

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RENAL İSKEMİ/REPERFÜZYON MODELİNDE
TAURİNİN EKSTRASELLÜLER MATRİKS
BÜTÜNLÜĞÜ ÜZERİNE OLASI KORUYUCU
ETKİSİNİN VE İLİŞKİLİ SİNYAL İLETİ
YOLAKLARININ TANIMLANMASI

CEMRE URAL

MOLEKÜLER TIP
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2014

TEZ KODU: DEU.HSI.Msc-2011970061

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RENAL İSKEMİ/REPERFÜZYON MODELİNDE
TAURİNİN EKSTRASELLÜLER MATRİKS
BÜTÜNLÜĞÜ ÜZERİNE OLASI KORUYUCU
ETKİSİNİN VE İLİŞKİLİ SİNYAL İLETİ
YOLAKLARININ TANIMLANMASI

CEMRE URAL

MOLEKÜLER TIP
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman Öğretim Üyesi: Yrd. Doç. Dr. Zahide ÇAVDAR

Bu araştırma BAP tarafından 2013.KB:SAG.76 proje numarasıyla desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.Msc-2011970061

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Yüksek Lisans programı öğrencisi Cemre Ural “RENAL İSKEMİ-REPERFÜZYON MODELİNDE TAURİNİN EKSTRASELLÜLER MATRIKS BÜTÜNLÜĞÜ ÜZERİNE OLASI KORUYUCU ETKİSİNİN VE İLİŞKİLİ SİNYAL İLETİ YOLAKLARININ TANIMLANMASI” konulu Yüksek Lisans tezini 25.12.2014 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

BAŞKAN

Yard. Doç. Dr. Zahide ÇAVDAR
Dokuz Eylül Üniversitesi
Moleküler Tıp Anabilim Dalı



ÜYE

Prof. Dr. Gül GÜNER AKDOĞAN
Dokuz Eylül Üniversitesi
Moleküler Tıp Anabilim Dalı



ÜYE

Prof. Dr. Bekir Uğur ERGÜR
Dokuz Eylül Üniversitesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

YEDEK ÜYE

Prof. Dr. Nur ARSLAN
Dokuz Eylül Üniversitesi
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

YEDEK ÜYE

Doç. Dr. Sea ÖZBAL
Dokuz Eylül Üniversitesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLO DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
KISALTMALAR	vii
TEŞEKKÜR	ix
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1 HÜCRE DIŞI MATRİS	7
2.2. MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR.....	7
2.2.1 Jelatinazlar	10
2.2.2 Regülasyonları	10
2.2.2.1 Transkripsiyonel Düzenleme	11
2.2.2.2. Aktivitesinin Regülasyonu	13
2.2.2.3. Spesifik Doku İnhibitörleri	14
2.2.3 Böbrek ve Matriks Metalloproteinazlar	15
2.3 İSKEMİ/ REPERFÜZYON.....	16
2.3.1 İskemi/Reperfüzyon Hasarı ile İlgili Moleküler Mekanizmalar	17
2.3.2. Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres.....	18
2.3.3. İskemi/Reperfüzyon Hasarı ve Renal Sistem.....	19
2.3.4 Renal İskemi Reperfüzyon Hasarında MMP'lerin rolü.....	21

2.3 TAURIN	22
2.3.1. Taurin ve Renal Sistem	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Araştırmanın Tipi	25
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	25
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları	25
3.4. Çalışma Materyali.....	25
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	25
3.6. Veri toplama Araçları	26
3.6.1. Deney Hayvanı.....	27
3.6.2. Histolojik Değerlendirmeler	29
3.6.2.1. Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü	29
3.6.3. Biyokimyasal İncelemeler.....	35
3.6.3.1 Dokuların Hazırlanması	36
3.6.3.2 Doku Protein Analizi	37
3.6.3.3. Serum Kreatinin ve BUN Düzeylerinin Belirlenmesi	37
3.6.3.4. Doku MDA Analizi.....	38
3.6.3.5. Doku SOD Analizi.....	39
3.6.3.6. MMP-2 ve MMP-9 mRNA Ekspresyonlarının Belirlenmesi	40
3.6.3.6.1. Total RNA İzolasyonu	40
3.6.3.6.2. RNA'nın Ölçülmesi.....	40
3.6.3.6.3 RNA' nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi	41
3.6.3.6.4. cDNA Sentezi	41
3.6.3.7. MMP-2 ve MMP-9 Aktivite Ölçümü	43
3.6.3.8. Western Blot ile p38 Protein Düzeylerinin Belirlenmesi.....	44
3.7. Araştırma Planı	49
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	49

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları.....	49
3.10. Etik Kurul Onayı	49
4. BULGULAR	50
4.1. Histolojik Bulgular	50
4.2. Biyokimyasal Bulgular	55
4.2.1. Serum Kreatinin ve BUN Düzeyleri	55
4.2.2. Doku Homojenatında Protein Düzeyleri.....	56
4.2.3. Böbrek Doku Homojenatında MDA Düzeyleri	57
4.2.4. Böbrek Doku Homojenatında SOD Düzeyleri	59
4.2.5. MMP-2, MMP-9 mRNA Ekspresyonları.....	60
4.2.6. MMP-2 ve MMP-9 Aktivite Düzeylerinin Belirlenmesi	63
4.2.7 Western Blot ile p38 Protein Düzeyleri	65
5.TARTIŞMA	66
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	71
7.KAYNAKLAR.....	72
8. EKLER	79
EK-1 Etik Kurul Onay.....	79
Ek-2 Özgeçmiş	80

TABLO DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. MMP'lerin sınıflandırılması (5,19)	9
Tablo 2. Rutin doku takibi.....	29
Tablo 3. Hematoksilen-Eozin boyama protokolü	30
Tablo 4. Masson-Trikrom boyama protokolü	32
Tablo 5. Periyodik Asit Schiff (PAS) boyama protokolü	34
Tablo 6. Homojenizasyon tampon içerikleri	36
Tablo 7. cDNA sentez karışımı ve prosedürü	42
Tablo 8. Real-Time PCR için kullanılan primer dizaynları	42
Tablo 9. qPCR karışımı	43
Tablo 10. SDS-PAGE yönteminde ayırıcı jelin (%10) hazırlanması	45
Tablo 11. SDS-PAGE yönteminde paketleyici jelin (%4) hazırlanması	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. MMP'lerin domain yapılarına göre sınıflandırılması	8
Şekil 2. MMP'lerin regülasyonları	11
Şekil 3. MAPK sinyal yolağının sistematik görüntüsü	12
Şekil 4. p38 MAPKinaz sinyal ileti yolağı.....	13
Şekil 5. MMP'lerin aktivasyon kaskadı.....	14
Şekil 6. MMP'lerin TIMP'ler tarafından inhibe edilmesi	15
Şekil 7. MMP'lerin nefron boyunca sentezlenme profilleri	16
Şekil 8.Hücre zedelenmesinde sitoplazmik kalsiyum artışının sebepleri ve sonuçları	17
Şekil 9. Malondialdehit oluşum mekanizması	18
Şekil 10. SOD reaksiyonu	19
Şekil 11. I/R hasarından böbrek yetmezliğine giden mekanizma	20
Şekil 12. Renal I/R hasarı ve MMP'lerin rolü	21
Şekil 13. Taurinin kimyasal yapısı	22
Şekil 14. Taurin sentezi	23
Şekil 15. Böbreklerde taurin transport sistemi	24
Şekil 16. Deney Akış Çizelgesi.....	26
Şekil 17. Böbrek I/R hasarı	28
Şekil 18. SOD kiti çalışma prensibi	39
Şekil 19. RNA jel görüntüsü.....	41
Şekil 20. H-E boyama ile böbrek dokularının incelenmesi	51
Şekil 21. Masson Trikrom boyama ile böbrek dokularının incelenmesi.....	52
Şekil 22. PAS boyama ile böbrek dokularının incelenmesi	53
Şekil 23. Histolojik skorlamaların değerlendirilmesi.....	54
Şekil 24. Serumda kreatinin düzeyi.....	55
Şekil 25. Serum BUN düzeyi	56
Şekil 26. Temsili BCA standart grafiği	56
Şekil 27. MDA standart grafiği	57
Şekil 28. Temsili MDA kromatogram.....	57
Şekil 29. Böbrek dokularında gruplar arası MDA düzeyleri.....	58
Şekil 30. SOD standart grafiği	59
Şekil 31. Böbrek dokularında SOD düzeyleri	60

Şekil 32. β -aktin primeri ile yapılan q-PCR sonucunda elde edilen amplikasyon grafiği	61
Şekil 33. β -aktin primeri ile yapılan q-PCR sonucunda elde edilen erime grafiği.....	61
Şekil 34. Böbrek dokularında gruplar arası MMP-2 ve MMP-9 mRNA ekspresyon düzeyleri	62
Şekil 35. MMP-2 aktivite standart grafiği.....	63
Şekil 36. MMP-9 aktivite standart grafiği.....	63
Şekil 37. MMP-2 aktivite düzeyi	64
Şekil 38. MMP-9 aktivite düzeyi	64
Şekil 39. p-p38 ve total p38 protein ekspresyonları için temsili western blot görüntüsü	65
Şekil 40. p-p38 ve total p38 için kat değişiminin dansitometrik analiz ile belirlenmesi	65

KISALTMALAR

APMA: p-Amino Fenilmerkürük Asetat
AP-1: Aktivatör Protein
APS: Amonyum Persülfat
ATN: Akut Tübüler Nekroz
ATP: Adenozintrifosfat
BCA: Biçinkonik Asit
BHT: Butilen Hidroksi Toluen
BSA: Bovin Sığır Albumini
BUN: Kan Üre Azotu
ESM: Ekstrasellüler Matris
EGF: Epidermal Büyüme Faktörü
ERK: Ekstrasellüler Sinyal Düzenleyici Kinaz
GFH: Glomerüler Filtrasyon Hızı
H₂CO₃: Karbonik Asit
H₂O₂: Peroksit
HOCl: Hipokloröz Asit
HPLC: Yüksek Performanslı Likit Kromatografi
I/R: İskemi/Reperfüzyon
IL-1: İnterlökin 1
JNK: c-Jun N-Terminal Kinaz
RNA: Ribonükleik Asit
MAPK: Mitojen ile Aktiflenen Protein Kinaz
MDA: Malondialdehit
MMP: Matriks Metalloproteinaz
NP-40: Nonidet P-40
PDGF: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PGE₂: Prostaglandin-E₂
PMNL: Polimorf Nüveli Lökositler
PVDF: Polivinilidendiflorid
PBS : Fosfat Tamponu
ROT : Reaktif Oksijen Türleri
RT-PCR: Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SDS-PAGE : Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

SOD: Süperoksit Dismutaz

TAE: Tris-Asetat EDTA

TBA: Tiyobarbitürik Asit

TEMED : Tetrametiletilendiamin

TGF- β : Transforme Edici Büyüme Faktörü

TIMP: Matriks Metalloproteinazların Doku İnhibitör Proteinleri

TNF: Tümör Nekrozis Faktör

TEŞEKKÜR

Tanıştığımız ilk günden bu yana sadece eğitime değil kişisel gelişime de katkı sağlayarak sabırla ve güler yüzüyle ışığını yolumdan eksik etmeyen danışmanım Yard. Doç. Dr. Zahide Çavdar'a

Desteğini her zaman hissettiğim Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Gül Güner Akdoğan'a ve tüm Moleküler Tıp AD ailesine

Tez savunma jüri üyelerim, Prof. Dr. Bekir Ergür' e, Prof. Dr. Nur Arslan' a, Doç. Dr. Seda Özbal' a ve tüm proje ekibimdeki hocalarıma

Bana laboratuvarlarını açıp, bilgilerini benimle paylaşarak gelişime yadsınamaz katkı sağlayan Prof. Dr. Alaattin Şen'e, Doç. Dr. Şevki Arslan'a, kısa bir sürede çalışma hayatım için idol yaptığım Gülsüm Terzioğlu'na

Yüksek lisans eğitimim başladığından beri yanımda olan yol gösteren, kimi zaman arkadaşım kimi zaman öğretmenim, yan masam Duygu Harmancı'ya, sadece bana tezimde değil başım her sıkıştığında yardıma koşan bana abi olan Dr. Memduh Bülbül'e ve diğer ARLAB çalışanlarına; Dokuz Eylül Tayfama, Ege Üniversitesindeki Muhteşem Yediliye

Bu yaşıma kadar benim kararlarımın hep arkasında olan, ellerinden ne geliyorsa yapan , beni koşulsuz seven; ailenin, sevginin, saygının ne olduğunu öğreten annem Nebile Türksü Ural'a ve babam Cafer Ural'a; sakın tavrıyla beni dengeleyen, canımdan can olan, sırtımı yaslayacağım sağlam bir dayanağın varlığını bilerek hissettiğim huzuruma sebep kardeşim Ali Emre Ural'a

Bu araştırmaya destek sağlayan Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimine teşekkür ederim.

