

Adropin ve Speksin Peptitlerinin Kronik Renal Yetmezlik Modelinde Kardiyak COX ve LOX Gen Ekspresyonları Üzerine Etkisi

The Effect of Adropin and Spexin Peptides on Cardiac COX and LOX Gene Expressions in Chronic Renal Failure Model

Burak YAZGAN¹, Gülsün MEMİ²

ÖZ

Bu çalışmada adropin ve speksin peptitlerinin siklooksijenaz (COX) ve araşidonat lipooksijenaz (ALOX) gen ekspresyonları üzerindeki etkisinin kronik renal yetmezlik ekseninde gelişen kardiyak hasarda incelenmesi amaçlanmıştır.

Sıçanlarda Kronik Renal Yetmezlik (KRY) modeli 10 gün boyunca adenin hemisülfat çözeltisinin gavaj yoluyla verilmesiyle oluşturulmuştur. Speksin tedavisi için 35 µg/kg ve adropin tedavisi için 2,1 µg/kg dozlarda peptitler 4 hafta boyunca intramusküler olarak uygulanmıştır. Renal fonksiyonlar otoanalizör ile ölçülmüştür. Kardiyak dokudaki COX1, COX2, ALOX12 ve ALOX15 mRNA ekspresyonları total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi sonrasında real time PCR ile ölçülmüştür.

Kontrol ve KRY grubu arasında COX1 ve COX2 ekspresyonlarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Kontrol grubuna kıyasla KRY grubunda ALOX12 gen ekspresyonu azalırken, tam tersi ALOX15 artmıştır. Speksin tedavisi COX2 ve ALOX15 seviyelerini KRY grubuna kıyasla azaltmıştır. Buna ek olarak, adropin tedavisi COX1 ekspresyonunu arttırırken, COX2 ve ALOX15 miktarını azaltmıştır. Benzer olarak uygulanan adropin+speksin tedavisinin COX1 ekspresyonunu arttırırken, COX2 ve ALOX15'i azalttığı gözlenmiştir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular adropin ve speksin peptitlerinin COX ve ALOX seviyelerini etkileyerek hem kardiyorenal fonksiyonların düzenlenmesini hem de inflamatuvar süreçlerin modülasyonunu sağladığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Adropin, Araşidonat lipooksijenaz, Kronik renal yetmezlik, Siklooksijenaz, Speksin.

ABSTRACT

In this study, it was aimed to examine the effects of adropin and spexin peptides on cyclooxygenase (COX) and arachidonate lipoxygenase (ALOX) gene expressions in cardiac damage developing in the axis of chronic renal failure.

The Chronic Renal Failure (CRF) model in rats was established by gavage administration of adenine hemisulfate solution for 10 days. Peptides were administered intramuscularly for 4 weeks at doses of 35 µg/kg for spexin treatment and 2.1 µg/kg for adropin treatment. Renal functions were measured with an autoanalyzer. COX1, COX2, ALOX12 and ALOX15 mRNA expressions in cardiac tissue were measured by real time PCR after total RNA isolation and cDNA synthesis.

There was no significant difference in COX1 and COX2 expressions between the control and CRF groups. While ALOX12 gene expression decreased in the CRF group compared to the control group, on the contrary, ALOX15 increased. Spexin treatment reduced COX2 and ALOX15 levels compared to the CRF group. In addition, adropin treatment increased the expression of COX1 and decreased the amount of COX2 and ALOX15. Similarly, it was observed that adropin + spexin treatment increased the expression of COX1 and decreased COX2 and ALOX15.

Our findings indicate that adropin and spexin peptides affect COX and ALOX levels, providing both the regulation of cardiorenal functions and the modulation of inflammatory processes.

Keywords: Adropin, Arachidonate lipoxygenase, Chronic renal failure, Cyclooxygenase, Spexin.

Hayvanlara uygulanan yöntemlerin etik kurallara uygunluğu Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından 28/12/2016 tarihi ve TUHADYEK-2016/51 numarası ile onaylanmıştır. Bu çalışma Amasya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje No: FMB-BAP 19-0387) ve Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (Proje No: 2018/118) tarafından desteklenmiştir.

¹ Dr. Öğr. Üyesi, Burak YAZGAN, Biyokimya, Amasya Üniversitesi Sabuncuoğlu Şerefeddin SHMYO Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, burak_yazgan@yahoo.com, ORCID: 0000-0003-0717-7768

² Dr. Öğr. Üyesi, Gülsün MEMİ, Fizyoloji, Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, glsnmemi@gmail.com, ORCID: 0000-0002-4897-6307

İletişim / Corresponding Author: Burak YAZGAN
e-posta/e-mail: burak_yazgan@yahoo.com

Geliş Tarihi / Received: 02.04.2022

Kabul Tarihi/Accepted: 30.08.2022

GİRİŞ

KRY nüfusun yaklaşık %10-15'ini etkileyen önemli küresel problemlerden birisidir. KRY'de tübüler hasar, sklerotik-fibrotik hasar ve inflamatuvar süreç aktif olarak rol oynamaktadır.¹ Aynı zamanda renal hasar en erken evrelerde bile kardiyovasküler hastalıklar için bir risk faktörüdür.² Kardiyovasküler hastalıklar, kronik renal yetmezliği olan hastalarda oldukça yaygındır ve bu hastaların ölümlerinin %50'sinden fazlasından sorumludur.³ Kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde COX ve ALOX enzimleri önemli rol oynamaktadır. COX ve ALOX'lar araşidonik asitin farklı lipid mediyatörlere dönüştürülmesinde görevli olan enzimlerdir. COX'lar araşidonik asitin prostaglandin H₂'ye (PGH₂) dönüştürülmesini sağlayan ilk enzimlerdir, sonrasında ise PGH₂ çeşitli sentaz enzimleri ile prostaglandinlerin farklı tipleri (E-F-D), tromboksan ve prostasiklin gibi biyolojik olarak aktif bir lipid ailesine dönüşümünü katalize eder.^{4, 5} Bu ürünler inflamasyon, oksidatif reaksiyonlar, hücre büyümesi, vasküler geçirgenlik gibi etkilerin yanında lokal ve sistemik hemodinamiklerin düzenlenmesi gibi çok çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlere katılır.^{6, 7} Siklooksijenazlar, COX-1 ve COX-2 olarak iki farklı izoform halinde bulunur. COX-1 normal metabolik-fizyolojik koşulların devamlılığı için üretilen ana formdur. COX-2 ise daha çok inflamasyon ve doku hasarı durumunda artış göstermektedir.^{8,9} Siklooksijenaz türevleri kardiyorenal sistemlerde, renal kan akışı, elektrolit dengesi, renin salınımı ve trombosit fonksiyonları gibi homeostazların korunmasında rol oynamaktadır.¹⁰ Araşidonat lipooksijenaz enzimlerinin ALOX₅, ALOX₁₂ ve ALOX₁₅ olmak üzere üç izoformu bulunmaktadır. ALOX₅ araşidonik asidi 5-Hidroperoksieikosatetraenoik asit (5-HpETE) üzerinden 5-Hidroksieikosatetraenoik asit (5-HETE) ve sonrasında lökotrienlere (LTA, LTB, LTC, LTE) dönüşümünü sağlayan enzimdir. Trombosit tipi trombosit lipooksijenaz olarak da adlandırılan

