



Yoğun Bakımda Trakeal Aspirasyon Sıvısındaki Akut Böbrek Yetmezliği Biyobelirteçlerinin Mortalite Üzerine Etkisi

The Effect of Acute Renal Failure Biomarkers in Tracheal Aspiration Fluid on Mortality in the Intensive Care Unit

Pınar Ayvat¹, Gülden Diniz²

¹İzmir Demokrasi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anestezi ve Reanimasyon Ana Bilim Dalı, İzmir, Türkiye

²İzmir Demokrasi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Ana Bilim Dalı, İzmir, Türkiye

Öz

Amaç: Akut böbrek yetersizliği sepsiste en sık görülen komplikasyonlardan biridir ve mortalite nedenlerindedir. Böbrek hasarının erken göstergelerinden olan nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin (NGAL) ve böbrek hasarı Molekül-1 (KIM-1) proteinlerinin akciğer sıvılarında izlenmesinin sepsiste mortalite gelişimini erken dönemde öngörebileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada; alveolar nötrofillerde NGAL ve KIM-1 varlığı ile sepsiste böbrek hasarına bağlı mortalite arasındaki ilişki araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntemler: Takibini yaptığımız Covid-19 olmayan hastalardan alınan trakeal aspirasyon sıvısına hücre blokması yapılmış ve immunohistokimyasal boyama ile boyanmıştır.

Bulgular: Çalışmaya toplam 56 hasta alınmıştır. Hastaların yaş ortalaması 70,13±13 yıl, yoğun bakımda ortalama takip süresi 27.5±18.3 gündür. Hastaların 19'unda (%33.9) makrofajlarda veya nötrofillerde NGAL proteini saptandı. NGAL ekspresyonunun varlığı ile cinsiyet (p=0,931), sepsis varlığı (p=0,293) ve sağ kalım arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı (p=0,134). Trakeal aspirasyon örneğinde %3'ün üzerinde şiddetli yangı hücresi varlığı olan şiddetli sepsisteki hastalar incelendiğinde (n=39), NGAL ekspresyonunun varlığı ile cinsiyet (p=0,250), sepsis varlığı (p=0,206) ve sağ kalım (p=0,151) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı. KIM-1 ekspresyonu sadece 2 olgunun materyalindeki epitel hücrelerinde soluk pozitif olup, istatistiksel anlamlılık yoktu.

Sonuç: Sepsis, yoğun bakım ünitelerinde sık karşılaşılan ölüm nedenlerinden olup, çoklu organ yetersizliğine gidebilen sistemik komplikasyonlara yol açar. Akut böbrek yetersizliği en sık görülen

komplikasyonlardan biridir ve mortalite nedenlerindedir. Böbrek hasarının erken göstergelerinden olan NGAL ve KIM-1 proteinlerinin akciğer sıvılarında izlenmesinin mortalite hakkında fikir verebileceğini düşünsek de muhtemelen olgu sayısının azlığı nedeniyle çalışmamızda anlamlı istatistiksel ilişki saptayamadık. Sorguladığımız ilişkinin geniş serilerde araştırılmasının önemli olduğunu düşünüyoruz

Anahtar Sözcükler: Yoğun bakım; biyobelirteç; mortalite; sepsis

Abstract

Aim: Acute renal failure is one of the most common complications in sepsis and is a cause of mortality. It is thought that monitoring of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and kidney damage Molecule-1 (KIM-1) proteins in lung fluids, which are early indicators of kidney damage, may predict the development of mortality in sepsis in the early period. In this study; The relationship between the presence of NGAL and KIM-1 in alveolar neutrophils and mortality due to kidney damage in sepsis was investigated.

Material and methods: Cell blocking was performed on tracheal aspiration fluid taken from non-Covid-19 patients we followed up and stained with immunohistochemical staining.

Results: A total of 56 patients were included in the study. The mean age of the patients was 70.13±13, and the mean follow-up period in the intensive care unit was 27.5±18.3 days. NGAL protein was detected in macrophages or neutrophils in 19 (33.9%) of 56 patients. No statistically significant correlation was found between the presence of NGAL expression and gender (p=0.931), the presence of sepsis (p=0.293),

and survival ($p=0.134$). When patients with severe sepsis with more than 3% inflammatory cells in the tracheal aspiration sample were analyzed ($n=39$), there was no statistical difference between the presence of NGAL expression and gender ($p=0.250$), presence of sepsis ($p=0.206$) and survival ($p=0.151$). KIM-1 expression was faintly positive in epithelial cells in the material of only 2 cases, and there was no statistical significance.

Conclusion: Sepsis is a common cause of death in intensive care units and causes systemic complications that can lead to multi-organ failure. Acute renal failure is one of the most common complications and a cause of mortality. Although we think that monitoring of NGAL and KIM-1 proteins, which are early indicators of kidney damage, in lung fluids may give us an idea about mortality, we could not detect a significant statistical relationship in our study, probably due to the small number of cases. We think it is important to investigate the possible relationship we questioned in larger series

Keywords: Critical care; biomarker; mortality; sepsis

Giriş

İlk kez 1991 yılında tanımlanan ve zaman içerisinde tanı kriterleri güncellenen sepsis, günümüzde hala dünya çapında önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olmaya devam etmektedir (1). Bir çalışmada, yıllık 31,5 milyon sepsis ve 19,4 milyon şiddetli sepsis vakası görüldüğü bildirilmektedir (2). Sepsisin patogenezi karmaşıktır ve enfekte eden mikroorganizmalar ile konakçı arasındaki etkileşimin birçok yönünü içerir. Konakçının verdiği yanıt çeşitli faktörlere bağlıdır ve mortalitede önemlidir (3).

Nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin (NGAL), ilk olarak nötrofillerde matris metalloproteinaz 9'a kovalent olarak bağlanan bir glikoprotein olarak izole edilmiştir (4). Nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin, inflamasyon ve doku hasarına yanıt olarak esas olarak nötrofillerden hızla salınması nedeniyle başlangıçta akut faz proteini olarak sınıflandırılmıştır (4,5). Bağışıklık sistemlerinin çeşitli hücrelerinden ekspresyonu nedeniyle doğal bağışıklığın antibakteriyel faktörü olarak bilinmektedir (6). Olgunlaşmamış kemik iliği progenitor hücreleri, granülosit öncüleri, aktive edilmiş monositler, makrofajlar ve nötrofiller NGAL eksprese ederken; lenfositler ve plazma hücreleri edemezler. Sağlıklı insanların kanında ve idrarında düşük miktarda böbrek epitel hücreleri ve nötrofiller tarafından üretilen NGAL bulunur (4-6). Nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalinin ekspresyonu, immün yanıtın düzenlenmesi, hidrofobik moleküllerin hücre zarları

boyunca taşınması, demir metabolizmasının düzenlenmesi ve epitelyalden mezenkimal transilyasyonların (EMT) desteklenmesi dahil olmak üzere birçok fizyolojik rol oynayabilir. Özetle, NGAL, çeşitli gelişim, büyüme ve tümörjenez süreçleri sırasında hayati birçok işlevi yerine getirir (6,7).

Böbrek hasarı molekül-1 (KIM-1) ilk olarak 1996 yılında, hepatit A virüsünün hücre içine penetrasyonunu kolaylaştıran immünoglobulin ailesi proteinlerine homolog olan müsin benzeri bir membran glikoproteini tip I olarak belirlenmiştir. Bu nedenle hepatit A virüsü hücre reseptörü 1 (HAVcr-1) olarak adlandırılmıştır. İki yıl sonra renal proksimal tübül hasarının çok spesifik ve duyarlı bir belirleyicisi olduğu bulunmuş ve KIM-1 olarak tanımlanmıştır (8). 2000'li yıllarda, özellikle solunum sisteminde görev yapan T hücrelerinde eksprese edilen T-hücre immünoglobulin ve müsin (TIM) domain ailesine ait bir grup protein belirlendi. Bu proteinlerden biri olan TIM-1 de KIM-1'e homologdur. Özetle günümüzde biyolojik veri tabanlarında bahsedilen HAVcr-1, KIM-1 ve TIM-1 (CD365) tanımları aynı proteini tanımlamaktadır (9,10). Böbrek hasarı molekül-1 sağlıklı böbrekte düşük bir seviyede eksprese edilir. Bununla birlikte, hücre ilişkili KIM-1 ekspresyonu, iskemik böbrekte önemli ölçüde artar ve böbrek hasarından sonra anti-inflamatuar bir rol oynar (11). Günümüzde, antikor aracılı hedefe yönelik tedavilerin umut verici hedefi olarak düşünülmektedir. Çünkü sağlıklı dokularda çok sınırlı ölçüde salgılanırken, başta over ve böbrek kansinmaları olmak üzere birçok insan kanserinde salınımının arttığı tespit edilmiştir. T-hücre immünoglobulin ve müsinin ekstrasellüler kısmına spesifik olan bir insan monoklonal IgG1 antikorunu yakın zamanda geliştirilmiştir. Bu antikorun (CDX-014) çeşitli dönüştürülmüş hücre hatlarında eksprese edilen saflaştırılmış rekombinant kimerik TIM-1-Fc proteini ve TIM-1'i bağladığı gösterilmiştir. Ancak henüz rutin tedavi rejimine dahil edilmemiştir (10).

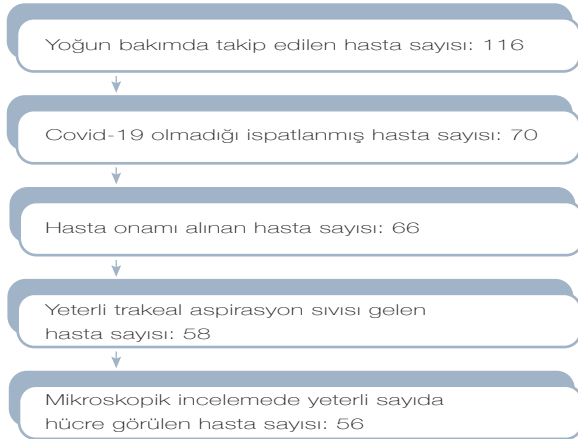
Şimdiye kadar, akut faz reaktanlarının, sepsiste mortalite dinamiklerini nasıl etkilediğine dair yayınlar vardır. Böbrek hasarının yoğun bakım hastalarında mortalite oranlarını arttırdığı da bilinmektedir. Ancak bu parametreler arasında KIM-1 ve NGAL ile sepsiste mortalite ilişkisi çalışılmamıştır. Bu çalışmada yoğun bakımda entübe olarak takip edilen hastalardan alınan akciğer sıvılarındaki yangısal hücrelerde KIM-1 ve NGAL ekspresyonlarının mortalite oranları ile ilişkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntemler

Hastanemiz yerel etik kurul onayı alındıktan sonra 18

yaş üstü, Covid-19 (-), aspirasyon ile hücre sayımına yetecek kadar sekresyon elde edilebilmesi için yoğun bakımda yatan endotrakeal entübe 56 hasta çalışmaya dahil edildi (karar no: 2020/21).