Cemre URAL

RENAL İSKEMİ/REPERFÜZYON MODELİNDE TAURİNİN EKSTRASELLÜLER MATRİKS BÜTÜNLÜĞÜ ÜZERİNE OLASI KORUYUCU ETKİSİNİN VE İLİŞKİLİ SİNYAL YOLAKLARININ TANIMLANMASI

Cemre Ural, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, 35340, İnciraltı, İzmir

ÖZET

Bir organa gelen kan akımının bir pıhtı veya mekanik bir etkenle (özellikle vasküler cerrahi işlemler ve organ transplantasyonu sırasında) yetersiz hale gelmesine veya durmasına iskemi denir. Reperfüzyon ise dokunun kanlanmasının yeniden başlamasıdır. Böbrekte iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarı süreçte oluşan serbest oksijen radikallerinden dolayı, vasküler ve doku hasarını oluşturur. Bu hasarın şiddeti iskemi süresi ile ilişkili olarak artmakta ve belirgin doku hasarı olmaksızın gelişen prerenal azotemiden, tübüler veya kortikal nekroza bağlı ciddi akut böbrek yetmezliğine kadar değişen klinik tablolar göstermektedir. Bu çalışmadaki amaç taurinin sıçanlarda renal iskemi/reperfüzyon hasarına karşı olası koruyucu etkilerinin, ekstrasellüler matriks regülasyonunda rol oynayan matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2) ve MMP-9 ve ilişkili sinyal ileti yolağı üzerine olan etkisinin araştırılmasıdır. 19 adet Wistar albino sıçan Sham (n=5), I/R hasarı olan (saline i.p) (n=7) ve I/R hasarı + taurin (200mg/kg i.p) (n=7) uygulanan olmak üzere 3 çalışma grubuna ayrıldı. I/R grubunda yer alan sıçanların sol böbrekleri 1 saat iskemi ve 6 saat reperfüzyona maruz bırakıldı. Taurin I/R uygulamasından 45 dakika önce i.p yol ile verildi. Tübüler hasar ve yapısal değişiklikler ışık mikroskopi ile değerlendirildi. Serum kreatinin ve BUN ölçümü sırasıyla Jaffe ve üreaz yöntemleri kullanılarak Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarında ölçüldü. MDA düzeyi yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile, SOD düzeyi ise kolorimetrik enzim aktivite kiti ile değerlendirildi. MMP-2 ve -9 için mRNA ekspresyon düzeyleri gerçek zamanlı PCR ile, aktiviteleri ise florometrik kit ile değerlendirildi. Total p38 ve p-p38 protein düzeyi western blot yöntemi ile saptandı. Sham grubu ile karşılaştırıldığında; I/R grubunda, böbrek tübüler dilatasyon ve fırçamsı kenar kaybı gibi karakteristik morfolojik değişikliklerde (p=0,004) ve

renal disfonksiyon belirteçleri olan BUN ve kreatinin düzeylerinde artış ($p=0.000$, $p=0.000$, sırasıyla) saptandı. I/R süresince artan MDA düzeyleri, taurin ile anlamlı olarak azaldı ($p=0.023$, $p=0.0147$; sırasıyla). I/R süresince azalan SOD düzeyleri ise taurin ile anlamlı olarak arttı ($p=0.04$, $p=0.049$; sırasıyla). Real-time PCR bulguları incelendiğinde ise I/R grubunda MMP-2 ve MMP-9 mRNA ekspresyonlarındaki artış taurin ile anlamlı olarak azaldı ($p=0.05$, $p=0.00$; $p=0.04$, $p=0.03$; sırasıyla). MMP-9 aktivitesinin sham grubuna göre, I/R de anlamlı olarak arttığı ($p=0.01$), bu artışın taurin ile azaldığı belirlendi ($p=0.04$). I/R süresince artan MMP-2 aktivitesini ($p=0.01$) taurinin anlamlı olarak azaltmadığı tespit edildi. Fosforile p38 (p-p38) protein ekspresyonunun ise, hasarlı grupta artarken, taurin uygulanan grupta anlamlı olarak azaldığı belirlendi. Sonuç olarak, taurinin renal I/R süresince oluşan oksidatif strese eşlik eden artmış MMP-2 ve MMP-9 mRNA ve enzim aktivite düzeylerini ve buna paralel olarak artmış p-p38 protein ekspresyon düzeylerini module ettiği gösterilmiştir.

Anahtar sözcükler: Taurin, Renal İskemi/Reperfüzyon, MMP-2, MMP-9, Oksidatif stres

THE INVESTIGATION OF POSSIBLE PROTECTIVE EFFECT OF TAURINE ON EXTRACELLULAR MATRIX AND RELATED SIGNALING PATHWAY IN RENAL ISCHEMIA/REPERFUSION MODEL

Cemre Ural, Dokuz Eylül University, Graduate School of Health Sciences, Department of
Molecular Medicine, 35340, Inciraltı, İzmir

ABSTRACT

Ischemia is defined as insufficient blood flow to an organ due to a blood clot or a mechanical cause (especially during vascular surgery or organ transplantation). Reperfusion, on the other hand, is the restoration of blood flow to a tissue or an organ. Renal ischemia/reperfusion injury results from the formation of free oxygen radicals during this process. The severity of this injury increases with increasing duration of ischemia, and can present itself with various clinical conditions including prerenal azotemia (with minute tissue injury), or severe renal failure due to tubular or cortical necrosis. The aim of this study was to investigate the potential protective effect of taurine against renal ischemia/reperfusion injury in rats, and its inhibitory effect on matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9, which play a role in the regulation of extracellular matrix. Nineteen Wistar albino rats were divided into three experimental groups as follows: Sham (n=5), I/R (saline, intraperitoneally) (n=7) and I/R + taurine (200mg/kg intraperitoneally) (n=7). Left kidneys of rats in the I/R group were exposed to 1 hour of ischemia, followed by 6 hours of reperfusion. Taurine was administered intraperitoneally 45 minutes before I/R. Light microscopy was used to evaluate tubular injury and structural changes. Serum creatinine and BUN were measured using colorimetric technique, jaffe and urease method, respectively at Central Laboratory, Dokuz Eylül University. High-performance liquid chromatography (HPLC) was used to analyze MDA levels. A colorimetric enzyme activity kit was used to analyze superoxide dismutase (SOD) levels. Real-time polymerase chain reaction (PCR) was used to analyze MMP-2 and MMP-9 mRNA expression levels. A fluorimetric kit was used to determine MMP-2 and MMP-9 enzyme activities. Total p38 and phospho-p38 (p-p38) levels were analyzed with Western blotting. I/R group had characteristic morphological changes including renal tubular dilation

and loss of brush borders ($p=0.004$), compared to the sham group. Moreover, creatinine and BUN levels were elevated significantly in the I/R group, compared to the sham group ($p=0.000$ and $p=0.000$, respectively). MDA levels were higher in the I/R group, but decreased significantly after taurine treatment ($p=0.023$, and $p=0.0147$, respectively). SOD levels were lower in the I/R group compared to the sham group, but increased significantly after taurine treatment ($p=0.04$, and $p=0.049$, respectively). Real-time PCR analysis showed statistically significant higher MMP-2 and MMP-9 mRNA expression in the I/R group compared to the sham group; however, taurine treatment caused significantly decrease in MMP-2 and MMP-9 mRNA expression levels ($p=0.04$, $p=0.00$; and $p=0.04$, $p=0.03$, respectively). MMP-9 activity was significantly higher in the I/R group ($p=0.01$), and decreased significantly after taurine treatment ($p=0.04$). However, taurine had no significant effect on increased MMP-2 activity in I/R group. Phosphorylated p38 (p-p38) protein levels were significantly higher in the I/R group, whereas taurine treatment caused a significant decrease. In conclusion, taurine modulated increased both mRNA expression and enzyme activities of MMP-2 and MMP-9, and also p-p38 protein expression that accompany increased oxidative stress during renal I/R.

Key Words: Taurine, Renal ischemia/reperfusion, MMP-2, MMP-9, oxidative stress

1. GİRİŞ VE AMAC

Bir organa gelen kan akımının bir pıhtı veya mekanik bir etkenle (özellikle vasküler cerrahi işlemler ve organ transplantasyonu sırasında) yetersiz hale gelmesine veya durmasına iskemi denir. Reperfüzyon ise dokunun kanlanmasıyla yeniden başlamasıdır. İskemik bir dokuda kan akımının yeniden başlaması durumunda serbest oksijen türleri dokuda yıkımı artırıcı etki yapar. Reperfüzyon hasarı başlangıçtaki iskemik süreç ile oluşan vasküler hasarı ve doku hasarını arttırmaktadır (1, 2). Bu hasarın şiddeti iskemi süresi ile ilişkili olarak artmakta ve belirgin doku hasarı olmaksızın gelişen prerenal azotemiden, tübüler veya kortikal nekroza bağlı ciddi akut böbrek yetmezliğine kadar değişen klinik tablolar gelişmektedir (3).

İskemi/reperfüzyonda ROT üretimi reperfüzyondan hemen sonra başlar (1). Serbest oksijen radikalleri, hücre membranlarında lipid peroksidasyonuna neden olarak direkt hücresel membran hasarına yol açarlar (4).

Matriks metalloproteinazlar (MMP), çinko metalloproteaz ailesinin “matriksin” olarak tanımlanan alt grubunda yer alan ve hücre dışı matrisin degradasyonundan sorumlu enzim ailesidir. MMP’ler içerdikleri yapısal organizasyonlarına ve substrat spesifitelerine göre Kollajenazlar, Jelatinazlar, Stromelizinler, Matrilizinler, Membran tip MMP’ ler ve diğer MMP’ler olmak üzere 6 ayrı alt grupta sınıflandırılmaktadırlar (5). Jelatinaz grubu içinde yer alan MMP-2 ve MMP-9 diğer MMP’lerden yapısal olarak farklı katalitik bölge içinde 3 adet fibronektin tip II benzeri tekrar içeren ilave bir bölge bulundurlar. MMP’lerin yapısal gen ekspresyonu normal koşullarda düşük olarak bildirilmektedir. Bununla birlikte ECM’nin yeniden modellenmesini gerektiren fizyolojik veya patolojik koşullarda ekspresyonları indüklenmektedir (6,7).

In vitro ve *in vivo* I/R modelleri ile yapılan çalışmalarda MMP ekspresyonunda artış meydana geldiği birçok çalışmada bildirilmektedir (8-10). Öte yandan I/R sürecinde, özellikle reperfüzyon sonrası oluşan artmış reaktif oksijen türlerinin (ROT), MMP-2 ve MMP-9’u indüklediği ve beraberinde bazal membran degradasyonu ile vasküler hasara yol açtığı *in vivo* ve *in vitro* iskemi-reperfüzyon modellerinde gösterilmiştir (11, 12). Böbrek İ-R modellerinde de MMP-2 ve MMP-9’un arttığı (13-15) bildirilmiş ve I/R koşullarında artan

MMP-2 ve MMP-9'un apoptoz ve nekrozun eşlik ettiği akut tübüler hasar ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (16).

Taurin tüm memeli dokularda serbest olarak bulunan sülfür içeren bir aminoasittir. Vitamin B6 varlığında metionin ve sisteinden sentez edilmesine rağmen en çok diyetle alınır. Hayvan modelleri ile yapılan çalışmalar sonucunda taurinin başlıca biyokimyasal ve fizyolojik fonksiyonları arasında, safra asitlerinin konjugasyonu, kolesterol atılımı, kan basıncının düzenlenmesi, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, hücre membranının stabilizasyonu ve hücre içi kalsiyum seviyelerinin modülasyonu vardır. Oksidan bir bileşik olan HOCl, taurini N-klorotaurine dönüştürerek hücre içinde oksidatif hasar oluşmasını engellemektedir (17,18).

Farklı organ üzerinde denenen ve olumlu sonuçları gözlenen antioksidan özelliğe sahip taurinin, renal iskemi ve reperfüzyon (İ/R) hasarında matriks metalloproteinazlar üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle bu çalışmada taurinin böbrek İ/R sırasında oksidatif stres ile uyarılan MMP-2 ve MMP-9 üzerine etki gösterip göstermediği ve eğer olası koruyucu bir etki varsa taurinin bu etkiyi hangi sinyal ileti yolu aracılığı ile gerçekleştirdiği araştırılacaktır. Bu çalışmada taurinin renal İ/R hasarında MMP-2 ve MMP-9 üzerinde olası azaltıcı etkisi araştırılacak ve meydana gelen bu değişikliklerin MMP'lerin regülasyonunda rol oynayan MAPK sinyal ileti yolları içinde yer alan p38 ile ilişkisi araştırılacaktır. Bu amaçlar doğrultusunda taurinin olası etkisinin değerlendirilmesinde histolojik ve biyokimyasal parametreler kullanılacaktır. Bu araştırmanın hipotezi ise, 'Taurin antioksidan etkisi ile renal iskemi/reperfüzyon sırasında meydana gelen oksidatif stres ile indüklenen MMP-2 ve MMP-9'un mRNA ve aktivite düzeylerini p38 sinyal ileti yolağını baskılayarak azaltır' şeklinde kurgulandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 HÜCRE DIŞI MATRİS

Hücre dışı matris, diğer adıyla ekstraselüler matrix (ESM), hücrelerarası boşluklarda özel bir ortam oluşturan dinamik bir yapıdır. Dokulardaki hücrelerin bir arada durmasına yardımcı olur, hücre büyümesi ve farklılaşmasını kontrol eden pek çok hormonu bulundurur. ESM yapısında proteoglikanlar, kollajen fibrilleri ve multiadhezif matriks glikoproteinleri olmak üzere üç temel protein bulunur. Üreme ve ölüm gibi kritik hücreyel olayları etkileyen sinyaller gönderen dinamik, aktif bir ortamdır. Hücre-matriks etkileşimleri ESM bileşenlerinin hidrolizinden sorumlu olan proteolitik enzimler tarafından düzenlenir. Bu enzimler ESM yapısının bileşimini ve bütünlüğünü düzenleyerek matriks molekülleri tarafından oluşturulan sinyallerin kontrolü, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve ölümünde de temel rol oynar. Bu enzim sistemlerinin içinde matriks metalloproteinazlar (MMP) önemli bir grubu oluşturmaktadır (6).

