

T. C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HAYVAN BESLEME VE BESLENME
HASTALIKLARI ANABİLİM DALI



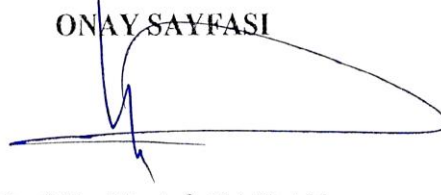
YÜKSEK YAĞLI DİYETLE BESLENEN
SIÇANLARDA MAGNEZYUM
FORMLARININ RENAL DİSTAL
TUBÜL TAŞIYICI PROTEİNLER
ÜZERİNE ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kübra YAZGAN

2018

ONAY SAYFASI



Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. Talat GÜLER

Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Kazım ŞAHİN



Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ



Prof. Dr. Talat GÜLER



Prof. Dr. Kazım ŞAHİN





ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Kübra YAZGAN

Tarih
02.08.2018
İmza

Prof. Dr. Kazım ŞAHİN

Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim dalı

ELAZIĞ

TEŞEKKÜR

Tez çalışmasının planlanması, yürütülmesi ve gerçekleştirilmesinde değerli bilgilerini benimle paylaşan, sonuçların değerlendirilmesi ve yazım aşamasında bana büyük katkılar sağlayan kıymetli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Kazım ŞAHİN hocama teşekkürü bir borç bilirim. Bu tez çalışmasında benden yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Nurhan ŞAHİN, Sayın Doç. Dr. Cemal ORHAN, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet TUZCU hocalarıma saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Bu tez çalışmasının uygulama ve analizlerinde destek aldığım Beşir ER, Hafize GENÇABAN ve Füsun ERTEN'e teşekkürlerimi sunarım. FÜBAP–VF.18.02 nolu proje ile sağladığı maddi destekten dolayı Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Projeler Birimi ve çalışanlarına teşekkür ederim. Eğitimim süresince her türlü maddi ve manevi destekleriyle bana güç veren başta ailem olmak üzere tüm sevdiklerime teşekkürlerimi sunarım.

KÜBRA YAZGAN

İÇİNDEKİLER

KAPAK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
ETİK BEYAN	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLO LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
KISALTMALAR LİSTESİ	x
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ	3
3.1. Magnezyum	4
3.2. Magnezyumun Böbreklerden Emilimi ve Atılımı	6
3.2.1. Proksimal Konvolüsyonlu Tüpte Magnezyum Emilimi	7
3.2.2. Henle'nin Kalın Artan Ekstremitesinde Magnezyum Emilimi	8
3.2.3. Distal Kıvrımlı Tüpte (DCT) Magnezyum Emilimi	9
3.3. Böbreklerin Mg Homeostazisindeki Rolü	10
3.4. Renal Magnezyum Taşıyıcıları	11
3.4.1. Geçici Reseptör Potansiyel Melastatin (TRPM) 6 VE 7	13
3.4.2. Na ⁺ -CL-Kotransporter (NCC)	15
3.4.3. Claudin-16ve 19	16
3.4.4. Epidermal Büyüme Faktörü	17

3.5. Amaç	19
4. GEREÇ VE YÖNTEM	21
4.1. Araştırma Materyali ve Deneme Düzeni	21
4.2. Laboratuvar Analizleri	23
4.2.1. Serum Üre Nitrojeni ve Kreatinin Analizi	23
4.2.2. Böbrek Magnezyum Analizi	23
4.2.3. Böbrek MDA Analizi	24
4.2.4. Western Blot Analizleri	25
4.2.5. İstatistiksel Analizler	30
5. BULGULAR	31
5.1. Üre ve Kreatin Düzeyleri	31
5.2. Böbrek Mg Düzeyleri	33
5.3. Böbrek MDA Düzeyleri	35
5.4. Protein Düzeyleri	37
6. TARTIŞMA	46
7. KAYNAKLAR	53
8. ÖZGEÇMİŞ	63

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Araştırmada kullanılacak bazal diyetin bileşimi	22
Tablo 2. Deneme planı (n=7)	23



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Renal tübüler Mg+2 kullanımı. Filtrelenmiş Mg+2'un%95'inden fazlası böbrek içinde emilir ve günlük olarak sadece yaklaşık 100 mg Mg+2 atılır. Distal kıvrımlı tüp, Mg+2 reabsorpsiyonunun olduğu son kısımdır. Bu bölümün ilerisinde, böbrek tübüleri Mg+2 'a karşı geçirgen değildir 7

Şekil 2: Henle'nin (TAL) kalın artan uzvunda Mg+2 kullanımı. Bağlanam proteinleri claudin-16 ve -19, Ca²⁺ve Mg+2 geçirgen kanal oluştururlar. Dolaşımdaki Mg+2 veya Ca²⁺, sıkı bağlantı claudin kompleksi üzerinde inhibe edici etkiye sebep olan bazolateral kalsiyum duyarlı reseptörü (CaSR) aktive edebilir. Bazolateral Na-K-ATPase, paraselüler Mg+2 ve Ca²⁺emilimini kolaylaştırmak için olumlu bir pozitif lümen voltajı üreten, apikal Na-K-2Cl kotransporter (NKCC2) ve paralel K⁺ atılımının ROMK yoluyla teşvik kuvvetini sağlar (19, 20). 8

Şekil 3: Henle'nin (TAL) kalın artan uzvunda düzenlenmiş paraselüler Mg+2 emilimi. Claudin-16 kendi başına Na⁺ için geçirgendir ve claudin-19 Cl⁻'a karşı geçirgen değildir. Claudin-14, claudin-16'nın Na kanalı geçirgenliğini belirler. Na⁺, TAL'in distal kısmına geri döner ve pozitif bir luminal voltajın korunmasına yardımcı olur. Claudin-14'ün bu etkisinin tıkanması, pozitif luminal voltajı tehlikeye atar ve Mg+2 emilimi için itici gücü azaltır. Claudin-19 tarafından Cl⁻ passage'nin caydırılması, negatif bir mikro alanlı yük yaratır ve luminal Mg+2 ve Ca²⁺ 'ya karşı seçici bir çekim yaratır. Yüksek konsantrasyonda Mg²⁺ veya Ca²⁺ ile aktive edildiğinde bazolateral kalsiyum duyarlı reseptör (CaSR), miR-9 ve miR-375'i inhibe eder. İnhibisyon, mikroRNA'ların claudin-14 translasyonu ile

etkileşimini ortadan kaldırır, bu da claudin-14 translasyonunun ve claudin-14'ün claudin-14'ün aracılık ettiği inhibisyonu ile sonuçlanır, böylece Mg^{2+} ve Ca^{2+} absorpsiyonunu inhibe eder. 9

Şekil 4: Yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda Mg formlarının Kan Üre Azotu üzerine etkisi. 31

Şekil 5: Yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda diyetle katılan Mg formlarının serum keratin üzerine etkileri. 32

Şekil 6: Yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda Mg formlarının böbrek Mg düzeyleri üzerine etkisi. 34

Şekil 7: Yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda Mg formlarının böbrek MDA üzerinde etkisi. 36

Şekil 8:Yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda Mg formlarının böbrek TRPM6 düzeyi üzerine etkisi. 38

Şekil 9:Yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda Mg formlarının böbrek TRPM7 düzeyi üzerine etkisi. 40

Şekil 10: Yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda Mg formlarını renal tubül taşıyıcı protein olan NCC düzeyi üzerine etkisi. 42

Şekil 11: Yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda Mg formlarının EGF düzeyi üzerine etkisi. 43

Şekil 12:Yüksek yağlı diyet ile beslenen ratlarda Mg formlarının claudin16 düzeyi üzerine etkisi 44

Şekil 13: Yüksek yağlı diyet ile beslenen ratlarda Mg formlarının claudin19düzeyi üzerine etkisi. 45

KISALTMALAR LİSTESİ

ATP	: Adenozin 3'-trifosfat
CaSR	: Kalsiyuma Duyarlı Reseptör
CAT	: Katalaz enzim
CLDN -16	: CLAUDİN-16
CLDN -19	: CLAUDİN-19
DCT	: Distal kıvrık Tubül
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit.
EGFR	: Epidermal growth factor receptor
FHHNC	: Familial Hereditör Nefro Calsinosiz
GLUT	: Glikoz Taşıyıcı protein
GSHPx	: Glutasyon peroksidaz
HB-EGF	: Heparin-binding EGF-like growth factor
HER	: Human Epidermal Growth Factor
HSR	: Hipokalsemi
LETO	: Long-Evans Tokushima Otsuka
MDA	: Malondialdehit
Mg	: Magnezyum
MgO	: Magnezyum oksit
MgPic	: Magnezyum Pikolanat
mRNA	: Haberci RNA
NCC	: Na^{+} - Cl^{-} COTRANSPORTER
NKCC2	: Na-K-2CL KOTRANSPORTER

NRO	: Neuregulin
OETF	: Evans Tokushima Yağı
PMSF	: phenylmethysulfonyl fluoride
RNA	: Ribo Nükleik Asit
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TAL	: Kalın Artan kol
TRP	: Geçici alıcı potansiyel
TRPM-6	: Transient Receptor Potential Melastatin-6
TRPM-7	: Transient Receptor Potential Melastatin-7
WNK	: Lysine Deficient Protein Kinase 3
YYD	: Yüksek Yağlı Diyet

1. ÖZET

Vücudun birçok biyokimyasal fonksiyonunda rol oynayan magnezyum (Mg), hücrede en çok bulunan ikinci katyon olup, yaşamın her evresi için gereklidir. Öte yandan, obezite gibi kronik hastalıklar ve yağlı diyet alımı bir elektrolit bozukluğu olan hipomagnezemiye neden olur. Geniş literatür taramasına rağmen, yüksek yağlı diyetle (YYD) beslenen ratlarda, diyetle ilave edilen Mg formlarının [magnezyum oksit (MgO); magnezyum pikolinat (MgPic)], renal Mg taşıyıcıları üzerindeki moleküler etkileri ile ilgili çalışmalara rastlanılmamıştır. Bu çalışmada, yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanlarda, bu Mg formlarının renal Mg taşıyıcıları (TRPM6, TRPM7, EGF, claudin-16, claudin-19, NCC) üzerindeki moleküler etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, 8 haftalık yaşta 42 adet erkek Sprague-Dawley sıçan 6 gruba ayrıldı. 1)Kontrol; 2)MgO 3)MgPic; 4)YYD; 5)YYD+MgO; 6)YYD+MgPic. Mg, kg yemde 500 mg elemental Mg olacak şekilde diyetle katıldı. Diyetle katılan her iki Mg formunun serum kreatin ve üre üzerine bir etkisi tespit edilmemiştir ($P>0.05$). Yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda böbrek Mg düzeyi düşük bulunurken, böbrek MDA düzeyleri ise yüksek bulunmuştur. Ancak, böbrek Mg düzeyi, diyetle Mg ilavesi ile artmış, böbrek MDA düzeyi ise Mg ilaveleri ile azalmıştır ($P<0.001$). En yüksek artış/düşüş ise MgPic grubunda elde edildi. Ayrıca, TRPM6, TRPM7, NCC, EGF, claudin16 ve claudin19 Mg taşıyıcıları da yüksek yağlı diyetle negatif yönde etkilenmiştir. Ancak, Mg formlarının özellikle de MgPic'in bu iyon kanallarının düzeylerini iyileştirdiği belirlenmiştir ($P<0.001$). Sonuç olarak, yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanlarda MgO ve MgPic'in böbrek oksidatif stresini azaltarak ve böbrek TRPM6, TRPM7, NCC, EGF, claudin16 ve claudin19 gibi Mg taşıyıcılarını aktive ederek, böbrekte yağlı diyetle bağlı oluşabilecek olumsuzlukların önlenmesine katkı sağlayacağı kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Yüksek yağlı diyet, Böbrek, Magnezyum, TRPM, NCC, Claudin

2. ABSTRACT

The Effect of Magnesium Forms on Renal Distal Tubule Transporters in Rats Fed with High Fat Diet

Magnesium (Mg), which takes part in many biochemical body functions, is the second most common cation of the cell and is essential for every step of life. On the other hand, chronic diseases such as obesity and high fat diet intake lead to hypomagnesemia, an electrolyte disorder. Studies on the molecular effects of dietary supplementation of Mg forms [magnesium oxide (MgO); magnesium picolinate (MgPic)] on renal Mg transporters was not found in high fat diet fed rats, even with extensive literature review. In this study, the molecular effects of these Mg forms on renal Mg carriers (TRPM6, TRPM7, EGF, claudin-16, claudin-19, NCC) have been investigated in high-fat diet fed rats. For this purpose, 42 male Sprague-Dawley (8 weeks old) rats were allocated to six groups: 1) Control; 2) MgO; 3) MgPic; 4) HFD; 5) HFD+MgO; 6) HFD+MgPic. Mg added to the diet as 500 mg elemental Mg per kg/rat. No effect on serum creatinine and urea levels of both Mg forms in the diets was detected ($P > 0.05$). In high fat fed rats, kidney Mg levels were found lower, while kidney MDA levels were higher. However, the kidney Mg level was increased by dietary Mg supplementation and the kidney MDA level was decreased by Mg supplementations ($P < 0.001$). The highest increase/decrease obtained in the MgPic group. In addition, TRPM6, TRPM7, NCC, EGF, claudin16 and claudin19 Mg carriers affected negatively by the high fat diet. However, it has been determined that Mg forms, particularly MgPic, improve the levels of these ion channels ($P < 0.01$). In conclusion, MgO and MgPic could reduce the oxidative stress in the kidneys and activate Mg carriers such as kidney TRPM6, TRPM7, NCC, EGF, claudin16, and claudin19, thus contributing to the prevention of adverse reactions due to high fat feeding in the kidneys of the rats.

Key Words: High-fat diet, Kidney, Magnesium, TRPM, NCC, Claudin

3. GİRİŞ

Magnezyum (Mg^{+2}) vücutta en çok bulunan elementlerden biri olup, 300'den fazla enzimatik reaksiyonda görev alır ve hücre içinde potasyumdan sonraki ikinci katyondur. ATP, DNA, RNA dâhil pek çok yapıda bulunan Mg^{+2} , karbonhidrat metabolizmasında birçok enzimin kofaktörü olup, glikoz homeostazı ve insülin aktivitesinde önemli rol oynar (1-4). Mg^{+2} proteinlerin ve nükleik asitlerin ve iyon kanallarının bir modülatörünün önemli bir yapısal elementidir (5, 6). Magnezyumun kemik mineral metabolizması, vasküler tonusun korunması ve kardiyak ritmin düzenlenmesinde de rolü bulunmaktadır (7). Negatif yüklü iyonlar ile etkileşime girerek allosterik etki göstermekte olup, farklı moleküllerinin birbirine bağlanmasını sağlar. Hücre içi magnezyum düzeyleri; plazma membranından magnezyum girişini ve çıkışını, hücre içi magnezyumun depolanmasını ve organel lokalizasyonunu denetleyen kontrol mekanizmaları ile düzenlenmektedir (8). Mg^{+2} eksikliği migren, Parkinson, Alzheimer, hipotansiyon, tip 2 diabetes mellitus ve kardiyak aritmi gibi birçok hastalığa neden olur veya katkıda bulunur (7, 8).

3.1. Magnezyum

Fizyolojik koşullar altında, hücre içi Mg^{+2} konsantrasyonları, çoğu memeli hücresinde 10 ila 20 mM arasında değişir. Toplam hücresel Mg^{+2} 'nin yaklaşık %15-22'si hücre organellerinin sitoplazmasında ve lümeninde bulunur (9-11). Erişkin insan vücudunda yaklaşık 25 g magnezyum vardır. Bunun üçte ikisi iskelette, üçte biri yumuşak dokularda yer almaktadır. Negatif yüklü iyonlar ile etkileşime girerek allosterik etki göstermekte ve farklı moleküllerin birbirine bağlanmasına sebep olmaktadır. Toplam Mg^{+2} 'un yaklaşık %50'si, esas olarak ATP (Mg-ATP) olmak üzere, nükleotid trifosfatlara bağlanır (11). Tek bir ribozom 170'den fazla Mg^{+2} iyonunu bağlar ve tüm ribozom havuzunun hücresel Mg^{+2} 'un %25'ini şelatlayabileceği tahmin edilmiştir (11, 12, 13). Mg^{+2} 'nin önemli bir kısmı DNA ve non-spazomal RNA türleri ile ilişkilidir. Sekiz yüzden fazla enzimin aktivitesi için Mg^{+2} gereklidir (11). Koyu yeşil renkli sebzeler, bol miktarda işlenmemiş hububat, kuruyemiş, çekirdek, soya fasulyesi, yer fıstığı, rafine edilmemiş tahıllar, balık, tavuk eti, peynir ve yumurta Mg^{+2} bakımından zengin gıdalardır (4). Hava kirliliği, artmış rafine su ve diğer ürünlerin kullanımı magnezyumun doğal yollardan alınımını gün geçtikçe azaltmaktadır. Hücre içi Mg^{+2} düzeyleri katı kontrol mekanizmaları ile kontrol edilmektedir ve mekanizmalar plazma membranından Mg^{+2} girişini ve çıkışını ve hücre içi Mg^{+2} 'un depolanmasını ve organel lokalizasyonu kontrol etmek suretiyle bu düzeni sağlamaktadır (8).

Mg^{+2} salınımı Na/Mg exchanger adı verilen Na bağımlı bir taşıyıcı ve Na bağımsız bir Mg exchanger adı verilen taşıyıcı üzerinden gerçekleşir (14). Kemikte bulunan magnezyumun çok az bir kısmı ekstrasellüler magnezyum ile değişim içindedir. Vücuttaki total magnezyumunun yaklaşık %1'i ekstrasellüler sıvıdadır. Bu nedenle plazma magnezyum seviyesi ile total vücut magnezyum seviyesinin ölçümü güvenilir değildir (5, 15). Total vücut magnezyumu süt çocuklarında 260 mg/kg iken, erişkinlerde 330 mg/kg'a kadar çıkar (16). İnsanlarda normal serum magnezyum konsantrasyonu 1.6-2.4 mg/dl arasında değişim göstermektedir (17). Total vücut magnezyumunun %60'ı kemiklerde, geriye kalan %40'ı ise intrasellüler alanda bulunmaktadır (4). İntrasellüler magnezyumun %20-30'u intrasellüler alan ile ekstrasellüler arasında değişebilir, geriye kalan ise proteinlere bağlıdır. Total serum magnezyumunun %30'u proteinlere bağlı, %55'i iyonize, %15'i kompleks yapıdadır. İyonize ve kompleks yapıda bulunan fraksiyonları filtrasyona uğrar. Magnezyumun vücuttaki konsantrasyonu gastrointestinal sistemden emilim, böbreklerden reabsorbsiyon ve ekskresyon ile düzenlenir (18).

