

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KRONİK BÖBREK HASTALIĞI OLUŞTURULAN RATLARDA  
PREBİYOTİK TÜKETİMİNİN BAĞIRSAK KAYNAKLI ÜREMİK  
TOKSİNLER VE HASTALIĞIN PROGRESYONUNA ETKİSİ**

**Uzm. Dyt. Ebru MELEKOĞLU**

**Beslenme ve Diyetetik Programı**

**DOKTORA TEZİ**

**ANKARA**

**2020**

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın en başından sonuna kadar akademik bilgi ve tecrübeleriyle yoluma ışık tutarak desteğini esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. F. Gülhan SAMUR'a,

Tez izleme komitesinde görev alarak tez çalışmama önemli katkılarda bulunan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Mendane SAKA ve Sayın Doç. Dr. Aslı AKYOL MUTLU'ya,

Hayvan deneylerinin planlanması ve yürütülmesi aşamalarında özverili çalışmaları ve değerli katkıları için Sayın Doç. Dr. M. Alper ÇETİNKAYA'ya,

Tezimin laboratuvar analizleri aşamalarında bana laboratuvarlarını açan, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen Sayın Prof. Dr. Oğuz KUL ve Sayın Doç. Dr. Ş. Evrim TEKKELİ'ye,

Yaşamım boyunca varlıklarından güç aldığım, sonsuz sevgi ve anlayışla yanımda olan canım annem Nazife MELEKOĞLU, canım babam Hüseyin MELEKOĞLU ve biricik kardeşim Ahmet MELEKOĞLU'na,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, TÜBİTAK tarafından "Hızlı Destek Programı (1002)" kapsamında 217S980 proje numarasıyla desteklenmiştir. Ayrıca Mart 2018 tarihinden itibaren bursiyeri olduğum, TÜBİTAK BİDEB 2211-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Bursu kapsamında maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkürü borç bilirim.

**Uzm. Dyt. Ebru MELEKOĞLU**

## ÖZET

**Melekoğlu, E., Kronik Böbrek Hastalığı Oluşturulan Ratlarda Prebiyotik Tüketiminin Bağırsak Kaynaklı Üremik Toksinler ve Hastalığın Progresyonuna Etkisi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Beslenme ve Diyetetik Programı Doktora Tezi, Ankara, 2020.** Bu çalışmada kronik böbrek hastalığı (KBH) oluşturulmuş sıçanlarda prebiyotik tüketiminin bağırsak kaynaklı üremik toksin düzeylerine, inflamatuvar ve antioksidan göstergelere, renal hasar, bağırsak geçirgenliği ve hastalık progresyonu üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada erkek Spraque-Dawley sıçanlara oral gavajla 3 hafta boyunca adenin (200 mg/kg/gün) verilerek KBH oluşturulmuştur. Sıçanlar randomize iki gruba ayrılarak bir gruba (HP; n=9) prebiyotik kaynağı olarak oligofruktozla zenginleştirilmiş inülin (5g/kg/gün) ilave edilirken diğer gruba (HN; n=8) prebiyotik ilavesi yapılmamıştır. Ayrıca sağlıklı sıçanlardan da iki grup oluşturularak bir gruba (SP; n=8) prebiyotik (inülin, 5g/kg/gün) ilave edilirken diğer gruba (SN; n=8) prebiyotik ilavesi yapılmamıştır. Diyet müdahalesinin (4 hafta) sonunda tüm sıçanlar ötenazi edilerek böbrek ve kolon histolojik analizler için çıkarılmıştır. Serum örneklerinde; üremik toksinlerden p-cresol sülfat (PCS) ve indoksil sülfat (IS) düzeyleri, inflamasyon (IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ ) ve böbrek fonksiyon göstergeleri (üre, kreatinin) düzeyleri incelenmiştir. Böbrek hasarı histopatolojik yönden incelenmiş, ayrıca böbrek dokularında antioksidan parametrelerden süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ölçümü yapılmıştır. Ayrıca kolonda sıkı bağlantı proteinleri (claudin-1 ve occludin) analiz edilerek intestinal bariyer hasar incelenmiştir. Deney sonunda hasta grupta 4 haftalık prebiyotik tüketimi üre (HN: 127,4  $\pm$  45,77; HP: 71,7  $\pm$  7,73 mg/dl; p<0,001), PCS (HN: 1771,1  $\pm$  762,74; HP: 632,7  $\pm$  356,57 ng/ml; p=0,002) ve IL-6 düzeylerinde (HN: 205,8  $\pm$  76,80; HP: 57,6  $\pm$  46,80 pg/ml; p=0,001) önemli bir azalma sağlamıştır. Hasta grupta prebiyotik tüketiminin serum kreatinin, IS, IL-10 ve TNF- $\alpha$  düzeylerine önemli bir etkisi bulunmamıştır (p>0,05). Hasta sıçanlara ait böbrek dokularında oluşan histopatolojik değişikliklerin semikantitatif incelemesinde; prebiyotik verilen grupta kristal birikimi, tübüler ve glomerüler hasar, tübülointerstisyel fibrozis ve glomerüler inflamasyon şiddeti ve toplam hasar skoru daha az bulunmuştur (p<0,001). Prebiyotik verilen hasta gruba ait böbrek dokularında GPx aktivitesi prebiyotik verilmeyen hasta gruba göre daha yüksektir (p=0,007); ancak SOD aktivitesi üzerinde önemli bir etkisi bulunmamıştır (p>0,05). Sağlıklı ve hasta sıçanlarda prebiyotik müdahalesi sonucunda inen ve çıkan kolon dokularında claudin-1 protein seviyelerinde anlamlı artış gözlenmiştir (p<0,05). Sonuç olarak bu çalışmada, KBH'lı sıçanlarda dört haftalık prebiyotik desteğinin serum üre, PCS ve IL-6 düzeylerinde azalma sağladığı, böbrek dokularında antioksidan enzim aktivitesini ve intestinal bariyer fonksiyonu artırdığı ve hastalık progresyonunu yavaşlattığı bulunmuştur. KBH'da bağırsak kaynaklı üremik toksin üretiminin, inflamasyon ve intestinal bariyer hasarın azaltılmasında ve hastalığın progresyonunun kontrol edilmesinde prebiyotik olarak oligofruktozla zenginleştirilmiş inülin desteği alternatif bir diyet yaklaşımı olabilir.

**Anahtar Kelimeler:** prebiyotik, kronik böbrek hastalığı, üremik toksin, inflamasyon, intestinal bariyer fonksiyon.

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (Proje Numarası: 217S980).

## ABSTRACT

**Melekoğlu, E., The Effect of Prebiotic Consumption on Gut Derived Uremic Toxins and Disease Progression in Rats with Chronic Kidney Disease, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Programme of Nutrition and Dietetics Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2020.** This study aimed to investigate the effect of prebiotic consumption on gut derived uremic toxin levels, inflammatory and antioxidant parameters, renal damage, intestinal permeability and disease progression in rats with chronic kidney disease (CKD). Male Sprague-Dawley rats were given adenine (200 mg/kg/day) by oral gavage for 3-weeks to induce CKD. CKD rats were randomized to the prebiotic supplemented group (HP; n=9) (5g/kg/day) and non-supplemented group (HN; n=8). Also, healthy rats were randomized to the prebiotic-supplemented group (SP; n=8) (inulin, 5g/kg/day) and non-supplemented group (SN; n=8). At the end of the dietary intervention (4-weeks), all rats were euthanized and kidneys and colon were removed for histological evaluation. Serum uremic toxins- p-cresol sulphate (PCS) and indoxyl sulphate (IS), inflammation (IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ ) and renal function markers (urea and creatinine) levels were evaluated. Kidney tissues were evaluated histopathologically and antioxidant markers (superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx)). Also, expression level of tight-junction protein (claudin-1, occludin) were analysed in colon tissues and evaluated the intestinal barrier damage. At the end of this study, serum urea (HN: 127,4  $\pm$  45,77; HP: 71,7  $\pm$  17,73 mg/dl; p<0,001), PCS (HN: 1771,1  $\pm$  762,74; HP: 632,7  $\pm$  356,57 ng/ml; p=0,002) and IL-6 levels (HN: 205,8  $\pm$  76,80; HP: 57,6  $\pm$  46,80 pg/ml; p=0,001) were significantly decreased in CKD rats consuming prebiotic for 4-week. There was no significant effect of prebiotic consumption on serum creatinine, IS, IL-10 and TNF- $\alpha$  levels in CKD rats (p>0,05). When the histopathological changes in renal tissues were examined semi-quantitatively, it is found that the crystal accumulation, tubular and glomerular damage, tubulointerstitial fibrosis, glomerular inflammation, and total renal injury scores were less severe in the CKD group consuming prebiotic (p<0,001). GPx-activity in renal tissues was higher in the CKD-prebiotic group than in the non-supplemented group (p=0,007). However, in CKD, prebiotic consumption did not have a significant effect on SOD-activity in renal tissues (p>0,05). Significantly increased expression of the claudin-1 was observed in the descending and ascending colon tissue in both healthy and CKD groups (p>0,05). In conclusion, it is found that prebiotic supplementation for 4-weeks appeared to be associated with a reduction of serum urea, PCS, and IL-6 levels, ameliorated oxidative stress in kidney tissue, enhanced antioxidant enzyme activities in renal tissues and intestinal barrier function, and retarded CKD progression in CKD rats. Prebiotic oligofructose-enriched inulin supplementation may be an alternative dietary approach for reducing gut-derived uremic toxin formation, inflammation and intestinal barrier damage and controlling disease progression in CKD.

**Keywords:** prebiotic, chronic kidney disease, uremic toxin, inflammation, intestinal barrier function.

This study is supported by TÜBİTAK (Project Number: 217S980).

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvi
<b>1. GİRİŞ</b>	xvi
1.1. Kuramsal Yaklaşımlar	1
1.2. Amaç ve Varsayımlar	2
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1. Böbreğin Fizyolojisi ve Fonksiyonu	3
2.2. Kronik Böbrek Hastalığı	4
2.3. KBH'da Üremik Durum ve Üremik Toksinler	5
2.4. Bağırsak - Böbrek Aksı	5
2.5. KBH'nın Bağırsak Mikrobiyotası Üzerine Etkisi	9
2.6. Bağırsak Mikrobiyotasının KBH Üzerine Etkisi	10
2.6.1. Bağırsak Kaynaklı Üremik Toksinler	10
2.6.2. Sızıntılı Bağırsak	13
2.6.3. Renal Toksisite	15
2.7. KBH'da Bağırsak Mikrobiyotasının Modülasyonunda Prebiyotikler	16

2.7.1. Prebiyotikler	16
2.7.2. KBH'da Prebiyotik Tüketiminin Hastalığın Progresyonuna Etkisi	18
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>22</b>
3.1. Deney Hayvanları ve Araştırma Planı	22
3.1.1. Deney Hayvanlarında Hastalık Oluşturma Protokolü	24
3.1.2. Deney Hayvanlarına Prebiyotik Uygulama Protokolü	26
3.1.3 Örneklerin Alınması ve Saklanması	27
3.2. Serum Üremik Toksin Analizi	27
3.3. Patolojik İncelemeler	29
3.4. İmmunoperoksidaz Testler	29
3.5. Serum İnflamatuar Göstergelerinin Analizi	30
3.5.1. Serum IL-6 Düzeylerinin Ölçümü	30
3.5.2. Serum IL-10 Düzeylerinin Ölçümü	31
3.5.3. Serum TNF- $\alpha$ Düzeylerinin Ölçümü	32
3.6. Serum Üre ve Kreatinin Analizi	32
3.7. İstatistiksel Analizler	32
<b>4. BULGULAR</b>	<b>34</b>
4.1. Deney Süresince Sıçanların Vücut Ağırlığı ve Yem Tüketimi Değişimleri	34
4.2. Sıçanların Böbrek Fonksiyon Göstergelerine Ait Bulguları	36
4.3. Serum Üremik Toksin Analizine Ait Bulgular	39
4.4. Serum İnflamatuar Belirteçlerinin Analizine Ait Bulgular	41
4.5. Böbrek Dokularında Görülen Histopatolojik Bulgular	42
4.6. Böbrek Dokularında Antioksidan Parametrelere Ait Bulgular	48
4.7. Kolon Dokularında Sıkı Bağlantı Proteinlerinin İmmünohistokimyasal Analiz Bulguları	50

<b>5. TARTIŞMA</b>	59
5.1. Deney Süresince Sıçanların Vücut Ağırlığı ve Yem Tüketimi Değişimleri	59
5.2. Sıçanların Böbrek Fonksiyon Göstergelerine Ait Bulgular	61
5.3. Serum Üremik Toksin Düzeylerine Ait Bulgular	62
5.4. Serum İnflamatuar Belirteçlerinin Analizine Ait Bulgular	65
5.5. Böbrek Dokularında Görülen Histopatolojik Bulgular	68
5.6. Böbrek Dokularında Antioksidan Parametrelere Ait Bulgular	70
5.7. Kolon Dokularında Sıkı Bağlantı Proteinlerinin İmmünohistokimyasal Analiz Bulguları	72
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	75
6.1. Sonuçlar	75
6.2. Öneriler	80
<b>7. KAYNAKLAR</b>	82
<b>8. EKLER</b>	
Ek 1: Tez Orijinallik Raporu	
Ek 2: Dijital Makbuz	
Ek 3: Etik Kurul Onayı	
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	

**SİMGELER VE KISALTMALAR**

<b>Acta2</b>	Düz kas aktin $\alpha$ -2
<b>ADMA</b>	Asimetrik dimetil arjinin
<b>CMPF</b>	3-karboksi-4-metil-5-propil-2-furan propiyonik asit
<b>CREDIT</b>	Türkiye Kronik Böbrek Hastalığı Prevalans Çalışması
<b>Col1a1</b>	Kollajen tip-1 $\alpha$ 1
<b>ÇADA</b>	Çeyrekler arası dağılım aralığı
<b>Da</b>	Dalton
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immunoabsorbant Assay
<b>FFAR2</b>	Serbest Yağ Asidi Reseptörü 2
<b>FFAR3</b>	Serbest Yağ Asidi Reseptörü 3
<b>FOS</b>	Fruktooligosakkarit
<b>GFH</b>	Glomerüler filtrasyon hızı
<b>GLP-1</b>	Glukagon Benzeri Peptit -1
<b>GPx</b>	Glutatyon peroksidaz
<b>HMP</b>	Human Microbiome Project
<b>HRP</b>	Horseradish peroksidaz
<b>ICAM-1</b>	Hücreler arası adezyon molekülü-1
<b>IL</b>	İnterlökin
<b>IS</b>	İndoksil sülfat
<b>KBH</b>	Kronik böbrek hastalığı
<b>KDIGO</b>	Kidney Disease Improving Global Outcomes



<b>KZYA</b>	Kısa Zincirli Yağ Asitleri
<b>MAPK</b>	Mitojen ile Aktive Edilen Protein Kinaz
<b>MCP-1</b>	Monosit Kemoatraktan Protein-1
<b>MetaHIT</b>	Metagenomics of the Human Intestinal Tract
<b>MHC</b>	Major histokompatibilite kompleksi
<b>NADPH</b>	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
<b>NF-κB</b>	Nükleer Faktör Kappa B
<b>NHANES III</b>	National Health and Nutrition Examination Survey III
<b>Nrf2</b>	Nükleer faktör eritroid 2
<b>OAT</b>	Organik anyon taşıyıcıları
<b>PCS</b>	Para-cresol sülfat
<b>PD</b>	Polimerizasyon derecesi
<b>PTH</b>	Paratiroid hormon
<b>RAAS</b>	Renin Anjiyotensin Aldosteron Sistem
<b>ROS</b>	Reaktif oksijen türleri
<b>SDBY</b>	Son dönem böbrek yetmezliği
<b>SOD</b>	Süperoksit dismutaz
<b>TGF-β1</b>	Transforme edici büyüme faktörü β-1
<b>TMAO</b>	Trimetilamin N-oksit
<b>TNF-α</b>	Tümör nekrozis faktör-α
<b>ZO</b>	Zonula Occludens

## ŞEKİLLER

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
<b>2.1.</b> Bağırsak kaynaklı üremik toksin olan indoksil sülfatın oluşumu.	8
<b>2.2.</b> Bağırsak kaynaklı üremik toksin olan para-cresol sülfatın oluşumu.	8
<b>2.3.</b> KBH ve bağırsak mikrobiyotası arasındaki çift yönlü ilişki.	9
<b>2.4.</b> KBH'da bağırsak mikrobiyotasının ve intestinal geçirgenliğin sistemik inflamasyona ve hastalık progresyonuna katkısı.	14
<b>2.5.</b> IS ve PCS toksisitesinin renal etkileri.	15
<b>3.1.</b> Deney planı.	24
<b>3.2.</b> Adenin uygulanan sıçanların böbrek dokularının histopatolojik bulguları. Ön deney sonuçları.	25
<b>3.3.</b> İndoksil sülfat ölçümüne ait kromotogram.	28
<b>3.4.</b> P-cresol sülfat ölçümüne ait kromatogram.	28
<b>4.1.</b> Sağlıklı ve hastalık oluşturulan sıçanların deney süresince vücut ağırlığı değişimleri.	35
<b>4.2.</b> Böbrek hasarı oluşturulan ve sağlıklı kontrol grubundaki sıçanlara ait böbrek dokularının makroskopik görüntüleri.	37
<b>4.3.</b> Grupların serum üre değerleri (mg/dl).	38
<b>4.4.</b> Grupların serum kreatinin değerleri (mg/dl)	38
<b>4.5.</b> Grupların serum p-cresol sülfat (ng/ml) değerleri.	40
<b>4.6.</b> Grupların serum indoksil sülfat ( $\mu\text{g/ml}$ ) değerleri.	40
<b>4.7.</b> Grupların serum IL-6 (pg/ml) değerleri.	42
<b>4.8.</b> Grupların böbrek dokularındaki histopatolojik değişikliklerin toplam skoru	45
<b>4.9.</b> Deney gruplarının böbrek dokularında oluşan histopatolojik değişiklikler.	46
<b>4.10.</b> Böbrek dokularında süperoksit dismutaz pozitif boyanma yüzdeleri.	49
<b>4.11.</b> Böbrek dokularında glutatyon peroksidaz pozitif boyanma yüzdeleri.	50
<b>4.12.</b> Çıkan kolon kesitlerinde occludin proteininin immünohistokimyasal skorlaması.	51
<b>4.13.</b> Çıkan kolon kesitlerinde occludin boyanmaları, indirekt immüno-peroksidaz test, anti-occludin antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama.	52
<b>4.14.</b> İnen kolon kesitlerinde occludin proteininin immünohistokimyasal	

skorlaması.	53
<b>4.15.</b> İnen kolon kesitlerinde occludin boyanmaları. İndirekt immunoperoksidaz test, anti-occludin antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama.	54
<b>4.16.</b> Çıkan kolon kesitlerinde claudin-1 proteininin immünohistokimyasal skorlaması.	55
<b>4.17.</b> Çıkan kolon kesitlerinde claudin-1 boyanmaları, indirekt immunoperoksidaz test, anti-occludin antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama.	56
<b>4.18.</b> İnen kolon kesitlerinde claudin-1 proteininin immünohistokimyasal skorlaması.	57
<b>4.19.</b> İnen kolon kesitlerinde claudin-1 boyanmaları, indirekt immunoperoksidaz test, anti-occludin antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama.	58

**TABLULAR**

<b>Tablo</b>		<b>Sayfa</b>
<b>2.1.</b>	Üremik toksinlerin sınıflandırılması.	11
<b>3.1.</b>	Adeninle KBH oluşturma protokolü için yapılan ön deney sonuçları. Serum üre ve kreatinin düzeylerindeki değişim.	25
<b>3.2.</b>	Oligofruktozla zenginleştirilmiş inülinin enerji ve besin ögesi içeriği.	26
<b>3.3.</b>	Korelasyon katsayı aralıkları ve tanımlamaları	33
<b>4.1.</b>	Grupların deney süresince vücut ağırlığı ve günlük yem tüketim miktarları.	35
<b>4.2.</b>	Grupların böbrek fonksiyon göstergelerinin tanımlayıcı istatistikleri.	37
<b>4.3.</b>	Grupların serum üremik toksin düzeylerinin tanımlayıcı istatistikleri.	39
<b>4.4.</b>	Grupların serum inflamatuvar belirteçlerinin tanımlayıcı istatistikleri.	41
<b>4.5.</b>	Sıçanların serum üremik toksin ile inflamatuvar belirteç düzeyleri arasındaki ilişki.	42
<b>4.6.</b>	Grupların böbrek dokularında şekillenen histopatolojik değişiklikler ve şiddetleri.	44
<b>4.7.</b>	Sıçanların serum üremik toksin düzeyleri ile böbrek dokularında şekillenen histopatolojik değişiklik skorları arasındaki ilişki.	48

## 1. GİRİŞ

### 1.1. Kuramsal Yaklaşımlar

Kronik böbrek hastalığı (KBH); ilerleyici glomerüler, tübüler ve interstisyel hasarla karakterize olup bu hastalarda, üremik toksin adı verilen metabolik son ürünlerin vücutta birikimi söz konusudur (1). Birçok hastalıkla olduğu gibi KBH ile bağırsak mikrobiyotası arasındaki ilişki de son yıllarda ilgi çeken bir araştırma konusudur (2, 3). Böbrek yetmezliği ilerledikçe görülen üremi, antibiyotik ve fosfat bağlayıcı ilaçların uzun dönem kullanımı ve uzamış kolon geçiş zamanı gibi faktörler bağırsak mikrobiyotasının kompozisyonunda ve fonksiyonunda değişikliklere neden olmaktadır (4).

Bağırsak bakterilerinin temel enerji kaynağı fermente edilebilir diyet posasıdır. Ancak KBH'lı bireylerde hiperpotasemiyi önlemek için potasyumdan zengin olan sebze ve meyveler diyetinde sınırlandırılmaktadır. Bu nedenle bu hastaların diyet posası tüketimi önemli ölçüde azalmaktadır (5). Kolonda yeterli miktarda fermente edilebilir diyet posası olmaması, nitrojenli bileşenleri fermente ederek üremik toksin oluşturan bakterilerin tür ve sayılarının artmasına ve bağırsak mikrobiyotasında disbiyozise yol açmaktadır (6). Bağırsak mikrobiyotasındaki dengesizlik sonucu sentezi artan bağırsak kaynaklı üremik toksinler intestinal geçirgenliğin artmasına ve sistemik inflamasyona sebep olmaktadır (7). Bu toksinler KBH'lı hastalarda renal hasarı daha da ilerleterek hem hastalık progresyonunu olumsuz etkilemekte hem de mortalite riskini artırmaktadır (8-10).

Kronik böbrek hastalarında simbiyotik intestinal bakterilerin başlıca besin kaynağı olan fermente edilebilir posanın diyetine eklenmesinin; bağırsak mikrobiyota kompozisyonu ve fonksiyonunu düzenleyerek hem bağırsak kaynaklı üremik toksin oluşumunun azaltılmasında hem de hastalığın progresyonunun yavaşlatılmasında bir tedavi seçeneği olabileceği üzerinde durulmaktadır (11-14). Prebiyotik tüketiminin yararlı etkileri KBH'lı hayvan modellerinde gösterilmiştir. KBH'lı sıçanlarda azalmış kreatinin klirensi, böbrek dokularında interstisyel fibrozis, tübüler hasar, proinflamatuvar, profibrotik, pro-oksidan moleküllerin artışı, antioksidan enzimlerin

baskılanması, kolonik epitelyal sıkı bağlantı hasarı gösterilmiştir. Prebiyotik olarak verilen dirençli nişastanın KBH'lı sıçanlarda tüm bu olumsuz sonuçları önemli ölçüde geriletmişti ve KBH progresyonunu yavaşlattığı gösterilmiştir (15).

## **1.2. Amaç ve Varsayımlar**

Bu çalışmanın amacı, kronik böbrek hastalığında diyetle yetersiz alınan fermente edilebilir diyet posasının; potasyum ve fosfor içermeyen diyet posası desteğiyle karşılanarak bağırsak mikrobiyotasının modülasyonu ile bağırsak kaynaklı üremik toksin oluşumunun azaltılması ve hastalık progresyonu üzerindeki etkilerin araştırılmasıdır.

### **Varsayımlar:**

1. KBH modeli oluşturulmuş sıçanlarda prebiyotik müdahalesi yapılan ve yapılmayan gruplar arasında bağırsak kaynaklı üremik toksin düzeyleri açısından farklılık görülür.
2. KBH modeli oluşturulmuş sıçanlarda prebiyotik müdahalesi yapılan ve yapılmayan gruplar arasında inflamasyon göstergelerinde farklılık vardır.
3. KBH modeli oluşturulmuş sıçanlarda prebiyotik müdahalesi yapılan ve yapılmayan gruplar arasında oksidatif stres göstergelerinde farklılık vardır.
4. KBH modeli oluşturulmuş sıçanlarda prebiyotik müdahalesi yapılan grupta böbrek dokusu hasarı ve renal fonksiyon göstergelerinde iyileşme gözlenir.
5. KBH modeli oluşturulmuş sıçanlarda prebiyotik müdahalesi yapılan ve yapılmayan gruplar arasında bağırsak epitelyal geçirgenlik arasında fark vardır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Böbreğin Fizyolojisi ve Fonksiyonu

Böbrekler, sırtın ortasına yakın, göğüs kafesinin hemen altında, sağ ve solda iki tane olmak üzere retroperitoneal alanda konumlanmaktadır (16). En önemli görevlerinin başında sıvı ve elektrolit dengesini sağlayarak homeostazın sürdürülmesi gelmektedir. Böbrekler, kan hacmi ve basıncının, ozmolarite ve pH'ın düzenlenmesini, üre ve ürik asit gibi azotlu atık ürünlerin ve diğer toksik maddelerin idrarla atılmasını sağlamaktadır (17). Böbreklerin en temel ve fonksiyonel birimi nefronlardır. Nefronlar; plazmanın filtre edildiği glomerüler kısım ve süzülen sıvıdan atılacak olan idrarın oluşturulduğu tübüler kısımdan meydana gelmektedir (17). Günlük ortalama 1600 L kan, böbrek glomerüllerinden filtre edilerek (glomerüler filtrasyon) 180 L kadar ultrafiltrat adı verilen sıvı oluşturulur. Vücut için gerekli bileşenlerin geri emilimi (tübüler reabsorpsiyon) ve toksik maddelerin sekresyonu (tübüler sekresyon) sonucunda ultrafiltrattan günlük ortalama 1,5 L idrar oluşturulur (18). Tüm emilim ve atım süreçleri aldosteron, antidiüretik hormon ve paratiroid hormon tarafından düzenlenmektedir (17).

Her iki böbrekte toplam 2 milyona yakın nefron bulunmaktadır. Böbrek hasarı nefron sayısını azaltmakta, hasar gören nefronlar ise yenilenememektedir. Böbrek fonksiyonunun değerlendirilmesinde kullanılan glomerüler filtrasyon hızı (GFH); fonksiyonel olan her bir nefronda bulunan glomerüllerden birim zamanda süzülen toplam plazma miktarını ifade etmektedir (19).

İdrarla atılan atık maddelerin büyük bölümü protein metabolizmasının son ürünlerinden oluşmaktadır. Atılması gereken günlük solüt yükünün çoğunluğunu üre oluştururken, idrarda daha az miktarlarda ürik asit, kreatinin ve amonyak da bulunmaktadır. Bu nitrojenli atık ürünlerin idrar yoluyla eliminasyonu böbrek fonksiyonunun diğer bir göstergesidir (18). Böbrek fonksiyonunda azalma ya da böbrek yetmezliği gibi durumlarda yüksek düzeyde azot içeren son ürünler idrarla uzaklaştırılmadığında kanda birikerek "azotemi"ye yol açmaktadır (20).

## 2.2. Kronik Böbrek Hastalığı

Kronik böbrek hastalığı; üç aydan uzun süre boyunca glomerüler filtrasyon hızının azalması ( $GFH < 60 \text{ ml/dk/1,73m}^2$ ) veya böbrek hasarı göstergesi varlığı ile karakterize, ilerleyici ve geri dönüşsüz bir halk sağlığı problemidir (21). KBH, glomerüler filtrasyon hızı değerlerine göre 5 evreye ayrılmıştır (22). Beşinci evre; GFH'nin  $15 \text{ ml/dk/1,73m}^2$ 'nin altına düşmesidir ve bu evre son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) olarak adlandırılmaktadır. Bu hastaların yaşamlarını sürdürebilmesi için diyaliz ya da transplantasyon tedavisi almaları zorunludur (23). Dünya çapında yaklaşık 2,6 milyon kişi renal replasman tedavileri ile yaşamını sürdürebilmektedir. 2030 yılına kadar bu sayının yaklaşık 5,5 milyona çıkması beklenmektedir (24). Türkiye Kronik Böbrek Hastalığı Prevalans Çalışması (CREDIT) sonuçları, ülkemizdeki erişkin popülasyonun %15,7'sinde KBH bulunduğunu göstermektedir (25).

Üremik sendrom, metabolik asidoz, elektrolit anormallikleri, anemi, kemik mineral bozuklukları, anoreksi ve kaşeksi gibi KBH ile ilişkili birçok komplikasyon yaşam kalitesini oldukça kötü etkilemekte, kardiyovasküler hastalık ve mortalite riskini artırmaktadır (26). KBH'da besin öğeleri ve son ürünlerin metabolizmasındaki değişimler ve eşlik eden hastalıklar (diyabet, hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıklar) sebebiyle uygulanması gereken tıbbi beslenme tedavisi hem hastalığın progresyonunun yavaşlatılmasında hem de hastaların yaşam kalitesinin artırılmasında büyük öneme sahiptir (27). Beslenme tedavisindeki amaç, optimal beslenme durumunun sağlanması ve devamlılığının korunması, üremik sendrom, hiperfosfatemi, hiperpotasemi, hipervolemi ve metabolik asidoz riskinin azaltılmasıdır (27). Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) çalışma grubunun (22) 2013 yılında yayımladığı Kronik Böbrek Hastalığı Değerlendirme ve Yönetim Kılavuzunda hastalığın beslenme tedavisi, diyetin protein, potasyum, fosfor ve sodyum içeriğine yönelik olup diyetin posa içeriği ya da posa desteği kullanımı konusunda herhangi bir öneri bulunmamaktadır. Son yıllarda KBH popülasyonunda



yapılan birçok çalışma, diyet posası alımının önemine ve olumlu etkilerine işaret etmektedir (13, 14).

### **2.3. KBH'da Üremik Durum ve Üremik Toksinler**

Renal fonksiyonun azalması sonucunda idrarla atılamayan metabolitler kanda ve dokularda birikerek sıvı, elektrolit ve mineral dengesinin bozulması yanısıra, yüksek kan basıncı, asidoz, kemik mineral bozukluklar gibi vücutta istenmeyen pek çok duruma yol açmaktadır (28, 29). Birçok farklı kaynaktan gelen bu metabolitlere genel olarak "üremik tutulum molekülleri" ya da yaygın ismiyle "üremik toksin" adı verilmektedir (30). Üremi; böbrek fonksiyonunun bozulmasına paralel olarak kan üre konsantrasyonunun yükselmesi ile gelişen sıvı, elektrolit ve hormon dengesizlikleri ve metabolik anormallikler ile ilişkili klinik bir sendromdur (31). Metabolik süreçleri bozan ve üremik sendroma yol açan üremik toksinlerden bazıları; üre, oksalik asit, paratiroid hormon (PTH), fenoller ve indollerdir. Üremik toksinler vücuttaki birçok sistemi etkilemekle birlikte, KBH'da özellikle kardiyovasküler hasarla ilişkilidir (29).

Üremik toksinler ekzojen, endojen ya da bakteriyel kaynaklı olabilmektedir. Endojen kaynaklı üremik toksinler, üre gibi metabolik süreçler sonucu üretilen ve renal atım kapasitesinin azalmasıyla biriken ya da PTH gibi aşırı endojen üretim sonucu vücutta biriken solütlerdir (32). Eksojen kaynaklılar ise besinlerin, benzoik asit gibi işlenmiş besinlere eklenen koruyucular ya da aroma vericilerin ya da ilaçların metabolizması sonucu oluşan ara ürünler olabilmektedir (33). Kolonda sindirilmemiş besin öğelerinin bakteriyel fermantasyonu sonucu oluşan ürünler ise bakteriyel kaynaklı üremik toksinlerdir. İntestinal floranın değişmesi ya da mikrobiyota fonksiyonundaki değişimler birçok üremik toksinin serum konsantrasyonunda artışa yol açmaktadır (12, 34).

### **2.4. Bağırsak - Böbrek Aksı**

İnsan bağırsaklarında çoğunluğu (%97) anaerobik bakteri türü olmak üzere  $10^{11}$ 'den fazla sayıda mikrobiyal hücre bulunmaktadır (35). İnsan mikrobiyomunun

karakterizasyonunu amaçlayan “Human Microbiome Project” (HMP) (36) ve Metagenomics of the Human Intestinal Tract (MetaHIT) (37) gibi büyük ölçekli projeler ve yeni nesil dizileme teknolojisinin gelişmesi sonucunda bağırsak mikrobiyotasını oluşturan baskın türler (Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacterium, Proteobacteria, Verrucobacteria, Cyanobacteria) tanımlanmıştır (38). Bu sahada yapılan ilgi çekici araştırmalar, bağırsak mikrobiyotasının insan sağlığı üzerine etkisini ortaya koymuş ve bağırsak mikrobiyotasının “metabolik aktif bir organ” olarak tanımlanmasına katkı sağlamıştır (39). Bağırsaklarda konakçı sağlığı için faydalı, “probiyotik” adı verilen *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gibi türlerin yanı sıra *Clostridium* ve *Candida albicans* gibi potansiyel patojenik organizmalar da bulunmaktadır. Bu türlerin oranı ve dağılımındaki dengesizlik sonucu oluşan “dizbiyozis” durumu birçok hastalığa neden olabilmektedir (40). Diyet, fiziksel aktivite, enfeksiyon, inflamasyon, genetik ve antibiyotik kullanımı gibi epigenetik faktörler disbiyozise yol açmaktadır (41, 42).

Bağırsak mikrobiyotasının temel işlevlerinden biri; ince bağırsaklarda sindirime dirençli diyet karbonhidratının fermente edilerek (sakarolitik fermantasyon) kısa zincirli yağ asitlerine (KZYA) sentezidir (43). Asetat, bütirat ve propiyonat gibi KZYA’ların enerji homeostazı, glikoz ve lipid metabolizması, bağırsak bariyer bütünlüğünün sağlanması, immün cevabın düzenlenmesi, inflamatuvar ve antioksidan yanıt üzerinde olmak üzere birçok yararlı etkisi bulunmaktadır (44). Kolon epitelyal hücreleri için çok önemli besin kaynağı olan KZYA’lar; sağlıklı kolonositlerin proliferasyonunu ve sıkı bağlantı proteinlerinden claudin-1, zonula occludens-1 (ZO1) ve occludin üretimini artırarak bağırsak bariyer bütünlüğünü sağlamaktadır (45). Epitelyal geçirgenliği azaltarak sistemik inflamasyona neden olan lipopolisakaritlerin ve peptidoglikanların translokasyonunu engellemekte, dolayısıyla makrofaj aktivasyonunu ve proinflamatuvar sitokin ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini önlemektedir (46). Ayrıca kolonda bulunan KZYA’lar ortam pH’ını düşürerek patojenik mikroorganizmaların inhibe edilmesini sağlamaktadır (47). KZYA’lar düzenleyici T lenfositleri (T-reg) için de önemli bir besin ögesidir (48,

49). Bağırsak mikrobiyotası tarafından KZYA oluşumunun azalması T-reg popülasyonu ve fonksiyonunu olumsuz etkilemektedir (50-52).