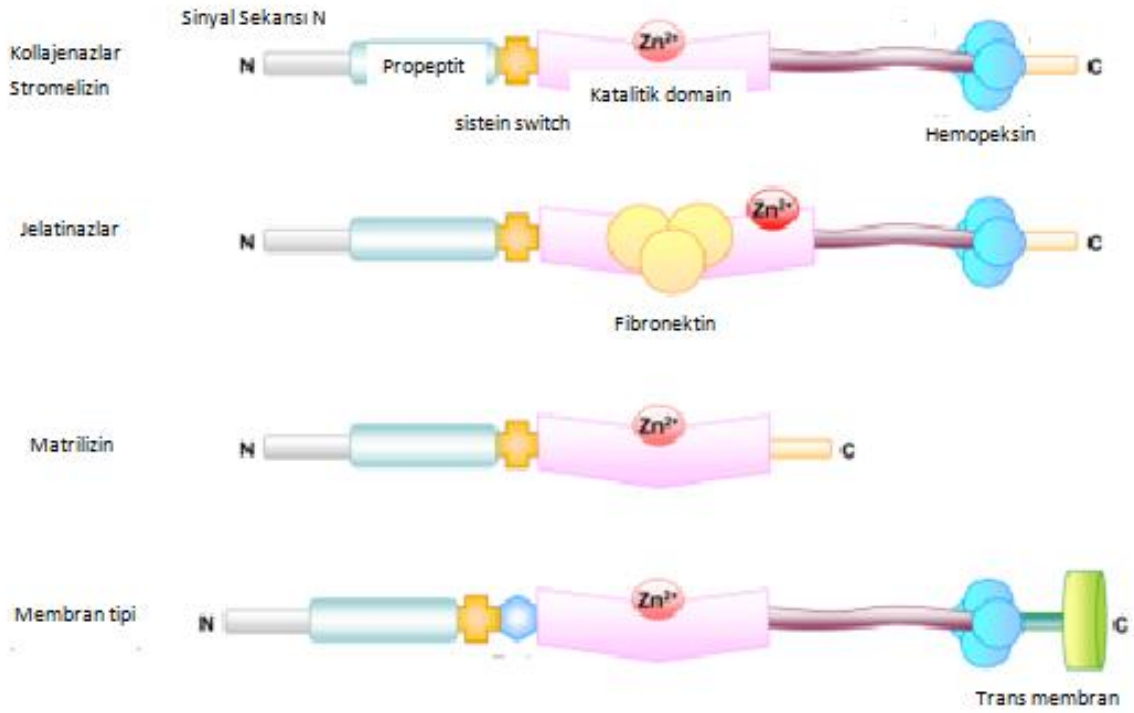
2.2. MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR

MMP'ler ESM bileşenlerini yıkıma uğratan çinko bağımlı endopeptidaz ailesidir. Hücre büyümesi, embriyonik gelişme gibi biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde hemde tümör oluşumunu ve organ fibrogenezinde önemli rol oynamaktadır. Bu enzim ailesinin bilinen 28 üyesi bulunmaktadır. MMP'ler içerdikleri yapısal organizasyonlarına ve substrat spesifitelerine göre Kollajenazlar, Jelatinazlar, Stromelisinler, Matrilizinler, Membran tip MMP, diğer MMP'ler olmak üzere 6 ayrı gruba ayrılırlar.

MMP'ler bazı ortak yapısal özelliklere sahiptirler. MMP'lar predomain, prodomain, katalitik domain, menteşe bölgesi, hemopeksin/vitronektin benzeri domain bölümlerini içerirler (Şekil 1). Predomain, ilk bölge olarak tanımlanan, molekülü sekresyon için hedefleyen, ancak daha sonra uzaklaştırılan ve latent enzimde bulunmayan sinyal peptid dizesidir. 80-90 aminoasit içeren aminoterminal propeptiddir. Prodomain, enzim aktifleştğinde bu bölge yapıdan kopar. Prodomain yapısında bulunan sistein rezidülerinin enzimin latent formunun korunmasında rol oynadığını düşünülmektedir. Katalitik bölge, histidin rezidüleri içeren,

fonksiyonel stabilitenin korunması için gerekli olan çinko iyonunu içeren bölgedir. Prolinden zengin bölge: Katalitik bölge ve son bölge arasında yer alır(6).

Hemopeksin benzeri bölge: Son kısımda hem bağlayan moleküllere dizin benzerliği nedeniyle, hemopeksin olarak adlandırılan bölge yer alır. Bu bölge N ve C terminal kısımları bağlayan disülfid bağı içerir ve katalitik bölgeye 5-10 aminoasitlik prolinden zengin bir bölge ile bağlanır. Bu bölgenin fonksiyonu bilinmemekle birlikte substrat spesifitesini sağlama ya da plazminojen aktivatör ürokinaz sistemine analog olma özelliği ile, hücre yüzey reseptör alanını tanıma fonksiyonu gösterdiği ileri sürülmektedir. Substrata bağlanma ve TIMPs ile etkileşime girmede fonksiyonel rolü vardır (5). Substrat spesifitelerine yapılan sınıflandırma Tablo 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. MMP'lerin domain yapılarına göre sınıflandırılması (19)

Tablo 1. MMP'lerin sınıflandırılması (5,19)

MMP	EC No	Sınıf	ESM yapısında bulunan Substrat	ESM yapısında bulunmayan substratlar
MMP-1	3.4.21.32	Kollajenaz	Kolajen I,II, III, V, VII, VII, IX kasein, proteoglikan	IL-1 β , TNF- α , α 1-antripsin, α 1-proteaz inhibitörü
MMP-2	3.4.24.24	Gelatinaz	Kolajen I,IV, V, VII, Jelatin Fibronektin, Elastin	Aktif MMP-9,-13, Plazminojen, IL-1 β , TNF- α , TGF- β
MMP-3	3.4.24.17	Stromelizin	Elastin, Jelatin, Agrekan, Proglukan, Kasein	E-kadherin, fibrinojen, pro-IL-1b, pro-MMP-1, pro- MMP-8, pro-MMP-9, pro- TNFa,
MMP-7	3.4.24.23	Matrilizin	Kolajen IV, jelatin, Glikoprotein	E-kadherin, plazminojen, pro-MMP-2, pro-MMP-7, pro-MMP-8, pro-TNFa, transferrin
MMP-8	3.4.24.34	Kollajenaz	Kolajen I, II, III, IV, PMNL, Agregan, laminin	Pro-MMP8, α 2-anti plazmin
MMP-9	3.4.24.35	Gelatinaz	Jelatin, laminin, kolajen IV, Fibronektin	IL-1 β , pro-TNF- α , TGF- β , Plazminojen
MMP-10	3.4.24.22	Stromelizin	Kolajen I, II, III, IV, Fibronektin, laminin	Pro-MMP-1, pro-MMP-8, pro-MMP-10
MMP-11	3.4.24	Stromelizin	Laminin, Elastin	α 1-antitripsin, α 1-proteinaz inhibitörü,
MMP-12	3.4.24.65	Makrofaj Metalloelastaz	Elastin	Plazminojen
MMP-13	3.4.24.	Kollajenaz	Kolajen I,II,III, IV,V, IX, X, XI, jelatin, laminin	Pro-MMP-9, -13, Plazminojen Aktivatörü
MMP-14	3.4.24.80	MT1	Kolajen I, II, III, jelatin, laminin, agrekan	CD44, pro-MMP-2, pro-MMP-13, pro-TNFa, doku transglutaminaz
MMP-15	3.4.24	MT2	Kolajen I, II, III, jelatin	ro-MMP-2, pro-MMP-13, doku transglutaminaz

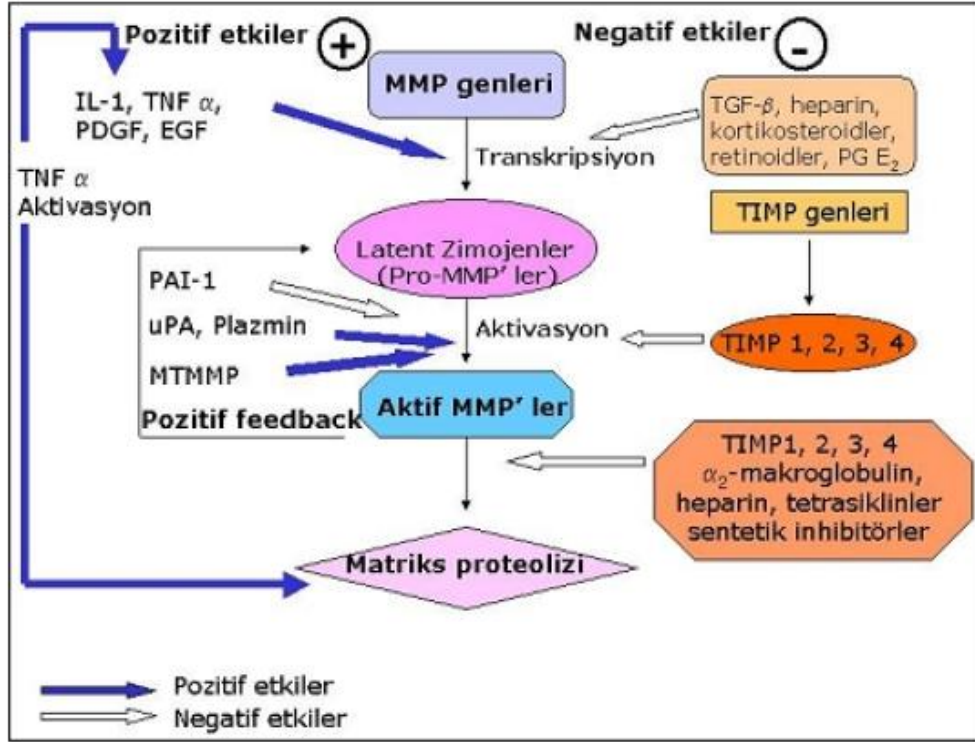
MMP-16	-	MT3	Kolajen I, II, laminin,	Pro-MMP-2, pro-MMP-13
MMP-17	-	MT4	Fibronektin, Fibrin, jelatin	
MMP-18	-	Kollajenaz	-	
MMP-19	-	RASI	Kolajen I	
MMP-20	3.4.24.	Enamelizin	Agrekan, Amelogenin	
MMP-23	-	CA-MMP	-	
MMP-24	-	MT5	Kolajen 1, Fibronektin	Pro-MMP2, pro-MMP-13
MMP-25	-	MT6	Fibrin, Fibronektin	pro-MMP-2
MMP-26	3.4.24	Enamelizin	Kolajen IV, Fibronektin, Fibrinojen	Fibrin, fibronectin pro-MMP-2 b1-proteinase inhibitor
MMP-27	-	-	-	
MMP-28	-	Epilizin	-	

2.2.1 Jelatinazlar

Jelatinaz enzimleri, diğer MMP'lerden farklı olarak katalitik bölgede 3 tane fibronektin tip II benzeri ilave bir domain bulundurulur. (Şekil 1). Bu kısım jelatin ve kollajene yüksek afinite ile bağlanmayı sağlayarak proteolitik aktiviteyi artırır, ayrıca elastolitik aktivite için de temeldir. Jelatinazlar, Tip IV, V, VII, X, XI ve XIV kollajen, jelatin, elastin, proteoglikan kor proteinleri, myelin temel protein, fibronektin, fibrillin-1 gibi proteinleri yıkma özelliğine sahiptirler . Diğer MMP'lar gibi inaktif proformlar olarak salınırlar ve ekstrasellüler olarak aktive edilirler (5,19).

2.2.2 Regülasyonları

MMP'lerin çoğunun ekspresyonu normal yetişkin dokularında düşük düzeyde bulunur. Bazı fizyolojik ve patolojik yeniden yapılanma süreçlerinde ekspresyonları artar. MMP aktivitesi, transkripsiyonel regülasyon, aktivite regülasyonu ve spesifik inhibitörler ile inhibisyonu olmak üzere üç basamakta düzenlenir (20). Şekil 2 de özetlenmiştir.