Covid olmadığı kanıtlanmış, Covid PCR (-) olan 70 hasta çalışmaya dahil edilmek için uygundu. Bu hastalardan dördü yakını onam vermediği için çalışmaya alınamadı. 8 hasta entübe takip edildiği dönemde yapılan aspirasyonda pulmoner sekresyon materyali gelmediği için dahil edilemedi. Geriye kalan 58 entübe hastaya trakeal aspirasyon işlemi uygulandı. Ancak mikroskopik bakı aşamasında, 2 hastanın incelenecek materyalinde hücre bulunmadığı için çalışmadan çıkarıldı. Geriye kalan 56 hasta ile çalışma sürdürüldü (Şekil 1). Bu çalışmada sepsis tanısı koymak için 3. Uluslararası Sepsis Konsensusu kriterleri kullanılmıştır (12).



Şekil 1. Akış şeması

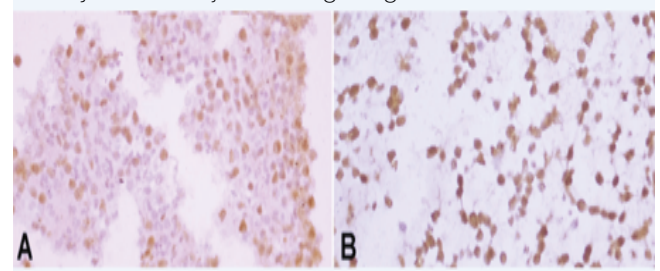
Trakeal aspirasyon işlemi: Trakeal aspirasyon öncesinde %100 O₂ ile 2 dakika oksijenize edilen hastalarda, beslenme durdurulduktan sonra semi fowler pozisyonu verildi. Aseptik kurallara uygun olarak, kapalı sistem aspirasyon kateteri kullanılarak endotrakeal tüp veya trakeostomi kanülü içerisinde geçilerek aspirasyon gerçekleştirildi. Sekresyonların saklanması için Paul Trakeal Kültür Şişesi (40 ml) kullanıldı. Sonrasında 1 dakika %100 O₂ ile ventile edilen hasta, saturasyon değerleri kabul edilebilir değerlerde ise önceki mekanik ventilatör ayarları ile ventilatöre tekrar bağlandı.

Numunelerin saklanması: Paul's Tracheal Culture Bottle içerisindeki hasta sekresyonunun üzerine, alınan sekresyon ile eşit hacimde önceden hazırlanmış olan fiksatif eklendi. Etiketlenen örnekler saklama kapları içerisinde patoloji birimine gönderildi. Aspirasyon materyalleri eşit hacimde fiksatif (aynı hacimde %95 etil alkol ve %10 formalin karışımı) ile karıştırıldı ve hücre bloğu hazırlamaya gönderildi.

Hücre bloklarının yapılması: Hücre bloklarının hazırlanması için her numune fiksatif ile 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve

hücre butonu aynı fiksatif içinde yeniden süspansedildi ve 3000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Tüp 4-6 saat bekletildi. Hücre butonu, süpernatant atıldıktan sonra dikkatlice çıkarıldı, bir filtre kağıdına sarıldı ve etiketli bir doku kasetine yerleştirildi. Numune daha sonra rutin biyopsi numuneleriyle aynı şekilde işlendi ve gömüldü. Hücre bloklarından her biri 3-4 µm kalınlığında doku kesitleri alındı. Kesitler, morfolojik değerlendirme için Hematoksilin ve Eozin ile boyandı. Akciğer hastalığı olmayan sağlıklı, sigara içmeyen yetişkinlerden elde edilen bronşiyal aspirasyon sıvısı, yalnızca küçük yüzdelerde lenfositler, nötrofiller ve diğer enflamatuvar hücreler içerir; alveolar makrofajlar, yüzde 90'a varan oranda baskın hücre popülasyonudur. Bu çalışmada, daha önceki yayınlardaki kriterlere dayanarak, alveolar makrofajların azlığı (10'dan az alveolar makrofaj/büyük büyütme alanı), hava yolu kaynaklı epitel hücrelerinin alveolar makrofajdan fazla olması, mukopürülan eksüda, abartılı dejeneratif değişikliklerin varlığı olarak tanımlanan kriterlere göre yetersiz kabul edilen örnekler belirlendi.