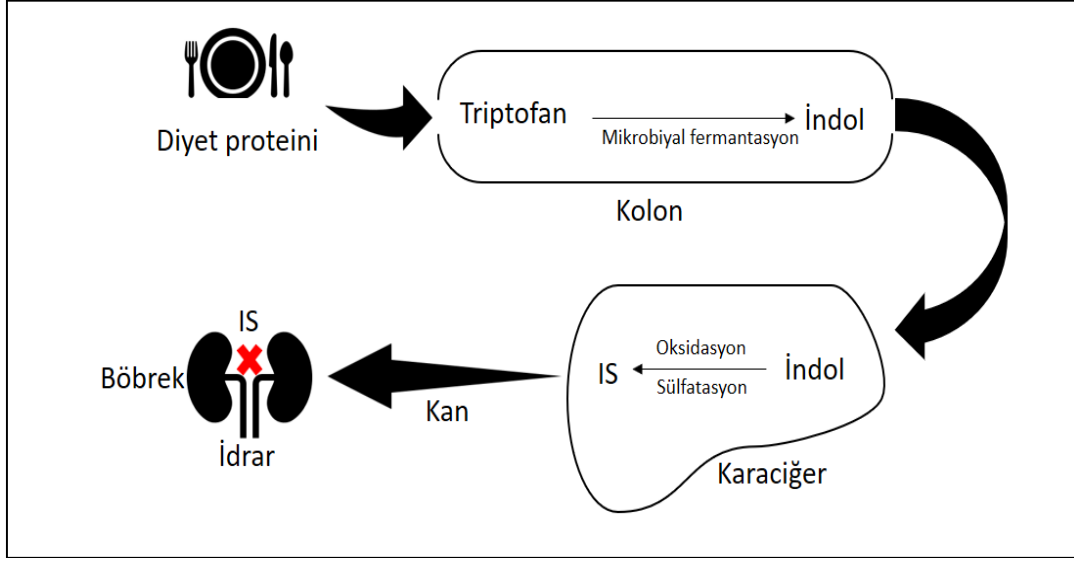
KZYA'ların doğrudan kolonositler üzerine olumlu etki ederek bağırsak bariyer bütünlüğünü sağlamasının yanı sıra reseptör aktivasyonu ile birtakım hücrel sinyal iletim mekanizmalarını başlatabilmektedir. Bu reseptörlerden biri; inflamasyon ve besin alımı sonrası insülin salınımını artıran glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) sekresyonunu düzenleyen serbest yağ asidi reseptörü 2'dir (FFAR2). KZYA'ların bağlanarak hücre içi sinyal yollarını aktive ettiği bir diğer reseptör olan serbest yağ asidi reseptörü 3 (FFAR3) ise adipositlerden leptin üretimini ve lipit profilini düzenlemektedir (53). Kısacası KZYA'lar FFAR2 ve FFAR3 reseptörlerine bağlanarak immün sistem, inflamatuvar yanıt, glikoz ve lipit metabolizmalarının düzenlenmesinde rol oynamaktadır (44).

Kolonda yeterli miktarda fermente edilebilir karbonhidrat bulunmadığı zaman, bağırsak mikrobiyotasında nitrojenli bileşikler fermente edebilen bakteri türleri bu bileşikler fenol, indol, amin gibi son ürünlere dönüştürmektedir (proteolitik fermantasyon). Bu nitrojenli bileşiklerin kaynağını; dolaşımdan intestinal sisteme geçen üre, sindirime uğramadan kolona gelen diyet proteinleri, intestinal epiteldeki ölü hücreler, pankreatik ve intestinal salgılar oluşturmaktadır (6).

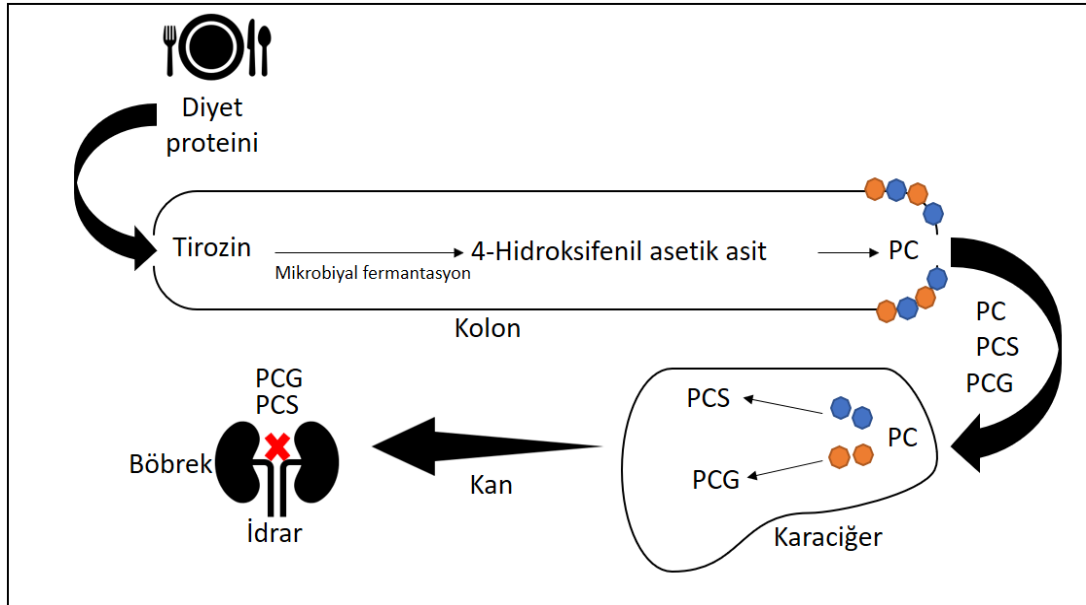
Kolona gelen triptofan aminoasidi, triptofanı fermente edebilen bakteri türleri tarafından mikrobiyal fermantasyona uğrayarak indole metabolize edilmektedir. İntestinal kanaldan emilen indol, portal dolaşımla karaciğere gelir ve burada oksidasyona ve sülfatasyona uğrayarak indoksil sülfata (IS) dönüştürülür (54) (Şekil 2.1).

Tirozinin intestinal fermantasyonu sonucu oluşan 4-hidroksifenil asetik asit, dekarboksile olarak p-cresol'a (PC) dönüşmektedir. İntestinal mukozaya gelen PC, sitozolik sülfotransferazla başlıca metaboliti olan p-cresol sülfata (PCS) ya da sitozolik glukroniltransferazla p-cresol glukronide (PCG) metabolize edilmektedir. Portal dolaşım yoluyla karaciğere gelen bu metabolitlerden sitozolik konjugasyona uğramayan PC hepatik sülfotransferazla PCS'ye ya da hepatik glukroniltransferazla

PCG'ye dönüştürülmektedir (55) (Şekil 2.2). Bağırsak kaynaklı proteine bağlı üremik toksin adı verilen, nitrojen kaynaklarının mikrobiyal fermentasyonu sonucu oluşan bu metabolitlerin birçok toksik etkisi bulunmaktadır. Bu üremik toksinler kronik böbrek hastalığına ve hastalığın progresyonuna yol açmakta, kardiyovasküler hastalık riski ve tüm nedenlere bağlı mortalite riskini artırmaktadır (56).



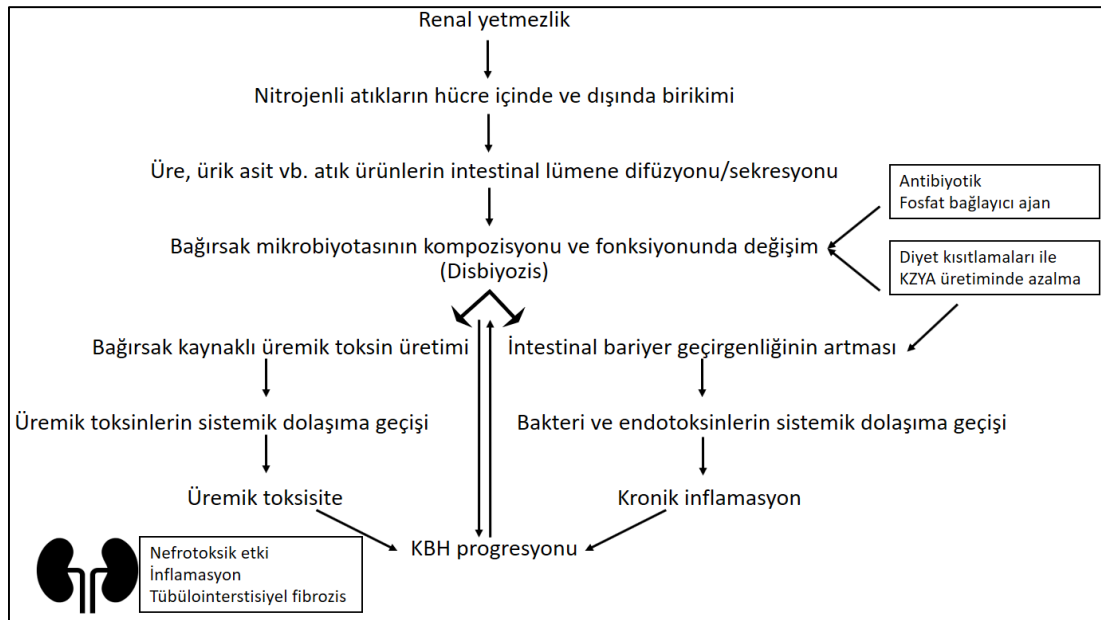
**Şekil 2.1.** Bağırsak kaynaklı üremik toksin olan indoksil sülfatın oluşumu.



**Şekil 2.2.** Bağırsak kaynaklı üremik toksin olan para-cresol sülfatın oluşumu.

## 2.5. KBH'nın Bağırsak Mikrobiyotası Üzerine Etkisi

KBH ile bağırsak mikrobiyotası arasındaki karmaşık ilişkinin çift yönlü olduğu ortaya konulmuştur. Böbrek yetmezliği bağırsak mikrobiyotasının kompozisyonunu olumsuz etkilemekte, buna karşılık mikrobiyal metabolizma sonucu oluşan üremik toksinler de böbrek yetmezliğinde progresyona neden olmaktadır (57). KBH'da birçok faktör bağırsak mikrobiyotasının kompozisyonu ve fonksiyonunda değişikliklere yol açmaktadır. Bunlar; üremik durum, ince bağırsaklarda protein sindiriminin etkin olmaması, kolon geçiş zamanının uzaması, diyet kısıtlamaları, antibiyotik ve fosfat bağlayıcı ilaç kullanımı olarak özetlenebilir (13, 58) (Şekil 2.3).



**Şekil 2.3.** KBH ve bağırsak mikrobiyotası arasındaki çift yönlü ilişki.

Böbrek yetmezliği ile oluşan üremik durum, hücre içi ve dışı sıvılardaki ürenin intestinal kanala geçişini artırmaktadır. Böylece bağırsaklarda üreyi fermente edebilen mikrobiyal türlerin sayısı çoğalmaktadır. Bu mikrobiyal türler üreyi amonyak ve amonyum hidroksite metabolize etmektedir. Amonyak ve amonyum hidroksit bağırsak epitelyal yüzeyinde bulunan sıkı bağlantı proteinlerine hasar vererek intestinal bariyer bütünlüğünü bozmaktadır (59). Ayrıca yüksek üre düzeyi intestinal mikrobiyota kompozisyonunun proteolitik fermentasyon lehine

değişimine yol açarak PCS ve IS gibi üremik toksinlerin üretimine ve birikimine neden olmaktadır (50, 60).

Özellikle ileri derecede böbrek yetmezliği olan hastalarda hiperpotaseminin önlenmesi amacıyla uygulanan tıbbi beslenme tedavisi çerçevesinde sebze ve meyve grubu diyetle kısıtlanmaktadır. Bu besin grubu aynı zamanda fermente edilebilir karbonhidratların kaynağıdır (2). Bu hastalarda fermente edilebilir diyet posası tüketiminin azalması, bağırsak mikrobiyotasında KZYA'ları oluşturan bakteri popülasyonunun azalmasına neden olmaktadır (50). Bağırsak mikrobiyotasında sakkarolitik fermantasyon süreçlerinin azalması sonucu proteolitik fermantasyon ve proteine bağlı üremik toksin üretimi artmaktadır (61). Son dönem böbrek yetmezliği olan hastaların bağırsak mikrobiyotası kompozisyonunu değerlendiren bir çalışmada on dokuz baskın türden on ikisinin üre, beş tanesinin ürik asit, üç tanesinin ise indol ve p-cresol fermente edebilen bakteri türleri olduğu görülmüştür. Aynı hastaların bağırsak mikrobiyotasında bulunan dört sınırlı türden ikisinin KZYA'dan bütiratu fermente edebilen bakteri türleri olduğu gösterilmiştir (50). KBH'a bağlı gelişen mikrobiyal floranın kompozisyon ve fonksiyonunda bozulma sonucunda konakla mikrobiyom arasındaki simbiyotik ilişki bozularak, üremik toksisite, inflamasyon, kardiyovasküler komplikasyonlara yol açan son ürünlerin oluşumu artmaktadır (58).

## **2.6. Bağırsak Mikrobiyotasının KBH Üzerine Etkisi**

### **2.6.1. Bağırsak Kaynaklı Üremik Toksinler**

Endojen metabolik atıkların vücuttan uzaklaştırılmasından üriner sistem sorumludur. Karaciğer, detoksifiye ürünlerin böbrekler yoluyla daha kolay atılımını sağlamak için çeşitli konjugasyon mekanizmalarında rol oynamaktadır (62). KBH'da böbrek fonksiyonu azaldığı için üremik toksinlerin vücuttan atımı zorlaşmaktadır. Bu toksinlerin serumda ve vücut dokularında birikimi sonucunda kardiyovasküler, nörolojik, endokrin ve iskelet sistemini olumsuz etkileyen üremik semptomlar görülmektedir (30). Üremik toksinlerin sınıflandırılması, moleküler ağırlıkları ve proteine bağlı olmasına göre yapılmaktadır. Buna göre moleküler ağırlıkları  $\leq 500$

Dalton (Da) olanlar düşük moleküler ağırlıklı solütler olarak isimlendirilirler ve bunlar diyaliz yoluyla kolaylıkla vücuttan uzaklaştırılmaktadır. Moleküler ağırlıkları >500 Da olanlar orta moleküler ağırlıklı solütlerdir ve diyaliz işleminde ancak geniş porlu membranlar kullanılarak uzaklaştırılabilir. Son grubu oluşturan proteine bağlı solütler ise moleküler ağırlıklarından bağımsız olarak değerlendirilir ve proteine bağlı yapıları nedeniyle diyaliz membranlarından difüzyonu oldukça zordur (30). Proteine bağlı üremik toksinlerin büyük çoğunluğu aminoasitlerin bağırsak bakterileri tarafından metabolizması sonucu oluşmaktadır (Tablo 2.1).

**Tablo 2.1.** Üremik toksinlerin sınıflandırılması.

Sınıf	Üremik toksin	MA (Da)	Grup	Kaynak
Düşük moleküler ağırlıklı (<500 Da)	Üre	60	Diğer	Diyet proteini
	Ürik asit	168	Pürin	Pürin metabolizması
	Kreatin	131	Guanidin	Endojen
	Kreatinin	113	Guanidin	Kreatin
	TMAO	75	Amin	Diyet kolin ve L-Karnitin
Orta moleküler ağırlıklı (≥500 Da)	ADMA	202	Guanidin	Protein metabolizması
	β-2 mikroglobulin	11800	Peptit	MHC
	PTH	9225	Peptit	Endojen
	Leptin	16000	Peptit	Endojen
	Nöropeptit Y	4272	Peptit	Endojen
Proteine bağlı bileşikler	TNF-α	26000	Sitokin	Endojen
	İnterlökin-6	24500	Sitokin	Endojen
	IS	251	İndol	Triptofan
	İndol asetik asit	175	İndol	Triptofan
	PCS	188	Fenol	Fenil alanin, tirozin
	p-cresol glukronid	283	Fenol	Fenil alanin, tirozin
	Kinürenin	208	Aminoasit	Triptofan
Kinolinik asit	167	İndol	Triptofan	
CMPF	240	Diğer	Furanoid yağ asitleri	

TMAO: Trimetilamin N-oksid; ADMA: Asimetrik dimetil arjinin; MHC: Major histokompatibilite kompleksi; PTH: Paratiroid hormon; TNF-α: tümör nekrozis faktör-α; IS: indoksil sülfat; PCS: para-cresol sülfat; CMPF: 3-karboksi-4-metil-5-propil-2-furan propiyonik asit

KBH'da bağırsak kaynaklı proteine bağlı üremik toksinlerin vücuttan diyaliz yoluyla uzaklaştırılmadığı göz önüne alındığında bağırsak kaynaklı üremik toksinlerin üretimini önleyecek tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi çok önemlidir. Hem IS hem de PCS, serumda taşıyıcı proteine yüksek afinite göstererek %90'nın üzerinde bir bağlanma oranı ile albümine bağlı halde bulunmaktadır (62). Para-cresolün farklı konjugatlarından olan PCS ve p-cresol glukronid, benzer metabolizmalara sahip olmasına rağmen PCS'nin albümine bağlanma oranı daha yüksek olduğu için (PCS: %94,2 ± 3,0; p-cresol glukronid: %8,3 ± 4,4) diyalizle uzaklaştırılması 2 kat daha zordur (63).

Hem PCS hem de IS dolaşımında albümine bağlı olarak taşınır ve sağlıklı bireylerde böbreklerden tübüler sekresyon yoluyla atılırlar. (64). Böbrek yetmezliği ilerledikçe bu üremik toksinlerin hem üretimi arttığı hem de vücuttan atımı azaldığı için serum düzeyleri yaklaşık 10 kat artmaktadır (65).

PCS ve IS'nin renal tübüler hücreler üzerinde bazı patofizyolojik değişiklikler meydana getirerek böbrek hasarını artırdığı gösterilmiştir (66). Bu etkilerin; oksidatif stres, sitokin ve inflamatuvar gen ekspresyonu, renal fibrozis, nefroskleroz, epitelyal hücrelerin mezenkimal hücrelere farklılaşması, renin anjiyotensin aldesteron sistemi (RAAS) aktivasyonu, monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) ekspresyonu, Klotho gen metilasyonu, hücreler arası adezyon molekülü-1 (ICAM-1)'in indüksiyonu gibi mekanizmalarla oluştuğu gözlenmiştir (66).

Renal hasarın dışında bu bileşenlerin sitotoksik etkileri kardiyovasküler ve inflamatuvar değişikliklere yol açmaktadır. Bazı çalışmalarda bu toksinlerin KBH'da, kardiyovasküler ve inflamatuvar sonuçlarda güvenilir biyobelirteçler olabileceği üzerinde durulmaktadır (67-69). Üremik toksinlerin nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidazı içeren bazı yollarla ROS üretimine yol açtığı, mitojen ile aktive edilen protein kinaz (MAPK)/ nükleer faktör kappa B (NF-κB) yollarını tetiklediği ve böylece proinflamatuvar sitokinler, kemokinler ve adezyon moleküllerinin üretimine sebep olduğu gösterilmiştir (68). Farklı derecelerde böbrek yetmezliği olan hastalar üzerinde yapılan klinik çalışmalarda IS ve PCS



metabolitlerinin renal hastalık progresyonu, kardiyovasküler morbidite ve mortalite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (8, 70-75).

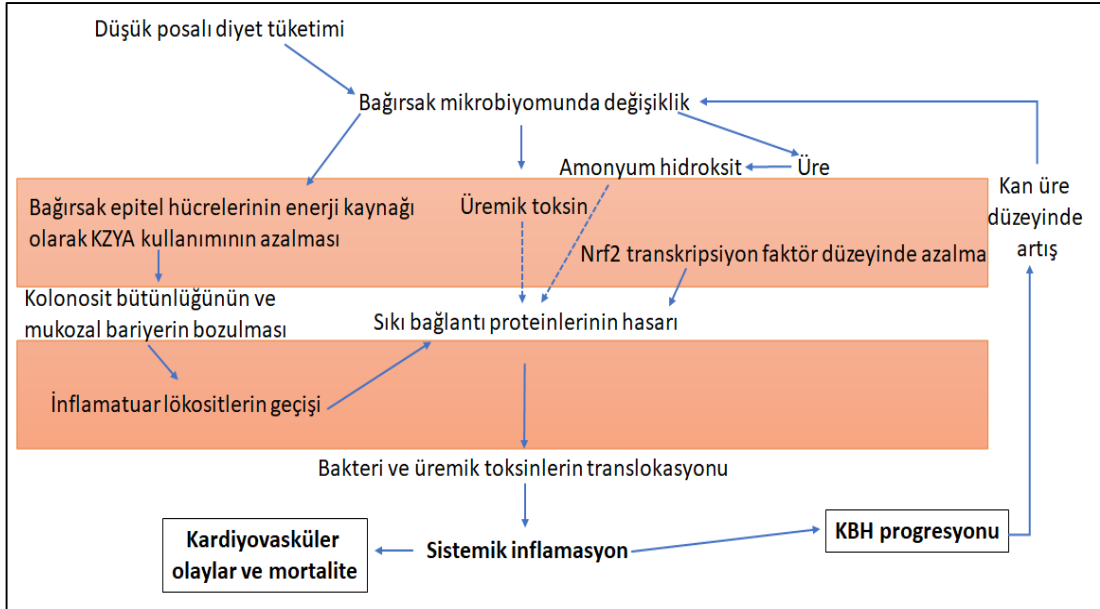
### 2.6.2. Sızıntılı Bağırsak

KBH'da var olan disbiyozis durumu intestinal duvarda ödem ve bağırsak iskemisine yol açarak "sızıntılı bağırsak" olarak adlandırılan intestinal epitelyal geçirgenliğe neden olmaktadır (76). Subtotal nefrektomi ya da adeninle indüklenen kronik böbrek yetmezliği modeli oluşturulan sıçanlarda intestinal epitel dokuda bulunan sıkı bağlantı proteinlerinin (occludin, claudin ve zona occludens) büyük ölçüde azaldığı gösterilmiştir (77-79).

KBH'da renal yetmezliğe bağlı olarak vücut sıvılarında artan üre intestinal sisteme diffüz ederek bağırsak mikrobiyotasında üre parçalayan enzime (üreaza) sahip bakteri popülasyonunu artırmaktadır. Üreaza sahip bu bakteri türleri üreyi metabolize ederek amonyağa dönüştürmekte, daha sonra da amonyum hidroksite hidrolize etmektedir. Amonyum hidroksit, epitelyal sıkı bağlantı proteinlerine zarar vererek intestinal bariyer geçirgenliğini artırmaktadır (59, 80). Böylece endotoksinlerin ve diğer luminal üremik toksinlerin sistemik dolaşıma geçmesine yol açarak lokal ve sistemik inflamasyona neden olmaktadır. Kronik lokal ve sistemik inflamasyon durumu da KBH progresyonunun ilerlemesine sebep olarak bağırsak epitelyal bariyere zarar veren kısır bir döngü yaratmaktadır. Bağırsak epitelyal bariyer geçirgenliğinin bozulması KBH'nin bir sonucu olduğu gibi aynı zamanda KBH progresyonunun bir nedenidir (Şekil 2.4) (76).

KBH'da tüketilen düşük posalı diyet sonucunda mikrobiyomda simbiyotik dengenin bozulması ve bağırsak epitelyal hücrelerinin KZYA'yı enerji kaynağı olarak kullanamaması kolonosit bütünlüğünü bozar ve koruyucu mukozal bariyere zarar vermektedir. Sonuçta inflamatuvar hücrelerin bariyerden geçişi kolaylaşarak sistemik inflamasyona katkıda bulunmaktadır (81). Aynı zamanda bağırsak inflamasyonu sıkı bağlantı proteinlerinin endositozunu uyararak epitelyal bariyer yıkımını artırmaktadır (81). KBH'lı sıçanların bağırsak dokularında antiinflamatuvar bir

transkripsiyon faktör olan nükleer faktör eritroid 2 (Nrf2)'nin baskılandığı, Nrf2 agonistleri ile müdahale edildiğinde ise hem bağırsak inflamasyonunun azaldığı hem de sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonlarının arttığı deneysel bir modelde gösterilmiştir (82).

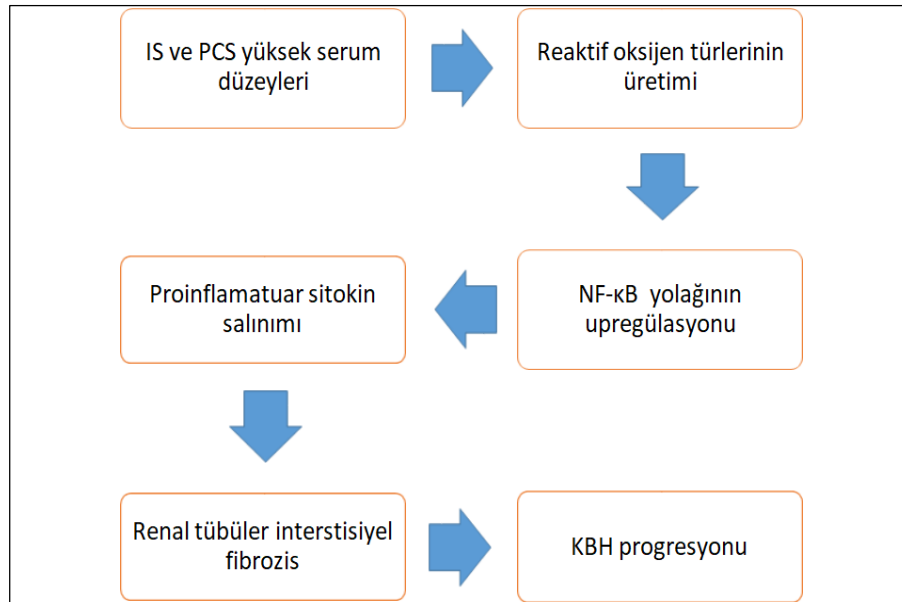


**Şekil 2.4.** KBH'da bağırsak mikrobiyotasının ve intestinal geçirgenliğin sistemik inflamasyona ve hastalık progresyonuna katkısı.

KBH'lı hastaların kan dolaşımında endotoksinlere ve bağırsak bakterilerine ait DNA parçalarına rastlanmış ve renal yetmezlik derecesi arttıkça dolaşımda bulunan endotoksin düzeyinin de arttığı gözlenmiştir (83, 84). Hemodiyaliz hastalarından oluşan bir kohort çalışmasında klinik olarak enfeksiyon varlığı olmamasına rağmen kan endotoksin düzeyi ile sistemik inflamasyon şiddeti ilişkili bulunmuştur (85). Bağırsak geçirgenliğinin artması sonucu bu toksinler sistemik dolaşıma geçerek inflamasyonu ve oksidatif stresi artırmakta, KBH progresyonu ve kardiyovasküler mortalite için risk faktörü olan sistemik inflamasyona neden olmaktadır (76).

### 2.6.3. Renal Toksikite

Farklı KBH evrelerindeki 268 hasta üzerinde yapılan prospektif gözlemsel bir çalışmada yüksek serum IS (HR= 1,063;  $p<0,001$ ) ve PCS değerleri (HR= 1,092;  $p<0,001$ ) ile hastalık progresyonu ilişkili bulunmuştur (86). Ayrıca PCS'nin yüksek serum düzeyi ile tüm nedenli mortalite arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunmuştur. Üstelik bu ilişkinin hastaların demografik özellikleri, çalışma başlangıcındaki renal fonksiyon durumu, serum IS ve kreatinin düzeyleri gibi faktörlerden bağımsız olduğu ortaya konulmuştur (86). Bağırsak kaynaklı üremik toksinlerin renal toksisite üzerine etkileri daha çok in vivo ortamda araştırılmış ve etki mekanizmalarının bir kısmına NF $\kappa$ B yolağını aktive eden reaktif oksijen türlerinin aracılık ettiği düşünülmektedir (87). In vitro çalışmalar NF- $\kappa$ B yolağı ile proinflamatuvar sitokin salınımının ve plasminojen aktivatör inhibitör-1 upregülasyonunun hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve renal tübülointerstisyel fibrozise yol açtığı gösterilmiştir (88, 89) (Şekil 2.5).



**Şekil 2.5.** IS ve PCS toksisitesinin renal etkileri.

Hayvan modellerinde oral IS ve PCS uygulamasının renal fonksiyonunda bozulma, glomerüler sklerozis ve tübülointerstisyel fibrozise neden olduğu gösterilmiştir (90-92). Niwa ve ark. (93) böbrek yetmezliği oluşturulan sıçanların

böbrek dokularında IS'nin monosit infiltrasyonunu artırarak tübülointerstisyel fibrozise ve renal yetmezlik progresyonuna yol açtığını rapor etmiştir. IS'nin glomerüler visseral epitelyal hücreler üzerinde toksik etkisi olduğu ve progresif glomerüler hasara yol açtığı gösterilmiştir (94). Yapılan hücre kültürü çalışmalarında PCS'nin tübüler epitelyal hücrelerde reaktif oksijen türlerinin oluşumunu artırdığı görülmüştür (92, 95). Böbrek yetmezliği modeli oluşturulmuş sıçanlara dört hafta boyunca intraperitoneal PCS enjeksiyonunun böbrek dokularında reaktif oksijen türlerinin üretimini arttırdığı ve tübülointerstisyel fibrozis oluşturduğu gözlenmiştir (92).

## **2.7. KBH'da Bağırsak Mikrobiyotasının Modülasyonunda Prebiyotikler**

### **2.7.1. Prebiyotikler**

Diyet posası; gastrointestinal sistem enzimleri tarafından sindirime dirençli, intrinsik, bitki hücre duvarını oluşturan yapısal polisakkaritler ve ligninden oluşmaktadır. Fonksiyonel posa ise bitkilerden izole edilerek ayrıştırılan fizyolojik yararlı etkileri olan sindirilemeyen karbonhidratları ifade etmektedir. Diyet posası ve fonksiyonel posanın toplamı ise "toplam diyet posası" olarak tanımlanmaktadır (96). Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık ve Beslenme Değerlendirme Çalışması III (NHANES III) verileri KBH'da yüksek diyet posası tüketiminin inflamasyon ve mortalite riskini azalttığını göstermiştir (97). Diyet posasının renal sağlık üzerine pozitif etkileri ortaya konulmuş olmasına rağmen kronik böbrek hastalarının diyet posası tüketimleri yetersizdir (97). Bunun başlıca sebebi hastalığın tıbbi beslenme tedavisi çerçevesinde düşük potasyum ve fosfor içeren, sebze, meyve ve tam tahıl ürünlerinin kısıtlandığı diyetlerin önerilmesidir (98).

Diyet posası çözüner ve çözünmez olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Çözünür posa kolonda bağırsak bakterileri tarafından fermente edilirken, çözünmez posanın çok az bir kısmı fermente edilebilir (99). In vitro şartlarda diyet posasının en az %60'ı fermente edilebiliyorsa fermente edilebilir diyet posası olarak değerlendirilmektedir. İnülin ve türevleri fruktooligosakkaritler,

galaktooligosakkaritler, pektin, guar gum, beta-glukanlar fermente edilebilir diyet posası türleridir ve prebiyotik olarak değerlendirilmektedir (100). Prebiyotikler; gastrointestinal sistem enzimlerine dirençli, bağırsaklarda simbiyotik bakterilerin çoğalmasını ve aktivitelerinin artmasını sağlayan, intestinal mikrobiyota tarafından fermente edilebilen diyet bileşenleridir (101). Bir diyet bileşeni, üç kriteri karşıladığı takdirde prebiyotik olarak değerlendirilmektedir. Bunlar; (i) gastrik aside, sindirim enzimlerine ve gastrointestinal emilime karşı dirençli olmak, (ii) intestinal mikrobiyota tarafından fermente edilebilir olmak ve (iii) sağlık üzerinde faydalı fizyolojik etkileri olan intestinal bakterilerin büyümesini ve/veya aktivitesini selektif stimüle etmektir (102). KBH'lı hastalarda fermente edilebilir diyet posası tüketimi artırıldığında KZYA üretimi artacağı için intestinal bariyer geçirgenlik ve lokal ve/veya iskemik inflamasyon üzerine olumlu etkileri olabileceği; ayrıca KZYA oluşturan bakteri türlerinin sayısı ve fonksiyonu artacağı için üremik toksin üreten bakteri türlerinin kolonizasyonu azalacağı öne sürülmektedir (15). Öne sürülen farklı bir mekanizma; diyet posasının bağırsak mikroflorasını oluşturan canlılardaki nitrojen tutulumunu artırarak serum üre düzeyininin düşürülmesine katkı sağlayabileceğidir (103). Kolonda üretilen KZYA, ortam pH'ını düşürerek amonyağın amonyuma dönüşümünü ve feçes yoluyla uzaklaştırılmasını sağlamaktadır (103).

### **Oligofruktozla Zenginleştirilmiş İnülin**

Diyetle inülin alımı Avrupa'da 3-11g/gün, Amerika Birleşik Devletleri'nde 1-4 g/gün olduğu rapor edilmiştir. Bu miktarlar inülin için belirlenen tolere edilebilen miktar olan 10-20 g/gün'ün çok altındadır (104). İnülin; buğday, soğan, muz, yer elması ve pırasa gibi besinlerde bulunmaktadır; ancak ticari olarak piyasaya sunulan formu çoğunlukla hindiba kökünden elde edilmektedir (105). İnülin,  $\beta$  (2-1) bağlarıyla bağlı fruktoz polimerlerinden oluşmakta ve polimerizasyon derecesi (PD) 2-60 arasında değişmektedir. Bu  $\beta$  (2-1) bağlarının sindirim enzimleriyle hidrolizasyona dayanıklı olması hem prebiyotik etkisini hem de düşük enerji içeriğini sağlamaktadır (106, 107). İnülinin enzimatik olarak kısmi hidrolizasyonu sonucunda oligofruktoz elde edilmektedir (106). Düşük molekül ağırlıklı oligofruktoz ile yüksek

molekül ağırlıklı inülinin karıştırılması sonucunda oligofruktozla zenginleştirilmiş inülin elde edilmektedir (108). İnülin tipi fruktanlar arasındaki en aktif ürün oligofruktozla zenginleştirilmiş inülinidir. İnülin tipi fruktanların kolonik fermantasyonları birçok diyet posasının aksine seçicidir, bu da demek oluyor ki potansiyel sağlığa yararlı bakteri sayısını artırırken potansiyel zararlı bakteri sayısını azaltmaktadır (108).

### **2.7.2. KBH'da Prebiyotik Tüketiminin Hastalığın Progresyonuna Etkisi**

Bağırsak-böbrek aksındaki fonksiyonu göz önüne alındığında özellikle hiperkalemik hastalarda yeterli diyet posası sağlanması için alternatif çözümler geliştirmek çok önemlidir. Prebiyotik, probiyotik ya da simbiyotikler intestinal floradaki protein fermente eden türleri azaltarak bağırsak kaynaklı üremik toksin üretiminin azaltılmasında düşük maliyetli bir tedavi stratejisi potansiyeli taşımaktadır.

KBH'da bağırsak mikrobiyotasının modülasyonunu amaçlayan probiyotik, prebiyotik ya da simbiyotiklerin kullandığı birçok çalışmada üremik toksin, kardiyovasküler risk ve inflamasyon üzerine etkileri araştırılmıştır (12). Yapılan bir meta-analizde KBH'da fermente edilebilir posa desteğinin (inülin, psilyum, gum, laktuloz) üre ve kreatinin serum düzeylerinde anlamlı azalma sağladığı gösterilmiştir. Ancak incelenen çalışmalar arasında heterojenite olduğu ve posa desteğinin serum üre düzeylerini düşürücü etkisinin doza bağlı olmadığı ve bu çalışmalarda kardiyovasküler olaylar gibi sonuçlara değinilmediği belirtilmiştir (14). Hemodiyaliz tedavisi alan hastalara 4 haftalık oligofruktozla zenginleştirilmiş inülin müdahalesi, serum üre ve PCS düzeylerinde anlamlı azalma sağlarken serum IS düzeylerinde anlamlı bir etkisi gözlenmemiştir (109). Hemodiyaliz tedavisi alan hastalar üzerinde yapılan farklı bir çalışmada ise katılımcılara prebiyotik olarak dirençli nişasta verilmiş, altı haftalık müdahale sonucunda serum IS düzeyinde istatistiksel düzeyde anlamlı azalma gösterilmiştir (110). Dirençli nişastanın kullanıldığı deneysel bir çalışmada, prebiyotik müdahalesinin KBH oluşturulmuş sıçanlarda feçesle amonyum atımını artırarak nitrojenli atık ürünlerin birikimini azalttığı, hastalık progresyonunu

iyileştirdiği gözlenmiştir. Aynı zamanda oksidatif stres ve inflamatuvar göstergelerini azalttığı gösterilmiştir (15). KBH evresi 4 veya 5 olan hastalara altı haftalık prebiyotik ve probiyotik takviyesinin yapıldığı bir çalışmada bağırsak mikrobiyota kompozisyonunda Bifidobacterium türlerinde artış görülmüş, müdahale süresince antibiyotik ilaç tedavisi almayan hastalarda serum PCS ve IS düzeylerinde hem istatistiksel hem de klinik olarak önemli azalma gösterilmiştir. Hastaların renal, oksidatif stres ve inflamasyon göstergelerinde ise anlamlı fark bulunmamıştır (111).