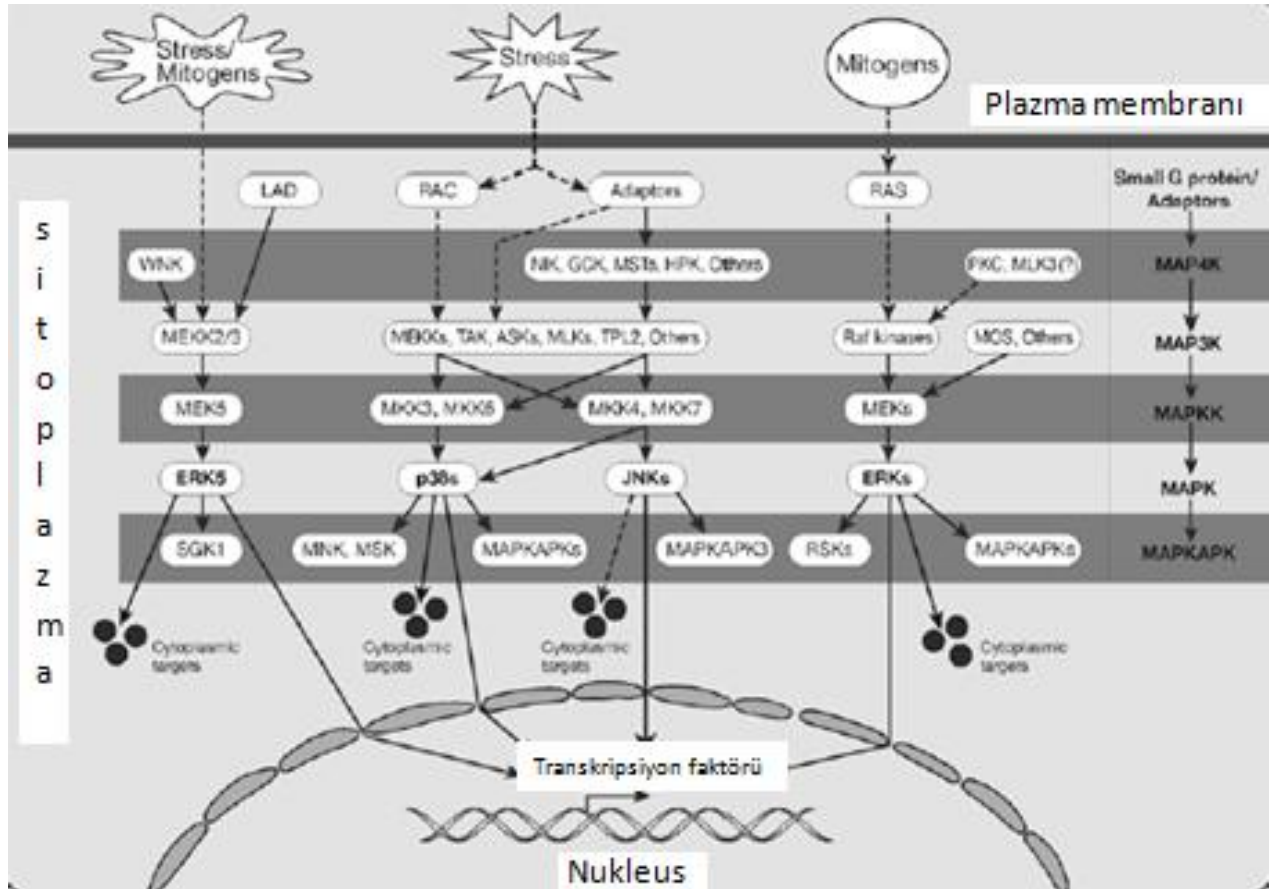


Şekil 2. MMP'lerin regülasyonları

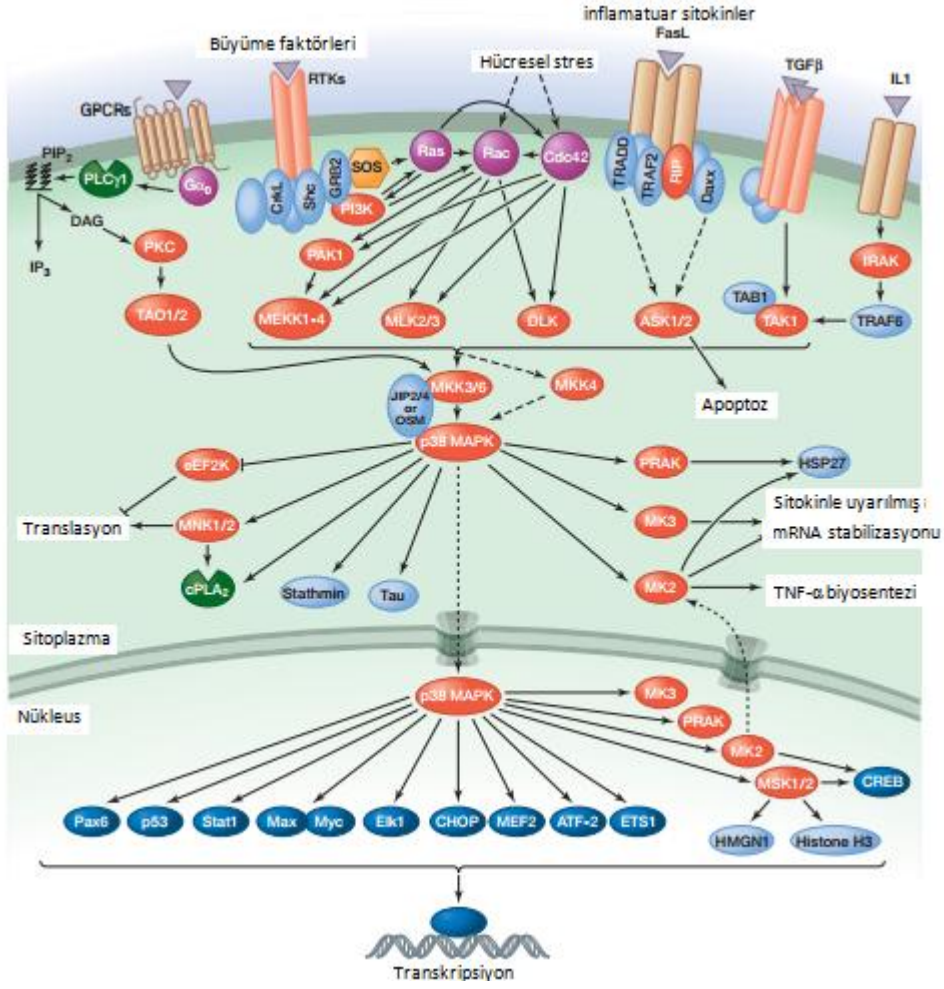
2.2.2.1 Transkripsiyonel Düzenleme

MMP'lerin ekspresyonunu düzenleyen sinyal ileti yollarından p38 kinaz, c-Jun N-terminal Kinaz (JNK) ve ERK yolağı (extracellular signal-regulated kinase) olmak üzere üç MAP-kinaz (mitogen-activated protein kinase) yolağından oluşmaktadır (Şekil 3). p38 ve JNK yolağı inflamatuvar sitokinler, ozmotik stres ve apaoptotik sinyallere yanıt olarak aktive olurken, ERK yolağı sitokinler, büyüme faktörleri ve forbol esterlere yanıt olarak aktive olur. Çalışmamızda odaklandığımız, p38 MAPK ailesinin 4 üyesi vardır. En çok bulunan p38 α hücrenin çoğalmasına ve uyarıcılara karşı tepki olarak büyümesine yardımcı olur. Proliferasyon ve farklılaşma bozukluğu yaşayan hücrelerde p38 α eksikliği tespit edilmiştir. Reaktif oksijen türlerinin (ROT) sitokin ile indüklenen p38 aktivasyonunda kritik bir rol oynadığı rapor edilmiştir. Fizyolojik koşullarda p38, ROT sinyal aracısı olarak ve ya hücre

döngüsünü baskılayarak ya da aktive ederek işlev gösterebilir. Kısacası p38 MAPK oksidatif stres sensörü olarak çalışır. Aktif MAP-kinazlar nükleusa transloke olurlar ve MMP gen ekspresyonu ile ilgili transkripsiyon faktörlerinin aktive olmasını sağlarlar. İnsan MMP gen promotör sekans analizleri ile 'aktivatör protein-1' (AP-1) bağlanma bölgelerinin transkripsiyonel aktivasyonda önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir. AP-1 bağlanma bölgelerini tanıyan ve etkileşime giren transkripsiyon faktörleri jun ve Fos ailesi içinde yer almaktadır. Ayrıca AP-1 transkripsiyon faktörlerinin ETS transkripsiyon faktörlerinin de MMP ekspresyonunun düzenlenmesiyle ilişkilidir. Transkripsiyonel düzenlemede, MMP gen ekspresyonu tümör nekrozis faktör (TNF), interlekin-1 (IL-1) gibi inflamatuvar sitokinlerle, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi birçok büyüme faktörü ve hormonlar ile uyarılır. Transforme edici büyüme faktörü (TGF- β), heparin, kortikosteroidler, retinoidler, prostaglandin E2 (PGE2) ve diğer eikozanoidler ise MMP gen transkripsiyonunu inhibe ederler (21,22). Şekil 4'te ayrıntılı olarak p38 sinyal yolağını ve etkilediği transkripsiyon faktörleri gösterilmektedir.



Şekil 3. MAPK sinyal yolağının sistematik görüntüsü (21,23)

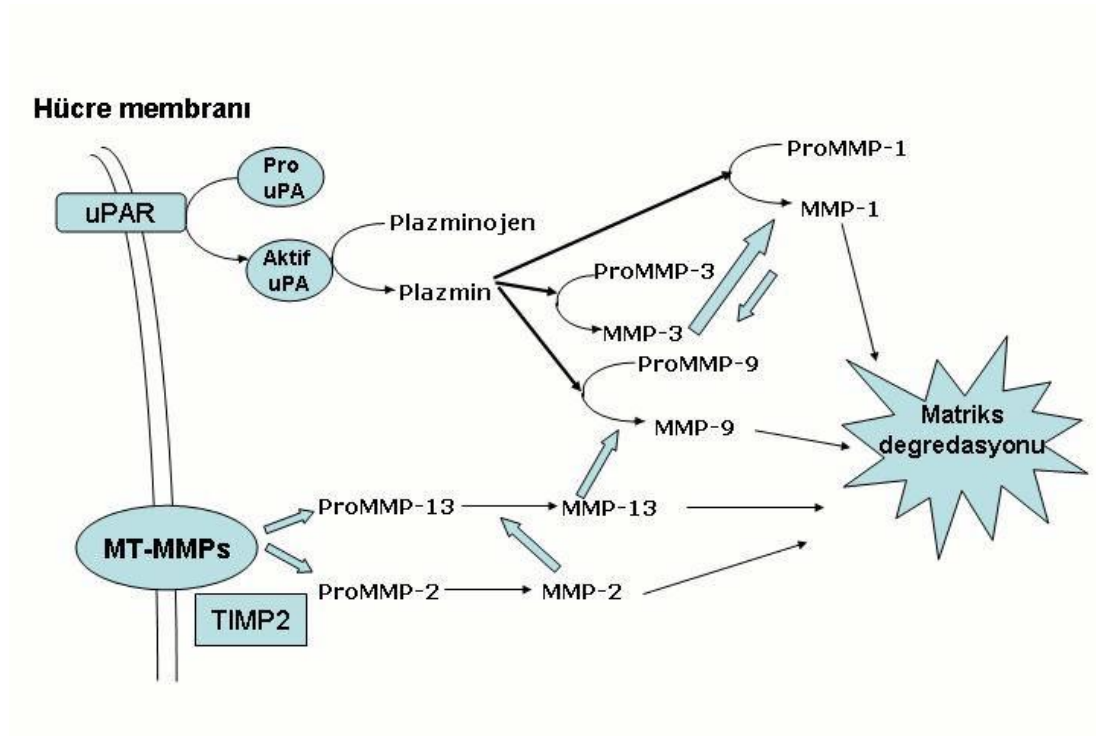


Şekil 4. p38 MAPKinaz sinyal ileti yolağı (24)

2.2.2.2. Aktivitesinin Regülasyonu

MMP'ler sentez edildikten sonra inaktif proenzim olarak salıverilirler. Enzimin pro-bölgesindeki sisteinin sülfidril grubu ile aktif bölgedeki Zn^{++} arasındaki etkileşim latentliğin sürdürülmesinden sorumludur. MMP'lerin temel fizyolojik aktivatörü plazmindir (21).

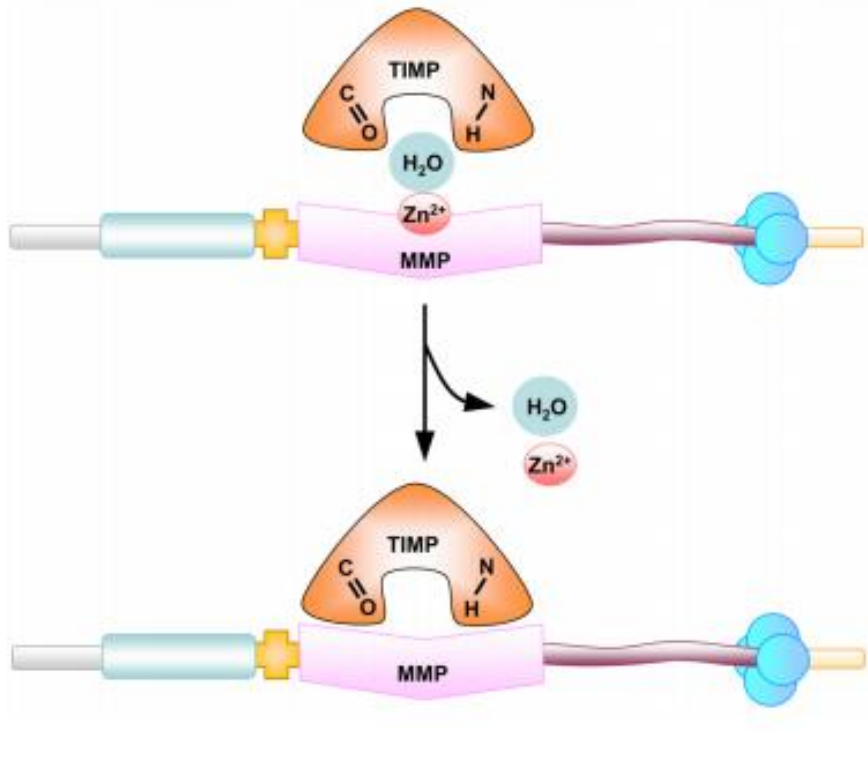
Latent formda bulunan MMP; organik civa bileşenleri, şelasyon yapıcı ajanlar ve proteazlar gibi bazı *in vitro* ajanlarla aktive edilir ve bu aktivasyon proteolitik sindirimle sınırlandırılır. Latent molekülün aktif enzim haline geçişi MMP aktivitesinin regüle olduğu bir sonraki aşama olan proteinaz kaskadı (Şekil 5) aktivasyonunu da içerir. Plazminojen aktivatörlerinin aktivasyonu ile plazminojen prekürsörlerinden üretilen plazmin MMP'nin endojen aktivatörüdür. Bu kaskat hücre membranında lokalize olmuştur (22).



Şekil 5. MMP'lerin aktivasyon kaskadı

2.2.2.3. Spesifik Doku İnhibitörleri

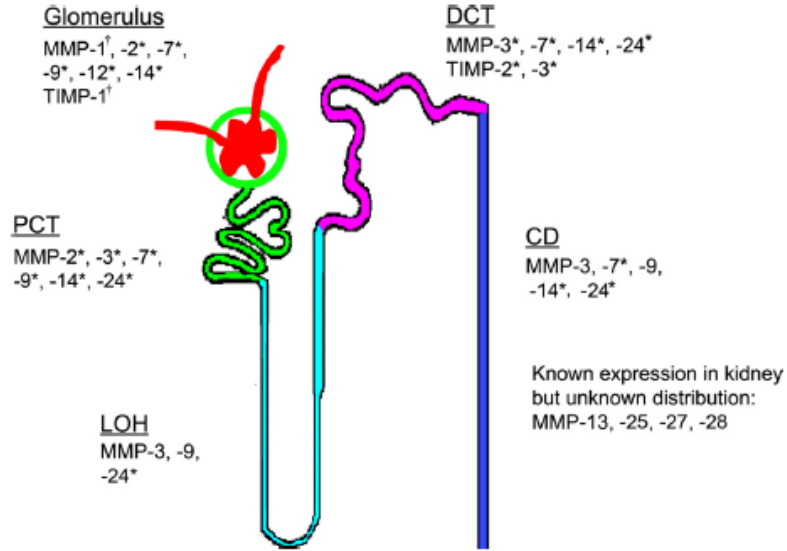
MMP aktivitesinin kontrolünde spesifik doku inhibitörleri olan TIMP'ler anahtar rol oynarlar. Bundan başka 2- makroglobulin, heparin, tetrasiklinler ve sentetik inhibitörler de aktif MMP inhibitörleri arasında yer alırlar. Yüksek molekül ağırlıkları nedeniyle TIMP'lerin dokulara girmesi zordur. TIMP'ler bağ dokusu metabolizmasının düzenlenmesinde temel proteinlerdendirler. MMP'lere irreversibl ve nonkovalent biçimde bağlanarak latent enzim formunun aktivasyonunu ve katalitik aktivitenin sürdürülmesini inhibe ederler (Şekil 6). Böylece TIMP'ler; MMP enzim aktivitesini ve MMP/TIMP dengesini sıkı kontrol altında tutarlar. İnsanlarda TIMP-1, 2, 3 ve 4 olmak üzere 4 adet TIMP türü tanımlanmıştır. Ayrıca değişik MMP türlerine göre de özgüllük gösterirler. Örneğin; TIMP-1, 184 amino asit içeren 28 kDa ağırlığında glikoproteindir ve tüm MMP'leri inhibe edebilir fakat MMP-9'a afinitesi daha fazladır. TIMP-2 ise MMP-2'ye spesifik inhibitör proteindir (25).