İmmünohistokimyasal (İHK) testler: Bu testler streptavidin-biotin peroksidaz yöntemi (Invitrogen, Camarillo, 85-9043, ABD) kullanılarak manuel olarak yapıldı. Parafin bloklardan elde edilen seri 4 µm'lik kesitler, pH 6.0'da 10 mM/L sitrat tamponunda antijenik epitoplarnın belirginleşmesi için 20 dakika kaynatıldı, oda sıcaklığında 20 dakika soğutuldu ve daha sonra endojen peroksidaz ve biyotini bloke etmek amacıyla primer blokan kullanıldı. Blokan sonrasında 1:300 seyreltmede hazırlanan NGAL (Novus Biologicals, USA, Littleton, NDP1- 90331) ve KIM-1 (Bioss, Philadelphia, HAVCRI, USA) antikoranı kullanılarak kesitler bir saat oda sıcaklığında enkübe edildi. Primer antikor uygulaması sonrası kit içerisinde belirtilen şekilde İHK boyama tamamlandı. NGAL pozitifliği yaygın sitoplazmik ve/veya nükleer boyanma olarak tanımlandı. KIM-1 pozitifliği yaygın sitoplazmik boyama olarak tanımlandı. Her iki antikor için, fokal boyama veya çok zayıf boyama, NGAL veya KIM-1 negatifliği olarak kabul edildi (Resim). Derin trakeal aspirasyon sıvısındaki, NGAL-pozitif nötrofillerin ve/veya makrofajların varlığı değerlendirildi.



Resim 1. A) PNL'lerden zengin bir hastada az sayıda NGAL ekspresyonu, (B) Hemen tümü NGAL pozitif yangı hücreleri (DABx 200)

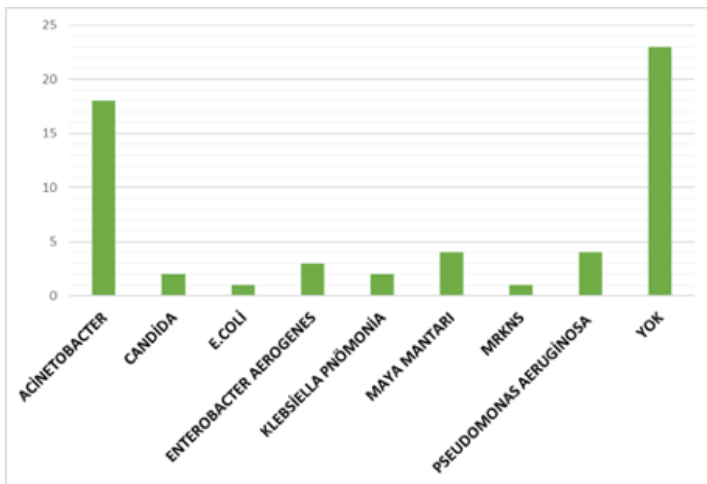
İstatistiksel yöntem

İstatistiksel değerlendirmeler için analiz program (SPSS Inc. version 22 IBM, Chicago, ABD) kullanıldı. Normallik varsayımı, Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Parametrik testler içerisinde Bağımsız Örneklem T-Testi, parametrik olmayan testler içerisinde Mann Whitney-U testi kullanıldı. Kategorik ve nominal verilerin analizi Ki-Kare Testi ile sağlandı. İstatistiksel anlamlılık için üst sınır 0,05 olarak alındı.

Bulgular

Çalışma popülasyonumuz 32'si erkek (%57.1) ve 24'ü (%42.9) kadın olmak üzere 56 hastadan oluşuyordu (Tablo 1). Hastaların yaş ortalaması 70,13±13 yıl (range, 25-91 yıl) idi. Ortalama yatış süresi 30.04±17.5 gün (3-85 gün), yoğun bakımda ortalama takip süresi 27.5±18.3 gün (3-85 gün) idi. Yoğun bakımda Apache II skorlamasına göre takip edilen hastalarımızın tanı grupları incelendiğinde, solunum (KOA, pnömoni, akciğer kanseri vb) ve nörolojik hastalıklar (serebrovasküler tıkanıklık, kanama vb) en sık yoğun bakıma kabul nedeni idi (sırasıyla %43,1 ve %22,4). Sonrasında sırasıyla kardiyak, travma ve gastrointestinal sistem nedenli yatışlar sıklıkla gözlenmekteydi.

Elli altı hastanın 42'sinde bir veya daha fazla eşlik eden kronik hastalık vardı. Hastalarımızın 36'sında (%64.29) örnekleme anında sepsis varken, 20'sinde (%35.71) yoktu (Tablo 1). Kültürlerde en sık üreyen mikroorganizma 18 hastada görülen *Acinetobacter* olmuştur (Grafik 1).

