

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DİYABETİK NEFROPATİDE PODOSİT
EPİTELYAL-MEZENKİMAL GEÇİŞ SÜRECİNDE
TGF- β /SMAD YOLAĞININ ROLÜ

Bilge KARATOY ERDEM

DOKTORA TEZİ

2023-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DİYABETİK NEFROPATİDE PODOSİT
EPİTELYAL-MEZENKİMAL GEÇİŞ (EMT) SÜRECİNDE
TGF- β /SMAD YOLAĞININ ROLÜ

Bilge KARATOY ERDEM

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. S. Halide AKBAŞ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2018-3935 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2023-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼ne;

Bu alışma j¼rimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Tıbbi Biyokimya Programında doktora tezi olarak kabul edilmiştir./...../2023

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. S. Halide AKBAş
Akdeniz niversitesi

.....

ye : Prof. Dr. Mutay ASLAN
Akdeniz niversitesi

.....

ye : Doç. Dr. Vural Taner YILMAZ
Akdeniz niversitesi

.....

ye : Prof. Dr. G¼zin AYKAL
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi

.....

ye : Doç. Dr. Meltem DEMİR
Antalya Bilim Üniversitesi

.....

Bu tez, Enstit¼ Y¼netim Kurulunca belirlenen yukarıdaki j¼ri yeleri tarafından uygun g¼r¼lm¼ř ve Enstit¼ Y¼netim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Melike CENGİZ

Enstit¼ M¼d¼r¼

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Bilge KARATOY ERDEM

İmza

Tez Danışmanı

Prof. Dr. S. Halide AKBAŞ

İmza

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca çalışmalarına yön veren, bana yol gösteren ve yüreklendiren, öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım tez danışmanım Prof. Dr. S. Halide Akbaş'a,

Birlikte çalıştığımız tüm araştırma projelerinde bana destek olan ve yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Vural Taner Yılmaz'a,

Tez çalışmamın araştırma ekibinde yer alan ve uygun hastaları bana yönlendiren Doç. Dr. Nusret Yılmaz'a,

Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki eğitimim boyunca yetişmemde emeği geçen tüm hocalarıma,

Tez çalışmam için hasta örneklerini toplamamda bana yardım eden ve ihtiyaç duyduğumda hep yanımda olan ekip arkadaşım Dr. Nurullah Özsarı'ya,

Varlığıma vesile olan, çalışkanlığı ve azmiyle yolumu aydınlatan ve daima kalbimde yaşayacak olan annem Firdevs Karatoy'a,

Hayatımın her aşamasında yanımda olan, bana inanan ve beni destekleyen babam Alihsan Karatoy'a,

İyi ve kötü günde yanımda olan, bana hep güvenen ve daima başaracağıma inandıran sevgili eşim Cahit Erdem'e,

Ve varlığıyla hayatımı anlamlandıran biricik kızım Beren Erdem'e,

en içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Diyabetik nefropati (DN), Diabetes Mellitus'un yaygın bir mikrovasküler komplikasyonudur. Epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) ile ilişkili podosit hasarı DN'ye neden olabilir. Bu çalışmada, podositlerde EMT sürecinde rol alan TGF- β /Smad yolağı ile ilişkili proteinlerin idrar düzeylerinin, DN tanısında erken biyobelirteç olarak potansiyel rollerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Tip 2 Diabetes Mellitus (T2DM) tanısı almış 60 hasta ve 20 sağlıklı gönüllü çalışmaya dahil edildi. Hastalar albüminüri düzeylerine göre üç gruba ayrıldı. Kan örneklerinde kreatinin, glukoz ve hemoglobin A1c (HbA1c), idrar örneklerinde albümin ve kreatinin düzeyleri ölçüldü. Tahmini Glomerüler Filtrasyon Hızı (eGFH) hesaplandı. İdrarda nefrin, podosin, podokaliksin, podoplanin, smad2, smad7 ve TGF- β 1 ELISA ile analiz edildi. Sonuçlar idrar kreatinine oranlanarak değerlendirildi. Alıcı İşlem Karakteristikleri (ROC) analizleri ile bu belirteçlerin DN tanısındaki duyarlılık ve özgüllükleri hesaplandı.

Bulgular: İdrar nefrin, podosin, podokaliksin, podoplanin, TGF- β 1, smad2 ve smad7 düzeyleri mikro ve makroalbüminürik T2DM gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti. Bu proteinlerin tümü eGFH ile negatif korelasyon, diyabet süresi, HbA1c ve idrar albümin kreatinin oranı ile pozitif korelasyon gösterdi. DN tanısında podosin, nefrin ve smad2'nin hem duyarlılık hem de özgüllüğünün mikroalbüminüriden daha yüksek olduğu gözlemlendi.

Sonuç: Bu çalışma, DN'de podosit EMT sürecinde TGF- β /Smad sinyal yolu ile ilişkili proteinlerin arttığını ve DN tanısında mikroalbüminüriye göre duyarlılık ve özgüllük açısından üstünlüklerini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: diyabetik nefropati, nefrin, podosin, smad2, smad7

ABSTRACT

Objective: Diabetic nephropathy (DN) is a common microvascular complication of Diabetes Mellitus. Podocyte damage associated with epithelial mesenchymal transition (EMT) can cause DN. It was aimed to investigate the potential roles of urinary levels of TGF- β /Smad pathway-related proteins, which are involved in the podocyte EMT, as an early biomarker in the diagnosis of DN in this study.

Methods: 60 patients diagnosed with Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) and 20 healthy volunteers were included in the study. The patients were divided into three groups according to their albuminuria levels. Creatinine, glucose and hemoglobin A1c (HbA1c) were measured in blood samples, albumin and creatinine levels were measured in urine samples. The estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR) was calculated. Nephrin, podocin, podocalyxin, podoplanin, smad2, smad7 and TGF- β 1 in urine were analyzed by ELISA. The results were evaluated with urine creatinine ratio. Sensitivity and specificity of these markers for the diagnosis of DN were calculated by Receiver Operating Characteristic (ROC) analyses.

Results: Urine nephrin, podocin, podocalyxin, podoplanin, TGF- β 1, smad2 and smad7 levels were significantly higher in the micro and macroalbuminuric T2DM groups compared to the control group. All of these proteins were negatively correlated with eGFR and positively correlated with diabetes duration, HbA1c, and urinary albumin creatinine ratio. It was observed that both sensitivity and specificity of podocin, nephrine and smad2 were higher than microalbuminuria in the diagnosis of DN.

Conclusion: This study shows that TGF- β /Smad signaling pathway-related proteins are increased during podocyte EMT in DN and their superiority over microalbuminuria in terms of sensitivity and specificity in the diagnosis of DN.

Keywords: diabetic nephropathy, nephrin, podocin, smad2, smad7

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix

1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Diabetes Mellitus	3
2.2. Diyabetik Nefropati	4
2.3. Diyabetik Nefropatide Podosit Patobiyolojisi	5
2.3.1. Böbrek Anatomisi	5
2.3.2. Diyabette Podosit Hasarının Moleküler Mekanizmaları	7
2.3.3. Podositlerin Silinmesi	7
2.3.4. Slit Diyafram	9
2.4. Podositüri	10
2.5. Podosit Hasarı ve Diyabetik Nefropati İlişkisi	11
2.6. Podosit Epitelyal Mezenkimal Geçiş (EMT) Süreci	14
2.7. Diyabetik Nefropatide TGF- β /Smad Sinyal Yolağı	16
2.7.1. Diyabetik Nefropatide TGF- β 1/Smad Sinyalinin Aktivasyonu ve Disregülasyonu	16
2.7.2. Diyabetik Nefropati Patogenezinde Smad2 ve Smad3'ün Farklı Roller	17
2.7.3. Smad7'nin Renal Fibrozis ve İnflamasyondaki Koruyucu Rolü	18
2.8. Diyabetik Nefropatide Tedavi Stratejileri	19
2.9. Biyobelirteçler Nelerdir?	21
2.10. Diyabetik Nefropati Tanısında Kullanılan Biyobelirteçler	21

2.10.1. Glomerüler Filtrasyon Hızı	22
2.10.2. Mikroalbüminüri	22
2.10.3. Yeni Biyobelirteçler	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Laboratuvar Çalışmaları	24
3.2. Kullanılan Kitler ve Sarf Malzemeleri	24
3.3. Ayrıntılı Yöntemler	25
3.3.1. Kreatinin Analizi	25
3.3.2. Albümin Analizi	25
3.3.3. Glukoz Analizi	25
3.3.4. HbA1c Analizi	25
3.3.5. Nefrin, Podosin, Podokaliksin, Podoplanin, TGF- β 1, Smad2 ve Smad7 Analizleri	25
3.4. İdrarda Nefrin Analizi	27
3.5. İdrarda Podosin Analizi	28
3.6. İdrarda Podokaliksin Analizi	28
3.7. İdrarda Podoplanin Analizi	29
3.8. İdrarda TGF- β 1 Analizi	29
3.9. İdrarda Smad2 Analizi	30
3.10. İdrarda Smad7 Analizi	30
3.11. İstatistiksel Analizler	31
4. BULGULAR	32
4.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması	32
4.2. Kan ve İdrar Parametrelerinin Gruplardaki Ortalama Değerleri ve Gruplar Arası Farkları	33
4.3. Parametreler Arasındaki İlişkiler	33
4.4. İdrar Belirteçlerinin ROC Analizleri	38
5. TARTIŞMA	42

6. SONUÇ VE ÖNERİLER	55
KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	72



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 4.1.	Gruplardaki kadın ve erkek sayıları	32
Tablo 4.2.	Gruplardaki nefropati durumu	32
Tablo 4.3.	Tüm parametrelerin çalışma gruplarındaki ortalama değerleri ve gruplar arası farklarına ait <i>p</i> değerleri	34
Tablo 4.4.	Tüm parametrelerin gruplar arası farkları	35
Tablo 4.5.	Araştırılan idrar belirteçlerinin yaş, diyabet süresi ve biyokimyasal parametreler ile anlamlı korelasyonları (<i>r</i>)	36
Tablo 4.6.	Araştırılan idrar belirteçlerinin birbirleri ile anlamlı korelasyonları (<i>r</i>)	37
Tablo 4.7.	İdrar Belirteçlerinin ROC eğrisi altında kalan alanları	38
Tablo 4.8.	İdrar Nefrin/Kr, Podosin/Kr, Podokaliksin/Kr, Smad2/Kr, Smad7/Kr, TGF- β 1/Kr, Smad2/Smad7 oranı ve albüminüri düzeylerine ait duyarlılık, özgüllük ve belirlenen kesme değerleri	40

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Glomerüler kapillerler ve bazal membrane	6
Şekil 2.2.	Glomerüler filtrasyon bariyerini oluşturan yapılar	7
Şekil 2.3.	Diyabette glomerüler bazal membran ve podositlerdeki değişiklikler	8
Şekil 2.4.	Diyabetik nefropatinin evreleri	11
Şekil 2.5.	Hipergliseminin neden olduğu podosit EMT'nin indüksiyonu ve ilerlemesinde rol oynayan moleküler mekanizmalar	15
Şekil 2.6.	Diyabetik nefropatide TGF- β /Smad yolağı sinyal moleküllerinin etkileşimi	19
Şekil 2.7.	Klinik kullanım için biyobelirteçlerin geliştirilmesindeki tipik adımlar.	21
Şekil 3.1.	Nefrin kalibrasyon eğrisi	28
Şekil 3.2.	Podosin kalibrasyon eğrisi	28
Şekil 3.3.	Podokaliksin kalibrasyon eğrisi	29
Şekil 3.4.	Podoplanin kalibrasyon eğrisi	29
Şekil 3.5.	TGF- β 1 kalibrasyon eğrisi	30
Şekil 3.6.	Smad2 kalibrasyon eğrisi	30
Şekil 3.7.	Smad7 kalibrasyon eğrisi	31

Şekil 4.1.	İdrar Nefrin/Kr, Podosin/Kr, Podokaliksin/Kr, Smad2/Kr, Smad7/Kr, TGF- β 1/Kr oranlarına ait ROC eğrileri	39
Şekil 4.2.	İdrar Smad2/Smad7 oranlarına ait ROC eğrisi	39
Şekil 4.3.	İdrar Albümin/Kr oranlarına ait ROC eğrisi	40
Şekil 4.4.	İdrar düzeyleri kesme değerlerinden yüksek olan örnek yüzdelерinin gruplara göre dağılımı	41

SİMGELER ve KISALTMALAR

AKT	: Protein Kinaz B
CD2AP	: CD2 ile İlişkili Protein
DM	: Diabetes Mellitus
DN	: Diyabetik Nefropati
eGFH	: Tahmini Glomerüler Filtrasyon Hızı
EMT	: Epitelyal Mezenkimal Geçiş
FP	: Ayaksı Çıkıntılar
GBM	: Glomerüler Bazal Membran
GFB	: Glomerüler Filtrasyon Bariyeri
GFH	: Glomerüler Filtrasyon Hızı
ILK	: İntegrin Bağımlı Kinaz
I-SMAD	: İnhibitör Smad
KR	: Kreatinin
PI3K	: Fosfatidilinositol 3 Kinaz
ROC	: Alıcı İşlem Karakteristikleri
R-SMAD	: Reseptör Smad
SD	: Slit Diyafram
SDBH	: Son Dönem Böbrek Hastalığı
T1DM	: Tip 1 Diabetes Mellitus

T2DM	: Tip 2 Diabetes Mellitus
TGF-β	: Transforme Edici Büyüme Faktörü-Beta
ZO-1	: Zonula Occludens-1



1. GİRİŞ

Diyabetik nefropati (DN), Diabetes Mellitus (DM) hastalarında meydana gelen ciddi bir komplikasyondur. DN; tüm nedenlere bağlı mortalite, kardiyovasküler hastalık ve son dönem böbrek hastalığına (SDBH) ilerleme riski artışıyla ilişkilidir.

DN patogeneğinde genetik, metabolik, hemodinamik faktörler ile fibrozis gelişimine neden olan çeşitli sitokin ve büyüme faktörlerinin rol oynadığı ileri sürülmektedir. Diyabette oluşan glikotoksisite ve hemodinamik değişiklikler, glomerüler filtrasyon bariyerinde yapısal değişikliklere neden olur. Tip 2 Diabetes Mellitus (T2DM) hastaları tanı aldıktan kısa bir süre sonra birçoğunda albüminüri gözlenir. Herhangi bir tedavi uygulanmazsa mikroalbüminürik T2DM'li hastaların %20-40'ı makroalbüminüriye ilerler. Makroalbüminürik hastaların ise %20'si SDBH'ye ilerler (Kurt ve ark., 2004).

Klinik uygulamada mikroalbüminüri DN'nin en erken belirteci olarak kabul edilse de, DN tanısında mikroalbüminürinin yeterli özgüllükte olmadığını gösteren çalışmalar vardır (Fiseha, 2015). Albüminüri, ağır egzersiz, idrar yolu enfeksiyonu, akut hastalık ve kalp yetmezliği gibi birçok nedenle ortaya çıkabilir. Bunun yanısıra DN hastalarının büyük bir kısmında böbrek fonksiyonlarındaki azalmanın, mikroalbüminüri ortaya çıkmadan önce başladığı bildirilmiştir (Robles-Osorio ve Sabath, 2014). Erken tanı ve tedavi, böbrek fonksiyon kaybını yavaşlatabileceği ve diğer olumsuz sonuçları azaltabileceğinden DN'yi erken dönemde tespit edebilecek tanısal belirteçlerin bulunması önemlidir.

DN'de hastalığın tanısal veya öngörücü biyobelirteçleri olarak podosit hasarı ve podositik proteinler yoğun bir şekilde araştırılmaktadır (Jim ve ark., 2012). Günümüzde DN sürecinde podositlerdeki patolojik değişikliklerin rolü büyük ölçüde ortaya konmuştur. Podositler, çeşitli spesifik biyobelirteçlerle tanımlanmıştır. Nefrin, podosin ve podokaliksin gibi proteinler, DN'nin de içinde olduğu çeşitli böbrek hastalıklarında görülen proteinüri ile ilişkilidir, bu nedenle mikroalbüminüriden önce bu proteinlerin idrarda saptanabilmesi nefropatilerin tanısında ümit vaat etmektedir (Kwon ve ark., 2016; Zheng ve ark., 2011).

Podosit, glomerüler filtrasyon bariyerini oluşturmaya yardımcı olan, glomerüler bazal membran ve endotel hücre tabakası ile birlikte protein kaybını önleyen özel bir visseral epitel hücresidir. DN'de podositopeni (podosit sayısının azalması) ve podositüri (idrarla podosit atılımı) olduğu iyi bilinmektedir (Nakamura ve ark., 2000; White ve ark., 2002). Podosit kaybı, glomerüler bazal membran yapısının bozulmasını hızlandırarak glomerüloskleroz sürecini başlatır. Podositopeni ve podositüri ile birlikte glomerüler filtrasyon bariyerinde oluşan bu düzensizlik proteinüriye yol açar.

Epitelyal mezenkimal geçiş (EMT), podosit hasarı ile ilişkili önemli bir patolojik mekanizmadır. EMT sürecinde epitelyal hücreler özelliklerini kaybederek mezenkimal hücrelerin özelliklerini kazanır. Transforme Edici Büyüme Faktörü-Beta1 (TGF- β 1), çeşitli epitel hücre proteinlerinin ekspresyonunu yeniden düzenleyerek, fibrotik materyallerin aşırı birikmesine katkıda bulunur ve Transforme Edici Büyüme Faktörü-Beta (TGF- β)/Smad sinyal yolağı aracılığıyla EMT'yi indükler. Progresif böbrek hastalıklarının çoğunda, podositlerde TGF- β 1 artışı gözlenir (Ying ve Wu, 2017).

DN'li hastaların glomerüler ve tübülointerstisyel hücrelerinde fosforile edilmiş Smad2 ve Smad3'ün nükleer translokasyonu ile TGF- β /Smad sinyali yüksek oranda aktive olur. TGF- β /Smad sinyalinin aktivasyonu, hem glomerüler hem de tübülointerstisyel fibrozise önemli ölçüde katkıda bulunur (Li ve ark., 2004). Fibrotik böbrekte Smad2 ve Smad3'ün aktivasyonu, TGF- β /Smad sinyal yolağında yer alan inhibitör Smad7'nin kaybı ile ilişkili bulunmuştur (Wang ve ark., 2005; Chen ve ark., 2010).

Bu çalışmada, DN'nin erken teşhisinde kullanılabilecek potansiyel üriner biyobelirteçler olarak podosit ilişkili proteinlerden nefrin, podosin, podokaliksin ve podoplanin ile podosit EMT sürecine yol açan TGF- β /Smad yolağı sinyal proteinlerinden TGF- β 1, smad2 ve smad7'nin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus (DM), klinik olarak kronik hiperglisemi ile karakterize, glukoz homeostazının metabolik bir bozukluğudur. Diyabetin küresel prevalansı son on yılda önemli ölçüde artmıştır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) tahminlerine göre, yetişkin nüfusta (18 yaş üstü) diyabet prevalansı 1980'de %4.7'den 2014'te %8.5'e yükselmiştir ve diyabetli hastaların %46'sı teşhis edilmemiş diyabetten muzdariptir (Beagley ve ark., 2014). Dünya çapında 382 milyon kişi diyabetle yaşamakta ve bu sayının 2035 yılına kadar 600 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (Guariguata ve ark., 2014). DM, mortalite ve morbiditenin yedinci önde gelen nedeni olarak kabul edilir. 2013 yılında 5.1 milyon ölümün doğrudan diyabetle ilişkili olduğu tahmin edilmektedir ve bu da tüm nedenlere bağlı ölümlerin %8.4'ü olduğu anlamına gelmektedir (International Diabetes Federation, 2015).

DM iki ana tipte sınıflandırılır: Tip 1 DM (T1DM) (İnsülin bağımlı Diabetes Mellitus) ve T2DM (İnsülin bağımlı olmayan Diabetes Mellitus). T1DM, insülin eksikliği ile ilişkilidir. İnsülin salgılanmasından sorumlu Langerhans adacıklarında bulunan pankreatik Beta hücrelerinin yok edildiği otoimmün hastalık sonucu oluşur (Forbes ve ark., 2013). T1DM her yaşta ortaya çıkabilir, ancak çocukluk döneminde yaşamın erken evrelerinde gelişme eğilimindedir. Diyabet hastalarının %5-10'unu oluşturur. Öte yandan T2DM, artan glukoz kan seviyesi uyarısına bir yanıt olarak, telafi edici hiper-insülin salgılanmasıyla birlikte periferik insülin direnci ile karakterize edilir. T2DM, diyabetik vakaların çoğunluğunu oluşturur ve yetişkinleri, özellikle de aşırı kilolu insanları etkileme eğilimindedir (Forbes ve ark., 2013).

Kronik hiperglisemi ciddi organ hasarı ile ilişkilidir. Artan ölüm oranları diyabetik komplikasyonlardan kaynaklanmaktadır. Bu komplikasyonlar akut metabolik komplikasyonlar (ketoasidoz, hipoglisemi, hiperosmolarite, laktik asidoz) ile başlamakta ve kronik hiperglisemiye maruz kalma sonucu uzun süreli vasküler komplikasyonlarla sonuçlanmaktadır. DM'nin uzun süreli vasküler komplikasyonları iki gruba ayrılabilir: makrovasküler ve mikrovasküler hastalıklar. Kardiyovasküler hastalıklar gibi makrovasküler hastalıklar, arterlerin hasar görmesinden kaynaklanır (Forbes ve ark., 2013). Retinopati, nöropati ve nefropati gibi mikrovasküler hastalıklara ise küçük damarların hasar görmesi neden olur.

Mikrovasküler komplikasyonlar morbidite ile ilişkili olmasına rağmen, kardiyovasküler hastalıklar diyabetik hastalarda ana ölüm nedenidir (Roper ve ark., 2001). Mikrovasküler ve kardiyovasküler komplikasyonların insidansı, hiperglisemiye kronik maruz kalma derecesi ile bağlantılıdır. Glukoz düzeylerinin sıkı kontrolünün diyabetik komplikasyonların azaltılması üzerindeki etkisine ilişkin kanıtlar sınırlıdır, bu konuda araştırmalar sürmektedir.

2.2. Diyabetik Nefropati

DN, diyabet tanısı alan hastaların %20-30'unda SDBH'nin önde gelen nedenidir (Wolf ve Ziyadeh, 2007; Shahbazian ve ark., 2013). SDBH'nin yüksek tıbbi maliyeti olan, kötü prognozlu ve hayatı tehdit eden bir komplikasyon olduğu bilinmektedir. 30 yıllık diyabet süresinden sonra DN'ye bağlı SDBH insidansının %3,3 olduğu gösterilmiştir (Narres M ve ark., 2016). Birçok epidemiyolojik çalışma, kronik böbrek hastalıkları ile ilişkili ölüm riskinin zamanla artma eğiliminde olduğunu belirtmektedir (Sattar ve ark., 2012; Groop ve ark., 2009). T2DM hastalarında DN prevalansı, T1DM hastalarından daha yüksek bulunmuştur (Shahbazian ve ark., 2013).

DN, hastalığın evresini belirleyen çevresel ve genetik risk faktörlerinin yanı sıra hemodinamik ve metabolik değişikliklerin bir sonucu olarak ortaya çıkar. Böbrek yapısı ve işlevindeki değişiklikler, DM'nin başlangıcından sonraki ilk birkaç ay kadar erken bir zamanda DN ile ilişkilidir. Hiperfiltrasyon ve hiperperfüzyon, meydana gelen çok erken glomerüler hemodinamik değişikliklerdir. Hiperglisemik koşulların neden olduğu böbrek kan akışının bozulmuş otheregölasyonu, afferent arteriyolün genişlemesine neden olur ve bu da glomerüler filtrasyon hızını (GFH) arttırır ve intraglomerüler basıncı indükler. Bu değişiklikler, sonunda glomerüloskleroza yol açan mezanjiyal hacim ve hücre dışı matriks genişlemesi yoluyla glomerüler hasara katkıda bulunur (Wolf ve Ziyadeh, 2007; Shahbazian ve ark., 2013). Böbrek hipertrofisi, diyabetik böbreklerin bir başka erken histolojik değişikliğidir (Rasch ve ark., 1983). Glomerüler ve tübüler hipertrofi ayrıca, Kollajen IV, Laminin, Fibronektin, vb. gibi hücre dışı matriks proteinlerinin ilerleyici birikiminin bir sonucu olarak matriks genişlemesi ve bazal membranların kalınlaşması ile de ilişkilidir. Tüm bu değişiklikler, glomerüloskleroz ve tübülointerstisyel fibrozis ile

karakterize edilen geri dönüşümsüz diyabetik böbrek hasarı gelişiminden önce gerçekleşir (Wolf ve Ziyadeh, 1999).

Günlük idrar albümin atılım hızının 30-300 mg olması ile karakterize olan mikroalbüminüri, diyabetik hastalarda ortaya çıkan en erken klinik bulgu olarak kabul edilir. Tedavi edilmediği takdirde, diyaliz ve transplantasyon gibi renal replasman tedavisi gerektiren SDBH'ye yol açan makroproteinüri (>300 mg/gün) seviyesine ilerleyebilir (Dirks ve ark., 2006). T1DM ve T2DM hastalarının yaklaşık %25-30'u diyabetin ilk 20 yılında mikroalbüminüri geliştirir (Shahbazian ve ark., 2013; Hovind ve ark., 2004).

Mikroalbüminüri, bazal membranın kalınlaşması, mezanjiyal genişleme ve matriks proteinlerinin birikmesi ile karakterize edilen erken glomerüler lezyon ile ilişkilidir (Bangstad ve ark., 1993). Bu süreçte tübülointerstisyel fibrozis ve ardından glomerüler filtrasyon hızında azalma ve tübüler hücrelerin metabolik aktivitesinde harabiyet görülür (Stitt-Cavanagh ve ark., 2009).