Şekil 6. MMP'lerin TIMP'ler tarafından inhibe edilmesi (19)

2.2.3 Böbrek ve Matriks Metalloproteinazlar

Böbrekteki MMP'lerin ekspresyonu karışık ve tam anlamıyla karakterize edilememiştir. Fakat böbrekte nefron oluşumunun düzenlenmesinde görevli olduğu bilinmektedir. Ayrıca proteolitik potansiyelinin dolaylı doku fibrozis sonucunu olan akut böbrek hastalıklarının gelişimi ve ilerlemesinin nedenleri arasında gösterilmiştir (20). MMP-2, -3, -9, -13 ve diğerlerinin eksprese olduğu normal böbreklerde gösterilmiştir (15). MMP'lerin nefron boyunca sentezlenme profilleri Şekil 7' de gösterilmiştir.



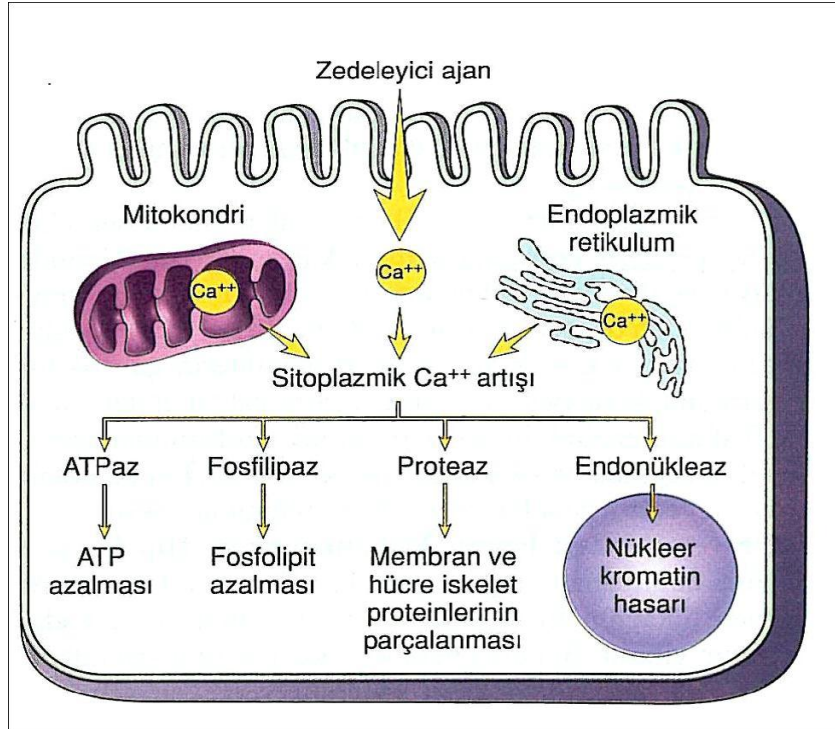
Şekil 7. MMP'lerin nefron boyunca sentezlenme profilleri (20). PCT: proksimal kıvrık tüp; LOH: henle kulbu; DCT: distal kıvrık tüp; CD: kanal

2.3 İSKEMİ/ REPERFÜZYON

İskemi, organ veya doku kan akımındaki yetersizliğe bağlı olarak gelişen geri dönüşümlü veya dönüşümsüz hücre ve doku hasarıdır (26). Bu olay, organı perfüze eden kan akımındaki azalmaya bağlı olarak gelişen hücre zedelenmesine yol açar. İskemik hasarın derecesi hipoksinin derinliğine ve şiddetine bağlıdır. İskemi, akut veya kronik olabilir (26,27). Geri dönüşümsüz hücre hasarını önleyebilmek için dokuya yeniden kan akımının sağlanması (reperfüzyon) gerekmektedir. İskemi sonrası kan akımının tekrar başlaması paradoksal olarak iskeminin oluşturduğu hasarı artırır ve iskemik dokularda iskeminin oluşturduğu hasardan daha fazla hasara yol açabilir (27). İskemi ve reperfüzyon periyotlarından oluşan bu zararlı etkilerin tümü İ/R hasarı olarak adlandırılır (28). Klinik olarak İ/R hasarı sıklıkla transplantasyon, iskemik serebrovasküler olay, miyokard enfarktisi, şok/resüsitasyon ve turnike uygulamaları sonrasında görülmektedir (39).

2.3.1 İskemi/Reperfüzyon Hasarı ile İlgili Moleküler Mekanizmalar

İskemi sırasında hücre membranında bulunan Na^+/K^+ pompasının çalışması için gerekli olan enerji sağlanamaz. K^+ iyonları hücre dışına çıkarken Na^+ ve Cl^- iyonları da hücre içine girerler. Bu iyonların hücre içine geçisi ile hücrelerde şişme meydana gelir. Anaerobik glikolizle enerji ATP üretilmeye çalışılırken, laktik asit ve karbondioksit birikir. Karbondioksitin birikimi karbonik asit (H_2CO_3) üretimi ile sonuçlanır, böylece asidoz artar. İki dakikalık iskemi sonrasında özellikle beyin hücrelerinde ekstrasellüler pH 7.3'ten 6.7'ye kadar düşebilmektedir (27). Adenozin trifosfat bağımlı çalışan diğer bir pompa ise ekstrasellüler ve intrasellüler Ca^{+2} u dengelemektedir. Hücre içerisindeki Ca^{+2} miktarındaki artış İ/R hasarında ilk olarak göze çarpan olaylardan biridir ve iskeminin süresi ile yakından ilişkilidir. Hücre içi Ca^{+2} 'un artması potansiyel zararlı etkilere sahip çok sayıda enzimin aktif hale gelmesine neden olur. İntrasellüler Ca^{+2} artışı ile fosfolipazlar ve proteolitik enzimler aktive olur. Fosfolipaz aktivasyonu ile membran fosfolipidleri bozulmaya başlar; plazma ve mitokondriyal membran biyoenerjetikleri ve geçirgenlikleri de değişir (30). Araşidonik asit fosfolipazların aktivasyonu sonucu oluşur. Araşidonik asit, direkt etkiyle mitokondriyal enzimleri inhibe ederek serbest radikal oluşumunu artırır (27). (Şekil 8).

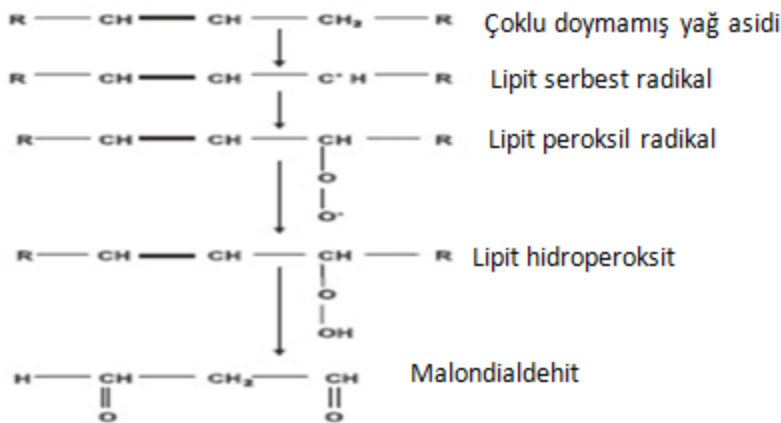


Şekil 8. Hücre zedelenmesinde sitoplazmik kalsiyum artışının sebepleri ve sonuçları (29)

İskemik periyod süresince dokuda üretilen toksik ROT ve O^{2-} radikalleri reperfüzyon sırasında endotelial hasar, artmış mikrovasküler permeabilite ve doku ödemeine sebep olmaktadır (31). Artan ROT'nin başlattığı lipid peroksidasyonu ve protein hasarı sonucu hücre fonksiyonları bozulur ve doku nekrozu ortaya çıkar (30).

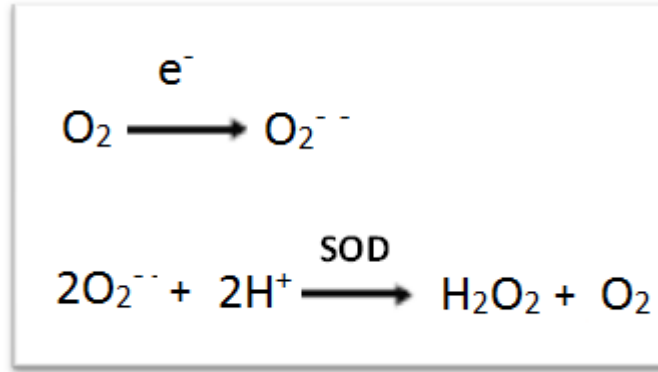
2.3.2. Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres

Reaktif oksijen türleri; normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali'dir. Bunlar, çeşitli serbest radikallerin oluşturduğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler. Biyolojik moleküllerin hepsi serbest radikaller tarafından etkilenirler, fakat lipidler serbest radikal hasarından en fazla etkilenen biyomoleküllerdir. Hücre membranındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca tepkimeye girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Çoklu doymamış yağ asitlerinin ve kolesterolün oksidatif hasarlanmasına lipid peroksidasyonu denilmektedir. Peroksidasyon basamakları Şekil 9'de gösterilmiştir. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür (32). Lipid peroksitleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehit (MDA) meydana gelir. Bu nedenle biyolojik materyalde MDA ölçülmesi lipid peroksit seviyelerinin belirlenmesinde kullanılır.



Şekil 9. Malondialdehit oluşum mekanizması

Serbest radikallerin organizmadaki oluşum hızıyla bunların antioksidan sistemler tarafından kaldırılma hızı bir denge içerisinde. Süperoksit dismutaz, oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunur, süperoksitin H_2O_2 dismutasyonunu katalizleyen bir metalloenzimdir. SOD süperoksit serbest radikalının hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü aşağıdaki (Şekil 10) reaksiyonla katalizleyen antioksidan enzimdir. Serbest radikallere karşı organizmada ilk savunma SOD enzimi ile gerçekleşir. SOD, O_2^- radikalini metabolize eder ve daha zararlı olan hidroksil radikalının oluşumunu engeller (33).



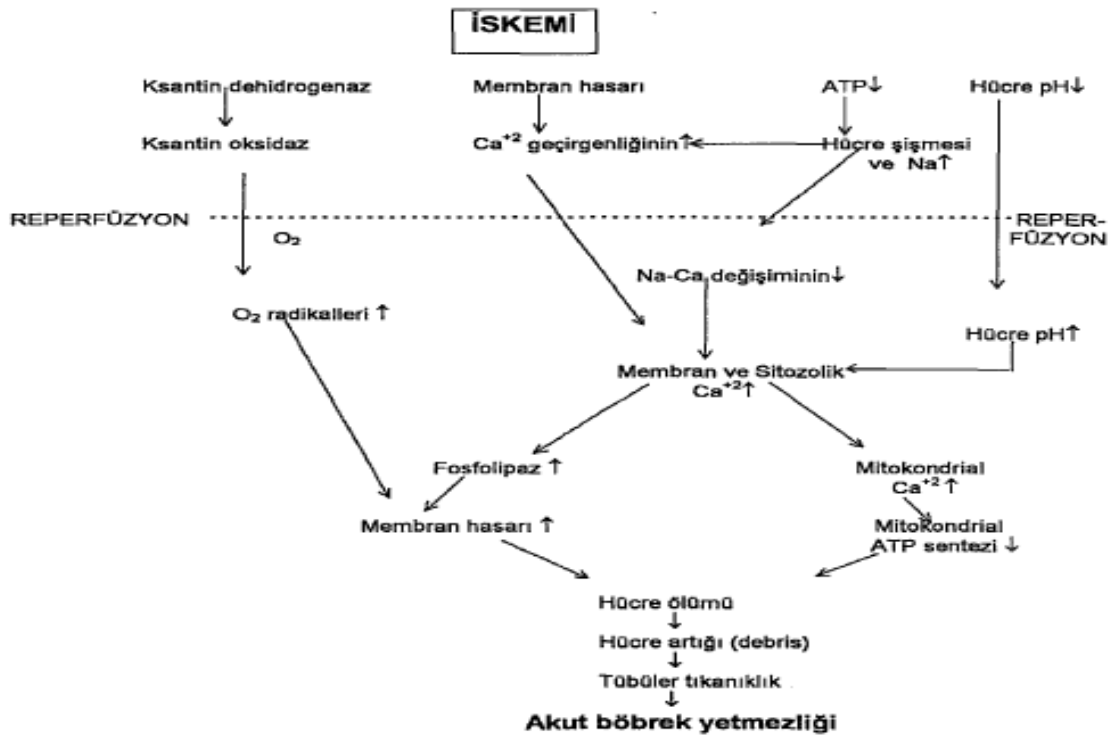
Şekil 10. SOD reaksiyonu

2.3.3. İskemi/Reperfüzyon Hasarı ve Renal Sistem

İskemi reperfüzyon hasarı renal transplantasyon ve septik şokla ilişkili akut renal yetersizlik gelişiminde en önemli patolojik mekanizmalardan biridir. İskemi reperfüzyon hasarına sekonder akut renal yetersizlik kötü prognoz ve yüksek mortalite oranı ile ilişkilidir. Hayvan ve insan modellerinde uzamış iskeminin renal kan akımında ve glomerüler filtrasyon hızında (GFH) azalmayla sonuçlandığı gösterilmiştir. İskemik akut renal yetersizlik, yetersiz kan akımıyla başlar. Yetersiz kan akımı da azalmış kardiyak debi yanında renal arter stenozu ya da tıkanıklığı veya intrarenal küçük damarların ateroskleroz, ateroemboli, vaskülit gibi nedenlerle hasarlanması sonucu gelişir (34). Böbreklerdeki İ/R hasarının mekanizması

multifaktöriyel ve birbirine bağlı hipoksi, serbest radikal hasarı ve enflamatuvar cevaplarla ilişkilidir (25)