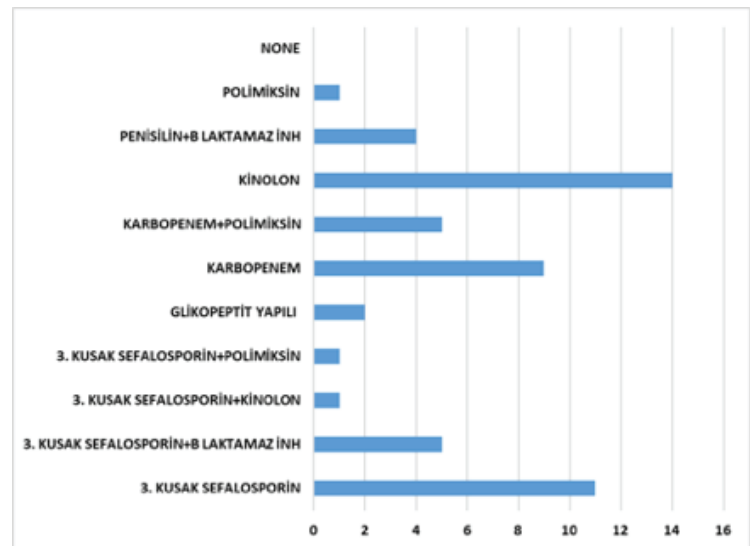


Grafik 1. Hastalardan izole edilen mikroorganizmalar

Dokuz (%16,1) hastada tam veya kısmi tedavi sağlanırken, 47 (%83,9) hasta sekonder enfeksiyon veya ilişkili hastalıklar nedeniyle kaybedildi. Bronkoalveolar sıvının mikrobiyolojik incelemesinde 33 (%58,9) hastanın kültüründe farklı mikrobiyolojik ajanlar üredi. Antibiyogramlara göre veya profilaktik amaçlı olarak 51 (%91,1) hastada farklı tipte antibiyotik kullanılmıştır (Grafik 2).

Tablo 1. Hastaların demografik verileri

		n	%
Cinsiyet dağılımı	Kadın	24	42.9
	Erkek	32	57.1
	Toplam	56	100
Kronik hastalık varlığı	Evet	42	75
	Hayır	14	25
	Toplam	56	100
Sepsis varlığı	Evet	36	64.3
	Hayır	20	35.7
	Toplam	56	100
Tüm hastalar içinde trakeal aspirasyon sıvısında NGAL varlığı	Evet	19	33.9
	Hayır	37	66.1
	Toplam	56	100
Derin trakeal aspirasyon materyalinde %3'ün üzerinde PNL hücresi olan hastalarda NGAL varlığı	Evet	12	30
	Hayır	27	70
	Toplam	39	100



Grafik 2. Hastalarda kullanılan antibiyotiklerin dağılımı

Tüm hastalarda immünohistokimyasal boyanmış hücre blok materyallerinin incelenmesinde makrofajlarda ve/veya nötrofillerde NGAL ve KIM-1'in sitoplazmik ve/veya nükleer ekspresyonuna bakıldı. On dokuz (%33.9) hastada makrofajlarda veya nötrofillerde NGAL proteini saptandı. Ki-kare analizinde NGAL ekspresyonunun varlığı ile cinsiyet ($p=0,931$), sepsis varlığı ($p=0,293$) ve sağ kalım arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p=0,134$) (Tablo 2).

Tablo 2. Derin trakeal aspirasyonda NGAL varlığı ile cinsiyet, sepsis, mortalite arasındaki ilişki

	n (%)	Cinsiyet ile NGAL ilişkisi (p)	Sepsis varlığı ile NGAL ilişkisi (p)	Mortalite ile NGAL ilişkisi (p)
Tüm hastalar içinde trakeal aspirasyon sıvısında NGAL saptanan hastalar	19 (33.9)	0,931	0,293	0,134
Derin trakeal aspirasyon materyalinde %3'ün üzerinde PNL hücresi olan hastalar içerisinde NGAL saptanan hastalar	12 (30)	0,250	0,206	0,151

Bazı hastalarda PNL bulunmasına rağmen, PNL'lerde NGAL ekspresyonu saptanmadı. Bazı hastalarda eser miktarda PNL hücreleri görüldü. Tüm hastaların sadece 39'unun bronşiyal aspirasyon materyalinde normalden fazla PNL hücresi (>%3 PNL hücresi) tespit edildi. Normalden fazla PNL hücresine sahip bu hastalar incelenirken, NGAL ekspresyonu ve farklı klinikopatolojik parametreler yeniden değerlendirildi. Bu grup 23 erkek (%59) ve 16 kadın (%41) hastadan oluşmaktaydı. Bu hastaların ortalama yaşı 69,1±14 yıl (dağılım, 25-91 yıl) idi. Otuzdokuz olguda, NGAL ekspresyonunun varlığı ile cinsiyet (p=0,250), sepsis varlığı (p=0,206) ve sağkalım (p=0,151) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı (Tablo 2).

Mann-Whitney U testinde, NGAL varlığı ile yaş (p=0,848), Glasgow skalası (p=0,758), Apache skoru (p=0,451), hastanede yatış süresi (p=0,368) arasında istatistiksel anlamlılık saptanmadı.

Trakeal aspirasyon materyalinde yüksek miktarda PNL saptanan 39 hastada steroid tedavisinin mortalite açısından fark yaratıp yaratmadığı incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi (p=0.373).

Tüm hastalar içerisinde KIM1 ekspresyonu, sadece 2 olgunun materyalindeki epitel hücrelerinde soluk pozitif olup, istatistiksel anlamlılık saptanmadı.

Tartışma

Çalışmamızda hastanemizdeki yoğun bakımda hastalarının çoğunluğunun solunum ve nörolojik sistem hastalıkları nedeniyle takip edildiği görüldü. Hastaların %75'inde kronik hastalık vardı, %64'ünde ise sepsis tanısı vardı. Mortalite oranı %83,9 idi. On dokuz (%33.9) hastada NGAL proteini saptandı ancak sepsis ve sağkalım arasında bir ilişki gözlenmedi. Trakeal aspirasyon sıvısında PNL yüksekliği olan 39 hasta ayrıca incelendiğinde, NGAL varlığı ile cinsiyet, sepsis veya mortalite arasında bir ilişki saptanmadı. KIM1 ekspresyonu ise yalnızca iki olguda saptandı.