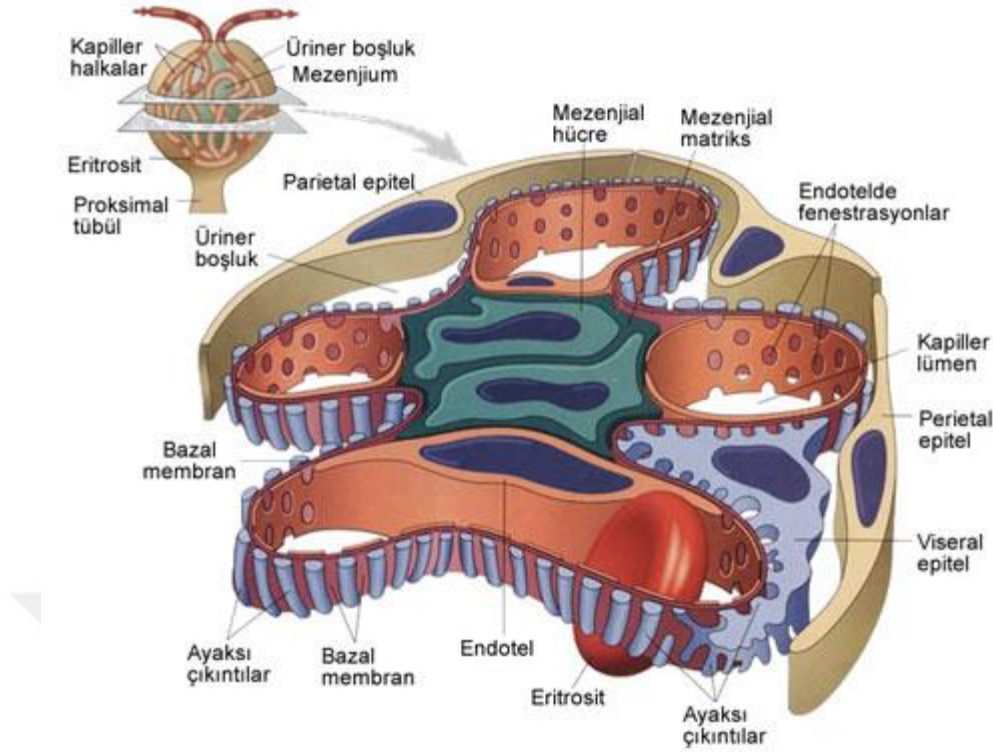
Bugüne kadar DN hastalarının tedavisinde kullanılan potansiyeli en iyi tedavi antihipertansif ilaçlardır; ancak bu ajanlar hastalığın ilerlemesini geciktirse de hasarı engellemez. Bu nedenle, hipergliseminin neden olduğu böbrek hasarının altında yatan mekanizmaların kapsamlı bir şekilde anlaşılması büyük önem taşımaktadır.

2.3. Diyabetik Nefropatide Podosit Patobiyolojisi

2.3.1. Böbrek Anatomisi

Böbreğin uzunlamasına kesiti alındığında renal korteks ve renal medulla olmak üzere başlıca iki bölge dikkat çeker. Renal korteks; glomerül adı verilen kapiller yumakların yerleştiği, böbreğin en dış kısmında yer alır. Renal medullada ise piramide benzer yapılar görülür. Medulla; glomerüllerin uzantısı olan tübüllerden oluşur ve glomerül içermez (Arınoy ve ark., 2017).

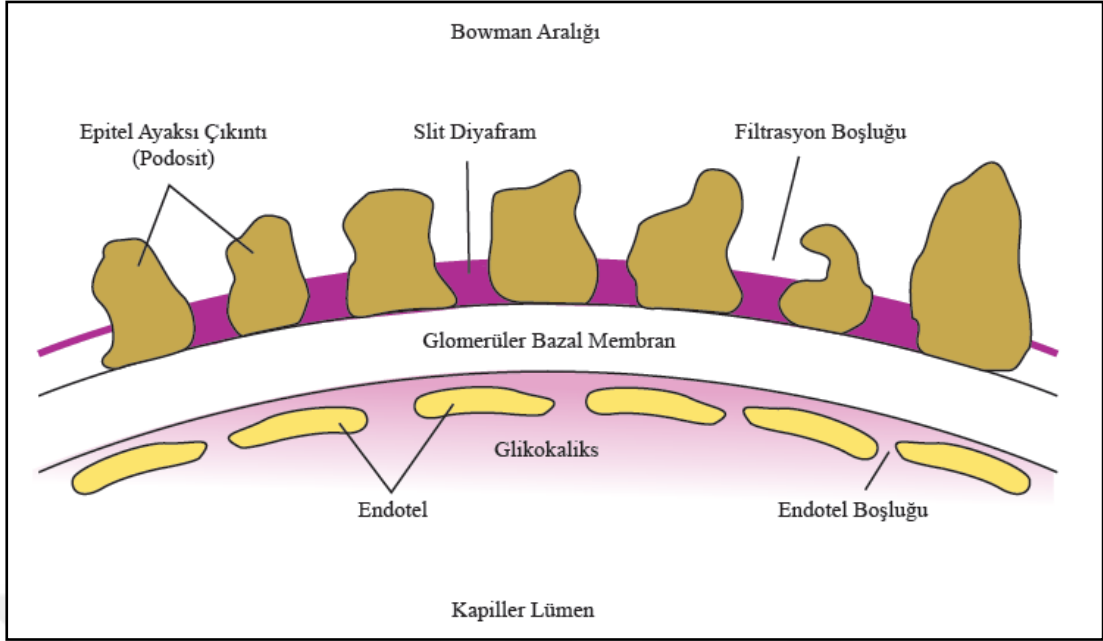
Böbreklerin en küçük fonksiyonel birimine nefron adı verilir ve her bir böbrekte 1 milyon kadar nefron bulunur. Nefronlar, glomerüler ve renal tübüler sistem olmak üzere iki kısımdan oluşur. Glomerül; glomerüler endotel hücreleri, mezengial hücreler ve podositlerden oluşan özelleşmiş bir kapiller yumaktır, tübüler sistemin başlangıcı olan Bowman kapsülüne gömülü halde bulunur.



Şekil 2.1. Glomerüler kapillerler ve bazal membran (Kumar ve ark., 2014).

Tek katlı endotel hücrelerinden oluşan özelleşmiş kan damarları glomerüler kapillerler olarak adlandırılırlar ve glomerüler bazal membran (GBM) tarafından sarılı halde bulunurlar (Şekil 2.1). Glomerüler bazal membranın dışında podosit adı verilen visseral epitel hücreleri yer alır. Podositler polarize özelliğe sahip hücrelerdir. Glomerüler kapillerlerin dışını, birbirlerine iç içe geçmiş parmaklar gibi sararlar. Podositler arasındaki boşluk ise slit diyafram (SD) denilen bir yapı ile örtülür.

Glomerüler kapillerler, endotel hücreleri ile döşelidir ve bu endotel hücreleri fenestralara (pencere) sahiptir (Şekil 2.2). Endotel hücrelerinin yüzeyi negatif yüklü glikoproteinler ve podokaliksin ile kaplıdır. Fenestralı endotel hücreleri, GBM ve podositler ile birlikte glomerüler filtrasyon bariyerini (GFB) oluştururlar. GFB'deki filtrasyon aralıkları yaklaşık 3.7×3.7 nm'dir ve 3,6 nm çapa sahip olan albümin bu aralıktan geçebilir (Arınsoy ve ark., 2017). Buna rağmen, albümin idrarda çok az miktarda görülür. Albüminin idrara geçişi, GFB'nin sahip olduğu negatif yük sayesinde engellenir. GFB'den bir molekülün geçip geçememesi o molekülün şekline, hacmine ve sahip olduğu elektriksel yüke bağlıdır.



Şekil 2.2. Glomerüler filtrasyon bariyerini oluşturan yapılar (Arınsoy ve ark., 2017).

2.3.2. Diyabette Podosit Hasarının Moleküler Mekanizmaları

Podositin benzersiz yapısı, geniş bir fonksiyon yelpazesi ile fizyolojik koşullara uygun tepkiler sunar. Ancak bu durum hücreyi hasarlanmaya karşı çok hassas hale getirir. Çeşitli patojenik (toksik, metabolik, hemodinamik) faktörlerin etkisi altında, podositlerde yapısal ve fonksiyonel değişiklikler meydana gelir (Bobkova ve ark., 2018). Podosit hasarının (podositopati) karakteristik özellikleri; ayaksı çıkıntıların (FP) genişlemesi ve silinmesi, podosit hipertrofisi, apoptoz, glomerüler bazal membrandan (GBM) ayrılma, idrar yoluyla atılım (podositüri) ve glomerüllerdeki podosit sayısının azalmasıdır (podositopeni).

Podositopati tanısı, böbrek biyopsi materyalinin morfolojik incelemesi (ışık ve elektron mikroskobu ile podositlere özgü proteinlerin immünohistokimyasal tanımlanması) veya idrar biobelirteçlerinin saptanması ve miktar tayininin yapılması ile gerçekleştirilebilir.

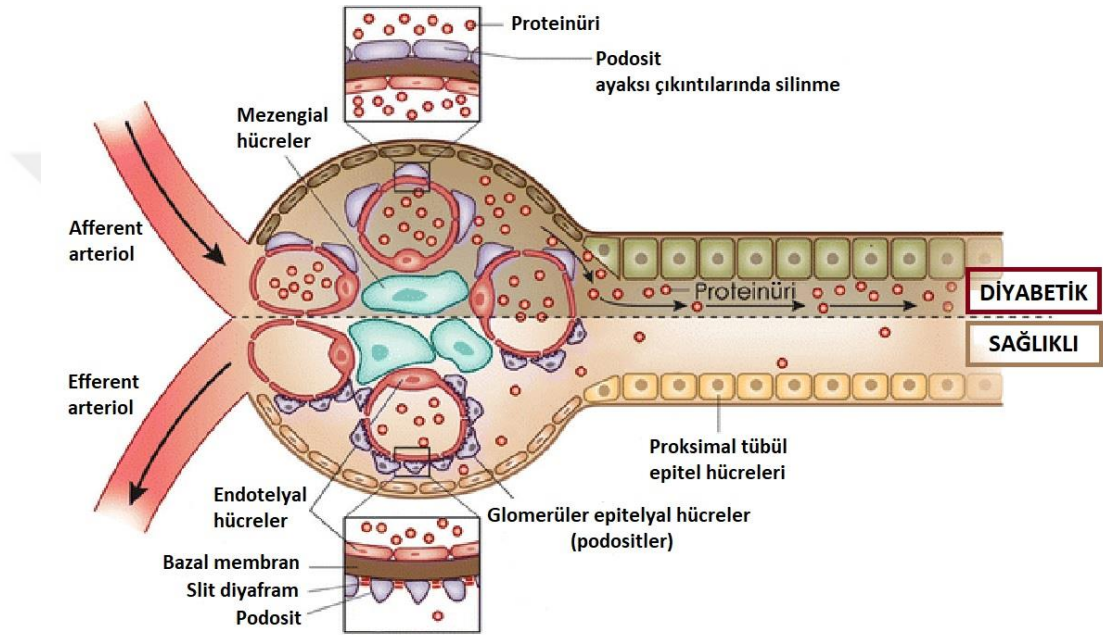
2.3.3. Podositlerin Silinmesi

Podositler, FP'nin normal hücresel yapısının değişmesine, GBM boyunca düzleşmesine, yayılmasına ve slit diyaframın bozulmasına neden olan, silinme adı verilen bir süreçten geçebilir. Silinme süreci;

- i) SD'nin bozulması ve bununla ilişkili protein-protein etkileşimleri;
- ii) FP ile GBM arasındaki işbirliğinin bozulması;

- iii) Aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi ve bununla ilişkili protein-protein etkileşimleri;
- iv) FP'nin negatif yüklü apikal yüzeyinin bozulması ile ortaya çıkabilir (Shankland, 2006).

Podosit şeklindeki değişiklik, hasarlanmayı izleyen pasif bir süreç değildir; podositlerin farklı protein alanlarının karmaşık moleküler etkileşimlerinin bir sonucudur (Armelloni ve ark., 2014).



Şekil 2.3. Diyabette glomerüler bazal membran ve podositlerdeki değişiklikler (Chadha ve Morris, 2016).

Sağlıklı glomerüllerde fenestralı endotel hücre tabakası, bazal membran ve podositler, büyük moleküler ağırlıklı proteinlere karşı geçirgen olmayan güçlü bir filtrasyon bariyeri oluşturur. Diyabette ise podositler ve bazal membranda oluşan hasar nedeniyle filtrasyon bariyeri boyunca moleküllerin geçirgenliğinde artış, bunun sonucunda da proteinüri gözlenir (Şekil 2.3).

T1DM ve T2DM'de FP genişlemesi ve silinmesi bir dizi deneysel ve klinik çalışma ile doğrulanmıştır ve bu değişikliklerin şiddeti ile albüminüri arasında doğrudan bir ilişki kurulmuştur (Wolf ve ark., 2005; Wolf ve Ziyadeh, 2007; Steffes ve ark., 2001; Vestra ve ark., 2003).

2.3.4. Slit Diyafram

Makromoleküllerin kandan idrara geçişini düzenleyen benzersiz bariyer, podositler arasındaki etkileşimi temsil eden SD'dir. Çeşitli proteinler (nefrin, CD2AP, ZO-1, FAT, nefrin benzeri-1, podosin, P-kaderin) SD yapısını belirler (Ding ve Saleem, 2012; New ve ark., 2014; Martin ve Jones, 2018).

Transmembran protein nefrin, yalnızca hücre dışı SD filtrasyon ağının temel bileşeni olarak değil, aynı zamanda hücre içinde etkileşimler yoluyla bir sinyal iskelesi olarak da işlev görür. Hücre dışında bulunan nefrin komşu FP'nin nefrin molekülleri ile bağlanır. Sitoplazmik nefrin, aktin hücre iskeletinin yeniden şekillenmesi, PI3K/Akt sinyal yolu aktivasyonu, kalsiyum sinyali ve nefrin endositozu dahil olmak üzere çeşitli hücre içi podosit yollarının düzenlenmesi için kritik olan tirozin kalıntıları üzerinde fosforile edilir (Greka ve Mundel, 2012; Genhez ve Geraldles, 2017). Nefrin, P-kaderin veya FAT gibi bağlantı proteinleri ile lokalize olur. Nefrinin podosine bağlanması, hücre sinyalleşmesinin işlevini sağlar (Martin ve Jones, 2018; Brosius ve Coward, 2014).

DN'li hastaların böbrek biyopsilerinde yapılan çalışmalarda, nefrinin glomerüler ekspresyonunun azaldığı ve bu değişikliklerin podosit FP bozukluğu ile ilişkisi ortaya konmuştur (Doublier ve ark., 2003; Jim ve ark., 2012).

Çeşitli nefropatilerde, podosit aktin hücre iskeletinden nefrinin ayrışması ve ardından nefrinin idrara atılması (nefrinüri) nedeniyle SD'de fokal kusurlar oluşturmalarının, proteinüri mekanizmalarından biri olabileceği tartışılmaktadır (Nakatsue ve ark., 2005). DM'de nefrinürinin, podosit hasarının bir belirtisi olabileceği gösterilmiştir (Jim ve ark., 2012). Kesitsel bir çalışmada Patari ve ark. T1DM'li hastaların idrarında nefrinin varlığını immünoblotlama yöntemiyle değerlendirmiş; DM olan normoalbuminürlü hastalarının %30'unda, mikroalbuminürlü hastaların %17'sinde ve proteinürlü hastaların %28'inde nefrinüri saptamış, sağlıklı bireylerde ise nefrinüri bulunmadığını bildirmişlerdir (Patari ve ark., 2003). Belinda Jim ve ark. ise T2DM hastalarında ELISA yöntemiyle kantitatif nefrinüri tayini yapmış; mikroalbuminürlü ve proteinürlü diyabetik hastaların %100'ünde ve normoalbuminürlü hastaların %54'ünde nefrinüri bulmuştur (Jim ve ark., 2012).

DN'li fare modelinde yapılan bir çalışmada saptanabilir düzeyde albüminüri gelişmeden önce üriner nefrinin ortaya çıkabileceği belirtilmiştir (Chang ve ark., 2012). Farklı yöntemlerle değerlendirilen nefrinürinin DN'nin klinik belirtileri (mikroalbüminüri, proteinüri, hipertansiyon, glomerüler filtrasyon hızı) ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (Jim ve ark., 2012; Wang ve ark., 2007; Zheng ve ark., 2011, Wickman ve ark., 2013). Ayrıca bir çalışmada nefrinüri, kronik böbrek hastalığı riski düşük olduğu düşünülen normoalbüminürik diyabetik hastalarda bile, daha düşük GFH ile ilişkilendirilmiştir (Ng ve ark., 2011). Sunulan veriler, nefrinürinin DM'deki glomerüler hasarın hassas bir göstergesi olabileceğini düşündürmektedir, bu nedenle, DN'nin erken teşhisi ve izlenmesi için iyi bir uygulama perspektifine sahiptir.

2.4. Podositüri

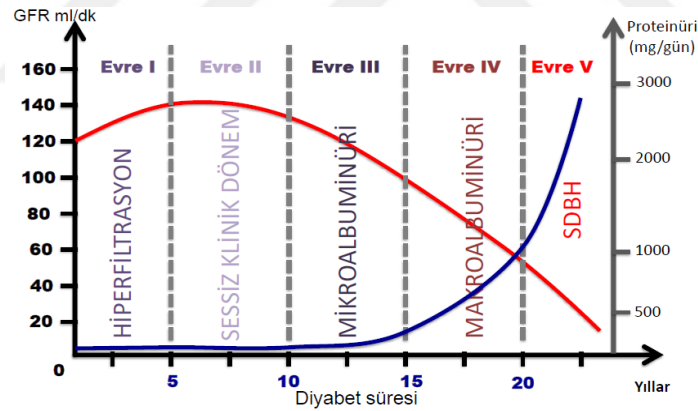
Glomerüler podosit hasarına, yalnızca yapısal veya fonksiyonel proteinlerin idrarla atılımı değil, aynı zamanda GBM'den ayrılmaları nedeniyle podositlerin kendilerinin de atılımı eşlik eder (Weil ve ark., 2012). Adezyon moleküllerinin düzeyinde veya aktivitesindeki değişiklikler, olası bir podosit ayrılma mekanizması olarak tartışılmaktadır. DN'nin deneysel modelleri ve podosit hücre kültüründe, hipergliseminin kısa süreli etkisinin bile, podositlerdeki $\alpha 3\beta 1$ -integrinler ile GBM'deki $\alpha 3\beta 1$ -integrin reseptörlerinin azalmış ekspresyonuna ve GBM'den podosit ayrılmasına yol açtığı, bunun da idrarla podosit atılımına (podositüri) neden olduğu gösterilmiştir (Vogelmann ve ark., 2003).

T2DM hastalarında, yüzey proteini podokaliksine karşı antikolar kullanarak immünofloresan ile idrar podositlerinin araştırıldığı bir çalışmada, mikroalbüminüri hastaların yarısında ve proteinüri hastaların %80'inde podositüri olduğu, ayrıca proteinüri hastaların idrarındaki işaretli podosit sayısının, mikroalbüminüri hastalardakinden önemli ölçüde daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Nakamura ve ark., 2000). Yu ve ark. podositürinin proteinüriden daha duyarlı bir glomerüler hasar belirteci olduğunu göstermişlerdir (Yu ve ark., 2005). ELISA yöntemini kullanarak idrarda podokaliksin tayininin yapıldığı bir çalışmada da normoalbüminüri diyabetik hastaların yarısında podositüri olduğu saptanmıştır (Hara ve ark., 2012). Bu araştırmaların sonuçları da podosit hasarının mikroalbüminüri oluşumundan önce ortaya çıktığını düşündürmektedir.

Başka bir çalışmada akış sitometrisi yöntemiyle, normoalbuminürlü DM hastalarında podokaliksin-pozitif podositlerin sayısının önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir. Parametrik olmayan ROC analizi ile podositüri duyarlılığının ve özgüllüğünün, DN değerlendirmesi için geleneksel olarak kullanılan kreatinin klirensinden önemli ölçüde daha yüksek olduğu doğrulanmıştır (Ye ve ark., 2014).

2.5. Podosit Hasarı ve Diyabetik Nefropati İlişkisi

Diabetes Mellitus'un en önemli mikrovasküler komplikasyonlarından biri diyabetik nefropatidir. T1DM hastalarının yaklaşık %30'unda, T2DM hastalarının %40'ında DN oluşmaktadır (Pugliese ve ark., 2020). SDBH tanısı alan hastaların önemli bir kısmını DN vakaları oluşturmakta ve bu hastalarda diyaliz ya da transplantasyon gibi renal replasman tedavilerine gereksinim duyulmaktadır. Diyabetik nefropati erken renal hipertrofik değişikliklerden, glomerul, interstisyum ve tübüler yapıların bozulmasına kadar giden süreci kapsayan bir tablodur. Bu süreç 5 evrede gerçekleşir; glomerüler hiperfiltrasyon evresi, sessiz evre, mikroalbuminüri evresi, makroalbuminüri evresi ve son dönem böbrek yetmezliği (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Diyabetik nefropatinin evreleri

DN erken tanısı için halen kullanımda olan biyobelirteç olan albuminürinin düşük duyarlılık ve geniş varyasyon gibi sınırlamaları bulunmaktadır. T2DM'li bireylerin % 29.1-61.6'sı, erken tanı için altın standart olan mikroalbuminürinin başlangıcından önce böbrek yetmezliğine sahiptir (An ve ark., 2009; Robles-Osorio ve Sabath, 2014). Örneğin; normoalbuminürik renal yetmezlikli T2DM'li hastaların tanısının, renal fonksiyonları bozuk albuminürik hastalara göre daha zor olduğu bir araştırmada belirtilmiştir (Thomas ve ark., 2009). Bu nedenle erken dönemde tanıda

kullanılabilecek yüksek duyarlılık ve özgülükte glomerüler ve tübüler biyobelirteçlere gereksinim duyulmaktadır.

Diyabette oluşan glikotoksisite ve hemodinamik değişiklikler, glomerüler filtrasyon bariyerinde yapısal değişikliklere neden olur. Glomerüler filtrasyon bariyeri içinde glomerüler endotelial hücreler, glomerüler bazal membran, podositler ve podositler arasında yer alan slit diyafram bulunmaktadır. Çoğu glomerülopatide lezyon glomerüler epitelyal hücrelerde yani podositlerdedir (Dai ve ark., 2017). Podositler glomerüler kapillerlerin dış yüzeyini kaplayan, ayaksı çıkıntılar ile oldukça özelleşmiş bir görünüm sergileyen hücrelerdir. Konjenital nefrotik sendromda ya da edinsel kazanılmış proteinürilerde ayaksı çıkıntılarda büzüşme ve silinmelerin oluşması, bu yapıların glomerüler filtrasyon bariyerinde önemli bir rol üstlendiklerini göstermektedir. Ayaksı çıkıntıları birbirine bağlayan slit diyaframların genetik defektleri sonucunda da glomerülopatiler oluşabilmektedir. Podosit disfonksiyonu, hasarı veya kaybı metabolik, genetik veya çevresel mekanizmalarla oluşan birçok glomerüler hastalıkta yaygındır ve glomerüler filtrasyon bariyerinin hasarına neden olabilir (Maezawa ve ark., 2015).

Podositler oldukça yüksek diferansiyasyon gösteren glomerüler epitelyal hücrelerdir. Ayaksı yapılar, podoplanin proteini ile GBM'ye sıkı sıkıya bağlı olan bazal, bazolateral bölge ve parietal bölgeden oluşur (Johnstone ve Holzman, 2006). Transmembran proteinler, glomerüler filtrasyon bariyerinin yapısını ve fonksiyonunu korumak için aktin hücre iskeleti ile adaptör proteinlerini bağlar. Podosit parietal bölgesinde, salgı proteinleri, negatif yüklenererek GBM'de komşu FP'ler arasındaki filtrasyon yolunu korumak için kullanılırlar (Takeda, 2003).

Podositler, DN'nin altında yatan patolojik mekanizmalarda önemli bir rol oynar. Imasawa ve ark. podosit moleküllerinin yapı ve fonksiyonunun, yüksek glukoz koşullarında transforme olduğunu şartlı olarak farklılaşan bir insan podosit hücre hattı kullanarak göstermişlerdir (Imasawa ve ark., 2016). Diyabetik nefropatide podositlerdeki ayaksı çıkıntılarda kopma, GBM incilmesi, glikokalikslerde azalma, mezengial matrikste birikim ve glomeruloskleroz oluşur.

Yapılmış DN çalışmalarında, podosit kaybı ve glomerüler hastalıkların progresyonu arasındaki korelasyon gösterilmeye çalışılmıştır (Pagtalunan ve ark., 1997). Özellikle

DN'nin erken evrelerinde podosit ekspresyonunun glomerüllerde azaldığı gösterilmiş ve proteinüri ilerledikçe podosit hasarının artış gösterdiği bildirilmiştir (Su ve ark., 2010). Çeşitli glomerüler hastalıklarda idrarda podositlerin saptanmasının glomerüllerden podosit kaybının bir göstergesi olduğu öne sürülmektedir (Hara ve ark., 1998; Marshall, 2005). Diyabetli hastaların idrarlarında podosit ile ilişkili çeşitli proteinlerin atılımının daha çok olduğunun gösterilmesi bu proteinlerin DN'de erken böbrek hasarı için potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir (Kandasamy ve ark., 2014).

Podositler, çeşitli spesifik biyobelirteçlerle tanımlanmıştır. Nefrin, podosin ve podokaliksin gibi proteinler, DN'nin de içinde olduğu çeşitli böbrek hastalıklarında görülen proteinüri ile ilişkili olduğundan, mikroalbuminüriden önce bu proteinlerin idrarda saptanabilmesi primer ve sekonder nefropatilerin tanısında ümit vaat etmektedir (Kwon ve ark., 2016; Zheng ve ark., 2011).

Podokaliksin, idrarda podosit tanımlanması için başarıyla kullanılan en güçlü belirteçlerden biridir. Podokaliksin, podositlerde ve çeşitli non-renal hücrelerde eksprese edilen bir sialoproteindir. 140 kDa'luk bu polianyonik protein, podositlerin plazma membranına lokalize olur. Hücre gövdesi boyunca lokalizasyonunun bir sonucu olarak, slit diyaframın bütünlüğünden bağımsız olarak birçok glomerülopatide bozulmadan korunabilir. Bu nedenle farklı böbrek hastalıklarında podosit atılımının saptanmasında önemli bir rol oynamaktadır (Sun ve ark., 2012).