Yetersiz hücresel Mg^{+2} alımı protein sentezini etkiler, enerji metabolizmasını bozar ve hücre büyümesini ve çoğalmasını engeller. Organismal Mg^{+2} yoksunluğu, tip 2 diyabet, metabolik sendrom, osteoporoz ve farklı immün, kardiyovasküler ve nörolojik bozukluklar gibi yaygın insan hastalıklarına katkıda bulunur. ABD popülasyonunun %60'ı yetersiz Mg^{+2} alımı göstermekte ve hipomagnezemi hastanede yatan hastaların %30'unda ortaya çıkmaktadır (19, 20). Böbrek, Mg^{+2} homeostazını düzenleyen temel organdır (21). Son yirmi yılda, Mg^{+2} disregülasyonunun nedeni olarak nadir görülen genetik değişiklikler olan

hastaları araştırmak suretiyle bir dizi yeni Mg^{+2} düzenleyici mekanizma ortaya çıkarılmıştır (22).

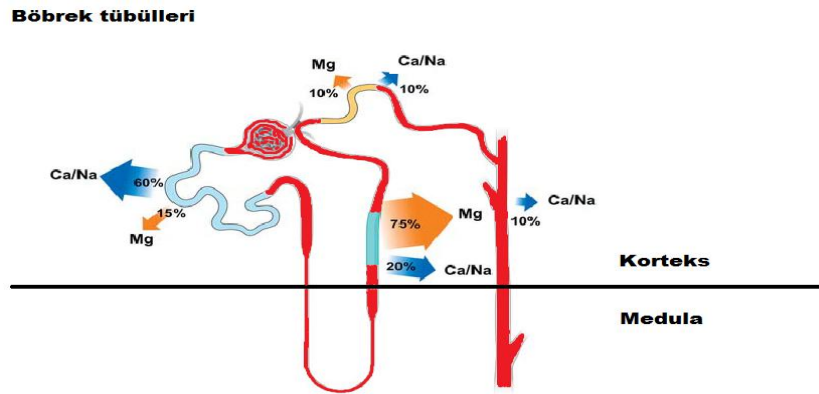
3.2. Magnezyumun Böbreklerden Emilimi ve Atılımı

Genlerdeki polimorfizmlerin Mg^{+2} homeostasisi ile bağlantıları olup, Mg^{+2} 'nin hayati öneme sahip, hücre içi bir element olduğunu göstermiştir. Magnezyum, nükleotit ve baz eksizyonu onarımı ile yanlış eşleşme dahil DNA onarımına katılmaktadır (23). Magnezyum transport sistemi ve pasif difüzyonla jejenumdan emilmektedir. Vücutta bulunan toplam 20-30 gr kadar magnezyumun, %60'ı kemiklerde, %39'u intrasellüler alanda ve %1'i ise ekstrasellüler alanda bulunmaktadır (4). Böbreklerin magnezyum dengesinde önemli bir rolü vardır. Plazma magnezyumunun %80'i iyonizedir ve kolayca glomerüler filtrasyona uğramaktadır. Filtre olan magnezyumun yaklaşık olarak %95'i nefronun değişik bölümlerinden geri emilir. Magnezyum geri emiliminin çoğu proksimal tübülden gerçekleşmez. Magnezyum geri emiliminin en çok olduğu kısım henlenin çıkan kalın segmentinden (TAL) olmaktadır (24). Proksimal tübülden geri emiliminin %15-25'i, distal tübülden %5-10 gerçekleşmektedir. Henlenin çıkan kolunda geri emilim pasiftir, hücreler arası sıkı bağlantılarda Ca ile beraber olur. Magnezyumun emilimi, besinlerle alım miktarına bağlıdır ve alınan Mg^{+2} 'un ortalama %30-40'ı emilir. Günde 1 mmol düzeyinde Mg^{+2} alımında %80'i emilirken, 25 mmol alımında ise yaklaşık %25'i emilir (25). Genel yetişkin popülasyonda diyet Mg^{+2} alımı, 350-450 mg/gün aralığında olmalıdır. Günde Mg^{+2} fekal atılımı 270 mg'dır. Mg^{+2} , gastrointestinal sistemden, ince bağırsaktaki paraselüler nakil ve kolondaki transselüler transport yoluyla kan içine emilir, burada emilen Mg^{+2} 'nın %25'i öncelikle albümin olmak üzere dolaşımdaki

proteinlere bağlanır. Bağlanmamış Mg^{+2} , kemik ve hücre içi Mg^{+2} ile dengelenir. Hücre içi Mg^{+2} konsantrasyonları 10–30 mM aralığındadır ve serbest sitosolik Mg^{+2} konsantrasyonu 0.5-1.2 mM'dir (26). Dolaşan Mg^{+2} 'nın yaklaşık %70-75'i bağlanmamış olup, böbrekler içinde süzülür (26).

3.2.1. Proksimal Konvolüsyonlu Tüpte Magnezyum Emilimi

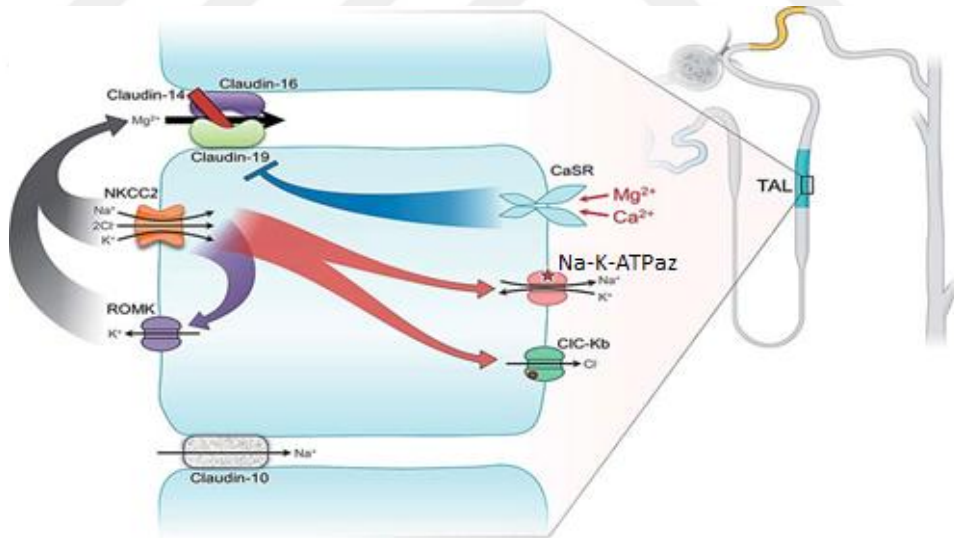
Kalsiyum (Ca^{2+}) ve sodyumun (Na^+) proksimal emiliminin aksine, filtrelenmiş Mg^{+2} 'nin nispeten küçük bir fraksiyonu (%15), bir paraselüler mekanizma yoluyla proksimal tübüller içinde emilir. Proksimal kıvrımlı tübülün birinci bölümünde, Na^+ , Ca^{2+} ve su, büyük ölçüde Mg^{+2} emiliminden önce emilir (27). Filtratlar, proksimal tübülün daha uzak kısımlarına ulaştığında, peritübüler dolaşımdakine kıyasla tübüler sıvı Mg^{+2} konsantrasyonunda bir artış olur. Lümen akışkanlar ile peritübüler dolaşım arasındaki Mg^{+2} konsantrasyongradyanı yaklaşık 1.7–1.9'a ulaştığında, Mg^{+2} absorpsiyonu meydana gelir ve muhtemelen konsantrasyon gradyanı tarafından yönlendirilir (28).



Şekil 1: Renal tübüler Mg^{+2} kullanımı. Filtrelenmiş Mg^{+2} 'nin %95'inden fazlası böbrek içinde emilir ve günlük olarak sadece yaklaşık 100 mg Mg^{+2} atılır. Distal kıvrımlı tüp, Mg^{+2} reabsorpsiyonunun olduğu son kısımdır. Bu bölümün ilerisinde, böbrek tübülleri Mg^{+2} 'a karşı geçirgen değildir (28).

3.2.2. Henle'nin Kalın Artan Ekstremitesinde Magnezyum Emilimi

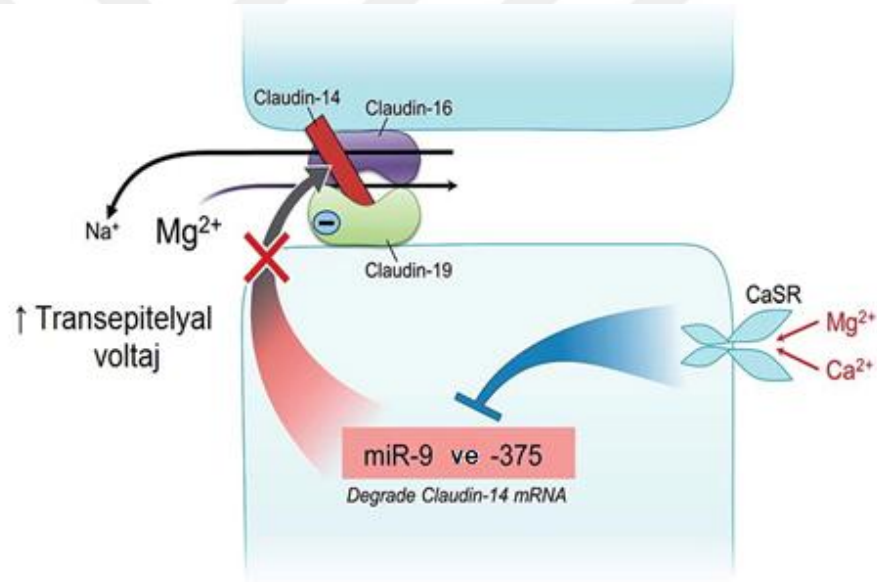
Mg^{+2} , Henle'nin (TAL) kalın artan kısmında, paraselüler olarak absorbe edilir, emilimi sıkı birleşme proteinleri tarafından kolaylaştırılır ve ana itici güç, transepitelyal voltaj gradyanıdır. TAL'ın başlangıç kısmında luminal voltaj pozitifdir (yaklaşık +8 mV) ve Na^+ ve Cl^- konsantrasyonları nispeten yüksektir (Şekil 2). Pozitif voltaj esas olarak apikal Na-K-2Cl ko-transporter (NKCC2) aracılı Na^+ , K^+ ve lümeneye paralel K^+ atılımı, Cl^- absorpsiyonu ile gerçekleşir (29, 30). NKCC2'nin itici gücü bazolateral Na-K-ATPaz'dır. Pozitif transepitelyal voltaj gradyanı, paraselüler mekanizmalar yoluyla Mg^{+2} emilimini ilerletir. Na^+ konsantrasyonunun azaldığı TAL'in uzak ucunda, Mg^{+2} emilimi, bitişik tubüler epitelyal hücreler, özellikle de claudin-16, -19 ve -14 arasında sıkı birleşme proteinleri tarafından düzenlenir (31).



Şekil 2: Henle'nin (TAL) kalın artan uzvunda Mg^{+2} kullanımı. Bağlanam proteinleri claudin-16 ve -19, Ca^{2+} ve Mg^{+2} geçirgen kanal oluştururlar. Dolaşımdaki Mg^{+2} veya Ca^{2+} , sıkı bağlantı claudin kompleksi üzerinde inhibe edici etkiye sebep olan bazolateral kalsiyum duyarlı reseptörü (CaSR) aktive edebilir. Bazolateral Na-K-ATPase, paraselüler Mg^{+2} ve Ca^{2+} emilimini kolaylaştırmak için olumlu bir pozitif lümen voltajı üreten, apikal Na-K-2Cl kotransporter (NKCC2) ve paralel K^+ atılımının ROMK yoluyla teşvik kuvvetini sağlar (19, 20).

3.2.3. Distal Kıvrımlı Tüp (DCT) Magnezyum Emilimi

Mg^{+2} 'un yaklaşık %10'u DCT'de emilir. Bu tübüler kesitte Mg^{+2} emilimi, paraselüler yerine transselülerdir. Mg^{+2} absorpsiyonu, çok kanallı yollar ve taşıyıcı proteinler ile sıkı bir şekilde düzenlenir (32). İnce ayar ve idrar Mg^{+2} atılımının nihai miktarını belirler. Bu bölümde Mg^{+2} 'un kimyasal gradyanı küçüktür. Böylece, pozitif bir transapikalmembran voltajı gradyanı, Mg^{+2} girişi için kritik hale gelir. Bilinen tüm düzenleyici yollar, transapikalmembran voltajını etkileyerek, TRPM6 aracılığıyla DCT hücrelerine Mg^{+2} girişi için temel itici gücü etkilemektedir (Şekil 4) (33).



Şekil 3: Henle'nin (TAL) kalın artan uzvunda düzenlenmiş paraselüler Mg^{+2} emilimi.

Claudin-16 kendi başına Na^{+} için geçirgendir ve claudin-19 Cl^{-} 'a karşı geçirgen değildir. Claudin-14, claudin-16'nın Na kanalı geçirgenliğini belirler. Na^{+} , TAL'in distal kısmına geri döner ve pozitif bir luminal voltajın korunmasına yardımcı olur. Claudin-14'ün bu etkisinin tıkanması, pozitif luminal voltajı

tehlikeye atar ve Mg^{+2} emilimi için itici gücü azaltır. Claudin-19 tarafından Cl^- passage'nin caydırılması, negatif bir mikro alanlı yük yaratır ve luminal Mg^{+2} ve Ca^{2+} 'ya karşı seçici bir çekim yaratır. Yüksek konsantrasyonda Mg^{2+} veya Ca^{2+} ile aktive edildiğinde bazolateral kalsiyum duyarlı reseptör (CaSR), miR-9 ve miR-375'i inhibe eder. İnhibisyon, mikroRNA'ların claudin-14 translasyonu ile etkileşimini ortadan kaldırır, bu da claudin-14 translasyonunun ve claudin-14'ün claudin-14'ün aracılık ettiği inhibisyonu ile sonuçlanır, böylece Mg^{2+} ve Ca^{2+} absorpsiyonunu inhibe eder (19, 20).

3.3. Böbreklerin Mg Homeostazisindeki Rolü

Magnezyum dengesinin düzenlenmesinde böbreklerin önemli bir rolü vardır. Magnezyum plazmada %80 iyonize formda bulunarak kolayca glomeruler filtrasyona uğramaktadır (34). Magnezyum yaklaşık olarak %95'i filtre edildikten sonra nefronun değişik bölümlerinden geri emilir. Magnezyum geri emiliminin %60-70'i henlenin çıkan kalın segmentinde gerçekleşir (35). Toplayıcı sistemden geri emilim yok denecek kadar azdır. Magnezyum geri emilimi, paracellin-1 (claudin-16) olarak bilinen protein iyon kanalından henlenin çıkan kalın kolunda sıkı bağlantılarla Ca ile beraber pasif taşıma ile olur (36). Paracellin-1 proteininde meydana gelen bir mutasyon böbreklerden aşırı Mg^{+2} ve Ca kaybına sebep olarak hiperkalsiüri ve nefrokalsinozisle seyreden hastalığa yol açarak böbrek yetmezliğine sebep olur (FHHNC=Familyal Human HerediterNefroCalsinozis). Distal tubüldeki geri emilim TRPM-6 isimli reseptör aracılığıyla olur. TRPM6'daki bir mutasyon ise otozomal resesif kalıtılan ve süt çocuklarında görülen hipomagnezemiyle ve sekonder hipokalsemiyle seyretmektedir (37). Bu hastalık

sürecinde süt çocuklarında antikonvulzan ilaçlaradirençli generalize konvülziyonlar ve nöromuskuler uyarılabilirliklerinde (kas spazmları, tetani gibi) artış görülür (38).

3.4. Renal Magnezyum Taşıyıcıları

Omurgalılarda, geçici alıcı potansiyel (TRP) iyon kanallarının melastatine bağlı alt familyasının üyeleri, Mg^{+2} taşınmasında önemli rol oynamaktadır. Geçici alıcı potansiyel melastatin 6 (TRPM6) ve geçici alıcı potansiyel melastatin 7 (TRPM7) solven taşıyıcı ailesi 41, plazma membranı veya organellerin membranlarından Mg^{+2} taşınmasında rol oynar (39). Son yıllarda, Mg^{+2} homeostazına katılan bu iyon kanalları üzerinde yapılan çalışmalar ilgi çekmektedir. TRPM6 sistemik Mg^{+2} homeostaz için önemlidir, çünkü bağırsağın fırça sınır membranı ve renal distal kıvrık tübülün apikal membranı boyunca yüksek oranda eksprese edilir (40, 41).

Bağırsakta TRPM6 ekspresyonu, diyet Mg^{+2} ile düzenlenir. Bu, TRPM6'nın Mg emiliminin bir kapıcısı olarak işlev gördüğünü göstermektedir (41). TRPM6 genindeki fonksiyon kaybı mutasyonları, nadir otozomal resesif hastalığında hipomagnezemi olan hastalarda tanımlanmıştır (42). TRPM7 ise endotelde intraselüler Mg düzeyinin ayarlanmasında önemli görev alır. Bu kanalların hem iyon kanalı hem de kinaz olarak iki fonksiyonu vardır. C terminallerinde bulunan aktif threonine/serine kinazdan dolayı kinaz olarak fonksiyon görürler (43). Magnezyumun distal tübüldeki geri emilimi TRPM6 aracılığıyla olur. Endotel hücrelerinde bulunan TRPM7, endotel proliferasyonunu kontrol etmekte ve nitrik oksit sentezinde rol oynamaktadır. TRPM6, en yakın

homoloğu olan Mg^{+2} geçirgen katyon kanalı TRPM7 ile spesifik olarak etkileşerek, hücre yüzeyinde işlevsel TRPM6/TRPM7 komplekslerinin toplanmasına neden olur (44). TRPM7 ile heterooligomerizasyonunu önleyen amino asit ikameleri de dahil olmak üzere, TRPM6'daki mutasyonlar, sekonder otozomal resesif hipomagnezemi ve sekonder hipokalsemiye neden olur (14). Katyonla birleşmiş klorid kotransporter ailesi olarak da bilinen SLC12'nin bir üyesi olan renal tiyazid duyarlı NaCl kotransporter (NCC), distal kıvrık tübüldeki tuz taşıyıcısıdır. Bu kotranspöratör aktivitesi, kan basıncı, serum potasyum, asit baz metabolizması ve üriner kalsiyum atılımı gibi çeşitli fizyolojik değişkenlerin düzenlenmesi için kritik önem taşır (45). NCC böbreklerin distal kıvrık tüplerinde eksprese edilir ve filtrelenmiş NaCl yükünün yaklaşık %5'inin yeniden emiliminden sorumludur (46). NCC miktarı diyet NaCl kısıtlaması ile artar (47). Böbrek Na atılımı ve Na alımının ayarlanmasında NCC homeostatik bir rol üstlenmiştir (48, 49).