Bağırsak mikrobiyotasının prebiyotik, probiyotik ya da simbiyotiklerle modifikasyonunu hedefleyen, KBH'lı insanlar üzerinde yapılan bağırsak kaynaklı üremik toksin üretimi üzerine etkisinin incelendiği çalışmalarda çelişkili sonuçlar elde edilebilmektedir (112, 113). Bu durumun sebeplerinden bazıları; bu hastalarda antibiyotik kullanımı (111), çalışmalarda müdahale süresinin kısa olması, uzun dönem etkilerin incelenememesi gibi sınırlılıklardır (113).

KBH'da prebiyotik, probiyotik ya da simbiyotik desteğinin değerlendirildiği bir sistematik derleme ve meta analizde 16 çalışmada 645 yetişkin bireyin sonuçları incelenmiştir. Dâhil edilen çalışmaların 5 tanesinde prebiyotik, 6 tanesinde probiyotik, 5 tanesinde ise simbiyotik kullanılmış olup çalışmaların kalitesi değerlendirildiğinde orta ve çok düşük arasında değişmektedir. Kanıt düzeyi düşük sonuçlar prebiyotik, probiyotik ya da simbiyotik kullanımının serum üre, IS ve PCS düzeyleri üzerinde ya hiç etkisi olmadığı ya da hafif azalma sağladığını göstermiştir (114). İnülin, dirençli nişasta, gum arabic ve arabinoksilan oligosakkaritleri kullanılan 4 farklı çalışmada (110, 115-117) 105 KBH'lı katılımcı değerlendirildiğinde prebiyotik desteğinin serum üre düzeylerini azalttığı (ortalama fark= -2,23 mmol/L, p=0,006) gösterilmiştir (114).

KBH ile ilişkili sistemik inflamasyonun, intestinal mikrobiyom ve bariyer yapı fonksiyonundaki değişikliklerden kaynaklandığına dair birçok kanıt bulunmaktadır. Bu kanıtlara paralel olarak intestinal mikroflora kompozisyonunda büyük ölçüde değişiklikler, intestinal geçirgenlikte artış ve endotoksemi KBH'lılarda çok yaygın olarak görülmektedir (58, 118, 119). Bu sebeple hastalığın önlenmesinde ya da

progresyonunun yavaşlatılmasında intestinal ekosistemin ve geçirgenliğin düzeltilmesinin potansiyel bir tedavi hedefi olabileceği düşünülmektedir (120). Böbrek yetmezliği modeli oluşturulmuş fareler üzerinde yapılan bir çalışmada fermente edilebilir diyet posası olarak kullanılan guar gamın üç haftalık müdahalesi sonrası intestinal sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunda, Lactobacillus türlerinin konsantrasyonunda ve çekal KZYA miktarında artış; serum üre düzeylerinde ve böbrek dokularında inflamatuvar gen ekspresyonunda azalma gösterilmiştir (120). Asetik, propiyonik ve bütirik asit gibi KZYA'ların, renal kortikal epitelyal hücrelerde tümör nekrozis faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ile uyarılan MCP-1 ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir. Bu gözlem intestinal fermantasyon sonucunda oluşan KZYA'nın dolaşım sistemine taşınarak direkt olarak renal inflamasyon ve fibrozisi baskılayabileceğini göstermektedir (121).

Birçok çalışmada KBH'da IS, PCS gibi bağırsak kaynaklı üremik toksinlerin inflamasyon, KV risk ve mortalite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (75, 86, 122, 123). Çift-kör plasebo kontrollü randomize bir çalışmada üç aylık fruktooligosakkarit (FOS) desteği sonunda idrar PCS, serum IS, intestinal bariyer geçirgenliği gösteren serum zonulin düzeyleri, inflamasyon ve böbrek fonksiyonunda anlamlı değişiklik gözlenmemiştir (124). Üremik toksinlerin serum düzeyinin azaltılmasında, kullanılan prebiyotik türünün ve mikrobiyal fermantasyon sürecinin etkili bir faktör olduğu düşünülmektedir (124). FOS, inülin ve oligofruktozun her üçü de fruktanlar kategorisi altında olmakla birlikte polimerizasyon dereceleri birbirinden farklılık göstermektedir (125). FOS, kısa zincirli bir fruktan olduğu için proksimal kolonda hızlıca fermente olmakta, inülin ise uzun zincirli yapısı sayesinde üremik toksin üretiminin daha yoğun olduğu kolonun son bölümüne kadar ulaşabilmektedir (126). İnülin ve türevlerinin kullanıldığı çalışmalarda ise serum üremik toksin düzeylerinde istatistiksel ve klinik öneme sahip anlamlı azalma gösterilmiştir (109, 127). Buna göre inülin ve türevlerinin bağırsak kaynaklı üremik toksinlerin azaltılmasında FOS ile karşılaştırıldığında daha etkili olabileceği düşünülmektedir (124).

KBH modeli oluşturulmuş sıçanlarda, prebiyotik ve probiyotik tedavi verilen grup, destek tedavinin verilmediği grupla karşılaştırıldığında serum kreatinin ve kan



üre azotu düzeyleri anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Aynı zamanda prebiyotik ve probiyotik kullanımının KBH'lı sıçanların böbrek dokularında tübülointerstisyel hasarı iyileştirdiği gözlenmiş, böbrek fonksiyon göstergeleri arasındaki olumlu yöndeki bu farklılık tübülointerstisyel hasarın gerilemesi ile ilişkilendirilmiştir (128).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma, deneysel müdahale çalışması olarak planlanmış olup deney hayvanlarının bakımı, hastalık oluşturma protokolü ve diyet müdahaleleri 9 Nisan – 5 Haziran 2018 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yapılmıştır. Deney hayvanlarının anestezi uygulanarak sakrifikasyonu; kan ve idrar örneklerinin alınması, böbrek ve kolonun çıkarılması işlemleri de Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yapılmıştır. İzole edilen serum örnekleri, organ ve dokular Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü Araştırma Laboratuvarları'nda -80 °C'de saklanmıştır. Serum üremik toksin analizleri Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Laboratuvar'ında yapılmıştır. Serum inflamatuvar parametrelerinin (IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ ) ölçümü Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü Araştırma Laboratuvarları'nda yapılmıştır. Böbrek dokularının histopatolojik incelenmesi, kolon dokularında sıkı bağlantı proteinlerinin (claudin-1, occludin) ve böbrek dokularında antioksidan parametrelerinin (SOD, GPx) immünohistokimyasal analizleri Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda yürütülmüştür.

Bu proje Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından incelenmiş olup kurulun 18.05.2017 tarih ve 2017/05 sayılı toplantısında önerilen projenin gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna karar verilmiştir (Karar no: 2017/37-06) (Ek-3). Araştırma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından "Hızlı Destek Programı (1002)" kapsamında 217S980 proje numarası ile desteklenmiştir. Ayrıca, Hacettepe Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) doktora tezi proje bütçesinden de kullanılmıştır.

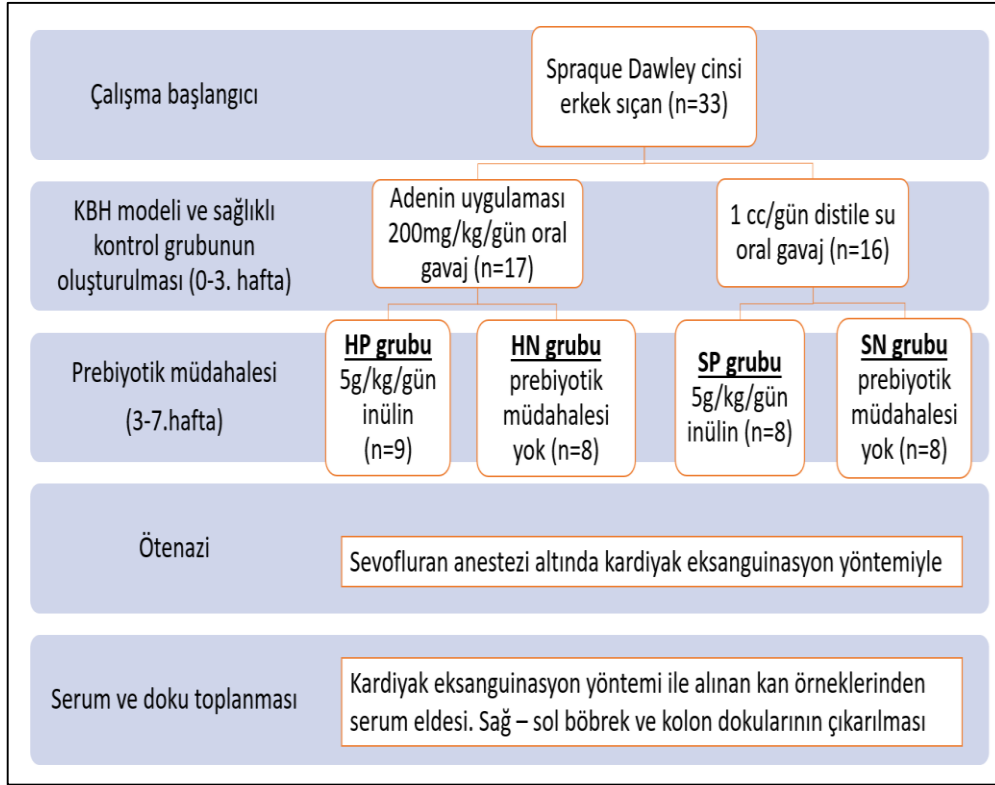
#### 3.1. Deney Hayvanları ve Araştırma Planı

Tez konusu ile ilgili makalelerden elde edilen literatür bilgileri sonuçlarından yararlanılarak araştırmanın örneklem büyüklüğü; GPower programı kullanılarak %80

güçle; her grupta (4 grup) minimum 8 sıçan olacak şekilde toplam 32 sıçan olarak belirlenmiştir (129, 130). Deney hayvanı ölümlerinin yaşanması durumunu öngörerek istatistiki analizleri riske atmamak için hasta gruba 9 sıçan dahil edilmiştir. Çalışmada ortalama 350 g ağırlığında 33 adet Spraque Dawley ırkı yetişkin erkek sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamda, sıcaklığın 21 °C ve ortam neminin %55-60 olduğu odalarda, her deney hayvanı ayrı kafeslerde olacak şekilde tutulmuştur. Deney hayvanlarının vücut ağırlığı ölçümleri hassas terazi (Mettler Toledo PL3001-S) kullanılarak haftalık yapılmıştır. Deney hayvanlarının yem ve suları ad libitum verilerek tüketilen miktarlar haftalık olarak kayıt altına alınmıştır. Hafta başında belli bir miktarda verilen yem ve su miktarları kaydedilerek hafta sonunda kafeslerde kalan yem ve su miktarları ölçülmüş, böylece haftalık yem ve su tüketimleri hesaplanmıştır. Deney hayvanlarına verilen yem bileşenleri; %23 protein, %8 kül, %7 selüloz ve %3 yağ şeklindedir.

Deney temel olarak 2 aşamadan oluşmaktadır. İlk aşama deney hayvanlarına adenin verilerek kronik böbrek hastalığının oluşturulması; ikinci aşama ise diyetle prebiyotik ilavesi yapılmasıdır. Araştırma planı Şekil 3.1'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir. Deney grupları ise aşağıdaki gibidir;

- i. Hasta - prebiyotik müdahale grubu (HP): Adenin uygulamasıyla KBH oluşturulmuş; içme sularına 5g/kg vücut ağırlığı/gün oligofruktozla zenginleştirilmiş inülin karıştırılarak prebiyotik uygulanan grup (n=9).
- ii. Hasta - kontrol grubu (HN): Adenin uygulamasıyla KBH oluşturulmuş; içme sularına prebiyotik eklenmeyen grup (n=8).
- iii. Sağlam - prebiyotik müdahale grubu (SP): İçme sularına 5g/kg vücut ağırlığı/gün oligofruktozla zenginleştirilmiş inülin karıştırılarak prebiyotik uygulanan sağlam grup (n=8).
- iv. Sağlam - kontrol grubu (SN): İçme sularına prebiyotik eklenmeyen sağlam grup (n=8).



**Şekil 3.1.** Deney planı.

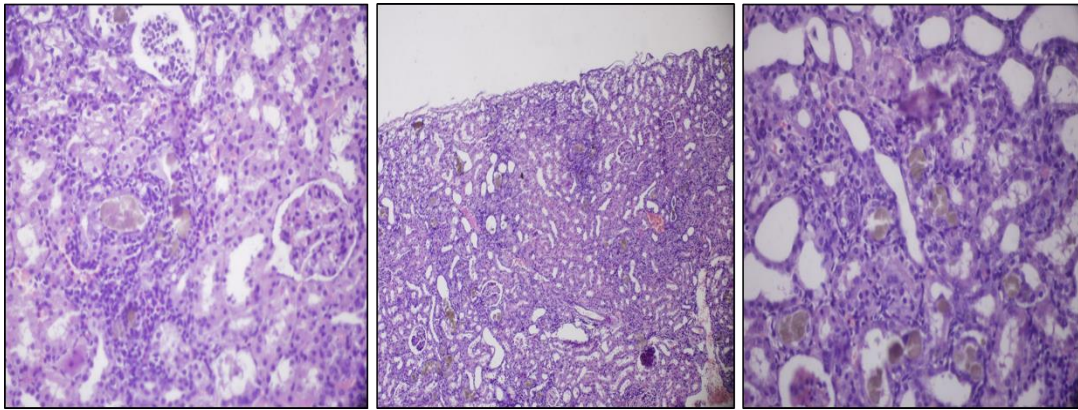
### 3.1.1. Deney Hayvanlarında Hastalık Oluşturma Protokolü

Adenin modeli, deney hayvanlarında KBH oluşturmada; uygulamasının kolay olması, cerrahi girişim gerektirmemesi ve deney hayvanlarının hayatta kalım oranlarının daha yüksek olması sebebiyle çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (131-137). Bu yöntemde oral olarak alınan adenin, 2,8-dihidroks adenine metabolize olur ve proksimal tübüllerin epitel hücrelerinde kristalize olarak harabiyete yol açmaktadır (138).

Bu proje önerisi için protokol oluşturabilmek için Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bir ön deney tarafımızdan yapılmıştır. Yapılan ön deneyde 3 adet 300-350 g ağırlığında erkek Spraque Dawley sıçana 3 hafta boyunca 200 mg/kg/gün dozunda oral gavaj yolu ile adenin uygulanmıştır (139). Ön deneyimiz sonucunda serumda bakılan böbrek fonksiyon testleri (Tablo 3.1) ve böbrek dokularında yapılan histopatolojik değerlendirmelerle KBH oluşumu doğrulanmıştır (Şekil 3.2).

**Tablo 3.1.** Adeninle KBH oluşturma protokolü için yapılan ön deney sonuçları. Serum üre ve kreatinin düzeylerindeki değişim.

	Serum üre (mg/dl)		Serum kreatinin (mg/dl)	
	0.hafta	3.hafta	0.hafta	3.hafta
<b>A1</b>	41.6	204.1	0.74	1.66
<b>A2</b>	36.6	180.2	0.72	1.47
<b>A3</b>	37.2	140.5	0.61	1.35



**Şekil 3.2.** Adenin uygulanan sıçanların böbrek dokularının histopatolojik bulguları. Ön deney sonuçları.

Ön deney sonucunda sıçanlardan izole edilen böbrek dokularının histopatolojik değerlendirmesinde; proksimal tübül lümenlerinde yoğun olmak üzere lümenin tamamını dolduran, sarı-açık kehribar renkte ve radial uzantılara sahip kristaller gözlenmiştir. Tübül epitellerinde hafif derecede parankim ve vakuoler dejenerasyondan, total tübül nekrozuna kadar varan değişiklikler ile bazal membranı hasar gören tübüller etrafında nekrotik hücrelere ait kromatin kalıntıları ile tübülointerstisyel makrofaj ve lenfosit infiltrasyonu görülmüştür. Yer yer etkilenen tübül yapısının gözden kaybolarak interstisyel yangı alanların multifokal odaklar halini aldığı dikkat çekmektedir (Şekil 3.2).

Ön deneyle doğruladığımız üzere; KBH oluşturmak için sıçanlara 3 hafta boyunca günde 1 kez olmak üzere 200 mg/kg vücut ağırlığı dozundaki adenin, 1 cc distile suyla karıştırılarak oral gavaj yoluyla verilmiştir. Oral gavaj sıçanlarda stres

oluşturan bir uygulama olduğu için sağlıklı gruptaki sıçanlara da 3 hafta boyunca günde 1 kez olmak üzere 1 cc distile su oral gavaj yoluyla verilmiştir.

### 3.1.2. Deney Hayvanlarına Prebiyotik Uygulama Protokolü

Bu çalışmada prebiyotik kaynağı olarak suda çözünür, potasyum ve fosfor içermeyen fermente edilebilir posa kaynağı olarak oligofruktozla zenginleştirilmiş inülin kullanılmıştır (Orafti Synergy1; BENE0, Belçika). Çalışmada kullanılan prebiyotik, hindiba kökünden elde edilen inülin fraksiyonlarının kombinasyonundan oluşan toz formda bir besin maddesidir. İçeriğinde uzun zincirli olan inülin (PD  $\geq$  10) ve daha kısa zincirli olan oligofruktoz (PD  $<$ 10) eşit miktarda bulunmaktadır. Çalışmada kullanılan prebiyotik desteğinin enerji ve besin ögesi içerik bilgileri üretici firmadan sağlanmış olup Tablo 3.2’de gösterilmektedir.

**Tablo 3.2.** Oligofruktozla zenginleştirilmiş inülinin enerji ve besin ögesi içeriği

<b>Enerji ve besin ögeleri</b>	<b>100 g için değerler</b>
<b>Enerji (kkal)</b>	214
<b>Karbonhidrat (g)</b>	10
<b>Şeker (g)</b>	10
<b>Posa (g)</b>	87
<b>Protein</b>	–
<b>Yağ</b>	–
<b>Tuz (Sodyum) (g)</b>	0,03 (0,01)
<b>Vitaminler</b>	–
<b>Mineraller</b>	–

Sıçanlar üzerinde yapılmış olan, prebiyotik desteği sonucunda inflamasyon, oksidatif stres ve mikrobiyota modülasyonunun sağlandığı çalışmalar temel alınarak uygulanacak prebiyotik dozu 4 hafta boyunca 5g/kg vücut ağırlığı/gün olarak belirlenmiştir (15, 130, 140). Oligofruktozla zenginleştirilmiş inülin; suda kolayca çözünür yapısı sebebiyle deney hayvanlarının içme sularına karıştırılarak uygulanmıştır. Diyetine prebiyotik eklenecek her bir sıçanın vücut ağırlığına göre hesaplanan prebiyotik dozu, deney hayvanlarının içme suyuna karıştırılarak günlük

dozlar halinde deneyin 3. haftasının sonundan itibaren 7. haftanın sonuna kadar 28 gün boyunca uygulanmıştır.

### **3.1.3 Örneklerin Alınması ve Saklanması**

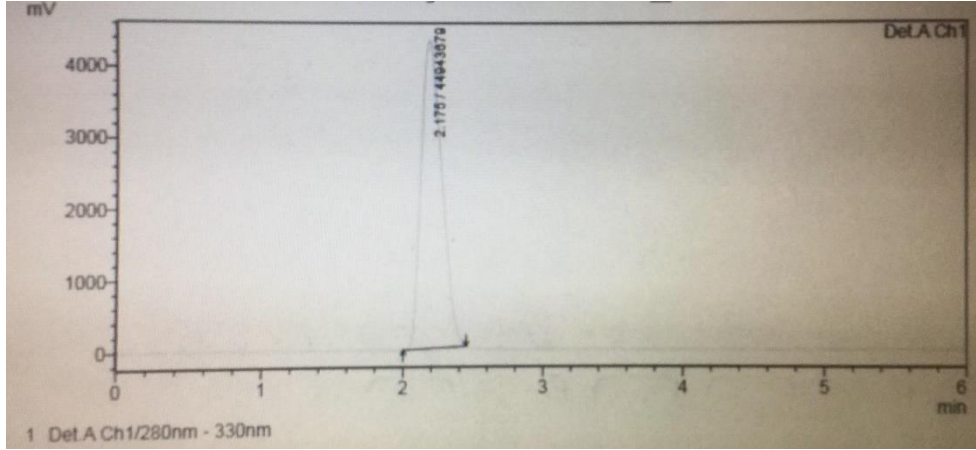
Deneyin 7. haftasının sonunda (28. günde) sıçanlara Sevofluran anestezisi altında kardiyak eksanguinasyon yöntemiyle ötenazi uygulanmıştır. Kardiyak eksanguinasyon yöntemiyle hayvanlardan alınan kan örnekleri, sarı kapaklı 5 mL'lik plastik serum separatör tüplerine (SST) toplanmıştır. Oda sıcaklığında iki saat bekletilen kan örnekleri 1000 devirde 15 dk santrifüj edilerek serumları ayrılmıştır (Thermo Scientific Heraeus Cryofuge, Almanya). Elde edilen numuneler Eppendorf tüpüne aktararak daha sonra çalışılmak üzere -80°C'de saklanmıştır.

### **3.2. Serum Üremik Toksin Analizi**

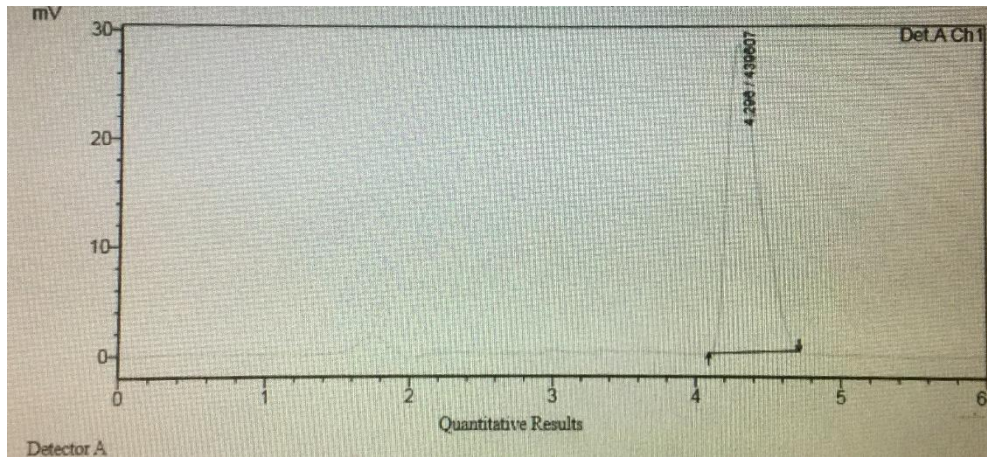
Tüm deney gruplarından alınan 1 er mL'lik serum numunelerindeki p-cresol ve indoksil sülfat miktarları Shimadzu marka LC-10 AD model yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazıyla ters faz kromatografik koşullarda analiz edilmiştir. Durgun faz olarak Phenomenex marka oktadesil silan içerikli (C18) kolon, hareketli faz olarak ise asetonitril ve asetat tamponundan oluşan bir sistem kullanılmıştır. Bu kromatografik sisteme ait analizler floresans dedektörü ile gerçekleştirilmiştir. HPLC analizleri öncesinde numunelerden 250 µL'lik porsiyonlar alınarak üzerlerine 750 µL asetonitril ilave edilmiş ve karışım 30 saniye vorteks mikserde karıştırılmıştır. Ardından 4000 rpm devirle 15 dakika santrifüj edilmiştir. Akabinde süpernatant kısımdan yani üstteki fazdan 20'şer µL'lik hacimler direkt HPLC sistemine enjekte edilmiştir.

HPLC sisteminde kullanılan hareketli fazın oranları asetonitril : pH 4,5 sodyum asetat tampon (55 : 45 h/h), durgun faz olan C 18 kolonun ölçüleri ise 4,6 mm (iç çap) x 150 mm (uzunluk) x 5 µm partikül boyutu şeklindedir. Durgun fazın hareketli faza göre daha apolar olduğu ters faz kromatografi tekniği uygulanmıştır. Hareketli fazın akış hızı dakikada 0.8 mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Floresans dedeksiyon için 280 nm ekzitasyon ve 330 nm emisyon dalga boyları kullanılmıştır.

İndoksil sülfat ve p-cresol retansiyon zamanları sırasıyla 2,1 ve 4,3 dakikadır (Şekil 3.3 ve 3.4).



**Şekil 3.3.** İndoksil sülfat ölçümüne ait kromatogram.



**Şekil 3.4.** P-cresol sülfat ölçümüne ait kromatogram.

Numune analizlerinde geçmeden önce Merck marka p-cresol ve indoksil sülfat standart maddelerinin saf serum örneklerine katımıyla 250  $\mu$ L'lik porsiyonlar alınarak üzerlerine 750  $\mu$ L asetonyril ilave edilmiş ve karışım 30 saniye vorteks mikserde karıştırılmıştır. Ardından 4000 rpm devirle 15 dakika santrifüj edilmiştir. Akabinde süpernatant kısımdan yani üstteki fazdan 20'şer  $\mu$ L'lik hacimler direkt HPLC sistemine enjekte edilerek çeşitli durgun faz, mobil faz ve akış profili denemeleri sonucunda yukarıda belirtilen kromatografik analiz koşulları belirlenmiş ve bu analiz yöntemi International Conference of Harmonization (ICH) kriterlerine



(141) göre valide edilmiştir. Analit (p-cresol ve indoksil sülfat) konsantrasyonları ve HPLC pik alan oranları arasındaki korelasyona göre ölçü eğrileri çizilmiş, denklemleri belirlenmiş ve akabinde bu denklem yardımıyla içeriği bilinmeyen serum numunelerinin analizleri yapılmıştır. P-cresol ve indoksil sülfat için ölçü eğrisi denklemleri sırasıyla  $y=44569x+106897$  ve  $y=25112x+6578$ 'dir. Bu doğrulara ait korelasyon katsayıları sırasıyla 0,9986 ve 0,9988'dir. P-cresol için 10-600 ng/mL, indoksil sülfat için 5-50 µg/mL düzeyinde bir doğrusallık söz konusudur.

### 3.3. Patolojik İncelemeler

Tüm sıçanlardan alınan 66 adet böbrek (sağ ve sol) ve 33 adet kolon dokusu örneği %4 PBS (fosfat tampon tuz çözeltisi) tamponlu paraformaldehit solüsyonu içerisinde 48-72 saat tespit edildikten sonra, böbrekten korteks-medullayı temsil edecek şekilde diagonal ve kolondan sirküler 2-4 mm kalınlığında seri kesitler alınmıştır. Alınan kesitler, akan çeşme suyu altında 6-8 saat yıkanarak rutin doku takip işlemlerinin ardından parafinde bloklanmıştır. Parafin bloklardan 4-5µm kalınlığında seri kesitler alınmıştır. Rutin olarak hematoksilin ve eozin (HE) ile boyanan kesitler, histopatolojik yönden incelenmiştir.

Böbrek ve kolon dokularındaki histopatolojik bulgular değerlendirilmiş ve semikantitatif olarak skorlanmıştır (0= yok, 1= hafif ve lokal, 2= orta şiddette, 3=yoğun ve yaygın, 4= çok yoğun ve yaygın) (142). Lezyonlu bölgeler işaretlendikten sonra yedek parafin kesitler kullanılarak aşağıda tanımlandığı şekilde immunoperoksidaz testler gerçekleştirilmiştir.

### 3.4. İmmunoperoksidaz Testler

Tüm immunohistokimyasal testler ticari streptavidin- biotin kit (Thermo Fisher Scientific, USA) ve aminoethyl carbazole (AEC) kromojeni (Thermo Fisher Scientific, USA) kullanılarak yapılmıştır. Karşıt boyama olarak ise Mayer's hematoksilin kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak kullanılan dokulara primer antikor yerine immunize olmayan fare serumu damlatılarak aynı boyama prosedürü izlenmiştir. Buna göre; kesitler ksilol serilerinde beşer dakika deparafinize edildikten

sonra, dereceli alkol serilerinden geçirilerek distile suda 5 dakika bekletilmiş ve rehidrasyonu sağlanmıştır. Hidrojen peroksidadz aktivitesini engellemek için, kesitler metanol içinde %3'lük hidrojen peroksit ile 10 dakika muamele edilmiştir. Tris-buffered saline (TBS, pH 6.0) kullanılarak 15 dakika ısı aracılı antijen geri alma yöntemi uygulanmış ve PBS ile yıkanan kolon ve böbrek dokuları protein bloke edici serumda 10 dakika bekletilmiştir. Sonrasında kolon dokularında sıkı bağlantı proteinlerinin analizi için claudin-1 (sc-166338; Santa Cruz Biotechnology; Dallas, TX, USA) ve occludin (sc-133256; Santa Cruz Biotechnology) antikoları; böbrek dokularında oksidatif stres parametrelerinin analizi için ise süperoksit dismutaz (SOD) (sc-101523; Santa Cruz Biotechnology) ve glutatyon peroksidadz (GPx) (sc-133160; Santa Cruz Biotechnology) antikoları kullanılmıştır. Dokular sırasıyla primer antikor, biotinli sekonder antikor ve streptavidin-peroksidadz ile 60 dakika, 20 dakika ve 20 dakika süreyle olacak şekilde oda ısısında inkübe edilmiştir. Her bir aşamadan sonra dokular 10'ar dakika PBS ile yıkanmıştır. Son olarak AEC kromojeni ile kontrollü olarak boyanmış ve karşıt boyama olarak Mayer's hematoksilen uygulanmıştır.

Histomorfometrik analizlerde; DP 25 dijital kamera ataçmanlı Olympus BX51 trinoküler ışık mikroskobu ile immunohistokimyasal bulgular görüntülenmiş ve her bir dokunun dijital mikrofotoğrafları çekilmiştir. Çekilen mikrofotoğraflardan Olympus DP2-BSW (Ver 2.0) analiz programı yardımı ile kantitatif olarak pozitif boyanmaların % derecesi hesaplanmıştır.

### **3.5. Serum İnflamatuar Göstergelerinin Analizi**

Serum interlökin (IL)-6, IL-10 ve TNF- $\alpha$  düzeyleri kantitatif sandviç enzim immünoassay tekniği ile ticari sıçana özgü ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbant Assay) kitleri kullanılarak ölçülmüştür.

#### **3.5.1. Serum IL-6 Düzeylerinin Ölçümü**

Serum örneklerinde IL-6 miktarlarının belirlenmesinde sıçana özgü ELISA kiti (CSB-E04640r; Cusabio Biotech Co., Ltd; USA) kullanılmıştır. Testin çalışma prensibi

genel olarak Őu Őekildedir; hazırlanan standart solüsyonu ve örnekler IL-6'ya özgü antikorlarla kaplanmış mikropłaka kuyucuklarına eklenerek mevcut IL-6'nın antikorlara bağlanması için 37°C'de 2 saat boyunca inkübe edilir. Bağlanmamış maddelerin uzaklaştırılmasından sonra IL-6'ya özgü biyotin-bağlı antikorlar kuyucuklara eklenerek 37°C'de 1 saat inkübe edilir. Kuyucuklar yıkanarak avidin-konjuge Horseradish peroksidaz (HRP) eklenerek için 37°C'de 1 saat boyunca inkübe edilir. Yıkanarak bağlanmamış avidin-enzim reaktifleri uzaklaştırılır. Substrat solüsyonu eklenir ve ilk aşamada bağlanan IL-6 miktarıyla orantılı olarak renk gelişimi gözlenir. Son olarak durdurma solüsyonu ile renk değişimi durdurularak renk yoğunluğu ELISA okuyucusunda 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Standart kalibrasyon eğrisi çizilerek örneklerin IL-6 düzeyleri pg/ml cinsinden hesaplanmıştır. İlgili kitin deteksiyon limiti 0,312 pg/ml – 20 pg/ml aralığında ve duyarlılığı 0,078 pg/ml'dir.

### **3.5.2. Serum IL-10 Düzeylerinin Ölçümü**

Serum IL-10 düzeyleri sıçana özgü ELISA kiti (CSB-E04595r; Cusabio Biotech Co., Ltd; USA) kullanılarak ölçülmüştür. Testin çalışma prensibi genel olarak Őu Őekildedir; hazırlanan standart solüsyonu ve örnekler IL-10'a özgü antikorlarla kaplanmış mikropłaka kuyucuklarına eklenerek mevcut IL-10'un antikorlara bağlanması için 37°C'de 2 saat boyunca inkübe edilir. Bağlanmamış maddelerin uzaklaştırılmasından sonra IL-10'a özgü biyotin-bağlı antikorlar kuyucuklara eklenerek 37°C'de 1 saat inkübe edilir. Kuyucuklar yıkanarak avidin ile konjuge HRP eklenerek için 37°C'de 1 saat boyunca inkübasyon sonrası bağlanmamış avidin-enzim reaktifleri uzaklaştırılması için tüm kuyucuklar yıkanır. Substrat solüsyonu eklenir ve ilk aşamada bağlanan IL-10 miktarıyla orantılı olarak renk değişimi gözlenir. Son olarak durdurma solüsyonu ile renk değişimi durdurularak renk yoğunluğu ELISA okuyucusunda 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Standart kalibrasyon eğrisi çizilerek örneklerin IL-10 düzeyleri pg/ml cinsinden hesaplanmıştır. İlgili kitin deteksiyon limiti 3,12 pg/ml – 200 pg/ml aralığında ve duyarlılığı 0,78 pg/ml'dir.

### 3.5.3. Serum TNF- $\alpha$ Düzeylerinin Ölçümü

Serum örneklerinde TNF- $\alpha$  miktarlarının belirlenmesinde sıçana özgü ELISA kiti (CSB-E11987r; Cusabio Biotech Co., Ltd; USA) kullanılmıştır. Test şu şekilde çalışılmıştır; hazırlanan standart solüsyonu ve örnekler TNF- $\alpha$ 'ya özgü antikorlarla kaplanmış kuyucuklara eklenerek mevcut TNF- $\alpha$ 'nın antikorlara bağlanması için 37°C'de 2 saat boyunca inkübe edilir. Bağlanmamış maddelerin uzaklaştırılmasından sonra TNF- $\alpha$ 'ya özgü biyotin-bağlı antikorlar kuyucuklara eklenerek 37°C'de 1 saat inkübe edilir. Kuyucuklar yıkanarak avidin ile konjuge HRP eklenerek için 37°C'de 1 saat boyunca inkübe edilir. Bağlanmamış avidin-enzim reaktifleri uzaklaştırılması için tüm kuyucuklar yıkanır. Substrat solüsyonu eklenir ve ilk aşamada bağlanan TNF- $\alpha$  miktarıyla orantılı olarak renk değişimi oluşur. Son olarak durdurma solüsyonu ile renk değişimi durdurularak renk yoğunluğu ELISA okuyucusunda 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. Standart kalibrasyon eğrisi çizilerek örneklerin TNF- $\alpha$  düzeyleri pg/ml cinsinden hesaplanmıştır. İlgili kitin deteksiyon limiti 6,25 pg/ml – 400 pg/ml aralığında ve duyarlılığı 1,56 pg/ml'dir.

### 3.6. Serum Üre ve Kreatinin Analizi

Deney hayvanlarından toplanan kan örnekleri pıhtı oluşturucu jelli serum tüplerine alınmıştır. Oda sıcaklığında 2 saat bekletildikten sonra 4,000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serum örnekleri elde edilmiştir. Serum örneklerinin üre ve kreatinin seviyeleri biyokimya otoanalizöründe (XL 200, Erba Diagnostics Mannheim, Almanya) ölçülmüştür.

### 3.7. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel verilerin değerlendirilmesinde IBM SPSS Versiyon 23.0 istatistiksel paket programı kullanılmıştır. Niceliksel veriler için ortalama standart sapma tabloları kullanılmıştır. Verilerin normal dağılıma uygunluğu görsel (histogram ve olasılık grafikleri) ve analitik yöntemlerle (Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk testleri) incelenmiştir. Tanımlayıcı analizler normal dağılmayan değişkenler için ortanca ve çeyrekler arası dağılım aralığı (ÇADA)

kullanılarak verilmiştir. Normal dağılmayan değişkenler Kruskal-Wallis testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. İkişerli karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi ve Bonferroni düzeltmesi kullanılarak değerlendirilmiştir. Korelasyon analizleri sayısal ve normal dağılım gösteren değişkenler için Pearson testi, parametrik olmayan değişkenler için ise Spearman testi kullanılmıştır. Korelasyon katsayılarının mutlak değerine göre ilişkinin tanımlanması için aşağıdaki tanımlamalar kullanılmıştır. p değerinin 0,05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar şeklinde değerlendirilmiştir.