Sepsis ile takip edilen hastalarda hastalığın seyri değişkendir ve mortalite riski oldukça yükselebilir. Bu nedenle sepsiste mortalite gelişimini erken dönemde öngörebilmek önemlidir. Sepsiste mortaliteyi etkileyen pek çok parametre vardır. Yapılan çalışmalarda hastalık şiddetini ve prognozu tayin etmek için pek çok belirteç kullanılmıştır. İdeal belirteç; organa spesifik, etiyoloji ve histolojik bulgular ile korele, noninvaziv ve ucuz olmalı, ayrıca hızlı yanıt vermelidir. Sepsisteki böbrek hasarının takibinde rutin olarak kullanılan kan üre nitrojeni ve kreatinin yanı sıra son yıllarda sistatin c, NGAL, IL-8, KIM-1 gibi yeni ve özgül belirteçler de kullanıma girmiştir (13). NGAL,

insanda genellikle nötrofillerde, nötrofil jelatinaza kovalent bağla bağlı olarak bulunan bir glikoproteindir. Küçük, hidrofobik molekülleri bağlayabilen ve hücre homeostazında rol oynayan ekstraselüler bir proteindir (14). Lipokalin-2 olarak da bilinir. Böbrek proksimal tübül hücreleri, endotel, düz kas hücreleri ve lökositler tarafından üretilen bir proteindir. Epitelyal hücrelerde sentezlendiği için böbrek dışında karaciğer, akciğer ve bağırsaklarda da sentezlenebilmektedir. Bu nedenle böbrek, trakea, akciğer, mide, pankreas ve kolondan fizyolojik olarak çok düşük düzeylerde salınır. Ancak enflamasyon durumlarında endotel hücre hasarı sonucu salınımı artar. Diğer küçük moleküller gibi NGAL de glomerüllerden filtre olmaktadır. Sonrasında büyük bir kısmı proksimal tübülden megalin reseptörleri aracılığıyla geri emilmekte ve endositoz ile hücre içine alınmaktadır. Sonuç olarak sağlıklı bireylerde, idrarda eser miktarda atılmaktadır (15). Küçük moleküller ağırlığı nedeniyle plazma ve serumda arttığı durumlarda idrarla atılımında da artış izlenmektedir. Çalışmamızda NGAL varlığı sadece immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiş, serum ya da idrar değeri ölçülmemiştir. Bu nedenle yorum yapılamamaktadır.

Sideroforlar, NGAL için endojen ligand görevi yaparlar, ona karakteristik parlak kırmızı rengini verirler ve biyolojik etkilerinin çoğunu düzenlerler. Bakteriler çoğalabilmeleri için demire ihtiyaç duyarlar. NGAL de demiri bağlayarak bakterilerin sideroforları aracılığı ile demiri absorbe etmelerini engeller (16).

NGAL proinflatuar bir moleküldür. İnflamasyon olan bölgede granülosit birikimi olur. Granülositlerin apoptozisi sonrası NGAL içeren salgı granülleri açığa çıkar ve lokal doku hasarına aracılık eder. Escherichia Coli'nin intraperitoneal enjeksiyonundan sonra oluşturulan sepsiste serum ve karaciğer NGAL düzeylerinin dört saat içinde, dalak NGAL düzeyinin altı saat içinde yükseldiği saptanmış ve bir akut faz proteini olarak NGAL'in önemi gösterilmiştir (17). Biz de çalışmamızda sepsisli hastalardaki trakeal aspirasyon sıvısındaki NGAL varlığının mortalite ve morbiditedeki yol gösterici rolünü araştırdık ve NGAL ekspresyonunun prognostik faktörlerle ilişkisini saptayamadık. NGAL, hücre içine demir bağlayıcı sideroforlar ile kompleks halde ya da yalnız protein yapısı ile alınır. Nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalinin hücre içi aktivitesi, hücre içine alınma şekline bağlı olarak değişiklik gösterir. Nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin hücre içine demir bağlayıcı sideroforlar ile kompleks halde alındığında; endosomal veziküllerin içine alındıktan sonra sitoplazmik alana göç eder, siderofor-demir kompleksi açığa çıkar ve demir

bağımlı spesifik yolaklar aktive olur. Nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin hücre içine yalnız protein yapısı ile alındığında ise hücrenel demiri bir miknatis gibi çekerek ekstraselüler aralığa yönlendirir. Böylece hücrenel demir havuzunun tüketimine yol açarak apoptozise aracılık ettiği varsayılır. Nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalinin antibakteriyel etkisinde bu apoptozis mekanizmasının rolü olduğu düşünülmektedir (18–20). Bakterilerin büyümeleri için demir gereklidir. Nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin siderofor aracılı demir döngüsüne katılarak demir depolarını tüketir ve bakterilerin büyümesini engeller. Antibakteriyel etkisi sayesinde doğal bağışıklıkta NGAL'in önemli rol oynadığı düşünülmektedir (21). Bakteriyel enfeksiyonlarda nötrofil aktivasyonuna bağlı olarak NGAL düzeylerinde artış mevcuttur. Nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalinin eksikliğinde, gram (-) bakteri enfeksiyonu ve sepsis sıklığında artış olduğu gösterilmiştir.