ALOX₁₂ ise araşidonik asidi 12-Hidroksieikosatetraenoik asite (12-HETE) dönüştürür. ALOX₁₅ ise araşidonik asidin özellikle 15-Hidroksieikosatetraenoik aside (15-HETE) dönüşümünü katalizleyerek farklı lipid mediyatörlerin oluşumunu sağlamaktadır.^{11, 12} ALOX'lar biyoaktif lipid mediyatörlerin üretimini düzenleyerek inflamatuvar süreci yönetmesinden dolayı kalp hasarı ve kardiyak yetmezlikte önemli rol oynamaktadır. Özellikle bu enzim sınıfından ALOX₁₂ ve ALOX₁₅ eksikliğinin, kardiyak hasarı ve kalp yetmezliğini geciktirmek üzere nötrofil ve makrofajları aktive etmek üzere lipidomik yolağı etkilediği bilinmektedir.^{13, 14} Bunun yanında çalışmalar ALOX₁₅ enziminin vasküler düz kas hücreleri üzerine ve adrenal hücrelerde anjiotensin ile indüklenen hücre büyümesinde rol aldığını göstermektedir.¹⁵ LOX ve COX enzimleri substrat olarak araşidonik asiti kullanır ve 25'ten fazla aktif maddeyi etkileyerek birçok hücre ve ekstrasellüler doku ve organı hedef olarak etki gösterirler. Bu kadar etkisi olan bu iki enzimin aktivitesi üzerine etki gösteren ilaçlar klinik olarak oldukça önemlidir.¹⁶

Speksin, diğer ismi ile nöropeptit Q, Galanin/kisspeptin/speksin ailesinin üyesi olan peptit yapısına sahip bir hormondur. Speksin ilk olarak 2007 yılında biyoinformatik yöntemlerin gelişimi ile Markov modelleme tekniğiyle Mirabeau tarafından keşfedilmiştir.¹⁷ Bu peptit hormonu şifreleyen gen insanlarda kromozom 12 (C12orf39) üzerinde bulunmaktadır. Öncelikle bu gen 116 amino asitten oluşan speksin pre-propeptidinin sentezlenmesini sağlamaktadır. Sinyal peptitlerinin kırılmasının ardından moleküler ağırlığı 1,6 kDa olan 14 amino asitlik aktif speksin hormonu yapısını kazanmış olur. Speksin hormonunun amino asit dizilimi farklı canlılar arasında büyük oranda benzerlik göstermektedir.¹⁸ Özellikle insanlarda ve sıçanlarda deri, tiroid, beyin, kalp, ovaryum, testis, akciğer, mide, ince bağırsak, kolon, karaciğer, pankreas, böbrek, kas, adipoz doku

ve adrenal bezlerde speksinin mRNA-protein düzeyinde ifadesi gerçekleşmektedir.¹⁹ Speksin, G protein bağımlı reseptör (GPCR) ailesinin üyeleri olan Galanin reseptör 2 ve 3 (GALR2 ve GALR3) için özgün bir ligand olup ilgili reseptörlere bağlanarak hücre içerisine sinyal iletimini başlatır.²⁰ Bu peptidin fizyolojik olarak enerji dengesi, yağ asidi alımı, glukoz ve lipit metabolizmasının modülasyonunu sağladığı, kan basıncı, su-tuz dengesi ve kardiyorenal fonksiyonları düzenlediği belirtilmiştir.²¹ Yapılan çalışmalar speksin seviyelerinin diyabet, obezite, metabolik sendrom, alkol dışı (non-alkolik) karaciğer yağlanması, kardiyovasküler hastalıklar, böbrek hastalıkları ve polikistik over sendromu gibi hastalıklarla değiştiğini belirtmektedir.²² Bu peptidin inflamatuvar yolakları düzenlediği belirtilse de COX ve ALOX'lar üzerine etkisi ile ilgili literatürde çalışma bulunmamaktadır.

Adropin 2008 yılında Kumar tarafından keşfedilen bir biyoaktif peptit hormondur. Adropin enerji homeostazi ilişkili gen bölgesinden kodlanmaktadır ve bu gen 9.kromozom (9p13.3) üzerinde bulunmaktadır.²³ Bu peptidin yapısı 76 amino asitten oluşmaktadır ve moleküler ağırlığı 4,49 kDa'dur. Adropinin doku dağılımı oldukça geniştir ve beyin, serebellum, umbilikal ven, kalp, koroner

arter, gastrointestinal sistem, pankreas, böbrek ve karaciğer gibi birçok dokuda bu hormonun üretiminin olduğu bildirilmiştir.^{23, 24} Bu peptit özellikle vücudun enerji dengesinin düzenlenmesi, glukoz, lipid ve protein metabolizmasının regülasyonundan sorumludur.^{25, 26} Yapılan son çalışmalara bakıldığında adropin peptidinin özellikle diyabet, diyabetik nefropati, kronik böbrek hastalıkları, endotelial disfonksiyon, kalp yetmezliği ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok patolojik durumda koruyucu olduğunu göstermektedir.²⁷⁻³¹ Bunun yanında bazı çalışmalar adropinin antiinflamatuvar etkilerinin olduğunu göstermiştir.^{31, 32} Ancak bu peptidin COX ve ALOX'lar üzerine doğrudan etkileri ile ilgili literatürde çalışma bulunmamaktadır.

Bu bilgiler ışığında bu çalışmadaki amacımız adropin ve speksinin COX ve ALOX gen ekspresyonları üzerindeki etkisini kronik renal yetmezlik ekseninde gelişen kardiyak hasarda incelemektir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular; adropin ve speksin peptitlerinin COX ve ALOX seviyelerini etkileyerek hem kardiyorenal fonksiyonların düzenlenmesini hem de inflamatuvar süreçlerin modülasyonunu sağladığını göstermektedir. Sonuçlarımız bu peptitlerin potansiyel bir ilaç hedefi olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

MATERYAL VE METOT

Araştırmanın Türü

Bu çalışma olgu-kontrol tipte bir araştırmadır.