**Tablo 3.3.** Korelasyon katsayı aralıkları ve tanımlamaları (143).

<b>Korelasyon Katsayısı</b>	<b>Korelasyon Tanımı</b>
0,05 – 0,30	Düşük ya da önemsiz
0,30 – 0,40	Düşük-orta derece
0,40 – 0,60	Orta derece
0,60 – 0,70	İyi derece
0,70 – 0,75	Çok iyi derece
0,75 – 1,00	Mükemmel

## 4. BULGULAR

### 4.1. Deney Süresince Sıçanların Vücut Ağırlığı ve Yem Tüketimi Değişimleri

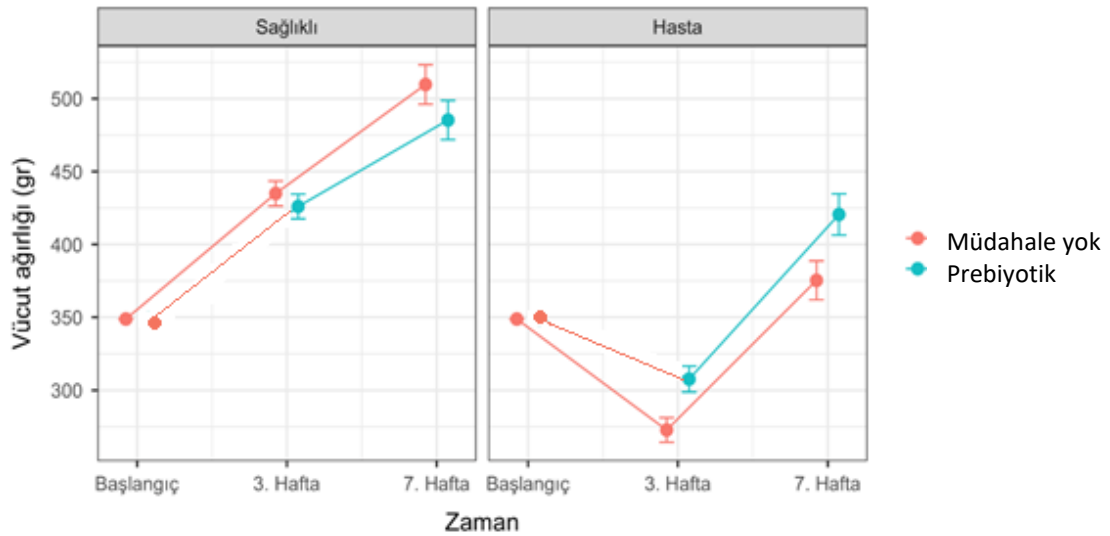
Deney hayvanlarının lisanslı üretici merkezden temin edilmesinden sonra tüm sıçanların (n=33) ağırlık kaydı çalışma başlangıcından başlanarak haftalık olarak tutulmuştur. Çalışmanın ilk aşaması olan kronik böbrek hasarının oluşturulması amacıyla 17 sıçan randomize olarak seçilerek bu sıçanlara 3 hafta boyunca oral gavaj yöntemiyle adenin verilmiştir. Hastalık oluşturma sürecini takip eden 4 haftalık dönemde ise hastalık oluşturulan sıçanlardan (n=17) 9 tanesi randomize olarak seçilerek normal yemle beslemenin yanısıra içme sularına prebiyotik ilavesi (5g/kg/gün) yapılmıştır. Hastalık oluşturulmuş sıçanlardan geriye kalan 8 tanesine ise yalnızca normal yem vermeye devam edilmiş, içme sularına prebiyotik ilavesi yapılmamıştır.

Kronik böbrek hasarı oluşturulmayan sağlıklı sıçanlar (n=16) ise ilk üç haftalık dönemde yalnızca normal yemle beslenmiş, takibindeki 4 haftalık süreçte ise sıçanların yarısı randomize olarak seçilerek normal yemle beslemenin yanısıra içme sularına prebiyotik ilavesi (5g/kg/gün) yapılmıştır.

Deney süresince sıçanlarda gözlenen vücut ağırlığı değişimi Şekil 4.1 ve Tablo 4.1'de gösterilmektedir. Deneyin kronik böbrek hasarı oluşturulduğu ilk üç haftalık döneminde her iki grubun da (HN ve HP) vücut ağırlığında azalma gözlenirken; prebiyotik müdahalesi yapılan dört haftalık sürede ise her iki grubun da vücut ağırlığında artış gerçekleşmiştir. Ancak prebiyotik verilen hasta grubun (HP) vücut ağırlığındaki artış (0-3.hafta:  $332,8 \pm 43,05$  g; 3-7.hafta:  $436,72 \pm 35,11$  g) prebiyotik müdahalesi yapılmayan hasta sıçanların (HN) vücut ağırlığındaki artıştan (0-3.hafta:  $264,5 \pm 27,37$  g; 3-7.hafta:  $370,1 \pm 52,60$  g) daha yüksek olduğu görülmüştür (p=0,05).

Başlangıç vücut ağırlıkları homojen olan sağlıklı gruptaki sıçanlardan 3.haftadan itibaren prebiyotik müdahalesine başlanan gruptaki (SP) vücut ağırlığı artışının (0-3.hafta:  $417,18 \pm 14,98$  g; 3-7.hafta:  $479,6 \pm 17,57$  g), prebiyotik

müdahalesi yapılmayan gruba (SN) göre (0-3.hafta:  $423,7 \pm 43,88$  g; 3-7.hafta:  $502,5 \pm 47,42$  g), daha az olduğu görülmektedir (Şekil 4.1). Ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p=0,07$ ).



**Şekil 4.1.** Sağlıklı ve hastalık oluşturulan sıçanların deney süresince vücut ağırlığı değişimleri.

**Tablo 4.1.** Grupların deney süresince vücut ağırlığı ve günlük yem tüketim miktarları.

		0-3. hafta	p	3-7. hafta	p
Vücut ağırlığı (g)	HN	$264,5 \pm 27,37^a$		$370,1 \pm 52,60^a$	
	HP	$332,8 \pm 43,05^b$	<0,001	$436,7 \pm 35,11^b$	<0,001
	SN	$423,7 \pm 43,88^c$		$502,5 \pm 47,42^c$	
	SP	$417,18 \pm 14,98^d$		$479,6 \pm 17,57^d$	
Yem tüketimi (g/gün)	HN	$16,2 \pm 3,44^a$		$25,5 \pm 4,35^a$	
	HP	$21,7 \pm 3,50^a$	<0,001	$27,8 \pm 4,31^{a,b}$	0,003
	SN	$31,0 \pm 3,12^b$		$32,6 \pm 2,14^b$	
	SP	$30,9 \pm 1,54^b$		$30,4 \pm 2,44^{a,b}$	

Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma (Ort.  $\pm$  SS) olarak verilmiştir.

\* $p<0,05$  (Kruskal-Wallis Hipotez Testi uygulanmıştır).

<sup>a, b, c, d</sup>: Grupların ikili karşılaştırmaları Mann-Whitney U testi ile yapılmıştır. Post-hoc olarak Bonferroni düzeltmesi yapıldığında ikili gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark olanlar farklı harflerle işaretlenmiştir.

Sağlıklı ve hastalık oluşturulan sıçanların deney süresince ortalama vücut ağırlıkları ve tükettikleri günlük yem miktarları Tablo 4.1’de gösterilmektedir. İlk 3 hafta ve son 4 hafta süresince tüm grupların vücut ağırlığı ve yem tüketimleri karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

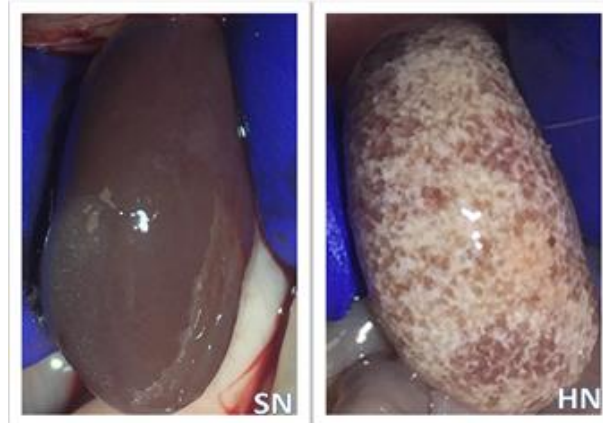
İlk 3 haftalık dönemde hastalık oluşturulan sıçanlarda yem tüketiminin sağlıklılara göre daha az olduğu görülmektedir. Grupların ikili karşılaştırılması yapıldığında HN-HP ve SN-SP grupları arasında fark yoktur; ilk üç haftalık dönemde prebiyotik müdahalesi olmadığından hasta ve sağlıklı grupların yem tüketimlerinin kendi aralarında benzer olması beklenen bir durumdur. Ancak HN-SN, HN-SP, HP-SN ve HP-SP gruplarının ilk 3 haftada ortalama günlük yem tüketimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ( $p<0,05$ ) (Tablo 4.1.).

Son 4 haftalık prebiyotik müdahalesinin yapıldığı dönemde gruplar arasında en yüksek yem tüketimi sağlıklı ve prebiyotik müdahalesi yapılmayan grupta (SN) iken en az yem tüketimi ise hasta ve prebiyotik müdahalesi yapılmayan grupta (HN) gözlenmiştir. Gruplar ikili karşılaştırıldığında sadece HN-SN gruplarının ortalama günlük yem tüketimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ( $p<0,05$ ). Prebiyotik müdahalesi hasta sıçanların yem tüketimleri üzerinde (HN-HP) fark yaratmadığı gibi; sağlıklı sıçanların da yem tüketimlerini istatistiki önemde etkilememiştir (SN-SP) (Tablo 4.1.).

#### **4.2. Sıçanların Böbrek Fonksiyon Göstergelerine Ait Bulguları**

Kronik böbrek hasarı oluşturmak amacıyla deneyin ilk 3 haftasında adenin uygulanan sıçanlardan toplanan böbrek dokularının makroskopik görüntüleri sağlıklı böbrek dokuları ile karşılaştırıldığında adenin kristallerinin doku birikimi çıplak gözle dahi gözlenebilmektedir (Şekil 4.2).





**Şekil 4.2.** Böbrek hasarı oluşturulan ve sağlıklı kontrol grubundaki sıçanlara ait böbrek dokularının makroskopik görüntüleri.

Deney sonunda tüm sıçanlardan toplanan serum örneklerinden üre ve kreatinin düzeyleri analiz edilerek böbrek fonksiyonları incelenmiştir (Tablo 4.2). Buna göre bütün grupların serum üre ( $p < 0,001$ ) ve kreatinin düzeyleri ( $p = 0,002$ ) arasında istatistiksel anlamlı fark vardır. Sağlıklı kontrol grup ile karşılaştırıldığında, KBH oluşturulan sıçanlarda serum üre ve kreatinin düzeyleri artmıştır. Bu durum KBH modellerinde gözlemlenen şiddetli glomerüler ve tübüler hasar ile uyumludur.

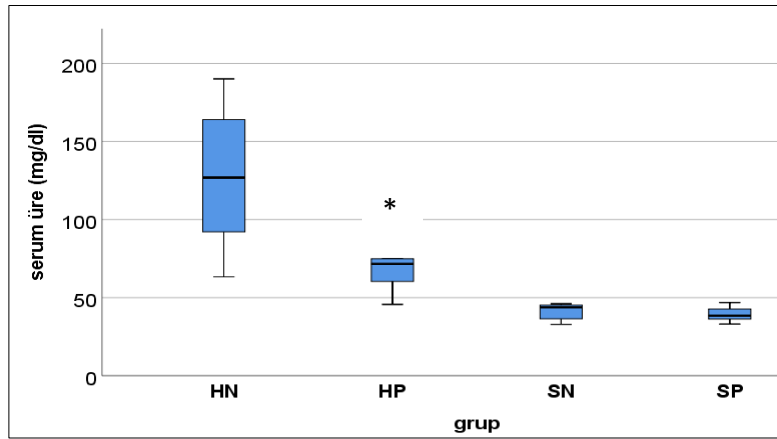
**Tablo 4.2.** Grupların böbrek fonksiyon göstergelerinin tanımlayıcı istatistikleri

		n	Ort. $\pm$ SS	Ortanca	ÇADA	En küçük	En büyük	p*
Serum üre (mg/dl)	HN	8	127,4 $\pm$ 45,77 <sup>a</sup>	126,9	73,48	63,3	190,1	<0,001
	HP	9	71,74 $\pm$ 17,73 <sup>b</sup>	71,6	26,15	45,7	100,1	
	SN	8	41,2 $\pm$ 5,19 <sup>c</sup>	43,8	9,50	32,9	46,1	
	SP	8	39,4 $\pm$ 4,52 <sup>c</sup>	38,5	6,90	33,1	46,9	
Serum kreatinin (mg/dl)	HN	8	1,3 $\pm$ 0,49 <sup>a</sup>	1,2	0,96	0,6	1,96	0,002
	HP	9	0,8 $\pm$ 0,15 <sup>a,b</sup>	0,9	0,26	0,6	1,03	
	SN	8	0,6 $\pm$ 0,22 <sup>a,b</sup>	0,6	0,43	0,4	0,9	
	SP	8	0,6 $\pm$ 0,27 <sup>b</sup>	0,46	0,11	0,4	1,2	

\* $p < 0,05$  (Kruskal-Wallis Hipotez Testi uygulanmıştır).

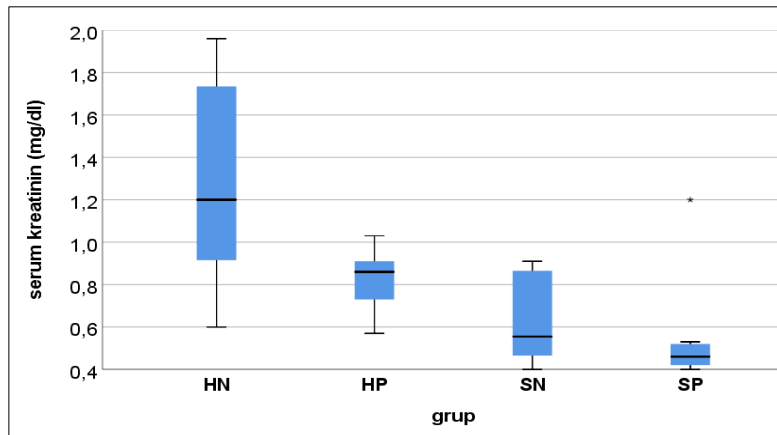
<sup>a, b, c</sup>: Grupların ikili karşılaştırmaları Mann-Whitney U testi ile yapılmıştır. Post-hoc olarak Bonferroni düzeltmesi yapıldığında ikili gruplarda istatistiksel anlamlı fark olanlar farklı harflerle işaretlenmiştir. ÇADA, çeyreklikler arası dağılım aralığı.

Grupların ikili karşılaştırılmaları yapıldığında serum üre düzeylerinde HN-HP, HP-SP, HP-SN, HN-SN ve HN-SP grupları arasında istatistiksel anlamlı fark varken SN ile SP arasında fark bulunmamıştır. Buna göre hasta grupta prebiyotik tüketimi serum üre düzeylerinde istatistiksel anlamlı azalma sağlamıştır. Prebiyotik verilen hasta grupta, müdahale yapılmayan hasta gruba göre serum üre düzeyinde %43,7 azalma vardır ( $p=0,012$ ). Diğer taraftan sağlıklı sıçanların serum üre düzeyi üzerinde prebiyotik müdahalesinin anlamlı bir etkisi olmamıştır ( $p=0,462$ ) (Şekil 4.3).



**Şekil 4.3.** Grupların serum üre değerleri (mg/dl).

Sıçanların serum kreatinin düzeyleri ikili gruplar arasında karşılaştırıldığında yalnızca HN ile SP arasında fark varken ( $p=0,003$ ) diğer grupların ikili karşılaştırmaları sonucunda anlamlı fark bulunmamıştır. Buna göre hasta ve sağlıklı grupta serum kreatinin düzeyi üzerinde prebiyotik ilavesinin anlamlı bir etkisi yoktur (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4.** Grupların serum kreatinin değerleri (mg/dl).

### 4.3. Serum Üremik Toksin Analizine Ait Bulgular

Deney sonunda tüm sıçanlardan toplanan serum örnekleri analiz edilerek bağırsak kaynaklı üremik toksinlerden p-cresol sülfat ve indoksil sülfat düzeyleri belirlenmiştir (Tablo 4.3). Buna göre bütün grupların serum p-cresol sülfat ( $p<0,001$ ) ve indoksil sülfat düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı bir fark vardır ( $p=0,04$ ).

**Tablo 4.3.** Grupların serum üremik toksin düzeylerinin tanımlayıcı istatistikleri

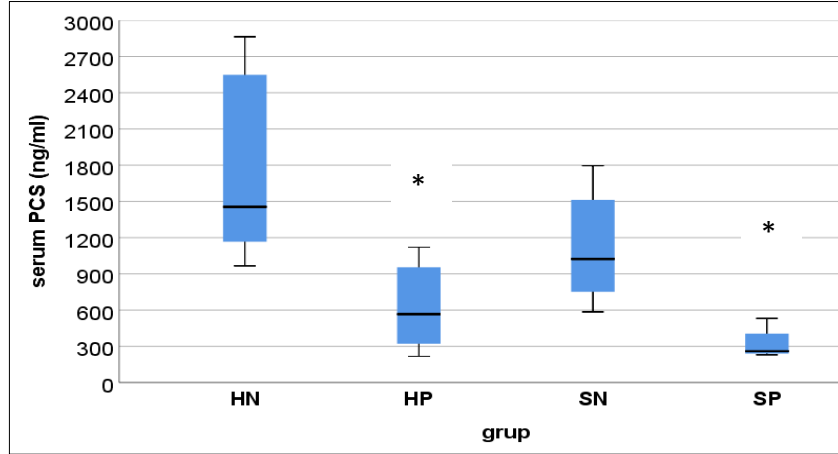
		n	Ort. $\pm$ SS	Ortanca	En küçük	En büyük	ÇADA	p*
Serum PCS (ng/ml)	HN	8	1771,1 $\pm$ 762,74 <sup>a</sup>	1455,3	966,1	2863,1	1503,8	<0,001
	HP	9	632,7 $\pm$ 356,57 <sup>b,c</sup>	356,6	217,5	1121,0	749,7	
	SN	8	1119,3 $\pm$ 468,30 <sup>a,b</sup>	1022,8	585,6	1795,4	913,8	
	SP	8	321,6 $\pm$ 114,32 <sup>c</sup>	260,0	229,8	531,6	188,5	
Serum IS ( $\mu$ g/ml)	HN	8	116,6 $\pm$ 23,73 <sup>a,b</sup>	110,9	88,0	162,8	30,4	0,038
	HP	9	121,9 $\pm$ 29,79 <sup>a</sup>	111,2	91,4	171,5	53,4	
	SN	8	95,3 $\pm$ 14,96 <sup>b</sup>	92,3	83,6	130,6	10,6	
	SP	8	100,0 $\pm$ 12,68 <sup>a,b</sup>	98,4	84,1	124,2	16,9	

\* $p<0,05$  (Kruskal-Wallis Hipotez Testi uygulanmıştır).

<sup>a, b, c</sup>: Grupların ikili karşılaştırmaları Mann-Whitney U testi ile yapılmıştır. Post-hoc olarak Bonferroni düzeltmesi yapıldığında ikili gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark olanlar farklı harflerle işaretlenmiştir.

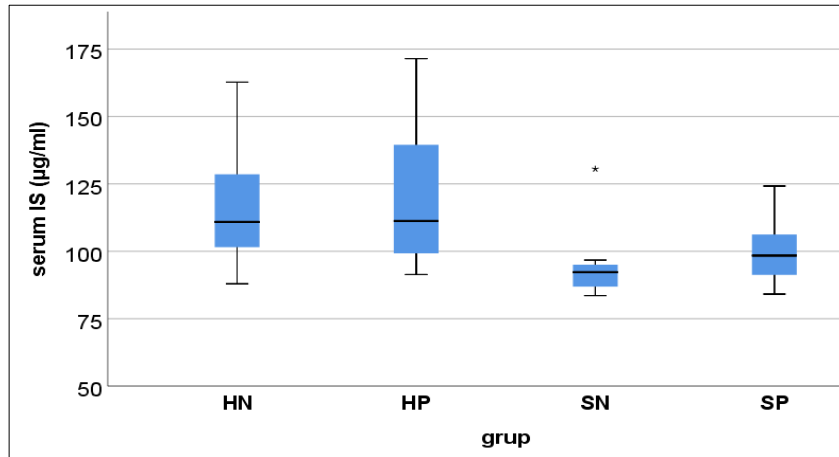
ÇADA, çeyreklikler arası dağılım aralığı.

Serum p-cresol sülfat düzeyleri ikili gruplar arasında karşılaştırıldığında HN-HP; HN-SP; SN-SP grupları arasında anlamlı fark vardır. Hasta grupta prebiyotik tüketimi serum p-cresol sülfat düzeyinde istatistiksel anlamlı azalma sağlamıştır ( $p=0,002$ ). Prebiyotik verilen hasta grupta, prebiyotik müdahalesi yapılmayan hasta gruba göre serum p-cresol düzeyinde %64,3 azalma vardır. Aynı zamanda sağlıklı sıçanlarda prebiyotik tüketimi de serum p-cresol düzeyinde %71,3 azalma sağlamıştır ( $p=0,001$ ) (Şekil 4.5).



**Şekil 4.5.** Grupların serum p-cresol sülfat (ng/ml) değerleri.

Serum indoksil sülfat düzeyleri, ikili gruplar arasında karşılaştırıldığında sadece HP ile SN grupları arasında istatistiksel anlamlı fark vardır. Buradan çıkarılacak sonuç; serum indoksil sülfat düzeylerinde gruplar arasındaki istatistiksel fark HP ile SN gruplarından kaynaklanmaktadır. Hasta grupta prebiyotik müdahalesinin serum indoksil sülfat düzeyi üzerinde anlamlı bir etkisi gözlenmemiştir. Aynı şekilde sağlıklı grupta da diyetle oligofruktozla zenginleştirilmiş inülin ilavesinin serum indoksil sülfat düzeyinde herhangi bir etkisi olmamıştır ( $p=0,208$ ) (Şekil 4.6).



**Şekil 4.6.** Grupların serum indoksil sülfat ( $\mu\text{g/ml}$ ) değerleri.

#### 4.4. Serum İnflamatuar Belirteçlerinin Analizine Ait Bulgular

Kronik böbrek yetmezliği oluşturulmuş ve sağlıklı sıçanlarda prebiyotik tüketiminin inflammatuar belirteçler üzerine etkisini incelemek amacıyla toplanan serum örneklerinden IL-6, IL-10 ve TNF- $\alpha$  düzeyleri analiz edilmiştir (Tablo 4.4). Analiz edilen inflammatuar belirteçlerden sadece serum IL-6 düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel öneme sahip anlamlı fark bulunmuştur (p=0,008).

Serum IL-6 düzeyleri, ikili gruplar halinde karşılaştırıldığında HN ile HP (p=0,001) ve HN ile SN (p=0,005) grupları arasında istatistiksel öneme sahip fark bulunmuştur. KBH oluşturulan grupta prebiyotik tüketimi serum IL-6 düzeyinde istatistiksel anlamlı azalmaya sebep olmuştur. Sağlıklı sıçanlarda ise prebiyotik müdahalesinin serum IL-6 düzeyi üzerinde anlamlı bir etki bulunmamıştır (Şekil 4.7).

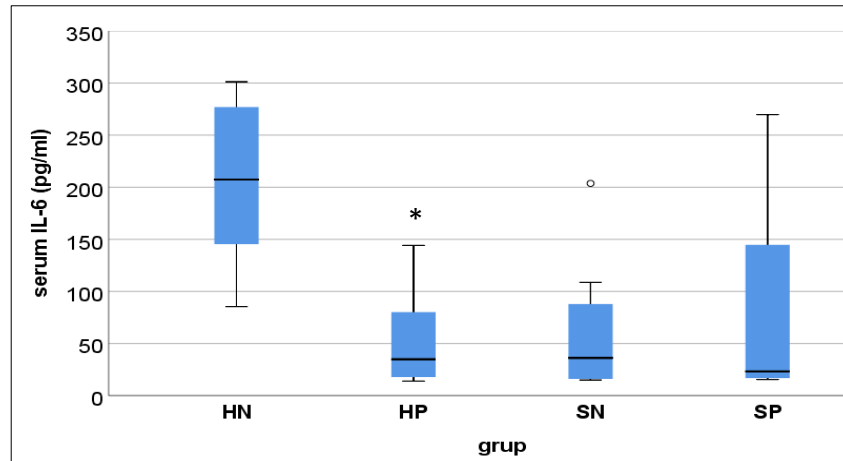
**Tablo 4.4.** Grupların serum inflammatuar belirteçlerinin tanımlayıcı istatistikleri

	n	Ort. $\pm$ SS	Ortanca	En küçük	En büyük	ÇADA	p*	
IL-6 (pg/ml)	HN	8	205,8 $\pm$ 76,80 <sup>a</sup>	207,4	85,5	301,2	135,9	0,008
	HP	9	57,6 $\pm$ 46,80 <sup>b</sup>	34,9	13,90	144,09	76,99	
	SN	8	62,4 $\pm$ 65,57 <sup>b</sup>	36,2	14,93	203,70	82,81	
	SP	8	81,8 $\pm$ 99,18 <sup>a,b</sup>	23,2	15,51	269,69	155,03	
IL-10 (pg/ml)	HN	8	103,8 $\pm$ 80,19	80,3	29,03	253,68	127,61	0,486
	HP	9	85,6 $\pm$ 91,69	67,4	22,37	316,54	70,02	
	SN	8	58,6 $\pm$ 26,52	54,8	32,01	115,87	27,91	
	SP	8	53,7 $\pm$ 34,03	43,4	22,99	121,69	51,17	
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	HN	8	12,1 $\pm$ 5,49	10,5	7,40	24,87	4,03	0,971
	HP	9	15,0 $\pm$ 9,69	10,5	6,78	36,88	12,18	
	SN	8	12,3 $\pm$ 3,71	11,7	8,63	19,85	5,12	
	SP	8	13,5 $\pm$ 5,12	12,7	6,78	20,47	9,50	

\*p<0,05 (Kruskal-Wallis Hipotez Testi uygulanmıştır).

<sup>a, b</sup>: Grupların ikili karşılaştırmaları Mann-Whitney U testi ile yapılmıştır. Post-hoc olarak Bonferroni düzeltmesi yapıldığında ikili gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark olanlar farklı harflerle işaretlenmiştir.

ÇADA, çeyreklikler arası dağılım aralığı.



**Şekil 4.7.** Grupların serum IL-6 (pg/ml) değerleri.

Sıçanların serum inflamatuvar belirteçleri ile serum PCS ve IS düzeyleri arasındaki ilişki Tablo 4.5’de gösterilmiştir. Serum PCS düzeyleri ile serum IL-6, IL-10 ve TNF- $\alpha$  düzeyleri arasında önemli bir ilişki bulunmamıştır. Serum IS düzeyleri ile IL-6 düzeyi arasında negatif düşük orta derece korelasyon gözlenmiştir ( $r=-0,381$ ,  $p=0,029$ ). Diğer inflamatuvar belirteçlerden IL-10 ve TNF- $\alpha$  düzeyleri ile serum IS arasında anlamlı bir ilişki belirlenmemiştir.

**Tablo 4.5.** Sıçanların serum üremik toksin ile inflamatuvar belirteç düzeyleri arasındaki ilişki

	Serum PCS		Serum IS	
	r	p	r	p
IL-6	0,174	0,332	-0,381*	0,029
IL-10	0,293	0,098	0,261	0,142
TNF- $\alpha$	0,003	0,987	-0,145	0,420

Pearson korelasyon testi uygulanmıştır.  
r: Pearson korelasyon katsayısı; \* $p<0,05$ .

#### 4.5. Böbrek Dokularında Görülen Histopatolojik Bulgular

Böbrek dokularında şekillenen histopatolojik değişiklikler; kristal birikimi, tübüler ve glomerüler hasar, interstisyel fibrozis ve glomerüler inflamasyon olarak sınıflanmıştır. Böbrek dokularındaki histopatolojik bulgular değerlendirilerek semikantitatif olarak (0= Yok, 1= hafif ve lokal, 2= orta şiddette, 3=yoğun ve yaygın, 4= çok yoğun ve yaygın) skorlanmış ve Tablo 4.6’da sunulmuştur.

Gereç ve yöntem bölümünde bahsedildiği üzere adeninle KBH modeli oluştururken kullanılan adenin; 2,8-dihidroksiadenin'e metabolize olarak proksimal tübüllerin epitel hücrelerinde kristalize olmaktadır. Bu kristallerin birikimi renal harabiyete yol açarak böbrek yetmezliği tablosu oluşturmaktadır. Adenin yöntemiyle hastalık oluşturulan ve prebiyotik müdahalesi yapılmayan HN grubunda kristal birikimi skoru, hastalık oluşturulan ve prebiyotik müdahalesi yapılan HP grubuna kıyasla daha yüksektir. Sağlıklı sıçanlarda böbrek harabiyeti oluşturulmadığı için SN ve SP grubunda kristal birikimi gözlenmemiştir (Tablo 4.6).

Tübüler hasar skoru ise hastalık oluşturulan ve prebiyotik müdahalesi yapılmayan HN grubunda HP grubuna kıyasla daha yüksektir. Sağlıklı ve prebiyotik müdahalesi yapılmayan SN grubunda 8 sıçandan 5'inde hafif ve lokal düzeyde tübüler hasar görülürken prebiyotik verilen sağlıklı (SP) 8 sıçandan 3'ünde hafif ve lokal düzeyde tübüler hasar görülmüştür (Tablo 4.6).

Glomerüler hasar skorunun prebiyotik verilen hasta grupta (HP), prebiyotik müdahalesi yapılmayan hasta gruba (HN) göre daha düşük olduğu semikantitatif olarak belirlenmiştir. Sağlıklı ve prebiyotik müdahalesi yapılmayan SN grubunda 8 sıçandan 3'ünde hafif ve lokal düzeyde glomerüler hasar görülürken prebiyotik verilen sağlıklı (SP) grupta glomerüler hasar görülmemiştir (Tablo 4.6).

Glomerüler inflamasyon şiddetinin prebiyotik müdahalesi yapılmayan hasta grupta (HN), prebiyotik verilen gruba (HP) göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Sağlıklı sıçanlardan oluşan her iki grupta da (SN ve SP) glomerüler inflamasyon bulgusu bulunmamaktadır (Tablo 4.6).

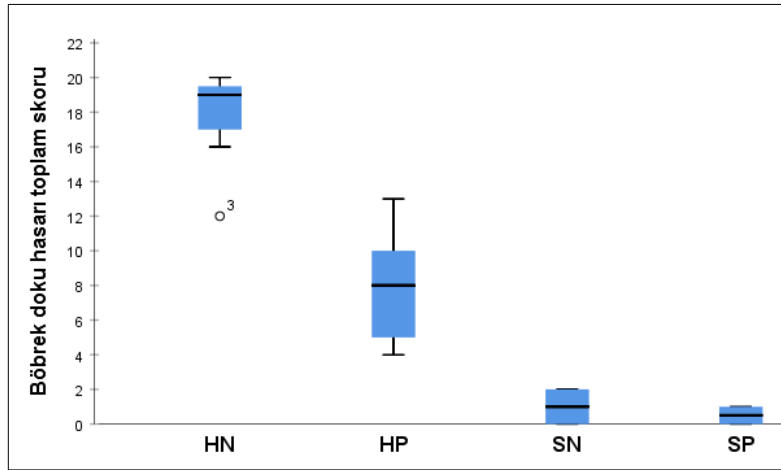
Kronik böbrek hasarının bir diğer göstergesi olan interstisyel fibrozis bulguları değerlendirildiğinde prebiyotik verilen hasta sıçanlarda, prebiyotik müdahalesi yapılmayanlara göre daha hafif şiddette olduğu görülmüştür. Sağlıklı ve prebiyotik müdahalesi yapılmayan SN grubunda interstisyel fibrozis bulgusu yokken prebiyotik verilen sağlıklı (SP) grupta bulunan 8 sıçandan sadece 1'inde hafif ve lokal düzeyde gözlenmiştir (Tablo 4.6).

**Tablo 4.6.** Grupların böbrek dokularında şekillenen histopatolojik değişiklikler ve şiddetleri

Grup	Kristal birikimi	Tübüler hasar	Glomerüler hasar	Glomerüler inflamasyon	İnterstisyel fibrozis	Toplam skor
HN1	2	4	3	3	4	16
HN2	4	4	4	4	4	20
HN3	1	2	3	3	3	12
HN4	3	4	4	4	4	19
HN5	4	3	4	3	4	18
HN6	4	4	4	4	4	20
HN7	3	4	4	4	4	19
HN8	4	4	4	4	3	19
HP1	2	1	1	2	1	7
HP2	1	2	1	2	2	8
HP3	0	1	1	2	1	5
HP4	1	2	2	2	3	10
HP5	1	3	2	4	3	13
HP6	2	3	2	3	3	13
HP7	0	1	1	2	1	5
HP8	1	2	2	2	3	10
HP9	0	1	1	1	1	4
SN1	0	1	1	0	0	2
SN2	0	1	1	0	0	2
SN3	0	1	0	0	0	1
SN4	0	1	0	0	0	1
SN5	0	0	0	0	0	0
SN6	0	0	0	0	0	0
SN7	0	0	0	0	0	0
SN8	0	1	1	0	0	2
SP1	0	1	0	0	0	1
SP2	0	1	0	0	0	1
SP3	0	0	0	0	0	0
SP4	0	1	0	0	0	1
SP5	0	0	0	0	0	0
SP6	0	0	0	0	0	0
SP7	0	0	0	0	0	0
SP8	0	0	0	0	1	1

Semi-kantitatif skorlama; skor 0: %0 (yok), skor 1: <%25 (hafif ve lokal), skor 2: %25-50 (orta şiddet), skor 3: %50-75 (yoğun ve yaygın), skor 4: >%75 (çok yoğun ve yaygın) olarak değerlendirilmiştir.

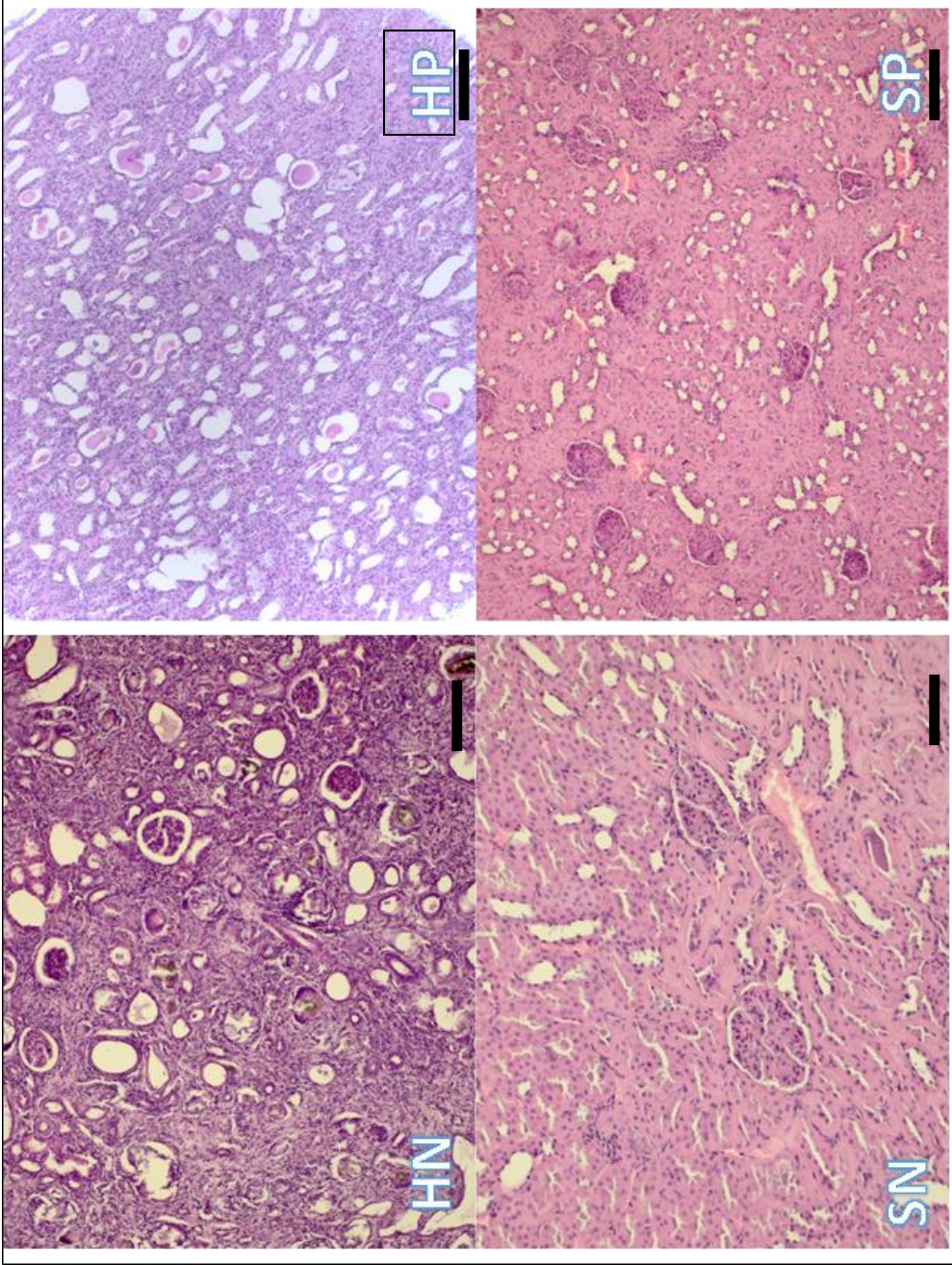




**Şekil 4.8.** Grupların böbrek dokularındaki histopatolojik değişikliklerin toplam skoru

Deney grupların böbrek dokularındaki histopatolojik değişikliklerin toplam skoru karşılaştırıldığında prebiyotik verilen hasta sıçanlarda ( $8,3 \pm 3,39$ ), prebiyotik müdahalesi yapılmayanlara ( $17,9 \pm 2,70$ ) göre daha düşük olduğu görülmektedir. Sağlıklı sıçanlarda da aynı derecede olmasa da prebiyotik verilenlerde ( $0,5 \pm 0,54$ ) toplam hasar skoru prebiyotik müdahalesi yapılmayanlara ( $1,0 \pm 0,93$ ) göre daha düşüktür (Şekil 4.8). Buna göre bütün grupların böbrek dokularının histopatolojik değişiklik toplam skoru arasında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p < 0,001$ ). Grupların ikiyeşerli karşılaştırmaları yapıldığında sadece SN-SP grupları arasında önemli fark bulunmazken ( $p = 0,258$ ), diğer tüm gruplar arasında istatistiksel öneme sahip anlamlı fark bulunmuştur ( $p < 0,001$ ).