Glomerüler filtrasyon bariyerinin son ayağını oluşturan slit diyafram (SD), podositlerin ayaksı çıkıntılarını birbirine bağlayan karmaşık bir yapıdır. Bu yapı sadece podositleri birbirine bağlamaz, boyutlarına göre molekül geçişini de belirler. Slit diyaframın yapısı açısından anahtar komponent nefrindir. Nefrin gen ekspresyonunun düşük olması podosit hasarına yol açar. Nefrin, glomerüler podositlerde eksprese edilen bir 180 KDa'luk bir transmembran proteindir ve idrardaki varlığı, DN seyrinde podosit lezyonları ile korelasyon gösterir. Bir meta analiz çalışmasında, idrar nefrin düzeylerinin erken glomerüler hasarda, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek önemli bir belirteç potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir (Shahid ve ark., 2014). Bir çalışmada, nefrinüri sırasıyla normo, mikro ve makroalbuminürik DM hastalarının % 53'ünde, % 71'inde ve % 90'ında bulunmuştur (Do Nascimento ve ark., 2013). Yine farklı üç çalışmada, normoalbuminürik

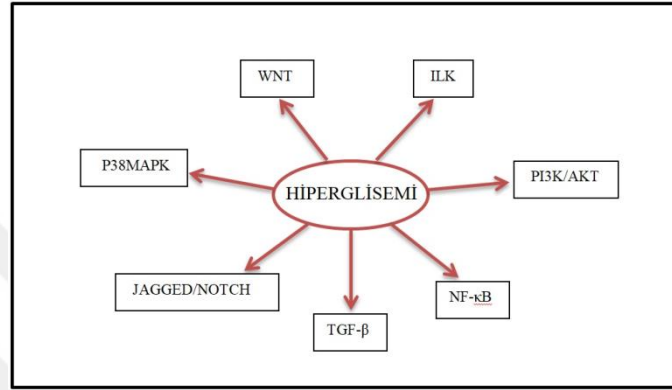
T2DM'li hastalarda artmış nefrinürinin azalmış GFH ile korelasyonu gösterilmiştir (Petrica ve ark., 2014).

Slit diyaframın bir başka önemli komponenti podositlerdir. Slit diyaframın diğer proteinleri ile birlikte podosit ayakları çıkıntılarının iskeletini oluşturmaktadır. Bir transmembran proteini olan podosin, nefrin ile birlikte hücre membranının bütünlüğünü koruyarak glomerül yapı ve fonksiyonları açısından çok büyük önem taşırlar. Podositlerdeki ayakları çıkıntılar, aktin demetlerinden oluşan bir iskelete sahiptir. Aktin filamentleri podosit ve ayakları çıkıntılara şekil verir ve esneklik sağlar. Aktin demetlerinin oluşturduğu hücre iskeleti, podokaliksin ve sinaptopodin gibi proteinlerle düzenlenmekte ve glomerüler filtrasyon bariyerinin bütünlüğü sağlanmaktadır. Hücre iskeletinin normal yapısının sürdürülmesi glomerülün seçici geçirgenliği için kritik bir öneme sahiptir. SD, boyut seçici bir bariyer olarak sunulan tamamlayıcı bir birleşim yeridir ve adaptör proteinler (CD2-ilişkili protein (CD2AP), zo-1, β -katenin) tarafından aktin bazlı sitoskeletona bağlanır (Patrakka ve ark., 2010; Tae-Sun, 2013). Önemli SD proteinleri olarak, nefrin, podosin ve p-kaderin ekspresyonunun kaybı, podositin fenotipine ve işlevine zarar verir.

2.6. Podosit Epitelyal Mezenkimal Geçiş (EMT) Süreci

Epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) kavramının, podosit hasarını yönlendiren önemli bir patolojik mekanizma olduğu öne sürülmektedir. EMT, epitelyal hücrelerin ayırt edici epitel özelliklerini kaybettiği ve mezenkimal hücrelerin özelliklerini kazandığı sıkı düzenlenmiş bir süreçtir. EMT sürecinde, podositlerde nefrin, podosin, p-kaderin ve zonula okludens-1 (zo-1) ekspresyonu azalır, SD'nin hücre-hücre etkileşiminde değişiklik ve aktin hücre iskeletinde yeniden düzenlenme gözlenir (Valcourt ve ark., 2005). EMT sürecinde TGF- β ve Smad proteinleri sinyal yolu, transkriptomik yeniden programlamayı destekler. Progresif böbrek hastalıklarının çoğunda, podositlerde TGF- β artışının gözlenmesi, TGF- β 'nin ekstrasellüler membran protein sentezinin temel düzenleyicisi olduğunu göstermektedir (Ying ve Wu, 2017). EMT sürecinde, TGF- β 1, çeşitli epitel hücre tanıma proteinlerinin ve örgütsel proteinlerin ekspresyonunu yeniden düzenleyerek, fibrotik materyallerin aşırı birikmesine katkıda bulunur. Smad bağımlı yollar, ağırlıklı olarak TGF- β 1'in aracılık ettiği yollardır. Smadlar üç sınıfa ayrılır: reseptör ile düzenlenen Smadlar (R-Smads, Smad 1, 2, 3, 5 ve 8), ortak Smadlar (Co-Smad; Smad 4) ve inhibitör Smadlar (I-Smad, Smad 6 ve

Smad 7). DN hastalarında yapılmış doku çalışmalarında, podositlerde nefrin ve zo-1 ekspresyonunda azalma, snail ve integrin-bağımlı kinaz (ILK) gibi önemli EMT düzenleyicilerinin ekspresyonunda ise artış olduğu öne sürülmektedir (Li ve ark., 2008; Yamaguchi ve ark., 2009; Kretzler ve ark., 2001). Son dönemde, ortamda bulunan yüksek glukozun, in vitro ve in vivo olarak yapılan doku çalışmalarında, podositlerde EMT sürecini indükleyen bir faktör olduğu gösterilmeye çalışılmaktadır (Şekil 2.5) (Ying ve Wu, 2017).



Şekil 2.5. Hipergliseminin neden olduğu podosit EMT'nin indüksiyonu ve ilerlemesinde rol oynayan moleküler mekanizmalar (Ying ve Wu, 2017).

Podosit hasarı ve/veya glomerül başına düşen podosit sayılarında gözlenen azalmaların, proteinüri aşamasından önce DN'de gözlenmesi gelecek araştırmalar açısından ümit vermektedir. Ancak bu çalışmalar dokuda gerçekleştirildiğinden invaziv bir girişim olan böbrek biyopsisi gereksinimi bulunmaktadır. Bu nedenle dokudaki hasarı, kolay ve non-invaziv elde edilen bir örnek olan idrarda gösterebilecek erken DN belirteçlerine gereksinim çok büyüktür. DN'de, nefron boyunca oluşan patofizyolojik süreçleri farklı mekanizmalar (tübüler hasar, oksidatif stres, inflamasyon ve intrarenal renin-anjiyotensin sistemi aktivasyonu) üzerinden yansıtan bir dizi anahtar biyolojik belirteç idrarda tanımlanmıştır (Lee ve Choi, 2015; Fiseha, 2015; Zürbig ve ark., 2012). Bu nedenle idrardaki podosit spesifik belirteçler ve EMT sürecinin düzenleyicilerinin ölçümü, DN'nin erken tanısında ve hastalığın izleminde çok önemli görülmektedir ve bu konuda yapılacak geniş kapsamlı çalışmalara gereksinim bulunmaktadır. İdrar belirteçleri birçok renal hastalıkta, yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip yöntemlerle non-invaziv olarak ölçülebileceğinden diagnostik ve prognostik değerleri vardır, ancak gerçek diagnostik ve prognostik değerlerini değerlendirmek için daha kapsamlı klinik araştırmalar gereklidir (Kostovska ve ark., 2016).

2.7. Diyabetik Nefropatide TGF- β /Smad Sinyal Yolağı

DN'nin patolojik özellikleri arasında yaygın glomerüler bazal membran kalınlaşması, mezanjial genişleme, podosit sayısında azalma, renal fibrozis ve düşük dereceli renal inflamasyon bulunur. Bu nedenle, DN patogenezi, hiperglisemi, hiperlipidemi ve hipertansiyonu içeren çok faktörlü bir süreçtir (Kanwar ve ark., 2008; Soldatos ve Cooper, 2008). DN'de, ileri glikasyon son ürünleri (AGE), hücre içi polioller, anjiyotensin (Ang) II, büyüme faktörleri ve inflamatuvar sitokinler dahil olmak üzere birçok aracı vardır. Transforme edici büyüme faktörlerinden biri olan TGF- β 1 ise DN oluşumunda anahtar rol oynamaktadır (Ziyadeh, 2004). Günümüzde, TGF- β 1'in biyolojik aktivasyonu ile hem Smad'a bağımlı hem de bağımsız yolları aktive ettiği iyi bilinmektedir.

Transforme edici büyüme faktörü- β , TGF- β süper ailesinin bir üyesidir. TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3 olarak adlandırılan üç TGF- β izoformu vardır. TGF- β 1, aktif olmayan bir prositokin olarak salgılanır. Bu prositokin, olgun aktif TGF- β 1 proteini ile ona non-kovalent bağlı latent-ilişkili protein (LAP) ve bir latent TGF- β bağlayıcı proteinden oluşmaktadır. TGF- β 1, reseptörlerine bağlanmadan önce, pH değişimi, reaktif oksijen türleri, plazmin, katepsin ve integrinler gibi çeşitli uyaranlara yanıt olarak hücre dışı aktivasyona uğrar (Lan, 2012). .

In vitro koşullarda, yüksek glukoz ve AGE, tübüler ve mesangial hücrelerde TGF- β 1 ve reseptörünün ekspresyonunu indükleyebilir (Yamagishi ve ark., 2003). Ayrıca anjiyotensin II de renal TGF- β ekspresyonunu uyarabilir (Kang ve ark., 2000). Bu nedenle, diyabetik hastalarda ve diyabetli hayvan modellerinde TGF- β 1 ve reseptörünün renal ekspresyonunda artışlar bulunmuştur. DN'li hastalarda, artan idrar TGF- β seviyeleri, interstisyel fibrozisin şiddeti ile ilişkilidir ve TGF- β ekspresyonu ile ilerleyici diyabetik böbrek hastalığı arasında bir bağlantı olduğunu düşündürür (Korpinem ve ark., 2000).

2.7.1. Diyabetik Nefropatide TGF- β /Smad Sinyalinin Aktivasyonu ve Disregülasyonu

TGF- β /Smad sinyal yoluna dair son bulgular, DN'de TGF- β 1'in patojenik rolüne dair yeni anlayışlar sağlamıştır. TGF- β 1, hücre içi sinyalleşmesini, TGF- β reseptör I (T β RI) kinazı aktive eden TGF- β reseptör II'ye (T β RII) bağlanarak başlatır, Smad2 ve Smad3 olarak adlandırılan reseptörle düzenlenen Smadların (R-Smads)

fosforilasyonu ile sonlandırır. Aktive edilmiş Smad2 ve Smad3 daha sonra Smad4 (Co-Smad) ile oligomerik kompleksler oluşturur. Bu oligomerik kompleksler çekirdekte yer değiştirir ve burada hedef genlerin transkripsiyonunu düzenlerler (Lan, 2012).

Smad2 ve Smad3; TGF- β /aktivine özgü R-Smad, Smad1, Smad5 ve Smad8; kemik morfogenetik proteinine (BMP) özgü R-Smad'dır. Smad4 ise tek Co-Smad'dır. BMP sinyalinin seçici inhibitörü olan Smad6 ve TGF- β sinyalinin güçlü bir inhibitörü olan Smad7; I-Smadlar'dır. TGF- β 1 biyolojik etkilerini göstermek için Smad bağımlı yollara ek olarak, mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK), fosfatidilinositol 3-kinaz ve Rho kinaz yolları gibi Smad'dan bağımsız yolları da kullanabilir (Wang ve ark., 2021).

DN'li hastaların glomerüler ve tübülointerstisyel hücrelerinde fosforile edilmiş Smad2 ve Smad3'ün nükleer translokasyonu ile TGF- β /Smad sinyali yüksek oranda aktive olur. TGF- β /Smad sinyalinin aktivasyonu, hem glomerüler hem de tübülointerstisyel fibrozise önemli ölçüde katkıda bulunur (Li ve ark., 2004). Bu, Tip 1 diyabetik böbrek hastalığının deneysel hayvan modelinde de görülmektedir. İn vitro koşullarda, yüksek glukoz, AGE ve AngII, Smad2 ve Smad3'ü aktive edebilir (Li ve ark., 2003). Mezengial hücreler, tübüler epitel hücreleri ve vasküler düz kas hücreleri tarafından kollajen matriks sentezini indükler. Fibrotik böbrekte Smad2 ve Smad3'ün aktivasyonu, inhibitör Smad7'nin kaybı ile ilişkilidir (Wang ve ark., 2005; Chen ve ark., 2010). Bu nedenle, Smad sinyal yolu, diyabetik böbrek içinde düzensiz ve dengesizdir. Bu bulgu, hastalıklı böbrek içindeki TGF- β /Smad sinyallemesinin yeniden dengelenmesinin, DN için yeni bir terapötik stratejiyi temsil edebileceğini düşündürmektedir (Lan, 2011).

2.7.2. Diyabetik Nefropati Patogeneğinde Smad2 ve Smad3'ün Farklı Roller

Pozitif ve negatif Smad sinyal yolları arasındaki bir dengesizlik, DN'ye yol açan kilit bir mekanizma olabilir. Smad2 ve Smad3'ün birbirine bağlanmasına ve embriyonik gelişimde gereksiz bir rol oynamasına rağmen, son çalışmalar Smad2 ve Smad3'ün renal fibrozisde karşıt rollere sahip olduğunu belirlemiştir. Bu nedenle, Smad'lar DN'de farklı roller oynayabilir (Lan, 2012).

Aşırı kollajen matriks birikimi ile karakterize böbrek fibrozisi, DN'nin temel bir özelliğidir. Smad2 ve Smad3, hem deneysel hem de insan DN'sinde güçlü bir şekilde etkinleştirilir. Son çalışmalar, diyabet dahil olmak üzere farklı hastalık koşulları altında Smad3'ün renal fibroze aracılık ettiğini bulmuştur (Phanish ve ark., 2006). In vitro olarak, TGF- β 1, AngII, yüksek glikoz ve AGE gibi birçok fibrojenik faktör Smad2 ve Smad3'ü etkinleştirebilse de, gen nakavt fareler ve hücrelerden yapılan çalışmalar, Smad3'ün silinmesinin, farklı hastalıklarda fibrozisi inhibe ettiğini bulmuştur (Yang ve ark., 2009; Yang ve ark., 2010). Smad3'ün renal fibrozisteki kritik rolü, DN, obstrüktif nefropati ve ilaca bağlı nefrotoksisite dahil olmak üzere çeşitli fare modellerinde de gösterilmiştir. Bu modellerde, Smad3 aktivasyonunun azalması ilerleyici renal fibroze karşı koruma sağlar. Buna karşılık, farelerde oluşturulmuş obstrüktif nefropati modelinde, Smad2 geninin böbrekten silinmesi renal fibrozisi büyük ölçüde artırmıştır; bu da büyük ölçüde artmış Smad3 aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir (Meng ve ark., 2010).

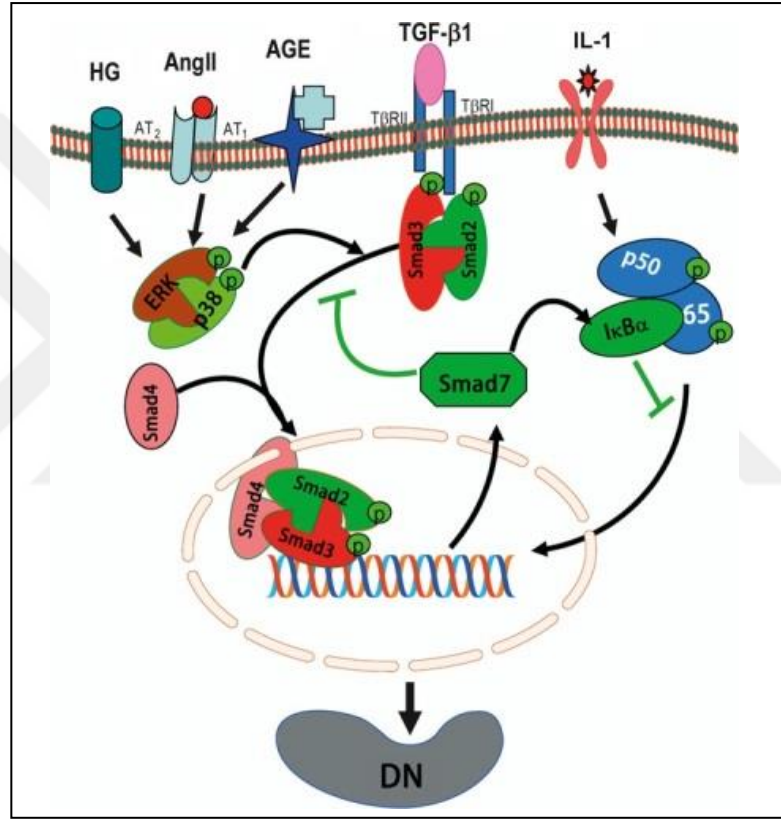
2.7.3. Smad7'nin Renal Fibrozis ve İnflamasyondaki Koruyucu Rolü

Smad7, Smad2 ve Smad3'ün aktivasyonunu negatif olarak düzenleyen inhibitör bir Smad'dir. Smad7'nin ekspresyonu, TGF- β 1 tarafından indüklenir. Fibrotik böbrekte, Smad7 seviyeleri büyük ölçüde azalır. Renal Smad7 degradasyona uğradığında, Smad sinyalinin aktivasyonu artar, bu da progresif renal fibrozis ile sonuçlanır. Bu nedenle, Smad7'nin aşırı ekspresyonu, TGF- β 1, yüksek glukoz, AGE ve AngII'ye yanıt olarak in vitro Smad2/3 aracılı renal fibrozisi inhibe eder (Wang ve ark., 2021). Benzer şekilde, renal Smad7'nin aşırı ekspresyonu, DN dahil olmak üzere bir dizi hastalık modelinde ilerleyici renal fibrozisi önler veya bloke eder (Chen ve ark., 2010). Smad7'nin degradasyonu hem obstrüktif nefropatide hem de diyabetik böbrek hastalığında renal fibrozisi arttırdığı bulgusu, renal fibroziste Smad7'nin koruyucu rolünü doğrular (Chen ve ark., 2010; Fukasawa ve ark., 2004).

Renal Smad7 kaybı sadece TGF- β /Smad3 aracılı renal fibrozisi arttırmakla kalmaz, aynı zamanda nükleer faktör (NF)- κ B'ye bağlı inflamatuvar yolu aktive ederek renal inflamasyonu artırır. NF- κ B/p65 aktivasyonunun renal inflamasyon gelişimi ile ilişkili olduğu iyi bilinmektedir. Renal Smad7'nin aşırı ekspresyonu, interlökin-1 β ve tümör nekroz faktörü- α tarafından indüklenen NF- κ B'ye bağlı inflamatuvar tepkileri büyük ölçüde inhibe eder, bu da Smad7 ve NF- κ B sinyal yolları arasında fonksiyonel

bir bağlantı olduğu anlamına gelir. Smad7, bir NF-KB inhibitörü olan IκBa ekspresyonunu indükleyebilir, böylece NF-KB aktivasyonunu baskılayabilir (Şekil 2.6) (Lan, 2012).

Aslında, renal Smad7'nin aşırı ekspresyonu, DN'de NF-KB aktivasyonunu ve renal inflamasyonu inhibe etme yeteneğine sahiptir. Smad7'nin anti-inflamatuar rolüne ilişkin kanıtlar, Smad7 nakavt farelerde diyabetik böbrek hastalığında ve obstrüktif nefropatide daha şiddetli böbrek iltihabı geliştirmeleri bulgusundan gelmektedir (Chen ve ark., 2010).



Şekil 2.6. Diyabetik nefropatide TGF-β/Smad yolağı sinyal moleküllerinin etkileşimi (Lan, 2012).

2.8. Diyabetik Nefropatide Tedavi Stratejileri

Yaşlanan nüfus, giderek artan yerleşik yaşam tarzı kalıpları ve obezitenin yaygınlaşması ile diyabet prevalansı dünya çapında endişe verici bir oranda artmaktadır. Aslında, 2030 yılına kadar 360 milyon kişinin diyabetle yaşayacağı tahmin edilmektedir (International Diabetes Federation, 2015). Hastalık, kan şekerindeki dalgalanmalarla karakterize olmasına rağmen, kardiyovasküler hastalık, retinopati ve ayak ve böbrek hastalığı gibi diyabetik komplikasyonlar, sağlık

hizmetleri kaynaklarına primer diyabetten kaynaklanan acil durumlardan çok daha fazla yük getirir.

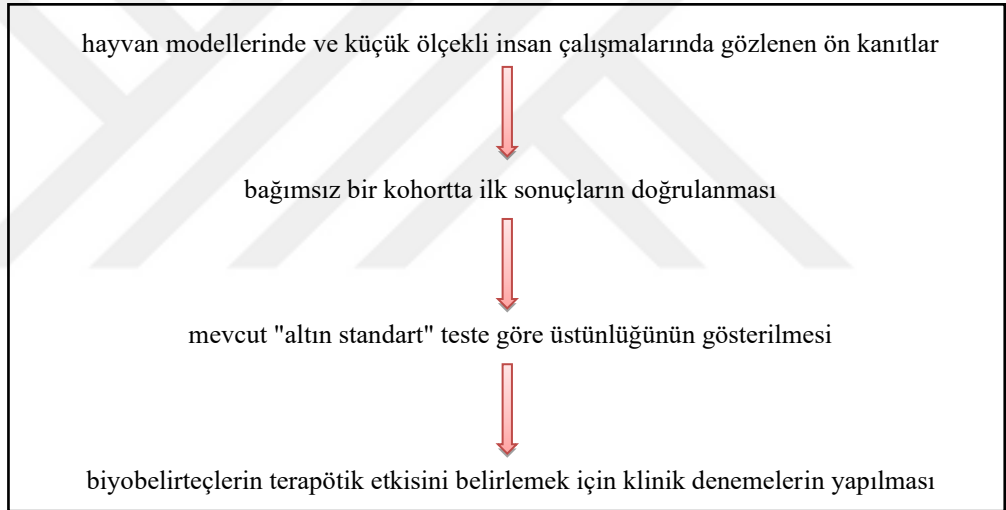
Albüminüri (idrar albümin/kreatinin >300 mg/g) ve genellikle glomerüler filtrasyon hızının (GFH) 60 mL/dk/1.73 m²'nin altında olması ile karakterize olan DN, batı dünyasında SDBH vakalarının yaklaşık %50'sini oluşturmaktadır (Collins ve ark., 2013).

Tarihsel olarak, diyabette böbrek hasarının başlangıcı ve ilerlemesi mikroalbüminüri oluşumuna kadar glomerüler hiperfiltrasyon (GFH >125 mL/dk/1.73 m²), mezangial matriks ve glomerüler bazal membran (GBM) düzeyindeki yapısal değişiklikler dahil klinik olarak sessiz erken evrelerden, oluşur. Mikroalbüminüri (idrar albümin/kreatinin >30 mg/g), hastalığın klinik olarak saptanabilen en erken ayırt edici özelliğidir, bunu takiben aşikar albüminüri ve SDBH'ye doğru GFH'de düşüş gözlenir (Currie ve Delles, 2016). Birçok diyabetik hastada kardiyovasküler nedenlerle erken ölüm görülmektedir. Bu da daha az kişinin SDBH'ye ulaşana kadar hayatta kaldığı anlamına gelir. Bununla birlikte, son 20 yılda renin-anjiyotensin sistemi (RAS) bloke eden ajanların neredeyse evrensel olarak reçetelenmesi, diyabette kardiyovasküler mortalite üzerinde önemli bir etkiye sahip olmuştur (Ziyadeh ve Sharma, 2003). Bunun sonucunda SDBH insidansı T2DM'li hastalarda yükselmiştir (Stewart ve ark., 2007). DN'li bireylerin tedavisi ile ilişkili bireysel ve toplumsal maliyetler, yalnızca renal replasman tedavisi nedeniyle değil, aynı zamanda DN ile kardiyovasküler hastalık arasındaki çok güçlü ilişki nedeniyle de yüksektir. Kardiyovasküler hastalık, renal parametrelerin klinik olarak normal sınırlar sınırlar içinde olduğu hastalığın erken evrelerinde bile belirgindir (Fox ve ark., 2012). Buna rağmen, bu hastaların tedavisi için yeni terapötik stratejiler belirlenmemiştir. Mevcut klinik kılavuzlar, kan basıncı ve albüminürinin kontrolü için RAS bloke edici ajanların kullanılmasını savunmaktadır, ancak bu ilaçların yaygın kullanımında bile hastaların önemli bir kısmında hastalık ilerlemeye devam etmektedir. DN'nin ilerlemesini önlemek veya yavaşlatmak için diyabetli hastalara RAS bloke edici ajanların erken veya daha yoğun reçete edilmesini değerlendiren denemeler, mikroalbüminüri başlangıcının gecikmesinin mümkün olduğunu göstermiştir (Haller ve ark., 2011). Ek olarak, DN'yi destekleyen birçok karmaşık patofizyolojik mekanizma arasındaki etkileşimin anlaşılması sınırlı kalmaktadır. Bu

nedenle, son yıllarda risk altındaki bireylerin erken tanımlanmasını kolaylaştırmakla kalmayıp, aynı zamanda DN patogenezi daha da karakterize etmek ve böylece yeni ilaç hedeflerini belirlemek için DN'nin yeni biyobelirteçlerini araştıran yayınlarda bir artış görülmesi şaşırtıcı değildir.

2.9. Biyobelirteçler Nelerdir?

Biyobelirteçler, normal/patojenik süreçlerin veya terapötik bir müdahaleye verilen farmakolojik tepkilerin nesnel olarak ölçülebilir ve değerlendirilebilir bir göstergesi olarak tanımlanır. Yeni hastalık biyobelirteçlerinin tanımlandığını iddia eden yayınlarda artış görülmesine rağmen, tek başına ilişkinin gösterilmesi bunları rutin klinik kullanıma yönlendirmek için yeterli değildir. Biyobelirteç keşfi ve doğrulamasında bir takım kilit hedeflere öncelikle ulaşılmalıdır (Şekil 2.7) (Currie ve Delles, 2016).



Şekil 2.7. Klinik kullanım için biyobelirteçlerin geliştirilmesindeki tipik adımlar. Temelde ilk adımlarda çok sayıda potansiyel biyobelirteç varken, klinik uygulamaya kadar sadece birkaç başarılı belirteç kalır.

Ek olarak, biyobelirteçlerin genellikle ön sonuçlardan ziyade kesin klinik son noktaları tanımlaması gerekir, bu da DN gibi yavaş ilerleyen koşullarda bu verilerin toplanmasının uzun yıllar alabileceği anlamına gelir.