Sağlıklı kişilerde NGAL sentezi çok düşük miktardadır. Dolaşımdaki ana kaynağı nötrofillerdir. Düşük miktarlarda böbrek, prostat, akciğer, timus, karaciğer, solunum ve sindirim yolu epitelinden salınır. Ayrıca doğum sonrası uterus dokusu ve ek gıdaya geçiş döneminde meme dokusunda olduğu gibi eski volümüne geri dönmeye çalışan dokularda da ekspresye edildiği gösterilmiştir. İnterlökin, tümör nekroz faktör- α ve interferon gibi proinflamatuvar sitokinler ve retinoik asit gibi vitaminler NGAL ekspresyonunu düzenleyen faktörlerdir (14–16). Nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin özellikle stres altındaki hücrelerden sentezlenir. Deri, tiroid, meme, over, endometrium, kolon, akciğer, karaciğer, safra yolları, özofagus, mide ve pankreas dahil olmak üzere çeşitli organlardan kaynaklanan malign tümörlerde; inflamasyon, enfeksiyon, iskemi, yanık, kalp ve böbrek hasarı gibi durumlarda dokularda ve vücut sıvılarında NGAL ekspresyonunun arttığı bildirilmektedir (17). Nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin düzeylerindeki artışa dolaşımdaki nötrofillerin katkıda bulunduğu kesin olarak bilinse de enfekte akciğer dokusuna göç etmiş nötrofillerden salınan NGAL göz ardı edilmemelidir.

Nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin akut ve kronik böbrek hasarının en iyi erken belirteci olarak bilinir. Bununla birlikte NGAL'in renal hastalıklar dışında abdominal aort anevrizmaları, preeklampsi, romatoid artrit, meme, mide, kolon ve pankreas adenokarsinomları gibi birçok malignitede olmak üzere ciddi ekstrarenal hastalıklarda da rolü olduğu bildirilmiştir (22,23). Kalp yetmezliği hastalarında ve akut koroner sendrom geçiren hastalarda sağlıklı bireylere kıyasla serum NGAL düzeyleri anlamlı olarak yükselmiştir (24).

Plazma NGAL konsantrasyonları bakteri sebepli enfeksiyonlarda yükseldiği gibi, kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve astımda artmaktadır.

Ischimura ve arkadaşları ilk kez 1998 yılında tanımlanan KİM-1 proteinin, tip 1 membran glikoproteinidir (25). Aynı zamanda TIM-1 ve hepatositlerde de hepatit A virus hücrenel reseptör-1 olarak da isimlendirilmiştir (26). Aslında normal böbrekten ihmal edilebilir düzeyde salgılanan bu protein, sepsis gibi durumlarda tübüler böbrek hasarında ise proksimal tübül S-3 segmentinde belirgin olarak indüklenen bir belirteçtir (27). Birçok böbrek hastalığında KİM-1 ekspresyonunun, tübüler-interstisyel hasar, inflamasyon ve tübüler fenotip differasyonu ile ilişkili bulunması sonucunda idrardaki KİM-1 düzeyinin tübüler hasarı yansıtabildiği kanısına varılmıştır. Bir araştırmada aort cerrahisi olmuş ve akut tubuler nekroz gelişen bir hastanın altı saat aralıklarla idrarda KİM-1 bakılarak akut tübüler nekroz gelişen hastalarda böbrek KİM-1 ekspresyonunun karşılaştırılması amaçlanmış ve aort klempleme sonrası on iki saat içinde KİM-1'in idrarda saptanabilir seviyelere ulaştığı ve giderek arttığı bulunmuştur (28). KİM-1'in normal böbrekten çok az miktarda salınması, proksimal tübül apikal membranda bulunması ve değişikliklere duyarlı olmasından dolayı böbrek hasarında ideal bir biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir. Sepsis nedeniyle takip ettiğimiz hastalarda KİM-1 varlığı ile mortalite oranlarını karşılaştırdığımızda çoğu olguda KİM-1 ekspresyonu bulunmadığı için bir ilişki saptayamadık.

Çalışmamızın kısıtlılıkları; çalışmamız yoğun bakımdaki entübe hastalardan alınan akciğer sıvısı örneklerinde yapılmıştır. Mali kısıtlılıklardan dolayı bu çalışmada serum veya idrarda biyobelirteçlere bakılamamıştır. Eş zamanlı serum ve idrarda NGAL ve KİM-1 seviyelerine bakılabilecek, geniş bütçeli ve fazla sayıda hastayı içeren çalışmalar ile desteklenmesi gerekecektir.

Sonuç

Sepsis, yoğun bakım ünitelerinde sık karşılaşılan ölüm nedenlerinden olup, çoklu organ yetersizliğine gidebilen sistemik komplikasyonlara yol açar. Akut böbrek yetersizliği en sık görülen komplikasyonlardan biridir ve mortalite nedenlerindedir. Böbrek hasarının erken göstergelerinden olan NGAL ve KİM-1 proteinlerinin akciğer sıvılarında izlenmesinin bize mortalite hakkında fikir verebileceğini düşünsek de muhtemelen olgu sayısının azlığı nedeniyle çalışmamızda anlamlı istatistiksel ilişki saptayamadık. Sorguladığımız ilişkinin geniş serilerde araştırılmasının önemli olduğunu düşünüyoruz.