Böbrekte claudin-16 olarak adlandırılan ve claudin ailesinin bir üyesi olan parasellin-1, parasellüler kalsiyum ve magnezyum taşınmasından sorumludur. Parasellin-1 disfonksiyonu, hiperkalsiüri ile konjenital hipomagnezemiye neden olur. Parasellin-1 isimli gendeki mutasyonlar sonucu idrarla Mg ve Ca kaybedilir, çünkü parasellin-1 Ca ve Mg 'un böbreklerdeki pasif reabsorbsiyonunu düzenler. Sıkı bağlantılı proteinlerin bulunduğu claudin ailesinin farklı alt grupları nefronun tamamında dağılmış olarak bulunur ve parasellüler iyon taşınımındaki rollerini anlama böbrek iyonu homeostazını anlamak için oldukça önemlidir (36).

3.4.1. Geçici Reseptör Potansiyel Melastatin (TRPM) 6 VE 7

TRP süper ailesinin bir üyesi olan TRPM6, DCT'nin apikal membranı boyunca lokalize olur. TRPM6 ve TRPM7, homo ve heteromerik kompleksler oluşturabilir (50, 51). Özellikle, TRPM6 fonksiyonel homomerik kanallar ve heteromerik TRPM6/7 kanalları oluşturur (52). Üç kanal, TRPM6, TRPM7 ve kompleks TRPM6/7, farklı iki değerlikli katyon geçirgenliği, pH duyarlılığı ve benzersiz tek kanallı iletkenlik gösteren farklı iyon kanallarıdır (53). Memelilerde ilk tarif edilen Mg taşıyıcı kanalı TRPM (transient receptor potential melastatin)'nin TRPM6 ve TRPM7, hem iyon kanalı, hem de kinaz olarak ikili fonksiyon gösterirler. Kinaz olarak fonksiyon görmelerinin nedeni C terminallerinde bulunan aktif treonin/serin kinazdır (54). TRPM7 vücutta yaygın olarak bulunur ve endotelde intraselüler Mg düzeyinin ayarlanmasında önemli rol üstlenir. TRPM6 ise temel olarak böbrek ve barsakta Mg salınımının kontrolünü sağlar (55). TRPM6 ve TRPM7, Mg homeostazının düzenlenmesinde önemli rol oynarlar ve muhtemelen hücresel ve biyofiziksel özelliklerdeki farklılıklardan dolayı işlevsel olarak birbirine bağımlıdırlar (51). TRPM6, Mg^{+2} için yüksek bir afiniteye sahiptir, böbreğin apikal membranında bulunur ve intestinal epitelyal hücreler esas olarak kalın bağırsak ve aktif transepitelyal transportta fonksiyonları vardır (56). TRPM6 ekspresyonu, hücre içi Mg^{+2} seviyelerine duyarlıdır ve kritik geri emilim bölgelerinde (DCT), Mg^{+2} geri emiliminde ve atılımında önemli bir rol oynar. Bu, TRPM6'nın Mg^{+2} homeostazının korunmasında anahtar bir bileşen olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, TRPM7, hücresel Mg^{+2} ve Ca^{2+} emilimi için gereklidir (57, 58, 59). Yapılan bir çalışmada, TRPM6'daki mutasyonların sekonder hipokalsemi ile hipomagnezemiye neden olduğu kanıtlanmıştır (60).

Uygun bir transmembran potansiyeli ile harekete geçen Mg^{+2} , epitel hücresine apikal epitelyal Mg^{+2} TRPM6kanalı yoluyla girer. Ayrıca, magnezyum eksikliği olan diyetle beslenen farelerde, TRPM6 mRNA ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (41). Diğer bir çalışmada da, HSH hastalarında TRPM6 mutasyonlarının neden olduğu düşük serum magnezyum seviyelerinin, yüksek dozlarda magnezyumun oral desteği ile iyileştirilebildiği belirtilmiştir (61). Hücre içi Mg^{+2} ile indüklenen TRPM6'nın regülasyonu, Mg^{+2} akışında bir geri bildirim mekanizması sağlar ve hücre içi Mg^{+2} tamponlama ve Mg^{+2} ekstrüzyon mekanizmaları, kanal fonksiyonunu güçlü bir şekilde etkilemektedir (62). TRPM7, büyük ölçüde korunmuş bitişik bir katyon kanalı transdüksiyon membranı kapsayan bölge ve yakın sarmal bobin karakterine yakın kısa bir N-terminal bölgesinden oluşan özelliklerin bir takım kümesi tarafından tanımlanan, yakın zamanda tarif edilen bir iyon kanalı ailesi olan TRPM katyon kanalı ailesinin bir üyesidir (63, 64, 65). TRPM7 vücutta yaygın olarak bulunur ve endotelde intraselüler Mg^{+2} düzeyinin ayarlanmasında önemli rol üstlenir. TRPM7 kanal geçirgenlik özellikleri ile ilgili olarak, Na ve Ca'nin hem seçici olmayan iletimini hem de iki değerlikli katyonlara karşı seçiciliğe sahip kompleks geçirgenliği düşündüren çelişen veriler sunulmuştur (62, 66). Endotel hücrelerinde TRPM7'nin bulunduğu, endotel proliferasyonunu kontrol ettiği ve NO sentezini sağladığı gösterilmiştir (44).

Yapılan bir çalışmada farelerde diyetle Mg^{+2} kısıtlanması, böbrekte TRPM6 mRNA seviyelerinin belirgin şekilde artışına neden olmuştur (67). Benzer bir çalışma diyetteki Mg^{+2} kısıtlamasının muhtemelen diyet kompozisyonu ve rejim süresi gibi deneysel parametrelerin farklılıkları nedeniyle hem böbrekte

hem de kolondaki TRPM6 ekspresyonunu arttırdığını göstermiştir. Buna karşılık; iki çalışma da benzer şekilde TRPM7 mRNA ekspresyonunun her iki dokuda da değişmediğini ortaya koymuştur (68).

3.4.2. Na⁺-Cl⁻-Kotransporter (NCC)

NCCT veya da tiyazid duyarlı Na⁺Cl⁻ kotaşıyıcıları veya TSC olarak da bilinen Na⁺Cl⁻ kotaşıyıcıları (NCC), böbrekte sodyum ve klorür iyonlarının, nefronun distal kıvrımlı tübülünün hücrelerine geriemiiliminde rol oynarlar (69, 70). Elektron geçirmeyen katyon ile bağlanmış klorür taşıyıcıları olan SLC12 kotransporter ailesinin bir üyesiolan renal tiyazid duyarlı NCC, distal kıvrık tübüldeki tuz taşıyıcısıdır. İnsanlarda, 16q13'te bulunan SLC12A3 tarafından kodlanır (71). NCC, hem N hem C terminusuolan hücre içi amino ve karboksil terminal bölgeleri olan 10 ya da 12 transmembran domeninin hidrofobik bir çekirdeğine sahip olduğu kabul edilen bir transmembran proteindir (72). NCC proteininin kesin yapısı henüz kristalleşmediği için bilinmemektedir. NCC proteini plazma membranında homodimer oluşturur. NCC fonksiyonunun kaybedilmesi, tuz kaybı ve düşük tansiyon, hipokalemik metabolik alkaloz, hipomagnezemi ve hipokalsiüri ile karakterize otosomik resesif bir hastalık olan Gitelman sendromuna neden olur. NCC genindeki yüzlerce farklı mutasyon tespit edilmiştir (73, 74, 75). NCC, nefronun distal kıvrımlı tübünün apikal membranında bulunduğu için, tübülün lümenine bakar ve tüp şeklindeki sıvıyla temas eder. Distal kıvrımlı tübül içindeki hücrelerin apikal membranı boyunca sodyum gradyanının kullanılmasıyla, NCC, Na⁺ ve Cl⁻ tübüler akışkandan bu hücrelere taşır. Daha sonra, Na⁺, bazal membranda bulunan Na⁺-K⁺ ATPaz

tarafından hücrenin dışına ve kan dolaşımına pompalanır ve Cl^- bazolateral klorür kanalı ClC-Kb yoluyla hücrelerden ayrılır (71). NCC aktivitesi, fosforilasyon ve korunmuş serin/treonin kalıntılarının tekrar fosforilasyonu sonucu protein geçişini plazma membranına ve taşıyıcı kinetiğine etki eden iki kontrol mekanizması ile göstermektedir. NCC'nin işlev görmesi için plazma membranında olması gerektiğinden, aktivitesi plazma membranındaki protein miktarının artırılması veya azaltılması ile düzenlenebilir. WNK3 ve WNK4 kinazlar gibi bazı NCC modülatörleri, hücre zarındaki NCC miktarını, sırasıyla, plazma membranından proteinin sokulmasını veya çıkarılmasını indükleyerek düzenleyebilir (76, 77). Bukotransporter aktivitesi, kan basıncı, serum potasyum, asit baz metabolizması ve üriner kalsiyum atılımı gibi çeşitli fizyolojik değişkenlerin düzenlenmesi için kritik önem taşır (78, 79). Sodyum klorür kotransporter tiyazid duyarlıdır ve tuz dengesinin ayarlanmasında ve sıklıkla hipertansiyon tedavisinde kullanılır (80). Diyetle NaCl kısıtlaması ile NCC miktarı artar ve aldosteron kaçıışı yüksek tuz diyeti ile azaltılır ve mineralokortikoid reseptör blokajı ile azalır, böbrek Na^+ atılımını Na^+ alımına ayarlama NCC artması homeostatik bir rolünün olduğu gösterir (45, 46, 48, 81). Magnezyum salınımı elektrokimyasal gradiente karşı gerçekleşir. Na/Mg iyon exchanger adı verilen Na bağımlı bir taşıyıcı ve Na bağımsız bir Mg exchanger adı verilen taşıyıcı üzerinden bu işlem gerçekleşir (14).

3.4.3. Claudin-16 ve 19

Claudinler (CLDN), nematodlardan insana kadar birçok organizmada bulunan küçük transmembran proteinlerdir (MW: 20–27 kDa). Bunlar sıkı bağlantı bariyerinin oluşmasında ve ayarlanmış paraselüler iyon akışından

sorumlu olan anahtar bileşenlerdir (31). Claudin-16 ve claudin-19 proteinleri katyon kanalı oluşturmak için TAL'de lokalize edilir (82). İlk hücre dışı döngü ortalama 53 amino asit ve ikincisi ise biraz daha küçük olan 24 amino asitten oluşur. N-terminal ucu genellikle çok kısadır (4–10 amino asit), C-terminal ucu 21 ila 63 arasında değişir ve bu proteinlerin sıkı bağlantılarda lokalizasyonu için gereklidir (83). Claudin-16 kendi başına bir Na^+ geçirgen kanaldır ve Claudin-19, Cl^- 'nin geçişi için caydırıcı bir proteindir (82, 84). TAL'de, claudin-16 ve claudin-19'un birleşik etkisi ile paraselüler Mg^{+2} Emilimi kolaylaştırılır ve claudin-14 tarafından inhibe edilir (85).

Claudin-16 ve claudin-19, henle (TALH) döngüsünde, filtrelenmiş Na^+ 'un %25-40'i, Mg^{+2} 'un %50-60'ı ve Ca^{2+} 'un %30-35'ini geri emilmesinden sorumludur (86). TALH'de tuz ve su geri emiliminin ayrışması, luminal sıvının seyreltilmesine ve daha sonra toplama kanalında su geri emilimini başlatan bir eksenel kortikomedüller osmolalite gradyanının oluşmasına neden olur (87). TALH'deki lümen sıvısının seyreltilmesi de Ca^{2+} ve Mg^{+2} pasif paraselüler reabsorpsiyon için itici güç olarak lümen pozitif voltajlara yol açan bir bazolateral-luminal transepitelyal tuz konsantrasyonu gradyanı oluşturur (88). Monojenik böbrek bozukluğu, hiperkalsiüri ve nefrokalsinozlu otozomal resesif ailevi hipomagnezemi (FHHNC; OMIM # 248250), claudin-16 ve claudin-19 genlerindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkar (89, 90).

3.4.4. Epidermal Büyüme Faktörü

Epidermal büyüme faktörü (EGF), reseptör EGFR'ye bağlanarak hücre büyümesini ve farklılaşmasını uyarır (91). ErbB reseptör ailesi, epidermal büyüme

faktörü (EGF) reseptörü (EGFR; HER1; ErbB1), HER2/neu (ErbB2), HER3 (ErbB3) ve HER4 (ErbB4) içeren, reseptör tirozin kinaz süper ailesinin alt sınıfı'na aittir. Tüm ErbB reseptörleri ortak bir hücre dışı ligand bağlayıcı bölge, tek bir membrana yayılan bölge ve bir sitoplazmik protein tirozin kinaz alanına sahiptir (92, 93). İnsan EGF'si 53 amino asit kalıntısı ve üç molekül içi disülfid bağı olan bir 6-kDa proteinidir. EGF, epitelyal sodyum kanal aktivitesini ayarlayarak distal nefron epitelyumu boyunca sodyum Emilimini spesifik olarak kontrol edebilir (94). EGF orijinal olarak farelerin submaksiyel bezlerinde ve insan idrarında bulunan salgılanmış bir peptittir. EGF, submandibular bez ve parotis bezi dahil olmak üzere birçok insan dokusunda bulunmuştur (95). Ayrıca tümörlerin başlangıcında ve ilerlemesinde de rol oynar. Çeşitli malign tümörlerde anormal ekspresyona dayanarak, ErbB aile üyeleri antikanser terapisinde hedef olarak kabul edilmiş ve şu anda meme ve kolon malignitelerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Tümör biyolojisinden başka, ErbB sinyalleme böbrek elektrolit homeostazında kritik rol oynar. Ayrıca, ErbB aile üyeleri, hipertansiyonda ve aterosklerozda olduğu gibi, organ hasarının gelişiminde rol oynamaktadır (96). Şimdiye kadar, ErbB reseptörleri için 11 bileşik tanımlanmıştır. EGF, transforme edici büyüme faktörü (TGF), heparin bağlama EGF-benzeri büyüme faktörü (HB-EGF), amphiregulin (AR), betaselülulin, epigen ve epiregulin tercihen EGFR'ye bağlanırken, neuregulin (NRG) familyası ligandları (NRG-1, NRG-2, NRG-3 ve NRG-4) ErbB3 ve ErbB4'e bağlanır ancak EGFR'ye bağlanmaz (97, 98). Ligand bağımlı EGFR sinyalleme sinin insan böbrek fizyolojisinde çeşitli rolleri vardır. EGF, glomerüler hemodinami ve böbrek metabolizmasını modüle eder in vitro çalışmaların hiçbirisi, ErbB sinyalleme sinin

nefrojeneziyi etkilediği kesin işlevsel mekanizma hakkında bilgi sağlamamıştır (99).

3.5. Amaç

Obezlerde yapılan çalışmalarda, serum magnezyum düzeylerinin kontrol grubuna göre düşük olduğu ve insülin direncinin arttığı bildirilmiştir (100, 101). Magnezyum eksikliği sonucunda insülin reseptöründeki tirozin kinaz aktivitesinin bozulduğu ve insülin direncinin geliştiği bildirilmiştir (102, 103). Organik bileşiklerle oluşturulan Mg şelatlarının, inorganik Mg formlarına göre daha düşük toksisiteye ve daha yüksek biyoyararlılığa sahip olduğu bilinmektedir. Farklı Mg şelatlarının [nikotinat, propionat, metiyonin] etkileri ile ilgili bir dizi çalışma mevcuttur (3, 103, 104, 105). MgPic yeni geliştirilen bir şelattır. Bu çalışma, yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanlarda farklı Mg-şelatların (MgO'ya karşı MgPic) böbrek dokusu renal distal tubül taşıyıcı proteinler ile ilgili moleküler mekanizmada meydana gelecek muhtemel değişiklikler üzerine etkilerini belirlemek ve bu etkilerini karşılaştırmak amacıyla yapılacaktır.

Hücre içinde potasyumdan sonraki ikinci katyon olan Mg, vücutta en çok bulunan elementlerden biri olup, ATP, DNA ve RNA gibi önemli yapılarda bulunmaktadır. Yeterli Mg tüketimi, insan vücudunda Mg dengesini ve normal Mg'a bağlı hücrel reaksiyonları korumada kritik önem taşır. Ancak, obezite, diyabet gibi kronik hastalıklara veya yüksek yağlı diyet tüketimine bağlı olarak görülen Mg yetersizliği veya Mg taşıyıcılarının disfonksiyonu, Mg^{+2} ve Ca^{+2} 'un böbreklerdeki reabsorbsiyonunun bozulmasına neden olur. Yapılan literatür taramalarında, yüksek yağlı diyetle (YYD) beslenen ratlarda, diyetle ilave edilen

Mg formlarının renal Mg taşıyıcıları üzerindeki moleküler etkileri ile ilgili çalışmalara rastlanılmamıştır. Yukarıdaki bilgiler ışığında, bu çalışmada, yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanlarda, farklı Mg formlarının (MgO ve MgPic) renal Mg taşıyıcıları (TRPM6, TRPM7, EGF, claudin-16, claudin-19, NCC) üzerindeki moleküler etkileri araştırılmıştır.



4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Araştırma Materyali ve Deneme Düzeni

Çalışmada 8 haftalık yaşta toplam 42 adet Sprague-Dawley sıçan (ağırlık: 180 ± 20 g) kullanılmıştır. Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan, onay alındıktan sonra (Tarih: 06. 12. 2017, Toplantı Sayısı 2017/128 Karar No: 244), araştırma standart deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak yürütülmüştür. Hayvanlar 15 günlük adaptasyon periyodundan sonra denemeye tabii tutulmuştur. Deneme Fırat Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezinde yürütülmüştür. Su ve yem deneme süresince serbest olarak verilmiştir. Havalandırma ve ışık kontrolü düzenli olarak yapılmıştır. Işıklandırmada 12/12 saat aydınlık/karanlık ve ortam sıcaklığı $22 \pm 2^\circ\text{C}$ olacak şekilde ayarlanmıştır.

Sıçanlar, her grupta 7 hayvan olacak şekilde rastgele aşağıdaki gibi 6 gruba ayrılmıştır: 1) Kontrol: Ratlar kalorinin %12'si yağlardan sağlanan standart diyet ile beslendi; 2) MgO: Ratlar kg yemde 500 mg elemental Mg olacak şekilde MgO içeren standart diyet ile beslendi; 3) MgPic: Ratlar kg yemde 500 mg elemental Mg olacak şekilde MgPic içeren standart diyet ile beslendi; 4) YYD: Ratlar kalorinin %42'si yağlardan elde edilen yüksek yağlı diyet (Tablo 1; YYD) ile beslendi; 5) YYD+MgO: Ratlar kg yemde 500 mg elemental Mg olacak şekilde MgO içeren YYD ile beslendi; 6) YYD+MgPic: Ratlar kg yemde 500 mg elemental Mg olacak şekilde MgPic içeren YYD ile beslendi. Ayrıca, Tablo 2'de deneme düzeni gösterilmektedir.

Çalışmada kullanılan Mg şelatları ticari firmalardan (Magnesium Oxide, Hard Eight Nutrition LLC, Nevada, USA ve Magnesium Picolinate, Assay %98.88, Nutrition 21, NY, USA) temin edildi. Magnezyum dozları Bertinato vd. (24) referansı esas alınarak belirlenmiştir. Yem önce ön karmaları mikro karıştırıcı da hazırlanarak magnezyumun yeme homojen olarak karıştırılabilmesi sağlanmıştır. Yem bileşimi Tablo 2'de gösterilmektedir. Deneme süresi 8 hafta sürmüştür.