Adenin yöntemiyle hastalık oluşturulan ve prebiyotik müdahalesi yapılmayan HN grubuna ait böbrek dokularında genel olarak; korteksten başlayarak medullaya doğru uzanan, kollajen zengin ve az miktarda yangı hücreleriyle karışık fibrozis ile karakterize bulgular gözlenmiştir (Şekil 4.9). Bazı olgularda korteksin yarısından fazlasında, fonksiyonel yapı (glomerulus, tübül ve damar) içermeyen fibrozis gözlenmiştir. Bazı olgularda sağlam kalan tübüller ileri derecede kistik ve dilate, atrofik ve lümenlerinde dökülmüş epitel hücrelerine yönelik bulgular gözlenmiştir. Hastalık oluşturulan ve prebiyotik müdahalesi yapılmayan HN grubunda daha çok medullar bölgede olmak üzere, yoğun hiyalin silindirleri ve tübüler kalsifikasyon izlenmiştir. Glomeruluslarda kapiller yumak atrofisi ve Bowman pariyetal yaprağında



**Şekil 4.9.** Deneysel grupların böbrek dokularında oluşan histopatolojik değişiklikler. HE boyama Bar= HN, HP, SP; 220µm, SN;100 µm.

kalınlaşma, şiddetli olgularda glomeruloskleroza rastlanmıştır. Kortikal bölgede, dejenerere ve nekrotik tübülüs lümenlerinde koyu kahverengi ışınal çizgilerle yoğun kristal yapılara rastlanmıştır. Fibrozisin yoğun olduğu alanlarda, kortikal çok sayıda çöküntüler gözlenmiştir (Şekil 4.9).

Hastalık oluşturulan ve prebiyotik müdahalesi yapılan HP grubunda genel olarak histopatolojik görünüm böbrek korteksinde multifokal alanlar halinde fibrozisin HN grubuna göre daha hafif olduğu ve tamir faaliyetlerine yönelik makrofaj ve polimorf nükleer lökositlerin ön planda olduğu gözlenmiştir. İki olguda (HP5 ve HP6), HP grubu içindeki diğer olgulara göre subkapsüler bölgeden başlayarak pelvis renalise kadar kordonlar şeklinde ilerleyen tubüointerstisyel fibrozisin daha şiddetli olduğu gözlenmiştir. HP grubunda kristaloid yapılara- eğer varsa- fokal inflamasyonla birlikte tübül lümenlerinde ve oldukça nadiren rastlanmıştır. Tübüler epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon, tübüler atrofi ile çevrelerinde fibrozis gözlenirken; genel bulgu çevrede sağlam kalan tübüllerin rejeneratif faaliyeti yönünde olmuştur. Dolayısıyla yüksek oranlarda lümeni döşeyen prizmatik epitel görünümünde, hiperplazik tiroidizasyon alanlarına rastlanmıştır. Fokal fibrotik alanlarda glomeruloskleroza yanısıra, glomerular kapiller yumağın hiperselüler görünümü, fenestrasyon, Bowman kapsülünün pariyetal yaprağında değişen derecelerde kalınlaşma gözlenmiştir (Şekil 4.9).

Deney gruplarını oluşturulan sıçanların serum üremik toksinleri ile böbrek dokularında şekillenen histopatolojik değişiklik skorları arasındaki ilişki Tablo 4.7’de verilmiştir. Serum PCS düzeyleri ile tübüler ( $r=0,402$ ;  $p=0,020$ ), glomerüler ( $r=0,465$ ;  $p=0,006$ ) ve toplam hasar skorları ( $r=0,411$ ;  $p=0,018$ ) arasında pozitif orta derecede korelasyon belirlenmiştir. Serum PCS düzeyleri ile kristal birikimi, glomerüler inflamasyon ve interstisyel fibrozis skorları arasında anlamlı bir ilişki belirlenmemiştir ( $p \geq 0,05$ ).

**Tablo 4.7.** Sıçanların serum üremik toksin düzeyleri ile böbrek dokularında şekillenen histopatolojik değişiklik skorları arasındaki ilişki

	Serum PCS		Serum IS	
	r	p	r	p
<b>Kristal birikimi</b>	0,270	0,129	0,448**	0,009
<b>Tübüler hasar</b>	0,402*	0,020	0,393*	0,024
<b>Glomerüler hasar</b>	0,465**	0,006	0,371*	0,033
<b>Glomerüler inflamasyon</b>	0,332	0,059	0,445**	0,009
<b>İnterstisyel fibrozis</b>	0,282	0,112	0,420*	0,015
<b>Toplam skor</b>	0,411*	0,018	0,450**	0,009

Spearman korelasyon testi uygulanmıştır.

r: Spearman korelasyon katsayısı; \*p<0,05 \*\*p<0,001

Sıçanların serum IS düzeyleri ile tübüler (r=0,393; p=0,024) ve glomerüler (r=0,371; p=0,033) hasar skorları arasında pozitif düşük-orta derece korelasyon tespit edilmiştir. Ayrıca serum IS düzeyleri ile kristal birikimi (r=0,448; p=0,009), glomerüler inflamasyon (r=0,445; p=0,009), interstisyel fibrozis (r=0,420; p=0,015) ve toplam hasar skorları (r=0,450; p=0,009) arasında pozitif orta derecede korelasyon bulunmaktadır.

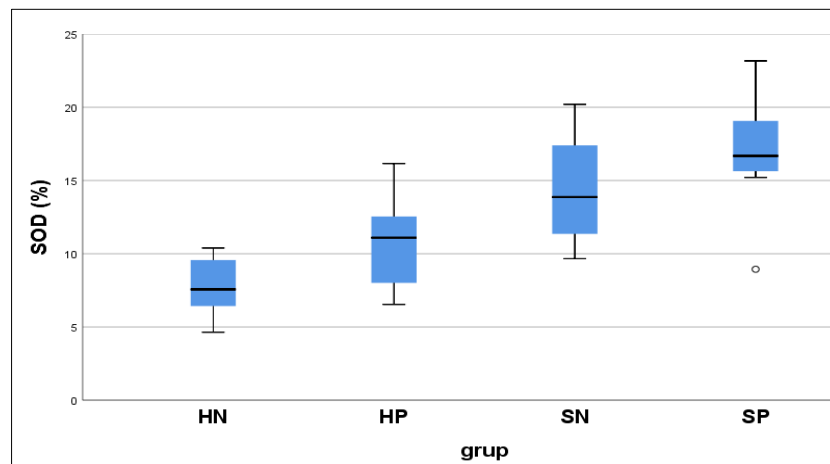
#### 4.6. Böbrek Dokularında Antioksidan Parametrelere Ait Bulgular

Böbrek dokuları SOD ve GPx olmak üzere her iki enzimatik aktivite yönünden değerlendirildiğinde proksimal tübül epitellerinin değişen derecelerde immünoreaktivite gösterdiği, yer yer lümende homojen boyanmalarla birlikte dejenere epitel boyanmalarının daha düşük seviyede olduğu gözlenmiştir.

Hasta ve prebiyotik eklenmeyen (HN) grupta tübulointerstisyel fibrozis ve yangı hücrelerinin bulunduğu odaklar hemen hemen hiç SOD ve GPx aktivitesi göstermezken, kısmen sağlam kalan tübüllerde tek tek sitoplazmik tübül epitel boyanmalarına rastlanmıştır. Bu boyanmaların genel olarak daha solgun renkte olduğu gözlenmiştir. Hasta sıçanlardan oluşan her iki grupta (HN ve HP) ortak bulgu olarak rejenera tübül epitellerinde yoğun ve diffüz boyanmalar dikkat çekmektedir. Glomerüler boyanmaya ise hiçbir grupta rastlanmamıştır. Sonuç olarak HP grubunda

kortekste daha yoğun olmak üzere medullar bölge konnektif ve kollektif tübül epitellerinde yoğun ve diffüz boyanma gözlenmiştir.

Böbrek dokularında SOD immunoreaktivitesinin kantitatif histomorfometrik analizi sonuçlarına göre tüm gruplar arasında SOD enzim aktivitesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (Şekil 4.10) ( $p=0,001$ ). Böbrek dokularında SOD immünoperoksidaz boyama sonuçlarına göre antioksidan enzim aktivitesi en yüksekten en düşüğe sırasıyla SP, SN, HP ve HN şeklindedir.

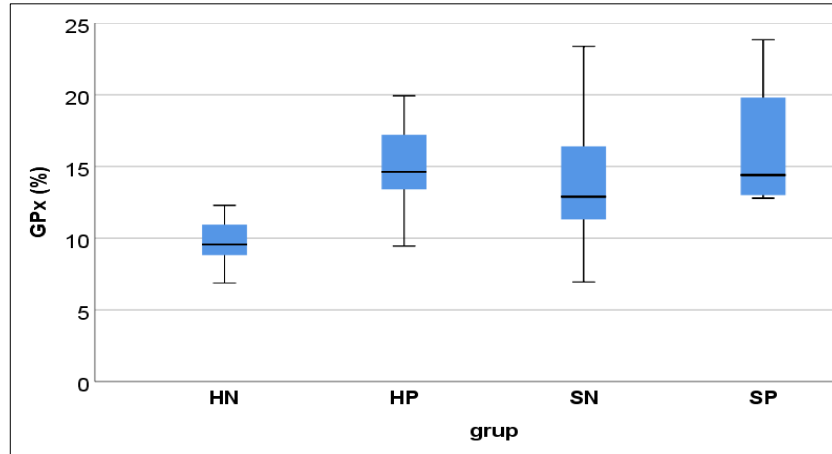


**Şekil 4.10.** Böbrek dokularında süperoksit dismutaz pozitif boyanma yüzdeleri.

Grupların ikişerli karşılaştırmaları yapıldığında SOD enzim aktivitesi açısından HP ile SP ( $p=0,007$ ), HN ile SN ( $p=0,002$ ) ve HN ile SP ( $p=0,002$ ) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Ancak SOD enzim aktivitesi açısından HN ile HP ve SN ile SP grupları arasında anlamlı fark bulunmamaktadır. Buna göre hasta gruptaki sıçanlarda, prebiyotik müdahalesinin SOD aktivitesi üzerine istatistiksel öneme sahip etkisi bulunmamıştır. Ayrıca prebiyotik müdahalesinin SOD aktivitesi üzerine olumlu etkisi sağlıklı grupta istatistiksel olarak anlamlı olmasa da prebiyotik verilen sağlıklı grupta enzim aktivitesinin prebiyotik ilavesi yapılmayan gruba göre daha yüksek olduğu görülmüştür.

Dört deney grubuna ait böbrek dokularının kantitatif histomorfometrik analizi sonucunda hesaplanan glutasyon peroksidazın boyanma oranları arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur (Şekil 4.11) ( $p=0,004$ ). Böbrek dokularında GPx

immünoperoksidaz boyama sonuçlarına göre antioksidan enzim aktivitesi en yüksekten en düşüğe sırasıyla SP, HP, SN ve HN şeklindedir. Grupların ikişerli karşılaştırmaları yapıldığında HN ile HP ( $p=0,007$ ) ve HN ile SP ( $p=0,001$ ) grupları arasındaki fark istatistiksel anlamlı bulunmuştur. Buna göre hasta gruptaki sıçanlarda prebiyotik müdahalesi GPx aktivitesini artırmıştır.



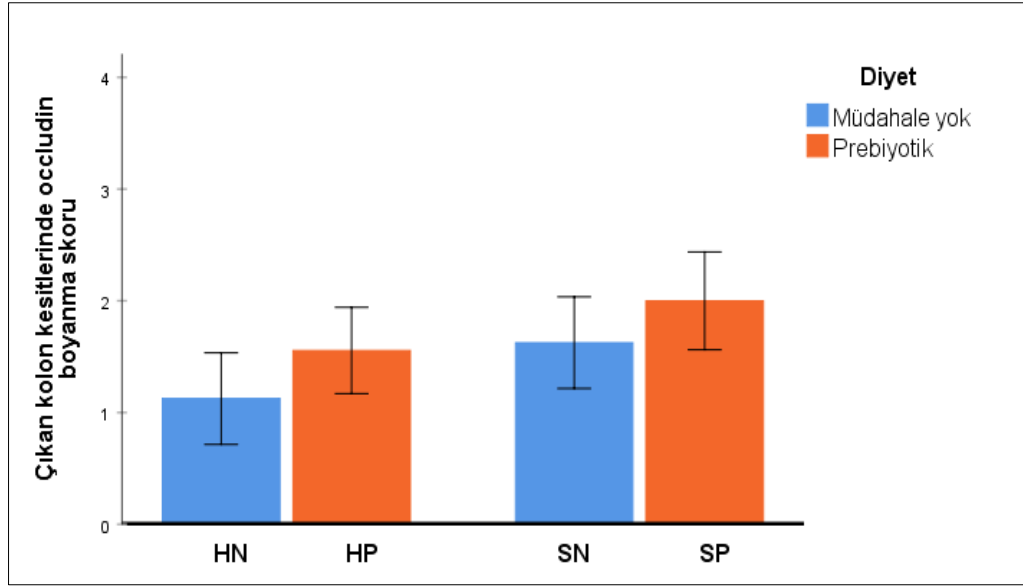
**Şekil 4.11.** Böbrek dokularında glutatyon peroksidaz pozitif boyanma yüzdeleri.

#### 4.7. Kolon Dokularında Sıkı Bağlantı Proteinlerinin İmmünohistokimyasal Analiz Bulguları

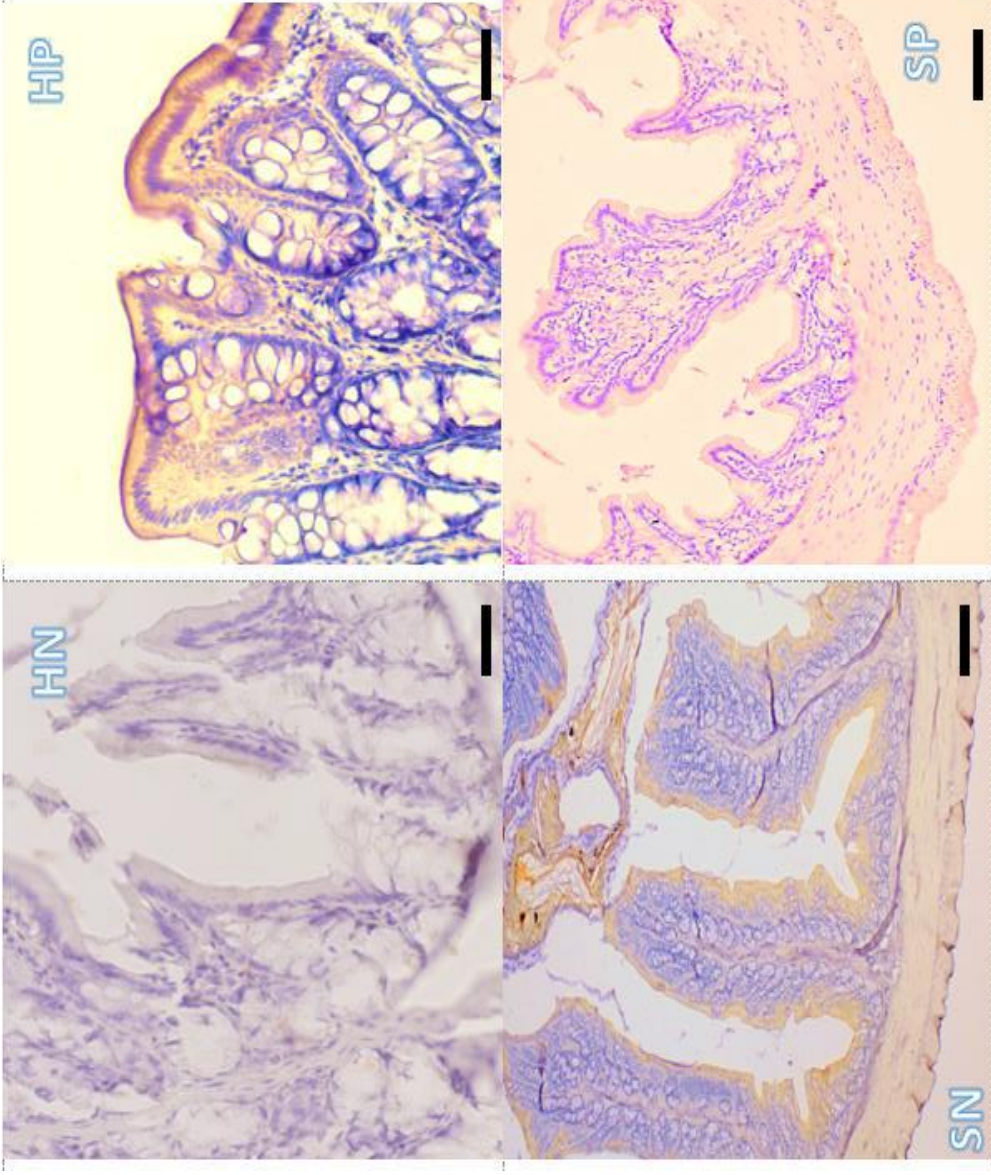
Tüm gruplardaki sıçanlara ait kolon dokularından hem çıkan hem de inen kolon kesitleri, sıkı bağlantı proteinlerinden occludin ve claudin-1 boyanmaları bakımından semikantitatif olarak değerlendirilmiştir. Değerlendirmede 0= yok, 1= hafif ve lokal, 2= orta şiddette, 3= yoğun ve yaygın, 4= çok yoğun ve yaygın boyanma olarak derecelenmiştir.

Hasta grupta prebiyotik ilavesi yapılan HP grubuna ait çıkan kolon dokularında immünohistokimyasal değerlendirme yapıldığında occludin boyanmalarının HN grubuna göre daha yoğun şiddette olduğu gözlenmiştir. Sağlıklı sıçanlara ait çıkan kolon kesitleri değerlendirildiğinde, prebiyotik verilen SP grubunda occludin boyanmalarının SN grubuna göre daha yoğun olduğu görülmüştür (Şekil 4.12 ve Şekil 4.13). Ancak hem hasta hem de sağlıklı grupta prebiyotik tüketim durumlarına göre kolon kesitlerindeki occludin boyanma skoru

ortalamalarının istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermediği sonucuna varılmıştır ( $p=0.055$ ). Sıçanların hasta/sağlıklı olma durumlarının ise çıkan kolon kesitlerindeki occludin boyanma skoru ortalamaları üzerinde anlamlı fark oluşturduğu görülmüştür ( $p=0,026$ ).



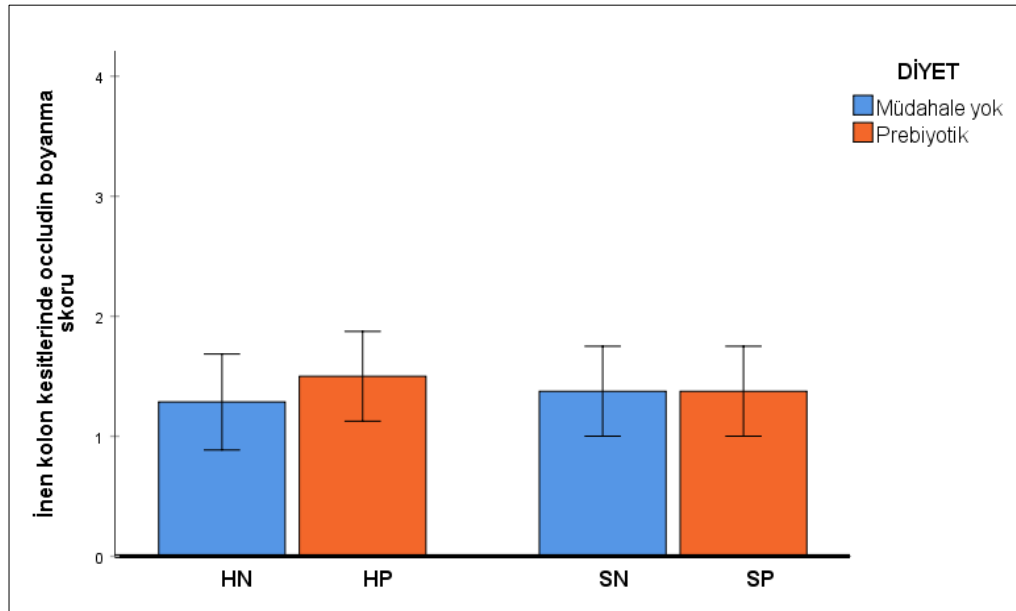
**Şekil 4.12.** Çıkan kolon kesitlerinde occludin proteininin immünohistokimyasal skorlaması.



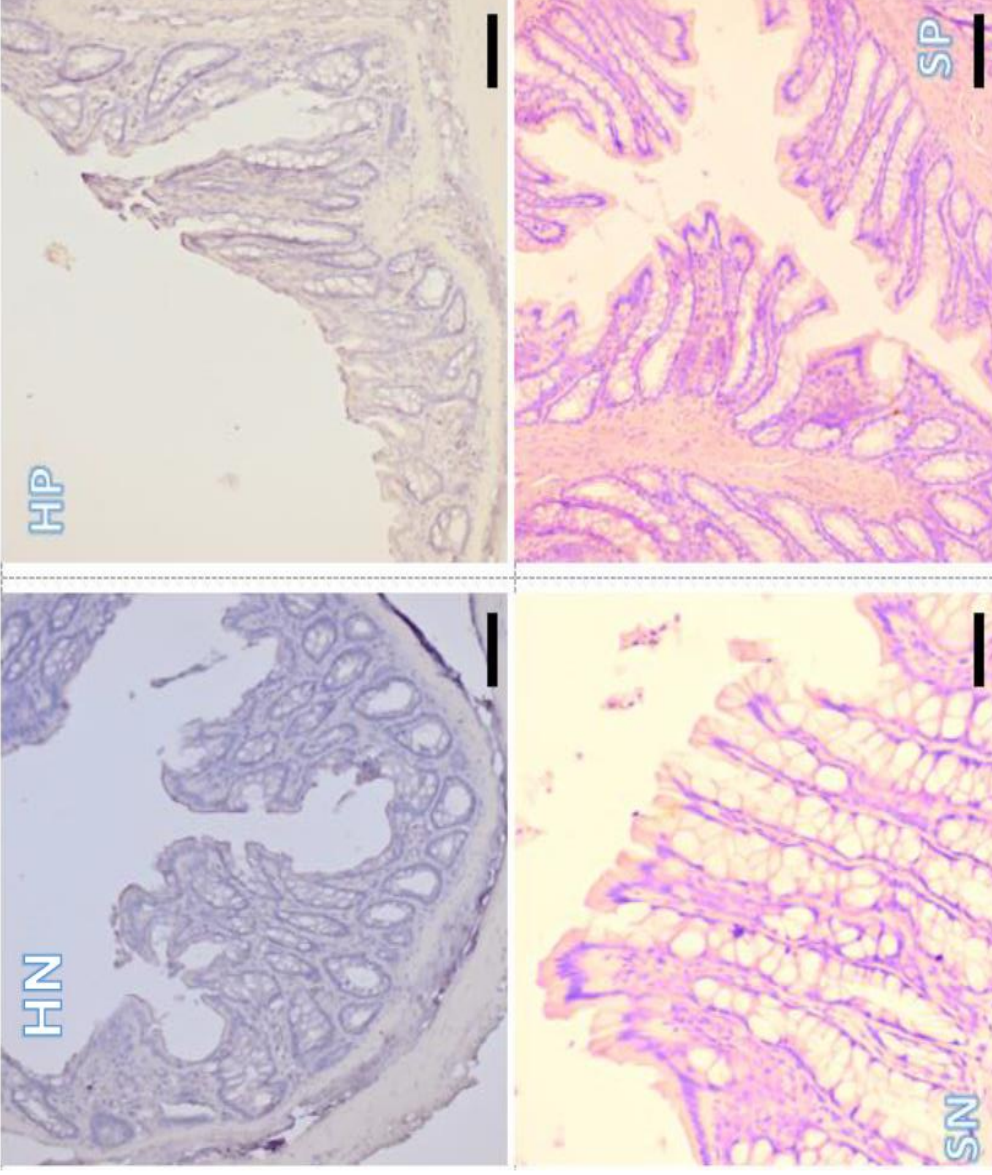
**Şekil 4.13.** Çıkan kolon kesitlerinde occludin boyanmaları, indirekt immuno-peroksidaz test, anti-occludin antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama. Bar=HN, HP 90 µm, SN, SP 180 µm.



Hasta veya sağlıklı olma durumunun sıçanlara ait inen kolon kesitlerindeki occludin protein boyanmaları açısından anlamlı etkisi yoktur ( $p=0,924$ ). Sağlıklı sıçanlara ait inen kolon kesitleri incelendiğinde occludin boyanmaları açısından SN ve SP grupları arasında fark bulunmamaktadır (Şekil 4.14 ve Şekil 4.15). Hasta grupta prebiyotik ilavesi yapılan HP grubuna ait inen kolon dokularında immünohistokimyasal değerlendirme yapıldığında occludin boyanma skorunun HN grubundan yüksek olduğu gözlenmiştir. Ancak hasta ve sağlıklı sıçanlarda prebiyotik tüketiminin sıçanlara ait inen kolon kesitlerindeki occludin protein düzeylerine etkisi anlamlı değildir ( $p=0,568$ ).

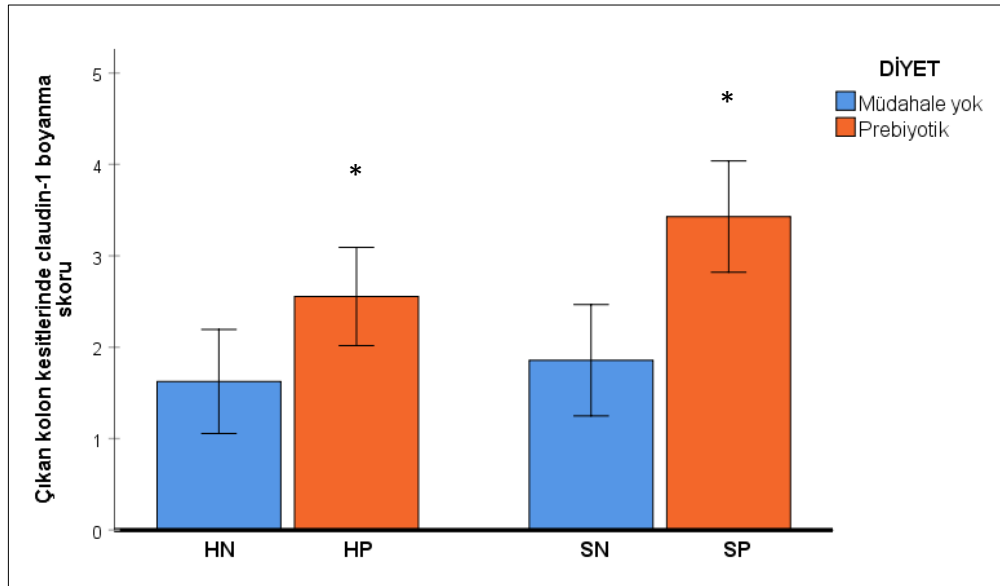


**Şekil 4.14.** İnen kolon kesitlerinde occludin proteininin immünohistokimyasal skorlaması.

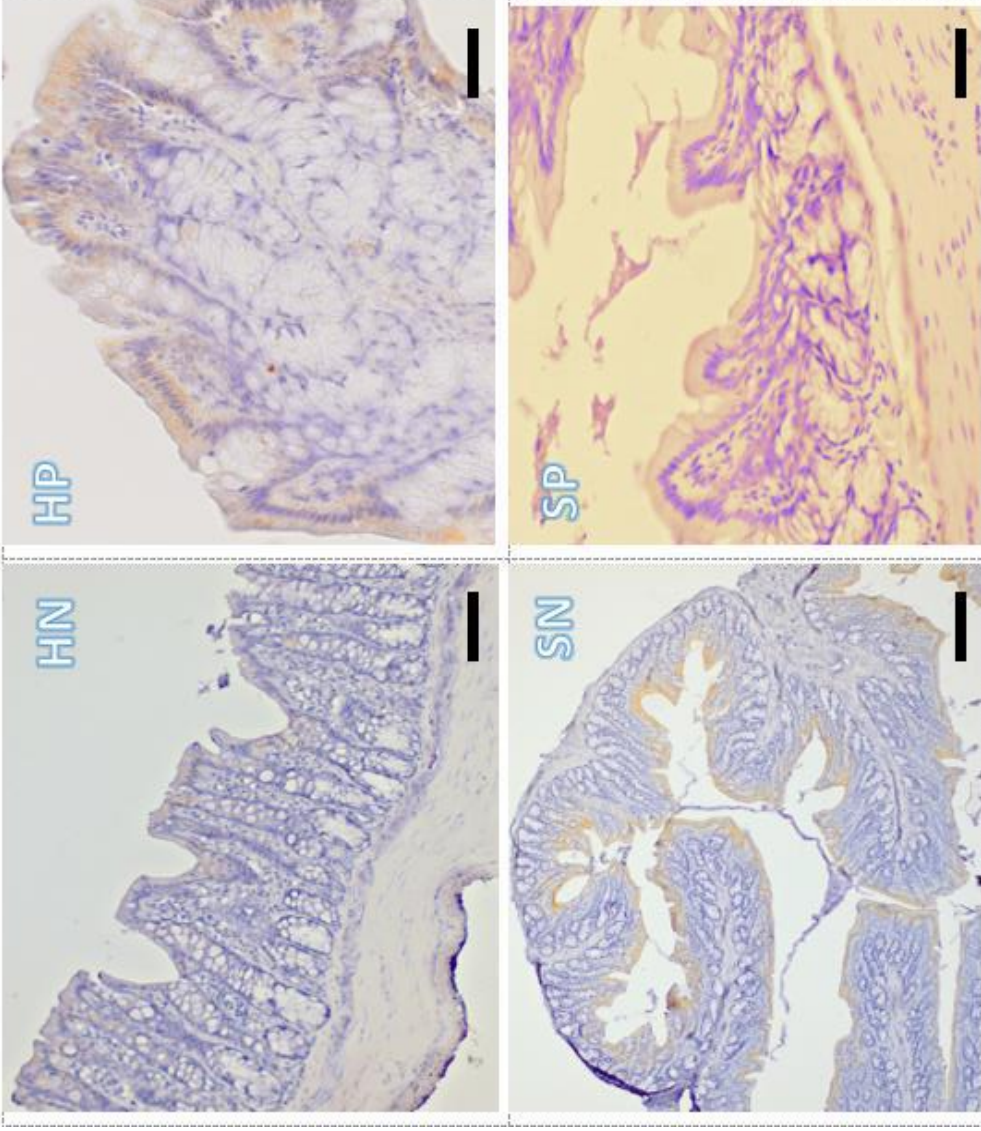


**Şekil 4.15.** İnen kolon kesitlerinde occludin boyanmaları. İndirekt immunoperoksidaz test, anti-occludin antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama. Bar= HN, HP 220 µm, SN, SP 90 µm.

Hasta sıçanlarda prebiyotik ilavesi yapılan HP grubunda çıkan kolonda claudin-1 boyanmaları immünohistokimyasal olarak değerlendirildiğinde HN grubuna göre daha yoğun şiddette olduğu gözlenmiştir. Sağlıklı sıçanlarda da çıkan kolon kesitlerinde prebiyotik verilen SP grubunda claudin-1 boyanmalarının SN grubuna göre daha yoğun olduğu görülmüştür (Şekil 4.16 ve Şekil 4.17). Hem hasta hem de sağlıklı grupta sıçanların prebiyotik tüketim durumlarına göre kolon kesitlerindeki claudin-1 boyanma skoru ortalamalarının istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği sonucuna varılmıştır ( $p < 0.001$ ). Sıçanların hasta/sağlıklı olma durumlarının ise çıkan kolon kesitlerinde claudin-1 boyanma skoru ortalamaları üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı görülmüştür ( $p = 0,062$ ).