2.10. Diyabetik Nefropati Tanısında Kullanılan Biyobelirteçler

DN'nin doğru teşhisi için altın standart test böbrek biyopsisi olmasına rağmen, bu strateji tanılabilir şüphenin olduğu durumlarda uygulanmaktadır. Bu nedenle tanıların çoğu, albüminüri ve/veya azalmış GFH'nin saptanmasını gerektiren, klinik olarak kabul edilen DN tanımına göre konur. Klinik kılavuzlar, DN'nin teşhisi ve izlenmesi için her iki parametrenin de düzenli olarak ölçülmesini önerir (KDIGO, 2013).

2.10.1. Glomerüler Filtrasyon Hızı

İnulin gibi ekzojen filtrasyon belirteçlerinin vücuttan temizlenmesi GFH'nin resmi ölçümü için kabul edilen altın standart teknik olsa da, bu testlerin zaman alıcı ve maliyetli olması, özellikle hassas bir ölçümün gerekli olduğu durumlarda kullanılmak üzere tercih edildiği anlamına gelir. Rutin klinik uygulama daha sıklıkla serum kreatinin düzeylerinden tahmini GFH (eGFH) hesabına dayanır. Son yıllarda birçok klinik laboratuvarında Renal Hastalıkta Diyet Modifikasyonu (MDRD) ve Kronik Böbrek Hastalığı Epidemiyoloji İşbirliği (CKD-EPI) formülleri standart olarak kullanılmaktadır.

DN'nin erken teşhisi için eGFH kullanımının sınırlılıkları vardır:

- MDRD ve CKD-EPI gibi formüllerin doğruluğunun diyabetli hastalarda azaldığı gösterilmiştir (Camargo ve ark., 2011);
- Serum kreatinin kas kütesinden etkilenir, yani bu ölçüm kullanılarak GFH tahmini, yetersiz beslenen veya morbid obez hastalarda oldukça değişken olabilir (Guidone ve ark., 2012);
- DN'nin en erken aşamasının genellikle GFH'de nispi bir artış ile karakterize edildiği düşünülür; ancak, denkleme dayalı tahminlerin daha yüksek GFH seviyelerinde çok daha az doğruluk sunduğu düşünülmektedir.

2.10.2. Mikroalbuminüri

Albumin atılımı genellikle kategorik olarak normoalbuminüri (idrar albumin/kreatinin <30 mg/g veya <3 mg/mmol), mikroalbuminüri (idrar albumin/kreatinin 30–300 mg/g veya 3–30 mg/mmol) veya makroalbuminüri (idrar albumin/kreatinin >300 mg/g veya >30 mg/mmol) olarak ifade edilir. Mikroalbuminüri genellikle DN'nin klinik olarak saptanabilen en erken belirtisidir ve çeşitli nedenlerle önemli bir DN biyobelirteci haline gelmiştir. Mikroalbuminürinin diyabette aşikar SDBH'ye ilerlemenin yüksek oranda prediktifi olduğunu ve sadece renal sonuçların değil, aynı zamanda kardiyovasküler olaylar ve mortalitenin de öngörücüsü olduğunu bildiren çalışmalar vardır (Hillege ve ark., 2002). Ayrıca, mikroalbuminürideki azalmanın ilerleyici böbrek hastalığı riskini de azalttığı gösterilmiştir (Lambers ve ark., 2015). Bu nedenle mikroalbuminüri, diyabetli hastaları tedavi eden klinisyenler için temel bir araçtır ve DN'nin en yaygın kullanılan klinik indeksi olmaya devam etmektedir. Bununla birlikte, son yıllarda,

erken hastalık tespiti için bir takım sınırlamalara sahip olduğu vurgulanmıştır (Currie ve Delles, 2016):

- Günümüzde, mikroalbuminüri hastaların daha önce düşünülenlerden çok daha az sayıda aşikar DN'ye ilerlediği ve normoalbuminüriye gerilemenin sıklıkla görüldüğü kabul edilmektedir.
- Diyabette, erken GFH düşüşü ile non-albuminürik DN gibi alternatif hastalık fenotipleri tanımlanmıştır, bu da mikroalbuminürinin mutlaka böbrek fonksiyonunda geri dönüşümsüz düşüşe yol açan anahtar bir aşama olmadığı anlamına gelir.
- Mikroalbuminüri için tanısal eşiğe ulaşıldığında, mesanjium ve GBM düzeyinde önemli yapısal değişiklikler olmuştur ve bunun öncesinde genellikle filtrasyon işlevinde mevcut klinik tekniklerle saptanamayan değişiklikler meydana gelmiştir.
- Albümin atılımı şu anda kategorik olarak tanımlansa da, çalışmalar kardiyovasküler ve renal olaylarla olan ilişkinin normoalbuminürik düzeyde iken başladığını ve aslında belirgin bir risk eşiği olarak tanımlanamayacağını göstermiştir.

2.10.3. Yeni Biyobelirteçler

eGFH ve albuminüri, DN'nin teşhisi ve izlenmesi için temel klinik belirteçler olmaya devam etse de, bu belirteçlerin hastalığın erken evrelerinde kullanımları sınırlıdır ve hastalığın klinik öncesi evrelerindeki hastaları tanımlamak için yeni biyobelirteçlere ihtiyaç vardır.

DN'nin patogenezi karmaşıktır, birbiriyle ilişkili sayısız mekanizmayı içerir. Literatürde bu süreçleri yakalayan birçok biyobelirteç tanımlanmış ve başka çalışmalarda da kapsamlı bir şekilde gözden geçirilmiştir. Bazıları özel umut vaat ediyor olsa da, metodolojik olarak sağlam ve prospektif hiçbir biyobelirtecine mikroalbuminüriden daha iyi performans gösterdiği henüz kesin olarak gösterilememiştir.

DN'nin karmaşık patogenezinin yüksek derecede tanısal duyarlılık ve özgüllük sunmak için birçok yolaktaki bozulmaları eş zamanlı olarak yakalayabilecek çoklu belirleyicili bir tanı yaklaşımı gerektirdiği öne sürülmüştür (Schutte ve ark. 2015).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Endokrinoloji Polikliniği'nde 2020-2021 yılları arasında T2DM tanısıyla izlenen, yerel etik kurul ve hasta onayı alınan 60 hasta bu çalışmaya dahil edildi. Bu hastalar non-albüminürik (idrar albümin/kreatinin oranı <30 mg/g), mikro-albüminürik (idrar albümin/kreatinin oranı $30-300$ mg/g) ve makro-albüminürik (idrar albümin/kreatinin oranı >300 mg/g) T2DM olmak üzere üç (3) gruba ayrıldı. 20 sağlıklı gönüllüden kontrol grubu oluşturuldu.

Hasta grupları en az 6 ay önce diyabet tanısı almış T2DM'li hastalardan, kontrol grubu ise DM, kronik böbrek hastalığı veya tiroid hastalığı öyküsü olmayan sağlıklı bireylerden oluşturuldu. Tiroid hastalığı veya diyabet dışında böbrek hasarı öyküsü olan, steroid veya nefrotoksik ilaç kullanan hastalar ile serum glukoz, HbA1c, idrar albümin/kreatinin oranı düzeyleri yüksek olan kontroller çalışma dışı bırakıldı.

Ayrıca çalışmaya dahil edilen tüm denekler DN ve DN olmayan iki gruba ayrıldı. Makroalbüminüri ve/veya GFH'de azalma ile klinik olarak nefropati tanısı almış olan T2DM'li hastalar DN grubunu oluşturdu.

Analizler için gereken kan örnekleri, 8-12 saatlik açlık sonrasında, spot, taze ve steril idrar örnekleri ise sabah saatlerinde alındı. Hemogloblin A1c (HbA1c) dışındaki testler için örnekler, analiz zamanına kadar -80°C 'de saklandı.

3.1. Laboratuvar Çalışmaları

Kan örneklerinde kreatinin, glukoz ve HbA1c düzeyleri ölçüldü. İdrar örneklerinde albümin ve kreatinin düzeyleri ölçüldü. İdrar nefrin, podosin, podokaliksin, podoplanin, smad 2, smad 7, TGF-beta düzeyleri ise ELISA ile analiz edildi.

3.2. Kullanılan Kitler ve Sarf Malzemeleri

- Serum glukoz kiti
- Serum kreatinin kiti
- İdrar kreatinin kiti
- İdrar albümin kiti
- HbA1c kiti

- Human Podocin ELISA Kit
- Human Podocalyxin ELISA Kit
- Human Podoplanin ELISA Kit
- Human Smad7 ELISA Kit
- Human Smad2 ELISA Kit
- Human Nefrin ELISA Kit
- Human TGF-Beta1 ELISA Kit
- Pipet ucu (10 µL)
- Pipet ucu (200 µL)
- Pipet ucu (1000 µL)
- Tekrarlayıcı pipet ucu (10-1000 µL)
- Tekrarlayıcı pipet ucu (25-2500 µL)
- 96'lık pipet ucu kutusu (10 µL'lik)
- 96'lık pipet ucu kutusu (200 µL'lik)
- 96'lık pipet ucu kutusu (1000 µL'lik)
- Steril Eppendorf Tüp (1,5 µL)
- Falkon Tüp 15 mL'lik
- Eppendorf kutusu

3.3. Ayrıntılı Yöntemler

3.3.1. Kreatinin Analizi

Serum ve idrar kreatinin düzeyleri, ticari kit kullanılarak rate-blanked kinetik Jaffe yöntemiyle otoanalizörde Roche-Cobas 8000 otoanalizörü C702 modülü ile ölçüldü.

3.3.2. Albümin Analizi

İdrar albümin düzeyleri, ticari kit kullanılarak turbidimetrik yöntemle Roche-Cobas 8000 otoanalizörü C702 modülü ile ölçüldü.

3.3.3. Glukoz Analizi

Serum glukoz düzeyleri, ticari kit kullanılarak kolorimetrik yöntemle Roche-Cobas 8000 otoanalizörü C702 modülü ile ölçüldü.

3.3.4. HbA1c Analizi

Tam kanda HbA1c düzeyleri, BIO-RAD Variant II Hemoglobin Test Sistemi ile ölçüldü.

3.3.5. Nefrin, Podosin, Podokaliksin, Podoplanin, TGF- β 1, Smad2 ve Smad7 Analizleri

İdrar nefrin, podosin, podokaliksin, podoplanin, TGF- β 1, smad2 ve smad7 düzeyleri sandviç ELISA yöntemi ile ölçüldü. Bu yöntemde antikor ile kaplanmış kuyucuklara eklenen örnekler ve standartlarda bulunan moleküller inkubasyon ile birbirlerine bağlandı. Yıkama aşamaları ile bağlanmayan kısımlar uzaklaştırıldı. Daha sonra ortama eklenen Biotin-işaretli ikinci antikor, kuyucuklarda önceden birinci antikorla bağlanmış olan analite bağlandı. Sonraki aşamada ortama Streptavidin-HRP eklenerek ve biyotin-anti-konjugata bağlanması sağlandı. HRP ile reaksiyona giren substrat kuyucuklara eklenerek örnekte bulunan konjugat miktarıyla doğru orantılı olarak renkli ürün oluşumu gözlemlendi. Son olarak ortama asit eklenerek reaksiyon durduruldu ve oluşan renkli ürünlerin 450 nm dalga boyunda absorbansları MicroQuant Plate Reader (Bio-Tek Instruments, Vermont, USA) cihazı ile okundu. Her parametre için standartlardan elde edilen absorbanslar ile kalibrasyon eğrileri çizildi ve numunelerdeki bilinmeyen konsantrasyonlar hesaplandı.

ELISA Kitlerinin İçeriği

- Ön Kaplamalı ELISA Plakası
- Standart Çözeltileri
- Standart Dilüsyon Çözeltileri
- Streptavidin-HRP
- Substrat A Çözeltileri
- Substrat B Çözeltileri
- Yıkama Tamponu Konsantresi (25x)
- Biotinlenmiş Standart Antikoru
- Durdurma Solüsyonu
- Plaka Koruyucu

Reaktiflerin Hazırlanması

- Tüm reaktifler kullanımdan önce oda sıcaklığına getirildi.

- Stok standarttan, seyreltme çözeltisi ile ½ oranında seyreltme yapılarak 5 farklı konsantrasyonda kalibrasyon standardı hazırlandı.
- Seyreltme çözeltisi sıfır standart (blank) olarak kullanıldı.
- 500 mL yıkama tamponu elde etmek için 20 mL'lik konsantre yıkama tamponu çözeltisi distile su ile 25 kat seyreltildi.

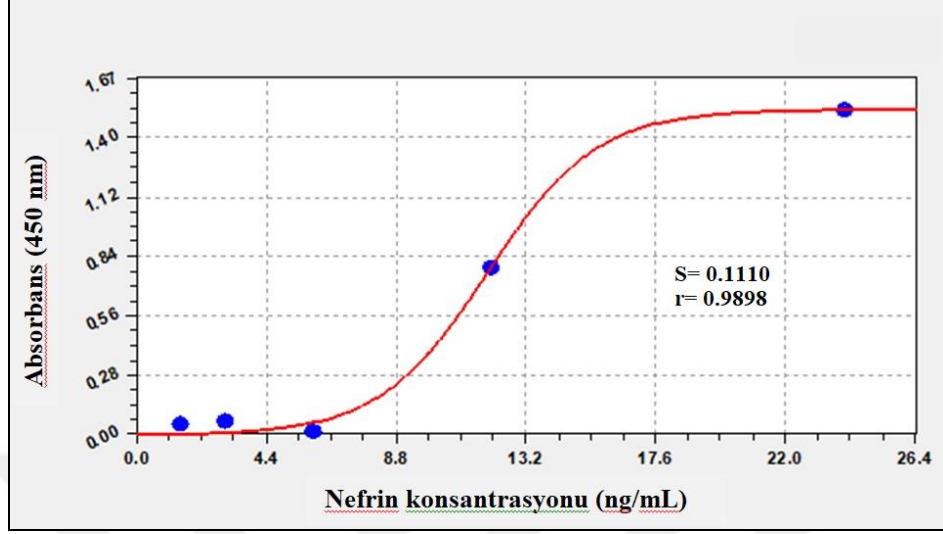
ELISA Test Prosedürü

1. Tüm reaktifler, standart solüsyonlar ve numuneler kitlerdeki talimatlara göre hazırlandı. Kullanmadan önce tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Analiz oda sıcaklığında gerçekleştirildi.
2. Kuyucuklara 50 µL kalibratör standartlardan eklendi. (Not: Standart çözelti biyotinlenmiş antikor içerdiğinden, standartların olduğu kuyucuklara antikor eklenmedi.)
4. Numune kuyucuklarına 40 µL idrar numunesi ve 10 µL antikor eklendi. Ardından sıfır standart (blank) hariç, standart ve numune kuyucuklarının hepsine 50 µL streptavidin-HRP ilave edildi. Plaka örtülerek etüve kondu ve 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.
5. İnkübasyondan sonra plaka, hazırlanan yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı. Her kuyucuk için 0,35 mL yıkama tamponu kullanıldı.
6. Her kuyucuğa 50 µL substrat solüsyonu A ve ardından her kuyuya 50 µL substrat solüsyonu B eklendi. Plaka kapatılarak tekrar etüve kondu ve 37°C'de 10 dakika boyunca inkübe edildi.
7. Her kuyucuğa 50 µL asit içerikli durdurma solüsyonu eklendi, inkübasyon sonrası oluşan mavi rengin hemen sarıya dönüştüğü gözlemlendi.
8. Durdurma solüsyonu ekledikten sonra 10 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropilaka okuyucu kullanılarak her kuyunun optik yoğunluğu (OD değeri) belirlendi.

3.4. İdrarda Nefrin Analizi

İdrar nefrin düzeyleri ticari bir ELISA kit (BT Lab, E1091Hu 96 Tests, Shanghai, China) kullanılarak ölçülmüştür. Kalibratör standartlar 0 – 24 ng/mL aralığında

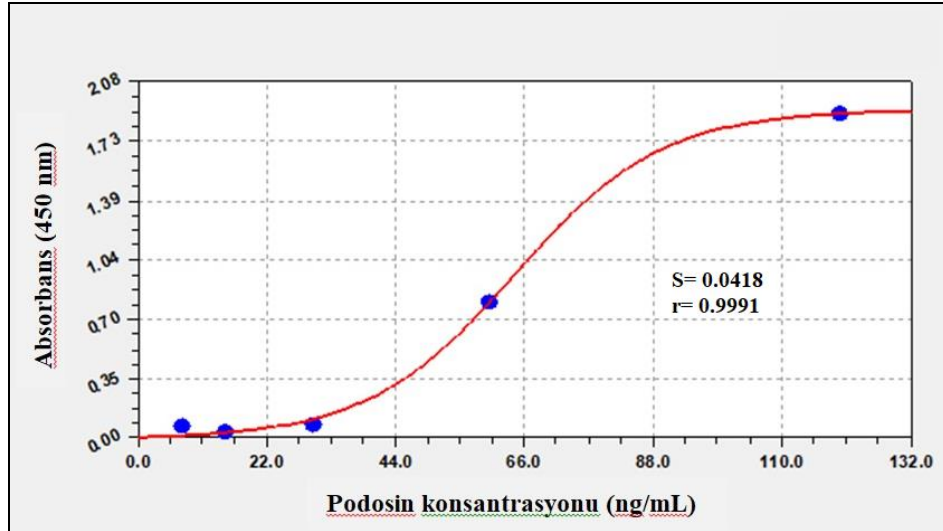
hazırlanmıştır. İdrar numunelerindeki nefrin miktarı kalibratör standartlarından elde edilen kalibrasyon eğrisine (Şekil 3.1) göre hesaplanmıştır.



Şekil 3.1. Nefrin kalibrasyon eğrisi

3.5. İdrarda Podosin Analizi

İdrar podosin düzeyleri ticari bir ELISA kit (BT Lab, E1082Hu 96 Tests, Shanghai, China) kullanılarak ölçülmüştür. Kalibratör standartlar 0 – 120 ng/mL aralığında hazırlanmıştır. İdrar numunelerindeki podosin miktarı kalibratör standartlarından elde edilen kalibrasyon eğrisine (Şekil 3.2) göre hesaplanmıştır.

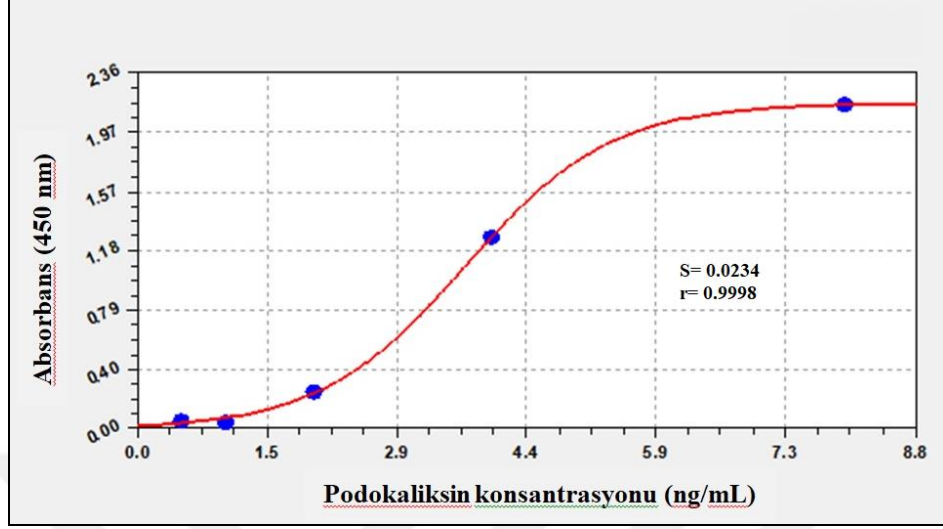


Şekil 3.2. Podosin kalibrasyon eğrisi

3.6. İdrarda Podokaliksin Analizi

İdrar podokaliksin düzeyleri ticari bir ELISA kit (BT Lab, E1834Hu 96 Tests, Shanghai, China) kullanılarak ölçülmüştür. Kalibratör standartlar 0 – 8 ng/ml

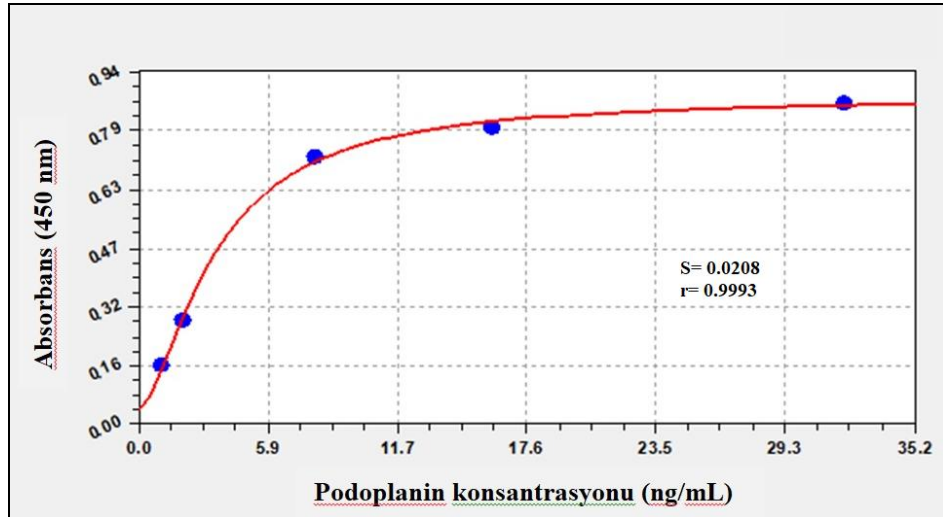
aralığında hazırlanmıştır. İdrar numunelerindeki podokaliksin miktarı kalibratör standartlarından elde edilen kalibrasyon eğrisine (Şekil 3.3) göre hesaplanmıştır.



Şekil 3.3. Podokaliksin kalibrasyon eğrisi

3.7. İdrarda Podoplanin Analizi

İdrar podoplanin düzeyleri ticari bir ELISA kit (BT Lab, E0123Hu 96 Tests, Shanghai, China) kullanılarak ölçülmüştür. Kalibratör standartlar 0 – 32 ng/mL aralığında hazırlanmıştır. İdrar numunelerindeki podoplanin miktarı kalibratör standartlarından elde edilen kalibrasyon eğrisine (Şekil 3.4) göre hesaplanmıştır.

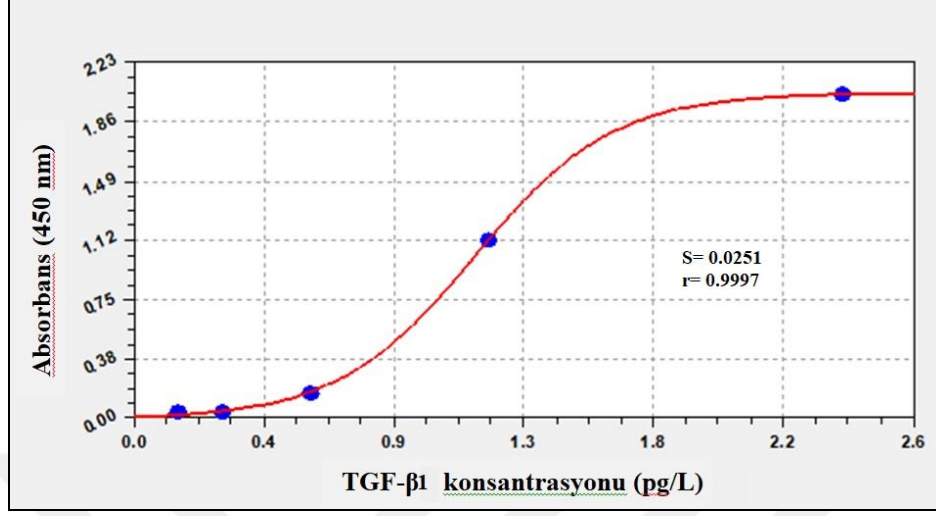


Şekil 3.4. Podoplanin kalibrasyon eğrisi

3.8. İdrarda TGF-β1 Analizi

İdrar TGF-β1 düzeyleri ticari bir ELISA kit (BT Lab, E0639Hu 96 Tests, Shanghai, China) kullanılarak ölçülmüştür. Kalibratör standartlar 0 - 2.4 pg/L aralığında

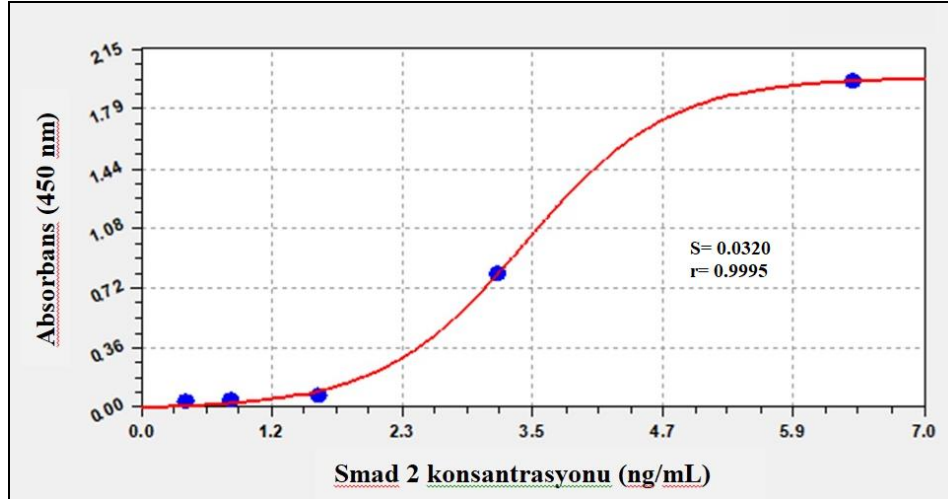
hazırlanmıştır. İdrar numunelerindeki TGF- β 1 miktarı kalibratör standartlarından elde edilen kalibrasyon eğrisine (Şekil 3.5) göre hesaplanmıştır.



Şekil 3.5. TGF- β 1 kalibrasyon eğrisi

3.9. İdrarda Smad2 Analizi

İdrar Smad2 düzeyleri ticari bir ELISA kit (BT Lab, E2911Hu 96 Tests, Shanghai, China) kullanılarak ölçülmüştür. Kalibratör standartlar 0 – 6.4 ng/mL aralığında hazırlanmıştır. İdrar numunelerindeki Smad2 miktarı kalibratör standartlarından elde edilen kalibrasyon eğrisine (Şekil 3.6) göre hesaplanmıştır.