Deneyisel uygulamalar sonrasında etik kurulun aldığı kararlara uygun olarak kesimleri yapılan sıçanların serum böbrek dokuları alınarak, kuru buzda hemen donduruldu. Analizler yapılınca kadar -80 °C' de saklandı.

Tablo 1. Araştırmada kullanılacak bazal diyetin bileşimi

Hammadde, %	Kontrol (Bazal) Diyet g/kg	Yüksek Yağlı Diyet (YYD)
Kazein	20.00	20.00
Mısır Nişastası	57.95	15.00
Sükroz	5.00	14.95
Soya Yağı	7.00	-
Sığır Don Yağı (İç yağı)	-	40.00
Selüloz	5.00	5.00
Vitamin-mineral karışımı*	4.50	4.50
L-sistein	0.30	0.30
Kolin bitartarat	0.25	0.25

*Vitamin-mineral karışımının kilogramı;1. 8 mg tüm-trans retinil asetat (A vitamini), 0. 025 mg kolekalsiferol (D Vitamini), 12. 5 mg tüm rac-alfa-tokoferol asetat (E vitamini),1. 1 mg menadion sodyum bisulfit (K3 Vitamini),1. 1 mg tiyamin (Vitamin B1), 4. 4 mg ribolavin (Vitamin B2), 35 mg niasin (Vitamin B3), 10 mg kalsiyum pantotenat (B5 vitamini),2. 2 mg Vitamin B6, 0. 02 Vitamin B12, 0. 55 mg folik asit, 0. 1 mg d-biyotin, 40 mg Mn (MnO), 12. 5 mg Fe (FeSO₄), 25 mg Zn (ZnO),3. 5 mg Cu (CuSO₄), 0. 3 mg I (KI), 0. 15 mg Se (Na₂SeO₃), 175 mg kolin klorit (C₅H₁₄ClNO)

Tablo 2. Deneme planı (n=7)

Gruplar	Doz
Grup 1, Kontrol	-
Grup2, Kontrol+MgO	500 mg elemental magnezyum/kg yem
Grup 3, Kontrol+MgPic	500 mg elemental magnezyum /kg yem
Grup 4, YYD	-
Grup 5, YYD +MgO	500 mg elemental magnezyum /kg yem
Grup 6, YYD +MgPic	500 mg elemental magnezyum /kg yem

YYD: Yüksek yağlı diyet; MgO: Magnezyum oksit MgPic: Magnezyum pikolinat

4.2. Laboratuvar Analizleri

4.2.1. Serum Üre Nitrojeni ve Kreatinin Analizi

Kan örnekleri 3000 g de 10 dk süreyle santrifüj edildi ve serumları ayrıldı. Serum üre ve kreatin düzeyleri Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları anabilim Dalında bulunan biyokimya analizör cihazında (Samsung LABGEO PT10, Suwon, Korea) ticari kitlerle ölçüldü.

4.2.2. Böbrek Magnezyum Analizi

Böbrek dokusu Mg düzeyleri Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresinde (AAS) ölçüldü. Ölçümlerde alev sistemi kullanıldı. Magnezyum standart çözeltileri, 1000 ppm'lik standart çözeltiden 0.25, 0.50,1.00,2.00, 4.00, 10.00 ppm olacak şekilde seyreltilerek hazırlanmıştır. Doku örnekleri, AAS'de ölçüme hazır hale getirilmesi için yaş yakma işlemine tabii tutulmuştur. Bu amaçla, 250mg

böbrek tartılıp teflonlara konularak, üzerine 8 ml %65 lik HNO_3 ilave edilerek, yaklaşık 30-35 dk mikro dalga fırında (Berghoff, Germany) yakıldı ve tamamen çözelti haline getirildi. Elde edilen çözeltiler deiyonize su ile dilue edildi ve AAS’de ölçüme hazır hale getirildi. Böbrek magnezyum analizi Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı Yem Analiz Laboratuvarında bulunan Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi (Perkin Elmer A Analyst 800, MA, USA) ile yapıldı.

4.2.3. Böbrek MDA Analizi

Böbrek malondialdehit düzeyleri Sahin ve ark. (106) ’nin bildirdiği yöntemle göre belirlendi. Böbrek örneklerinden 0,5 g alınarak, 1 ml ultra saf su, 100 µl butil hidroksi tolüen (500 µg/ml; 2,6-di t-butil-p-kresol, BHT) ve 1 ml 0.5 M perklorik asit (HClO_4 , %60, Riedel, Almanya) ile ultraturrax mekanik homojenizatör yardımıyla parçalandı. Örnekler kapaklı polipropilen santrifüj tüplerine alındı ve vorteksle iyice karıştırıldıktan sonra 5000 rpm devirde 4 °C’de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant dikkatlice viallere alınarak dokularda ekstraksiyon işlemi tamamlandı.

Kalibrasyon grafiği oluşturulmak ve hesaplamalarda kullanmak üzere MDA (1,1,3,3-tetraethoksi-propan, Sigma-Aldrich, Almanya) standartları hazırlandı. MDA standardı için tetraethoksi-propandan 10 µl hacimde alınarak 10 ml’lik kapaklı bir cam tüpe alındı. Hacim 0.1 M hidroklorik asit (HCl, %37, Merck, Almanya) ile 10 ml hacme tamamlandı. Benmaride (Memmert, Almanya) 100 °C’de 5 dk kapak kapalı şekilde muamele edildikten sonra soğutuldu ve ultra saf su ile 100 ml hacme tamamlandı. Elde edilen solüsyon 2.92 µg/ml MDA

içermektedir (98).

MDA analizlerinde kolon olarak C₁₈ (ODS-3,5 µm, 4.6 x 250 mm, Inertsil, GL Sciences, Japonya), hareketli faz olarak ise pH:3.6 olarak ayarlanan 30 mM potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄, Merck, Almanya) – metanol (CH₄O, Sigma-Aldrich, Almanya) karışımı (%82.5–17.5; v/v) kullanıldı. Analiz şartları; kolon fırını sıcaklığı 30°C, hareketli faz akış hızı 1 ml/dk, enjeksiyon hacmi 30 µl, dalga boyu 250 nm ve analiz süresi 10 dk olacak şekilde ayarlandı. Örneklerde MDA için alıkonma süreleri sırasıyla yaklaşık 5.4 dakika olarak belirlendi. Böbrek örneklerinin MDA düzeyleri 3.54, 2.98, 2.40, 7.62, 6.76, 5.41 nmol/mg protein olarak bulundu.

4.2.4. Western Blot Analizleri

Böbrek örneklerinin Western blot analizleri, Sahin (107), tarafından uygulanan metoda göre yapıldı. Taze veya dondurulmuş dokular 1:10 (w/v) oranında homojenizasyon solüsyonunda [10mM Tris- HCl (pH=7.4), 0.1 mMNaCl, 0.1mM fenil metil sülfonilflorid (PMSF), 5µM soybean (bir tripsin inhibitörü olarak cam homojenizatör yardımıyla soğuk ortamda homojenize edildi.

Proteinlerin proteaz aktivitesi ile bozulmalarını engellemek amacıyla homojenizasyon işlemleri esnasında tüm işlemler buz içerisinde yapılmıştır. Homojenatlar soğutmalı santrifüjde +4 °C’ de 60 dakika süreyle 15.000 x g’de santrifüj edildi. İlk süpernatantlar eppendorf tüplere alınarak –80 °C’ de saklandı. Pelletler, eşit hacimde ilave edilen homojenizasyon solusyonunda [25 mMTris- HCl (pH= 7.4), 0. 1mM PMSF, %2’lik TritonX –100 ve %1’lik SDS] yeniden süspanse edildi. +4 °C’ de 2 saat inkübasyona bırakıldı ve homojenatlar soğutmalı santrifüjde +4 °C’de 60 dakika süreyle 15.000 g’de santrifüj edildi. Elde edilen2.

Süpernatantların mikrosantrifüj tüplere alınarak SDS-PAGE ve Western blot analizleri için -80°C 'de saklandı.

SDS-PAGE analizinde; jelin yapısında yer alan sodyum dodesil sülfat (SDS), deterjanının bulunması ile proteinler kendilerini oluşturan monomer alt birimlerine ayrılmaktadır. Böylece protein agregasyonu önlenmektedir. SDS moleküllerine bağlanan denatüre polipeptidler negatif yük kazanırlar. SDS bağlantılı polipeptid kompleksleri, molekül ağırlıklarına bağlı olarak jel içerisinde hareket ederler. Hareket eden moleküllerin ağırlıkları; aynı jel üzerinde bulunan bir standartla karşılaştırılarak tespit edilir. Mutasyon geçirmiş veya çeşitli olumsuz çevre faktörleri sonucunda canlı organizmanın bir kısım proteinlerinden normale göre parça kopması veya parça ilavesi ya da bazı proteinlerin yeterince sentezlenmemesi gibi özellikler bu jel sisteminde tespit edilmeye çalışılır.

Serbest ve serbest olmayan protein örnekleri Laemmli (1970) tarafından belirtildiği şekilde hazırlanan SDS-PAGE ile incelendi. Jel oluşturmak için uygun bir pozisyonda tutturulan iki cam arasına yerleştirilmek üzere 10 ml'lik ayırma jel solusyonu hazırlandı. Hazırlanan bu jel solusyonu iyice karıştırıldı ve uygun bir otomatik pipet yardımıyla belirli kısımlardan sıkıştırılarak kaset haline getirilen iki cam levha arasına aktarıldı. İki cam levha arasına jel ilave edilirken üst kısımda tarak dişlerinin yüksekliği kadar ($\approx 1\text{cm}$) bir boşluk bırakıldı. Hazırlanan kaset şeklindeki bu iki cam levha arasındaki jel yaklaşık olarak 30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek aralarındaki akrilamid monomerlerinin polimerleşmesi sağlandı. Daha sonra iki cam levhanın üst kısmına örnek sayısına uygun sayıda dişe sahip tarak yerleştirildi.

Tarak dişlerinin ara dolgu maddesi olarak ifade edilen yükleme jeli 10 ml kadar hazırlandı. Hazırlanan bu jel solusyonu iyice karıştırıldı ve uygun bir otomatik pipet yardımıyla, jel kasetine yerleştirilmiş olan tarak dişleri arasındaki boşluklar dolduruldu. Bu dolgu iki camın en üst seviyesine kadar tamamlandı. Yükleme jeli çok çabuk polimerize olduğundan işlemlerin kısa sürede yapılmasına dikkat edildi. 25–30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek polimerleşme sağlandı. Tarak, polimerleşmesi tamamlanan jelden çıkarıldı. Bu işlem sırasında jel de meydana gelen ve örneklerin bırakılacağı yuvaların bozulmamasına dikkat edildi. Cam levhalardan oluşan kaset elektroforez tankına yerleştirildi. Protein çözücü solusyonu; 0,125 M Tris (pH6.8), %2’lik SDS, %0.002 oranında Bromofenol mavisi, %20’lik gliserol, %10’luk merkaptioethanol şeklinde hazırlandı. Yaklaşık olarak 150 µl olarak alınan her bir protein örneğine eşit oranda çözücü solusyondan ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Tarak dişinin genişliğine bağlı olarak, hazırladığımız karışımdan 10–20 µl kadar transfer edildi. Tank içerisine yeterli miktarda tank solusyonu ilave edildi.

Güç kaynağından önce düşük bir voltajla (150 V) akım elektroforeze verildi. 5–10 dakika sonra voltaj değeri yükseltildi (180–200 V). Çıplak gözle izlenilebilen mavi boya bandı jelin alt kısmına gelince elektroforez cihazı kapatıldı.

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra kaseti oluşturan iki cam birbirinden ayrılarak aradaki jel çıkarıldı. Protein bantlarının görünür hale gelebilmesi için bu jel %1.25’lik Coomassieblue boya ortamına alındı. Burada en az yarım saat en çok bir gece boyunca oda sıcaklığında bekletildi.

Boya solusyonundan alınan jel boyayı giderici solusyon (destainingsolution) ortamına alındı. Ara sıra çalkalanarak protein bantlarının dışındaki boya maddesi uzaklaştırıldı. Boya giderici solusyonda 5'er dakika bekletildi ve solusyon döküldü. Jel tekrar boya giderici ortama alındı ve bu işlem 2–3 kez tekrarlandı. Böylece jel üzerinde bulunan protein bantlarının dışındaki boya giderilmiş oldu.

Proteinlerin elektroforezleri SDS-PAGE'de gerçekleştirildikten sonra Western blot tekniği ile jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana aktarımı (blotlama), spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için nitroselüloz membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama), özgül antikorlarla tepkime ve en son aşamada ise proteinlerin görüntülenme aşamaları gerçekleştirildi. Jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana aktarımı (blotlama) için SDS-PAGE tamamlandıktan sonra poliakrilamid jel blotlanmak üzere alındı. Nitroselüloz membrana transferin gerçekleştirilmesi için poliakrilamid jel ile nitroselüloz membran (Schleicher and Schuell, Inc. , USA) yüzeyleri arasında boşluk kalmayacak biçimde karşı karşıya getirildi ve bunlar filtre kağıtlarıyla sarılmış bir şekilde blotlama düzeneğine yerleştirilerek tampon solüsyonuyla doyuruldu. Soğutulmuş tampon solüsyonuyla doldurulmuş tanka yerleştirilen düzenek için 60 dakika boyunca 150 mA elektrik akımı uygulandı. Bu şekilde proteinlerin transferi sağlanmış oldu.

Spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için nitroselüloz membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama) için, blotlama işlemi bittikten sonra petri kutularına alınan nitroselüloz membranlar tampon solüsyonla $[\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ (0.025 M), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (0.075 M),

NaCl (1.45 M)] çalkalayıcı üzerinde 3 kez 5'er dakika olacak şekilde yıkandı. Spesifik olmayan bağlanmalar, 100 mM NaCl, 20 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄ (pH: 7.2) tamponunda % 1'lik taze sığır serum albumini ile 37 °C' de 90 dakikalık inkübasyonla bloklandı. Özgül antikorlarla tepkime işlemi için, primer antikor olarak poliklonal TRPM6, TRPM7, NCC, EGF, Claudin 16 ve Claudin 19 (Abcam, Cambr, dge, UK) antikorları kullanıldı. Primer antikorlar % 0.05 oranında Tween-20 bulanan tamponda belirtilen oranlarda hazırlandı. Nitroselüloz membranlar primer antikorlar ile +4°C' de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Daha sonraki safhada nitroselüloz membranlar 5 kez 5'er dakika tampon solüsyonuyla yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra nitroselüloz membranlar % 0.05 oranında Tween-20 bulanan tamponda 1:1000 oranında hazırlanan, peroksidazla konjuge edilmiş sekonder antikor ile 37 °C' de 90 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. Sonraki aşamada nitroselüloz membranlar 5 kez 5 dakika tampon solüsyonuyla yıkandı. Bantların görüntülenmesi için 1 M Tris (pH: 7.4) tamponunda % 0.03-0.05 oranında hazırlanmış diaminobenzidin (DAB) solusyonu kullanıldı. DAB'la reaksiyon sonucu nitroselüloz membranlar üzerindeki bantlar kısa bir süre sonra görünür hale geldi. 5–10 dakikalık bir reaksiyon süresi sonunda DAB'la renklendirilen bantlar net olarak görüldükten sonra nitroselüloz membranlar iyice yıkandı. Nitroselüloz membranlar iyice kurutulduktan sonra, bantların rölatif yoğunlukları analiz edilmek üzere alındı. Bantların rölatif yoğunlukları Image analyses system (Image J National Institute of Health Bethesda, USA) programı kullanılarak analiz edildi.

4.2.5. İstatistiksel Analizler

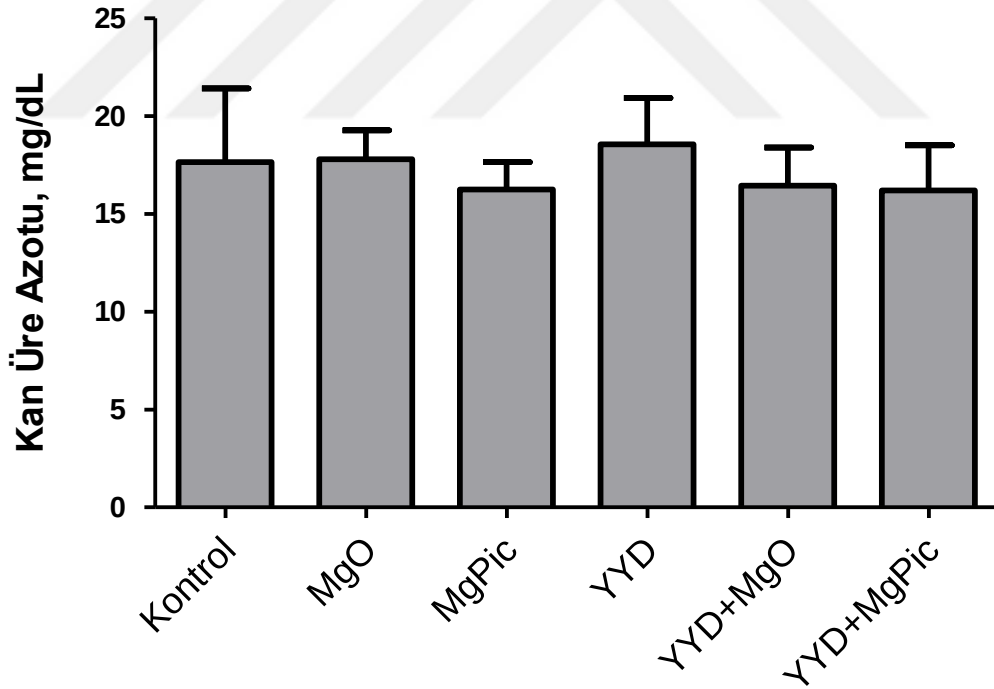
Elde edilen veriler gruplar arasındaki farklılıkları ortaya koymak için SPSS (IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: Amerika) paket programı ile PROC GLM prosedürü kullanılarak analiz edildi. Grup içi farklılıklar da Fisher post hoc testi ile analiz edildi. İstatistiksel anlamlılık $P < 0.05$ olarak kabul edildi.