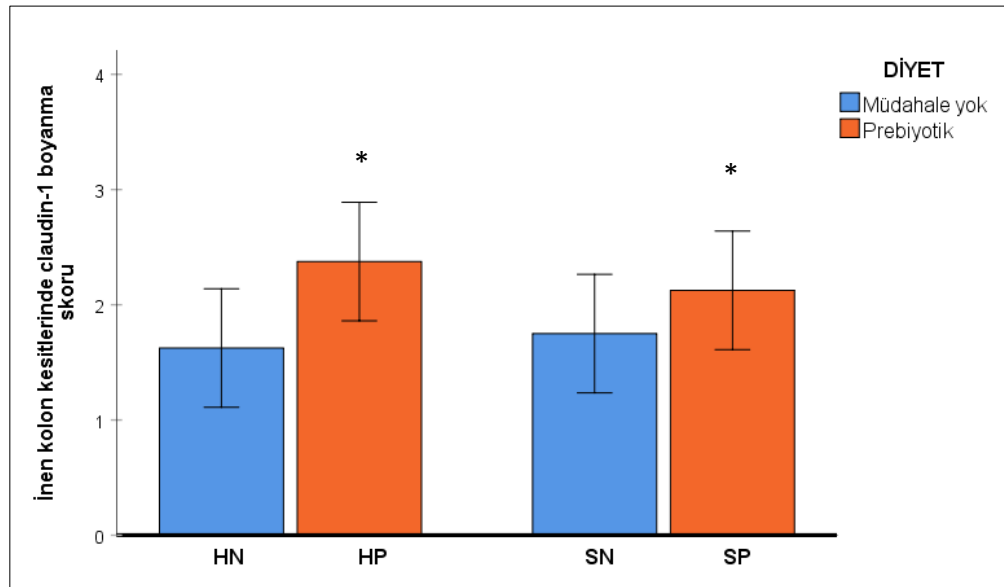


**Şekil 4.16.** Çıkan kolon kesitlerinde claudin-1 proteininin immünohistokimyasal skorlaması.

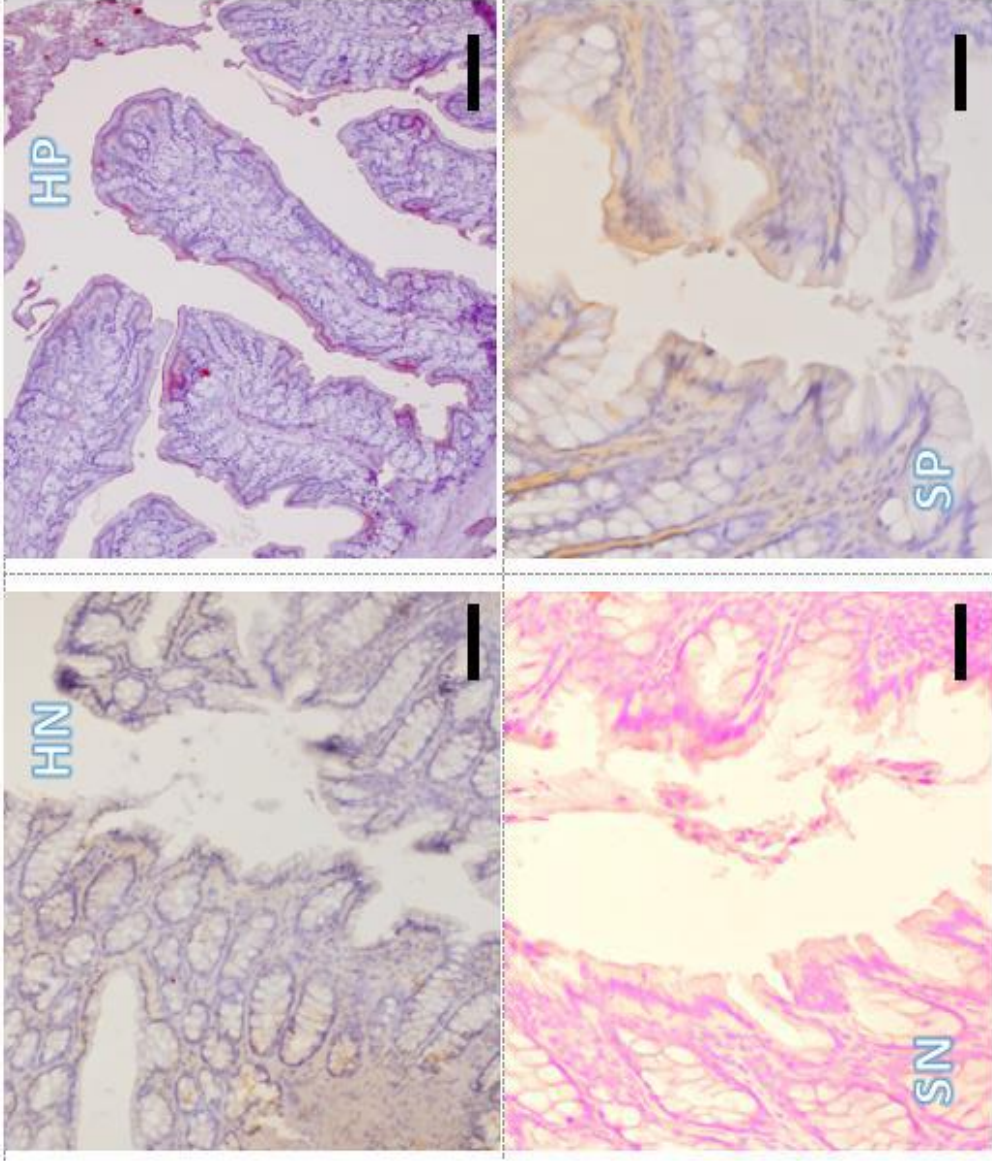


**Şekil 4.17.** Çıkan kolon kesitlerinde claudin-1 boyanmaları, indirekt immunoperoksidaz test, anti-occludin antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama. Bar= SN 280 µm, HP, SP 160 µm, SN, 220 µm.

İnen kolon kesitlerinin immünohistokimyasal incelemesi yapıldığında hasta sıçanlarda prebiyotik müdahalesi yapılan grupta (HP) claudin-1 boyanma düzeylerinin prebiyotik verilmeyen hasta gruba (HN) göre daha yoğun ve yaygın şiddette olduğu görülmüştür. Sağlıklı sıçanlarda da prebiyotik müdahalesi sonucu inen kolon kesitlerinde claudin-1 protein düzeylerinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.18 ve Şekil 4.19). Sıçanlarda hasta/sağlıklı olma durumu inen kolon kesitlerinde claudin-1 boyanma skoru ortalamaları üzerinde anlamlı bir etkisi yoktur ( $p=0,805$ ). Ancak prebiyotik müdahalesi yapılma durumuna göre sıçanlara ait inen kolon kesitlerinde claudin-1 boyanma skoru ortalamaları anlamlı fark göstermektedir ( $p=0,033$ ).



**Şekil 4.18.** İnen kolon kesitlerinde claudin-1 proteininin immünohistokimyasal skorlaması.



**Şekil 4.19.** İnen kolon kesitlerinde claudin-1 boyanmaları, indirekt immunoperoksidaz test, anti-occludin antikor, Mayer's hematoksilen karşıt boyama. Bar= HN 220 µm, HP 280 µm, SN,SP 100 µm.

## 5. TARTIŞMA

KBH'da böbrek fonksiyonunun azalmasıyla vücut sıvılarında biriken üremik retansiyon solütlerinin birçok biyokimyasal ve fizyolojik etkileri vardır. Bu etkiler direkt ya da indirekt olarak etki göstererek inflamasyona, bağırsak disbiyozisine, bakteri translokasyonuna, inflamasyona ve KBH progresyonuna sebep olmaktadır (21). Bu çalışmada adenin maruziyetiyle kronik böbrek hastalığı modeli oluşturulmuş Sprague Dawley cinsi sıçanlarda prebiyotik tüketiminin bağırsak kaynaklı üremik toksinler ve hastalığın progresyonuna etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen veriler, bulgular bölümüne uyumlu olacak şekilde yedi bölümde tartışılmıştır.

Birinci bölümde sıçanların deney süresince vücut ağırlıkları ve yem tüketimlerindeki değişiklikler; ikinci bölümde böbrek fonksiyon göstergeleri; üçüncü bölümde bağırsak kaynaklı üremik toksin düzeyi; dördüncü bölümde inflamatuvar belirteçler; beşinci bölümde böbrek dokularında meydana gelen histopatolojik değişiklikler; altıncı bölümde böbrek dokularında antioksidan parametre düzeyleri; yedinci bölümde ise kolon dokularında sıkı bağlantı protein düzeyine ait veriler değerlendirilmiştir.

### 5.1. Deney Süresince Sıçanların Vücut Ağırlığı ve Yem Tüketimi Değişimleri

KBH'nin klinik göstergelerinden biri de anoreksiya, tat değişiklikleri, bulantı ve kusma gibi gastrointestinal semptomlardır (21). Anoreksiya, enerji ve protein alımını azaltarak malnütrisyon ve kaşeksiye yol açmaktadır (144). KBH'da anoreksiya patogenezinin; orta molekül ağırlıklı üremik toksinler ve IL-6, TNF- $\alpha$  gibi inflamatuvar sitokinlerin yüksek serum düzeyleri, leptin ve ghrelin gibi hormonlar ve nöropeptitler ile ilişkili olduğu öne sürülmektedir (144, 145). Başlıca anoreksijenik bileşik olan leptin, böbrekler yoluyla atılır. Deneysel ve klinik çalışmalarda KBH'da serum leptin düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (146, 147).

Başlangıç ağırlıkları benzer seçilerek çalışmaya dâhil edilen sıçanların çalışma boyunca ağırlık değişimleri Şekil 4.1'de gösterilmektedir. KBH'nin oluşturulduğu ilk 3 haftalık dönemde adenin metoduyla böbrek hasarı oluşturulan sıçanlarda vücut

ağırlığının azaldığı görülmektedir. Oral gavaj yoluyla adenin müdahalesi sonucunda artan inflamatuvar sitokinler, oksidatif ve nitrozatif stres belirteçleri hastalık oluşturulan sıçanlarda ilk 3 haftalık sürede besin alımında ve vücut ağırlığında azalmaya neden olmuş olabilir (148, 149). Prebiyotik müdahalesinin yapıldığı 3-7. haftalar arasında hem HP hem HN gruplarında vücut ağırlığı artışı görülmekte; ancak HP grubundaki vücut ağırlığı artışının HN grubuna göre daha yüksek olduğu dikkat çekmektedir ( $p=0,05$ ). Prebiyotik olarak verilen oligofruktozla zenginleştirilmiş inülinin, KBH'da inflamasyon kaynaklı anoreksiya durumuna yol açan inflamatuvar sitokinleri azaltarak (150), böbrek fonksiyon göstergelerinde ve üremik durumda iyileşme sağlayarak (15), orta molekül ağırlıklı üremik toksin ve leptin klirensini artırarak anoreksiyada azalma ve iştah durumunda artış sağlayabileceği olası mekanizmalardır (145).

Kolona ulaşan nitrojen/diyet posası oranı, kolonda baskın olan mikrobiyal metabolizmanın bir göstergesidir (126). Sindirilmeyen fermente edilebilir diyet posasının diyetle artması sonucu sakkarolitik fermantasyon artarak KZYA üretimi artar. Yeterli fermente edilebilir diyet posası olmadığında ise kolonda proteolitik bakteriyel fermantasyon artarak üremik toksin üretimini artırmaktadır (151). Yapılan bu çalışmada prebiyotik verilen hasta grupta (HP) preolitik/sakkarolitik fermantasyon dengesinin sakkarolitik yöne kayması sonucunda serum üre ve PCS düzeyleri, prebiyotik müdahalesi yapılmayan hasta gruba (HN) göre daha düşük bulunmuştur (Tablo 4.2 ve Tablo 4.3). Prebiyotik verilen hasta grupta serum üre ve PCS düzeylerinin düşmesi üremik durumun iyileşmesine katkı sağlayarak üreminin neden olduğu anoreksiyayı, vücut ağırlığı ve besin alımını olumlu etkilemiş olabilir.

Mikrobiyota transferi çalışmalarında inülin ve diğer sindirilemeyen posa türlerinden zengin diyetin KZYA üretimini artırarak obeziteyi önlediği gösterilmiştir (152, 153). Bu obezite karşıtı etkinin altında yatan mekanizma; KZYA'lerinin bariyer fonksiyonunu iyileştirerek, metabolik endotoksemi, obezite ve insülin direncine sebep olan bakteriyel toksinlerin dolaşıma geçmesini önlemesidir (154-156). Yüksek yağlı diyetle beslenen fareler üzerinde yapılan bir çalışmada fermente edilebilir posa müdahalesi sonucu artan KZYA üretiminin iştahı baskıladığı ve ağırlık kazanımını



azalttığı gösterilmiştir (157). Bir meta-analizde yüksek KZYA düzeyinin doyumluğu, enerji harcamasını ve termogenezi artırdığı, besin alımını azalttığı ve lipogenez inhibisyonunu sağladığı sonucuna varılmıştır (158). KZYA'lerinin GLP-1, peptit YY ve gastrik inhibitör polipeptit gibi doyumluk sağlayan peptitlerin sekresyonunu artırarak iştahı baskılayabileceği öne sürülmektedir (159). Sağlıklı sıçanlara 3 hafta boyunca oligofruktozla zenginleştirilmiş inülin verilen bir çalışmada serum GLP-1 ve peptit YY konsantrasyonlarının kontrol grubunun yaklaşık iki katı olduğu gösterilmiştir (160). Erkek Wistar sıçanlara 35 gün boyunca oligofruktozla zenginleştirilmiş standart diyet alanlarda yüksek yağlı diyet alanlara göre enerji alımı, vücut ağırlığı ve yağ kütlesi artışının daha az olduğu, GLP-1 ve 2 düzeyinde artış ve ghrelin düzeyinde azalma rapor edilmiştir (161). Bizim çalışmamızda da bu verilere paralel olarak prebiyotik verilen sağlıklı grubun vücut ağırlığı artışının prebiyotik müdahalesi yapılmayan sağlıklı grupla karşılaştırıldığında daha az olduğu görülmektedir (Şekil 4.1). Aynı zamanda, prebiyotik verilen sağlıklı grupta yem tüketim miktarı prebiyotik müdahalesi yapılmayan sağlıklı gruba göre daha azdır (Tablo 4.1). Ancak, sağlıklı sıçanlarda hem vücut ağırlığı değişimi hem de yem tüketimleri için aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p>0,05$ ).

## 5.2. Sıçanların Böbrek Fonksiyon Göstergelerine Ait Bulgular

Böbrek yetmezliği modeli oluşturmak için kullanılan, bir kimyasal nefrektomi yöntemi olan adenin müdahalesinin en az 3 hafta uygulanması daha önceki çalışmalarda (139, 162) belirtildiği üzere böbreklerde geri dönüşsüz hasar oluşturduğu yapılan bu çalışmayla da doğrulanmıştır (Şekil 4.2 ve Tablo 4.2). Ayrıca KBH oluşturulan sıçanlarda serum üre ve kreatinin düzeyleri sağlıklı sıçanlara göre istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Hasta gruptaki sıçanlar kendi içlerinde karşılaştırıldığında diyetlerine prebiyotik ilavesi yapılanların serum üre düzeylerinin istatistiksel olarak daha düşük olduğu görülmüştür. Serum kreatinin düzeylerinde ise prebiyotik müdahalesinin anlamlı bir etkisi olmamıştır. Bir başka çalışmada KBH oluşturulmuş sıçanlarda kan üre azotu ve serum kreatinin düzeyleri sağlıklı kontrollere göre daha yüksek bulunmuş, ancak prebiyotik olarak kullanılan

galaktoolisakkaritin böbrek fonksiyonu üzerine etkisi gözlenmemiştir (129). KBH modeli oluşturulan sıçanlarda yapılan bir başka çalışmada ise, prebiyotik olarak dirençli nişasta verilen grupta serum üre düzeylerinde farklılık gözlenmezken serum kreatinin düzeylerinde anlamlı azalma meydana gelmiştir (15). KBH oluşturulmuş sıçan modelinde yapılan bir başka çalışmada prebiyotik ve probiyotik tedavi verilen grup, destek tedavinin verilmediği grupla karşılaştırıldığında serum kreatinin ve kan üre azotu düzeyleri anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur (128).

Çalışma sonuçlarımıza benzer şekilde, hemodiyaliz hastalarında yapılan bir çalışmada 4 haftalık oligofruktozla zenginleştirilmiş inülin müdahalesi sonucu serum üre düzeylerinde azalma gözlenirken serum kreatinin düzeylerinde anlamlı farklılık oluşmamıştır (109). İnülin, dirençli nişasta, gum arabic ve arabinoksilan oligosakkaritleri kullanılan 4 farklı çalışmadan toplam 105 KBH'lı katılımcının değerlendirildiği bir çalışmada prebiyotik desteğinin serum üre düzeylerinde belirgin azalma (ortalama fark= -2,23 mmol/L, p=0,006) sağladığı gösterilmiştir (114).

### **5.3. Serum Üremik Toksin Düzeylerine Ait Bulgular**

Para-cresol sülfat ve indoksil sülfatın serum seviyeleri; bu metabolitlerin bağırsak mikrobiyotası tarafından üretimi ile böbrek yoluyla eliminasyonu arasındaki dengeyi yansıtmaktadır. Proteine bağlı üremik toksinlerden olan PCS ve IS'nin eliminasyonları glomerüler filtrasyon hızına ve tübüler taşıyıcı sisteme bağlı olup tübüler sekresyon aracılığıyla gerçekleşmektedir (163). Tübüler sekresyon; renal plazma akımından gelen solütlerin aktif taşıyıcı sistemle kılcal damarlardan renal tübüllere geçişidir (65). P-cresol sülfat ve indoksil sülfatın organik anyon taşıyıcıları (OAT) 1 ve 3 tarafından sekresyona uğradığı bilinmektedir (164). Normal şartlar altında böbrekler yoluyla elimine edilen bu metabolitlerin renal klirenslerinde azalmaya bağlı olarak KBH'da serum düzeyleri artmaktadır (65). Bu doğrultuda bizim çalışmamızda hasta ve sağlıklı sıçanlar karşılaştırıldığında, HN ve SN gruplarının serum PCS ve IS düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı fark olmadığı görülmekte (Tablo 4.3); bunun sebebinin sıçanlarda oluşturulan böbrek hasarına rağmen, rezidüel renal fonksiyonun PCS ve IS klirensini hasta ve sağlıklı sıçanlarda benzer

oranlarda sağlayabildiği çıkarımı yapılabilir. Rezidüel böbrek fonksiyonu durumunda tübüler lümeneye sekrete edilen PCS ve IS düzeyi, böbreğin sekresyon klirensini koruma derecesine bağlıdır (165). Genelde glomerüler filtrasyon ve tübüler sekresyonun benzer oranda azaldığı varsayılmış olsa da bazı solütlerin glomerüler filtrasyon ve tübüler sekresyon ile klirenslerinin farklı derecelerde azaldığına dair bazı kanıtlar vardır (165).

Üremik toksinlerin renal klirensleri ve böbrek yetmezliğine bağlı olarak plazma düzeylerinde artış derecesi belirgin şekilde değişiklik göstermektedir (65). Yapılan bir çalışmada IS ile PCS'nin renal klirensleri karşılaştırıldığında IS klirensinin yaklaşık üç kat daha fazla olduğu ve bu durumun herhangi bir KBH evresinde serum IS düzeylerinin PCS düzeylerinden daha düşük olmasına yol açabileceği ileri sürülmektedir (64). Bu bulguların kısmen, PCS ve IS'nin tübüler taşıyıcı afiniteleri arasında önemli farklılıklar ve/veya ayrı taşıyıcı sistemlerin kullanılması ile açıklanabileceği belirtilmektedir (64). Yapılan bir çalışmada PCS ve IS'nin toplam plazma düzeyleri sağlıklı ve KBH'lı bireylerde karşılaştırılmış, serum PCS düzeyinin IS'ye göre KBH'lı bireylerde daha yüksek olduğu gözlenmiştir (166). Sağlıklı bireylerde toplam PCS düzeyi 0,3 mg/dl iken 3. Evre KBH'si olanlarda 1 mg/dl; IS düzeyi ise sağlıklı bireylerde 0,1 mg/dl iken 3. Evre KBH hastalarında 0,2 mg/dl'dir (166).

Bu çalışmada bakteriyel protein fermantasyon metabolitlerinden olan PCS ve IS'nin serum düzeyleri analiz edilmiş ve tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Grupların ikili karşılaştırması yapıldığında hastalık oluşturulan sıçanlarda prebiyotik müdahalesinin serum PCS düzeylerini düşürdüğü (%64,3), serum IS düzeylerini ise etkilemediği sonucuna varılmıştır (Tablo 4.3). Bizim çalışma sonuçlarımıza uyumlu olarak, hemodiyaliz tedavisi alan hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada 4 haftalık oligofruktozla zenginleştirilmiş inülin müdahalesinin serum üre ve PCS düzeylerinde anlamlı azalma sağlarken serum IS düzeylerinde anlamlı bir etkisi gözlenmemiştir (109). Dirençli nişastanın kullanıldığı deneysel bir çalışmada ise prebiyotik müdahalesinin KBH oluşturulmuş sıçanlarda feçes yoluyla amonyum atımını arttığı ve buna bağlı olarak nitrojenli atık ürünlerin

birikiminin azaldığı rapor edilmiştir (15). Yapılan çalışmalarda PCS ve IS'nin yüksek luminal pH'da daha fazla üretildiğini ve düşük pH'da daha az mikrobiyal üretimini gösteren çalışmalar vardır (126, 167). Bizim çalışmamızda da prebiyotik müdahalesi sonucu artan KZYA'ların luminal pH'ı düşürerek üremik toksin oluşumunu azaltmış olabilir.

KBH'lı hastalarda farklı diyet posası türleri ile yapılan birçok çalışmada birbirinden çok farklı sonuçlar elde edilmiştir. 6 hafta boyunca dirençli nişasta verilen hemodiyaliz hastalarında serbest IS serum düzeyinde %27 azalma gösterirken serbest serum PCS düzeyindeki azalma ise istatistiki öneme sahip değildir (110). Dört hafta boyunca 20g/gün dozunda arabinoxylan oligosakkarit verilen hastalarda serum PCS ve IS düzeylerinde değişiklik görünmezken (115), prebiyotik olarak inülin ve bezelye kabuğu posası kullanılan başka bir çalışmada ise serum PCS düzeyi %20 azalmıştır (127). 10, 20 ve 40 g/gün gum arabic desteğinin KBH'lı hastalarda IS düzeyleri üzerinde etkisi gözlenmemiştir (168). Çalışma sonuçlarındaki bu tutarsızlık; farklı tür ve miktarda prebiyotiklerin kullanılması, kısa müdahale süresi ve örneklem sayısı yetersiz ve diyet değerlendirilmesi yapılmayan, diyetle alınan posanın göz ardı edilmesinden kaynaklanabilmektedir. Çift-kör plasebo kontrollü randomize kontrollü bir çalışmada 3 ay boyunca kısa zincirli FOS verilen hastaların serbest ve total IS, PCS serum düzeylerinde istatistiki öneme sahip farklılık gözlenmemiştir (124). Kısa zincirli FOS, proksimal kolonda hızlıca fermente olarak üremik toksin üretiminin yoğun olduğu kolonun son bölümüne kadar ulaşamadığı için üremik toksin düzeylerine etki etmediği düşünülmektedir (126). Bu çalışmada prebiyotik müdahalesi yapılan hem hasta hem sağlıklı grubun serum PCS düzeylerinde istatistiksel öneme sahip azalma görülürken serum IS düzeyleri arasında fark yoktur (Tablo 4.3). Böbrek yetmezliği modeli oluşturulmuş sıçanlarda yapılan başka bir çalışmada metabolomik analizler serum, idrar ve çekal dışkıda bakılmış; prebiyotik olarak dirençli nişasta verilen grubun serum ve idrar IS düzeylerinin sırasıyla %36 ve %66 oranında, idrar p-cresol düzeylerinin ise %47 azaldığı gösterilmiştir (130). Cerrahi yöntemle böbrek yetmezliği oluşturulan sıçanlarda ise galaktooligosakkarit verilen grupta çekal indol ve serum IS

konsantrasyonlarının önemli ölçüde azaldığı rapor edilmiştir (129). Bizim çalışmamızda üremik toksinler sadece serumda ve serbest formları bakılmıştır. Vücuttaki dokuların maruz kaldığı serbest (proteine bağlı olmayan) formda üremik toksinlerdir. IS ve PCS, büyük oranda proteine bağlı olduğu için dokuların maruz kaldığı serbest solüt düzeyi, toplam solüt miktarının küçük bir kısmını oluşturmaktadır (169). İndoksil sülfat %10, PCS ise yaklaşık %5-10 oranında proteine bağlanmadan serbest formda bulunmaktadır (30). Normal renal fonksiyonu olan bireylerde yapılan bir çalışmada IS ve PCS'nin serbest fraksiyonlarının toplam plazma konsantrasyonunun %2'si olduğu; ayrıca albümine bağlı üremik solütlerin klirensinin serbest solütlere göre daha düşük olduğu gösterilmiştir (169).

Bu çalışmada sıçanların bağırsak mikrobiyota analizleri yapılmamış; bu sebeple PCS ve IS üretimi ile ilişkili mikrobiyal türler ve oligofruktozla zenginleştirilmiş inülinin hangi mikrobiyal türleri artırdığı tanımlanamamıştır. Serum IS ve PCS düzeyleri analiz ederek bağırsak mikrobiyotası tarafından üretilen üremik toksinler indirekt olarak ölçülmüştür. Daha önce yapılan bir çalışmada erken renal yetmezliği olan hastalarda IS'nin Clostridia sınıfından Christensenellaceae, Ruminococcaceae ve Lachnospiraceae türleri ile; PCS'nin ise Clostridia sınıfından Ruminococcaceae türü ile ilişkili olduğu bulunmuştur (163). Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada ise dirençli nişasta verilen grupta Bacteroidetes: Firmicutes oranında anlamlı artış rapor edilmiştir (130).

#### **5.4. Serum İnflamatuar Belirteçlerinin Analizine Ait Bulgular**

KBH gelişimi ve progresyonunun en önemli nedenlerinden biri sistemik inflamasyondur. Daha önce yapılan çalışmalarda sistemik inflamasyonun en önemli mediyatörlerinden birinin bağırsak disbiyozisi olduğu kanıtlanmıştır (170, 171). KBH'da bağırsakta artan disbiyotik bakteri türleri (Enterobacteriaceae ve Pseudomonadaceae; Proteobacteria, Bacteroidaceae ve Clostridiaceae) bağırsak mukuzol bariyer fonksiyonuna zarar vererek (172), intestinal T helper 17 hücrelerinin Treg hücrelerine oranını artırarak (173), lipopolisakkarit translokasyonu sonucu bağırsak bakteriyel bileşenlerinin sistemik dolaşıma geçişine neden olarak

lokal ve sistemik inflamasyona neden olmaktadır (174). Ayrıca bağırsak kaynaklı üremik toksinlerden PCS ve IS proinflamatuvar etki göstermektedir (171). Bağırsak kaynaklı üremik toksinlerin yüksek serum düzeylerinin, reaktif oksijen türlerinin aracılık ettiği NF-κB yolağı ile proinflamatuvar sitokin salınımını artırabileceği ileri sürülmektedir (87-89). Bu bilgilere paralel olarak bizim çalışmamızda, sağlıklı sıçanlarla KBH oluşturulmuş sıçanlar karşılaştırıldığında (SN-HN) serum IL-6 düzeylerinin hasta grupta istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek olduğu görülmüştür (Tablo 4.3). Sağlıklı sıçanlarda KBH oluşturulması sonucu proinflamatuvar sitokinlerden IL-6 düzeyinde artış olduğu; ancak TNF-α düzeylerinde farklılık olmadığı gözlenmiştir. Proinflamatuvar sitokinlerden IL-6'nın serum düzeylerinin hastalık oluşturulan sıçanlarda yüksek olması KBH ile ilişkili sistemik inflamasyonun bir göstergesidir. Çalışmamıza benzer olarak adenin yöntemi kullanılan bir başka çalışmada, KBH oluşturulmuş sıçanlarda hem IL-6 hem de TNF- α düzeylerinin kontrol gruba göre anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ( $p<0,001$ ).

Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda inflamatuvar sitokinlerin ve diğer belirteçlerin dolaşım düzeylerinin yüksek olduğu ve bu durumun tüm nedenli ölümler ve kardiyovasküler ölümlerle ilişkili olduğu bilinmektedir (175, 176). Özellikle IL-6'nın akut faz inflamatuvar yanıtta çok önemli olduğu düşünülmektedir. İnterlökin-6'nın hemodiyaliz hastalarında CRP'ye göre daha iyi bir gösterge olduğu (177, 178), periton diyalizi alan hastalarda ise mortalite konusunda daha güçlü bir gösterge olduğu gösterilmiştir (179). Bağırsak kaynaklı üremik toksinlerin inflamasyon ve oksidatif stres üzerine etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada, inflamatuvar belirteçlerden IL-6 ve yüksek duyarlılıklı CRP (hs-CRP) KBH'lı bireylerde sağlıklı kontrol gruba göre daha yüksek bulunmuştur. Hasta bireyler farklı KBH evrelerine göre gruplara ayrıldığında serum IL-6 düzeyinin hastalık progresyonu arttıkça yükseldiği, hs-CRP düzeyinin ise sadece hastalığın erken evresinde yüksek olduğu görülmüştür (180). KBH'da inflamatuvar belirteçlerin yükselmesi bu maddelerin renal klirenslerinin azalması ve diğer eşlik eden faktörler sebebiyle olabileceği öne sürülmektedir (181). Deneysel modellerde PCS'nin inflamatuvar gen

ekspresyonlarını artırarak renal hücre hasarına yol açtığı gösterilmiştir (182). Ayrıca yapılan çalışmalarda serum IS ve PCS düzeylerinin IL-6 düzeyi ile pozitif ilişkili olduğu ve IS ve PCS'nin proinflamatuvar etki gösterdiği sonucuna varılmıştır (123, 180). Bu çalışmada ise serum IL-6 ile PCS düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki belirlenemezken, serum IS düzeyleri ile negatif ilişki tespit edilmiştir. Ancak bu negatif ilişkinin gücü düşük-orta düzeydedir (Tablo 4.4).

Diyet posasının mikrobiyal fermantasyonu sonucu oluşan bir KZYA olan bütiratın, intestinal mukozadaki lamina propriada en çok bulunan immün hücre tipi olan makrofajların fonksiyonunu artırdığı hem in-vivo hem in-vitro ortamda gösterilmiştir (183). Makrofajlara n-bütirat ile müdahale edilmesi sonucu lipopolisakkarit kaynaklı proinflamatuvar mediyatörlerden IL-6, IL-12 ve nitrik oksit sentezinin baskılanması gibi olumlu etkiler sağlanırken TNF- $\alpha$  ve MCP-1 üzerinde hiçbir etkisi olmamıştır (183). Fermente edilebilir kompleks karbonhidratlardan olan amilozdan zengin diyetin inflamasyonu ve oksidatif stresi azalttığı, renal fibrozisi ve KBH progresyonunu geriletmediği bağırsak disbiyozisini iyileştirdiği daha önce yapılan çalışmalarda KBH'lı hayvan modellerinde gösterilmiştir (15, 130). Diyet posası ve prebiyotiklerin inflamasyonu azaltarak KBH'lı hastalarda mortaliteyi azalttığı gösterilmiştir (97). Bu çalışmada hasta sıçanlarda prebiyotik müdahalesi yapılanlarla yapılmayanlar karşılaştırıldığında oligofruktozla zenginleştirilmiş inülin verilen sıçanların serum IL-6 düzeylerinin istatistiksel olarak daha düşük olduğu ancak IL-10 ve TNF- $\alpha$  düzeyleri üzerine etkisi olmadığı görülmüştür. Sağlıklı sıçanlarda ise prebiyotik tüketiminin serum IL-6, IL-10 ve TNF- $\alpha$  düzeylerine herhangi bir etkisi gözlenmemiştir (Tablo 4.3). Bu verilere dayanarak prebiyotik müdahalesinin KBH'lı sıçanlarda proinflamatuvar sitokinlerden IL-6 düzeyinde anlamlı düşme sağlayarak sistemik inflamasyonu azaltıcı etki göstermiş olduğu çıkarımı yapılabilir. Hemodiyaliz tedavisi alan KBH'lı yetişkinlerde prebiyotik olarak verilen dirençli nişastanın plazma IL-6, IS ve tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS) düzeyinde anlamlı azalma sağlayarak inflamasyon, üremik toksin ve oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (184). Son dönem böbrek yetmezliği olan bireylerde yapılan çift-kör, randomize,

plasebo kontrollü bir çalışma da 2 aylık prebiyotik desteğinin serum kan üre azotu, IL-6 ve TNF-  $\alpha$  düzeylerinde anlamlı azalma sağladığı rapor edilmiştir (185).

### 5.5. Böbrek Dokularında Görülen Histopatolojik Bulgular

Adenin yöntemiyle oluşturulan KBH modelinde, oral yolla verilen adenin hızla 2,8-dihidroksiadenin'e metabolize olmaktadır. Proksimal renal tübüllerde kristalize olarak biriken bu renal tübül ve interstisyum hasarına ve renal yetmezlik progresyonuna neden olmaktadır (138). Adenin yöntemi ile renal yetmezlik tablosu oluşturulan bu çalışmada histopatolojik değerlendirmeler sonucunda KBH oluşturulan sıçanlarda kristal birikimi, tübüler hasar, glomerüler hasar ve inflamasyon, interstisyel fibrozis yoğun ve yaygın olarak görülmüştür (Tablo 4.6). Kronik böbrek hastalığında tübüler atrofi, interstisyel fibrozis, glomerüloskleroz, renal vaskülopati ve azalmış renal rejenerasyon kapasitesi gibi iyi tanımlanmış yapısal özellikler vardır (186). Yapılan histopatolojik incelemelerde adenin müdahalesiyle oluşturulan KBH'lı sıçanlarda, KBH'lı insanlara benzer şekilde renal yetmezlik oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4.9).

Üre, glomerüler filtrasyon ve tübüler geri emilim; kreatinin ise glomerüler filtrasyon ve tübüler sekresyon ile filtre olur. P-cresol ve indoksil sülfat gibi üremik toksinler ise tübüler sekresyon yoluyla klirensedilmektedirler (163). Glomerüler ve tübüler hasar bu metabolik ürünlerin uzaklaştırılmasını engelleyerek serum düzeylerinin yükselmesine neden olmaktadır. Bu çalışmada da KBH oluşturulan sıçanlarda serum üre ve PCS düzeyleri sağlıklı kontrollere göre belirgin düzeyde artmıştır.

Böbrek dokularında kristal birikimi ve glomerüler hasar sonucunda HN grubunda üre ve kreatinin düzeylerinin yüksek olması beklenen bir sonuçtur. Prebiyotik müdahalesi sonucu hasta sıçanların böbrek dokularında kristal birikiminin azalması, tübüler, glomerüler ve tübülointerstisyel hasarın gerilemesi ile böbrek fonksiyon göstergelerinden serum üre düzeylerinde olumlu azalma ilişkili olabilir. Prebiyotik ve probiyotik müdahalesinin birlikte yapıldığı bir deneysel çalışmada, KBH'lı sıçanların böbrek dokularında tübülointerstisyel hasarın iyileştiği gözlenmiştir.



ancak glomeruler skleroz açısından farklılık bulunmadığı belirtilmiştir. Aynı zamanda, serum kreatinin ve kan üre azotundaki azalma tübülointerstisyel hasarın gerilemesi ile ilişkilendirilmiştir (128).

Serbest formda bulunan PCS ve IS, proksimal tübül lümenine sekrete edilerek elimine edilmektedir. Hastalık oluşturulan sıçanlarda gözlenen proksimal tübülopati sonucunda tübüler sekresyon kapasitesi azalarak üremik toksin klirensinin azalmasına sebep olabilmektedir (165). Böylece hastalık oluşturulan sıçanlarda serum üremik toksin düzeyi artması beklenen bir sonuçtur. Bu çalışmada renal tübüler hasar ile serum PCS düzeyi orta derece; serum IS düzeyleri ise düşük-orta dereceli korelasyon göstermiştir (Tablo 4.7). Ayrıca prebiyotik desteğinin hasta grupta tübüler hasarı gerilettiği (Tablo 4.6) ve serum PCS düzeylerinde anlamlı azalma sağladığı (Tablo 4.3) gösterilmiştir. Bu verilere dayanarak tübüler hasarın gerilemesi ile serum PCS düzeylerinde sağlanan düşmenin ilişkili olabileceği çıkarımı yapılabilir. Çalışma sonuçlarımıza benzer olarak KBH oluşturulmuş sıçanlarda yapılan bir çalışmada, galaktooligosakkarit müdahalesinin tübülointerstisyel hasarı iyileştirdiği (129); simbiyotik müdahalesi yapılan başka bir deneysel çalışmada ise, tübülointerstisyel hasarın iyileştiği gözlenmiş, ancak glomeruler skleroz açısından farklılık bulunmadığı belirtilmiştir (128). Prebiyotik olarak laktulozun kullanıldığı bir çalışmada, adeninle KBH oluşturulan sıçanlarda prebiyotik müdahalesinin serum kreatinin ve kan üre azotu düzeylerini düşürdüğü ve tübülointerstisyel fibrozisi baskılayarak KBH progresyonunu önlediği rapor edilmiştir (187).

İndoksil sülfat, glomerüler skleroz ve interstisyel fibrozise yol açarak nefron kaybına ve hastalığın progresyonuna neden olmaktadır (91). Farelerden alınan böbrek dokularına PCS enjeksiyonunun renal fibrozise neden olarak böbrek hasarına yol açtığı gözlenmiştir (188). Renal interstisyel fibrozis ve glomeruloskleroz sonucu üremik toksinlerin böbrek yoluyla vücuttan uzaklaştırılması daha da zorlaşmakta ve hastalığın progresyonu kötüleşmektedir. Bu çalışmada renal interstisyel fibrozis ile serum IS düzeyleri arasında orta derecede pozitif ilişkili bulunmuştur. Glomerüler hasar ise hem PCS hem de IS düzeyleri ile pozitif korelasyon göstermektedir (Tablo 4.7).