Hayvan Modeli

Bu çalışmada kronik renal yetmezlik modeli Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında uygun koşullar olan 22±2 °C oda sıcaklığı, %65-70 nem oranı ve 12 saat aydınlık-karanlık döngüsü olan laboratuvar ortamında gerçekleştirilmiştir. Bu model kapsamında ağırlıkları yaklaşık 200-250 g ağırlığında değişen 25 adet wistar albino sıçan (Sprague Dawley) kullanılmıştır. Hayvanların su ve

yiyeceklere erişimleri sınırsız olarak sağlanmıştır.

Sıçanlar başlangıçta karışık olarak kontrol grubu (n=5) ve KRY (n=20) grubu olmak üzere iki ana gruba ayrılmıştır. Kontrol grubuna oral gavaj yoluyla 10 gün boyunca %5 karboksimetilselüloz (Sigma, kat no: C5013) 1 mL/kg ve sonrasında 4 hafta boyunca intraperitoneal olarak izotonik çözelti enjeksiyonu yapılmıştır. KRY gruplarına ise adenin hemisülfat (Sigma, kat no: A9126) 600 mg/kg ve %5 karboksimetilselüloz (1 mL/kg) olacak şekilde oral gavaj yoluyla 10 gün boyunca verilerek yetmezlik modeli oluşturulmuştur. Yetmezlik modelinin

doğrulanması için adenin uygulamasının bitişinden sonra 5. günde biyokimyasal parametreler değerlendirilmiştir. Doğrulama sonrasında KRY grubu kendi içerisinde 4 gruba ayrılmıştır ve 4 hafta boyunca belirtilen uygulamalar yapılmıştır. KRY kontrol için izotonik çözelti, adropin grubu için 2,1 µg/kg/mL dozunda adropin peptidi (Phoenix Pharmaceuticals, kat. no: 032-35), speksin grubu için 35 µg/kg/mL speksin peptidi (PolyPeptide, kat no: SC1547) ve adropin+speksin grubu için adropin 2,1 µg/kg/mL+ speksin 35 µg/kg/mL dozlarında olacak şekilde peptitler 4 hafta boyunca intramusküler enjeksiyon ile hayvanlara uygulanmıştır.

24 saatlik idrar örnekleri deney sonunda metabolik kafes yardımıyla toplanmıştır. Kan örnekleri de deney sonunda pıhtı aktivatörü içeren vakumlu serum tüpüne alınmıştır. Deney sonunda sıçanlar ketamin 100 mg/kg/i.p ve ksilazin 12,5 mg/kg/i.p anestezisi altında sakrifiye edilerek kalp dokusu ve kan örnekleri alınmıştır. Kan örnekleri pıhtılaşmaları beklendikten sonra 2500 rpm'de santrifüj edildikten sonra serumlar ependorf tüplere alınarak -20 °C derin dondurucuda (Arçelik) çalışmalar yapılana kadar saklanmıştır. Kalp dokuları ise fosfat tamponu (pH:7,4) ile yıkanma sonrasında önce sıvı azot üzerine alınmış sonrasında real time PCR çalışmaları yapılana kadar -80 °C derin dondurucuda (Thermo) saklanmıştır.

Renal Fonksiyon Testleri

Serum kreatinin ve kan üre azotu (BUN) seviyeleri ile 24 saatlik idrar örneklerinden kreatinin ve protein seviyeleri klinik biyokimya otoanalizörü ile ölçülmüştür (Architect C16000, Abbott Laboratories). İdrar protein/kreatinin oranı ise hesaplanmıştır.

Gen Ekspresyon Analizi

Kalbin sol ventrikülünden bistüri ile ~ 200 mg doku kesilerek homojenizatör (IKA) yardımıyla homojenize edilmiş ve GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific, Kat no: K0731) kullanılarak total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Örneklerdeki

total RNA konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometre (Multiskan Go µDrop, Thermo) kullanılarak belirlenmiştir. cDNA sentezi 100 ng total RNA kullanılarak Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Kat no: K1671) ile gerçekleştirilmiştir. cDNA örneklerindeki gen ekspresyon seviyeleri SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, Kat no: K0221) kit kullanılarak real time PCR sistemi (PikoReal™ Real-Time PCR System, Thermo Scientific) ile ölçülmüştür. Cihaz ile ölçülen threshold cycle (CT) değerleri kullanılarak ALOX-12, ALOX-15, COX-1 ve COX-2'ye ait genlerin rölatif gen ekspresyon düzeyleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduna göre kat değişimi olarak hesaplanmıştır. Bu yöntemle göre aşağıdaki formülasyonlar kullanılmıştır;

$$\Delta CT = CT (\text{hedef gen}) - CT (\beta\text{-aktin})$$

$$\Delta(\Delta CT) = \Delta CT (\text{kontrol grubu}) - \Delta CT (\text{tedavi grubu}).$$

$$\text{Kat değişimi} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Çalışmada kullanılan primer dizileri aşağıda verilmiştir. Primerlerin hedef gene olan spesifikliği NCBI Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) programı kullanılarak doğrulanmıştır.

ALOX 12 geni için forward primer; CCAACTGCAGGAGCTCCAAT ve reverse primer; CTCGGGTAGCCAGATCATCG. PCR ürün uzunluğu: 296 baz çifti (bç).

ALOX 15 geni için forward primer; CAAGATGGGTGTCTACCGCA ve reverse primer; AATTCTGCTTCCGAGTCCCG.

PCR ürün uzunluğu: 150 bç.

β -aktin geni için forward primer; CTGTGTGGATTGGTGGCTCT ve reverse primer; CAGCTCAGTAACAGTCCGCC. PCR ürün uzunluğu: 135 bç.

COX 1 geni için forward primer; AGGTGTACCCACCTTCCGTA ve reverse primer; GCTGCTCGTCATCCCATGTA. PCR ürün uzunluğu: 204 bç.

COX 2 geni için forward primer; CTCAGCCATGCAGCAAATCC ve reverse

primer; GGGTGGGCTTCAGCAGTAAT.
PCR ürün uzunluğu: 172 bp.

Verilerin Değerlendirmesi

Bu çalışmada elde edilen verilerin değerlendirilmesinde GraphPad Prism 8.0 programı kullanılmıştır. Gruplar arasındaki istatistiksel farklılıklar Anova Testi ve Post-Hoc Test olarak Mann Whitney U testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 0,05'ten küçük "p" değerleri anlamlı olarak kabul edilmiştir. Veriler tablo ve grafiklerde ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir.

Araştırmanın Etik Yönü

Bu çalışmada hayvanlara uygulanan deneysel prosedürün etik kurallara uygunluğu Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından

28/12/2016 tarihi ve TUHADYEK-2016/51 numarası ile onaylanmıştır.