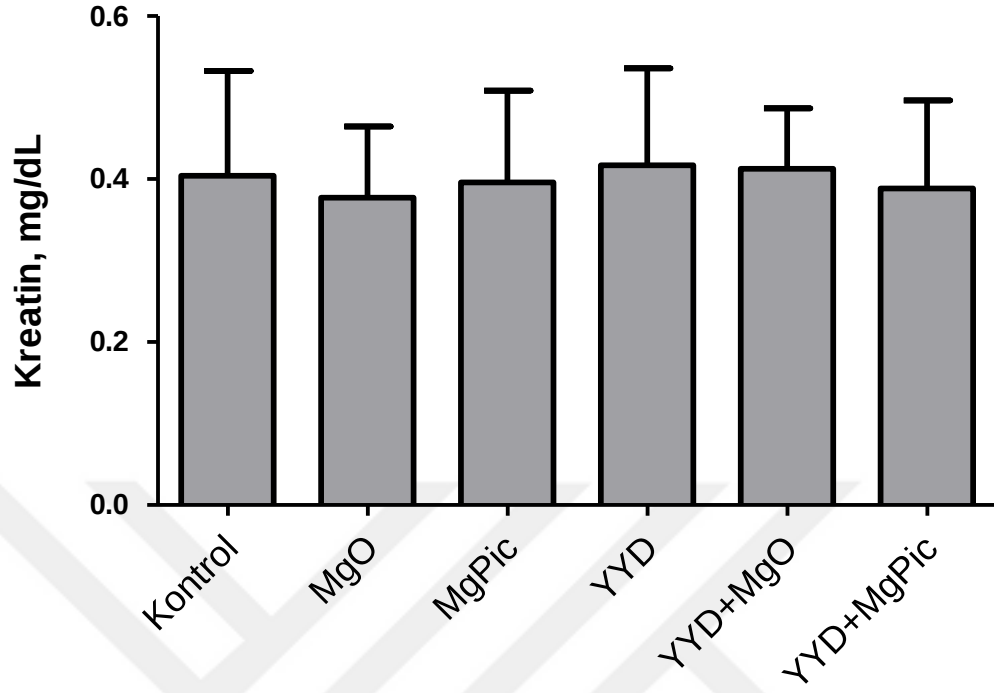
5. BULGULAR

5.1. Üre ve Kreatin Düzeyleri

Şekil 4 ve 5’de görüleceği üzere, normal ve yağlı diyet ile beslenen ratlarda, serum üre ve kreatin düzeyleri bakımından bir farklılık tespit edilmemiştir. Ayrıca, sıçanlarda diyetle ilave edilen MgO ve MgPic katkıları ile de bu değerler arasında farklılık tespit edilmemiştir ($P > 0.05$). Kontrol, MgO, MgPic, YYD, YYD+MgO, YYD+MgPic gruplarında üre düzeyleri sırası ile 17.64, 17.80, 16.25, 18.55, 16.45, 16.20 mg/dl ve kreatin düzeyleri de sırası ile 0.40, 0.38, 0.40, 0.42, 0.41, 0.39 mg/dl olarak bulunmuştur.



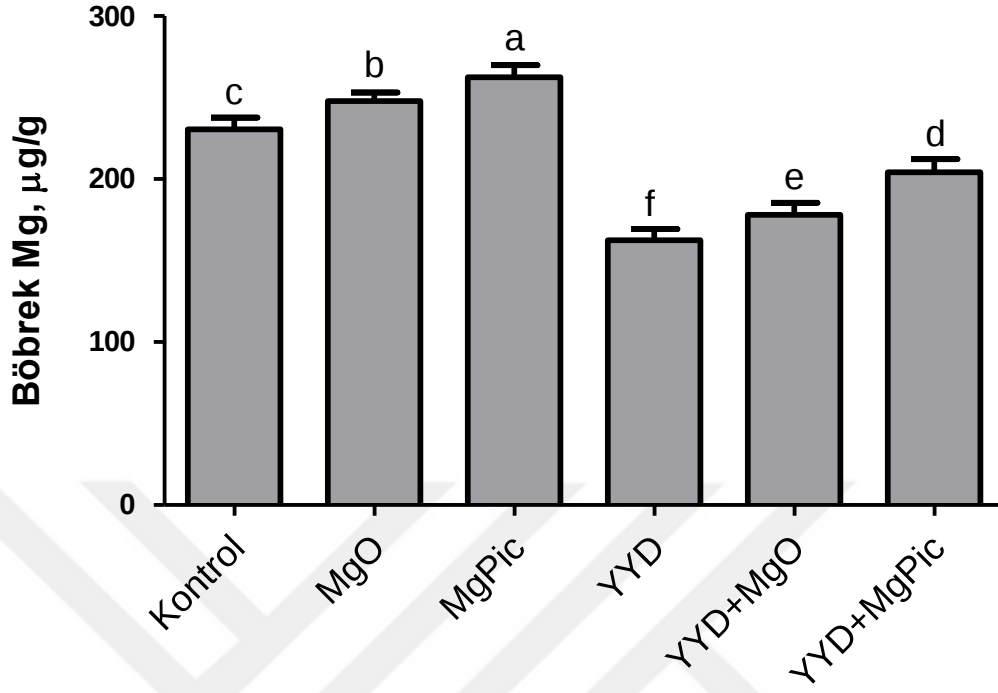
Şekil 4: Yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda Mg formlarının Kan Üre Azotu üzerine etkisi.



Şekil 5: Yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda diyetle katılan Mg formlarının serum kreatin üzerine etkileri.

5.2. Böbrek Mg Düzeyleri

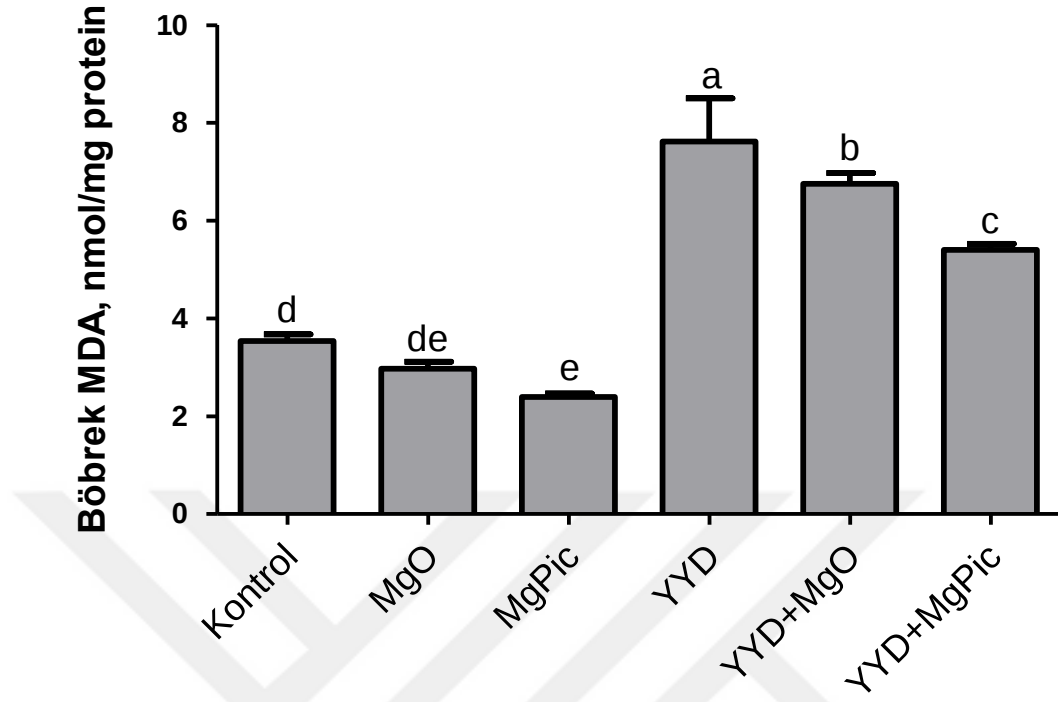
Şekil 6'ya bakıldığında, Kontrol, MgO, MgPic, YYD, YYD+MgO, YYD+MgPic gruplarında böbrek Mg düzeyleri 230.46, 247.82, 262.40, 162.46, 178.01, 204.21 olarak tespit edilmiştir. Bu değerlerden de anlaşılacağı üzere, yüksek yağlı diyetle ilgili olarak, böbrek Mg düzeylerinde bir düşüş belirlenmiştir ($P < 0.001$). Diyetle ilave edilen Mg formlarına ilgili olarak böbrek Mg düzeylerinde yükseliş tespit edilmiş ve gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). En yüksek Mg düzeyi, MgPic gruplarında tespit edilirken, en düşük düzey ise YYD grubunda bulunmuştur. Standart diyetle beslenen gruplarda, Mg düzeyi, MgO katılan grupta %7 ve MgPic katılan grupta ise %13 düzeyinde artmıştır. YYD+MgO ile beslenen ratlarda Mg düzeyi YYD+MgPic diyetle beslenen ratlara göre, %15 civarında daha düşük ölçülmüştür. MgO verilen diyetle beslenen ratlarda böbrek Mg düzeyi MgPic ve YYD+MgPic ile beslenen gruplar kıyaslandığında, MgPic grubundaki ratlarda böbrek Mg düzeyi %24 oranında yükseliş göstermiştir. YYD grubuna göre MgPic böbrek Mg düzeyini %38 arttırırken, MgO ise %35 arttırmıştır.



Şekil 6: Yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda Mg formlarının böbrek Mg düzeyleri üzerine etkisi.

5.3. Böbrek MDA Düzeyleri

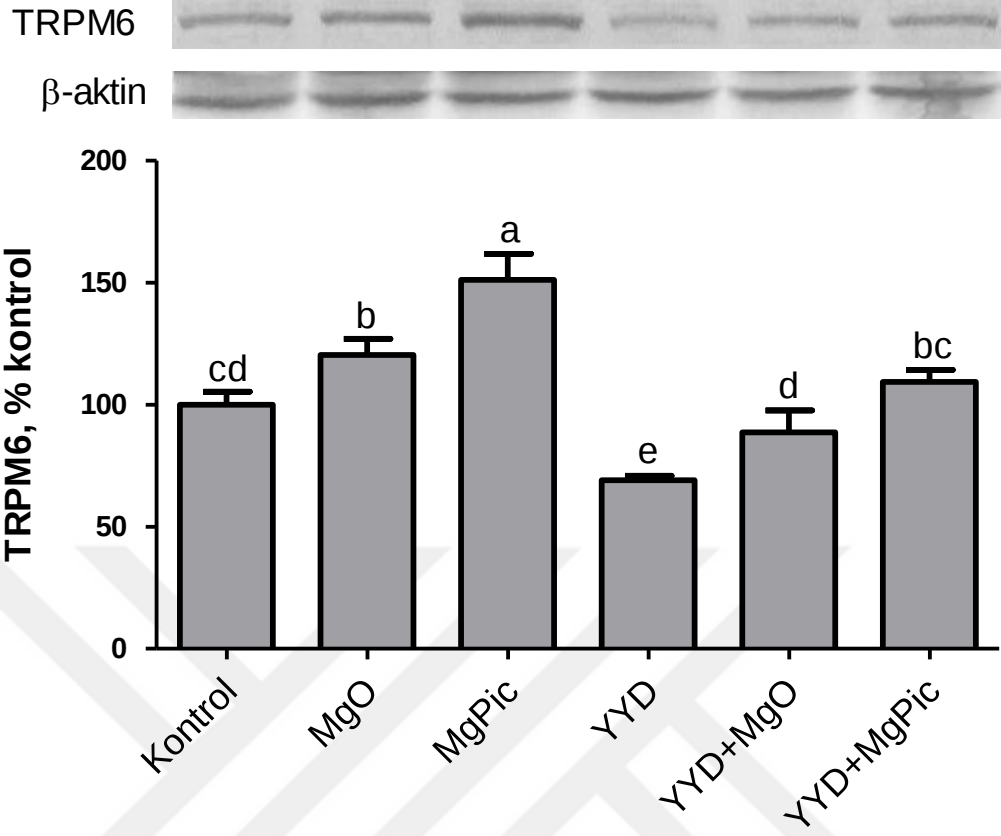
Böbrek MDA düzeyleri Şekil 7’de verilmiştir. Şekilde de görüleceği üzere, yüksek yağlı diyet tüketen sıçanlarda (YYD), MDA düzeyi, standart diyet ile beslenen kontrol sıçanlara göre %13 artmıştır ($P < 0.001$). Ancak her iki diyet ile beslenen sıçanlarda Mg ilavesi ile MDA düzeyi düşmüştür ($P < 0.001$). Ancak en yüksek düşüş MgPic gruplarında elde edilmiştir. Kontrol, MgO, MgPic, YYD, YYD+MgO, YYD+ MgPic gruplarında MDA düzeyleri sırası ile 3.54, 2.98, 2.40, 7.62, 6.76, 5.41 nmol/mg protein olarak bulundu. MgPic grubu MDA düzeyi, kontrol grubuna göre, yaklaşık %30 daha düşükbulunmuştur ($P < 0.05$). Yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda MgO böbrek MDA değerlerini yaklaşık %13 düşürürken, MgPic ise %30 oranında düşürmüştür ($P < 0.05$). Yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanlarda MgPic, MgO’e göre böbrek MDA düzeyinin %20 oranında düşürmüştür ($P < 0.05$).



Şekil 7: Yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda Mg formlarının böbrek MDA üzerinde etkisi.

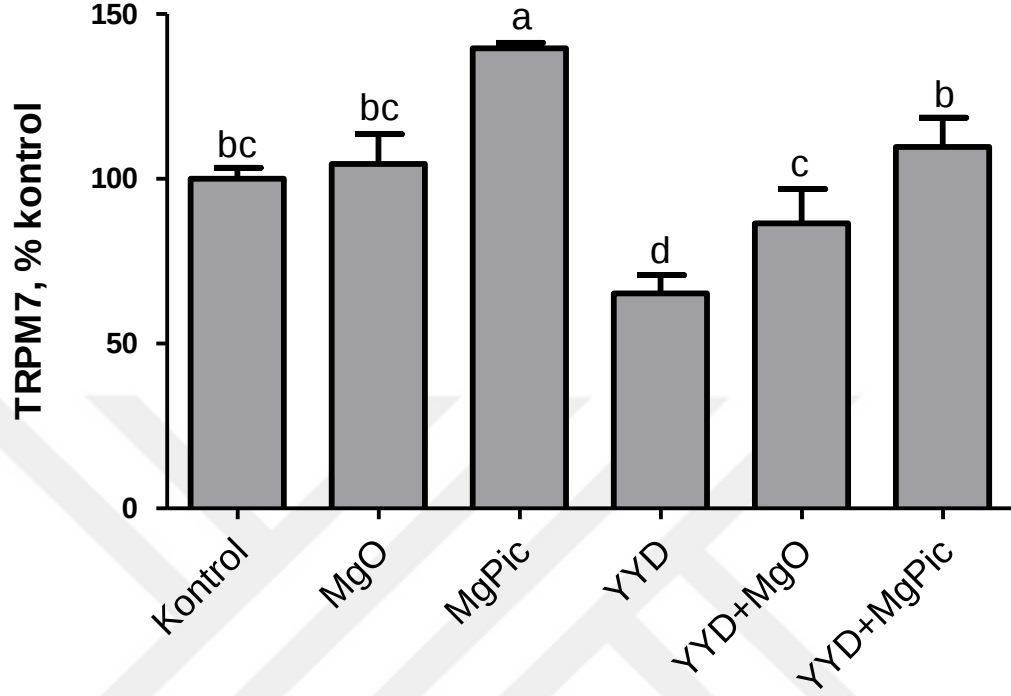
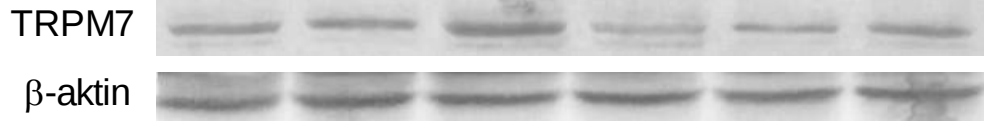
5.4. Protein Düzeyleri

Standart diyet ile beslenen sıçanlarda, kontrol, MgO, MgPic gruplarında böbrek TRPM6 düzeyleri sırasıyla %100.00, %120.40 ve %151.18 bulunurken, bu değerler YYD, YYD+MgO ve YYD+MgPic gruplarında %69.12, %88.70 ve %109.37 olarak bulunmuştur (Şekil 8, $P < 0.001$). Yağlı diyet ile TRPM düzeyi %30 oranında bir düşüş göstermiştir ($P < 0.001$). Standart diyet ile beslenen sıçanlarda, kontrol grubuna göre MgO ve MgPic gruplarında, böbrek TRPM6 düzeyi %20 ve %50 artış göstermiştir. YYD grubu, YYD+MgO ve YYD+MgPic katılan gruplar kıyaslandığında YYD+MgO ile beslenen ratlarda Mg düzeyi %28 ve YYD+MgPic katılan grupta ise Mg düzeyinde %8 oranında yükseliş gözlenmiştir ($P < 0.05$). YYD+MgO ile beslenen ratlarda, TRPM6 düzeyi YYD+MgPic verilen gruba göre %24 civarında düşük bulunmuştur ($P < 0.05$).



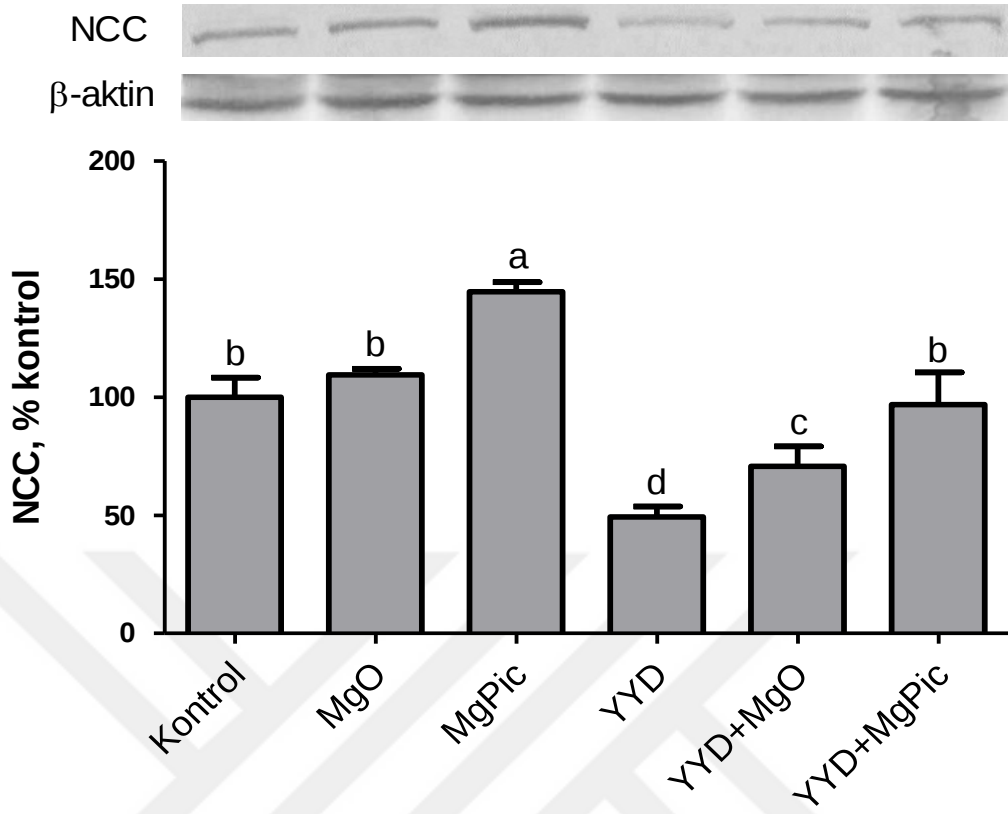
Şekil 8: Yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda Mg formlarının böbrek TRPM6 düzeyi üzerine etkisi.

