and mortality, *Nephrol Dial Transplant*, 2005;20: 1048–1056
98. Dr. Aycan Çınar, Nefroloji polikliniğimizde takip edilen periton diyalizi hastalari ile hemodiyaliz hastalarının aterosklerotik risk faktörleri açısından karşılaştırılması
99. Empana J-P, Jouven X, Canouï-Poitrine F, Luc G, Tafflet M, Haas B. et. al. C-Reactive Protein, Interleukin 6, Fibrinogen and Risk of Sudden Death in European Arterioscler *Thromb Vasc Biol.* 2010;30:2047-2052
100. Parekh S. R, Plantinga C. L, Kao W.H. L, Meoni A. L, Jaar G. B, Fink E. N. et. al. The association of sudden cardiac death with inflammation and other traditional risk factors, *Kidney International* (2008) 74, 1335–1342
101. Keller C, Katz R, Sarnak M J, Fried L. F, Kestenbaum B, Cushman M et. al. Inflammatory biomarkers and decline in kidney function in the elderly: the Cardiovascular Health Study, *Nephrol Dial Transplant*, 2010;25: 119–124
102. Weiner D.E, Tighiouart H, Elsayed E.F, Griffith J.L, Salem, D.N.; Levey, A.S.; Sarnak, M.J. The relationship between nontraditional risk factors and outcomes in individuals with stage 3 to 4 CKD. *Am. J. Kidney Dis*, 2008, 51, 212-223
103. Lavín-Gómez BA, Palomer-Fontanet R, Gago-Fraile M, Quintanar-Lartundo JA, Gamez-Palomo E, Gonzalez-Lamuno D. et. al. Inflammation Markers, Chronic Kidney Disease, and Renal Replacement Therapy, *Adv Perit Dial.* 2011;27:33
104. Panichi V, Migliori M, DePietro S, Taccola D, Bianchi A.M, Giovannini L et. al. C-Reactive Protein and Interleukin-6 Levels Are Related to Renal Function in Predialytic Chronic Renal Failure *Nephron* 2002;91:594–600

105. Malyszko J, Tesar V, Macdougall I. C, Neutrophil Gelatinase-Associated and Lipocalin What Do They Have in Common Hecpidin: There a Potential Interaction? *Kidney Blood Press Res* 2010;33:157–165
106. Wu V-C, Huang J-W, Wu M-S, Chin C-Y, Chiang F-Ti, Liu Y-B et. al. The effect of iron stores on corrected QT dispersion in patients undergoing peritoneal dialysis, *American Journal of Kidney Diseases* 2004;44(4):720–728
107. Liu R., Liu W, Doctrow S R, Baudry M, Iron toxicity in organotypic cultures of hippocampal slices: role of reactive oxygen species *Journal of Neurochemistry*, 2003;85:492–502
108. Wish B. J, Assessing Iron Status: Beyond Serum Ferritin and Transferrin Saturation Jay, *Clin J Am Soc Nephrol* 2006;1: 4–8
109. Kulaksız H, Gehrke S G, Janetzko A, Rost D, Bruckner T, Kallinowski B et. al. Pro-hepcidin: expression and cell specific localisation in the liver and its regulation in hereditary haemochromatosis, chronic renal insufficiency, and renal anaemia *Gut* 2004;53:735–743
110. Hecpidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein Elizabetha Nemeth, Erika V. Valore, Mary Territo, Gary Schiller, Alan Lichtenstein and Tomas Ganz 2003;101(79):2460-2464
111. Wrighting D M, Andrews N. C, Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3, *Blood* 2006;108(9):3204-3209
112. Truksa J, Peng H, Lee P, Beutler E, Different regulatory elements are required for response of hepcidin to interleukin-6 and bone morphogenetic proteins 4 and 9, *British Journal of Haematology*, 139, 138–147
113. Maruna P, Vokurka M, Lindner J, Plasma Hecpidin Correlates Positively With Interleukin-6 in Patients Undergoing Pulmonary Endarterectomy, *Physiol. Res.* 2011;60: 493-502
114. Piperno A, Mariani R, Trombini P, Girelli D, Hecpidin modulation in human diseases: From research to clinic, *World J Gastroenterol* 2009; 15(5): 538-551
115. Frazer D M, Anderson G J, Hecpidin compared with prohepcidin: an absorbing story, *Am J Clin Nutr* 2009;89:475–476
116. Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, et. al. Identification of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Novel Early Urinary Biomarker for Ischemic Renal Injury, *J Am Soc Nephrol* 2003;14: 2534–2543

117. Mishra J, Ma Q, Kelly C, Mitsnefes M, Mori K, Barasch J, Devarajan P, Kidney NGAL is a novel early marker of acute injury following transplantation, *Pediatr Nephrol* 2006;21: 856–863
118. Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Strong RK, The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition, *Mol Cell* 2002; 10: 1033–1043
119. Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, Strong RK et. al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 2004; 432: 917–921.
120. Davide Bolignano et. al, Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) and Progression of Chronic Kidney Disease *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4(2): 337–344.
121. Sasu B J., Cooke K. S., Arvedson T. L, Plewa C., Ellison A. R, Sheng J. et. al. Anti-hepcidin antibody treatment modulates iron metabolism and is effective in a mouse model of inflammation-induced anemia, *Blood* 2010;115(17):3616-24