Destekleyen Kuruluş

Bu çalışma Amasya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje No: FMB-BAP 19-0387) ve Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (Proje No: 2018/118) tarafından desteklenmiştir.

Araştırmanın Sınırlılıkları

Bu çalışmada adropin ve speksin peptitlerinin adenin ile oluşturulan kronik renal hasarın kardiyak dokudaki oksijenazlar üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Bu peptitler enerji homeostazını düzenledikleri için diyabetik nefropati modeli oluşturularak da bu peptitlerin farklı bir böbrek hasarı modelinde denenmesi mekanizmaların daha net aydınlatılmasında faydalı olabilecektir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Adropin ve Speksin Peptitlerinin Renal Fonksiyonlar Üzerine Etkisi

Yapmış olduğumuz çalışmada adenin solüsyonu ile oluşturulan KRY modelinde renal fonksiyon testleri değerlendirildiğinde Kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak BUN miktarının 2 kat, 24 saatlik idrar hacminin 6 kat, idrar protein miktarının 2 kat, günlük idrar protein kaybının 8 kat ve protein/kreatinin oranının 10 kat arttığı gözlenmiştir (Tablo 1). Speksin tedavisi verilen grupta KRY grubuna kıyasla idrar kreatinin miktarı yaklaşık %80 oranında azalış göstermiştir. Bunun yanında adropin tedavisi verilen grupta ise KRY grubuna kıyasla 24 saatlik idrar hacminin yaklaşık %50 oranında azaldığı gözlenmiştir. Benzer olarak adropin ve speksin kombine tedavisi alan grupta da KRY grubuna kıyasla idrar kreatininin %65, idrar protein miktarının %75 ve günlük idrar protein kaybının %50 oranında azaldığı gözlenmiştir.

KRY, kötü prognoz ve yüksek mortalite ile ilişkili böbreklerde parankimal fonksiyonun kronik olarak kaybıdır. Dünya Sağlık Örgütü 2015 yılı verilerine göre 1,2

milyon insanın böbrek yetmezliğinden dolayı hayatını kaybettiği belirtilmektedir ve bu durum nüfusun %6-12'lik kısmının etkilenmesine sebep olmaktadır.³³ Bu hastalık, dünya çapında hem aileler hem de toplum üzerinde ağır bir ekonomik yük oluşturmaktadır. Oluşan renal tübüler hasar sekonder olarak kardiyak dokuda hasara neden olarak kardiyovasküler hastalıkların gelişmesine zemin hazırlamaktadır. Renal hasarın belirlenmesinde özellikle BUN, serum kreatinin, GFR, sistatin C, proteinüri ve inflamatuvar mediyatörler değerlendirilmektedir.³³

Bizim yapmış olduğumuz bu çalışmadaki amacımız adropin ve speksinin COX ve ALOX gen ekspresyonları üzerindeki etkisini kronik renal yetmezlik ekseninde gelişen kardiyak hasarda incelemektir. Bu kapsamda adenin hemisülfat uygulayarak oluşturduğumuz renal hasar modelinde BUN, 24 saatlik idrar hacmi, idrar proteini, günlük idrar protein kaybı ve protein/kreatinin oranı gibi hasarı gösteren belirteçlerin önceki çalışmalarımızda arttığını göstermiştik. Renal hasar modelinin doğrulanması için önceki yayınlarımızda kullandığımız böbrek

fonksiyon testleri bu yayın kapsamında Tablo 1’de tekrardan gösterilmiştir. Uyguladığımız speksin tedavisinin idrar kreatinin miktarını azaltıcı etki gösterdiği, bunun yanında adropin tedavisi verilen grupta 24 saatlik idrar hacminin azaldığı gözlenmiştir. Benzer olarak adropin ve speksin kombine tedavisi

alan grupta da idrar kreatininin, idrar protein ve günlük idrar protein kaybının azaldığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar adropin ve speksinin renal fonksiyonlar üzerine koruyucu etkilerinin olduğunu göstermektedir.^{34, 35}

Tablo 1. Adropin ve Speksin Peptitlerinin Renal Fonksiyonlar Üzerindeki Etkisi

	Kontrol (30.gün)	KRY (30.gün)	KRY+S (30.gün)	KRY+A (30.gün)	KRY+A+S (30.gün)
BUN (mg/mL)	53,33±3,88	111,8±33,55**	117,4±27,36	116,3±25,47	142,2±29,45
Serum kreatinin (mg/mL)	0,26±0,05	0,4±0,17	0,6±0,26	0,56±0,13	0,5±0,07
İdrar kreatinin (mg/mL)	7000±1560	1566±529,9***	326,5±195,4+++	649,7±913,5	547,3±488,1 ⁺
24 saatlik idrar hacmi (mL)	8,41±2,85	50,17±10,89***	55,67±8,59	27±7,55 ⁺	44,20±20,81
İdrar proteini (mg/mL)	223,2±59,81	461,6±276,6*	221,0±151,7	152,9±66,92	125,3±37,38 ⁺
İdrar protein kaybı (mg/gün)	1920±886,4	16701±4006***	12792±6839	10143±4489	8694±3190 ⁺⁺
Kreatinin klirensi (mL/dakika)	3,33±1,71	66,75±40,79***	44,11±35,86	59,79±45,77 ⁺	51,21±46,92
Protein/kreatinin oranı	0,0323±0,006	0,293±0,17***	1,21±1,53	0,62±0,40	0,237±0,113

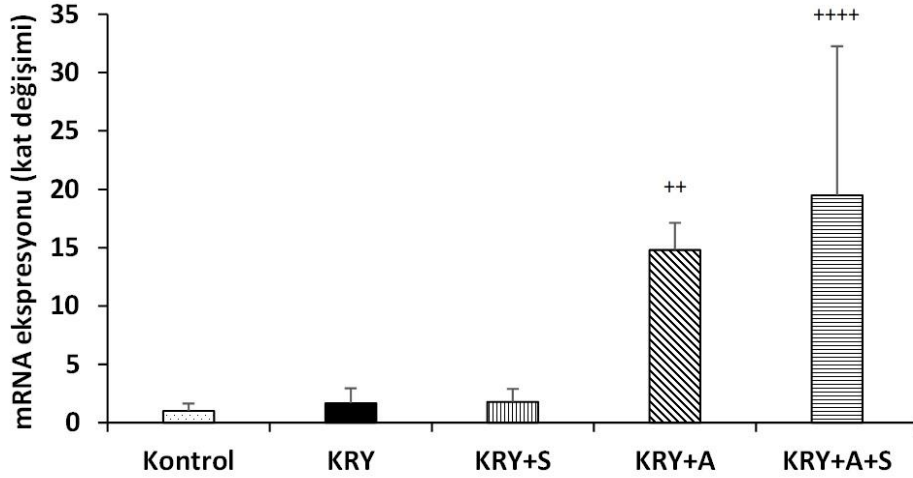
Serum kreatinin ve BUN seviyeleri ile 24 saatlik idrar örneklerinde kreatinin ve protein miktarları klinik kimya otoanalizörü ile ölçülmüştür. Kreatinin klirensi ve idrar protein/kreatinin oranı ise hesaplanmıştır. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak belirtilmiştir. Değerlendirme için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ***p<0,001 ve **p<0,01. KRY grubu ile karşılaştırıldığında ++p<0,01 ve +p<0,05. (n= 5). KRY, Kronik Renal Yetmezlik; S, Speksin; A, Adropin.