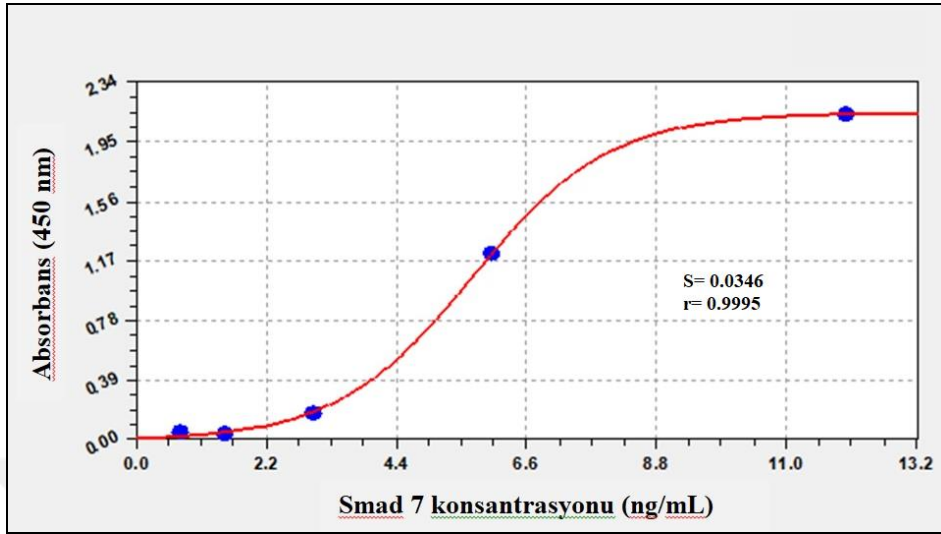


Şekil 3.6. Smad2 kalibrasyon eğrisi

3.10. İdrarda Smad7 Analizi

İdrar Smad7 düzeyleri ticari bir ELISA kit (BT Lab, E0639Hu 96 Tests, Shanghai, China) kullanılarak ölçülmüştür. Kalibratör standartlar 0 - 12 ng/mL aralığında

hazırlanmıştır. İdrar numunelerindeki Smad7 miktarı kalibratör standartlarından elde edilen kalibrasyon eğrisine (Şekil 3.7) göre hesaplanmıştır.



Şekil 3.7. Smad7 kalibrasyon eğrisi

3.11. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler IBM SPSS Statics 23 programı ile yapılmıştır ve p değeri <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Verilerin karşılaştırılmasında kullanılan istatistiksel metodlar bulgular bölümünde ayrıntılı olarak yazılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması

T2DM olan 60 hasta ile 20 sağlıklı gönüllü bu çalışmaya dahil edildi. Tüm katılımcılar (n=80) dört gruba ayrıldı. T2DM hastaları albüminüri düzeylerine göre gruplandırıldı.

- Grup 1; sağlıklı kontrolleri,
- Grup 2; normo-albüminürik (idrar albümin/kreatinin oranı <30 mg/g) T2DM hastalarını,
- Grup 3; mikro-albüminürik (idrar albümin/kreatinin oranı 30-300 mg/g) T2DM hastalarını
- Grup 4; makro-albüminürik (idrar albümin/kreatinin oranı >300 mg/g) T2DM hastalarını içermektedir.

Tüm katılımcıların %50'si erkek, %50'si ise kadındı, klinik olarak DN tanısı konmuş 30 hasta vardı. Tüm gruplardaki cinsiyet dağılımı Tablo 4.1'de, nefropati durumu ise Tablo 4.2'de gösterildi.

Tablo 4.1. Gruplardaki kadın ve erkek sayıları

CİNSİYET	ARAŞTIRMA GRUPLARI				TÜM KATILIMCILAR
	GRUP 1	GRUP 2	GRUP 3	GRUP 4	
ERKEK (n)	14 %70	4 %20	10 %50	12 %60	40 %50
KADIN (n)	6 %30	16 %80	10 %50	8 %40	40 %50
TOPLAM (n)	20 %100	20 %100	20 %100	20 %100	80 %100

Tablo 4.2. Gruplardaki nefropati durumu

NEFROPATİ DURUMU	ARAŞTIRMA GRUPLARI				TÜM KATILIMCILAR
	GRUP 1	GRUP 2	GRUP 3	GRUP 4	
DN DEĞİL (n)	20 %100	19 %95	11 %55	0 %0	50 %62.5
DN (n)	0 %0	1 %5	9 %45	20 %100	30 %37.5
TOPLAM (n)	20 %100	20 %100	20 %100	20 %100	80 %100

4.2. Kan ve İdrar Parametrelerinin Gruplardaki Ortalama Değerleri ve Gruplar Arası Farkları

Tüm parametrelerin gruplardaki ortalama değerleri ve gruplar arası farklılıkları Tablo 4.3'te verildi. Gruplar arası farklılıklar non-parametrik bir test olan Kruskal-Wallis Testi ile hesaplandı.

Tüm gruplarda parametrelerin normal dağılıma sahip olup olmadığı test edildi. Gruplardaki örnek sayısı 30'dan az olduğundan normallik analizi için Shapiro-Wilk testi kullanıldı. Yaş ve DM süresi tüm gruplarda normal dağılıma uyarken, diğer parametreler en az bir grupta normal dağılım göstermedi. Bu nedenle yaş ve DM süresi için parametrik, diğer parametreler için ise non-parametrik analizler kullanıldı. Yaş ve DM süresi Oneway ANOVA ile test edildi ve gruplar arası anlamlı farklılık olduğu gözlemlendi. Post Hoc analizlerle grupların karşılaştırılması Tukey HSD testi ile yapıldı. Diğer parametrelerde gruplar arası farklılığı analiz etmek için Kruskal-Wallis testi ile çoklu karşılaştırmalar yapıldı. Tüm parametrelerde gruplar arasında anlamlı farklılık gözlemlendi. Grupların ikili karşılaştırmaları Mann-Whitney U testi ile yapıldı. İkili karşılaştırmalarda gruplar arası farklılığa ilişkin p değerleri Tablo 4.4'te verildi.

Tüm parametrelerin cinsiyet ile değişkenlik gösterip göstermediği Mann Whitney U Testi ile analiz edildi. Serum Kreatinin ($p<0.0001$) dışında hiçbir parametre cinsiyete göre farklılık göstermedi.

4.3. Parametreler Arasındaki İlişkiler

Tüm parametrelerin korelasyon analizleri non-parametrik bir test olan Spearman's Rho ile yapıldı. Anlamlı korelasyonlara ait korelasyon katsayısı (r) değerleri Tablo 4.5 ve Tablo 4.6'da verildi. Araştırdığımız idrar belirteçlerinin tümü DM süresi, GFH ve HbA1c ile zayıf düzeyde, idrar albümin/kreatinin oranı ile orta düzeyde, idrar kreatinin ile çok yüksek düzeyde anlamlı korelasyonlar gösterdi.

Tablo 4.3. Tüm parametrelerin çalışma gruplarındaki ortalama değerleri ve gruplar arası farklarına ait *p* değerleri

PARAMETRELER	GRUP 1 (Ort±SEM) n=20	GRUP 2 (Ort±SEM) n=20	GRUP 3 (Ort±SEM) n=20	GRUP 4 (Ort±SEM) n=20	<i>p</i>
Yaş (yıl)	39.8 ± 3.34	53.53 ± 2.54	62.38 ± 1.96	60.28 ± 2.39	< 0.0001
DM Süresi (ay)	0	105.26 ± 18.11	123.50 ± 14.82	165.56 ± 25.92	< 0.0001
Serum Kreatinin (mg/dL)	0.95 ± 0.06	0.69 ± 0.05	0.99 ± 0.06	1.78 ± 0.26	< 0.0001
GFR (CKD-EPI)	95 ± 5	100 ± 5.65	76.17 ± 4.59	51.89 ± 6.63	< 0.0001
Serum Glukoz (mg/dL)	87.39 ± 1.74	128.74 ± 11.11	152.96 ± 14.45	131.83 ± 16.87	< 0.0001
HbA1c	5.56 ± 0.1	6.67 ± 0.21	7.28 ± 0.35	8.12 ± 0.47	< 0.0001
İdrar Albümin (mg/L)	6.21 ± 1.12	13.61 ± 3.94	101.01 ± 14.61	850.34 ± 218.47	< 0.0001
İdrar Kreatinin (mg/dL)	139.53 ± 19.83	140.77 ± 18.66	86.52 ± 6.08	55.44 ± 6.40	< 0.0001
İdrar Alb/Kr (mg/g)	4.85 ± 0.80	9.10 ± 1.99	115.34 ± 13.32	1677.76 ± 442.65	< 0.0001
Nefrin/Kr (ng/g)	6931.50 ± 788.20	8056.57 ± 1514.02	10181.58 ± 1044.47	19241.28 ± 2456.72	< 0.0001
Podosin/Kr (ng/g)	40494.23 ± 4873.93	49361.86 ± 9078.31	62723.43 ± 6314.23	114074.35 ± 14344.01	< 0.0001
Podokalsin/Kr (ng/g)	2480.98 ± 293.89	2954.10 ± 525.52	3752.14 ± 370.21	6778.86 ± 871.92	< 0.0001
Smad2/Kr (ng/g)	2227.24 ± 256.67	2738.38 ± 488.70	3515.23 ± 325.11	6291.90 ± 760.80	< 0.0001
Smad7/Kr (ng/g)	4239.97 ± 490.04	5040.16 ± 868.44	6333.08 ± 605.45	10963.81 ± 1388.42	< 0.0001
TGF-β/Kr (ng/g)	782.19 ± 91.03	959.76 ± 170.99	1207.32 ± 122.54	2169.01 ± 286.40	< 0.0001
Podoplanin/Kr (ng/g)	11625.79 ± 2043.94	15045.72 ± 3999.89	16014.89 ± 1873.26	21098.29 ± 3066.58	< 0.0001
Smad2/Smad7 oranı	0.526 ± 0.004	0.535 ± 0.008	0.561 ± 0.012	0.585 ± 0.010	0.025

SEM, ortalama standart hata.

Gruplar arası farklar Kruskal-Wallis H testi ile hesaplandı.

p <0.05 istatistiksel olarak anlamlı Kabul edildi.

Tablo 4.4. Tüm parametrelerin gruplar arası farkları

	GRUPLAR ARASI FARKLAR (<i>p</i>)					
	1-2	1-3	1-4	2-3	2-4	3-4
Yaş	0.003	< 0.0001	< 0.0001	0.025	0.296	0.720
DM Süresi	0.001	< 0.0001	< 0.0001	0.690	0.126	0.632
Serum Kreatinin	0.005	0.447	0.007	0.002	< 0.0001	0.017
GFH (CKD-EPI)	0.831	0.013	< 0.0001	0.001	< 0.0001	0.020
Serum Glukoz	< 0.0001	< 0.0001	0.008	0.261	0.659	0.135
HbA1c	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.464	0.039	0.171
İdrar Albümin	0.378	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
İdrar Kreatinin	0.976	0.002	< 0.0001	0.041	0.001	0.017
İdrar Alb/Kr	0.378	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Nefrin/Kr	0.564	0.007	< 0.0001	0.022	< 0.0001	0.012
Podosin/Kr	0.976	0.003	< 0.0001	0.027	0.001	0.015
Podokaliksin/Kr	0.879	0.006	< 0.0001	0.033	0.001	0.019
Smad2/Kr	0.976	0.001	< 0.0001	0.029	0.001	0.014
Smad7/Kr	0.976	0.006	< 0.0001	0.041	0.001	0.037
TGF- β /Kr	0.952	0.003	< 0.0001	0.033	0.001	0.037
Podoplanin	0.784	0.026	0.021	0.056	0.033	0.632
Smad2/Smad7	0.605	0.001	< 0.0001	0.053	0.001	0.026

Gruplar arası ikili karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi ile yapıldı.

$p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 4.5. Araştırılan idrar belirteçlerinin yaş, diyabet süresi ve biyokimyasal parametreler ile anlamlı korelasyonları (r)

	Nefrin/Kr	Podosin/Kr	Podokaliksin/Kr	Smad2/Kr	Smad7/Kr	TGF- β 1/Kr	Podoplanin/Kr
Yaş		0.256*	0.238*	0.254*	0.232*	0.241*	
DM Süresi	0.374**	0.415**	0.395*	0.430**	0.387**	0.403**	0.261*
Serum Kreatinin							
GFH (CKD-EPI)	-0.372**	-0.371**	-0.340**	-0.375**	-0.329**	-0.347**	-0.275*
Serum Glukoz				0.236*			
HbA1c	0.339**	0.364**	0.338**	0.392**	0.339**	0.359**	0.234*
İdrar Albümin	0.304**	0.301**	0.266*	0.317**	0.250*	0.270*	
İdrar Kreatinin	-0.988**	-0.991**	-0.988**	-0.993**	-0.991**	-0.995**	-0.873**
İdrar Albümin/Kr	0.526**	0.526**	0.496**	0.541**	0.484**	0.502**	0.317**

r: Korelasyon katsayısı, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

Tablo 4.6. Araştırılan idrar belirteçlerinin birbirleri ile anlamlı korelasyonları (r)

	Nefrin/Kr	Podosin/Kr	Podokaliksin/Kr	Smad2/Kr	Smad7/Kr	TGF- β 1/Kr	Podoplanin/Kr
Nefrin/Kr		0.993**	0.987**	0.989**	0.985**	0.989**	0.887**
Podosin/Kr	0.993**		0.991**	0.992**	0.991**	0.994**	0.884**
Podokaliksin/Kr	0.967**	0.991**		0.987**	0.994**	0.992**	0.883**
Smad2/Kr	0.989**	0.992**	0.987**		0.988**	0.994**	0.874**
Smad7/Kr	0.985**	0.991**	0.994**	0.988**		0.995**	0.888**
TGF- β 1/Kr	0.989**	0.994**	0.992**	0.994**	0.995**		0.885**
Podoplanin/Kr	0.887**	0.884**	0.883**	0.874**	0.888**	0.885**	

r: Korelasyon katsayısı, * $p < 0.05$, ** $p < 0.0001$.

4.4. İdrar Belirteçlerinin ROC Analizleri

İdrar Nefrin/Kr, Podosin/Kr, Podokaliksin/Kr, Podoplanin/Kr, TGF- β 1/Kr, Smad2/Kr, Smad7/Kr, Smad2/Smad7 ve albüminürinin DN tanısı için duyarlılık ve özgüllüklerinin hesaplanmasında ROC analizleri kullanıldı. Podoplanin/Kr için eğri altında kalan alan anlamlı bulunmadı. Diğer belirteçlerin eğri altında kalan alanları ile %95 güven aralığındaki alt ve üst kesme değerleri Tablo 4.7’de verildi.

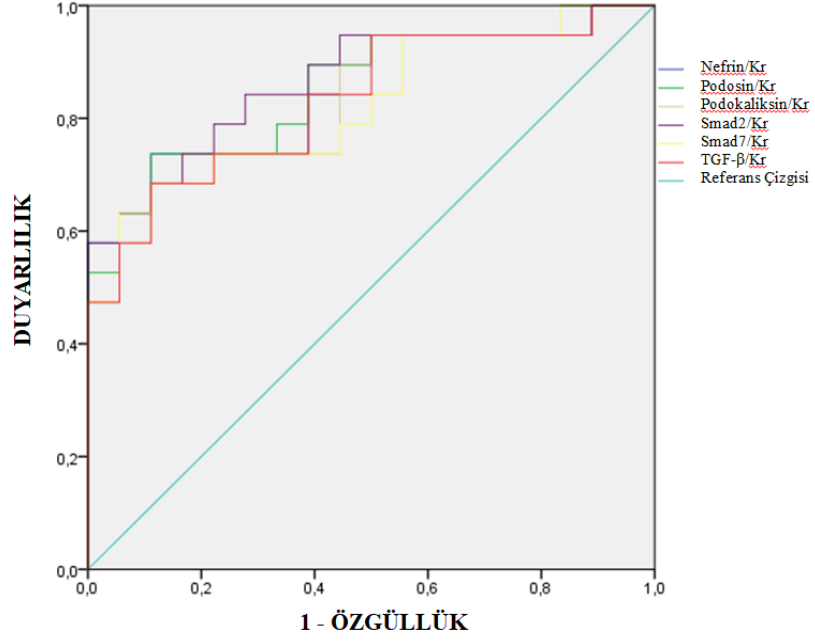
Tablo 4.7. İdrar Belirteçlerinin ROC eğrisi altında kalan alanları

ROC EĞRİSİ				
İDRAR BELİRTEÇLERİ	ALAN	p	%95 GÜVEN ARALIĞI	
			ALT SINIR	ÜST SINIR
Nefrin/Kr	0.848	<0.0001	0.721	0.975
Podosin/Kr	0.854	<0.0001	0.731	0.976
Podokaliksin/Kr	0.830	0.001	0.697	0.964
Smad2/Kr	0.865	<0.0001	0.746	0.985
Smad7/Kr	0.822	0.001	0.686	0.957
TGF- β 1/Kr	0.830	0.001	0.698	0.963
Smad2/Smad7	0.877	<0.0001	0.759	0.995
Albüminüri (Alb/Kr)	0.805	<0.0001	0.696	0.913

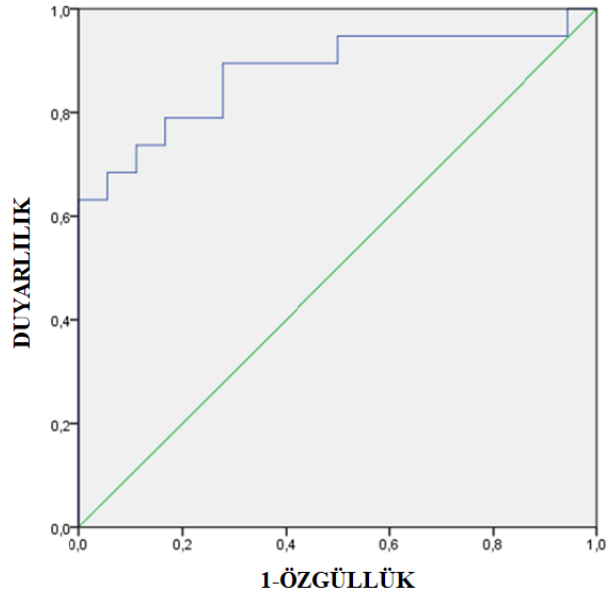
İdrar Nefrin/Kr, Podosin/Kr, Podokaliksin/Kr, Podoplanin/Kr, TGF- β 1/Kr, Smad2/Kr, Smad7/Kr’ye ait ROC eğrileri Şekil 4.1’de, Smad2/Smad7 oranına ait ROC eğrisi ise Şekil 4.2’de gösterildi. Bu belirteçlerin kesme (cut-off) değerleri ROC analiziyle belirlendi.

Günümüzde DN tanısında kullanılan albüminüri için de ROC analizi yapıldı. DN tanısında kullanılan makroalbüminüri (300 mg/g) ve potansiyel erken tanı belirteci olduğu düşünülen mikroalbüminüri (30 mg/g) düzeyleri kesme değerleri olarak kabul

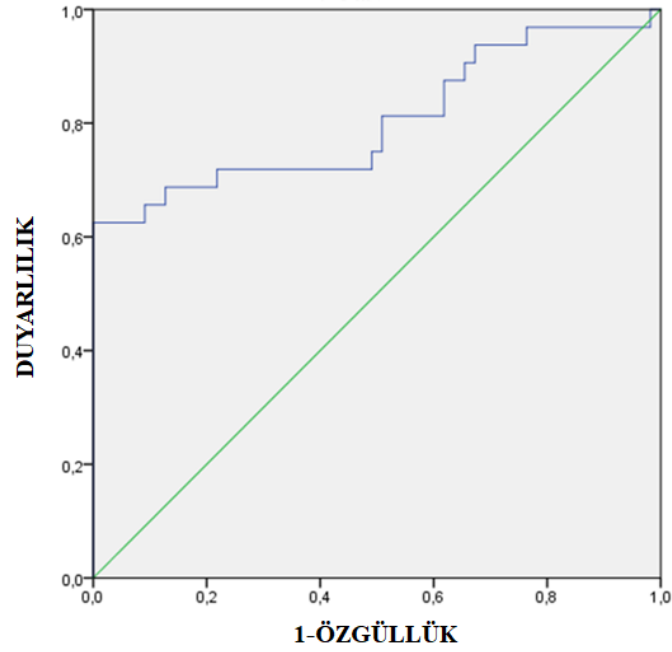
edildi. Albüminürinin bu kesme değerler için duyarlılık ve özgüllükleri potansiyel idrar belirteçleri ile karşılaştırıldı (Tablo 4.8). ROC eğrisi de Şekil 4.3'te gösterildi.



Şekil 4.1. İdrar Nefrin/Kr, Podosin/Kr, Podokaliksin/Kr, Smad2/Kr, Smad7/Kr, TGF-β1/Kr oranlarına ait ROC eğrileri



Şekil 4.2. İdrar Smad2/Smad7 oranlarına ait ROC eğrisi

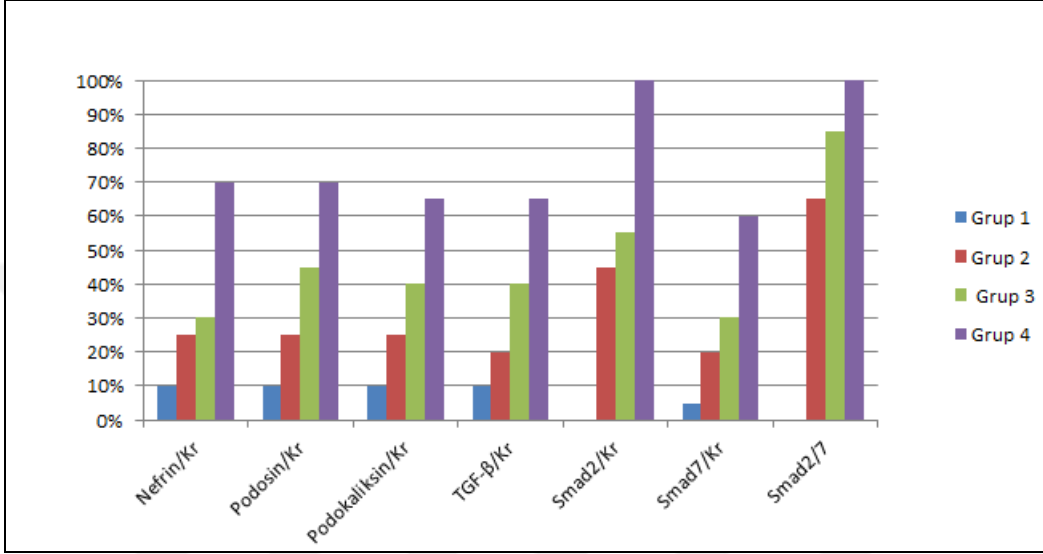


Şekil 4.3. İdrar Albümin/Kr oranlarına ait ROC eğrisi

Tablo 4.8. İdrar Nefrin/Kr, Podosin/Kr, Podokaliksin/Kr, Smad2/Kr, Smad7/Kr, TGF- β 1/Kr, Smad2/Smad7 oranı ve albüminüri düzeylerine ait duyarlılık, özgüllük ve belirlenen kesme değerleri

İDRAR BELİRTEÇLERİ	DUYARLILIK (%)	ÖZGÜLLÜK (%)	KESME (CUT-OFF) DEĞERİ
Nefrin/Kr (μ g/g)	74	89	10.61
Podosin/Kr (μ g/g)	74	89	60.74
Podokaliksin/Kr (μ g/g)	68.4	89	3.83
Smad2/Kr (μ g/g)	75	100	3.01
Smad7/Kr (μ g/g)	63	94	7.46
TGF- β 1/Kr (μ g/g)	68.4	89	1.21
Smad2/Smad7	63	100	0.53
Mikroalbüminüri	72	53	30
Makroalbüminüri	62.5	100	300

Tüm gruplarda her parametre için, belirlenen kesme değerinden yüksek olan sonuçların yüzdeleri hesaplandı. İdrar düzeyleri kesme değerinden yüksek olan örneklerin yüzdesi Şekil 4.4'te gösterildi.



Şekil 4.4. İdrar düzeyleri kesme değerlerinden yüksek olan örnek yüzdelерinin gruplara göre dağılımı

5. TARTIŞMA

DN, Diabetes Mellitus'un en önemli mikrovasküler komplikasyonlarından biridir. T1DM hastalarında diyabet süresi 25-40 yıldır ve %30 oranında DN gözlenmektedir. T2DM hastalarında ise tanıdan 20 yıl sonra yaklaşık %40 oranında DN gözlenmektedir (Pugliese ve ark., 2020). T2DM, T1DM'den daha fazla görüldüğünden T2DM'de DN prevalansı daha yüksektir. T2DM hastalarının %20'sinde 10 yıl içinde SDBH'ye ilerleme olduğu bildirilmektedir. SDBH tanısı alan hastaların önemli bir kısmını DN vakaları oluşturmakta ve bu hastalarda diyaliz ya da transplantasyon gibi renal replasman tedavilerine gereksinim duyulmaktadır.

Mikroalbüminüri; DN erken tanısı için yaygın olarak kullanılmakta olup düşük duyarlılık ve geniş varyasyon gibi sınırlamaları bulunmaktadır. T2DM'li bireylerin %30'u, erken tanı için altın standart olan mikroalbüminürinin başlangıcından önce böbrek hastalığına sahiptir (Kramer ve ark., 2003). Erken tanısal belirteçler, diyabetik nefropatinin ayırıcı tanısında ve prognozunda büyük önem taşırlar ve böbrek biyopsisi için endikasyon gereksinimini azaltırlar.

Mikroalbüminüri, daha önceki yıllarda altın standart olarak kabul edilse de kanıtlar DN'nin erken tespiti için yeterince duyarlı ve özgül bir belirteç olmadığını, ayrıca idrar yolu enfeksiyonları, akut hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar gibi diğer patolojik durumlarda da yükseldiğini göstermektedir (Fiseha ve ark., 2015). İdrarda mikroalbüminin varlığı, glomerüler filtrasyon bariyerinin üç bileşeninin de (endotel, glomerüler bazal membran ve podositler) hasar gördüğünü düşündürür ve tanısal doğruluğu, yapısal hasarın mikroalbümin atılımından önce oluşabileceği gerçeğiyle sınırlıdır. İdrarda podosit spesifik proteinlerin varlığı, glomerüler filtrasyon bariyerinin diğer iki bileşeninden bağımsız olarak sadece podositlerin hasarını gösterir (Nakamura ve ark., 2000). Podosit hasarının mikroalbüminüri ve proteinüri ortaya çıkmadan önce mevcut olduğu, bu nedenle DN tanısı için podosit spesifik proteinlerin mikroalbüminüriye kıyasla daha erken ve daha spesifik belirteçler olabileceği düşünülmektedir (Kostovkska ve ark., 2020a, 2020b).