Çalışmamızda hiçbir hibe veya destek kaynağı kullanılmamıştır. Yazarların herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

PA: Konsept, tasarım, veri toplama, literatür taraması ve yazma; AGDÜ:Konsept, materyaller, veri toplama, analiz ve yorumlama ve kritik inceleme aşamalarında araştırmayı desteklemişlerdir. Tüm yazarlar çalışma tasarımında yer almış ve makalenin son halini onaylamıştır.

Kaynaklar

- 1.Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, Brunkhorst FM, Rea TD, Scherag A et al. Assessment of clinical criteria for sepsis: for the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315:762.
2. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NKJ, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P et al. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis current estimates and limitations. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;193:259–72.
3. Salomão R, Ferreira BL, Salomão MC, Santos SS, Azevedo LCP, Brunialti MKC. Sepsis: Evolving concepts and challenges. *Brazilian J Med Biol Res*. 2019;52:e8595.
- 4.Santiago-Sánchez GS, Pita-Grisanti V, Quiñones-Díaz B, Gumpfer K, Cruz-Monserrate Z, Vivas-Mejía PE. Biological functions and therapeutic potential of lipocalin 2 in cancer. *Int J Mol Sci*. 2020;21:4365.
- 5.Crescenzi E, Leonardi A, Pacifico F. NGAL as a potential target in tumor microenvironment. *Int J Mol Sci*. 2021;22:12333.
- 6.Candido S, Maestro R, Polesel J, Catania A, Maira F, Signorelli SS et al. Roles of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in human cancer. *Oncotarget*. 2014;5:1576–94.
- 7.Bolignano D, Donato V, Lacquaniti A, Fazio MR, Bono C, Coppolino G et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in human neoplasias: A new protein enters the scene. *Cancer Lett*. 2010;288:10–6.
- 8.Li Yang, Craig R Brooks, Sheng Xiao, Venkata Sabbiseti, Melissa Y Yeung, Li-Li Hsiao et al. KIM-1-mediated phagocytosis reduces acute injury to the kidney *J Clin Invest*. 2015;125:1620-36.
- 9.Liu L, Song Z, Zhao Y, Li C, Wei H, Ma J et al. HAVCR1 expression might be a novel prognostic factor for gastric cancer. *PLoS One*. 2018; 13: e0206423.
- 10.Zheng X, Xu K, Chen L, Zhou Y, Jiang J. Prognostic value of TIM-1 expression in human non-small-cell lung cancer. *J Transl Med*. 2019; 17: 178.
- 11.Al-Bataineh MM, Kinlough CL, Mi Z, Jackson EK, Mutchler SM, Emler DR et al. KIM-1-mediated anti-inflammatory activity is preserved by MUC1 induction in the proximal tubule during ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2021; 321:F135–48.
- 12.Singer M, Deutschman CS, Seymour C, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315:801-10.
- 13.Lisowska-Myjak B. Serum and urinary biomarkers of acute kidney injury. *Blood Purif*. 2010;29:357-65.
- 14.Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengeløv H, Borregaard N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem*. 1993 May 15;268(14):10425-32.
- 15.Hvidberg V, Jacobsen C, Strong RK, Cowland JB, Moestrup SK, Borregaard N. The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. *FEBS Lett*. 2005; 579: 773-7.
- 16.Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Strong RK. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell*. 2002;10:1033-43.
- 17.Chakraborty S, Kaur S, Guha S, Batra SK. The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1826:129-69.
- 18.Laxminarayana R Devireddy, Claude Gazin, Xiaochun Zhu, Michael R Green. A cell-surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. *Cell*. 2005; 123: 1293-305.
- 19.Schmidt-Ott KM, Mori K, Li JY, Kalandadze A, Cohen DJ, Devarajan P et al. Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18:407-13.
- 20.Yang J, Goetz D, Li J, Wang W, Mori K, Setlik D, et al. An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Mol Cell*. 2002;10:1045-56.
- 21.Fjaertoft G, Foucard T, Xu S, Venge P. Human neutrophil lipocalin (HNL) as a diagnostic tool in children with acute infections: A study of the kinetics. *Acta Paediatr*. 2007;94:661–6.
- 22.Katano M, Okamoto K, Arito M, Kawakami Y, Kurokawa MS, Suematsu N et al. Implication of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induced neutrophil gelatinase-associated lipocalin in pathogenesis of rheumatoid arthritis revealed by

- proteome analysis. *Arthritis Res Ther.* 2009;11:R3
23. Moniaux N, Chakraborty S, Yalniz M, Gonzalez J, Shostrom VK, Standop J. Early diagnosis of pancreatic cancer: neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer.* 2008;98:1540-7.
24. Yndestad A, Landrø L, Ueland T, Dahl CP, Flo TH, Vinge LE et al. Increased systemic and myocardial expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in clinical and experimental heart failure. *Eur Heart J.* 2009;30:1229-36.
25. Huo W, Zhang K, Nie Z, Li Q, Jin F. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a novel kidney-specific injury molecule playing potential double-edged functions in kidney injury. *Transplant Rev (Orlando).* 2010;24:143-6.
26. Bailly V, Zhang Z, Meier W, Cate R, Sanicola M, Bonventre JV. Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration. *J Biol Chem.* 2002;277:39739-48.
27. Vaidya VS, Ramirez V, Ichimura T, Bobadilla NA, Bonventre J V. Urinary kidney injury molecule-1: A sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006;290:F517-29.
28. Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int.* 2002;62:237-44.