Normal fizyolojik şartlarda oksijen parsiyel basıncı korteksten medullaya doğru inildikçe azalmaktadır. Böbreğin İR hasarı öncelikle böbreğin hipoksiye duyarlı olduğu medullasından başlar. Böbreğe gelen kan akımının büyük kısmı renal korteksten geçer ve renal medullanın kanlanmasını sağlayan vaza rektaya çok az kan gider; bu da renal medüllayı hipoksiye daha duyarlı hale getirir. İskemik hasar tübül disfonksiyona ve sodyum geri emiliminde azalmaya neden olur; böylece distal kısımlara giden sodyum miktarı artar, glomerüler vazokonstriksiyon ve glomerüler filtrasyonda azalmaya sebep olan tübüloglomerüler *feedback* denen refleksin aktifleşmesi sağlanır. Medüller hipoksi ayrıca hücresel enerji depolarının azalmasına, endotel ve düz kas hücrelerindeki aktin hücre iskeletinin bozulmasına neden olur. Bu da hücresel şişme ve çevre dokularda hipoksinin artmasına yol açar (35). Ayrıca spektrin ve ankirin gibi aktin bağlayıcı proteinlerin bazolateral membrandan sitoplazmaya yöneldiği ve sonra da bu proteinlerin yıkımının arttığı görülmüştür. Tübül hücrelerde izlenen bu değişiklikler proksimal tübül hücrelerinin fırçamsı kenarlarının ve hücrelerin bazal membrandan koparak tübül lümenine dökülmesine ve tübül lümeninde tıkanmaya sebep olur (Şekil 11) (36).

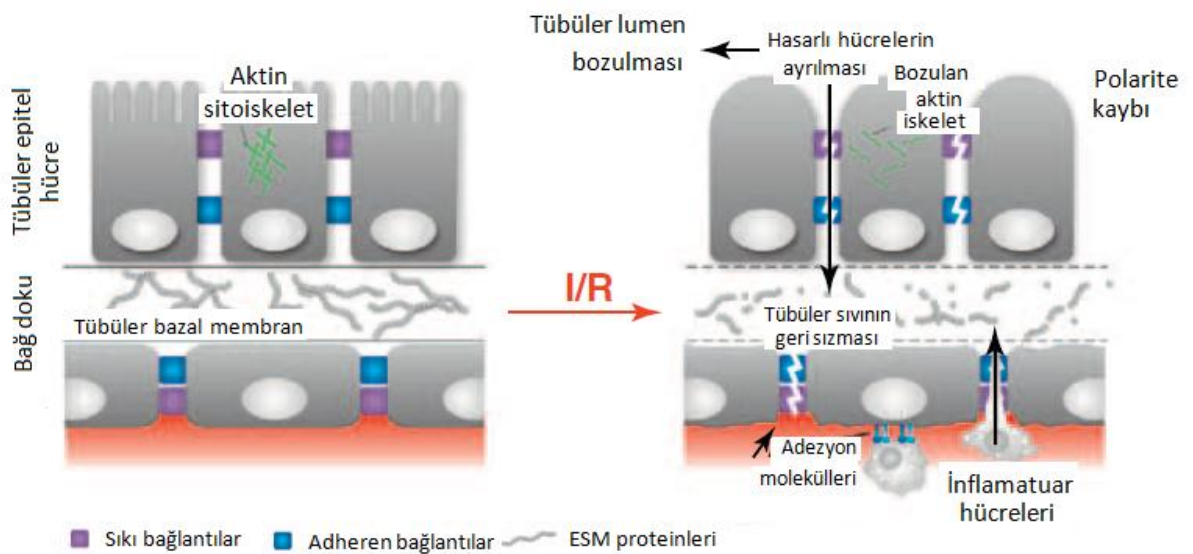


Şekil 11. I/R hasarından böbrek yetmezliğine giden mekanizma

2.3.4 Renal İskemi Reperfüzyon Hasarında MMP'lerin rolü

İnflamasyon ve oksidatif stres başta olmak üzere bir çok patolojik süreç MMP aktivite artışıyla ilişkilidir. İskemi hasarından sonra farklı organlarda MMP'ler farklı şekilde ifade edilebilirler. İskemi reperfüzyon sırasında inflamatuvar hücrelerinin birikimi ROS düzeyinin artışından, reaktif nitrojen türlerinin oluşmalarından ve iskemik dokularda proinflamatuvar sitokinlerinden sorumludur. Bu uyarıların iskemi hasarından sonra MMP'lerin post-translasyonel ve transkripsiyon ifadelerini arttırdığı bildirilmektedir. İskemi sırasında oluşan reaktif oksijen türlerinin MMP-9 aktivasyonuna yol açtığı bir çok çalışmada gösterilmiştir (37).

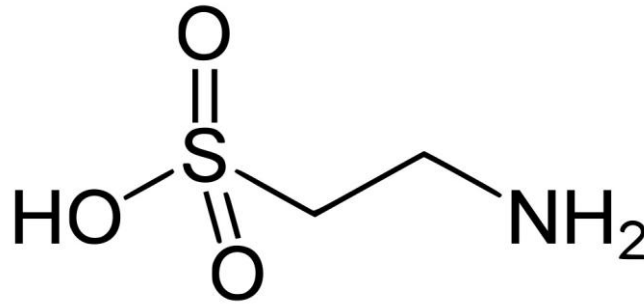
I/R süresince artan MMP' ler ayrıca endotel ve epitel hücre-hücre baplantılarını yıkarak bariyer fonksinlarının kaybını tetikler. Bu da zar sızıntısına yol açar. Böbrek akut I/R sırasında hücreler arası sıkı bağlantıların bozulmasında da proteoliz önemli rol oynar. Sürecin sonunda tübüler epitel hücreler depolarize olur ve ayrılarak lümenin bozup fonksiyonuna engel olurlar (Şekil 12). Tübüler sıvı geri dönüş mekanizmasının kaybına neden olurlar. Bununla birlikte I/R hasarında sonraki aşamalarında, MMP'lerin inhibisyonu iyileşme sürecinde engelleyebilir. Çünkü MMP'ler hücre migrasyonu ve anjiyogeneze de katılırlar. MMP aktivasyonunun zaman diliminin aydınlatılması I/R hasarında MMP' lerin inhibisyonu için terapötik belirlemede yol gösterebilir.



Şekil 12. Renal I/R hasarı ve MMP'lerin rolü (37)

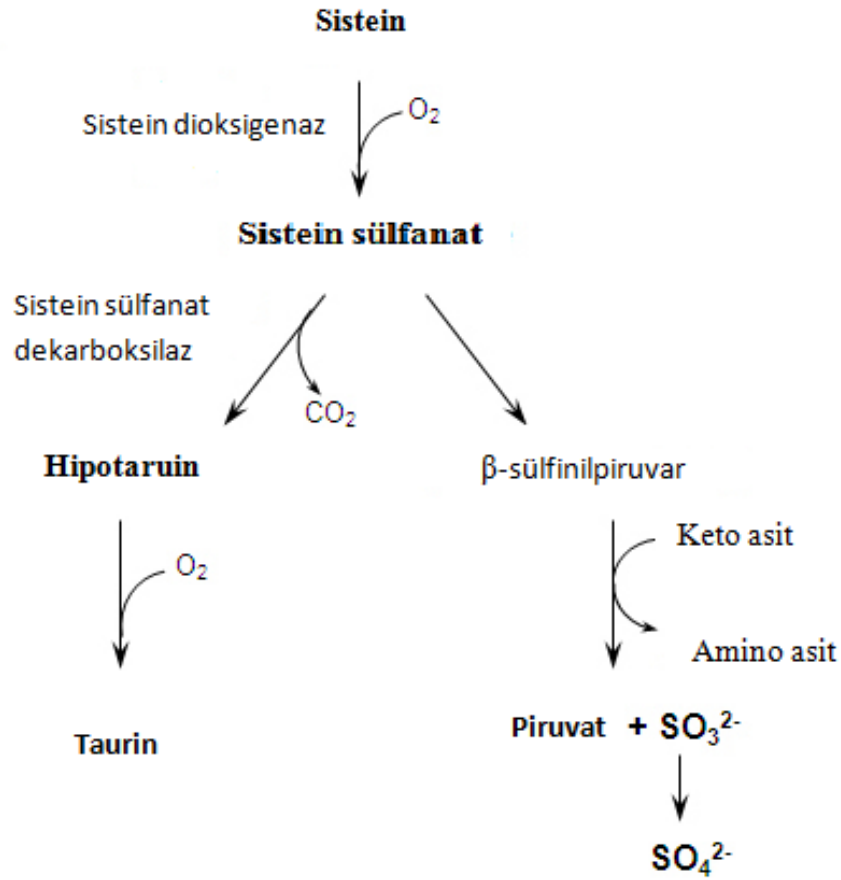
2.3 TAURIN

Taurin sistein türevi tiyol gurubu içeren bir aminoasittir. Aminoasitlerde olması gereken bir karboksil grubundan yoksun olmasına rağmen literatürde aminoasit olarak bahsedilmektedir. Amino sülfonik asit olarak da adlandırılır (38). Yapısı Şekil 13'te gösterilmiştir. İlk olarak Alman bilim adamları Friedrich Tiedemann ve Leopold Gmelin tarafından 1827 yılında öküz safrasından izole edildiği için taurin boğa veya öküz anlamına gelen Latince 'taurus' olarak adlandırılmıştır.



Şekil 13. Taurinin kimyasal yapısı, C₂H₇NO₃S

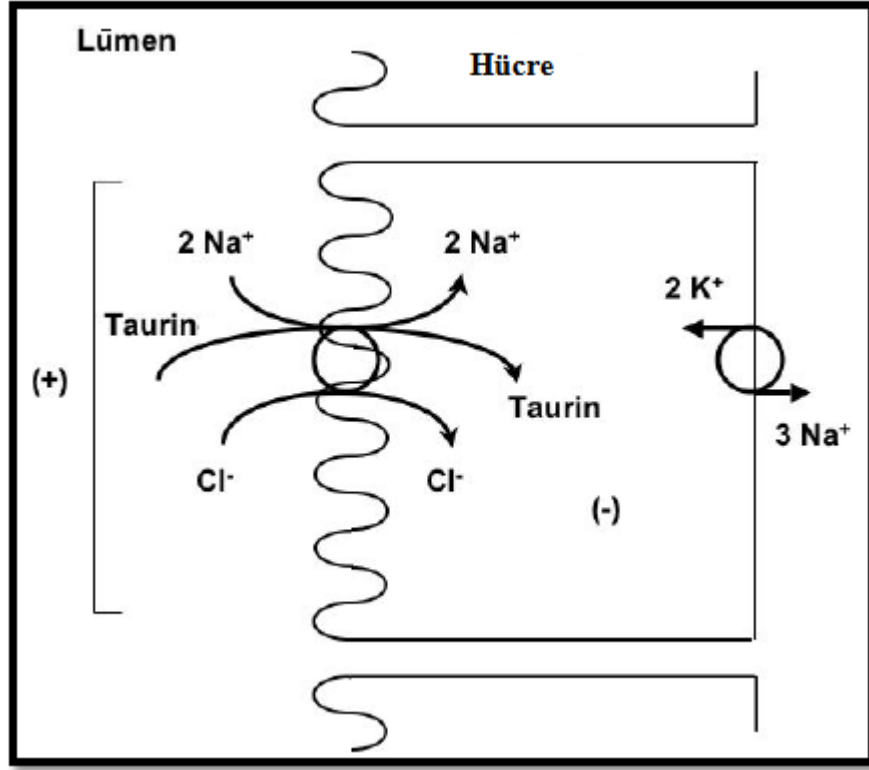
Taurin insanlar da dahil olmak üzere birçok hayvan dokusunda bulunabilir. Memeliler de taurin sentezi sistein sülfonik asit yolu ile pankreas oluşur. İlk önce sisteinin tiol grubu sistein dioksigenaz ile sistein sülfonik aside oksitlenir. Sistein sülfonik asit, sulfinoalanine dekarboksilaz tarafından hipotaurin formuna karboksilleştirilir (Şekil 14). Daha sonra hipotaurinin kendiliğinden ve ya enzimatik bir reaksiyon ile taurine okside olup olmadığı henüz bilinmemektedir (38). Sentetik taurin ise sulu sodyum bisülfid ile etilen oksit reaksiyonundan oluşan 2-hidroksi asitten elde edilir. Taurin safra asidi konjugasyonu, antioksidan, osmotik düzenleme, membran stabilizasyonu ve kalsiyum sinyal modülasyonu olmak üzere birçok temel biyolojik rollere sahiptir. Kardiyovasküler fonksiyon ve gelişimi aynı zamanda iskelet kası, retina fonksiyonu ve merkezi sinir sistemi için gereklidir. Oksidan bir bileşik olan HOCl'yi N-klorotaurine dönüştürerek hücre içinde oksidatif hasar oluşmasını engellemektedir (18).



Şekil 14. Taurin sentezi

2.3.1. Taurin ve Renal Sistem

Böbrek ve taurin arasındaki etkileşimler çok ve çeşitlidir. Böbrekte pek çok biyolojik sürece katılır ve taurin homeostasisinin özel yönlerini etkiler. Son zamanlarda böbreklerde taurinin oldukça fazla fizyolojik olayları düzenlediği belirlenmiştir (40). Taurinin taşınması sodyum ile gerçekleşir. Sodyuma ek olarak böbrek epitallerinden taurin alımı klor ve brom gerektirir. Şekil 15 'te detaylı olarak transport sistemi özetlenmiştir.