Podosit hasarı ve/veya glomerül başına düşen podosit sayılarında gözlenen azalmaların, proteinüri aşamasından önce DN'de gözlenmesi gelecek araştırmalar açısından ümit vermektedir. Ancak bu çalışmalar dokuda gerçekleştirildiğinden invaziv bir girişim olan böbrek biyopsisi gereksinimi bulunmaktadır. Dokudaki hasarı, kolay ve non-invaziv elde edilen bir örnek olan idrarda gösterebilecek erken DN belirteçlerine gereksinim çok büyüktür. Bu nedenle idrardaki podosit spesifik belirteçler ve EMT sürecinin düzenleyicilerinin ölçümü, DN'nin erken tanısında ve hastalığın izleminde çok önemli görülmektedir.

Bu çalışmada, DN'de podosit-EMT süreci ile ilgili olarak çeşitli moleküllerin idrar biyobelirteci olarak kullanılabilirliği araştırıldı. Bu kapsamda T2DM hastalarında podosit ile ilişkili proteinlerden nefrin, podosin, podokaliksin, podosit şeklini korumakla yükümlü yüzey-anyonik proteini podoplanin, transforme edici büyüme faktörü TGF- β 1, TGF- β reseptör antagonistlerinden olan hücre sinyalleşmesinde rol oynayan protein smad2 ve smad7'nin idrardaki düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçüldü ve bu parametrelerin DN tanısı için duyarlılık ve özgüllükleri geleneksel belirteç olan albüminüri ile karşılaştırıldı. Hipergliseminin neden olduğu podosit EMT sürecine yol açan TGF- β /Smad yolağında regülatör rol oynayan sitokin TGF- β 1 ve bu yolak ile ilişkili proteinlerin idrar düzeylerinin T2DM'li hastalarda sağlıklı deneklere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu saptandı.

Literatürde T2DM'li normoalbüminürik hastalarda sağlıklı deneklere kıyasla bu proteinlerin idrar düzeylerinde artış gözlenmesinin önemli olduğu, bu artışın mikroalbüminüri ortaya çıkmadan önce podosit hasarını gösterebileceği ifade edilmiştir (Kostovska ve ark., 2020b). Çalışmamızda da bu görüşü destekler nitelikte olarak, bu proteinlerin idrar düzeyleri normoalbüminürik T2DM'li deneklerin %20-65'inde ROC analizi ile elde edilen kesme değerlerinden yüksek bulundu.

Jim ve ark.'nın çalışmasında normoalbüminürik hastaların %54'ünde, makroalbüminürik ve mikroalbüminürik hastaların hepsinde (%100) üriner nefrin yüksekliği olduğu bildirilirken, 2020'de yayınlanan bir başka çalışmada normoalbüminürik hastaların %82'sinde, mikroalbüminürik hastaların %88'inde ve makroalbüminürik hastaların hepsinde (%100) üriner nefrin yüksekliği olduğu gösterilmiştir (Jim ve ark., 2012;

Kostovska ve ark., 2020b). Bizim çalışmamızda ise normoalbuminürik hastaların %25'inde, mikroalbuminürik hastaların %30'unda ve makroalbuminürik hastaların %70'inde idrar nefrin/kr düzeylerinin yüksek olduğu gözlemlendi. Nefrinürinin hastalığın erken evresinde görülmesi ve aşikar hastalıkta artış göstermesi önceki bulguları desteklemektedir. Patari ve ark. normoalbuminürik diyabetik hastaların üçte birinde albuminüri ile korele olmayan bir nefrin artışını bildirmişlerdir. Bu artışı mikro ve makro albuminürik hastalarda da gözlemişlerdir (Patari ve ark., 2003). Çalışmada, nefrinüriyi saptamak için nefrin fragmanlarını gösteren Western-Blot yöntemi kullanılmıştır. Nefrinüri seviyesi kantitatif olarak ölçülmediği için albuminüri ile bir ilişkisi olup olmadığı net değildir. Çalışmamızda nefrinüri (idrар nefrin/kr) ile albuminüri (idrар albumin/kr) arasında orta düzeyde korelasyon ($r= 0.526$, $p < 0.001$) ve nefrinüri ile eGFH arasında da orta düzeyde negatif korelasyon ($r= -0.372$, $p < 0.001$) olduğu gözlemlendi. Bu da nefrinürinin bozulmuş böbrek fonksiyonunun bir belirtici olabileceğini göstermektedir. Literatürde de bulgularımıza benzer şekilde idrar nefrin ile eGFH arasında anlamlı negatif korelasyon bulunduğunu gösteren çalışmalar yer almaktadır (Kostovska ve ark., 2020b; Kelly ve ark., 2002; Dp ve ark., 2011).

Kostovska ve ark., nefrinürinin DN'yi öngörme olasılığını ROC analizi ile %96 olarak belirlemiş, ancak duyarlılık ve özgüllük değerlerini bildirmemişlerdir. Ayrıca idrar nefrin düzeyleri kreatinine oranlanmadan değerlendirilmiştir (Kostovska ve ark., 2020b). Bizim çalışmamızda ise ROC analizi ile 10.6 $\mu\text{g/g}$ kesme değerine sahip nefrin/kr düzeylerinin %74 duyarlılık ve %89 özgüllüğe sahip olduğu görüldü.

Zheng ve arkadaşları gerçek zamanlı PCR ile idrar sedimentinde mesajcı RNA (mRNA) ekspresyonunu ölçerek DN hastalarında idrar podosin mRNA düzeylerinin, idrar albumin ve serum kreatinin seviyeleri ile anlamlı şekilde korele olduğunu ancak eGFH ile korelasyon göstermediğini bildirmişlerdir (Zheng ve ark., 2011). Başka bir çalışmada ise normoalbuminürik DM hastalarında, diyabetik olmayan kontrollere kıyasla idrar nefrin ve podosin düzeylerinin daha yüksek olduğu, ayrıca normal veya artmış eGFH'si olan diyabetik hastalarda üriner podosin düzeyleri ile eGFH arasında anlamlı negatif korelasyon bulunduğu gösterilmiştir (Lioudaki ve ark., 2015).

ElShaarawy ve ark. çalışmalarında T2DM'li hastalarda pre-nefropati evresinde idrarda podosin saptadıklarını ifade etmişlerdir (ElShaarawy ve ark., 2019). Makroalbuminürik hastalarda idrar podosin düzeylerinin, mikroalbuminürik veya normoalbuminürik hastalara kıyasla anlamlı derecede daha yüksek olduğunu ve DN şiddetinin bir belirteci olarak albumin/kreatinin oranı ile oldukça anlamlı bir pozitif korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca idrar podosinin DM süresi ve HbA1c ile ilişkili olduğunu ifade ederek 10 yıldan uzun süreli DM'li hastalarda, 5 yıldan kısa süreli DM'li hastalara göre anlamlı olarak daha yüksek idrar podosin düzeyleri bulunduğunu belirtmişlerdir. Çalışmada idrar podosinin tanısallık performansı, ROC analizi kullanılarak değerlendirilmiş, 5.3 ng/mL'lik bir eşik değeri alınarak, podosinin, normoalbuminürik vakalarda (kontrol grubuna karşı) DN'yi saptamak için %93,3 duyarlılık ve %90 özgüllük gösterdiği bulunmuştur. Ancak idrar podosin düzeyleri kreatinine oranlanmadan değerlendirilmiş ve çalışma az sayıda örneklem (10 sağlıklı ve 15 normoalbuminürik, 15 mikroalbuminürik, 15 makroalbuminürik T2DM hastası) ile yapılmıştır.

Bizim çalışmamızda idrar podosin/kr düzeylerinin sağlıklı kontrollere kıyasla normoalbuminürik, mikroalbuminürik ve makroalbuminürik T2DM hastalarında daha yüksek olduğu ancak, normoalbuminürik hastalardaki yüksekliğin anlamlı olmadığı gözlemlendi. Ayrıca idrar podosin/kr düzeylerinin eGFR ile negatif ilişkili olduğu, ek olarak DM süresi, HbA1c, idrar albumin/kr ile orta düzeyde korelasyon gösterdiği ve idrar kreatinin düzeyleri ile de negatif yönde oldukça güçlü bir korelasyona sahip olduğu görüldü. ROC analizi ile de 60.7 µg/g kesme değerine sahip podosin/kr düzeylerinin %74 duyarlılık ve %89 özgüllük değerine sahip olduğu hesaplandı. Çalışma grubumuzda normoalbuminürik hastaların %25'inde, mikroalbuminürik hastaların %45'inde ve makroalbuminürik hastaların %70'inde idrar podosin/kr düzeylerinin yüksek olduğu gözlemlendi.

Literatürde diyabetli hastalarda podositlerin sayısı ve yoğunluğunun belirgin şekilde azaldığı (podositopeni) bildirilmiştir. Podositlerin apikal membranının üriner boşluğa yakınlığı nedeniyle, bu bölgede meydana gelen patolojik olayların, bazal membran veya slit diyaframda meydana gelenlerden daha kolay idrarda saptanması beklenir (Hara ve

ark., 2005). Podokaliksin, podosit yüzeyinde bulunan birincil glikokonjuktatlardan biridir. Hara ve ark. IgA nefropatisi, lupus nefriti, minimal değişiklik nefrotik sendromu (MCNS), fokal segmental glomerüloskleroza (FSGS), membranöz nefropatisi, lupus nefriti ve diyabetik nefropatisi olan hastalarda üriner podokaliksin düzeylerini gösteren bir çalışma yayınlamışlardır (Hara ve ark., 2012). Belirtilen glomerüler hastalıkların hepsinde kontrol bireylere kıyasla anlamlı derecede yüksek üriner podokaliksin düzeyleri olduğunu göstermişlerdir. Diyabetli katılımcılarda, normoalbuminüri, mikroalbuminüri ve makroalbuminüri gruplarında kontrollere göre üriner podokaliksin düzeylerinin önemli ölçüde arttığını ifade ederek, normoalbuminürik hastaların %53.8'inde, mikroalbuminürik hastaların %64,7'sinde ve makroalbuminürik hastaların %66.7'sinde kesme değerinin üzerinde üriner podokaliksin seviyeleri kaydedildiğini bildirmişlerdir. Ancak çalışmada ROC analizi yapılmamış, kesme değerinin kaç olduğu ve nasıl hesaplandığı belirtilmemiştir. İlaveten, çalışmada diyabetli hastalarda üriner podokaliksin düzeyinin HbA1c ve idrar albümini ile korelasyon gösterdiği, eGFH ve proteinüri ile korelasyonunun bulunmadığı bildirilmiştir.

2020 yılında yayınlanmış bir çalışmada üriner podokaliksin düzeyleri, sağlıklı deneklere kıyasla idrar albümin/kr oranlarına göre ayrılmış T2DM'li tüm hasta gruplarında önemli ölçüde yüksek bulunmuş, podokaliksin düzeylerinin DN derecesi ile kademeli olarak arttığı belirtilmiştir. Ayrıca idrar podokaliksin düzeylerinin idrar albümin/kr ve HbA1c ile zayıf bir korelasyona sahip olduğu, GFH ile korelasyon göstermediği ifade edilmiştir. ROC analizi ile üriner podokaliksinin %73.3 duyarlılık ve %93.3 özgüllüğe sahip olduğu, 43.8 ng/mL kesme değeri kullanılarak normoalbuminürik hastaların %48,2'sinde, mikroalbuminürik hastaların %64'ünde ve makroalbuminürik hastaların %100'ünde, ilaveten DN tanısı konan hastaların %93,3'ünde ve DN tanısı konmamış T2DM'li hastaların %51.6'sında kesme değerinden yüksek sonuçlar gözlendiği bildirilmiştir. Ancak çalışmada podokaliksin değerleri kreatinine oranlanmadan değerlendirilmiştir (Kostovska ve ark., 2020a).

Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak idrar podokaliksin/kr düzeyleri diyabetik hasta gruplarında sağlıklı kontrollere kıyasla yüksek bulundu. Bu yükseklik mikroalbuminürik ve makroalbuminürik T2DM hastalarda anlamlı bulunurken,

normoalbuminürik hastalarda anlamlı değildi. İdrar podokaliksin/kr düzeylerinin eGFH ile negatif ilişkili olduğu ayrıca DM süresi, HbA1c, idrar albümin/kr ile orta düzeyde korelasyon gösterdiği ve idrar kreatinin düzeyleri ile de negatif yönde oldukça güçlü bir korelasyona sahip olduğu görüldü. Yapılan ROC analizi ile 3.8 µg/g kesme değerine sahip podokaliksin/kr düzeylerinin %68.4 duyarlılık ve %89 özgüllük değerine sahip olduğu hesaplandı. Çalışma grubumuzda normoalbuminürik hastaların %25'inde, mikroalbuminürik hastaların %40'ında ve makroalbuminürik hastaların %65'inde idrar podokaliksin/kr düzeylerinin yüksek olduğu gözlemlendi.

Hipergliseminin neden olduğu podosit hasarı, diyabetik böbrek hastalığının ilerlemesinde çok önemli bir rol oynar. Podosit ilişkili moleküllerden biri olan podoplanin, glomerüler filtrasyon bariyerinin bütünlüğü ile yakından ilişkilidir (Yu ve ark., 2019). Podoplaninin biyolojik işlevlerini yerine getirebilmesi için aynı hücrede veya komşu hücrelerde bulunan diğer proteinlerle etkileşime girmesi gerekir. Podoplaninin ligandlarına bağlanması, çoğalmayı, kasılmayı, göçü, epitelyal-mezenkimal geçişi ve hücre dışı matriksin yeniden şekillenmesini düzenleyen sinyal yollarının modülasyonuna yol açar (Quintanilla ve ark., 2019).

Yu ve ark., diyabetik farelerde ve kültürlenmiş fare podositlerinde berberin ve podoplanin ekspresyonunun renoprotektif etkisi arasındaki ilişkiyi araştırırken, podoplanin ekspresyon seviyelerinin hem diyabetik farelerin renal glomerulusunda hem de hiperglisemi ortamında kültürlenmiş podosit hücrelerinde önemli ölçüde azaldığını bulmuşlardır. Ayrıca, hiperglisemi koşulu altında podosit hücrelerinde NF-κB sinyal yolunun aktive edildiğini, bunun da podoplaninin ekspresyonunu azalttığını ve artan podosit apoptozisine yol açtığını göstermişlerdir (Yu ve ark., 2019).

Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada podosit belirteci podoplaninin immünofloresan sinyalinin, iskemi-reperfüzyon hasarından kısa bir süre sonra glomerülde azaldığı ve böbreğin tübülointerstisyel bölmesinde yoğunlaştığı bulunmuştur. Bu tübülointerstisyel sinyalin gücünün, iskeminin şiddeti ile doğru orantılı olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, iskemi sonrası farelerin idrarında podoplanin saptandığı ve idrar podoplanin-kreatinin oranındaki artışın, renal iskemi-reperfüzyon hasarının başlangıcı ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu bildirilmiştir (Kasinath ve ark., 2019).

Literatürde, diyabetik hasta gruplarında idrar podoplanin düzeylerini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma ile T2DM ve DN hastalarında idrar podoplanin düzeyleri ilk kez gösterilmektedir. Çalışmamızda diyabetik hasta gruplarında idrar podoplanin düzeyleri sağlıklı kontrollere kıyasla yüksek bulundu. Bu yükseklik mikroalbuminürik ve makroalbuminürik T2DM hastalarında anlamlı iken, normoalbuminürik hastalarda anlamlı değildi. Ayrıca normoalbuminürik ve mikroalbuminürik T2DM ile mikroalbuminürik ve makroalbuminürik T2DM grupları arasında da anlamlı bir farklılık yoktu. Yapılan ROC analizinde eğri altında kalan alanın anlamlı olmadığı görüldü. İdrar podoplanin düzeylerinin T2DM hastalarında DN'de arttığı gözlenirse de DN tanısı için uygun bir belirteç olamayacağı düşünüldü. Bunun sebebi bu glikoproteinin böbrek podositlerine spesifik olmaması olabilir. Podoplaninin podositler dışında akciğer alveolar hücrelerinde, lenfatik endotel hücrelerinde ve nörol dokuda da işlevleri olduğu bilinmektedir.

TGF- β , kemik morfojenik proteinleri (BMP'ler), büyüme ve farklılaşma faktörleri (GDF'ler) ile aktivinleri de içeren TGF- β süper ailesinin bir üyesidir. TGF- β ligandları, TGF- β 1, 2 ve 3 olmak üzere 3 izoform içerir, çeşitli hücre ve doku tiplerinde yaygın olarak eksprese edilen ve baskın olan tipi TGF- β 1'dir (Meng ve ark., 2015). TGF- β ligandları, büyük bir öncü protein olarak sentezlenir. Aktif TGF- β , fosforilasyon yoluyla TGFB1'i aktive etmek için TGFB2'ye bağlanır. Aktive edilmiş TGFB1 daha sonra Smad2 ve Smad3'ü fosforile eder. Aktive edilmiş R-Smad'lar (Smad2 ve 3), Smad4 (ortak Smad veya Co-Smad) ile kompleksler oluşturabilir ve hedef genlerin transkripsiyonunu düzenlemek için çekirdekte yer değiştirebilirler. Ayrıca Smad3 tarafından indüklenen inhibitör etkili Smad 7, Smad2 ile Smad3'ün fosforilasyonunu inhibe etmek için TGFB1'e yarışmalı olarak bağlanır. Ayrıca, Smad7, TGFB1'i parçalama işlevi de görebilir ve böylece negatif geri besleme mekanizması aracılığıyla TGF- β sinyalini negatif olarak modüle eder (Wang ve ark., 2005).

DN'li hastalarda ve hayvan modellerinde, TGF- β ligandları ile Smad2 ve Smad3 gibi sinyal moleküllerinin, glomerüller, tübüller ve tübülointerstitiumda yüksek oranda aktive edildiği gösterilmiştir (Wang ve ark., 2021). DN, yüksek glukoz, gelişmiş glikasyon son ürünleri (AGE'ler), hipertansiyon ve dislipidemi gibi mekanizmalar yoluyla TGF- β

sinyalini aktive edebilen çok sayıda faktör ile ilişkilidir. Böbrekte TGF- β 1 salınımının etkisiyle ekstrasellüler matriks bileşenleri birikir ve EMT aracılığıyla dokuda fibrosis gelişimine sebep olurlar. DN patogenezinde hücre dışı matriks proteinlerinin birikmesi, glomerüllerin bazal membranlarının kalınlaşması gibi morfolojik özellikler mikroalbüminüriden önce ortaya çıkmaktadır.

T1DM ve T2DM'li hastalarda, TGF- β 1'in plazma düzeyleri önemli ölçüde artar ve DN'li hastalarda daha da yükselir (Wang ve ark., 2021). DN'li hastalarda plazma TGF- β 1 düzeyleri ile proteinüri arasında güçlü korelasyon olduğu (İbrahim ve Rashed, 2007), plazmanın yanı sıra idrar TGF- β 1 düzeylerinde de yükseklik olduğu bildirilmiştir (Tsakas ve Goumenos, 2006). İdrar TGF- β 1 düzeyleri böbrekteki lokal üretimi yansıtır ve çeşitli glomerüler hastalık tiplerinde tanımlanmıştır.

Shaker ve ark., mikro ve makroalbüminürisi olan T2DM'li hastalarda serum ve idrar TGF- β 1 düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre önemli ölçüde arttığını göstermişlerdir (Shaker ve ark., 2014). Farklı çalışmalarda da serum ve idrar TGF- β 1 düzeylerinin serum glukoz konsantrasyonu ve HbA1c ile pozitif korelasyonlar gösterdiği bildirilmiştir (Hellmich ve ark., 2000; Hefini ve ark., 2007; El Mesallamy ve ark., 2012). Ayrıca T2DM'li hastalarda idrar TGF- β 1/kr konsantrasyonu ile proteinüri ve albüminüri arasında pozitif korelasyonlar bulunduğu bildirilmiştir (Shaker ve ark., 2014; Hefini ve ark., 2007).

Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak idrar TGF- β 1/kr düzeyleri diyabetik hasta gruplarında sağlıklı kontrollere kıyasla yüksek bulundu. Bu yükseklik mikroalbüminürik ve makroalbüminürik T2DM hastalarında anlamlı iken, normoalbüminürik hastalarda anlamlı değildi. İdrar TGF- β 1/kr düzeylerinin eGFH ile negatif ilişkili olduğu, DM süresi, HbA1c, idrar albümin/kreatinin oranı ile orta düzeyde korelasyon gösterdiği ve idrar kreatinin düzeyleri ile de negatif yönde oldukça güçlü bir korelasyona sahip olduğu görüldü. Yapılan ROC analizi ile DN'de 1.2 μ g/g kesme değerine sahip TGF- β 1/kr düzeylerinin %68.4 duyarlılık ve %89 özgüllük değerine sahip olduğu hesaplandı. Çalışma grubumuzda normoalbüminürik hastaların %20'sinde, mikroalbüminürik hastaların %40'ında ve makroalbüminürik hastaların %65'inde idrar TGF- β 1/kr düzeylerinin yüksek olduğu gözlemlendi.

DN'de tübülointerstisyel fibrozis gelişiminde hücre dışı matriks birikimi, lokal olarak aktive olan miyofibroblastlar tarafından yönlendirilir. EMT yoluyla tübüler epitel hücreleri gibi çeşitli hücre kaynaklarından miyofibroblastlar ortaya çıkmaktadır. TGF- β /Smad sinyal yolu, hem tübülointerstisyel fibrozis hem de EMT'de kritik bir rol oynar. Smad3 bir merkezi arabulucu iken, belirgin bir şekilde eksprese edilen diğer değişken Smad2'nin rolü tam olarak anlaşılmamıştır. 2018 yılında yayınlanan bir çalışmada, Smad2 nakavt fare modeli kullanarak, DN sırasında tübülointerstisyel fibrozis ve EMT gelişiminde renal Smad2'nin rolü incelenmiştir (Loeffler ve ark., 2018). Diyabetik Smad2 nakavt farelerde, diyabetik farelere kıyasla DN, tübülointerstisyel fibrozis ve tübüler EMT benzeri değişikliklerin azaldığı, miyofibroblast belirteçlerinin ekspresyonunun önemli ölçüde düştüğü gösterilmiştir. Diyabetin neden olduğu tübülointerstisyel fibrozis ve EMT'ye karşı bir koruma mekanizması olarak, diyabetik Smad2 nakavt farelerde azalmış Smad3 protein seviyeleri ve düşük TGF- β 1 seviyeleri bildirilmiştir. Bu bulgular, deneysel DN'de profibrotik TGF- β /Smad3 sinyalizasyonu için Smad2'nin önemli rolünü desteklemektedir.

2011 yılında yayınlanan bir çalışmada ise Smad7 eksikliği olan farelerde vahşi tip farelere göre albüminüri, renal fibrozis ve inflamasyonda önemli artış olduğu gösterilerek daha şiddetli diyabetik böbrek hasarı geliştiği bildirilmiştir (Chen ve ark., 2011).

Literatürde idrar Smad2 ve Smad7 düzeylerini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Bu araştırma DN hastalarında idrar Smad2/kr ve Smad7/kr düzeylerinin gösterildiği ilk çalışmadır. Diyabetik hasta gruplarında hem idrar Smad2/kr hem de Smad7/kr düzeyleri sağlıklı kontrollere kıyasla yüksek bulundu. Bu yükseklik mikroalbuminürik ve makroalbuminürik T2DM hastalarında anlamlı iken, normoalbuminürik hastalarda anlamlı değildi. İdrar Smad2/kr ve Smad7/kr düzeylerinin GFH ile negatif ilişkili oldukları, DM süresi, HbA1c, idrar albumin/kreatinin oranı ile orta düzeyde korelasyon gösterdikleri ve idrar kreatinin düzeyleri ile de negatif yönde oldukça güçlü korelasyonlara sahip oldukları görüldü. Yapılan ROC analizleri ile 3.01 μ g/g kesme değerine sahip Smad2/kr düzeylerinin %75 duyarlılık ve %100 özgüllük değerine; 7.46 μ g/g kesme değerine sahip Smad7/kr düzeylerinin %63 duyarlılık ve %94 özgüllük

değerine sahip olduğu hesaplandı. Çalışma grubumuzda normoalbuminürik hastaların %45'inde, mikroalbuminürik hastaların %55'inde ve makroalbuminürik hastaların %100'ünde idrar Smad2/kr düzeylerinin, normoalbuminürik hastaların %20'sinde, mikroalbuminürik hastaların %30'unda ve makroalbuminürik hastaların %60'ında idrar smad7/kr düzeylerinin yüksek olduğu gözlemlendi.

Smad2/3 kompleksleri nükleositol plazmik mekiklerde kritik bir rol oynar. Smad3'ün hiperaktivasyonu, renal fibrotik hastalıkların temel bir özelliğidir. Daha da önemlisi, Smad3 ve Smad7 dengesizliğinin fibrotik yanıtı aracılık eden ana mekanizmalardan biri olduğu kanıtlanmıştır. Smad3, inhibitör etkili olan Smad7'yi indükler. Bu da TGF- β 1'in sinyal iletimini negatif feed-back yoluyla bloke eder. Çalışma sonuçlarımız benzer şekilde Smad2'nin de Smad7'yi indüklediğini desteklemektedir.

Diyabetik hasta gruplarında yaptığımız analizler sonucunda hem renal fibrozisin indükleyicisi olan Smad2 hem de inhibitörü olan Smad7 düzeylerinin arttığı gözlemlendi. Bu sinyal moleküllerinin idrar düzeyleri, böbrekteki üretimlerini yansıtır ve Smad2 düzeyinin Smad7'ye göre daha fazla artmasının renal fibrozisi hızlandıracağı düşünüldü. Bu nedenle çalışmamızdaki tüm gruplarda Smad2/Smad7 oranları da değerlendirildi. Diyabetik hasta gruplarında idrar Smad2/Smad7 oranı sağlıklı kontrollere kıyasla yüksek bulundu. Bu yükseklik mikroalbuminürik ve makroalbuminürik T2DM hastalarında anlamlı iken, normoalbuminürik hastalarda anlamlı değildi. Yapılan ROC analizleri ile 0.53 kesme değerine sahip Smad2/Smad7 oranının %63 duyarlılık ve %100 özgüllük değerine sahip olduğu hesaplandı. Çalışma grubumuzda normoalbuminürik hastaların %65'inde, mikroalbuminürik hastaların %85'inde ve makroalbuminürik hastaların %100'ünde idrar smad2/smad7 düzeylerinin yüksek olduğu gözlemlendi.