Normal ve yüksek yağlı diyet ile beslenen sıçanların böbrek TRPM7 düzeyleri arasında önemli bir farklılık tespit edilmiştir (Şekil 9; $P < 0.001$). Kontrol grubu ile YYD grupları kıyaslandığında, YYD grubunda TRPM7 düzeyi %35 civarında daha düşük bulunmuştur. TRPM7 düzeyleri Kontrol, MgO, MgPic, YYD, YYD+MgO, YYD+MgPic gruplarında sırası ile %100.00, 104.55, 139.63, 65.21, 86.47, 109.69 olarak tespit edildi. Normal diyet ile beslenen sıçanlarda böbrek TRMP7 düzeyleri üzerine MgO'nin bir etkisi tespit edilmezken, MgPic'ın bu düzeyi yaklaşık %40 oranında yükselttiği gözlenmiştir. Ancak, yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanların böbrek TRMP7 düzeyleri MgO ilavesi ile yaklaşık %32 oranında artış göstermiştir. Bu oran MgPic ilavesi ile YYD grubuna göre, %40 civarına yükselmiştir ($P < 0.05$). YYD+MgO ile YYD+MgPic ile beslenen gruplar kıyaslandığında, TRPM7 düzeyi MgPic ile %27 oranında artış göstermiştir ($P < 0.05$).



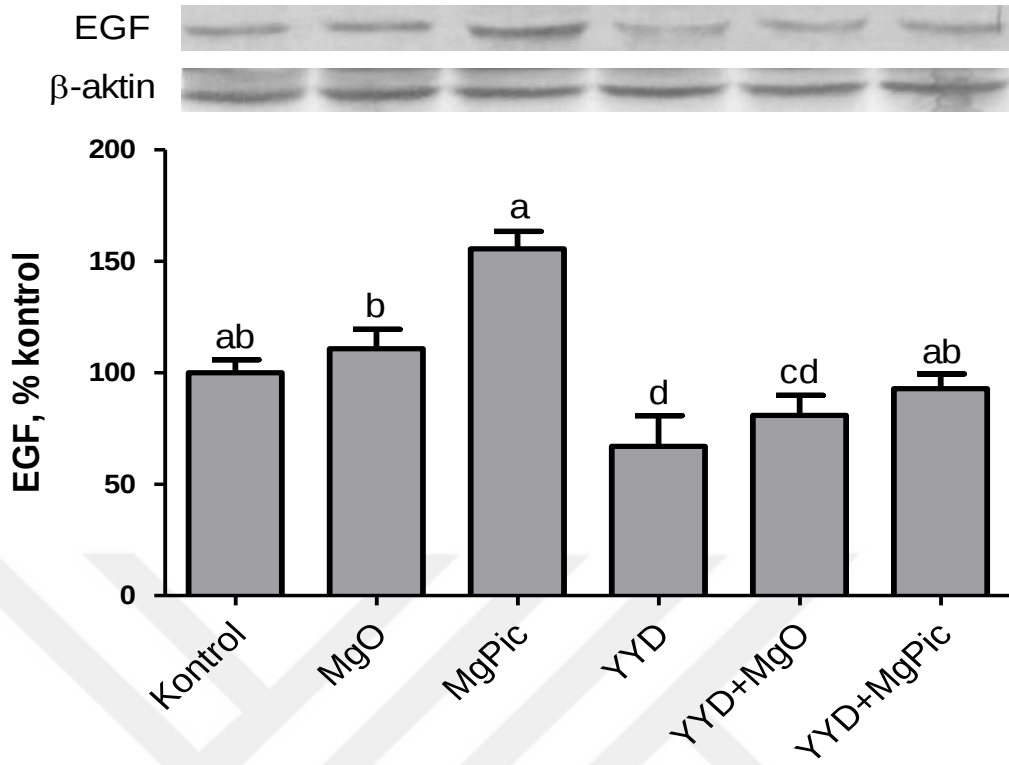
Şekil 9: Yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda Mg formlarının böbrek TRPM7 düzeyi üzerine etkisi.

Western blot sonuçlarına bakıldığında (Şekil 10), NCC düzeyleri Kontrol, MgO, MgPic, YYD, YYD+MgO, YYD+MgPic gruplarında sırası ile %100.00, 109.47, 144.73, 49.37, 70.72, 96.91 olarak tespit edilmiştir ($P < 0.0001$). YYD grubu böbrek NCC düzeyi, kontrol grubu (normal diyet) ile karşılaştırıldığında, %50 civarında düşüş göstermiştir ($P < 0.001$). Normal diyet ile beslenen sıçanlarda böbrek NCC düzeyleri üzerine MgO'nun bir etkisi tespit edilmezken, MgPic'in bu düzeyi yaklaşık %30 oranında yükselttiği gözlenmiştir. MgO katılan normal diyetle beslenen ratların NCC düzeyi, MgPic verilen gruplara kıyasla yaklaşık %32 oranında düşüş göstermiştir. YYD+MgPic beslenen grupta NCC düzeyi YYD grubuna göre %49 artış göstermiştir ($P < 0.05$). Ancak, YYD+MgO ile beslenen ratlarda NCC düzeyi, YYD ile beslenen gruba göre %27 oranında artış göstermiştir ($P < 0.05$).



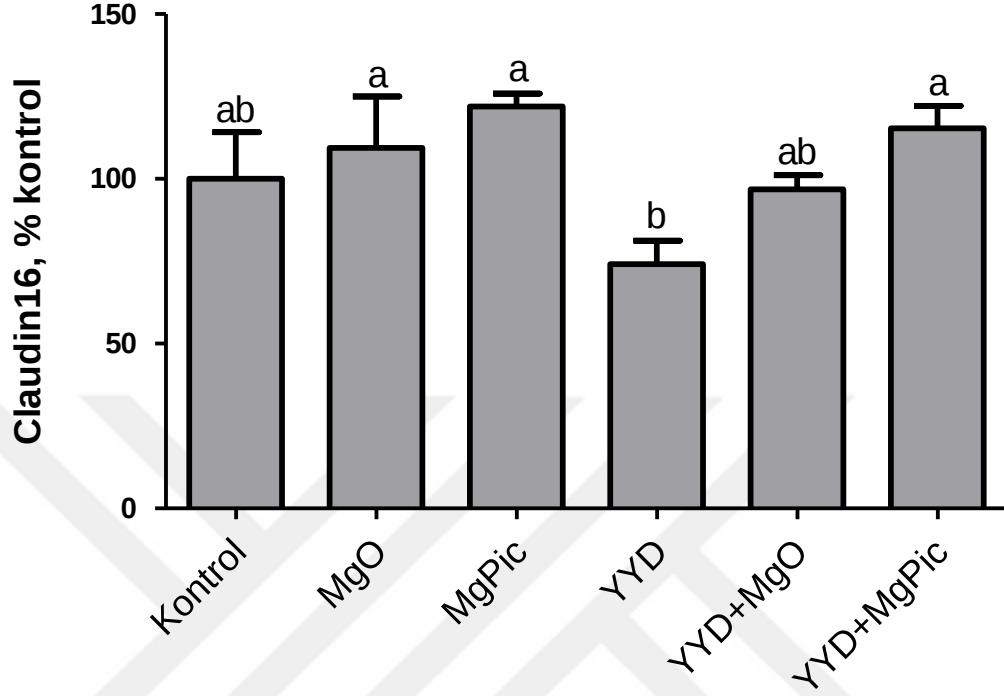
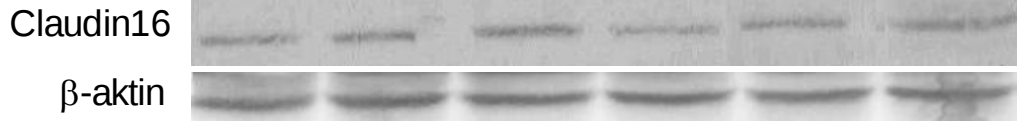
Şekil 10: Yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda Mg formlarını renal tubül taşıyıcı protein olan NCC düzeyi üzerine etkisi.

Böbrek EGF düzeyleri yüksek yağlı tüketimine bağlı olarak düşerken (%50), yüksek yağlı diyetle MgPic ilavesi artış göstermiştir (Şekil 11; $P < 0.001$). Örneğin, YYD grubunda bu oran %67.03 iken, YYD+MgPic grubunda ise %92.90 olarak bulunmuştur ($P < 0.05$). Bunabenzar olarak normal diyetle beslenen ratların kontrol grubunda EGF düzeyleri %100 iken, bu diyetle MgPic katılması ile bu oran %155'ye yükselmiştir. YYD+MgPic grubunda EGF düzeyi, YYD ile kıyaslandığında %27 oranında yüksek bulunmuştur ($P < 0.05$). Gruplarda MgO ilavesi ile de artış olmasına rağmen bu artış istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($P < 0.05$).

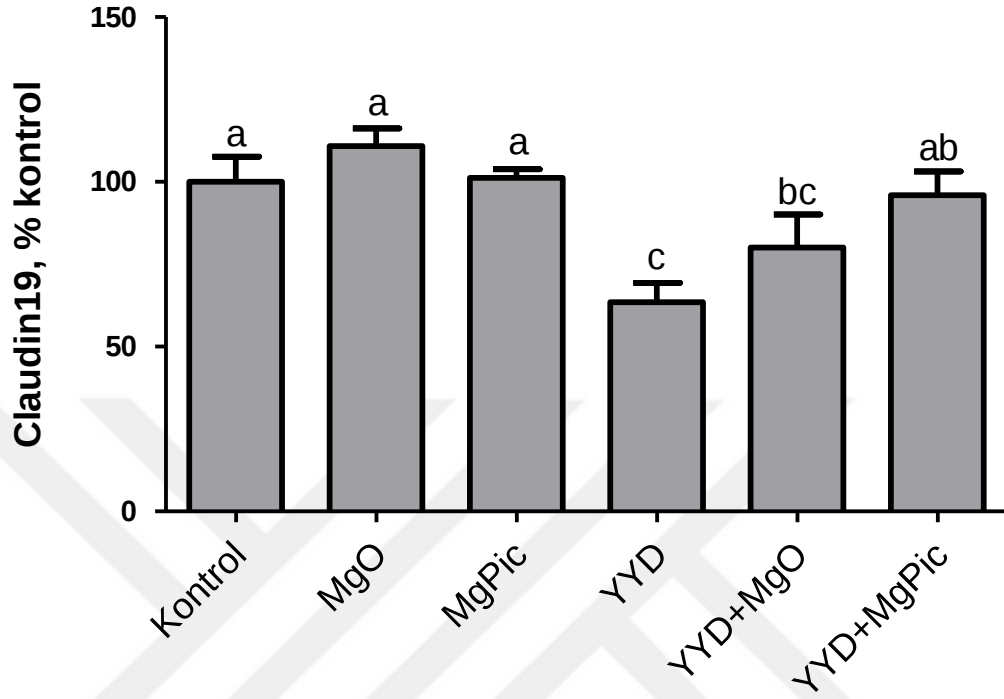
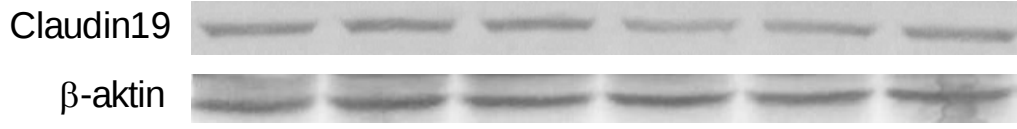


Şekil 11: Yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda Mg formlarının EGF düzeyi üzerine etkisi.

Yüksek yağlı diyet tüketimine bağlı olarak böbrek claudin16 ve 19 düzeylerinde azalma tespit edilmiştir (Şekil 12 ve 13; $P < 0.001$). Normal diyeti tüketen hayvanlarda her iki Mg formunun da claudin16 ve 19 düzeyleri üzerine bir etkisi tespit edilmemiştir ($P > 0.05$). Ancak, MgPic'in yüksek yağlı diyetle beslenen hayvanlarda claudin-16 ve 19 düzeylerini arttırdığı görülmüştür ($P < 0.05$). YYD+MgPic grubunda, YYD grubuna göre, Claudin16 ve 19 düzeylerisıra ile yaklaşık %35 ve %37 oranında artış göstermiştir. YYD ve YYD+MgO ile beslenen ratlarda claudin16 ve claudin 19 düzeyleri arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($P > 0.05$).



Şekil 12: Yüksek yağlı diyet ile beslenen ratlarda Mg formlarının claudin16 düzeyi üzerine etkisi



Şekil 13: Yüksek yağlı diyet ile beslenen ratlarda Mg formlarının claudin19 düzeyi üzerine etkisi.

6. TARTIŞMA

Magnezyum hücre içindeki tüm ana metabolik ve sinyal yollarında yer alır (108, 109). Magnezyum, temel olarak insülin reseptörünün tirozin kinaz aktivitesi üzerindeki etkisi ile fosfatı ATP'den proteine transfer ederek glikoz ve insülin metabolizmasında önemli bir rol oynar (110). Magnezyum, glikoz-1-fosfatı glikojenden salarak fosforilaz b kinaz aktivitesini de etkileyebilir. Ek olarak, magnezyum glikoz taşıyıcı protein 4 (GLUT4) aktivitesini de doğrudan etkileyebilir ve glikoz translokasyonunu hücreye düzenlemeye yardımcı olabilir (111). Bir fizyolojik kalsiyum kanalı antagonisti olarak, Mg^{+2} hücre içi kalsiyum konsantrasyonu akışları tarafından düzenlenen süreçleri etkiler ve bu nedenle normal nörolojik ve kas fonksiyonu için de gereklidir (112). Ayrıca, Mg^{+2} , fosfolipidlerle etkileşimler yoluyla membran geçirgenliğini düzenler ve damar tonunu ve kan basıncını etkiler.

Magnezyum eksikliği, bir dizi metabolik bozukluklar, oksidatif stres, sistemik inflamasyon, endotel disfonksiyonu, insülin direnci, hipertansiyon, tip 2 diyabet ve koroner kalp hastalığı gibi kronik hastalıklar ile ilişkili bulunmuştur (113-115). Yapılan çalışmalarda, yüksek yağlı diyetin, leptin direncine yol açarak doyma hissini azalttığı ve bu durumun insanlarda ve hayvanlarda metabolik bozukluklara ve obeziteye sebep olduğu bildirilmiştir (116, 117). Birçok çalışma, yüksek yağlı diyet ile beslenen ratların vücut ağırlıklarının standart diyetle beslenenlere göre artmış olduğunu göstermiş, obezite ile ilgili olarak adipoz dokunun ve vücut yağ oranının arttığını ve hiperleptinemik, hipertrigliseridemik ve hiperkolesterolemik etkilerin meydana geldiğini göstermiştir (118-120).

Normal yeme yaklaşık %10 -%46 arasında tereyağı, domuz yağı ve sığır iç yağı eklenerek yapılan deneysel çalışmalarda, vücut ağırlığı ve vücut yağ miktarındaki artış ile birlikte insülin direnci, oksidatif stres, kronik pankreatik yaralanmalar, kalp ve böbrek hastalıkları gibi birçok olumsuz durumun ortaya çıktığı tespit edilmiştir (121, 122). Yüksek yağlı diyetle beslenme sonucu oluşan metabolik sendromdan etkilenen hastalarda hipomagnezemi ve azalmış hücresel Mg^{+2} seviyeleri gibi değişmiş iyon homeostazisi görülmüş, bu da Mg^{+2} eksikliğinin patolojinin başlangıcı veya sebebi olup olmadığı sorusunu gündeme getirmiştir (123). Wegner ve ark. (124) ile Xu ve ark. (125) yaptıkları çalışmalarda, Tip1 diyabetli genç erişkinlerde serum magnezyum düzeylerinin kontrol grubundakilere göre daha düşük olduğunu bildirmişlerdir (124, 125). Tarafımızdan yürütülen bu çalışmada, yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda, iki farklıMg formunun, böbrekteki etki mekanizmaları araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, daha önceki çalışmalara benzer olarak, yüksek yağlı diyetle beslenen hayvanlarda, böbrek Mg düzeyi daha düşük, MDA düzeyi ise yüksek bulunmuştur (106). Ayrıca, yüksek yağlı diyet tüketimi, hayvanların böbreklerinde TRPM6, TRPM7, NCC, claudin16-claudin-19 ve EGF protein ekspresyonlarında azalmalara yol açmıştır. Ancak, diyete Mg ilavesi ile böbrek Mg düzeyinde artış, MDA düzeyinde düşüş tespit edilmiştir. Buna ilave olarak, yüksek yağlı diyetle beslenen hayvanlarda Mg tüketimi, Mg taşıyıcılarını regüle ederek koruyucu etki göstermiştir. Bu etki özellikle MgPic formunda daha belirgin olmuştur. Bunun da nedeni, organik formun emiliminin daha yüksek ve atılımının daha düşük olmasına bağlanabilir. Çünkü yapılan pek çok çalışmada, organik Mg tuzlarının inorganik bileşiklere göre daha yüksek biyoyararlanım gösterdikleri tespit

edilmiştir (126, 127). Coudray ve ark. (128), sıçanlarda yaptıkları bir çalışmada, diyetle Mg^{2+} (550 mg Mg^{+2} / kg) oksit, klorür, sülfat, karbonat, asetat, pidolat, sitrat, glukonat, laktat veya aspartate alımının, Mg^{+2} emilimini %50-67 arasında arttırdığı, organik Mg^{+2} tuzlarının inorganik Mg^{+2} tuzlarından daha fazla emilim gösterdiği ve Mg^{+2} glukonatın ise en yüksek Mg^{+2} biyoyararlanımını sergilediğini ortaya koymuşlardır. Bizim bulgulara benzer olarak, yapılan çalışmalarda, yüksek yağlı diyetlerin Mg 'nin emiliminidüşürdüğü bildirilmiştir (127). Yine, Lindberg ve ark. (129), sağlıklı gönüllülerdeki *in vitro* çözünürlük ve *in vivo* gastrointestinal absorpsiyon açısından Mg^{+2} sitrat ve Mg^{+2} oksidi karşılaştırmışlar ve Mg^{+2} sitratin biyoyararlanımının, muhtemelen daha iyi çözünürlüğü nedeniyle, MgO 'ten daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir (129). Aynı şekilde, Kappeler ve ark. (2017), biyomarker olarak 24 saatlik üriner Mg^{+2} atılımını kullanarak Mg^{+2} oksit ile karşılaştırıldığında, Mg^{+2} sitratin biraz daha yüksek biyoyararlanımını gözlemlemiştir (130). Ancak, yüksek yağlı diyet ile beslenen ratlarda, $MgPic$ 'ın etkileri ile ilgili çalışmalara rastlanılmamıştır. Bu çalışma ilk kez yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda, $MgPic$ 'ın obeziteye bağlı olarak düşen doku Mg düzeylerini iyileştirdiğini ortaya koymuştur.