Adropin ve Speksinin COX Gen Ekspresyonları Üzerindeki Modülasyonu

COX1 gen ekspresyon sonuçları değerlendirildiğinde Kontrol ve KRY grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 1). Benzer olarak speksin tedavisi de bu genin ekspresyonun da KRY grubuna kıyasla anlamlı bir değişime sebep olmamıştır. Ancak uygulanan adropin tedavisi COX1 seviyelerini KRY grubuna

kıyasla yaklaşık olarak 14 kat arttırmıştır. Benzer olarak adropin ve speksin kombine tedavisi de bu genin ekspresyonunda yaklaşık olarak 19 kat artışa sebep olmuştur. Sonuçlar Şekil 1’de ortalama ± standart sapma olarak belirtilmiştir. Değerlendirme için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. KRY grubu ile karşılaştırıldığında ++++p<0,0001 ve ++p<0,01. (n= 5).

COX-1

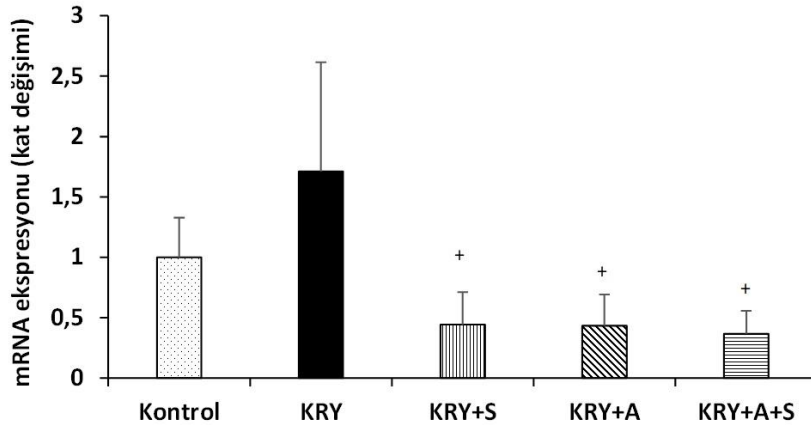


Şekil 1. Adropin ve Speksin Peptitlerinin COX1 Ekspresyonu Üzerine Etkisi

COX2 mRNA ekspresyon sonuçlarına bakıldığında Kontrol ve KRY grubunda anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 2). Ancak uygulanan speksin tedavisi ve adropin tedavileri KRY grubuna kıyasla COX2 seviyelerini yaklaşık olarak %75 oranında azaltmıştır. Benzer olarak adropin ve speksin kombine tedavisi de KRY

grubuna kıyasla COX2 gen ekspresyonunu yaklaşık olarak %80 oranında azaltmıştır. Sonuçlar Şekil 2’de ortalama \pm standart sapma olarak belirtilmiştir. Değerlendirme için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. KRY grubu ile karşılaştırıldığında $+p < 0,05$. (n= 5).

COX-2



Şekil 2. Adropin ve Speksin Peptitlerinin COX2 Ekspresyonu Üzerine Etkisi

COX ve ALOX enzimleri bir yağ asidi olan araşidonik asiti metabolize ederek prostaglandin, tromboksan, prostasiklin ve lökotrienler gibi lipid mediyatörlerin üretimini sağlamaktadır. Bu mediyatörlerin özellikle fibrotik süreç ve inflamatuvar yanıtı düzenlediği belirtilmektedir. Bu durum kardiyak hasar gelişiminde bu enzimlerin aktif rol alabileceğini

düşündürmektedir.^{5,10,12} COX1 enzimi özellikle fizyolojik koşulların düzenlenmesini sağlayan bir enzimdir ve kardiyorenal fonksiyonların düzenlenmesinde oldukça önemlidir.⁹ COX2 ise daha çok inflamatuvar süreci yönetmektedir. Yapılan bir çalışmada COX2 geni olmayan ratların kalp krizi geçirme

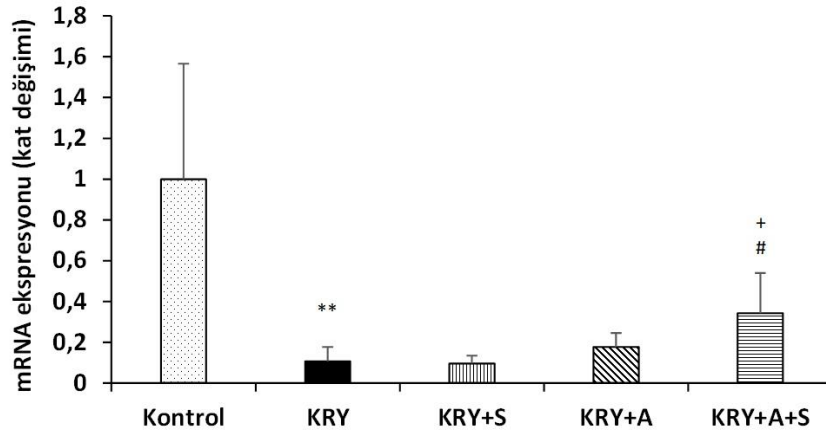
riskinin arttığı ve kardiyak enerji metabolizmasının bozulduğu bulunmuştur.³⁶

Yapmış olduğumuz çalışmamızda COX1 ve COX2 gen ekspresyonunun Kontrol ve KRY grubu arasında anlamlı bir değişime uğramadığı bulunmuştur. Benzer olarak speksin tedavisi de bu genin ekspresyonunda KRY grubuna kıyasla anlamlı bir değişime sebep olmamıştır. Ancak uygulanan adropin ve adropin+speksin kombine tedavisinin COX1'i önemli oranda arttırdığı bulunmuştur. COX2 gen ekspresyonuna bakıldığında ise speksin, adropin ve kombine tedavinin KRY grubuna kıyasla COX2 gen ekspresyonunu önemli oranda azaltıcı etki göstermiştir. Bu sonuçlar özellikle adropinin hem COX1 üzerinden kardiyorenal fonksiyonları düzenleyici etki gösterdiğini hem de COX2 üzerinden inflamatuvar süreci düzenlediğini düşündürmektedir. Speksinin ise özellikle COX2 üzerinden inflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde daha aktif rol aldığını göstermektedir.