Şekil 15. Böbreklerde taurin transport sistemi (40)

Böbrek tübüler hücre kültüründe taurinin hücre canlılığı ve hipoksi durumunda hayatta kalması üzerine pozitif etkileri bulunmuştur. Reperfüzyon sonrasında ise osmotik basıncı dengeleyerek intrasellüler kalsiyum dengesinin onarımını gerçekleştirdiği saptanmıştır (41). Organ korunumunda taurinin olumlu etkileri iskemi sırasında taurin uygulanan reperfüzyon böbrekte damar geçirgenliği ve organın ATP sistemini koruduğu kanıtlanmıştır (42). Bu doğrultuda iskemi reperfüzyon hasarının tedavi sürecinde taurinin kullanılmasına yönelik çalışmaların hız kazandığı dikkat çekmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma deneysel bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Bu araştırma Kasım 2013 ile Kasım 2014 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğrenme Kaynakları Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda (ARLAB) ve Dokuz Eylül Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Yapılan bu çalışmada araştırmanın evreni ve örneklemi yoktur.

3.4. Çalışma Materyali

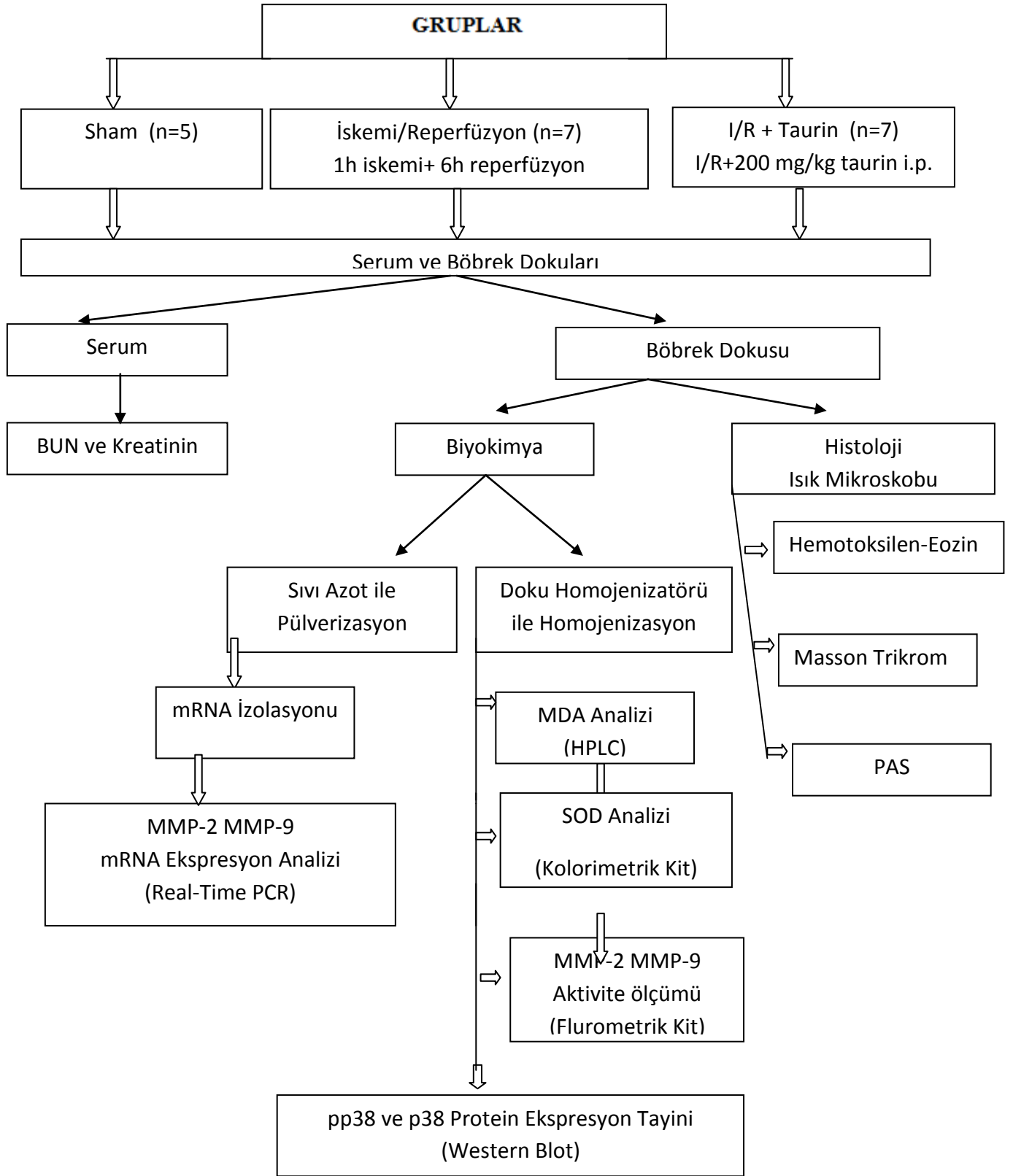
Araştırmada deney hayvanı Winstar albino sıçan kullanılmıştır. Sıçanların sol böbrek dokuları biyokimyasal ve histolojik incelemeler için ikiye ayrılmıştır. Toplanan kan örnekleri de biyokimyasal analizler için kullanılmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Çalışmanın bağımsız değişkeni: Taurin bileşiği

Çalışmanın bağımlı değişkeni: İskemi/reperfüzyon hasarı süresince yapısal ve biyokimyasal değişimler

3.6. Veri toplama Araçları



Şekil 16. Deney akış şeması

3.6.1. Deney Hayvanı

Bu çalışmada DEÜTF Deney Hayvanları Laboratuvarından temin edilen olan 28 adet Wistar-Albino suşu erişkin erkek sıçanlar (200-250 gr) kullanılmıştır. Herhangi bir nedenle deneyi devam edemeyecek ya da deneyler bitmeden yaşamı sonlanan denekler, deney ve istatistik kapsamından çıkarılmıştır.

Deney hayvanı grupları

Sıçanlar rastgele seçilerek 3 çalışma grubu oluşturulmuştur.

Grup 1: Sham grubu (n =5) Bu gruptaki sıçanlara sham operasyonu uygulandı.

Grup 2: Renal İskemi-reperfüzyon (I/R) grubu + Salin (n=7) Bu gruptaki sıçanlarda renal iskemi reperfüzyon oluşturuldu.

Grup 3: Renal I/R + Taurin (200 mg/kg) (n =7) Renal I/R uygulamasından 45 dakika önce i.p. yolla 200 mg/kg dozda taurin verilmiştir. Altıncı saatin sonunda tüm denekler sakrifiye edildi.

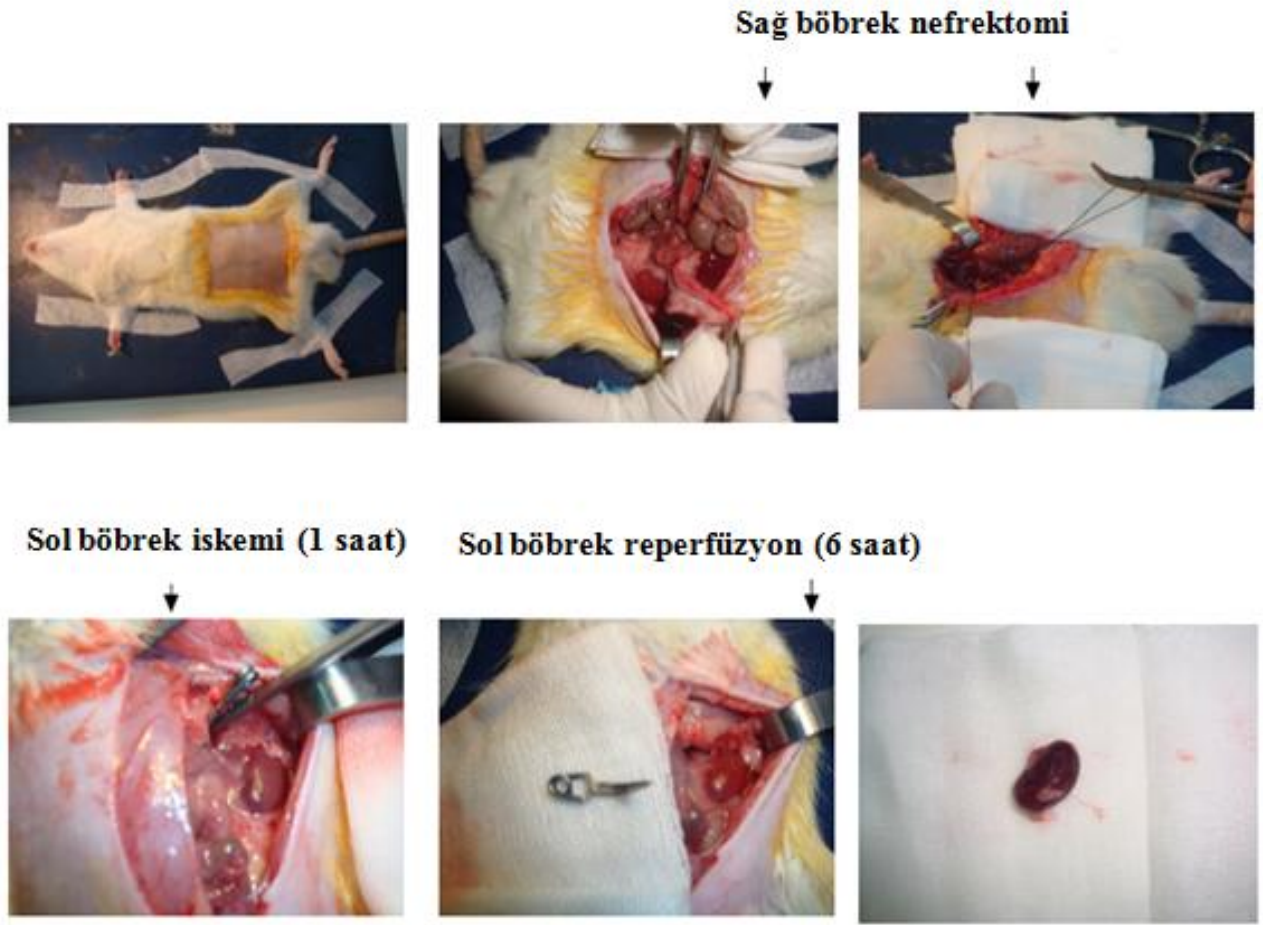
Hayvanlara Uygulanacak Taurinin Hazırlanması

Deneylerde kullanılan Taurin (Sigma, St. Louis, MO, USA) her deney öncesinde taze olarak hazırlandı. Deney gruplarını sayısına göre farklı hacimlerde hazırlandı. 200 mg/kg dozuna (43,44) dikkat edilerek katı haldeki taurin tartıldı ve uygun hacimde serum fizyolojikte steril koşullarda çözünmesi sağlandı. Hazırlanan taurin solüsyonu şırıngalara 2 ml olacak şekilde çekilip deney hayvanları için enjeksiyona hazır hale getirildi.

Renal İ/R hasar modeli

Anestezi için intraperitoneal ketamin HCl (50 mg/kg) ve ksilazin HCl (7,5 mg/kg) kombinasyonu uygulandı. Sırt üstü yatırılan sıçanların abdominal bölgesi traşlanıp ve %10 povidon iyodin ile dezenfeksiyonu takiben her iki böbreği görebilecek şekilde midline laparotomi yapıldı. Sonrasında tüm gruplarda sağ nefrektomi yapıldı. I/R modelinde sol

renal pediküle mikrovasküler klemptörler kullanılarak 60 dakika süre ile kan akımı kesildi. Sonrasında mikrovasküler klemptörler alınarak kan akımı tekrar sağlanarak, böbrek renginin normale döndüğü izlendikten sonra bati kapatıldı (45). Altı saat reperfüzyon sonrasında hayvanlar ketamin+ksilazin anestezisi altında tüm kanın alınması (kansızlaştırma) yöntemiyle sakrifiye edildi. Bir saat iskemi ve altı saat reperfüzyon seçimi daha önce yapılan pilot çalışma sonuçlarına göre gerçekleştirilmiştir. Toplanan kan, idrar (direct mesaneden aspirasyon ile) ve doku örnekleri (sol böbrek) biyokimyasal ve histopatolojik inceleme için ikiye ayrıldı. Yapılan müdahale Şekil 17' de gösterilmiştir.



Şekil 17. Böbrek I/R hasarı

3.6.2. Histolojik Değerlendirmeler

3.6.2.1. Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü

Böbrek dokuları %10' luk tamponlanmış nötral formalin içerisinde üç gün süreyle tespit edilerek rutin doku takip işlemi başlatıldı. Tespit maddesinin uzaklaştırılması için bir gece akan su altında yıkandıktan sonra, 60°C de etüvde 20' şer dakika sırasıyla %70, %80, %96 artan etil alkol serilerinden geçirildi. Daha sonra 60°C de etüvde 20' şer dakika dört değişim asetonda dehidrate edildi. Şeffaflandırma amacıyla 60°C de etüvde 30' ar dakika iki kez ksilolde bekletildi. 60°C' lik etüvde iki değişim halinde 1'er saat parafin ile immersiyonu sağlanarak parafin bloklar içerisine gömüldü (Tablo 2). Rotary mikrotom (RM 2255, Leica, Germany) aracılığı ile 5 µm'lik kesitler alındı. Her deneğe ait kesitler dokunun genel histomorfolojik özelliklerini değerlendirmek için hematoksilen-eozin, Masson-Trikrom ve PAS (Peryodik Asit Schiff) ile boyandı. Yapısal değişiklikleri incelemek için hematoksilen-eozin, proksimal ve bazal membran tübüllerindeki fırça kenar değişikliklerini incelemek için PAS ve kolajen içeriğin görebilmek için de Masson-Trikrom ile boyandı.