Yapılan in vitro çalışmalarda IS ve PCS gibi proteine bağılı üremik toksinlerin proksimal renal tübüler hücrelerde inflamatuvar gen ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (189). Preklinik çalışmalarda PCS ve IS'nin TGF- $\beta$ 1 ekspresyonunu ve fibrotik yanıt mediyatörlerini indükleyerek (190), intrarenal renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi aktive ederek renal fibrozise yol açtığı gösterilmiştir (191). İndoksil sülfat, renin-anjiyotensin sistemi aktive ederek epitelial-mezenkimal geçişi artırarak renal tübüler hücrelerin apoptozuna neden olmaktadır (192). Sıçanlarda IS müdahalesi sonucunda renal fibrozis gelişiminin hızlandığı rapor edilmiştir (193, 194). Adenin yöntemiyle KBH oluşturulan kemirgenlerde yapılan iki farklı çalışmada, hasta grubun böbrek dokularında inflamatuvar sitokin ve kemokinleri (TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-1 $\beta$  ve IL-6) ve transforme edici büyüme faktörü  $\beta$ -1 (TGF- $\beta$ 1), kollajen tip-1  $\alpha$ 1 (Col1a1), düz kas aktin  $\alpha$ -2 (Acta2) gibi fibrozisle ilişkili molekülleri kodlayan gen ekspresyonlarının daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. Prebiyotik verilen hasta grupta ise inflamatuvar, oksidatif ve fibrotik gen ekspresyon düzeylerinin normalize olduğu gösterilmiştir (15, 120). Bu çalışmada yapılan histopatolojik değerlendirme sonucunda hasta sıçanlarda görülen yaygın ve yoğun görülen glomerüler inflamasyon ve interstisyel fibrozisin prebiyotik müdahalesi yapılan hasta sıçanlarda gerilediği semi-kantitatif olarak gözlenmiştir (Tablo 4.6). Ayrıca hasta sıçanlara ait böbrek dokularındaki histopatolojik değişikliklerin toplam skoru karşılaştırıldığında prebiyotik verilen hasta sıçanlarda renal hasarın gerilediği bulunmuştur ( $p < 0,001$ ).

### **5.6. Böbrek Dokularında Antioksidan Parametrelere Ait Bulgular**

Oksidatif stres ve inflamasyon kronik böbrek hastalığının patogenezinde ve komplikasyonlarında başlıca rol oynamaktadır. Gen ekspresyonu ve metabolomik veriler KBH'lı bireylerde inflamatuvar ve pro-oksidan gen ekspresyonlarında artışın yanısıra antioksidan sisteme ait gen ekspresyonlarında azalma göstermektedir (195). Ayrıca KBH'lı bireylerde oksidatif stres belirteçlerin sağlıklı kontrollere göre daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (180, 196). Adeninle KBH oluşturulmuş sıçanlarında da böbrek dokularında sağlıklı kontrollere göre pro-oksidan, proinflamatuvar ve profibrotik proteinlerin artışı, GPx ve SOD gibi antioksidan proteinlerin ise azaldığı

görülmüştür (139). Yapılan bu çalışmada da hasta ve prebiyotik verilmeyen (HN) gruba ait böbrek dokularında SOD ve GPx aktivitesi diğer gruplara göre daha düşük bulunmuştur (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11). Hasta ve prebiyotik verilmeyen (HN) gruba ait böbrek dokularında SOD aktivitesi her iki sağlıklı gruba göre (SN ve SP) anlamlı olarak daha düşüktür ( $p=0,002$ ). Gruplar arasında GPx aktivitesi yönünden karşılaştırma yapıldığında; hasta ve prebiyotik verilmeyen (HN) gruba ait böbrek dokularında enzim aktivitesi sağlıklı ve prebiyotik verilen (SP) gruba göre anlamlı olarak daha düşüktür ( $p=0,001$ ).

Oksidatif stresin oluşmasında üremik toksinlerin başlıca rolü olduğu ve bu şekilde doku hasarına katkıda buldukları ileri sürülmektedir (197). Hayvan çalışmaları, NADPH bağımlı veya bağımsız yollarla renal bir ROS kaynağı olan siklo-oksijenaz-2'nin (COX-2) upregülasyonu ile oksidatif stresi indükleyebileceğini göstermiştir (197, 198). Dou ve ark (199), IS'nin endotel hücrelerde reaktif oksijen türlerinde artışa, glutasyon düzeylerinde ise azalmaya neden olduklarını göstermişlerdir. Bu sonuçlara göre IS'nin pro-oksidan ve antioksidan mekanizmalar arasındaki dengeyi bozarak oksidatif strese yol açtıklarını ileri sürmüşlerdir (199). Yapılan *in vitro* çalışmalarda IS'nin ROS üretimi yoluyla intraselüler adezyon molekülü 1'in renal ekspresyonunu artırdığı (200), PCS'nin ise lökosit serbest radikal üretimini aktive ederek oksidatif stresi artırdığı gösterilmiştir (201). Cerrahi yöntemle böbrek yetmezliği oluşturulmuş sıçanlarda yapılan bir çalışmada PCS'nin oksidatif stresi artırarak renal tübül hasara sebep olduğu gösterilmiştir (92). IS'nin renal tübül hücrelerde TGF- $\beta$ 1 ve kemokinlerin üretimini uyararak serbest radikal oluşumuna yol açmaktadır (189). Üremik sıçanlara oral IS uygulamasının böbreklerde süperoksit temizleyici aktiviteyi azalttığı gösterilmiş (202), böylece böbreklerde antioksidatif sisteme zarar vererek tübül hücre hasarına neden olduğu sonucu çıkarılmıştır (203). Rossi ve ark. (123), KBH evresi 3 veya 4 olan hastalarda serbest IS ve PCS düzeyleri ile GPx enzim aktivitesi arasında negatif korelasyon ( $r= -0,25$   $p=0,003$ ;  $r= -0,19$   $p=0,022$ ) rapor etmiştir.

Bu çalışmada SOD ve GPx aktivitesi hasta ve prebiyotik müdahalesi yapılmayan sıçanlara ait böbrek dokularında en düşük bulunmuştur (Şekil 4.10 ve

Şekil 4.11). Hasta sıçanlarda prebiyotik müdahalesinin GPx aktivitesi üzerinde olumlu etkisi gözlenirken, SOD aktivitesinde anlamlı bir artış sağlayamamıştır. Sağlıklı sıçanlarda ise prebiyotik müdahalesinin hem GPx hem de SOD aktivitesi üzerinde olumlu etkisi istatistiksel olarak anlamlı değildir. Çalışma sonuçlarımıza benzer olarak KBH modeli oluşturulan sıçanlarda yapılan bir çalışmada hasta grubun böbrek dokularında antiinflamatuvar transkripsiyon faktör olan Nrf2'nin translokasyonunda ve Nrf2'nin hedef genlerinden SOD, GPx, katalaz ve hemoksijenaz-1 düzeylerinde belirgin azalma gözlenmiştir. Prebiyotik tüketiminin ise Nrf2'nin nükleer translokasyonunda ve Nrf2'nin hedef genlerinin ekspresyonlarında iyileşme sağladığı belirtilmektedir (15). Serum antioksidan kapasitenin bir ölçüsü olan serum thiol içeriğinin prebiyotik olarak laktuloz verilen KBH'lı sıçanlarda önemli ölçüde arttığı, indirgenmiş glutatyon düzeylerinde ise anlamlı farklılık oluşturmadığı gözlenmiştir (187). Hemodiyaliz tedavisi alan hastalar üzerinde yapılan randomize, tek-kör klinik çalışmada katılımcılara 7 hafta boyunca simbiyotik desteği verildiğinde (*Bifidobacterium longum* + sorgum) serum total antioksidan kapasitede ve SOD aktivitesinde artış sağlanmıştır (204).

### **5.7. Kolon Dokularında Sıkı Bağlantı Proteinlerinin İmmünohistokimyasal Analiz Bulguları**

İntestinal epitelyal sıkı bağlantı yapısı bakterilerin ve bakterilere ait toksik ürünlerin paraselüler penetrasyonunu önlemektedir (205). Occludin, intestinal epitelyal bütünlüğü ve paraselüler bariyer fonksiyonu düzenleyen sıkı bağlantı komplekslerinin ayrılmaz bir bileşenidir (206). Claudinler, sıkı bağlantı yapının önemli bir yapısal bileşenini oluşturan ve paraselüler difüzyonda kritik rol oynayan membran proteinleri ailesine aittir. Claudin-1, 3, 4, 5 ve 8 dahil olmak üzere claudin ailesinin bazı üyeleri epitelyal bariyeri sıkılaştırmaya hizmet ederken, claudin-2, 7 ve 12 kanalları oluşturarak geçirgenliği artırmaktadır (207).

Kronik böbrek hastalığında renal fonksiyonun azalması atık ürünlerin kanda birikmesine neden olmaktadır. Böbrekler aracılığıyla vücuttan uzaklaştırılamayan protein fermentasyon ürünleri bağırsaklara gelerek, bağırsak intraluminal pH'ı artırır

ve sıkı bağlantı proteinlerine zarar vermektedir (208). Kronik böbrek hastalığı ile ilişkili sızıntılı bağırsak durumunda endotoksinlerin ve bakteriyel ürünlerin sistemik dolaşıma geçişi sağlıklı bireylere göre daha yüksektir (174). Üreye maruz bırakılan kolonik epitel hücrelerinde bariyer fonksiyonunun azaldığı; sıkı bağlantı proteinlerinden claudin 1, occludin ve zonula occludens (ZO)-1'in zarar gördüğü hem in vitro hem de in vivo çalışmalarda gösterilmiştir (59, 77). KBH modeli oluşturulmuş hayvanlar üzerinde yapılan bir çalışmada düşük posalı diyet tüketen sıçanların kolon dokularında claudin-1 ve occludin seviyelerinde belirgin bir azalma olduğunu göstermiştir (77). Bu çalışmada hastalık oluşturulan sıçanların çıkan kolon kesitlerinde sıkı bağlantı proteinlerinden occludin protein seviyelerinin sağlıklı kontrollere göre önemli ölçüde daha az olduğu gözlenmiştir ( $p=0,026$ ). Hastalık durumunun inen ve çıkan kolon claudin-1 protein seviyeleri üzerinde olumsuz etkisi görülmüş olsa da aradaki fark anlamlı bulunmamıştır (sırasıyla  $p=0,805$  ve  $p=0,062$ ). Bu veriler KBH'da üremik durumun epitelyal bariyer geçirgenliğinin bozulmasına katkıda bulunduğunu doğrulamaktadır. Ayrıca fermente edilebilir diyet posası olarak kullanılan oligofruktozla zenginleştirilmiş inülin desteğinin hem KBH oluşturulmuş hem de sağlıklı sıçanlarda inen ve çıkan kolon claudin-1 protein düzeyleri üzerinde anlamlı artış sağladığı gösterilmiştir (sırasıyla  $p=0,033$  ve  $p<0,001$ ). Buna göre prebiyotik tüketiminin KBH'lı sıçanlarda kolonik bariyer geçirgenliğinin önlenmesinde katkı sağladığı sonucu çıkarılmıştır. Benzer olarak prebiyotik tüketimi hasta sıçanlarda kolon occludin protein düzeylerinde artış sağlamış olsa da aradaki fark anlamlı bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Prebiyotik kaynağı olarak dirençli nişastanın kullanıldığı bir başka çalışmada (15) ise, prebiyotik ilavesi yapılan KBH'lı sıçanların kolonik dokularında claudin-1 ve occludin düzeylerinin kontrol grupta bulunanlara yaklaşan seviyelerde önemli ölçüde arttırdığı gösterilmiştir. Böbrek yetmezliği modeli oluşturulmuş fareler üzerinde yapılan başka bir çalışmada fermente edilebilir diyet posası olarak kullanılan guar gamın üç haftalık müdahalesi sonrası intestinal sıkı bağlantı proteinlerinden; zonula occludens (ZO)-1, ZO-2, occludin ve claudin 7'nin ekspresyonunda anlamlı artış sağlanmıştır (120). Ayrıca, kolonik sıkı bağlantı

yapılarının korunması sonucunda KBH ile ilişkili endotokseminin azaldığı gözlenmiştir (120).

Hipoalbüminemi; bağırsak kaynaklı, proinflamatuvar, proteine bağlı üremik toksinlerin bağırsak mukozası üzerine toksisitesini artırabilmektedir. Hipoalbüminemiden dolayı albümine bağlanamayan üremik toksinlerin serbest formları bağırsak mukozası dahil olmak üzere pek çok dokuda birikerek toksik etki göstermektedirler (171). Özellikle serbest p-cresol'ün insan kolonik epitelyumu üzerinde zararlı etkisi gösterilmiştir (209). Yapılan bu çalışmada hasta sıçanlarda serbest PCS düzeyleri sağlıklı kontrollere göre artmış ve prebiyotik müdahalesi sonucunda ise hasta sıçanların serum serbest PCS düzeylerinde anlamlı azalma sağlanmıştır ( $p<0,001$ ) (Tablo 4.3). Prebiyotik müdahalesi sonucunda azalan serbest PCS düzeyi, PCS'nin kolonik epitel dokuda birikerek toksik etki göstermesini engelleyebileceği ve sıkı bağlantı protein yapılarını korunmasına yardımcı olabileceği sonucu çıkarılabilir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

### 6.1. Sonuçlar

1. Araştırmanın örneklemini adenin maruziyetiyle KBH modeli oluşturulmuş Sprague Dawley cinsi, prebiyotik müdahalesi yapılan (HP (n=9)) ve yapılmayan sıçanlar (HN (n=8)) ile sağlıklı olup prebiyotik müdahalesi yapılan (SP (n=8)) ve yapılmayan sıçanlar (SN (n=8)) olmak üzere toplam 33 adet sıçandan oluşmaktadır.
2. Sıçanlara prebiyotik müdahalesi; oligofruktozla zenginleştirilmiş inülin kullanılarak, sıçanların içme sularına 5g/kg/gün dozunda ilave edilerek 4 hafta boyunca yapılmıştır.
3. Kronik böbrek hastalığı oluşturulan sıçanlardan prebiyotik verilen grupta vücut ağırlığı artışı prebiyotik müdahalesi yapılmayanlara göre daha yüksektir ( $p=0,05$ ).
4. Sağlıklı sıçanlarda prebiyotik tüketiminin vücut ağırlığı artışı üzerine etkisi gruplar arasında (SN ve SP) istatistiksel anlamlı fark göstermemektedir ( $p=0,07$ ).
5. Kronik böbrek hastalığı oluşturulan sıçanlarda; ilk 3 haftalık adeninle böbrek hasarı oluşturulan dönemde yem tüketimi sağlıklı sıçanlara göre daha azdır ( $p<0,05$ ).
6. Prebiyotik müdahalesi hasta sıçanların yem tüketimleri üzerinde (HN-HP) istatistiksel anlamlı fark oluşturmamıştır ( $p>0,05$ ).
7. Sağlıklı sıçanlarda prebiyotik müdahalesi grupların (SN-SP) yem tüketimleri üzerinde istatistiksel anlamlı fark oluşturmamıştır ( $p>0,05$ ).
8. Hasta sıçanlarda prebiyotik müdahalesi yapılmayan grupta serum üre düzeyi  $127,4 \pm 45,77$  mg/dl iken; prebiyotik verilen hasta grupta serum üre düzeyi  $71,74 \pm 17,73$  mg/dl'dir. Prebiyotik müdahalesi yapılan hasta sıçanlarda serum üre düzeyi prebiyotik verilmeyen gruba göre %43,7 oranında daha azdır ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p=0,012$ ).
9. Prebiyotik müdahalesinin sağlıklı sıçanların serum üre düzeyi üzerinde anlamlı bir etkisi olmamıştır ( $p=0,462$ ).

10. Serum kreatinin düzeyi prebiyotik müdahalesi yapılmayan hasta grupta  $1,3 \pm 0,49$  mg/dl; prebiyotik verilen hasta grupta ise  $0,8 \pm 0,15$  mg/dl'dir. İki grubun serum kreatinin düzeyleri arasındaki fark anlamlı değildir.
11. Sağlıklı grupta prebiyotik tüketiminin serum kreatinin düzeyi üzerinde anlamlı bir etkisi olmamıştır.
12. Hasta sıçanlarda prebiyotik verilen grupta serum PCS düzeyi ( $632,7 \pm 356,57$  ng/ml) prebiyotik müdahalesi yapılmayan gruba ( $1771,1 \pm 762,74$  ng/ml) göre %64,3 daha düşüktür ( $p=0,002$ ).
13. Sağlıklı sıçanlarda prebiyotik verilen grupta serum PCS düzeyi ( $321,6 \pm 114,32$  ng/ml) prebiyotik müdahalesi yapılmayan gruba ( $1119,3 \pm 468,30$  ng/ml) göre %71,3 daha düşüktür ( $p=0,001$ ).
14. Hasta sıçanlarda prebiyotik müdahalesinin serum indoksil sülfat düzeyi üzerinde anlamlı bir etkisi gözlenmemiştir.
15. Sağlıklı sıçanlarda diyetle prebiyotik ilavesinin serum indoksil sülfat düzeyi üzerinde istatistiksel anlamlı bir etkisi olmamıştır ( $p=0,208$ ).
16. Serum inflamatuvar belirteçlerden sadece IL-6 düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel öneme sahip anlamlı fark bulunmuştur ( $p=0,008$ ).
17. Hasta sıçanlarda prebiyotik verilen grupta serum IL-6 düzeyi ( $57,6 \pm 46,80$  pg/ml) prebiyotik müdahalesi yapılmayan gruba ( $205,8 \pm 76,80$  pg/ml) göre daha düşüktür ( $p=0,001$ ).
18. Sağlıklı sıçanlarda prebiyotik müdahalesinin serum IL-6 düzeyi üzerinde anlamlı bir etkisi bulunmamıştır ( $p=0,958$ ).
19. Diğer inflamatuvar belirteçlerden IL-10 ve TNF- $\alpha$  düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel öneme sahip anlamlı fark bulunmamıştır.
20. Serum PCS düzeyi ile IL-6, IL-10 ve TNF- $\alpha$  düzeyleri arasında ilişki bulunmamıştır.
21. Serum IS düzeyi ile IL-6 düzeyi arasında negatif düşük orta düzeyde ilişki bulunmuştur ( $r=-0,381$ ,  $p=0,029$ ).
22. Serum IS düzeyi ile IL-10 ve TNF- $\alpha$  düzeyleri arasında ilişki belirlenmemiştir.



- 23.** Hastalık oluşturulan sıçanlara ait böbrek dokularında yoğun ve yaygın kristal birikimi, tübüler ve glomerüler hasar, tübülointerstisyel hasar ve glomerüler inflamasyon tespit edilmiştir.
- 24.** Prebiyotik müdahalesi yapılan hasta sıçanlara ait böbrek dokularında; kristal birikimi, tübüler ve glomerüler hasar, tübülointerstisyel hasar ve glomerüler inflamasyonun prebiyotik verilmeyen hasta sıçanlara göre daha hafif olduğu semi-kantitatif olarak gösterilmiştir.
- 25.** Prebiyotik müdahalesi yapılan hasta sıçanlara ait böbrek dokularında toplam hasar skorunun, prebiyotik müdahalesi yapılmayan sıçanlara göre önemli ölçüde daha az olduğu gözlenmiştir ( $p<0,001$ ).
- 26.** Patolojik incelemede genel bulgu; prebiyotik müdahalesi yapılan hasta sıçanlara ait böbrek dokularında sağlam kalan tübüllerin rejeneratif faaliyeti yönündedir.
- 27.** Prebiyotik verilen hasta grupta histopatolojik bulgular; böbrek korteksinde multifokal alanlar halinde gözlenen fibrozisin prebiyotik verilmeyen hasta sıçanlara göre daha hafif olduğunu göstermektedir.
- 28.** Prebiyotik verilen hasta grupta böbrek korteksinde gözlenen fibrozise yönelik tamir faaliyetlerinde makrofaj ve polimorf nükleer lökositlerin ön planda olduğu gözlenmiştir.
- 29.** Serum PCS düzeyi ile tübüler hasar skoru arasında pozitif orta derecede korelasyon belirlenmiştir ( $r=0,402$ ;  $p=0,020$ ).
- 30.** Serum PCS düzeyi ile glomerüler hasar skoru arasında pozitif orta derecede korelasyon belirlenmiştir ( $r=0,465$ ;  $p=0,006$ ).
- 31.** Serum PCS düzeyi ile toplam histopatolojik hasar skoru arasında pozitif orta derecede korelasyon belirlenmiştir ( $r=0,411$ ;  $p=0,018$ ).
- 32.** Serum PCS düzeyi ile kristal birikimi, glomerüler inflamasyon ve interstisyel fibrozis skorları arasında anlamlı bir ilişki belirlenmemiştir ( $p\geq 0,05$ ).
- 33.** Serum IS düzeyi ile kristal birikimi skoru arasında pozitif orta derecede korelasyon bulunmuştur ( $r=0,448$ ;  $p=0,009$ ).
- 34.** Serum IS düzeyi ile tübüler hasar skoru arasında pozitif düşük-orta derece korelasyon tespit edilmiştir ( $r=0,393$ ;  $p=0,024$ ).

35. Serum IS düzeyi ile glomerüler hasar skoru arasında pozitif düşük-orta derece korelasyon tespit edilmiştir ( $r=0,371$ ;  $p=0,033$ ).
36. Serum IS düzeyi ile glomerüler inflamasyon skoru arasında pozitif orta derecede korelasyon belirlenmiştir ( $r=0,445$ ;  $p=0,009$ ).
37. Serum IS düzeyi ile interstisyel fibrozis skoru arasında pozitif orta derecede korelasyon belirlenmiştir ( $r=0,420$ ;  $p=0,015$ ).
38. Serum IS düzeyi ile toplam histopatolojik hasar skoru arasında pozitif orta derecede korelasyon bulunmuştur ( $r=0,450$ ;  $p=0,009$ ).
39. Böbrek dokularında SOD immünoperoksidaz boyama sonuçlarına göre en yüksek antioksidan enzim aktivitesi en yüksekten en düşüğe sırasıyla SP, SN, HP ve HN gruplarıdır.
40. Hasta sıçanlarda prebiyotik müdahalesinin SOD aktivitesi üzerine istatistiksel öneme sahip etkisi bulunmamıştır.
41. Sağlıklı sıçanlarda prebiyotik müdahalesinin SOD aktivitesi üzerine istatistiksel öneme sahip etkisi bulunmamıştır.
42. Hasta sıçanlarda prebiyotik müdahalesi yapılmayan gruba ait böbrek dokularında SOD enzim aktivitesi prebiyotik müdahalesi yapılmayan sağlıklı sıçanlara göre daha düşüktür ( $p=0,002$ ).
43. Hasta sıçanlarda prebiyotik müdahalesi yapılmayan gruba ait böbrek dokularında SOD enzim aktivitesi prebiyotik verilen sağlıklı sıçanlara göre daha düşüktür ( $p=0,002$ ).
44. Hasta sıçanlarda prebiyotik verilen gruba ait böbrek dokularında SOD enzim aktivitesi prebiyotik verilen sağlıklı sıçanlara göre daha düşüktür ( $p=0,007$ ).
45. Böbrek dokularında GPx immünoperoksidaz boyama sonuçlarına göre en yüksek antioksidan enzim aktivitesi en yüksekten en düşüğe sırasıyla SP, HP, SN ve HN gruplarıdır.
46. Hasta sıçanlarda prebiyotik müdahalesi böbrek dokularında GPx enzim aktivitesini anlamlı ölçüde artırmıştır ( $p=0,007$ ).

47. Hasta sıçanlarda prebiyotik müdahalesi yapılmayan gruba ait böbrek dokularında GPx enzim aktivitesi prebiyotik verilen sağlıklı sıçanlara göre daha düşüktür ( $p=0,002$ ).
48. Sağlıklı sıçanlarda prebiyotik müdahalesinin GPx aktivitesi üzerine istatistiksel öneme sahip etkisi bulunmamıştır.
49. Hasta sıçanların çıkan kolon kesitlerinde sıkı bağlantı proteinlerinden occludin protein düzeylerinin sağlıklı sıçanlara göre önemli ölçüde daha az olduğu gözlenmiştir ( $p=0,026$ ).
50. Hasta veya sağlıklı olma durumunun sıçanlara ait inen kolon kesitlerindeki occludin protein boyanmaları açısından anlamlı etkisi yoktur ( $p=0,924$ ).
51. Prebiyotik tüketim durumunun hasta ve sağlıklı sıçanların çıkan kolon kesitlerindeki occludin boyanma skoru ortalamaları üzerinde anlamlı etki göstermediği görülmüştür ( $p=0,055$ ).
52. Prebiyotik tüketim durumunun hasta ve sağlıklı sıçanların inen kolon kesitlerindeki occludin boyanma skoru ortalamaları üzerinde anlamlı etki göstermediği görülmüştür ( $p=0,568$ ).
53. Hasta veya sağlıklı olma durumunun sıçanlara ait çıkan kolon kesitlerindeki claudin-1 protein boyanmaları açısından anlamlı etkisi yoktur ( $p=0,062$ ).
54. Hasta veya sağlıklı olma durumunun sıçanlara ait inen kolon kesitlerindeki claudin-1 protein boyanmaları açısından anlamlı etkisi yoktur ( $p=0,805$ ).
55. Prebiyotik tüketim durumunun hasta ve sağlıklı sıçanların çıkan kolon kesitlerindeki claudin-1 boyanma skoru ortalamaları üzerinde anlamlı artış sağladığı görülmüştür ( $p<0,001$ ).
56. Prebiyotik tüketim durumunun hasta ve sağlıklı sıçanların inen kolon kesitlerindeki claudin-1 boyanma skoru ortalamaları üzerinde anlamlı artış sağladığı görülmüştür ( $p=0,033$ ).

## 6.2. Öneriler

Bağırsak kaynaklı proteine bağlı üremik toksinlerden PCS ve IS'nin nefrovasküler toksinler olduğu ve KBH progresyonunda belirgin rolleri bulunduğu bilinmektedir. Bu üremik toksinler çoğunlukla albümine bağlı halde oldukları için diyaliz gibi yöntemlerle vücuttan uzaklaştırılmaları da oldukça kısıtlıdır. Son yıllarda bağırsak mikrobiyotasının fonksiyonlarının ve özellikle KBH durumunda oluşan disbiyozisin sonuçlarının anlaşılması üzerine prebiyotikler ve/veya probiyotiklerle bağırsak mikrobiyotasının modülasyonunun sağlanması ilgi çekici bir konu hale gelmiştir.

KBH'ın bağırsak mikrobiyota metabolizması üzerine olumsuz etkisinin renal fonksiyon kaybından çok diyetel kısıtlamalardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Özellikle KBH'ın tıbbi beslenme tedavisinde hiperkalemiyi önlemek amacıyla uygulanan diyetler oldukça düşük miktarda diyet posası içermektedir. Diyetle fermente edilebilir diyet posası alımının azalması, bu hastaların bağırsak mikrobiyotasında disbiyozise yol açmakta; bu durum da bağırsak kaynaklı üremik toksin üretimini artırmaktadır. KBH'da var olan renal yetmezlik sonucu vücuttan uzaklaştırılmayan bu üremik toksinler böbrek hasarını daha da artırarak hastalığın progresyonunu kötüleştirmektedir. Bağırsak kaynaklı üremik toksin düzeylerinin azaltılmasında en etkili yolun üretimlerinin engellenmesinden geçtiği düşünülürse bu hasta grubunda hem disbiyozisin önlenmesi hem de renal hasarın yavaşlatılması ve iyileştirilmesi açısından prebiyotiklerin rolü açıklığa kavuşturulmalıdır.

Bağırsak mikrobiyotasının temel besin kaynağı olan fermente edilebilir posa olarak adlandırılan prebiyotiklerle simbiyozisin sağlanması, üremik toksinlerin üretiminin azaltılmasında, inflamasyon, oksidatif hasar ve KBH progresyonunun kontrol edilmesinde ucuz, sağlıklı ve invaziv olmayan bir alternatif olarak düşünülebilir. Ancak KBH progresyonu ya da ilişkili komplikasyonlarında disbiyozisin ve bağırsak mikrobiyotasının modülasyonunun potansiyel rolünün anlaşılabilmesi için daha çok deneysel çalışmaya ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada potasyum ve fosfor içermeyen, bağırsak mikrobiyotası tarafından fermente edilebilir diyet posası olan oligofruktozla zenginleştirilmiş inülinin; KBH oluşturulmuş sıçanlarda renal fonksiyon, serum üremik toksin düzeyi, inflamasyon, oksidatif stres ve bağırsak epitelyal geçirgenlik üzerine etkileri araştırılmıştır.

Elde edilen veriler doğrultusunda KBH oluşturulmuş hayvan modelinde 4 haftalık oligofruktozla zenginleştirilmiş inülin tüketiminin serum üre, p-cresol sülfat ve IL-6 düzeylerinde azalma bulunmuştur. Ayrıca KBH oluşturulmuş sıçanlarda prebiyotik olarak verilen oligofruktozla zenginleştirilmiş inülinin, renal hasarı yavaşlattığı, böbrek dokularında antioksidan aktiviteyi artırdığı ve kolonda bulunan sıkı bağlantı proteinlerinin aktivitesini artırarak intestinal bariyer fonksiyonunu artırarak hastalık progresyonunu yavaşlattığı bulunmuştur. Mevcut bulgular oligofruktozla zenginleştirilmiş inülinin prebiyotik etkisinin bağırsak mikrobiyotası fonksiyonunu olumlu etkileyerek bağırsak kaynaklı üremik toksin üretimini baskıladığı çıkarımını desteklemektedir. Oligofruktozla zenginleştirilmiş inülin dahil olmak üzere bağırsak mikrobiyotasının modifikasyonun sağlanmasında ve KBH progresyonunun önlenmesinde prebiyotiklerin kullanılması yeni bir terapötik yaklaşım olabilir.

Bu çalışmadan elde edilen bilgiler, kronik böbrek hastalığında uygulanan tıbbi beslenme tedavisinde prebiyotiklerin önemine ışık tutarak bu hastalarda ileri klinik çalışmalara ve yeni projelere temel oluşturma niteliğindedir. Ayrıca kronik böbrek hastalarının diyet tedavisinde yer verilebilecek potasyum ve fosfor içermeyen, prebiyotik eklenmiş tıbbi beslenme ürünlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalara zemin hazırlamaktadır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Felizardo RJ, Castoldi A, Andrade-Oliveira V, Camara NO. The microbiota and chronic kidney diseases: a double-edged sword. *Clin Transl Immunology*. 2016;5(6):e86.
2. Aron-Wisnewsky J, Clement K. The gut microbiome, diet, and links to cardiometabolic and chronic disorders. *Nat Rev Nephrol*. 2016;12(3):169-81.
3. Lin L, Zhang J. Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. *BMC Immunol*. 2017;18(1):2.
4. Wing MR, Patel SS, Ramezani A, Raj DS. Gut microbiome in chronic kidney disease. *Exp Physiol*. 2016;101(4):471-7.
5. Vaziri ND, Wong J, Pahl M, Piceno YM, Yuan J, DeSantis TZ, ve ark. Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora. *Kidney Int*. 2013;83(2):308-15.
6. Evenepoel P, Poesen R, Meijers B. The gut-kidney axis. *Pediatr. Nephrol*. 2017;32(11):2005-14.
7. Al Khodor S, Shatat IF. Gut microbiome and kidney disease: a bidirectional relationship. *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)*. 2017;32(6):921-31.
8. Barreto FC, Barreto DV, Liabeuf S, Meert N, Glorieux G, Temmar M, ve ark. Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4(10):1551-8.
9. Fogelman AM. TMAO is both a biomarker and a renal toxin. *Circ Res*. 2015;116(3):396-7.
10. Tang WH, Wang Z, Kennedy DJ, Wu Y, Buffa JA, Agatista-Boyle B, ve ark. Gut microbiota-dependent trimethylamine N-oxide (TMAO) pathway contributes to both development of renal insufficiency and mortality risk in chronic kidney disease. *Circ Res*. 2015;116(3):448-55.
11. Moraes C, Borges NA, Mafra D. Resistant starch for modulation of gut microbiota: Promising adjuvant therapy for chronic kidney disease patients? *Eur J Nutr*. 2016;55(5):1813-21.
12. Ramezani A, Raj DS. The gut microbiome, kidney disease, and targeted interventions. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(4):657-70.
13. Rossi M, Klein K, Johnson DW, Campbell KL. Pre-, pro-, and synbiotics: do they have a role in reducing uremic toxins? A systematic review and meta-analysis. *Int J Nephrol*. 2012;2012:673631.
14. Chiavaroli L, Mirrahimi A, Sievenpiper JL, Jenkins DJ, Darling PB. Dietary fiber effects in chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis of controlled feeding trials. *Eur J Clin Nutr*. 2015;69(7):761-8.

15. Vaziri ND, Liu SM, Lau WL, Khazaeli M, Nazertehrani S, Farzaneh SH, ve ark. High amylose resistant starch diet ameliorates oxidative stress, inflammation, and progression of chronic kidney disease. *PLoS One*. 2014;9(12):e114881.
16. Aktümsek A. *Anatomi ve fizyoloji: İnsan biyolojisi*. 3.baskı. Ankara: Nobel Yayın Dağıtım; 2006.
17. Eaton DC, Pooler JP. *Vander's Renal Physiology*, 8th ed. New York: McGraw-Hill Education; 2018. Chapter 1, Renal functions, basic processes, and anatomy; p.1-19.
18. Wilkens KG, Juneja V, Shanaman E. Medical nutrition therapy for renal disorders. Mahan LK, Raymond JL editors. *Krause's food & the nutrition care process*. 14th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2017.
19. Ok E, Altun B. Böbrek fonksiyonlarının değerlendirilmesi. Arınsoy T, Güngör Ö, Koçyiğit İ, editörler. *Böbrek fizyopatolojisi*. Türkiye: Reaktif; 2017.
20. Morgan DB, Carver ME, Payne RB. Plasma creatinine and urea: creatinine ratio in patients with raised plasma urea. *Br Med J*. 1977;2(6092):929-32.
21. Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P. Chronic kidney disease. *Lancet*. 2017;389(10075):1238-52.
22. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl*. 2013;3:1-150.
23. Eknoyan G, Levin A, Levin NW. Bone metabolism and disease in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis*. 2003;42:1-201.
24. Liyanage T, Ninomiya T, Jha V, Neal B, Patrice HM, Okpechi I, ve ark. Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease: a systematic review. *Lancet*. 2015;385(9981):1975-82.
25. Suleymanlar G, Utas C, Arınsoy T, Ates K, Altun B, Altıparmak MR, ve ark. A population-based survey of Chronic REnal Disease In Turkey--the CREDIT study. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(6):1862-71.
26. Bello AK, Alrukhaimi M, Ashuntantang GE, Basnet S, Rotter RC, Douthat WG, ve ark. Complications of chronic kidney disease: current state, knowledge gaps, and strategy for action. *Kidney Int Suppl*. 2017;7(2):122-9.
27. Anderson CA, Nguyen HA, Rifkin DE. Nutrition interventions in chronic kidney disease. *Med Clin North Am*. 2016;100(6):1265-83.
28. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med*. 2004;351(13):1296-305.
29. Vanholder R, Van Laecke S, Glorieux G. What is new in uremic toxicity? *Pediatr Nephrol*. 2008;23(8):1211-21.

30. Ackley W, Soiefer L, Etinger A, Lowenstein J. Uremic retention solutes. Karkar A, editor. Aspects in dialysis. IntechOpen; 2017.
31. Raghavan R, Eknoyan G. Uremia: A historical reappraisal of what happened. *Clin Nephrol.* 2018;89(5):305-13.
32. Glassock RJ. Uremic toxins: What are they? An integrated overview of pathobiology and classification. *J Ren Nutr.* 2008;18(1):2-6.
33. Schepers E, Glorieux G, Vanholder R. The gut: the forgotten organ in uremia? *Blood Purif.* 2010;29(2):130-6.
34. Briskey D, Tucker P, Johnson DW, Coombes JS. The role of the gastrointestinal tract and microbiota on uremic toxins and chronic kidney disease development. *Clin Exp Nephrol.* 2017;21(1):7-15.
35. Maukonen J, Saarela M. Human gut microbiota: does diet matter? *Proc Nutr Soc.* 2015;74(1):23-36.
36. NIH HMP Working Group; Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA, et al. The NIH human microbiome project. *Genome Res.* 2009;19(12):2317-23
37. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 2010;464(7285):59-65.
38. Fraher MH, O'Toole PW, Quigley EMM. Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012;9(6):312-22.
39. Verbeke KA, Boobis AR, Chiodini A, Edwards CA, Franck A, Kleerebezem M, et al. Towards microbial fermentation metabolites as markers for health benefits of prebiotics. *Nutr Res Rev.* 2015;28(1):42-66.
40. Antza C, Stabouli S, Kotsis V. Gut microbiota in kidney disease and hypertension. *Pharmacol Res.* 2018;130:198-203.
41. Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev.* 2010;90(3):859-904.
42. Levy M, Kolodziejczyk AA, Thaïss CA, Elinav E. Dysbiosis and the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2017.
43. Wong JMW, Kendall CWC, Jenkins DJA. Fermentation of prebiotics and short-chain fatty acid production. Cho SS, Finocchiaro T, editors. *Handbook of prebiotics and probiotics ingredients: Health benefits and food applications.* Boca Raton: CRC Press; 2009.
44. Esgalhado M, Kemp JA, Damasceno NR, Fouque D, Mafra D. Short-chain fatty acids: a link between prebiotics and microbiota in chronic kidney disease. *Future Microbiol.* 2017;12:1413-25.