Adropin ve Speksinin ALOX Gen Ekspresyonları Üzerindeki Düzenleyici Etkisi

ALOX12 gen ekspresyon sonuçları değerlendirildiğinde KRY grubunda Kontrol grubuna kıyasla bu genin ekspresyonunun yaklaşık olarak %90 oranında azaldığı bulunmuştur (Şekil 3). Ancak uygulanan speksin ve adropin tedavileri bu genin ekspresyonunda anlamlı bir değişikliğe sebep olmamıştır. Adropin ve speksinin birlikte uygulandığı tedavide ise KRY grubuna kıyasla yaklaşık olarak 3 kat arttığı gözlenmiştir. Ayrıca speksin grubuna kıyasla da yaklaşık 2 kat artış bulunmuştur. Sonuçlar Şekil 3'te ortalama \pm standart sapma olarak belirtilmiştir. Değerlendirme için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $**p<0,01$. KRY grubu ile karşılaştırıldığında $+p<0,05$. Speksin grubu ile karşılaştırıldığında $\#p<0,05$. (n= 5).

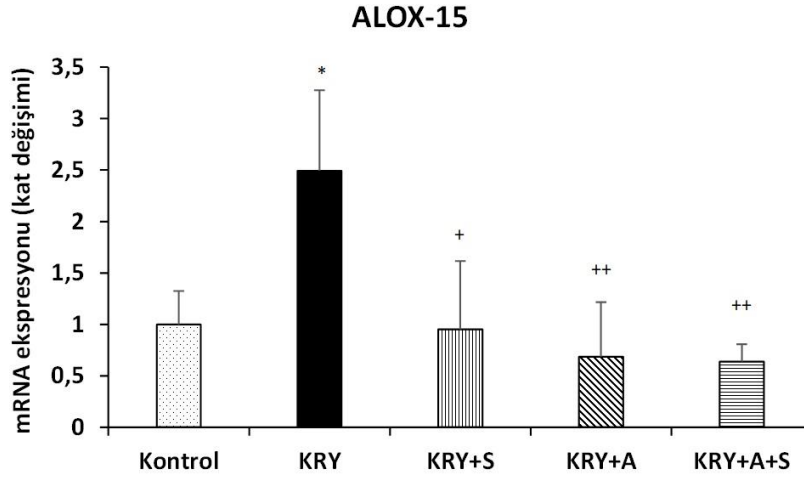
ALOX-12



Şekil 3. Adropin ve Speksin Peptitlerinin ALOX12 Ekspresyonu Üzerine Etkisi

ALOX15 mRNA ekspresyon sonuçlarına bakıldığında KRY grubunda Kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak 1,5 katlık bir artış gözlenmiştir (Şekil 4). Tam tersi speksin tedavisi sonrasında ise KRY grubuna kıyasla ALOX15'in yaklaşık olarak %60 oranında azaldığı bulunmuştur. Benzer olarak adropin uygulanması ve kombine olarak verilen adropin+speksin tedavisinde

ALOX15 gen ekspresyon seviyelerinde KRY grubuna kıyasla %75 oranında anlamlı bir azalışa yol açmıştır. Sonuçlar Şekil 4'te ortalama \pm standart sapma olarak belirtilmiştir. Değerlendirme için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $*p<0,05$. KRY grubu ile karşılaştırıldığında $++p<0,01$ ve $+p<0,05$. (n= 5).



Şekil 4. Adropin ve Speksin Peptitlerinin ALOX15 Ekspresyonu Üzerine Etkisi

ALOX enzimleri özellikle çeşitli lökotrienlerin üretimini sağlayarak yine inflamatuvar yanıtta rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda ALOX12'nin ateroskleroz ve böbrek yetmezliği gibi durumlarda azaldığı bulunmuştur.^{37, 38} ALOX12'nin aksine, hem ALOX15 enziminin hem de bu enzim ürünü olan 15-HETE'nin iskemik kalp hastalıklarında artarak kardiyovasküler hastalık gelişimine zemin hazırladığı yapılan çalışmalarda bulunmuştur.³⁹

ALOX12 sonuçlarına bakıldığında KRY grubunda Kontrol grubuna kıyasla bu genin ekspresyonunun önemli oranda azaldığı bulunmuştur. Speksin ya da adropin tedavileri bu genin ekspresyonunda anlamlı

bir değişikliğe sebep olmazken özellikle adropin ve speksinin birlikte uygulandığı kombine tedavide ise KRY grubuna kıyasla önemli oranda arttığı bulunmuştur. Bu sonuçlar ALOX12'nin kombine tedavi ile arttığı bu durumun ise kardiyoprotektif özellikleri güçlendirebileceğini göstermektedir. ALOX15 mRNA ekspresyon sonuçlarına bakıldığında KRY grubunda Kontrol grubuna kıyasla önemli bir artış gözlenmiştir. Aksine speksin, adropin ve kombine adropin+speksin tedavilerinin hepsi ALOX15 seviyelerinde KRY grubuna kıyasla önemli bir azalışa yol açmıştır. Bu tedavilerin hepsi ALOX15 miktarını azaltarak kardiyak dokunun korunmasını sağlamaktadır.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Kardiyovasküler hastalıklar günümüzde halen en önemli ölüm sebebidir. Kardiyak hasar sürecinde COX ve ALOX enzimleri hem doku yeniden düzenlenmesini hem de inflamasyonda rol alan birçok lipid mediyatörün üretiminden sorumlu olduğu için bu hastalıkların gelişiminde önemli bir rolü vardır. Adropin ve speksin karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmalarını kontrol ederek enerji regülasyonunu sağlamaktadır. Bu peptitlerin COX ve ALOX'lar üzerindeki etkileri ile ilgili literatürde yeterli çalışma bulunmamaktadır. Ancak özellikle adropin peptidinin endotelial disfonksiyon, kalp krizi