Deneysel çalışmalarda, yüksek yağlı diyetin, ratlarda serum ve doku MDA düzeylerini arttırıp, SOD, CAT ve GSHPx antkioksidan enzimlerinin aktivitelerini düşürerek oksitadif strese neden olduğu bildirilmiştir (106, 131, 132). Ayrıca, yüksek yağlı diyetin oksidatif hasara karşı koruma sağlayan antioksidan etkili bir transkripsiyon faktörü olan nükleer faktörü (eritroid kaynaklı 2) -like 2 (Nrf2) inaktive ederek oksidatif strese neden olduğu da bildirilmiştir (106). Yürüttüğümüz bu çalışmada, yüksek yağlı diyet ile beslenen ratların diyetine Mg

ilavesi ile böbrek MDA düzeylerinde azalma tespit edilmiştir. MgPic'in etkisi daha belirgin bulunmuştur. Ancak, yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda MgPic'in MDA üzerine etkisi ile ilgili literatürlere rastlanılmamıştır. Magnezyumun diğer formlarının MDA üzerine etkisi ile ilgili çalışmalarda ise benzer sonuçlar elde edilmiştir (106, 131). Örneğin, Morakinyo ve ark. (133) diyabetik ratlarda yaptıkları bir çalışmada, MgSO₄'ın MDA düzeyini düşürdüğü ve glutatyon konsantrasyonunu ise artırdığı tespit edilmiştir. Yine, yapılan diğer bir çalışmada da, diyabetik ratlarda Mg ilavesinin, plazma ve karaciğer MDA düzeylerini düşürdüğü ve antioksidan enzimleri (SOD & GST) ise arttırdığı görülmüştür (134). Zhao ve ark. (135) renal iskemi- reperfüzyon hasarı oluşturulan ratlarda, magnezyum izoglisitreniatın, tümör nekroz faktörü- α , interlökin (IL)- 1 β , IL- 6, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve kaspaz- 3'ün aktiviteleriniinhibe ettiğini bildirmişlerdir (135).

Böbrekler, Mg⁺² metabolizmasında merkezi bir role sahiptir, çünkü her gün, 80 mmol Mg⁺², glomerüllerden filtrelenen 84 mmol tübüllerde yeniden emilir (136, 137). TRPM6 ve TRPM7, Mg⁺² homeostazında önemli rol oynar (138, 139). Böbreğin distal kıvrımlı tüpü, NCC aracılığıyla Na⁺ reabsorbsiyonunu modüle ederek kan basıncı regülasyonunda önemli bir rol oynar. Yüksek tuz ve düşük K⁺ içeren NCC içeren bir diyet, Na⁺ tutulmasına ve kan basıncında artışa neden olur (140). Henle'nin kalın artan kısmında (TAL)'de, Mg⁺², sıkı birleşim yerlerinde claudin-16 (paracellin-1) ve claudin-19'un oluşturduğu bir paraselüler yoldan geri emilir (141). Claudin-16 ve claudin-19 moleküllerinin, Mg⁺² reabsorbsiyonu için kritik olduğu gösterilmiştir (142). Aksine, DCT'lerde, geçici

reseptör potansiyeli TRPM6 kanalı, idrar Mg^{+2} çıktısının nihai düzenlemesinden sorumlu olan Mg^{+2} geri emilimi için bir transselüler yol sağlar (143). Bu çalışmada, yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda, TRMP6, TRMP7, NCC, EGF, Claudin16 ve Caludin 16 düzeylerinde düşme tespit edilmiş ve MgPic ilavesi ile de bu düzeylerin arttığı belirlenmiştir. Yapılan literatür taramalarında, yüksek yağlı diyetle Mg ilavesi ile ilgili literatürlere rastlanmadığından bu sonuçlar ile literatürler arasında karşılaştırma yapılamamıştır. Ancak, NCC ve TRPM6 ekspresyonlarının tüm deney periyodu boyunca azalması tutarlı bir sonuçtur ve bu da NCC downregülasyonunun TRPM6 ekspresyonunun azalmasına muhtemel katkısını düşündürmektedir.

Yapılan birkaç çalışmada, obezlerde TRMP6 ve TRMP7 proteinlerin ekspresyonlarında düşüş tespit edilmiştir (144). Takayanagi ve ark. (144) Evans Tokushima yağlı (OLETF) and Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) obez diyabetik ratlardayaptıkları bir çalışmada, TRPM6 ve NCC gen ekspresyonlarının %63-85 oranında baskılandığını, ancak claudin-16'nın, Henle'nin kalın artan kısmında bir farklılık göstermediğini bildirmişlerdir. Primer hipomagnezemi ile sekonder hipokalsemi olan hastalarda, TRPM6'nın işlev mutasyonu kaybının, renal Mg^{+2} israfına (145) veya düşük serum Mg^{+2} düzeylerine göre fraksiyonel Mg^{+2} atılım hızının uygun olmayan bir yükselmesi ile sonuçlandığı bildirilmiştir (146).

Çalışmamızda EGF de, TRMP6 ile paralel bir değişim göstermiştir. Daha önce yapılan bir çalışmada da, EGF'in, TRPM6'nın pozitif bir regülatörü olarak işlev gördüğü bildirilmiş (147) ve anti-EGF reseptörü antikoru setuksimabın, TRPM6'nın EGF-bağımlı aktivasyonunu engelleyerek hipomagnezemiye neden

olduğu da belirtilmiştir (148). Benzer şekilde, siklosporin A uygulamasının neden olduğu hipomagnezeminin, temel olarak TRPM6'nın siklosporin ile indüklenen downregülasyonundan kaynaklandığı ifade edilmiştir (149). Ayrıca, TRPM6'nın downregülasyonunun diyabetik nefropatide hipomagnezemiye neden olabileceği bildirilmiştir (144). Yine, Madala ve ark. (149). Zucker yağlı sıçanlarda NCC ekspresyonunun %50 azaldığını tespit etmişlerdir. Benzer şekilde Rondon ve ark. (150), Zucker yağlı sıçanlarda NCC ekspresyonunda belirgin bir azalma olduğunu bildirmişlerdir. Bizim sonuçlarımızın aksine, Lee ve ark. (151) streptozotosin ile uyarılan diyabetik sıçanlarda TRPM6 ve NCC'nin ekspresyonunun arttığını ve claudin-16 ekspresyonunda değişmediğini bildirmişlerdir. Yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde claudin-1, claudin-3, claudin-4, claudin-7 ve claudin-15 ekspresyonu azaltmıştır (152).

Yapılan diğer bir çalışmada, magnesium lithospermate B (MLB) nin, yağ asidi taşıyıcı CD36 ve lipojenik transkripsiyon faktörü sterol düzenleyici eleman bağlama transkripsiyon faktörü 1c (SREBP1c) ekspresyonunu inhibe ettiği ve lipolitik transkripsiyon faktörü peroksizom proliferatörü ile aktive edilen reseptör- α 'nın (PPAR α) regülasyonunun ise aktive ettiği bildirilmiştir (153). Yüksek yağlı diyet dışında farklı modellerde yapılan çalışmalarda Mg katkısının bu proteinlerin ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir (154, 155). Örneğin, kolon hücrelerinin, TRPM6/7 inhibitörü NS8593'e maruz kalması, Mg⁺² akışını ve bunun sonucunda hücre proliferasyonunu azaltmış ancak Mg takviyesi inhibisyonu önlemiştir (154).

Sonuç olarak, yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda, yağ tüketimi oksidatif hasara yol açmış ve MDA düzeyini arttırmıştır. Ancak, böbrek Mg düzeyinde azalmaya neden olmuştur. Buna ilave olarak, yüksek yağlı diyet

tüketimi TRMP6, TRPM7, NCC, EGF, Claudin 16 ve 19 düzeylerinde ise düşüşe neden olmuştur. Diyete Mg ilavesiMg taşıyıcılarını regüle ederek, böbrek Mg düzeyini artırmış, oksidatif hasarı iyileştirmiştir. Bu etkiler MgPic tüketen hayvanlarda daha belirgin olarak görülmüştür.



7. KAYNAKLAR

1. Özek K. Kanatlı beslemede magnezyumun fonksiyonları ve metabolizması. Iğdır Univ. J Inst Sci& Tech 2016; 6: 165-173.
2. Swaminathan R. Magnesium metabolism and its disorders. Clin Biochem Rev 2003; 24: 47-66.
3. Chaudhary DP, Sharma R, Bansal DD. Implications of magnesium deficiency in type 2 diabetes: A review. Biol Trace Element Res 2010; 134: 119-129.
4. Kanbay M, Yilmaz MI, Apetrii M et al. Relationship between serum magnesium levels and cardiovascular events in chronic kidney disease patients. Am J Nephrology 2012; 36: 228-237.
5. Broadus AE. Mineral balance and homeostasis. In: An official publication of the American Society for bone and mineral research. Primer on the metabolic bone disease disorders of mineral metabolism, 4th ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkyns 1999: 74-80.
6. Grubbs RD, Intracellular Diabetologia 1993; 36: 767-770.
7. Resnick LM, Altura BT, Gupta RK, et al. Intracellular and extracellular magnesium depletion in type 2 (non-insulindependent) diabetes mellitus. magnesium and magnesium buffering. Biometals 2002; 15:251–259.
8. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. N Engl J Med 2005; 352: 1685-1695.
9. Gunther T. Concentration, compartmentation and metabolic function of intracellular free Mg²⁺. Magnes Res 2006; 19: 225-236.
10. Romani AM, Vink R, Nechifor M, Intracellular magnesium homeostasis. Magnesium in the Central Nervous System. Adelaide (AU): University of Adelaide Press, 2011.
11. Wolf FI, Torsello A, Fasanella S, Cittadini A Cell physiology of magnesium. Mol Aspects Med. 2003; 24:11-26.
12. Schuwirth BS, Borovinskaya MA, Hau CW, et al. Structures of the bacterial ribosome at3. 5 Å resolution. Science 2005; 310: 827-834.
13. Pontes MH, Sevostyanova A, Groisman EA. When Too Much ATP Is Bad for Protein Synthesis. J Mol Biol. 2015; 427:2586-2594.
14. Romani AM: Cellular magnesium homeostasis. Arch Biochem Biophys 2011; 512: 1-23.
15. Guillaume T, Krzesinski JM. Management of serum magnesium abnormalities. Rev Med Liege 2003; 58:465-467.
16. Wen SF, Evanson RL, Dirks JH. Micropuncture study of renalmagnesium transport in proximal and distal tubule ofthe dog. Am J Physiol 1970;219:570-574.
17. Monk RD, Bushinsky D. Treatment of calcium phosphorus, and magnesium disorders. In: Halperin M, ed. Therapy innephrology and hypertension: a companion of Brennor andRector's the kidney. Philadelphia: WB Saunders, 1999; 303-315.

18. Dr. Enver ŞİMŞEK, Dr. Kenan KOCABAY, Minerallerin İntestinal Emilimi ve Böbreklerden Atılımının Düzenlenmesi. *Türkiye Klinikleri J Pediatr* 2001;10:181-189.
19. Chhabra, S. ve Ramessur, K. Hypomagnesemia and its implications in Type 2 Diabetes Mellitus A Review Article. *Webmed Central Diabetes* 2012; 3:WMC003878 .
20. Del Gobbo LC, Imamura F, Wu, JH et al. Circulating and dietary magnesium and risk of cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Am J Clin Nutr* 2013; 98:160-173.
21. Jahnhen-Dechent W. ve Ketteler, M. Magnesium basics. *Clinical Kidney Journal*, 2012; : 3-14.
22. Hruby A, O'Donnell CJ, Jacques PF, Meigs JB, Hoffmann U ve Keown Mc NM. Magnesium intake is inversely associated with coronary artery calcification: the Framingham Heart Study. *JACC Cardiovasc Imaging* 2014; 7: 59-69.
23. Piskacek M, Zotova L, Zsurka G, et al. Conditional knockdown of hMRS2 results in loss of mitochondrial Mg²⁺ uptake and cell death. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 693–700.
24. Rayssiguier Y, Libako P, Nowacki W, et al. Magnesium deficiency and metabolic syndrome: stress and inflammation may reflect calcium activation. *Magnes Res* 2010; 23: 73-80.
25. Ebel H, Gunther T: Magnesium metabolism: A review. *J Clin Chem Clin Biochem* 1980; 18 :257–270.
26. Heng Li , Shiren Sun, Jianghua Chen, et al. Kidney Genetics of Magnesium Disorders *Dis* 2017;3:85–97.
27. Maunsbach, AB. Observations on the segmentation of the proximal tubule in the rat kidney. *J. Ultrastruct. Res* 1966; 16: 239.
28. Le Grimellec C: Micropuncture study along the proximal convoluted tubule. Electrolyte reabsorption in first convolutions. *Pflugers Arch* 1975; 354: 133–150.
29. Malnie, G, Mello Aires, M, Laeaz Vieira F. Chloride excretion in nephrons of rat kidney during alterations of acid-base equilibrium. *Amer J Physiol* 1970; 218: 20.
30. Murayama, Y. , Morel, F. , Le Grimellec, Chr. : Phosphate, calcium and magnesium transfers in proximal tubules and loops of I-Ienle, as measured by single nephron microperfusion experiments in the rat. *Pfliigers Arch* 1972 ;838:1.
31. Morita K, Furuse M, Fujimoto K, et al: Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 511–516.
32. Rector FC, Carter NW, Seldin DW. The mechanism of bicarbonate reabsorption in the proximal and distal tubules of the kidney. *J. Elin. Invest* 1965; 44: 278.
33. Heng Li , Shiren Sun, Jianghua Chen, Goushuang Xu, Hanmin Wang, Qi Qian. Genetics of Magnesium Disorders *Kidney Dis* 2017;3:85–97.
34. Konrad M, Schlingmann KP, Gudermann T. Insights into the molecular nature of magnesium homeostasis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286:599-605.
35. Xi Q, Hoenderop JG, Bindels RJ. Regulation of magnesium reabsorption in DCT. *Pflugers Arch* 2008; 24:

36. Blanchard A, Jeunemaitre X, Coudol P, et al. Paracellin-1 is critical for magnesium and calcium reabsorption in the human thick ascending limb of Henle. *KidneyInt* 2001; 59:2206-2215.
37. Walder RY, Landau D, Meyer P, et al. Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Nat Genet* 2002; 31:171-174.
38. Meij IC, Koenderink JB, van Bokhoven H, et al. Dominant isolated renal magnesium loss is caused by misrouting of the Na (+), K (+)-ATPase gamma-subunit. *Nat Genet* 2000; 26:265-266.
39. Sahni J, Scharenberg AM. The slc41 family of mgte-like magnesium transporters. *Mol Aspects Med* 2013; 34: 620–628.
40. Voets T, Nilius B, Hoefs S, et al. Trpm6 forms the mg21 influx channel involved in intestinal and renal mg21 absorption. *J Biol Chem* 2004; 279: 19–25.
41. Groenestege WM, Hoenderop JG, van den Heuvel L, Knoers N, Bindels RJ. The epithelial mg21 channel transient receptor potential melastatin 6 is regulated by dietary mg21 content and estrogens. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 1035–1043.
42. Walder RY, Landau D, Meyer P, Shalev H, Tsolia M, Borochowitz Z, Boettger MB, Beck GE, Englehardt RK, Carmi R, Sheffield VC. . Mutation of trpm6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Nat Genet* 2002; 31: 171-174.
43. Schlingmann KP, Waldegger S, Konrad M, et al. TRPM6 and TRPM7: Gatekeepers of human magnesium metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1772: 813-821.
44. Inoue K, Xiong ZG. Silencing TRPM7 promotes growth/proliferation and nitric oxide production of vascular endothelial cells via the ERK pathway. *Cardiovasc Res* 2009; 83: 547-557.
45. Masilamani S, Wang X, Kim GH, et al. Time course of renal Na-K-ATPase, NHE3, NKCC2, NCC, and ENaC abundance changes with dietary NaCl restriction. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 283: 648–657.
46. Song J, Hu X, Shi M, et al. Effects of dietary fat, NaCl, and fructose on renal sodium and water transporter abundances and systemic blood pressure. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 287: 1204-1212.
47. Giebisch G, Klose RM, Windhager EE. Micropuncture study of hypertonic sodium chloride loading in the rat. *Am J Physiol* 1964; 206: 687–693.
48. Wang XY, Masilamani S, Nielsen J, et al. The renal thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter as mediator of the aldosterone-escape phenomenon. *J Clin Invest* 2001; 108: 215–222.
49. De Jong JC, Van Der Vliet WA, Van Den Heuvel LP, et al. Functional expression of mutations in the human NaCl cotransporter: evidence for impaired routing mechanisms in Gitelman's syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 1442–1448.
50. Schlingmann KP, Weber S, Peters M, et al. Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. *Nat Genet* 2002; 31:166–170.

51. Schlingmann KP, Waldegger S, Konrad M, Chubanov V, Gudermann T. TRPM6 and TRPM7-Gatekeepers of human magnesium metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2007;1772: 813–821.
52. Schlingmann KP, Sassen MC, Weber S, et al. Novel TRPM6 mutations in 21 families with primary hypomagnesemia and secondary hypocalcemia. *J Am Soc Nephrol* 2005;16: 3061–3069.
53. Schlingmann KP, Gudermann T. A critical role of TRPM channel kinase for human magnesium transport. *J Physiol* 2005; 566: 301–308.
54. Walder RY, Landau D, Meyer P. Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Nat Genet* 2002; 31: 171–174.
55. Abed E, Moreau R. Importance of melastatin-like transient receptor potential 7 and cations (magnesium, calcium) in human osteoblast-like cell proliferation. *Cell Prolif* 2007; 40: 849–865.
56. Chubanov V, Gudermann T, Schlingmann KP. Essential role for TRPM6 in epithelial magnesium transport and body magnesium homeostasis. *Pflügers Arch* 2005;451: 228–234.
57. Gwanyanya A, Amuzescu B, Zakharov SI, Macianskiene R, Sipido KR, Bolotina VM, Vereecke J, Mubagwa K. Magnesium-inhibited, TRPM6/7-like channel in cardiac myocytes: permeation of divalent cations and pH-mediated regulation. *J Physiol* 2004;559: 761–776.
58. Schmitz C, Perraud AL, Fleig A, Scharenberg AM. Dual-function ion channel/protein kinases: novel components of vertebrate magnesium regulatory mechanisms. *Pediatr Res* 2004;55: 734–737.
59. Takezawa R, Schmitz C, Demeuse P, et al. Receptor-mediated regulation of the TRPM7 channel through its endogenous protein kinase domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 6009–6014.
60. Chubanov V, Schlingmann KP, Waring J, et al. Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia due to a missense mutation in the putative pore-forming region of TRPM6. *J Biol Chem* 2007;282: 7656–7667.
61. Shalev H, Phillip M, Galil A, Carmi R, Landau D. Clinical presentation and outcome in primary familial hypomagnesaemia. *Arch Dis Child* 1998; 78:127-130.
62. Runnels LW, Yue L, Clapham DE. TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities. *Science* 2001; 291: 1043-1047
63. Clapham DE, Runnels LW, Strübing C. The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci.* 2001; 2:387-396.
64. Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V. The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* 2002; 108:595-598.
65. Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V. A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol Cell* 2002; 9:229-231.