45. Morrison DJ, Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*. 2016;7(3):189-200.
46. Liu B, Qian J, Wang Q, Wang F, Ma Z, Qiao Y. Butyrate protects rat liver against total hepatic ischemia reperfusion injury with bowel congestion. *PLoS One*. 2014;9(8):e106184.
47. Harmsen HJM, de Goffau MC. *The Human Gut Microbiota*. Schwiertz A, editor. *Microbiota of the human body: Implications in health and disease*. Switzerland: Springer International Publishing; 2016.
48. Zeng H, Chi H. Metabolic control of regulatory T cell development and function. *Trends Immunol*. 2015;36(1):3-12.
49. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly YM, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*. 2013;341(6145):569-73.
50. Wong J, Piceno YM, Desantis TZ, Pahl M, Andersen GL, Vaziri ND. Expansion of urease- and uricase-containing, indole- and p-cresol-forming and contraction of short-chain fatty acid-producing intestinal microbiota in ESRD. *Am J Nephrol*. 2014;39(3):230-7.
51. Hendriks TK, van Gurp EA, Mol WM, Schoordijk W, Sewgobind VD, Ijzermans JN, et al. End-stage renal failure and regulatory activities of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>FoxP3<sup>+</sup> T-cells. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24(6):1969-78.
52. Vaziri ND, Pahl MV, Crum A, Norris K. Effect of uremia on structure and function of immune system. *J Ren Nutr*. 2012;22(1):149-56.
53. Puddu A, Sanguineti R, Montecucco F, Viviani GL. Evidence for the gut microbiota short-chain fatty acids as key pathophysiological molecules improving diabetes. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:162021.
54. Zhang LS, Davies SS. Microbial metabolism of dietary components to bioactive metabolites: opportunities for new therapeutic interventions. *Genome Med*. 2016;8(1):46.
55. Ramezani A, Massy ZA, Meijers B, Evenepoel P, Vanholder R, Raj DS. Role of the Gut Microbiome in Uremia: A Potential Therapeutic Target. *Am J Kidney Dis*. 2016;67(3):483-98.
56. Lekawanvijit S, Kompa AR, Krum H. Protein-bound uremic toxins: a long overlooked culprit in cardiorenal syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016;311(1):F52-62.
57. Vanholder R, Glorieux G. The intestine and the kidneys: a bad marriage can be hazardous. *Clin Kidney J*. 2015;8(2):168-79.
58. Vaziri ND, Zhao YY, Pahl MV. Altered intestinal microbial flora and impaired epithelial barrier structure and function in CKD: the nature, mechanisms,

- consequences and potential treatment. *Nephrol Dial Transplant*. 2016;31(5):737-46.
59. Vaziri ND, Yuan J, Norris K. Role of urea in intestinal barrier dysfunction and disruption of epithelial tight junction in chronic kidney disease. *Am J Nephrol*. 2013;37(1):1-6.
  60. Anders HJ, Andersen K, Stecher B. The intestinal microbiota, a leaky gut, and abnormal immunity in kidney disease. *Kidney Int*. 2013;83(6):1010-6.
  61. Di Iorio BR, Marzocco S, Nardone L, Sirico M, De Simone E, Di Natale G, et al. Urea and impairment of the gut-kidney axis in chronic kidney disease. *G Ital Nefrol*. 2017;34:1-14.
  62. Depner TA. Uremic Toxicity. Nissenson AR, Fine RN, editors. *Handbook of dialysis therapy*. 5th ed. Philadelphia: Elsevier; 2017.
  63. Pletinck A, Vanholder R, Glorieux G. p-Cresyl sulfate. Niwa T, editor. *Uremic toxins*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2012.
  64. Poesen R, Viaene L, Verbeke K, Claes K, Bammens B, Sprangers B, et al. Renal clearance and intestinal generation of p-cresyl sulfate and indoxyl sulfate in CKD. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013;8(9):1508-14.
  65. Mair RD, Sirich TL, Meyer TW. Uremic toxin clearance and cardiovascular toxicities. *Toxins (Basel)*. 2018;10(6):1-16.
  66. Vanholder R, Schepers E, Pletinck A, Nagler EV, Glorieux G. The uremic toxicity of indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate: a systematic review. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(9):1897-907.
  67. Borges NA, Barros AF, Nakao LS, Dolenga CJ, Fouque D, Mafra D. Protein-bound uremic toxins from gut microbiota and inflammatory markers in chronic kidney disease. *J Ren Nutr*. 2016;26(6):396-400.
  68. Niwa T, Shimizu H. Indoxyl sulfate induces nephrovascular senescence. *J Ren Nutr*. 2012;22(1):102-6.
  69. Soulage CO, Koppe L, Fouque D. Protein-bound uremic toxins...new targets to prevent insulin resistance and dysmetabolism in patients with chronic kidney disease. *J Ren Nutr*. 2013;23(6):464-6.
  70. Meijers BK, Claes K, Bammens B, de Loo H, Viaene L, Verbeke K, et al. p-Cresol and cardiovascular risk in mild-to-moderate kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5(7):1182-9.
  71. Bammens B, Evenepoel P, Keuleers H, Verbeke K, Vanrenterghem Y. Free serum concentrations of the protein-bound retention solute p-cresol predict mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int*. 2006;69(6):1081-7.
  72. Meijers BK, Bammens B, De Moor B, Verbeke K, Vanrenterghem Y, Evenepoel P. Free p-cresol is associated with cardiovascular disease in hemodialysis patients. *Kidney Int*. 2008;73(10):1174-80.

73. Liabeuf S, Barreto DV, Barreto FC, Meert N, Glorieux G, Schepers E, ve ark. Free p-cresylsulphate is a predictor of mortality in patients at different stages of chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(4):1183-91.
74. Niewczas MA, Sirich TL, Mathew AV, Skupien J, Mohny RP, Warram JH, ve ark. Uremic solutes and risk of end-stage renal disease in type 2 diabetes: metabolomic study. *Kidney Int*. 2014;85(5):1214-24.
75. Lin CJ, Wu V, Wu PC, Wu CJ. Meta-Analysis of the associations of p-cresyl sulfate (PCS) and indoxyl sulfate (IS) with cardiovascular events and all-cause mortality in patients with chronic renal failure. *PLoS One*. 2015;10(7):e0132589.
76. Lau WL, Vaziri ND. The leaky gut and altered microbiome in chronic kidney disease. *J Ren Nutr*. 2017;27(6):458-61.
77. Vaziri ND, Yuan J, Rahimi A, Ni Z, Said H, Subramanian VS. Disintegration of colonic epithelial tight junction in uremia: a likely cause of CKD-associated inflammation. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;27(7):2686-93.
78. Vaziri ND, Yuan J, Nazertehrani S, Ni Z, Liu S. Chronic kidney disease causes disruption of gastric and small intestinal epithelial tight junction. *Am J Nephrol*. 2013;38(2):99-103.
79. Yoshifuji A, Wakino S, Irie J, Tajima T, Hasegawa K, Kanda T, ve ark. Gut *Lactobacillus* protects against the progression of renal damage by modulating the gut environment in rats. *Nephrol Dial Transplant*. 2016;31(3):401-12.
80. Vaziri ND, Goshtasbi N, Yuan J, Jellbauer S, Moradi H, Raffatellu M, ve ark. Uremic plasma impairs barrier function and depletes the tight junction protein constituents of intestinal epithelium. *Am J Nephrol*. 2012;36(5):438-43.
81. Lau WL, Kalantar-Zadeh K, Vaziri ND. The gut as a source of inflammation in chronic kidney disease. *Nephron*. 2015;130(2):92-8.
82. Lau WL, Liu SM, Pahlevan S, Yuan J, Khazaeli M, Ni Z, ve ark. Role of Nrf2 dysfunction in uremia-associated intestinal inflammation and epithelial barrier disruption. *Dig Dis Sci*. 2015;60(5):1215-22.
83. McIntyre CW, Harrison LEA, Eldehni MT, Jefferies HJ, Szeto C-C, John SG, ve ark. Circulating endotoxemia: a novel factor in systemic inflammation and cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6(1):133-41.
84. Bossola M, Sanguinetti M, Scribano D, Zuppi C, Giungi S, Luciani G, ve ark. Circulating bacterial-derived DNA fragments and markers of inflammation in chronic hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4(2):379-85.
85. Feroze U, Kalantar-Zadeh K, Sterling KA, Molnar MZ, Noori N, Benner D, ve ark. Examining associations of circulating endotoxin with nutritional status, inflammation, and mortality in hemodialysis patients. *J Ren Nutr*. 2012;22(3):317-26.

86. Wu IW, Hsu KH, Lee CC, Sun CY, Hsu HJ, Tsai CJ, ve ark. p-Cresyl sulphate and indoxyl sulphate predict progression of chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(3):938-47.
87. Motojima M, Hosokawa A, Yamato H, Muraki T, Yoshioka T. Uremic toxins of organic anions up-regulate PAI-1 expression by induction of NF-kappaB and free radical in proximal tubular cells. *Kidney Int*. 2003;63(5):1671-80.
88. Shimizu H, Bolati D, Adijiang A, Enomoto A, Nishijima F, Dateki M, ve ark. Senescence and dysfunction of proximal tubular cells are associated with activated p53 expression by indoxyl sulfate. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010;299(5):C1110-7.
89. Shimizu H, Bolati D, Adijiang A, Muteliefu G, Enomoto A, Nishijima F, ve ark. NF-kappaB plays an important role in indoxyl sulfate-induced cellular senescence, fibrotic gene expression, and inhibition of proliferation in proximal tubular cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011;301(5):C1201-12.
90. Adijiang A, Goto S, Uramoto S, Nishijima F, Niwa T. Indoxyl sulphate promotes aortic calcification with expression of osteoblast-specific proteins in hypertensive rats. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23(6):1892-901.
91. Niwa T, Ise M. Indoxyl sulfate, a circulating uremic toxin, stimulates the progression of glomerular sclerosis. *J Lab Clin Med*. 1994;124(1):96-104.
92. Watanabe H, Miyamoto Y, Honda D, Tanaka H, Wu Q, Endo M, ve ark. p-Cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress by activation of NADPH oxidase. *Kidney Int*. 2013;83(4):582-92.
93. Miyazaki T, Ise M, Hirata M, Endo K, Ito Y, Seo H, ve ark. Indoxyl sulfate stimulates renal synthesis of transforming growth factor-beta 1 and progression of renal failure. *Kidney Int Suppl*. 1997;63:S211-4.
94. Ichii O, Otsuka-Kanazawa S, Nakamura T, Ueno M, Kon Y, Chen W, ve ark. Podocyte injury caused by indoxyl sulfate, a uremic toxin and aryl-hydrocarbon receptor ligand. *PLoS One*. 2014;9(9):e108448.
95. Gorin Y. Nox4 as a potential therapeutic target for treatment of uremic toxicity associated to chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2013;83(4):541-3.
96. Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids. Washington, DC: The National Academies Press; 2005. <https://doi.org/10.17226/10490>.
97. Krishnamurthy VMR, Wei G, Baird BC, Murtaugh M, Chonchol MB, Raphael KL, ve ark. High dietary fiber intake is associated with decreased inflammation and all-cause mortality in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2012;81(3):300-6.
98. Chan M, Kelly J, Tapsell L. Dietary modeling of foods for advanced CKD based on general healthy eating guidelines: What should be on the plate? *Am J Kidney Dis*. 2017;69(3):436-50.

99. Gökmen-Özel H. Glisemik indeks ve yük: Gerçekler ve çelişkiler. Tayfur M, Yabancı-Ayhan N, editörler. Beslenme ve diyetetik güncel konular-II. Ankara: Hatipoğlu Yayınevi; 2015.
100. Nişancı-Kılınç F. Diyet posası ve sağlık. Tayfur M, Yabancı-Ayhan N, editörler. Beslenme ve diyetetik güncel konular-II. Ankara: Hatipoğlu Yayınevi; 2015.
101. de Morais EC. Prebiotic addition in dairy products: Processing and health benefits. Preedy VR, Watson, RR, editors. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Bioactive Foods in Health Promotion. London: Academic Press; 2016.
102. Gibson GR, Probert HM, Loo JV, Rastall RA, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev.* 2004;17(2):259-75.
103. Vince AJ, McNeil NI, Wager JD, Wrong OM. The effect of lactulose, pectin, arabinogalactan and cellulose on the production of organic acids and metabolism of ammonia by intestinal bacteria in a faecal incubation system. *Br J Nutr.* 1990;63(1):17-26.
104. Bonnema AL, Kolberg LW, Thomas W, Slavin JL. Gastrointestinal tolerance of chicory inulin products. *J Am Diet Assoc.* 2010;110(6):865-8.
105. Mensink MA, Frijlink HW, van der Voort Maarschalk K, Hinrichs WL. Inulin, a flexible oligosaccharide. II: Review of its pharmaceutical applications. *Carbohydr Polym.* 2015;134:418-28.
106. Mensink MA, Frijlink HW, van der Voort Maarschalk K, Hinrichs WL. Inulin, a flexible oligosaccharide I: Review of its physicochemical characteristics. *Carbohydr Polym.* 2015;130:405-19.
107. Niness KR. Inulin and oligofructose: What are they?. *J Nutr.* 1999;129(7 Suppl):1402s-6s.
108. Roberfroid MB. Inulin-type fructans: Functional food ingredients. *J Nutr.* 2007;137(11 Suppl):2493s-502s.
109. Meijers BK, De Preter V, Verbeke K, Vanrenterghem Y, Evenepoel P. p-Cresyl sulfate serum concentrations in haemodialysis patients are reduced by the prebiotic oligofructose-enriched inulin. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25(1):219-24.
110. Sirich TL, Plummer NS, Gardner CD, Hostetter TH, Meyer TW. Effect of increasing dietary fiber on plasma levels of colon-derived solutes in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014;9(9):1603-10.
111. Rossi M, Johnson DW, Morrison M, Pascoe EM, Coombes JS, Forbes JM, ve ark. Synbiotics Easing Renal Failure by Improving Gut Microbiology (SYNERGY): A randomized trial. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2016;11(2):223-31.
112. Vanholder RC, Eloit S, Glorieux GL. Future Avenues to decrease uremic toxin concentration. *Am J Kidney Dis.* 2016;67(4):664-76.

113. Liabeuf S, Villain C, Massy ZA. Protein-bound toxins: has the Cinderella of uraemic toxins turned into a princess? *Clin Sci (Lond)*. 2016;130(23):2209-16.
114. McFarlane C, Ramos CI, Johnson DW, Campbell KL. Prebiotic, probiotic, and synbiotic supplementation in chronic kidney disease: A systematic review and meta-analysis. *J Ren Nutr*. 2019;29(3):209-20.
115. Poesen R, Evenepoel P, de Loor H, Delcour JA, Courtin CM, Kuypers D, ve ark. The influence of prebiotic arabinoxylan oligosaccharides on microbiota derived uremic retention solutes in patients with chronic kidney disease: A randomized controlled trial. *PLoS One*. 2016;11(4):e0153893.
116. Bliss DZ, Stein TP, Schleifer CR, Settle RG. Supplementation with gum arabic fiber increases fecal nitrogen excretion and lowers serum urea nitrogen concentration in chronic renal failure patients consuming a low-protein diet. *Am J Clin Nutr*. 1996;63(3):392-8.
117. Younes H, Egret N, Hadj-Abdelkader M, Remesy C, Demigne C, Gueret C, ve ark. Fermentable carbohydrate supplementation alters nitrogen excretion in chronic renal failure. *J Ren Nutr*. 2006;16(1):67-74.
118. Wang IK, Lai HC, Yu CJ, Liang CC, Chang CT, Kuo HL, ve ark. Real-time PCR analysis of the intestinal microbiotas in peritoneal dialysis patients. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(4):1107-12.
119. Jiang S, Xie S, Lv D, Wang P, He H, Zhang T, ve ark. Alteration of the gut microbiota in Chinese population with chronic kidney disease. *Sci Rep*. 2017;7(1):2870.
120. Hung TV, Suzuki T. Dietary fermentable fibers attenuate chronic kidney disease in mice by protecting the intestinal barrier. *J Nutr*. 2018;148(4):552-61.
121. Kobayashi M, Mikami D, Kimura H, Kamiyama K, Morikawa Y, Yokoi S, ve ark. Short-chain fatty acids, GPR41 and GPR43 ligands, inhibit TNF-alpha-induced MCP-1 expression by modulating p38 and JNK signaling pathways in human renal cortical epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;486(2):499-505.
122. Dou L, Sallee M, Cerini C, Poitevin S, Gondouin B, Jourde-Chiche N, ve ark. The cardiovascular effect of the uremic solute indole-3 acetic acid. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(4):876-87.
123. Rossi M, Campbell KL, Johnson DW, Stanton T, Vesey DA, Coombes JS, ve ark. Protein-bound uremic toxins, inflammation and oxidative stress: a cross-sectional study in stage 3-4 chronic kidney disease. *Arch Med Res*. 2014;45(4):309-17.
124. Ramos CI, Armani RG, Canziani MEF, Dalboni MA, Dolenga CJR, Nakao LS, ve ark. Effect of prebiotic (fructooligosaccharide) on uremic toxins of chronic kidney disease patients: A randomized controlled trial. *Nephrol Dial Transplant*. 2018;34(11):1876-84.

125. Kelly G. Inulin-type prebiotics--A review: Part 1. *Altern Med Rev.* 2008;13(4):315-29.
126. Smith EA, Macfarlane GT. Enumeration of human colonic bacteria producing phenolic and indolic compounds: effects of pH, carbohydrate availability and retention time on dissimilatory aromatic amino acid metabolism. *J Appl Bacteriol.* 1996;81(3):288-302.
127. Salmean YA, Segal MS, Pali SP, Dahl WJ. Fiber supplementation lowers plasma p-cresol in chronic kidney disease patients. *J Ren Nutr.* 2015;25(3):316-20.
128. Iwashita Y, Ohya M, Yashiro M, Sonou T, Kawakami K, Nakashima Y, ve ark. Dietary changes involving *Bifidobacterium longum* and other nutrients delays chronic kidney disease progression. *Am J Nephrol.* 2018;47(5):325-32.
129. Furuse SU, Ohse T, Jo-Watanabe A, Shigehisa A, Kawakami K, Matsuki T, ve ark. Galacto-oligosaccharides attenuate renal injury with microbiota modification. *Physiol Rep.* 2014;2(7):e12029.
130. Kieffer DA, Piccolo BD, Vaziri ND, Liu S, Lau WL, Khazaeli M, ve ark. Resistant starch alters gut microbiome and metabolomic profiles concurrent with amelioration of chronic kidney disease in rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2016;310(9):F857-71.
131. Henley C, Davis J, Miller G, Shatzen E, Cattley R, Li X, ve ark. The calcimimetic AMG 641 abrogates parathyroid hyperplasia, bone and vascular calcification abnormalities in uremic rats. *Eur J Pharmacol.* 2009;616(1-3):306-13.
132. Katsumata K, Kusano K, Hirata M, Tsunemi K, Nagano N, Burke SK, ve ark. Sevelamer hydrochloride prevents ectopic calcification and renal osteodystrophy in chronic renal failure rats. *Kidney Int.* 2003;64(2):441-50.
133. Matsui I, Hamano T, Mikami S, Fujii N, Takabatake Y, Nagasawa Y, ve ark. Fully phosphorylated fetuin-A forms a mineral complex in the serum of rats with adenine-induced renal failure. *Kidney Int.* 2009;75(9):915-28.
134. Neven E, Dams G, Postnov A, Chen B, De Clerck N, De Broe ME, ve ark. Adequate phosphate binding with lanthanum carbonate attenuates arterial calcification in chronic renal failure rats. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24(6):1790-9.
135. Price PA, Roublick AM, Williamson MK. Artery calcification in uremic rats is increased by a low protein diet and prevented by treatment with ibandronate. *Kidney Int.* 2006;70(9):1577-83.
136. Tamagaki K, Yuan Q, Ohkawa H, Imazeki I, Moriguchi Y, Imai N, ve ark. Severe hyperparathyroidism with bone abnormalities and metastatic calcification in rats with adenine-induced uraemia. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21(3):651-9.
137. Terai K, Nara H, Takakura K, Mizukami K, Sanagi M, Fukushima S, ve ark. Vascular calcification and secondary hyperparathyroidism of severe chronic

- kidney disease and its relation to serum phosphate and calcium levels. *Br J Pharmacol*. 2009;156(8):1267-78.
138. Claramunt D, Gil-Pena H, Fuente R, Hernandez-Frias O, Santos F. Animal models of pediatric chronic kidney disease. Is adenine intake an appropriate model? *Nefrologia*. 2015;35(6):517-22.
  139. Chen DQ, Chen H, Chen L, Vaziri ND, Wang M, Li XR, ve ark. The link between phenotype and fatty acid metabolism in advanced chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2017;32(7):1154-66.
  140. Hoentjen F, Welling GW, Harmsen HJ, Zhang X, Snart J, Tannock GW, ve ark. Reduction of colitis by prebiotics in HLA-B27 transgenic rats is associated with microflora changes and immunomodulation. *Inflamm Bowel Dis*. 2005;11(11):977-85.
  141. ICH, 2005. Q2 (R1), Validation of analytical procedures: Text and methodology, ICH Harmonised Tripartite Guideline. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Chicago, USA, 2005.
  142. Ali BH, Alza'abi M, Ramkumar A, Al-Lawati I, Waly MI, Beegam S, ve ark. The effect of activated charcoal on adenine-induced chronic renal failure in rats. *Food Chem Toxicol*. 2014;65:321-8.
  143. Hayran M, Hayran M. Sağlık Araştırmaları İçin Temel İstatistik. Ankara: Art Ofset Matbaacılık Yayıncılık Organizasyon; 2011.
  144. Bossola M, Tazza L, Giungi S, Luciani G. Anorexia in hemodialysis patients: An update. *Kidney Int*. 2006;70(3):417-22.
  145. Bossola M, Giungi S, Luciani G, Tazza L. Interventions to counteract anorexia in dialysis patients. *J Ren Nutr*. 2011;21(1):16-9.
  146. Cumin F, Baum HP, Levens N. Leptin is cleared from the circulation primarily by the kidney. *Int J Obes*. 1996;20(12):1120-6.
  147. Sharma K, Considine RV, Michael B, Dunn SR, Weisberg LS, Kurnik BR, ve ark. Plasma leptin is partly cleared by the kidney and is elevated in hemodialysis patients. *Kidney Int*. 1997;51(6):1980-5.
  148. Al Za'abi M, Al Salam S, Al Suleimani Y, Manoj P, Nemmar A, Ali BH. Gum acacia improves renal function and ameliorates systemic inflammation, oxidative and nitrosative stress in streptozotocin-induced diabetes in rats with adenine-induced chronic kidney disease. *Cell Physiol Biochem*. 2018;45(6):2293-304.
  149. Ali BH, Al-Husseni I, Beegam S, Al-Shukaili A, Nemmar A, Schierling S, ve ark. Effect of gum arabic on oxidative stress and inflammation in adenine-induced chronic renal failure in rats. *PLoS One*. 2013;8(2):e55242.



150. Mihai S, Codrici E, Popescu ID, Enciu AM, Albuлесcu L, Necula LG, ve ark. Inflammation-related mechanisms in chronic kidney disease prediction, progression, and outcome. *J Immunol Res*. 2018;2018:2180373.
151. Evenepoel P, Meijers BK, Bammens BR, Verbeke K. Uremic toxins originating from colonic microbial metabolism. *Kidney Int Suppl*. 2009(114):S12-9.
152. Zhang C, Yin A, Li H, Wang R, Wu G, Shen J, ve ark. Dietary modulation of gut microbiota contributes to alleviation of both genetic and simple obesity in children. *EBioMedicine*. 2015;2(8):968-84.
153. Chassaing B, Miles-Brown J, Pellizzon M, Ulman E, Ricci M, Zhang L, ve ark. Lack of soluble fiber drives diet-induced adiposity in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2015;309(7):G528-41.
154. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, ve ark. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56(7):1761-72.
155. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, ve ark. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008;57(6):1470-81.
156. Cani PD. Crosstalk between the gut microbiota and the endocannabinoid system: impact on the gut barrier function and the adipose tissue. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18 Suppl 4:50-3.
157. Arora T, Loo RL, Anastasovska J, Gibson GR, Tuohy KM, Sharma RK, ve ark. Differential effects of two fermentable carbohydrates on central appetite regulation and body composition. *PLoS One*. 2012;7(8):e43263.
158. Byrne CS, Chambers ES, Morrison DJ, Frost G. The role of short chain fatty acids in appetite regulation and energy homeostasis. *Int J Obes (Lond)*. 2015;39(9):1331-8.
159. den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res*. 2013;54(9):2325-40.
160. Delzenne NM, Cani PD, Daubioul C, Neyrinck AM. Impact of inulin and oligofructose on gastrointestinal peptides. *Br J Nutr*. 2005;93 Suppl 1:S157-61.
161. Cani PD, Neyrinck AM, Maton N, Delzenne NM. Oligofructose promotes satiety in rats fed a high-fat diet: involvement of glucagon-like Peptide-1. *Obes Res*. 2005;13(6):1000-7.
162. Hoibian E, Florens N, Koppe L, Vidal H, Soulage CO. Distal colon motor dysfunction in mice with chronic kidney disease: Putative role of uremic toxins. *Toxins (Basel)*. 2018;10(5):1-15.

163. Barrios C, Beaumont M, Pallister T, Villar J, Goodrich JK, Clark A, ve ark. Gut-microbiota-metabolite axis in early renal function decline. *PLoS One*. 2015;10(8):e0134311.
164. Wu W, Bush KT, Nigam SK. Key role for the organic anion transporters, OAT1 and OAT3, in the in vivo handling of uremic toxins and solutes. *Sci Rep*. 2017;7(1):1-9.
165. Wang K, Kestenbaum B. Proximal tubular secretory clearance: A neglected partner of kidney function. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2018;13(8):1291-6.
166. Deltombe O, Van Biesen W, Glorieux G, Massy Z, Dhondt A, Eloit S. Exploring protein binding of uremic toxins in patients with different stages of chronic kidney disease and during hemodialysis. *Toxins (Basel)*. 2015;7(10):3933-46.
167. Smith EA, Macfarlane GT. Formation of phenolic and indolic compounds by anaerobic bacteria in the human large intestine. *Microb Ecol*. 1997;33(3):180-8.
168. Elamin S, Alkhawaja MJ, Bukhamsin AY, Idris MAS, Abdelrahman MM, Abutaleb NK, ve ark. Gum arabic reduces C-reactive protein in chronic kidney disease patients without affecting urea or indoxyl sulfate levels. *Int J Nephrol*. 2017;2017:9501470.
169. Sirich TL, Aronov PA, Plummer NS, Hostetter TH, Meyer TW. Numerous protein-bound solutes are cleared by the kidney with high efficiency. *Kidney Int*. 2013;84(3):585-90.
170. Khoury T, Tzukert K, Abel R, Abu Rmeileh A, Levi R, Ilan Y. The gut-kidney axis in chronic renal failure: A new potential target for therapy. *Hemodial Int*. 2017;21(3):323-34.
171. Kanbay M, Onal EM, Afsar B, Dagel T, Yerlikaya A, Covic A, ve ark. The crosstalk of gut microbiota and chronic kidney disease: Role of inflammation, proteinuria, hypertension, and diabetes mellitus. *Int Urol Nephrol*. 2018;50(8):1453-66.
172. Jakobsson HE, Rodriguez-Pineiro AM, Schutte A, Ermund A, Boysen P, Bemark M, ve ark. The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. *EMBO Rep*. 2015;16(2):164-77.
173. Omenetti S, Pizarro TT. The Treg/Th17 axis: A dynamic balance regulated by the gut microbiome. *Front Immunol*. 2015;6:639.
174. Shi K, Wang F, Jiang H, Liu H, Wei M, Wang Z, ve ark. Gut bacterial translocation may aggravate microinflammation in hemodialysis patients. *Dig Dis Sci*. 2014;59(9):2109-17.
175. Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int*. 1999;55(2):648-58.

176. Qureshi AR, Alvestrand A, Divino-Filho JC, Gutierrez A, Heimbürger O, Lindholm B, ve ark. Inflammation, malnutrition, and cardiac disease as predictors of mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13 Suppl 1:S28-36.
177. Honda H, Qureshi AR, Heimbürger O, Barany P, Wang K, Pecoits-Filho R, ve ark. Serum albumin, C-reactive protein, interleukin 6, and fetuin A as predictors of malnutrition, cardiovascular disease, and mortality in patients with ESRD. *Am J Kidney Dis*. 2006;47(1):139-48.
178. Panichi V, Maggiore U, Taccola D, Migliori M, Rizza GM, Consani C, ve ark. Interleukin-6 is a stronger predictor of total and cardiovascular mortality than C-reactive protein in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19(5):1154-60.
179. Pecoits-Filho R, Bárány P, Lindholm B, Heimbürger O, Stenvinkel P. Interleukin-6 is an independent predictor of mortality in patients starting dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17(9):1684-8.
180. Gouroju S, Rao P, Bitla AR, Vinapamula KS, Manohar SM, Vishnubhotla S. Role of gut-derived uremic toxins on oxidative stress and inflammation in patients with chronic kidney disease. *Indian J Nephrol*. 2017;27(5):359-64.
181. Hsu HJ, Yen CH, Wu IW, Hsu KH, Chen CK, Sun CY, ve ark. The association of uremic toxins and inflammation in hemodialysis patients. *PLoS One*. 2014;9(7):e102691.
182. Poveda J, Sanchez-Nino MD, Glorieux G, Sanz AB, Egido J, Vanholder R, ve ark. p-Cresyl sulphate has pro-inflammatory and cytotoxic actions on human proximal tubular epithelial cells. *Nephrol Dial Transplant*. 2014;29(1):56-64.
183. Chang PV, Hao L, Offermanns S, Medzhitov R. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(6):2247-52.
184. Esgalhado M, Kemp JA, Azevedo R, Paiva BR, Stockler-Pinto MB, Dolenga CJ, ve ark. Could resistant starch supplementation improve inflammatory and oxidative stress biomarkers and uremic toxins levels in hemodialysis patients? A pilot randomized controlled trial. *Food Funct*. 2018;9(12):6508-16.
185. Laffin MR, Tayebi Khosroshahi H, Park H, Laffin LJ, Madsen K, Kafil HS, ve ark. Amylose resistant starch (HAM-RS2) supplementation increases the proportion of Faecalibacterium bacteria in end-stage renal disease patients: Microbial analysis from a randomized placebo-controlled trial. *Hemodial Int*. 2019;23(3):343-7.
186. Small DM, Coombes JS, Bennett N, Johnson DW, Gobe GC. Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease. *Nephrology (Carlton)*. 2012;17(4):311-21.

187. Sueyoshi M, Fukunaga M, Mei M, Nakajima A, Tanaka G, Murase T, ve ark. Effects of lactulose on renal function and gut microbiota in adenine-induced chronic kidney disease rats. *Clin Exp Nephrol*. 2019;23(7):908-19.
188. Sun CY, Chang SC, Wu MS. Suppression of Klotho expression by protein-bound uremic toxins is associated with increased DNA methyltransferase expression and DNA hypermethylation. *Kidney Int*. 2012;81(7):640-50.
189. Sun CY, Hsu HH, Wu MS. p-Cresol sulfate and indoxyl sulfate induce similar cellular inflammatory gene expressions in cultured proximal renal tubular cells. *Nephrol Dial Transplant*. 2013;28(1):70-8.
190. Shimizu H, Yisireyili M, Nishijima F, Niwa T. Indoxyl sulfate enhances p53-TGF-beta1-Smad3 pathway in proximal tubular cells. *Am J Nephrol*. 2013;37(2):97-103.
191. Sun CY, Chang SC, Wu MS. Uremic toxins induce kidney fibrosis by activating intrarenal renin-angiotensin-aldosterone system associated epithelial-to-mesenchymal transition. *PLoS One*. 2012;7(3):e34026.
192. Kim SH, Yu MA, Ryu ES, Jang YH, Kang DH. Indoxyl sulfate-induced epithelial-to-mesenchymal transition and apoptosis of renal tubular cells as novel mechanisms of progression of renal disease. *Lab Invest*. 2012;92(4):488-98.
193. Enomoto A, Takeda M, Tojo A, Sekine T, Cha SH, Khamdang S, ve ark. Role of organic anion transporters in the tubular transport of indoxyl sulfate and the induction of its nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13(7):1711-20.
194. Adijiang A, Shimizu H, Higuchi Y, Nishijima F, Niwa T. Indoxyl sulfate reduces klotho expression and promotes senescence in the kidneys of hypertensive rats. *J Ren Nutr*. 2011;21(1):105-9.
195. Chen DQ, Cao G, Chen H, Liu D, Su W, Yu XY, ve ark. Gene and protein expressions and metabolomics exhibit activated redox signaling and wnt/beta-catenin pathway are associated with metabolite dysfunction in patients with chronic kidney disease. *Redox Biol*. 2017;12:505-21.
196. Durak I, Kacmaz M, Elgun S, Ozturk HS. Oxidative stress in patients with chronic renal failure: effects of hemodialysis. *Med Princ Pract*. 2004;13(2):84-7.
197. Chao CT, Chiang CK. Uremic toxins, oxidative stress, and renal fibrosis: an intertwined complex. *J Ren Nutr*. 2015;25(2):155-9.
198. Bai Y, Sigala W, Adams GR, Vaziri ND. Effect of exercise on cardiac tissue oxidative and inflammatory mediators in chronic kidney disease. *Am J Nephrol*. 2009;29(3):213-21.
199. Dou L, Jourde-Chiche N, Faure V, Cerini C, Berland Y, Dignat-George F, ve ark. The uremic solute indoxyl sulfate induces oxidative stress in endothelial cells. *J Thromb Haemost*. 2007;5(6):1302-8.

200. Shimizu H, Yisireyili M, Higashiyama Y, Nishijima F, Niwa T. Indoxyl sulfate upregulates renal expression of ICAM-1 via production of ROS and activation of NF-kappaB and p53 in proximal tubular cells. *Life Sci.* 2013;92(2):143-8.
201. Schepers E, Meert N, Glorieux G, Goeman J, Van der Eycken J, Vanholder R. P-cresylsulphate, the main in vivo metabolite of p-cresol, activates leucocyte free radical production. *Nephrol Dial Transplant.* 2007;22(2):592-6.
202. Owada S, Goto S, Bannai K, Hayashi H, Nishijima F, Niwa T. Indoxyl sulfate reduces superoxide scavenging activity in the kidneys of normal and uremic rats. *Am J Nephrol.* 2008;28(3):446-54.
203. Niwa T. Indoxyl sulfate is a nephro-vascular toxin. *J Ren Nutr.* 2010;20(5 Suppl):S2-6.
204. Lopes R, de Lima SLS, da Silva BP, Toledo RCL, Moreira MEC, Anunciacao PC, ve ark. Evaluation of the health benefits of consumption of extruded tannin sorghum with unfermented probiotic milk in individuals with chronic kidney disease. *Food Res Int.* 2018;107:629-38.
205. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(11):799-809.
206. Al-Sadi R, Khatib K, Guo S, Ye D, Youssef M, Ma T. Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;300(6):G1054-64.
207. Markov AG, Veshnyakova A, Fromm M, Amasheh M, Amasheh S. Segmental expression of claudin proteins correlates with tight junction barrier properties in rat intestine. *J Comp Physiol B.* 2010;180(4):591-8.
208. Yang T, Richards EM, Pepine CJ, Raizada MK. The gut microbiota and the brain-gut-kidney axis in hypertension and chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2018;14(7):442-56.
209. Wong X, Carrasco-Pozo C, Escobar E, Navarrete P, Blachier F, Andriamihaja M, ve ark. Deleterious effect of p-cresol on human colonic epithelial cells prevented by proanthocyanidin-containing polyphenol extracts from fruits and proanthocyanidin bacterial metabolites. *J Agric Food Chem.* 2016;64(18):3574-83.