ve hipertansiyon gibi kardiyovasküler problemlerde koruyucu role sahip olduğu belirtilmektedir.⁴⁰ Bu çalışma ile adropin ve speksin peptitlerinin kardiyak dokuda COX ve ALOX gen ekspresyonlarını önemli oranda düzenlediğini gösterdik. Elde ettiğimiz veriler bu peptitlerin kardiyovasküler hastalık gelişiminde potansiyel birer terapötik ajan gibi kullanılabileceğini göstermektedir. Ancak bu peptitler ile ilgili hem diğer kardiyorenal hasarın oluşturulduğu hayvan modellerindeki çalışmalara hem de bunun yanında insan çalışmalarına ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Levin, A, Tonelli, M, Bonventre, J, Coresh, J, Donner, J.A, Fogo, A.B, Fox, C.S, Gansevoort, R.T, Heerspink, H.J.L, Jardine, M, Kasiske, B, Köttgen, A, Kretzler, M, Levey, A.S, Luyckx, V.A, Mehta, R, Moe, O, Obrador, G, Pannu, N, Parikh, C.R, Perkovic, V, Pollock, C, Stenvinkel, P, Tuttle, K.R, Wheeler, D.C and Eckardt, K.U. (2017). "ISN Global Kidney Health Summit Participants. Global Kidney Health 2017 and Beyond: A Roadmap for Closing Gaps in Care, Research, and Policy". *Lancet*,390 (10105), 1888-1917. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30788-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30788-2)
2. Go, A.S, Chertow, G.M, Fan, D, McCulloch, C.E. and Hsu, C.Y. (2004). "Chronic Kidney Disease and The Risks of Death, Cardiovascular Events, and Hospitalization". *New England Journal of Medicine*, 351 (13), 1296-1305. <https://doi.org/10.1056/nejmoa041031>
3. Collins, A.J, Foley, R.N, Gilbertson, D.T. and Chen, S.C. (2015). "United States Renal Data System Public Health Surveillance of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease". *Kidney International Supplements*, 5 (1), 2-7. <https://doi.org/10.1038/kisup.2015.2>
4. Rahman, S. and Malcoun, A. (2014). "Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs, Cyclooxygenase-2, and The Kidneys". *Prim Care*, 41 (4), 803-821. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2014.09.001>
5. Liaras, K, Fesatidou, M. and Geronikaki, A. (2018). "Thiazoles and Thiazolidinones As COX/LOX Inhibitors". *Molecules*, 23 (3), 685. <https://doi.org/10.3390/molecules23030685>
6. Fujihara, C.K, Antunes, G.R, Mattar, A.N.A.L, Andreoli, N, Avancini, D.M, Malheiros, C, Noronha, I.L. and Zatz, R. (2003). "Cyclooxygenase-2 (COX-2) Inhibition Limits Abnormal COX-2 Expression and Progressive Injury in The Remnant Kidney". *Kidney International*, 64 (6), 2172-2181. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00319.x>
7. Krämer, B.K, Kammerl, M.C. and Kömhoff, M. (2004). "Renal Cyclooxygenase-2 (Cox-2)". *Kidney and Blood Pressure Research*, 27 (1), 43-62. <https://doi.org/10.1159/000075811>
8. Parente, L. and Perretti, M. (2003). "Advances in The Pathophysiology of Constitutive and Inducible Cyclooxygenases: Two Enzymes in The Spotlight". *Biochemical Pharmacology*, 65 (2), 153-159. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01422-3](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01422-3)
9. Radi, Z.A. (2009). "Pathophysiology of Cyclooxygenase Inhibition in Animal Models". *Toxicologic Pathology*, 37 (1), 34-46. <https://doi.org/10.1177%2F0192623308329474>
10. Mitchell, J.A. and Kirkby, N.S. (2019). "Eicosanoids, Prostacyclin and Cyclooxygenase in The Cardiovascular System". *British Journal of Pharmacology*, 176 (8), 1038-1050. <https://doi.org/10.1111/bph.14167>
11. Newcomer, M.E. and Brash, A.R. (2015). "The Structural Basis for Specificity in Lipoxygenase Catalysis". *Protein Science*, 24 (3), 298-309. <https://doi.org/10.1002/pro.2626>
12. Giménez-Bastida, J.A, González-Sarriás, A, Laparra-Llopis, J.M, Schneider, C. and Espín, J.C. (2021). "Targeting Mammalian 5-Lipoxygenase by Dietary Phenolics As An Anti-Inflammatory Mechanism: A Systematic Review". *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (15), 7937. <https://doi.org/10.3390/ijms22157937>
13. Michiels, C., Bouaziz, N. and Remacle, J. (2002). "Role of The Endothelium and Blood Stasis in The Appearance of Varicose Veins". *International Angiology*, 21 (2), 18-25.
14. Kain, V, Ingle, K.A, Kabarowski, J, Barnes, S, Limdi, N.A, Prabhu, S.D. and Halade, G.V. (2018). "Genetic Deletion of 12/15 Lipoxygenase Promotes Effective Resolution of Inflammation Following Myocardial Infarction". *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 118, 70-80. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.03.004>
15. Wen, Y, Gu, J, Peng, X, Zhang, G. and Nadler, J. (2003). "Overexpression of 12-Lipoxygenase and Cardiac Fibroblast Hypertrophy". *Trends in Cardiovascular Medicine*, 13 (4), 129-136. [https://doi.org/10.1016/S1050-1738\(03\)00027-6](https://doi.org/10.1016/S1050-1738(03)00027-6)
16. Cicero, A.F, Derosa, G. and Gaddi, A. (2005). "Combined Lipoxygenase/Cyclo-Oxygenase Inhibition in The Elderly: The Example of Licofelone". *Drugs Aging*, 22 (5), 393-403. <https://doi.org/10.2165/00002512-200522050-00004>
17. Mirabeau, O, Perlas, E, Severini, C, Audero, E, Gascuel, O, Possenti, R, Birney, E, Rosenthal, N. and Gross, C. (2007). "Identification of Novel Peptide Hormones in The Human Proteome by Hidden Markov Model Screening". *Genome Research*, 17 (3), 320-7. <http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.5755407>
18. Lv, S.Y, Zhou, Y.C, Zhang, X.M, Chen, W.D. and Wang, Y.D. (2019). "Emerging Roles of NPQ/Spexin in Physiology and Pathology". *Frontiers in Pharmacology*, 10, 457. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00457>
19. Gu, L, Ma, Y, Gu, M, Zhang, Y, Yan, S, Li, N, Wang, Y, Ding, X, Yin, J, Fan, N. and Peng, Y. (2015). "Spexin Peptide Is Expressed in Human Endocrine and Epithelial Tissues and Reduced After Glucose Load in Type 2 Diabetes". *Peptides*, 71, 232-39. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.07.018>
20. Kim, D.K, Yun, S, Son, G.H, Hwang, J.I, Park, C.R, Kim, J.I, Kim, K, Vaudry, H. and Seong, J.Y. (2014). "Coevolution of The Spexin/Galanin/Kisspeptin Family: Spexin Activates Galanin Receptor Type II and III". *Endocrinology*, 155 (5), 1864-1873. <https://doi.org/10.1210/en.2013-2106>
21. Lv, S.Y, Zhou, Y.C, Zhang, X.M, Chen, W.D. and Wang, Y.D. (2019). "Emerging Roles of NPQ/Spexin in Physiology and Pathology". *Frontiers in Pharmacology*, 10, 457. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00457>
22. Türkel, İ, Memi, G. and Yazgan, B. (2022). "Impact of Spexin on Metabolic Diseases and Inflammation: An Updated Minireview". *Experimental Biology and Medicine*, 247 (7), 567-573. <https://doi.org/10.1177%2F15353702211072443>
23. Kumar, K.G, Trevaskis, J.L, Lam, D.D, Sutton, G.M, Koza, R.A, Chouljenko, V.N, Kousoulas, K.G, Rogers, P.M, Kesterson, R.A, Thearle, M, Ferrante, A.W, Mynatt, R.L, Burris, T.P, Dong, J.Z, Halem, H.A, Culler, M.D, Heisler, L.K, Stephens, J.M. and Butler, A.A. (2008). "Identification of Adropin As A Secreted Factor Linking Dietary Macronutrient Intake with Energy Homeostasis and Lipid Metabolism". *Cell Metabolism*, 8 (6), 468-81. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.10.011>
24. Jaszczwili, M, Billert, M, Strowski, M.Z, Nowak, K.W. and Skrzypski, M. (2020). "Adropin As A Fat-Burning Hormone with Multiple Functions—Review of A Decade of Research". *Molecules*, 25 (3), 549. <https://doi.org/10.3390/molecules25030549>
25. Aydin, S. (2014). "Three New Players in Energy Regulation: Peptin, Adropin and Irisin". *Peptides*, 56, 94-110. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.03.021>
26. Altamimi, T.R, Gao, S, Karwi, Q.G, Fukushima, A, Rawat, S, Wagg, C.S, Zhang, L. and Lopaschuk, G.D. (2019). "Adropin Regulates Cardiac Energy Metabolism and Improves Cardiac Function and Efficiency". *Metabolism*, 98, 37-48. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2019.06.005>
27. Lian, W, Gu, X, Qin, Y. and Zheng, X. (2011). "Elevated Plasma Levels of Adropin in Heart Failure Patients". *Internal*