DN genellikle semptomlara neden olmaz, bu nedenle “Amerikan Diyabet Derneği (ADA)” ve “Böbrek Hastalığı: Küresel Sonuçların İyileştirilmesi (KDIGO)” gruplarının kılavuzları, T2DM'li tüm hastaların tanı anında ve daha sonra yıllık olarak böbrek fonksiyonlarının ve albuminürinin ölçülmesini önerir. (ADA, 2019; Levey ve ark., 2007).

Albüminüri en iyi, spot idrar numunelerinde (ideal olarak sabah erken numunelerde) albümin/kreatinin ölçümleri kullanılarak değerlendirilir. Albümin atılımını ölçmek için 24 saatlik idrar da uygundur, ancak daha az kullanışlı ve toplama hatalarına daha yatkındır. Böbrek fonksiyonu, serum kreatinin bazlı bir eGFH hesaplaması kullanılarak değerlendirilmelidir. eGFH hesaplamalarında 60-90 $\mu\text{mL/dk}/1.73 \mu\text{m}^2$ aralığında üstün performansı nedeniyle CKD-EPI denklemi önerilir. Çoğu durumda, DN klinik bir tanıdır. Böbrek biyopsisi, tanı ve prognostik bilgi için altın standart testtir, ancak çoğu merkezde genellikle yalnızca alternatif bir böbrek patolojisinden şüphelenildiğinde yapılır (Selby ve Taal, 2020).

Hem T1DM hem de T2DM'de normal idrar albümin atılımı durumunda da eGFH'de azalmaların meydana gelebileceği giderek daha fazla kabul edilmektedir (Dwyer ve Lewis, 2013). Genel olarak, proteinürik olmayan kronik böbrek hastalığı genellikle doğada iskemik olan veya tübülo-interstisyel patolojilerin baskın olduğu etiyolojilere işaret eder. Bununla birlikte, diyabetik glomerülopatinin tipik histopatolojik değişiklikleriyle ilişkili olarak proteinürik olmayan DN de tanımlanmıştır (Budhiraja ve ark., 2013; Yamanouchi ve ark., 2019).

Retrospektif olarak eGFH değerleri $<60 \text{ mL/dk}/1.73 \text{ m}^2$ olan ve tipik DN patolojik bulgularına sahip hastalardan alınan 526 böbrek biyopsisi incelenerek, bunların %16,7'sinde (%3,6 normoalbüminüri ve %13,1 mikroalbüminüri) proteinürik olmayan DN (ACR $<300 \text{ mg/g}$) ve %83,3'ünde proteinürik DN (ACR $\geq 300 \text{ mg/g}$) olduğu bildirilmiştir (Yamanouchi ve ark., 2019). Bununla birlikte, birçok böbrek hastalığı formunda gözlemlendiği gibi, proteinüri derecesinin DN ilerleme riskinin güçlü bir belirleyicisi olmaya devam ettiği ve proteinürik olmayan DN'nin daha iyi bir prognoza sahip olduğu ifade edilmektedir. Albüminürik olmayan DN'de albüminürik DN'ye göre böbrek hasarının ilerlemesi ve SDBH gelişimi riskinin daha düşük olduğu bir dizi başka çalışmada bildirilmiştir (Koye ve ark., 2018). Ancak bu, albüminürik olmayan DN gelişimini maskeleyememelidir. Albüminürik olmayan DN de böbrek hastalığı olmayanlara kıyasla mortalite ve majör kardiyovasküler olaylar için önemli bir risk faktörüdür. Bir otopsi çalışmasında T1DM ve T2DM'li histolojik DN kanıtı olan 106

kişiden 20'sinin albüminürisi olmadığı ve ölüm öncesi DN tanısı almadığı açıklanmıştır (Klessens ve ark., 2016).

Bu çalışmada T2DM hastaları albüminüri düzeylerine göre üç gruba ayrıldı. Mikro ve makro albüminüri gruplarında albümin/kreatinin oranı sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak yüksekti. Araştırmaya dahil edilen idrar belirteçlerinin hepsi idrar kreatinin düzeyleri ile negatif yönde yüksek korelasyona sahipken, idrar albümin/kreatinin düzeyleri ile orta düzeyde korelasyon gösterdi. Yapılan ROC analizleri ile 30 mg/g kesme değerine sahip albümin/kreatinin düzeylerinin %72 duyarlılık ve %53 özgüllük değerine; 300 mg/g kesme değerine sahip albümin/kreatinin düzeylerinin %62.5 duyarlılık ve %100 özgüllük değerine sahip olduğu hesaplandı. Çalışma sonuçlarımızda mikroalbüminürinin DN tanısı için yeterli özgüllük değerine sahip olmadığı görülmektedir.

Araştırdığımız tüm idrar biyobelirteçleri eGFH ile negatif korelasyona sahipti, bu da her birinin bozulmuş böbrek fonksiyonunun bir belirteci olabileceğini göstermektedir. ROC analizi sonuçlarımıza göre smad2/kr'nin DN tanısı için en yüksek duyarlılık ve özgüllük gösteren parametre olduğu gözlenirse de örneklem büyüklüğü sonuçları etkileyebileceğinden idrar nefrin/kr, podosin/kr, podokaliksin, TGF- β 1, smad7 ve smad2/smad7 düzeyleri de DN için potansiyel erken tanı belirteci olabilirler.

Araştırmamızın iki sınırlılığı vardı. Birincisi, çalışmanın kesitsel doğası; ikincisi, çalışmanın küçük örneklem büyüklüğüdür. Araştırılan belirteçlerin idrarla atılımının nedensel bir mekanizmanın parçası olup olmadığını veya erken dönemde idrara çıkmalarının ileride oluşacak DN'yi tutarlı bir şekilde öngöreceğini bilemeyiz. Bu soruları cevaplamak için normoalbüminürik T2DM'li hastalarda prospektif olarak bu idrar belirteçlerini ölçmemiz gerekir. DN'nin erken tespitinde bu belirteçlerin değerini daha iyi değerlendirmek için geniş, ileriye dönük bir çalışma önerilir. Daha geniş araştırmalar, bu parametrelerden birinin klinik öncesi DN'nin bir belirteci olduğunu doğrularsa; gelecekte, doğrulanan idrar belirteci, DN'nin erken tespiti için rutin laboratuvar uygulamasında kullanılan altın standart olan mikroalbüminüri ile değiştirilecektir.

Bu çalışmanın sonuçları podosit EMT sürecinde TGF- β /Smad sinyal yolağı ile ilişkili moleküllerin idrar düzeylerinin DN ile arttığını ve DN'nin erken saptanmasında önemli olabileceklerini kanıtlamaktadır. Ayrıca, bulgularımız idrar nefrin, podosin ve smad2 düzeylerinin, DN tanısında mikroalbüminüriye kıyasla daha yüksek tanısal duyarlılığa ve özgüllüğe sahip olduklarını göstermektedir.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızın sonuçlarını şu şekilde özetleyebiliriz:

1. Araştırmaya 60 T2DM hastası ve 20 sağlıklı katılımcı dahil edildi.
2. T2DM hastaları idrar albümin/kr oranlarına göre üç gruba (normoalbuminürik, mikroalbuminürik, makroalbuminürik) ayrıldı. Kontrol grubu ise sağlıklı katılımcılardan oluşturuldu.
3. 80 katılımcıda, podosit ile ilişkili proteinlerden nefrin, podosin, podokaliksin ve podoplanin, hem tübülointerstisyel fibrozis hem de podosit EMT sürecinde kritik bir rol oynayan TGF- β /Smad sinyal yolu ile ilişkili proteinlerden TGF- β 1, smad2 ve smad7'nin idrardaki düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçüldü.
4. İdrar nefrin, podosin, podokaliksin, podoplanin, TGF- β 1, smad2 ve smad7 düzeyleri idrar kreatinine oranlanarak dört gruptaki farklılıkları değerlendirildi.
5. İdrar nefrin/kr, podosin/kr, podokaliksin/kr, podoplanin/kr, TGF- β 1/kr, smad2/kr ve smad7/kr düzeyleri mikroalbuminürik ve makroalbuminürik T2DM gruplarında sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı olarak yüksek bulundu. Ancak sağlıklı kontrol grubu ile normoalbuminürik T2DM grubu arasında anlamlı farklılık gözlenmedi.
6. İdrar nefrin/kr, podosin/kr, podokaliksin/kr, podoplanin/kr, TGF- β 1/kr, smad2/kr ve smad7/kr düzeylerinin eGFH ve idrar kreatinin düzeyleri ile negatif korelasyon, ayrıca DM süresi, HbA1c, idrar albümin/kr ile pozitif korelasyon gösterdiği bulundu.
7. İdrar nefrin/kr, podosin/kr, podokaliksin/kr, podoplanin/kr, TGF- β 1/kr, smad2/kr ve smad7/kr düzeyleri eGFH ile negatif korelasyon gösterdiğinden her birinin bozulmuş böbrek fonksiyonunun bir belirteci olabileceği düşüldü.
8. İdrar nefrin/kr, podosin/kr, podokaliksin/kr, podoplanin/kr, TGF- β 1/kr, smad2/kr ve smad7/kr düzeylerinin DN tanısı için duyarlılık ve özgüllükleri geleneksel belirteç olan albümin/kr ile karşılaştırıldı.
9. Yapılan ROC analizleri ile 10.6 μ g/g kesme değerine sahip nefrin/kr düzeylerinin %74 duyarlılık ve %89 özgüllük değerine; 60.7 μ g/g kesme değerine sahip podosin/kr düzeylerinin %74 duyarlılık ve %89 özgüllük değerine; 3.8 μ g/g kesme değerine sahip podokaliksin/kr düzeylerinin %68.4 duyarlılık ve %89 özgüllük değerine; 1.2 μ g/g kesme değerine sahip TGF- β 1/kr düzeylerinin %68.4 duyarlılık ve %89

özgüllük değerine; 3.01 µg/g kesme değerine sahip Smad2/kr düzeylerinin %75 duyarlılık ve %100 özgüllük değerine; 7.46 µg/g kesme değerine sahip Smad7/kr düzeylerinin %63 duyarlılık ve %94 özgüllük değerine; 0.53 kesme değerine sahip Smad2/Smad7 oranının %63 duyarlılık ve %100 özgüllük değerine; 30 mg/g kesme değerine sahip albümin/kr düzeylerinin %72 duyarlılık ve %53 özgüllük değerine sahip olduğu görüldü.

10. Mikroalbuminürinin DN tanısı için yeterli özgüllük değerine sahip olmadığı gözlemlendi.

11. DN için en yüksek tanısal duyarlılık ve özgüllük gösteren parametre idrar smad2/kr idi.

12. İdrar nefrin/kr, podosin/kr ve smad2/kr düzeyleri mikroalbuminüriye göre daha yüksek tanısal duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğundan DN için potansiyel erken tanı belirteci olabilecekleri düşünüldü.

13. Bu verilerle; nefrin, podosin, podokaliksin, podoplanin, TGF-β1, smad2 ve smad7 proteinlerinin idrarla atılımının DN'ye yol açan bir mekanizmanın parçası olup olmadığını veya erken dönemde idrara çıkmalarının ileride oluşacak DN'yi saptayabileceğini öngöremeyiz. Bu sonuçlardan yola çıkarak önerimiz, normoalbuminürik T2DM'li hastaların prospektif olarak izlenmesi ve zaman içerisinde DN tanısı alan ve almayan hastalarda idrar nefrin, podosin, podokaliksin, podoplanin, TGF-β1, smad2 ve smad7 düzeylerinin karşılaştırılmasıdır. Daha geniş kapsamlı ve prospektif olarak yapılacak araştırmalar, bu parametrelerden birinin DN'nin erken tanı belirteci olduğunu doğrulayabilir.

KAYNAKLAR

- Alhajj M, Farhana A. Enzyme Linked Immunosorbent Assay. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2021; Jan. 2021 Feb 6.
- American Diabetes Association. Microvascular complications and foot care: standards of medical care in diabetes - 2019. Diabetes Care. 2019; 42(Suppl 1):S124-S138.
- An JH, Cho YM, Yu HG, Jang HC, Park KS, Kim SY, et al. The Clinical Characteristics of Normoalbuminuric Renal Insufficiency in Korean Type 2 Diabetic Patients: A Possible Early Stage Renal Complication. J Korean Med Sci. 2009; 24(Suppl 1):S75-81.
- Arınsoy T, Güngör Ö, Koçyiğit İ. Böbrek Fizyopatolojisi. Reaktif, Ankara, 2017.
- Armelloni S, Corbelli A, Giardino L, Li M, Ikehata M, et al. Podocytes: recent biomolecular developments. BioMol Concepts. 2014; 4:319-330.
- Atzori L, Deidda S, Aste N. Enzyme-linked immunosorbent assay in autoimmune blistering diseases: preliminary experience of the Dermatology Department of Cagliari. G Ital Dermatol Venereol. 2008 Feb;143(1):1-8.
- Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. Peptides. 2015; 72:4-15.
- Bangstad HJ, Osterby R, Dahl-Jørgensen K et al. Early glomerulopathy is present in young, type 1 (insulin-dependent) diabetic patients with microalbuminuria. Diabetologia. 1993 Jun; 36(6):523-9.
- Beagley J, Guariguata L, Weil C & Motala AA. Global estimates of undiagnosed diabetes in adults. Diabetes Res Clin Pract. 2014 Feb; 103(2):150-60.
- Brosius FC, Coward RJ. Podocytes, signaling pathways, and vascular factors in diabetic kidney disease. Adv Chronic Kidney Dis. 2014; 21: 304–310.

Budhiraja P, Thajudeen B, Popovtzer M. Absence of albuminuria in type 2 diabetics with classical diabetic nephropathy: clinical pathological study. *Journal of Biomedical Science and Engineering*. 2013; 6:20-25.

Bobkova I, Chebotareva N, Schukina A, Kamyshova E, Bobrova L. New Insights into the Molecular Mechanisms of Podocytes Injury in Diabetes. *J Clin Exp Nephrol*. 2018; 3(3):17.

Camargo EG, Soares AA, Detanico AB, Weinert LS, Veronese FV, Gomes EC, et al. The Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) equation is less accurate in patients with type 2 diabetes when compared with healthy individuals. *Diabet Med*. 2011; 28(1):90–5.

Chang JH, Paik SY, Mao L. Diabetic kidney disease in FVB/NJ akita mice: temporal pattern of kidney injury and urinary nephrin excretion. *PLoS ONE*. 2012; 7(4): e3394.

Chen H, Huang XR, Wang W et al. The protective role of Smad7 in diabetic kidney disease: Mechanism and therapeutic potential. *Diabetes*. 2010; 60: 590– 601.

Chen HY, Huang XR, Wang W, Li JH, Heuchel RL, Chung ACK, Lan HY. The protective role of Smad7 in diabetic kidney disease: mechanism and therapeutic potential. *Diabetes*. 2011 Feb; 60(2):590-601.

Collins AJ, Foley RN, Herzog C, Chavers B, Gilbertson D, Herzog C, et al. US Renal Data System 2012 annual data report. *Am J Kidney Dis*. 2013; 61 (1 Suppl 1):A7, e1-476.

Currie G, Delles C. Urinary Proteomics for Diagnosis and Monitoring of Diabetic Nephropathy. *Curr Diab Rep*. 2016; 16:104.

Dai H, Liu Q, Liu B. Research Progress on Mechanism of Podocyte Depletion in Diabetic Nephropathy. *Journal of Diabetes Research*. 2017; Vol 2017, Article ID 2615286.

Denhez B, Geraldles P. Regulation of nephrin phosphorylation in diabetes and chronic kidney injury. *Adv Exp Med Biol*. 2017; 966:149-161.

Ding WY, Saleem MA. Current concepts of the podocyte in nephrotic syndrome. *Kidney Res Clin Pract.* 2012; 31:87-93.

Dirks J, Remuzzi G, Horton S, et al. Diseases of the Kidney and the Urinary System. In: Jamison DT (Eds). *Disease Control Priorities in Developing Countries*. 2nd edition. Washington (DC): World Bank. 2006; Chapter 36.

Do Nascimento JF, Canani LH, Gerchman F, Rodrigues PG, Joelsons G, dos Santos M, et al. Messenger RNA levels of podocyte-associated proteins in subjects with different degrees of glucose tolerance with or without nephropathy. *BMC Nephrol.* 2013; 14:214.

Doublier S, Salvidio G, Lupia E, Ruotsalainen V, Verzola D, et al. Nephrin expression is reduced in human diabetic nephropathy of type 1 diabetes. *Diabetes.* 2003; 52: 2969-2974.

Dwyer JP, Lewis JB. Nonproteinuric diabetic nephropathy: when diabetics don't read the textbook. *Med Clin North Am.* 2013; 97(1):53-58.

El Mesallamy HO, Ahmed HH, Bassyouni AA, Ahmed ME. Clinical significance of inflammatory and fibrogenic cytokines in diabetic nephropathy. *Clin Biochem.* 2012; 45:646-665.

ElShaarawy A, Behairy MA, Bawady SA, Abdelsattar HA, Shadad E. Urinary podocin level as a predictor of diabetic kidney disease. *J Nephropathol.* 2019; 8(3):e26.

Fiseha T. Urinary biomarkers for early diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients. *Biomark. Res.* 2015; 3:16.

Forbes JM, and Cooper ME. Mechanism of diabetic complications. *Physiol Rev.* 2013; 93:137-188.

Fox CS, Matsushita K, Woodward M, Bilo HJ, Chalmers J, Heerspink HJ, et al. Associations of kidney disease measures with mortality and end-stage renal disease in individuals with and without diabetes: a meta-analysis. *Lancet.* 2012; 380(9854):1662-73.

Fukasawa H, Yamamoto T, Togawa A et al. Down-regulation of Smad7 expression by ubiquitin-dependent degradation contributes to renal fibrosis in obstructive nephropathy in mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2004; 101:8687-92.

Greka A, Mundel P. Cell biology and pathology of podocytes. *Annu Rev Physiol*. 2012; 74:299-323.

Groop PH, Thomas MC, Moran JL et al. The presence and severity of chronic kidney disease predicts all-cause mortality in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2009 Jul; 58(7):1651-8.

Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I et al. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014 Feb; 103(2):137-49.

Guidone C, Gniuli D, Castagneto-Gissey L, Leccesi L, Arrighi E, Iaconelli A, et al. Underestimation of urinary albumin to creatinine ratio in morbidly obese subjects due to high urinary creatinine excretion. *Clin Nutr*. 2012; 31(2): 212-6.

Gurkishan S, Chadha, Marilyn E. Morris, Monoclonal Antibody Pharmacokinetics in Type 2 Diabetes Mellitus and Diabetic Nephropathy, *Curr Pharmacol Rep*. 2016; 2:45-56.

Haller H, Ito S, Izzo Jr JL, Januszewicz A, Katayama S, Menne J, et al. Olmesartan for the delay or prevention of microalbuminuria in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2011; 364(10):907-17.

Hara M, Yamagata K, Tomino Y, Saito A, Hirayama Y, Ogasawara S, Kurosawa H, Sekine S, Yan K. Urinary podocalyxin is an early marker for podocyte injury in patients with diabetes: establishment of a highly sensitive ELISA to detect urinary podocalyxin. *Diabetologia*. 2012; 55:2913-2919.

Hara M, Yanagihara T, Kihara I et al. Apical cell membranes are shed into urine from injured podocytes: a novel phenomenon of Pod injury. *J Am Soc Nephrol*. 2005; 16:408-416.

Hara M, Yanagihara T, Takada T, et al. Urinary excretion of podocytes reflects disease activity in children with glomerulonephritis. *Am J Nephrol*. 1998; 18:35-41.

Hefini S, Kamel A, El-Banawy H, Refai W, Khalil G. The role of BMP-7 and TGF- β 1 in diabetic nephropathy. *J Med Res Inst.* 2007; 28:235-243.

Hellmich B, Schellner M, Schatz H, Pfeiffer A. Activation of transforming growth factor-beta1 in diabetic kidney disease. *Metabolism.* 2000; 49(3):353-9.

Hillege HL, Fidler V, Diercks GF, van Gilst WH, de Zeeuw D, van Veldhuisen DJ, et al. Urinary albumin excretion predicts cardiovascular and noncardiovascular mortality in general population. *Circulation.* 2002; 106(14):1777-82.

Hovind P, Tarnow L, Rossing P et al. Predictors for the development of microalbuminuria and macroalbuminuria in patients with type 1 diabetes: inception cohort study. *BMJ.* 2004 May; 8;328(7448):1105.

Ibrahim S, Rashed L. Estimation of transforming growth factor-beta 1 as a marker of renal injury in type II diabetes mellitus. *Saudi Med. J.* 2007; 28, 519-523.

Imasawa T, Obre E, Bellance N, et al. High glucose repatterns human podocyte energy metabolism during differentiation and diabetic nephropathy. *The FASEB Journal.* 2016; 31(1):294-307.

International Diabetes Federation. Update of mortality attributable to diabetes for the IDF Diabetes Atlas: Estimates for the year 2013. *Diabetes Res Clin Pract.* 2015 Sep;109(3):461-5.

Jim B, Ghanta M, Qipo A, Fan Y, Chuang PY, Cohen HW, Abadi M, Thomas DB, He JC. Dysregulated Nephron in Diabetic Nephropathy of Type 2 Diabetes: A Cross Sectional Study. *PLoS One.* 2012; 7(5):e36041.

Johnstone DB, Holzman LB. Clinical impact of research on the podocyte slit diaphragm. *Nature Clinical Practice Nephrology.* 2006; 2(5):271-282.

Kandasamy Y, Smith R, Lumbers ER, Rudd D. Nephron - a biomarker of early glomerular injury. *Biomark Res.* 2014; 2:21.

Kang MJ, Ingram A, Ly H, Thai K, Scholey JW. Effects of diabetes and hypertension on glomerular transforming growth factor-beta receptor expression. *Kidney Int.* 2000; 58:1677-85.

Kanwar YS, Wada J, Sun L et al. Diabetic nephropathy: Mechanisms of renal disease progression. *Exp. Biol. Med.* 2008; 233:4-11.

Kasinath V, Yilmam OA, Uehara M, Yonar M, Jiang L, Xiaofei Li, Qiu W, Eskandari S, Ichimura T, Abdi R. Urine podoplanin heralds the onset of ischemia-reperfusion injury of the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2019; 316:F957-F965.

KDIGO. Clinical practice guideline for evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl.* 2013; 3:73-90.

Kelly DJ, Aaltonen P, Cox AJ, Rumble JR, Langham R, et al. Expression of the slit-diaphragm protein, nephrin, in experimental diabetic nephropathy: differing effects of anti-proteinuric therapies. *Nephrol Dial Transplant.* 2002; 17:1327-1332.

Khalid Al-Rubeaan, Khalid Siddiqui, Mohammed A et al. Assessment of the diagnostic value of different biomarkers in relation to various stages of diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients. *Scientific Reports.* 2017; 7: 2684.

Klessens CQ, Woutman TD, Veraar KA, et al. An autopsy study suggests that diabetic nephropathy is underdiagnosed. *Kidney Int.* 2016; 90(1):149-156.

Korpinen E, Teppo AM, Hukkanen L, Akerblom HK, Gronhagen-Riska C, Vaarala O. Urinary transforming growth factor- β 1 and 1-microglobulin children and adolescents with type1 diabetes. *Diabetes Care.* 2000; 23: 664-8.

Kostovska I, Trajkovska KT, Cekovska S, Spasovski G, Labudovic D. Nephrin and Podocalyxin - New Podocyte Proteins For Early Detection of Secondary Nephropaties. *BANTAO Journal.* 2016; 14(1): 11-16.

Kostovska I, Trajkovska Kt, Cekovska S, Topuzovska S, Kavrakova Jb, Spasovski G, Kostovski O, Labudovic D. Role of urinary podocalyxin in early diagnosis of diabetic nephropathy. *ROM. J. INTERN. MED.* 2020a; 58(4), 233-241.

Kostovska I, Trajkovska KT, TopuzovskaS, CekovskaS, Spasovski G, Kostovski O, LabudovicD. Urinary nephrin is earlier, more sensitive and specific marker of diabetic nephropathy than microalbuminuria. J Med Biochem. 2020b; 39(1): 83-90.

Koye DN, Magliano DJ, Reid CM, et al. Risk of progression of nonalbuminuric CKD to end-stage kidney disease in people with diabetes: the CRIC (chronic renal insufficiency cohort) study. Am J Kidney Dis. 2018; 72(5):653-661.

Kramer HJ, Nguyen QD, Curhan G, Hsu CY. Renal insufficiency in the absence of albuminuria and retinopathy among adults with type 2 diabetes mellitus. Jama. 2003; 289(24):3273-3277.

Kretzler M, Teixeira VP, Unschuld PG, et al. Integrinlinked kinase as a candidate downstream effector in proteinuria. FASEB J. 2001; 15:1843-1845.

Kumar V, Abbas A, Aster J. Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease 9th Edition. Elsevier, 2014.

Kurt M, Atmaca A, Gürlek A. Diyabetik nefropati. Hacettepe Tıp Dergisi 2004; 35:12-17.

Kwon SK, Kim SJ, Kim H. Urine synaptopodin excretion is an important marker of glomerular disease progression. Korean J Intern Med. 2016; 31:938-943.

Lambers Heerspink HJ, Kropelin TF, Hoekman J, de ZD. Drug-induced reduction in albuminuria is associated with subsequent renoprotection: a meta-analysis. J Am Soc Nephrol. 2015 Aug; 26(8):2055-64.

Lan HY, Chung AC. Transforming growth factor- β and Smads. Contrib. Nephrol. 2011; 170: 75-82.

Lan HY. Transforming growth factor- β /Smad signalling in diabetic nephropathy. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. 2012; 39, 731-738.

Lee SY, Choi ME. Urinary biomarkers for early diabetic nephropathy: Beyond albuminuria. Pediatr Nephrol. 2015; 30: 1063-1075.

Levey AS, Atkins R, Coresh J, et al. Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives - a position statement from kidney disease improving global outcomes. *Kidney Int.* 2007; 72(3):247-259.

Li JH, Huang XR, Zhu HJ et al. Advanced glycation end products activate Smad signaling via TGF-beta-dependent and independent mechanisms: Implications for diabetic renal and vascular disease. *FASEB J.* 2004; 18: 176-8.