66. Monteilh-Zoller MK, Hermosura MC, Nadler MJ, Scharenberg AM, Penner R, Fleig A. TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions. *J Gen Physiol* 2003; 121:49-60.
67. Cao G, Hoenderop JG, Bindels RJ. Insight into the molecular regulation of the epithelial magnesium channel TRPM6. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008; 17: 373-378.
68. Dimke H, Hoenderop JG, Bindels RJ. Molecular basis of epithelial Ca^{2+} and Mg^{2+} transport: insights from the TRP channel family. *J Physiol* 2011; 589: 1535-1542.
69. Abdallah JG, Schrier RW, Edelstein C, et al. Loop diuretic infusion increases thiazide-sensitive $\text{Na}^{+}/\text{Cl}^{-}$ -cotransporter abundance: role of aldosterone. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:1335–1341.
70. Gitelman HJ, Graham JB, and Welt LG. *Ann N Y Acad Sci* 1969; 162: 856-864.
71. Gamba, G, Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiol. Rev.* 2005; 85:423–493.
72. Gamba GS, Saltzberg N, Lombardi M, et al. Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 2749–2753.
73. De Jong JC, Van Der Vliet WA, Van Den Heuvel LP, Willems PH, Knoers NV, and Bindels RJ. Functional expression of mutations in the human NaCl cotransporter: evidence for impaired routing mechanisms in Gitelman's syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2002;13: 1442–1448.
74. Kunchaparty S, Palcsó M, Berkman J, Velazquez H, Desir GV, Bernstein P, Reilly RF, and Ellison DH. Defective processing and expression of thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter as a cause of Gitelman's syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol* 1999; 277: 643–649.
75. Bettinelli, A. Use of calcium excretion values to distinguish two forms of primary renal tubular hypokalemic alkalosis: Bartter and Gitelman syndromes. *J. Pediatr* 1992; 120: 38–43.
76. Rinehart J, Kahle K, de los Heros P, et al. "WNK3 kinase is a positive regulator of NKCC2 and NCC, renal cation- Cl^{-} cotransporters required for normal blood pressure homeostasis". *PNAS* 2005; 102: 16777–16782.
77. Zhou B, Zhuang J, Gu D, et al. "WNK4 Enhances the Degradation of NCC through a Sortilin-Mediated Lysosomal Pathway". *Journal of the American Society of Nephrology* 2010; 21: 82–92.
78. Chobanian, A. V, et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 2003; 289:2560–2572.
79. Reilly, R. F, and Ellison DH. Mammalian distal tubule: physiology, pathophysiology, and molecular anatomy. *Physiol. Rev* 2000; 80:277–313.
80. Lifton RP, Gharavi AG, and Geller DS. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* 2001; 104:545–556.

81. Nielsen J, Kwon TH, Masilamani S, et al. Sodium transporter abundance profiling in kidney: effect of spironolactone. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;283: 923–933.
82. Hou J, Renigunta A, Konrad M, et al. Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex. *J Clin Invest* 2008; 118: 619–628.
83. Rüffer C, Gerke V "The C-terminal cytoplasmic tail of claudins 1 and 5 but not its PDZ-binding motif is required for apical localization at epithelial and endothelial tight junctions". *Eur. J. Cell Biol* 2004; 83: 135–144.
84. Hou J, Paul DL, Goodenough DA: Paracellin-1 and the modulation of ion selectivity of tight junctions. *J Cell Sci* 2005; 118:5109–5118.
85. Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 1963; 17:375–412.
86. Hebert SC. Calcium and salinity sensing by the thick ascending limb: a journey from mammals to fish and back again. *Kidney Int Suppl* 2004; 28–33.
87. Han JS, Thompson KA, Chou CL, Knepper MA. Experimental tests of three-dimensional model of urinary concentrating mechanism. *J Am Soc Nephrol* 1992; 2:1677–1688.
88. Hebert SC, Culpepper RM, Andreoli TE. NaCl transport in mouse medullary thick ascending limbs. I. Functional nephron heterogeneity and ADH-stimulated NaCl cotransport. *Am J Physiol* 1981; 241:412–431.
89. Simon DB, Lu Y, Choate KA, et al. Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science* 1999; 285:103–106.
90. Alexander RT, Hoenderop JG, Bindels RJ. Molecular determinants of magnesium homeostasis: insights from human disease. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19:1451–1458.
91. Stubbs SC, Hargreave TB, Habib FK, Localization and characterization of epidermal growth factor receptors in human testicular tissue by biochemical and immunohistochemical techniques. *J. Endocrinol* 1990; 125: 485 - 492
92. Holbro T, Hynes NE. ErbB receptors: directing key signaling Networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44:195–217.
93. Sweeney C, Carraway KL III. Ligand discrimination by ErbB receptors: differential signaling through differential phosphorylation site usage. *Oncogene* 2000; 19:5568 –5573.
94. Tong Q, Stockand JD. Receptor tyrosine kinases mediate epithelial Na⁺ channel inhibition by epidermal growth factor. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;288:150 –161.
95. Venturi S, Venturi M. "Iodine in evolution of salivary glands and in oral health". *Nutrition and Health* 2009; 20: 119–34.
96. Sweeney C, Carraway KL III. Ligand discrimination by ErbB receptors: differential signaling through differential phosphorylation site usage. *Oncogene* 2000; 19:5568 –5573.
97. Dreux AC, Lamb DJ, Modjtahedi H, Ferns GA. The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: their putative role in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2006; 186:38 –53.
98. Threadgill DW, Dlugosz AA, Hansen LA, et al. Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* 1995; 269:230 –234.

99. Harris RC. Potential physiologic roles for epidermal growth factor in the kidney. *Am J Kidney Dis* 1991; 17:627– 630.
100. Huerta MG, Roemmich JN, Kington ML, Bovbjerg VE, Weltman AL. Magnesium deficiency is associated with insulin resistance in obese children. *Diabetes Care* 2005; 28: 1175-1181.
101. Jose B, Jain V, Vikram NK, Agarwala A, Saini S. Serum magnesium in overweight children. *Indian Pediatr* 2011; 49: 109-112.
102. Barbagallo M, Dominguez LJ. Magnesium metabolism in type 2 diabetes mellitus, metabolic syndrome and insulin resistance. *Arc Biochem Biophys* 2007; 458: 40-47.
103. Guerrero-Romero F, Rascón-Pacheco RA, Rodríguez-Morán M, de la Peña JE, Wachter N. Hypomagnesaemia and risk for metabolic glucose disorders: A 10-year follow-up study. *Euro J Clin Inv* 2008; 38: 389-396.
104. Swaminathan R. Magnesium metabolism and its disorders. *Clin Biochem Rev* 2003; 24: 47-66.
105. Bertinato J, Plouffe LJ, Lavergne C, et al. Bioavailability of magnesium from inorganic and organic compounds is similar in rats fed a high phytic acid diet. *Magnes Res* 2014; 27: 175-185.
106. Sahin K, Orhan C, Akdemir F, Tuzcu M, Sahin N, Yilmaz I, Juturu V. β -Cryptoxanthin ameliorates metabolic risk factors by regulating NF- κ B and Nrf2 pathways in insulin resistance induced by high-fat diet in rodents. *Food Chem Toxicol* 2017;107:270-279.
107. Sahin K, Orhan C, Tuzcu M, Sahin N, Erten F, Juturu V. Capsaicinoids improve consequences of physical activity. *Toxicol Rep.* 2018 May 15;5:598-607
108. De Baaij, J. H. ; Hoenderop, J. G. ; Bindels, R. J. Magnesium in man: Implications for health and disease. *Physiol. Rev* 2015; 95: 1–46.
109. Dai LJ, Ritchie G, Kerstan D et al. Magnesium transport in the renal distal convoluted tubule. *Physiol Rev* 2001; 81: 51–84.
110. Gröber U, Schmidt J, Kisters K, Magnesium in Prevention and Therapy. *Nutrients.* 2015; 7: 199-226.
111. Guerrero-Romero F, Simental-Mendía LE, Hernández Ronquillo G, Rodríguez-Morán M, Oral magnesium supplementation improves glycaemic status in subjects with prediabetes and hypomagnesaemia: A double-blind placebo-controlled randomized trial. *Diabetes Metab* 2015; 41: 202–207.
112. Saris NE, Mervaala E, Karppanen H, Khawaja JA, Lewenstam A, Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspects. *Clin Chim Acta* 2000; 294:1-26.
113. Song Y, Li TY, van Dam RM, Manson JE, Hu FB: Magnesium intake and plasma concentrations of markers of systemic inflammation and endothelial dysfunction in women. *Am J Clin Nutr* 2007; 85:1068-1074.

114. Song Y, Ford ES, Manson JE, Liu S: Relations of magnesium intake with metabolic risk factors and risks of type 2 diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: A critical appraisal. *Current Nutrition & Food Science* 2005; 1:231-243.
115. Song Y, Manson JE, Buring JE, Liu S: Dietary magnesium intake in relation to plasma insulin levels and risk of type 2 diabetes in women. *Diabetes Care* 2004; 27:59-65.
116. El-Haschimi K, Pierroz WM, Hileman SM, Bjobaek C, Flier JS. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J Clin Invest* 2000; 105 : 1827-1832.
117. Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: Modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity* 2007; 15: 798-808.
118. Garjani A, Fathiazad F, Zakheri A, et al. The effect of total extract of *Securigera securidaca* L. seeds on serum lipid profiles, antioxidant status, and vascular function in hypercholesterolemic rats. *J Ethnopharmacol* 2009; 126: 525-32.
119. Kalaivanisailaja J, Manju V, Nalini N. Lipid profile in mice fed a high-fat diet after exogenous leptin administration. *Polish J Pharmacol* 2003; 55: 763-769.
120. Kim SO, Yun SJ, Jung B, et al. Hypolipidemic effects of crude extract of adlay seed (*Coix lachrymajobi* var. *mayuen*) in obesity rat fed high fat diet: Relations of TNF- α and leptin mRNA expressions and serum lipid levels. *Life Sci* 2004; 75: 1391-404.
121. Amin KA, Nagy MA. Effect of carnitine and herbal mixture extract on obesity induced by high fat diet in rats. *Diabetol Met Synd* 2009; 1: 17-31.
122. Chen H, Li-Jun L, Jian-Jun Z, Boa X, Rui L. Effect of soybean oligosaccharides on blood lipid, glucose levels and antioxidant enzymes activity in high fat rats. *Food Chem* 2010; 119: 1633-1666.
123. Jungermann K, Heilbronn R, Katz N, Sasse D. The glucose/ glucose-6-phosphate cycle in the periportal and perivenous zone of rat liver. *Eur J Biochem* 1982; 123:429–436.
124. Wegner M, Araszkiewicz A, Zozulińska-Ziolkiewicz D, et al. The relationship between concentrations of magnesium and oxidized low density lipoprotein and the activity of platelet activating factor acetylhydrolase in the serum of Patients with type 1 diabetes. *Magnes Res* 2010; 23:97-104.
125. Xu J, Xu W, Yao H, et al. Associations of serum and urinary magnesium with the pre-diabetes, diabetes and diabetic complications in the Chinese Northeast population. *PLoS One* 2013; 8:567-50.
126. Schuchardt JP1, Hahn A1. Intestinal Absorption and Factors Influencing Bioavailability of Magnesium-An Update. *Curr Nutr Food Sci* 2017; 13:260-278.
127. Aranda P, Lopez Frias M, Lopez-Jurado M, et al. Nutritional availability of magnesium and calcium in magnesium-supplemented diets. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1989; 35:81-90.
128. Coudray C, Rambeau M, Feillet-Coudray C, et al. Study of magnesium bioavailability from ten organic and inorganic Mg salts in Mg-depleted rats using a stable isotope approach. *Magnes Res.* 2005 ; 18:215-223.

129. Lindberg JS, Zobitz MM, Poindexter JR, Pak CY, Magnesium bioavailability from magnesium citrate and magnesium oxide. *J. Am. Coll. Nutr* 1990; 9:48–55.
130. Kappeler D, Heimbeck I, Herpich C, et al. Higher bioavailability of magnesium citrate as compared to magnesium oxide shown by evaluation of urinary excretion and serum levels after single-dose administration in a randomized cross-over study. *BMC Nutr* 2017; 3:7.
131. Tuzcu Z, Orhan C, Sahin N, Juturu V, Sahin K. Cinnamon Polyphenol Extract Inhibits Hyperlipidemia and Inflammation by Modulation of Transcription Factors in High-Fat Diet-Fed Rats. *Oxid Med Cell Longev* 2017; 2017:1583098.
132. Epub 2017 Mar 15; Zhang H, Zou X, Huang Q, Zhong X, Huang Z. Effects of Kudingcha Nanoparticles in Hyperlipidaemic Rats Induced by a High Fat Diet. *Cell Physiol Biochem*. 2018; 45:2257-2267.
133. Morakinyo AO, Samuel TA, Adekunbi DA. Magnesium upregulates insulin receptor and glucose transporter-4 in streptozotocin-nicotinamide-induced type-2 diabetic rats. *Endocr Regul*. 2018; 52:6-16.
134. Hans CP, Chaudhary DP, Bansal DD. Effect of magnesium supplementation on oxidative stress in alloxanic diabetic rats. *Magnes Res* 2003;16:13-19.
135. Zhao Z, Tang Z, Zhang W, Liu J, Li B. Magnesium isoglycyrrhizinate protects against renal ischemia reperfusion injury in a rat model via anti inflammation, anti oxidation and anti apoptosis. *Mol Med Rep* 2017 ;16:3627-3633.
136. Swaminathan R . Magnesium metabolism and its disorders. *Clin Biochem Rev* 2003; 24: 47-66.
137. Glaudemans B, Knoers NV , Hoenderop JG , Bindels RJ . New molecular players facilitating Mg²⁺ reabsorption in the distal convoluted tubule. *Kidney Int* 2010; 77: 17-22.
138. Nadler MJ, Hermosura MC, Inabe K, Perraud AL, Zhu Q, Stokes AJ, Kurotaki T, Kinet JP, Penner R, Scharenberg AM, Fleig A: LTRPC7 is a Mg²⁺ ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature* 2001; 411: 590–595.
139. Schmitz C, Perraud AL, Johnson CO, Inabe K, Smith MK, Penner R, Kurotaki T, Fleig A, Scharenberg AM: Regulation of vertebrate cellular Mg²⁺ homeostasis by TRPM7. *Cell* 2003;114: 191–200.
140. Effects of a high sodium-low potassium diet on renal calcium, magnesium, and phosphate handling. van der Wijst J1, Tutakhel OAZ2, Bos C3, Danser AHJ4, Hoorn EJ5, Hoenderop JGJ6, Bindels RJM7. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2018 Jan 10.
141. Hou J , Renigunta A , Konrad M , Gomes AS , Schneeberger EE , Paul DL , Waldegger S , Goodenough DA . Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex. *J Clin Invest* 2008; 118: 619-628.
142. Simon DB , Lu Y , Choate KA , Velazquez H , Al-Sabban E , Praga M , Casari G , Bettinelli A , Colussi G , Rodriguez-Soriano J , McCredie D , Milford D , Sanjad S , Lifton RP . Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science* 1999; 285: 103-106.

143. Alexander RT , Hoenderop JG , Bindels RJ . Molecular determinants of magnesium homeostasis: insights from human disease. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 1451-1458.
144. Takayanagi K1, Shimizu T2, Tayama Y2, et al. Downregulation of transient receptor potential M6 channels as a cause of hypermagnesiuric hypomagnesemia in obese type 2 diabetic rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2015; 15:1386-97.
145. Schlingmann KP , Sassen MC , Weber S , et al. Novel TRPM6 mutations in 21 families with primary hypomagnesemia and secondary hypocalcemia. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 3061-3069.
146. Schlingmann KP , Weber S , Peters M , et al. Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. *Nat Genet* 2002; 31: 166-170.
147. Thebault S , Alexander RT , Tiel Groenestege WM , Hoenderop JG , Bindels RJ . EGF increases TRPM6 activity and surface expression. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 78-85.
148. Wolf FI , Cittadini AR , Maier JA . Magnesium and tumors: ally or foe? *Cancer Treat Rev* 2009; 35: 378-382.
149. Madala Halagappa VK, Tiwari S, Riaz S, Hu X , Ecelbarger CM . Chronic candesartan alters expression and activity of NKCC2, NCC, and ENaC in the obese Zucker rat. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 294: 1222-1231.
150. Rondon LJ, Groenestege WM, Rayssiguier Y, Mazur A. Relationship between low magnesium status and TRPM6 expression in the kidney and large intestine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; 294: 2001-2007.
151. Lee CT, Lien YH, Lai LW, et al. Increased renal calcium and magnesium transporter abundance in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Kidney Int* 2006; 69: 1786-1791.
152. Ahmad R, Rah B, Bastola D, Dhawan P, Singh AB. Obesity-induces Organ and Tissue Specific Tight Junction Restructuring and Barrier Deregulation by Claudin Switching. *Sci Rep*. 2017 Jul 11; 7:5125.
153. Ying-Jie Chen, Yuan-Hao Lo, Yi-Ting Chen, et al. Tzen Magnesium lithospermate B improves metabolic changes in high-fat diet-fed rats with metabolic syndrome *Journal of Functional Foods* 2015; 14: 163–173.
154. Luongo F, Pietropaolo G, Gautier M, et al. TRPM6 is Essential for Magnesium Uptake and Epithelial Cell Function in the Colon. *Nutrients*. 2018;10:
155. Rodríguez-Ramírez M, Rodríguez-Morán M, Reyes-Romero MA, Guerrero-Romero F. Effect of oral magnesium supplementation on the transcription of TRPM6, TRPM7, and SLC41A1 in individuals newly diagnosed of pre-hypertension. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Magnes Res* 2017;30:80-87.

8. ÖZGEÇMİŞ

A. KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Kübra Yazgan

Doğum Tarihi: 01.08.1992

Doğum Yeri: Malatya

Yabancı Dil Bilgisi: İngilizce

Görev Yeri: Elazığ Belediyesi

E-Posta Adresi: kubrayzgn92@gmail.com

Telefon: 0 5347778950

B. EĞİTİM BİLGİLERİ

Üniversite: Fırat Üniversitesi

Fakülte: Veteriner Fakültesi (2015)

C. İŞ TECRÜBESİNE AİT BİLGİLER

Çalıştığı Kurum: Elazığ Belediyesi (2017-devam ediyor)

Görevi : Veteriner Hekim

Tecrübe Süresi: 3 yıl