- Medicine, 50 (15), 1523-27. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.50.5163>
28. Topuz, M, Celik, A, Aslantas, T, Demir, A.K, Aydin, S. and Aydin, S. (2013). "Plasma Adropin Levels Predict Endothelial Dysfunction Like Flow-Mediated Dilatation in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus". *Journal of Investigative Medicine*, 61 (8), 1161-64. <http://dx.doi.org/10.2310/JIM.0000000000000003>
 29. Gulen, B, Eken, C, Kucukdagli, O.T, Serinken, M, Kocyigit, A, Kılıc, E. and Uyarel, H. (2016). "Adropin Levels and Target Organ Damage Secondary to High Blood Pressure in The ED". *The American Journal of Emergency Medicine*, 34 (11), 2061-64. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2016.04.014>
 30. Hu, W. and Chen, L. (2016). "Association of Serum Adropin Concentrations with Diabetic Nephropathy". *Mediators of Inflammation*, 2016, 6038261. <https://doi.org/10.1155/2016/6038261>
 31. Maciorkowska, M, Musiałowska, D. and Małyżko, J. (2019). "Adropin and Irisin in Arterial Hypertension, Diabetes Mellitus and Chronic Kidney Disease". *Advances in Clinical and Experimental Medicine: Official Organ Wroclaw Medical University*, 28 (11), 1571-1575. <https://doi.org/10.17219/acem/104551>
 32. Akcilar, R, Kocak, F.E, Simsek, H, Akcilar, A, Bayat, Z, Ece, E. and Kokdasgil, H. (2016). "Antidiabetic and Hypolipidemic Effects of Adropinin Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetic Rats". *Bratislava Medical Journal- Bratislavské lekárske listy*, 117 (2), 100-105. <https://doi.org/10.3390/diseases9020043>
 33. Deferrari, G, Cipriani, A. and La Porta, E. (2021). "Renal Dysfunction in Cardiovascular Diseases and Its Consequences". *Journal of Nephrology*, 34 (1), 137-153. <https://doi.org/10.1007/s40620-020-00842-w>
 34. Yazgan, B, Avci, F, Memi, G. and Tastekin, E. (2021). "Inflammatory Response and Matrix Metalloproteinases in Chronic Kidney Failure: Modulation by Adropin and Spexin". *Experimental Biology and Medicine*, 246 (17), 1917-1927. <https://doi.org/10.1177/15353702211012417>
 35. Memi, G. and Yazgan, B. (2021). "Adropin and Spexin Hormones Regulate The Systemic Inflammation in Adenine-Induced Chronic Kidney Failure in Rat". *Chinese Journal of Physiology*, 64 (4), 194. https://doi.org/10.4103/cjp.cjp_13_21
 36. Wan, Q, Kong, D, Liu, Q, Guo, S, Wang, C, Zhao, Y, Ke, Z.J. and Yu, Y. (2021). "Congestive Heart Failure in COX2 Deficient Rats". *Science China Life Sciences*, 64 (7), 1068-1076. <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1792-5>
 37. Zheng, Z, Li, Y, Jin, G, Huang, T, Zou, M. and Duan, S. (2020). "The Biological Role of Arachidonic Acid 12-Lipoxygenase (ALOX12) in Various Human Diseases". *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 129, 110354. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110354>
 38. Gertow, K, Nobili, E, Folkersen, L, Newman, J.W, Pedersen, T.L, Ekstrand, J, Swedenborg, J, Kühn, H, Wheelock, C.E, Hansson, G.K, Hedin, U, Haeggström, J.Z. and Gabrielsen, A. (2011). "12-and 15-Lipoxygenases in Human Carotid Atherosclerotic Lesions: Associations with Cerebrovascular Symptoms". *Atherosclerosis*, 215 (2), 411-416. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.01.015>
 39. Lundqvist, A, Sandstedt, M, Sandstedt, J, Wickelgren, R, Hansson, G.I, Jeppsson, A. and Hultén, L.M. (2016). "The Arachidonate 15-Lipoxygenase Enzyme Product 15-HETE Is Present in Heart Tissue from Patients with Ischemic Heart Disease and Enhances Clot Formation". *Plos One*, 11 (8), e0161629. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161629>
 40. Askin, L, Askin, H.S, Tanriverdi, O. and Hosoglu, Y. (2022). "Serum Adropin: Pathogenesis and Clinical Research in Cardiovascular Disease". *Erciyes Medical Journal*, 44 (1), 8-12. <https://doi.org/10.14744/etd.2021.23571>