Li JH, Huang XR, Zhu HJ, Johnson R, Lan HY. Role of TGF-beta signaling in extracellular matrix production under high glucose conditions. *Kidney Int.* 2003; 63: 2010-9.

Li Y, Kang YS, Dai C, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is a potential pathway leading to podocyte dysfunction and proteinuria. *Am J Pathol.* 2008; 172:299-308.

Lioudaki E, Stylianou KG, Petrakis I, Kokologiannakis G, Passam A, Mikhailidis DP, et al. Increased urinary excretion of podocyte markers in normoalbuminuric patients with diabetes. *Nephron.* 2015; 131(1):34-42.

Loeffler I, Liebisch M, Allert S, Kunisch E, Kinne RW, Wolf G. FSP1-specific SMAD2 knockout in renal tubular, endothelial, and interstitial cells reduces fibrosis and epithelial-to-mesenchymal transition in murine STZ-induced diabetic nephropathy. *Cell Tissue Res.* 2018 Apr; 372(1):115-133.

Maezawa Y, Takemoto M, and Yokote K, "Cell biology of diabetic nephropathy: roles of endothelial cells, tubulointerstitial cells and podocytes," *Journal of Diabetes Investigation.* 2015; 6(1):3-15.

Marshall SM. The podocyte: A major player in the development of diabetic nephropathy? *Horm Metab Res.* 2005; 37:9-16.

Martin CE, Jones N. Nephrin Signaling in the Podocyte: An Updated View of Signal Regulation at the Slit Diaphragm and Beyond. *Front Endocrinol.* 2018; 9:302.

Meng XM, Tang PM, Li J, Lan HY. TGF-beta/Smad signaling in renal fibrosis. *Front Physiol.* 2015; 6:82.

Meng XM, Huang XR, Chung AC et al. Smad2 protects against TGF- β /Smad3-mediated renal fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2010; 21: 1477-87.

Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Ebihara I, Koide H. Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2000; 15(9):1379-1383.

Nakatsue T, Koike H, Han GD, Suzuki K, Miyauchi N, et al. Nephrin and podocin dissociate at the onset of proteinuria in experimental membranous nephropathy. *Kidney Int.* 2005; 67: 2239-2253.

Narres M, Claessen H, Droste S et al. The Incidence of End-Stage Renal Disease in the Diabetic (Compared to the Non-Diabetic) Population: A Systematic Review. *PLoS One.* 2016; Jan 26;11(1):e0147329.

Nauta FL, Boertien WE, Bakker SJL, Goor HV, Oeveren WV, Jong PED, et al. Glomerular and Tubular Damage Markers Are Elevated in Patients With Diabetes. *Diabetes Care.* 2011; 34:975-81.

New LA, Martin CE, Jones N. Advances in slit diaphragm signaling. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2014; 23:420-430.

Ng DP, Tai BC, Tan E, Leong H, Nurbaya S, et al. Nephrinuria associates with multiple renal traits in type 2 diabetes. *Nephrol Dial Transplant.* 2011; 26:2508-2514.

Pagtalunan ME, Miller PL, Jumping-Eagle S, et al. Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. *J Clin Invest.* 1997; 99:342-348.

Patari A, Forsblom C, Havana M, Taipale H, Groop PH, et al. Nephrinuria in diabetic nephropathy of type 1 diabetes. *Diabetes.* 2003; 52: 2969-2974.

Patrakka J, Tryggvason K. Molecular make-up of the glomerular filtration barrier. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 396:164-169.

Petrica L, Vlad A, Gluhovschi G, Gadalean F, Dumitrascu V, Gluhovschi C, et al. Proximal Tubule Dysfunction Is Associated with Podocyte Damage Biomarkers Nephrin

and Vascular Endothelial Growth Factor in Type 2 Diabetes Mellitus Patients: A Cross-Sectional Study. PLoS ONE. 2014; 9(11):e112538.

Phanish MK, Wahab NA, Colville-Nash P, Hendry BM, Dockrell ME. The differential role of Smad2 and Smad3 in the regulation of pro-fibrotic TGFbeta1 responses in human proximal-tubule epithelial cells. Biochem. J. 2006; 393: 601-7.

Popovic D, Lalic K, Jotic A, Milicic T, Bogdanovic J, Dordevic M, Stankovic S, Jeremic V, Lalic NM. The inflammatory and hemostatic cardiovascular risk markers during acute hyperglycemic crisis in type 1 and type 2 diabetes. J Med Biochem. 2019; 38:126-33.

Pugliese G, Penno G, Natali A, Barutta F, Di Paolo S, Reboldi G, Gesualdo L, De Nicola L. Diabetic kidney disease: new clinical and therapeutic issues. Joint position statement of the Italian Diabetes Society and the Italian Society of Nephrology on “The natural history of diabetic kidney disease and treatment of hyperglycemia in patients with type 2 diabetes and impaired renal function”. Journal of Nephrology. 2020; 33:9-35.

Quintanilla M, Montero-Montero L, Renart J, Martín-Villar E. Podoplanin in Inflammation and Cancer. Int. J. Mol. Sci. 2019; 20(3):707.

Rasch R & Norgaard JO. Renal enlargement: comparative autoradiographic studies of 3H-thymidine uptake in diabetic and uninephrectomized rats. Diabetologia. 1983; 25: 280-287.

Robles-Osorio ML, Sabath E. Tubular dysfunction and non-albūminuric renal disease in subjects with type 2 diabetes mellitus. Rev Invest Clin. 2014; 66(3):234-9.

Roper NA, Bilous RW, Kelly WF, Unwin NC & Connolly VM. Excess mortality in a population with diabetes and the impact of material deprivation: longitudinal, population based study. BMJ. 2001; 322, 1389-1393.

Sattar A, Argyropoulos C, Weissfeld L et al. All-cause and cause-specific mortality associated with diabetes in prevalent hemodialysis patients. *BMC Nephrol.* 2012 Oct; 1(13):130.

Schutte E, Gansevoort RT, Benner J, Lutgers HL, Lambers Heerspink HJ. Will the future lie in multitude? A critical appraisal of biomarker panel studies on prediction of diabetic kidney disease progression. *Nephrol Dial Transplant.* 2015; 30 (Suppl 4):96-104.

Selby NM, Taal MW. An updated overview of diabetic nephropathy: Diagnosis, prognosis, treatment goals and latest guidelines. *Diabetes Obes Metab.* 2020; 22(Suppl. 1):3-15.

Shahbazian H & Rezaii I. Diabetic kidney disease; review of the current knowledge. *J Renal Inj Prev.* Jun 2013; 2(2):73-80.

Shahid MA, Baig S, Shah SNN. Nephrin: An emerging biomarker for detecting damage of glomerular filtration barrier. *Pak J Med Dent.* 2014; 3(4):83-8.

Shaker YM, Soliman HA, Ezzat E, Hussein NS, Ashour E, Donia A, Eweida SM. Serum and urinary transforming growth factor beta 1 as biochemical markers in diabetic nephropathy patients. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences.* 2014; 3(1):16-23.

Shankland SJ. Podocyte's response to injury: role in proteinuria and sclerosis. *Kidney Int.* 2006; 69: 2131-2147.

Soldatos G, Cooper ME. Diabetic nephropathy: Important pathophysiologic mechanisms. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2008; 82(Suppl. 1): S75-9.

Steffes MW, Schmidt D, McGregor R, Basgen JM. Glomerular cell number in normal subject and in type 1 diabetic patients. *Kidney.* 2001; 59: 2104-2113.

Stewart JH, McCredie MR, Williams SM, Jager KJ, Trpeski L, McDonald SP, et al. Trends in incidence of treated end-stage renal disease, overall and by primary renal

disease, in persons aged 20-64 years in Europe, Canada and the Asia-Pacific region, 1998-2002. *Nephrology (Carlton)*. 2007; 12(5):520-7.

Stitt-Cavanagh E, MacLeod L, Kennedy C. The podocyte in diabetic kidney disease. *Scientific World Journal*. 2009 Oct; 14(9):1127-39.

Su J, Li SJ, Chen ZH, et al. Evaluation of podocyte lesion in patients with diabetic nephropathy: Wilms' tumor-1 protein used as a podocyte marker. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010; 87:167-175.

Sun D, Zhao X, Meng L. Relationship between Urinary Podocytes and Kidney Diseases. *Renal Failure*, 2012; 34(3): 403-407.

Tae-Sun H. Roles of adaptor proteins in podocyte biology. *World J Nephrol*. 2013; 2:1-10.

Takeda T. Podocyte cytoskeleton is connected to the integral membrane protein podocalyxin through Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 2 and ezrin. *Clinical and Experimental Nephrology*. 2003; 7(4): 260-269.

Thomas MC, Macisaac RJ, Jerums G, Weekes A, Moran J, Shaw JE, et al. Nonalbuminuric Renal Impairment in Type 2 Diabetic Patients and in the General Population (National Evaluation of the Frequency of Renal Impairment co-existing with NIDDM [NEFRON] 11). *Diabetes Care*. 2009; 32:1497-502.

Tsakas S, Goumenos DS. Accurate measurement and clinical significance of urinary transforming growth factor-beta1. *Am J Nephrol*. 2006; 26(2):186-93.

Valcourt U, Kowanetz M, Niimi H, et al. TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. *Mol Biol Cell*. 2005; 16:1987-2002.

Vestra MD, Masiero A, Roiter AM, Saller A, Crepaldi G, et al. Is podocyte injury relevant in diabetic nephropathy? Studies in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2003; 52:1031-1035.

Vogelmann SU, Nelson WJ, Myers BD, Lemley KV. Urinary excretion of podocytes in health and renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003; 285: F40-F48.

Wang G, Lai FM-M, Lai K-B, Chow K-M, Li K-TP, et al. Messenger RNA expression of podocyte associated molecules in the urinary sediment of patients with diabetic nephropathy. *Nephron-Clinical Practice*. 2007; 106:169-179.

Wang L, Wang HL, Liu TT, Lan HY. TGF-Beta as a Master Regulator of Diabetic Nephropathy. *Int J Mol Sci*. 2021 Jul; 22(15):7881.

Wang W, Huang XR, Li, AG, Liu F, Li JH. Truong LD, Wang XJ, Lan HY. Signaling mechanism of TGF-beta1 in prevention of renal inflammation: Role of Smad7. *J Am Soc Nephrol*. 2005; 16, 1371-1383.

Weil EJ, Lemley KV, Mason CC, Yee B, Jones LI, Blouch K, et al. Podocyte detachment and reduced glomerular capillary endothelial fenestration promote kidney disease in type 2 diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 2012; 82:1010-1017.

White KE, Bilous RW, Marshall SM, El Nahas M, Remuzzi G, et al. Podocyte number in normotensive type 1 diabetic patients with albuminuria. *Diabetes*. 2002; 51:3083-3089.

Wickman L, Afshinnia F, Wang SQ, Yang Y, Wang F, et al. Urine podocyte mRNAs, proteinuria, and progression in human glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol*. 2013; 24:2081-2095.

Wolf G & Ziyadeh FN. Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int*. 1999 Aug; 56(2):393-405.

Wolf G & Ziyadeh FN. Cellular and Molecular Mechanisms of Proteinuria in Diabetic Nephropathy. *Nephron Physiol*. 2007; 106:26-31.

Wolf G, Chen S, Ziyadeh FN. From the periphery of glomerular capillary wall toward the center of disease. Podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2005; 54:1626-1634.

Yamagishi SI, Inagaki Y, Okamoto T. Advanced glycation end products inhibit de novo protein synthesis and induce TGF-beta overexpression in proximal tubular cells. *Kidney Int.* 2003; 63: 464-73.

Yamaguchi Y, Iwano M, Suzuki D, et al. Epithelial–mesenchymal transition as a potential explanation for podocyte depletion in diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis.* 2009; 54:653-664.

Yamanouchi M, Furuichi K, Hoshino J, et al. Nonproteinuric versus proteinuric phenotypes in diabetic kidney disease: a propensity score-matched analysis of a nationwide, biopsy-based cohort study. *Diabetes Care.* 2019; 42(5):891-902.

Yang F, Chung AC, Huang XR, Lan HY. Angiotensin II induces connective tissue growth factor and collagen I expression via transforming growth factor-beta-dependent and -independent Smad pathways: The role of Smad3. *Hypertension.* 2009; 54:877-84.

Yang F, Huang XR, Chung AC, Hou CC, Lai KN, Lan HY. Essential role for Smad3 in angiotensin II-induced tubular epithelial–mesenchymal transition. *J. Pathol.* 2010; 221: 390-401.

Ye H, Bai X, Gao H, Li Li, Wu C, et al. Urinary podocalyxin positive element occurs in the early stage of diabetic nephropathy and is correlated with a clinical diagnosis of diabetic nephropathy. *J Diabetes Complicat.* 2014; 28:96-100.

Ying Q, Wu G. Molecular mechanisms involved in podocyte EMT and concomitant diabetic kidney diseases: an update. *Renal Failure.* 2017; 39(1):474-483.

Yu D, Petermann A, Kunter U, Rong S, Shankland SJ, et al. Urinary podocyte loss is a more specific marker of ongoing glomerular damage than proteinuria. *JASN.* 2005; 16:1733-1741.

Yu J, Zong G, Wu H, Zhang K. Podoplanin mediates the renoprotective effect of berberine on diabetic kidney disease in mice. *Acta Pharmacologica Sinica.* 2019; 40:1544-1554.

Zheng M, Lv LL, Ni J, Ni HF, Li Q, Ma KL, et al. Urinary podocyte-associated mRNA profile in various stages of diabetic nephropathy. PLoS One. 2011; 6(5):e20431.

Ziyadeh FN, Sharma K. Overview: combating diabetic nephropathy. J Am Soc Nephrol. 2003; 14(5):1355-7.

Ziyadeh FN, Wolf G. Pathogenesis of podocytopathy and proteinuria in diabetic glomerulopathy. Cur Diab Rev. 2008; 4:39-45.

Ziyadeh FN. Mediators of diabetic renal disease: The case for $\text{tgf-}\beta$ as the major mediator. J. Am. Soc. Nephrol. 2004; 15(Suppl. 1): S55-7.

Zürbig P, Jerums G, Hovind P, et al. Urinary proteomics for early diagnosis in diabetic nephropathy. Diabetes. 2012; 61:3304-3313.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Bilge	Uyruğu	T.C.
Soyadı	KARATOY ERDEM	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Antalya Anadolu Lisesi	2003
Lisans	Gazi Üniversitesi / Kimya Mühendisliği	2008
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi / Tıbbi Biyokimya	2015
Doktora	Akdeniz Üniversitesi / Tıbbi Biyokimya	2023

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	2016-Halen

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YÖKDİL	80

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Renal Transplantasyon ve 1,25-(OH) ₂ -Vitamin D3	Akdeniz Üniversitesi BAP (Yüksek Lisans Tezi)	2013-2015
Renal Transplantasyon Hastalarında 1,25-dihidroksivitamin D3 Düzeylerinin İnorganik Pirofosfat, Fetuin A, Osteoprotegerin, Kemik Morfogenik Protein-2 ve Alkalen Fosfataz ile İlişkisi	TÜBİTAK (1002-Hızlı Destek)	2015-2016
Preeklampside Podosit Hasarının Anjiyogenik ve AntiAnjiyogenik Faktörler ve Oksidatif Stresle İlişkisi	Akdeniz Üniversitesi BAP	2016-2019
Nefrotik Sendromda Podosit Hasarının Kütle Spektrometrik Yöntemle Araştırılması	Akdeniz Üniversitesi BAP	2016-2018

Kütle Spektrometrik Yöntemle Plazma Oksisterollerinin Ölçümü ve Analitik Validasyonunun Değerlendirilmesi	Akdeniz Üniversitesi BAP	2016-2017
Fabry hastalığı araştırılmasında sıvı kromatografi ardışık kütle spektrometresi ile idrarda globotriaosilsfingozin ve globotriaosilseramidin ölçümü	Akdeniz Üniversitesi BAP	2017-2020
Çocuk Yoğun Bakım Ünitesinde Uykuya Yönelik Geliştirilen Stratejilerin Melatonin-Kortizol Salgılanmasına ve Sirkadiyen Ritme Etkisi	Akdeniz Üniversitesi BAP	2018-2021
Sfingolipidozların Tanısında Lizosfingolipid Ve Oksisterol Düzeylerinin Sıvı Kromatografi-Ardışık Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) İle Ölçümü	Akdeniz Üniversitesi BAP	2018-2021
Hastane Kökenli Sepsis Olguları ile Travma Sonrası ve Postoperatif Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu (SIRS) olgularında Presepsin, C-Reaktif Protein (CRP), İnterlökin 6 (IL-6) ve Prokalsitonin Değerlerinin Karşılaştırılması: Presepsinin Rolü	Akdeniz Üniversitesi BAP	2019-2022
Renal Transplantasyon Sonrasında Greft Fonksiyonun Öngörülmesinde Hücre Siklusu Biyobelirteçlerinin Değerlendirilmesi	Akdeniz Üniversitesi BAP	2020-2022
Obsesif Kompulsif Bozukluk Tanılı Çocuk ve Ergenlerde Serum Matrix Metalloproteinaz-9 ve Tissue İnhibitör Metalloproteinaz-1 in Değerlendirilmesi	Akdeniz Üniversitesi BAP	2021-2022
Diyabetik Nefropatide Podosit Epitelyal-Mezenkimal Geçiş (EMT) Sürecinde TGF-B/Smad Yolağının Rolü	Akdeniz Üniversitesi BAP (Doktora Tezi)	2018-2023

Burslar-Ödüller:

- Tübitak 1002-Hızlı Destek Bursu (2015-2016)
- Tübitak 2224-B Yurt İçi Bilimsel Etkinliklere Katılımı Desteği

Yayınlar ve Bildiriler:

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

- Karatoy Erdem B., Davran F., Yılmaz V.T., Çetinkaya R., Akbaş S.H., "The Association of Serum Free Light Chain Levels with Markers of Renal Function", RENAL FAILURE, Vol.37, Pp.1057-1060, 2015.
- Davran F., Yılmaz V., Karatoy Erdem B., Gultekin M., Suleymanlar G., Akbas H., "Association of Interleukin 18-607A/C And -137C/G Polymorphisms with Oxidative Stress in Renal Transplant Recipients.", RENAL FAILURE, Vol.38, Pp.717-22, 2016.
- Karatoy Erdem .B, Özcan M., Yılmaz V.T., Akkaya B., Çetinkaya R., Ersoy F., Süleymanlar G., Akbas H. "A UFLC-MS/MS Method for the Simultaneous Analysis of Urinary Podocin and Podocalyxin in Patients with Nephrotic Syndrome.", Laboratory Medicine, 53(3): 246–254, 2022.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Ve Bildiri Kitaplarında (Proceedings) Basılan Bildiriler

- Karatoy Erdem B., Akbaş S.H., "Determination of Urinary Podocin and Podocalyxin Levels by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry", TBD International Biochemistry Congress - 2018, Muğla, TÜRKİYE, Vol.44, Pp.44-44
- Karatoy Erdem B., Yılmaz V.T., Akbaş S.H., "The Relationship Between Fetuin A and Graft Function in Renal Transplant Recipients", 5th EFLM-UEMS European Joint Congressin Laboratory Medicinelaboratory Medicine At The Clinical Interface, Vol.56, Pp.203-359
- Karatoy Erdem B., Akbas H., "Renal Transplant Alıcılarında Vasküler Kalsifikasyonun Değerlendirilmesi", Uluslararası Katılımlı Kongre & LAB EXPO 2018 , ANTALYA, TÜRKİYE, 1-4 Ekim 2018, Pp.153-153
- Akbaş S.H., Karatoy Erdem B., Küpesiz O.A., "Hematopoetik Kök Hücre Nakli Hastalarında Busulfan’a Özgü Terapotik İlaç İzleminin Önemi", Uluslararası

Katılımlı Hematolojik Hastalıkların Tanı Ve İzleminde Laboratuvar Sempozyumu, DENİZLİ, TÜRKİYE, 5-7 Nisan 2018, Vol.16, No.1, Pp.5

- Karatoy Erdem B., Yilmaz V.T., Süleymanlar G., Dinçkan A., Akbaş S.H., "Association Between 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Levels with Inorganic Pyrophosphate, Fetuin A, Osteoprotegerin, Bone Morphogenic Protein-2 And Alkaline Phosphatase in Renal Transplant Patients", EUROMEDLAB 2017, Vol.55
- Karatoy Erdem B., Davran F., Yilmaz V.T., Çetinkaya R., Akbaş S.H., "The Association of Serum-Free Light-Chain Levels with Markers of Renal Function", II. Türkiye in vitro Diyagnostik Sempozyumu: Biyobelirteçler, İzmir, Türkiye, 10-12 Mayıs 2017, Turk J Biochem 2017, Volume 42 I, Supplement Issue 2, Pp47
- Karatoy Erdem B., Yilmaz V.T., Suleymanlar G., Dinçkan A., Akbaş S.H., "Association Between 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Levels with Inorganic Pyrophosphate, Fetuin A, Osteoprotegerin, Bone Morphogenic Protein-2 And Alkaline Phosphatase in Renal Transplant Patients", 4th Joint EFLM-UEMS Congress: Warsaw, Poland, 21–24 September, 2016, eA296
- Davran F., Yilmaz V.T., Karatoy Erdem B., Gültekin M., Suleymanlar G., Akbaş S.H., "Association of İnterleukin 18 - 607A/C And - 137C/G Polymorphisms with Oxidative Stress in Renal Transplant Recipients", 4th Joint EFLM-UEMS Congress: Warsaw, Poland, 21–24 September, 2016, Pp.124-12
- Karatoy Erdem B., Yilmaz V.T., Süleymanlar G., Özcan F., Baykal A., Akbaş S.H., "The Relationship Between Vitamin D Status and Graft Function in Renal Transplant Recipients", 41st FEBS Congress On Molecular And Systems Biology For A Better Life, İZMİR, TÜRKİYE, 3-8 Ekim 2016, Pp.244-244
- Karatoy Erdem B., Yilmaz V.T., Çetinkaya R., Akbaş S.H., "The Association of Serum-Free Light-Chain Levels with Markers of Renal Function", 22nd International Congress of Clinical Chemistry And Laboratory Medicine, İstanbul, TÜRKİYE, 22-27 June 2014, Vol.37, Pp.1057-1060
- Karatoy Erdem B., Özsarı N., Soyuçen E., Akbaş H. "Plazma Lizosfingolipidlerinin Eş Zamanlı Kütle Spektrometrik Ölçümü", VII.

Uluslararası Lizozomal Hastalıklar Kongresi, Çevrimiçi Kongre-Sözlü Sunum, 25-27 Kasım 2021

- Karatoy Erdem B., Özsan N., Soyuçen E., Akbaş H. "Simultaneous Mass Spectrometric Measurement of Plasma Lysosphingolipids for the Diagnosis of Different Sphingolipidoses", FEBS Advanced Lecture Course; 360 Lysosome From Structure to Genomics, From Function to Disease, Kusadasi/Izmir, Turkey, 4-9 October 2022, Pp.109

Ulusal Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

- Karatoy Erdem B., "Kronik Böbrek Hastalığı Ve Vasküler Kalsifikasyon", Türk Klinik Biyokimya Dergisi, Ss.89-98, 2017, Derleme.
- Karatoy Erdem B., Akbaş S.H., "D Vitamini Ve Metabolomik", Türk Klinik Biyokimya Dergisi, Ss.127-134, 2018, Derleme.
- Karatoy Erdem B., Yilmaz V.T., Baykal Ataman A., Süleymanlar G., Akbaş S.H., "The Relationship Between Vitamin D Status and Graft Function in Renal Transplant Recipients", Internatiol Journal Of Medical Biochemistry, Vol.1, No.1, Pp.1-5, 2018.
- Karatoy Erdem B., Yilmaz V.T., Süleymanlar G., Dinçkan A., Akbaş S.H., "A Prospective Evaluation of Vascular Calcification Markers in Renal Transplantation ", Journal of Turkish Clinical Biochemistry, Vol.18, No.3, Pp.121-128, 2020.

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan Ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

- Karatoy Erdem B., Akbaş S.H., "İdrarda Globotriaosilseramid (Gb3) Düzeylerinin Sıvı Kromatografi - Kütle Spektrometresi İle Belirlenmesi", 3. Ulusal Proteomik Kongresi, İSTANBUL, TÜRKİYE, 27-29 Şubat 2020, Ss.33-33
- Karatoy Erdem B., Akbaş S.H., "İdrarda Globotriaosilsfingozin (Lizo-Gb3) Düzeylerinin Sıvı Kromatografi - Kütle Spektrometresi İle Belirlenmesi", 3.

Ulusal Proteomik Kongresi, İSTANBUL, TÜRKİYE, 27-29 Şubat 2020, Ss.32-32

- Karatoy Erdem B., "Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi İle Üriner Podosin Ve Podokaliksin Düzeylerinin Belirlenmesi", TBD Uluslararası Biyokimya Kongresi, MUĞLA, TÜRKİYE, 26-30 Ekim 2018, Ss.53-53
- Karatoy Erdem B., Yılmaz V.T., Süleymanlar G., Özcan F., Baykal Ataman A., Akbaş S.H., "Böbrek Nakli Alıcılarında D Vitamini ile Greft Fonksiyonları Arasındaki İlişki", 34.Ulusal Nefroloji, Hipertansiyon, Diyaliz Ve Transplantasyon Kongresi, ANTALYA, TÜRKİYE, 18-22 Ekim 2017, Ss.122-122
- Karatoy Erdem B., Davran F., Yılmaz V.T., Çetinkaya R., Akbaş S.H., "Serum Serbest Hafif Zincir Seviyelerinin Böbrek Fonksiyon Belirteçleri İle İlişkisi", II. Türkiye İn Vitro Diyagnostik (IVD) Sempozyumu, TÜRKİYE, Cilt 42, Ss.51-51
- Karatoy Erdem B., Akbaş S.H., Küpesiz O.A., "Pediatrik Hematopoetik Kök Hücre Nakli hastalarında Busulfan Düzeylerinin Lc-Ms/Ms ile Belirlenmesi", XXVII. Ulusal Biyokimya Kongresi, Antalya, TÜRKİYE, TBD Cilt 40, Ss. 168
- Karatoy Erdem B., Yılmaz V.T., Süleymanlar G., Akbaş S.H., "Renal Transplantasyon Alıcılarında D Vitaminive Greft Fonksiyonunun İlişkisi", XXVII. Ulusal Biyokimya Kongresi, Antalya, TÜRKİYE, TBD Cilt 40, Ss. 354