Tablo 2. Rutin doku takibi

İşlem	Madde	Süre
Fiksasyon	%10'luk Formaldehit	3 gün
Fiksatiften Uzaklaştırma	Akarsu	1 Gece
Dehidratasyon	%70'lik Alkol	20 Dakika
Dehidratasyon	%80'lik Alkol	20 Dakika
Dehidratasyon	%96'lık Alkol	20 Dakika
Post Fiksasyon	Aseton 1	20 Dakika
Post Fiksasyon	Aseton 2	20 Dakika
Post Fiksasyon	Aseton 3	20 Dakika

Post Fiksasyon	Aseton 4	20 Dakika
Şeffaflandırma	Xylol 1	30 Dakika
Şeffaflandırma	Xylol 2	30 Dakika
	Parafin 1	60 Dakika
	Parafin 2	60 Dakika
Bloklama	Parafin	

Hematoksilen-Eozin boyaması

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 2 saat 60°C'lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 20 dakika (etüvde) diğer ikisi 10'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için 2 değişim absolü alkol ve %96'dan %70'e azalan alkol serilerinden geçirdi. Kesitler distle su ile çalkalandıktan sonra 10 dakika Hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika Eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri absolü alkol serilerinden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 3).

Tablo 3. Hematoksilen-Eozin boyama protokolü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	30 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (Etüvde)	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (Oda Isısında)	10 Dakika

Deparafinizasyon	Ksilen 3	10 Dakika
Rehidratasyon	Absolü Alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	Absolü Alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	% 96 Alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	% 80 Alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	% 70 Alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Hematoksilen	10 Dakika
Yıkama	Akarsu	10 Dakika
Boyama	Eosin	2 Dakika
Yıkama	% 70 Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	% 80 Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	% 96 Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolü Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolü Alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 Dakika
Kapama	Entellan	

Masson-Trikrom Boyaması

Alınan parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 30 dakika (etüvde) diğer ikisi 20'şer dakikalık üç farklı ksilende tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için 2 değişim absolü alkol ve %96'dan %70'e azalan alkol serilerinden geçirdi. Ve akarsuda 5 dakika bekletildikten sonra Masson Trikrom boyama seti (2049 GBL, İstanbul, Türkiye) içerisinde dokular üzerine 8 damla Weigert hematoksilin boyası ile 8 damla ferrik klorür çözeltisi damlatıldı ve 20 dakika bekletildi. 1 dk distile su ile yıkandıktan sonra 8 damla asit-alkol çözeltisi ile 1 dakika bekletilen kesitler distile suyla iyice yıkandı. Ardından 8 damla Ponceau asit fuksin azofloksin çözeltisi dokunun üzerini tamamen kaplayacak şekilde uygulandı. 5 dakika sonra uzaklaştırıldı ve 1 ml stok asit çözeltisi ve 29 ml distile su ile hazırlanan asitli su ile kısaca yıkandı. 8 damla fosfomolibdik asit turuncu G boyası ile 20 dakika muamele edildikten sonra asitli su ile yıkandı ve 8 damla açık yeşil boya ile 5 dakika boyandı. Boyamanın ardından akan su altında yıkanan kesitler artan alkol serilerinden geçirildi. Ksilen ile şeffaflaştırma yapıldıktan sonra entellan ile kapatıldı (Tablo 4).

Tablo 4. Masson-Trikrom boyama protokolü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	1 Gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (Etüvde)	30 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (Oda Isısında)	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3 (Oda Isısında)	20 Dakika
Rehidratasyon	%100'luk alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%100'luk alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%96'lık alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%80'lik alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%70'lik alkol	Çalkalama

Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	No:1 + No:2 Solusyonu	10 Dakika
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	No: 3	4 Dakika
Boyama	No: 4	5 Dakika
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	No: 5	10 Dakika
Boyama	No: 6	5 Dakika
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Dehidratasyon	% 70–80–96–100-100'lük Alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 Dakika
Kapama	Entellan	

Peryodik Asit Schiff Boyaması (PAS) :

Alınan parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 1 saat (etüvde) diğer ikisi 30'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için 2 değişim absolü alkol ve %96'dan %70'e azalan alkol serilerinden geçirildi, kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 3-5 dakika peryodik asit ile boyandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 1-2 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 20-23 dakika schiff boyası ile boyandı. Boyamadan sonra 5 dk akarsuda tutuldu. Daha sonra dehidratasyon işlemi için sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri

Absolü alkol serilerinden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20’şer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı. (Tablo 5)

Tablo 5. Periyodik Asit Schiff (PAS) boyama protokolü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	1 Gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (Etüvde)	1 Saat
Deparafinizasyon	Ksilen 2-3 (Oda Isısında)	30 Dakika
Rehidratasyon	%100-100-96-80-70’lik Alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	10 Dakika
Boyama	Peryodik Asit	3-5 Dakika
Yıkama	Akarsu	1 Dakika
Boyama	Schiff	20-23 Dakika
Yıkama	Akarsu	1-2 Dakika
Boyama	Hematoksilen	1-2 Dakika
Yıkama	Akarsu	5 Dakika
Dehidratasyon	% 60–70–80–96-100’lük Alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1–2–3	20’şer Dakika
Kapama	Entellan	

Böbrek dokusunun histomorfolojisinin değerlendirilmesi:

Kesitlerden elde edilen görüntülerin incelenmesinde bilgisayarlı video kamera esaslı görüntü analiz yöntemi kullanıldı (UTHSC Image software). Tüm kesitler analize edildi; sadece boyamaya bağlı belirgin artefaktları olan kesitler değerlendirme dışı tutuldu. Boyama tamamlandıktan sonra kesitler ışık mikroskopunda (Olympus BX-51 Tokyo, Japan) 40 X büyütmede incelenerek, görüntüler yüksek çözünürlüğe sahip kamera yardımıyla bilgisayara aktararak değerlendirildi (Olympus DP-71, Japan). Bütün kesitler dijital olarak fotoğraflandı.

Deney gruplarına ait böbrek dokusu kesitlerinde ışık mikroskopik olarak; mononükleer hücre infiltrasyonu, eritrosit ekstrasvazasyonu, kapiller dilatasyon, renal korpüskül morfolojisi, proksimal tübüluslarda vakuolizasyon, fırçamsı kenar kaybı, tübüler dilatasyon ve kast formasyonu değerlendirildi. Kesitlerden elde edilen görüntüler değerlendirilirken semikantitatif olarak tübülointertisyel hasar için (tübüler fırçamsı kenar kaybı, tübüler dilatasyon, kast formasyonu, vakuolizasyon, mononükleer hücre infiltrasyonu, eritrosit ekstrasvazasyonu, renal korpüskül morfolojisi gibi parametreler için) skorelama yapıldı. Skorelama 0=hiç yok, 1= % 1-25, 2= % 26-50, 3= % 51-75, 4= % 76-100 olarak uygulandı (46).

3.6.3.Biyokimyasal İncelemeler

Analizler deneklerden alınan serum ve doku örneklerinde gerçekleştirildi. Serumda değerlendirilecek parametreler için ise rutinde kullanılan kırmızı kapaklı tüplere alınan kan örnekleri 2500 rpm'de santrifüj edilerek üst faz alındı. Tüm deneklerdeki dokuların yarısı biyokimyasal incelemeler için kullanılmıştır. Biyokimyasal analizler için ayrılan böbrekler farklı analizler için üç parçaya ayrılıp saklandı. Bir grup böbrek dokusu RNaz Later (Sigma, AM7024) solüsyonunda mRNA çalışması için saklandı. Tüm biyolojik materyaller analiz süresine kadar -80°C de saklandı. .

3.6.3.1 Dokuların Hazırlanması

Dokular analiz koşullarına göre uygun homojenizasyon tamponu ile homojenize edildi.

Tablo 6A' da belirtilen Tris-HCl homojenizasyon tamponu ile dokular 1:8 oranında (w/v) homojenize edildi (QIAGEN, TissueLyser II). MDA analizi için homojenizatlar 2500 xg de, SOD ve p28 ekspresyon analizleri için 11000 xg de santrifüj edildi.

MMP-2 ve MMP-9 aktivite analizleri için kullanılan homojenizasyon tamponu Tablo 6B' de gösterilmektedir. 0,1 g doku Tris-HCl homojenizasyon tamponuyla (8x) homojenize edildi. 10000 xg de santrifüj edildi.

Santrifüj basamağından sonra toplanan supernatantlar -80°C de saklandı.

Tablo 6. Homojenizasyon tampon içerikleri

A: Tris-HCl Homojenizasyon Tampon İçeriği pH:7.4		B: Tris-HCl homojenizasyon tamponu pH: 7.0	
Tris	50mM	Tris	50mM
Brij 35	%0,05	Brij 35	%0,05
Aprotinin	1 µg/ml	NaCl	0,15 M
Leupeptin	1 µg/ml	CaCl ₂	10mM
Pepstatin	1 µg/ml	Leupeptin	1 µg/ml
PMSF	1 µg/ml	Pepstatin	1 µg/ml
Sodyum orto vanadat	1 µg/ml		

3.6.3.2 Doku Protein Analizi

Doku örneklerinde protein ölçümünde biçinkonik asit (BCA) yöntemi kullanıldı. Bu amaçla Thermo marka (Kat No: BCA, Protein assay Kit, 2325) protein analiz kiti kullanıldı. Yöntemde, bakır sülfat BCA çözeltisine eklendiğinde elma yeşili renk oluşturmakta; bu çözelti protein çözeltisine ilave edildiğinde, proteinin peptid bağları ile etkileşerek, alkali koşullar altında iki değerlikli Cu^{2+} iyonları bir değerlikli Cu^{+} iyonlarına indirgenerek mavi-mor renkli bir kompleks oluşturmaktadır. Mavi rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile orantılıdır (47). Protein standartı olarak bidistile su içinde 25, 125, 250, 500, 1000, 1500, 2000 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında sığır serum albumini (BSA) standartları hazırlandı.

- Standartlardan ve örneklerden 25'er μL 96 kuyucuklu plağa konuldu.
- Çalışma çözeltisi; A reaktifi (biçinkonik asit çözeltisi, sodyum karbonat, sodyum bikarbonat, biçinkonik asit ve sodyum tartarat) ve B reaktifinin (bakır sülfat çözeltisi) 1:50 oranında karıştırılmasıyla hazırlandı.
- 200 μL çalışma çözeltisinden her kuyucuğa eklendi.
- 37 °C'de 30 dakika bekletildi.
- Örnek absorbansları 562 nm'de okundu.
- Protein konsantrasyonları standart grafiği kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar $\mu\text{g/mL}$ olarak ifade edildi.

3.6.3.3. Serum Kreatinin ve BUN Düzeylerinin Belirlenmesi

Serum kreatinin ve kan üre azotu (BUN) düzeyleri için Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'ndan hizmet alımı yapılmıştır. Abbott Architect C16000 otoanaliz cihazı ile çalışılmıştır. BUN ve kreatinin ölçümü sırasıyla üreaz ve Jaffe reaksiyonu prensibiyle ölçülmektedir. Üreaz prensibi; üre, su ve üreaz ile hidrolize olur ve amonyak ile karbon dioksit açığa çıkar. İlk reaksiyonda açığa çıkan amonyak, glutamat- dehidrojenaz (GLDH) ile 2-oksoglutarat ve NADH ile birleşir ve glutamat ile NAD^{+} oluşur. Birim zaman başına NADH absorbansındaki düşüş üre konsantrasyonu ile orantılıdır. Jaffe reaksiyonu ise,

alkali pH da örneklerdeki kreatinin pikrik asit ile reaksiyona girerek oluşan kompleksin kolorimetrik ölçümüne dayanmaktadır. (48,49).

3.6.3.4. Doku MDA Analizi

Malondialdehit (MDA), lipid peroksidasyonunda bir son üründür ve oksidatif hasarın düzeyini göstermekte kullanılır. Yöntemde lipid hidroperoksitleri asit katalizi ile MDA'ya parçalanarak meydana gelen MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile oluşturduğu kompleks floresans dedektör ile (eksitasyon dalga boyu:515 nm, emisyon dalga boyu 553 nm) tespit edildi (50). Doku MDA değerleri $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein olarak ifade edildi. Çalışmamızda MDA ölçümü yüksek performanslı likit kromatografi (HPLC) ile gerçekleştirildi. 250 x 4,6 mm 5 μM tanecik C_{18} kolon kullanıldı. Mobil faz olarak KH_2PO_4 (0,01M) ve K_2HPO_4 (0,01M) pH 7 %30 metanol kullanılmıştır. Mobil faz akış hızı: 0,8 ml/dakika olacak şekilde ayarlanmıştır. Standart olarak 1,1,3,3-tetraetoksipropan (Sigma, 85H2501) kullanılmıştır. Standart konsantrasyonları 0.75, 1.5, 3, 5, 10, 20, 40, 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ olarak belirlenmiştir.

Uygulama basamakları aşağıda özetlenmiştir:

1. 40 μL örnek (veya standart) kapaklı cam tüplere konuldu.
2. 100 μL saf su eklendi.
3. 20 μL 2.8 mmol/L bütillen hidroksi toluen (BHT) (etanolde) eklendi.
4. 40 μL %8.1 SDS, 600 μL , 8 g/L TBA+Asetik asit karışımı ilave edildi (TBA, 200 mL/L asetik asit ile 1:1 dilue edildi, 2 M NaOH pH NaOH ile 3.5'a ayarlanır).
5. 95 °C'deki su banyosunda 1 saat bekletildi.
6. Su banyosundan çıkarıldıktan sonra buz üzerinde soğutuldu.
7. 200 μL saf su, 1000 μL , butanol:piridin (15:1) ilave edilir ve tam 1 dakika vortekslenerek karıştırıldı. 2-3 dakika tüpler bekletildi.
8. Organik fazın kendiliğinden ayrıldığı gözlemlendi.
9. Üst fazlar ependorf tüplerine alındı.
10. 10,000 rpm'de 5-10 dakika santrifüj edildi.

11. HPLC (Shimadzu VP Series) kolonuna 10 µL enjekte edildi.

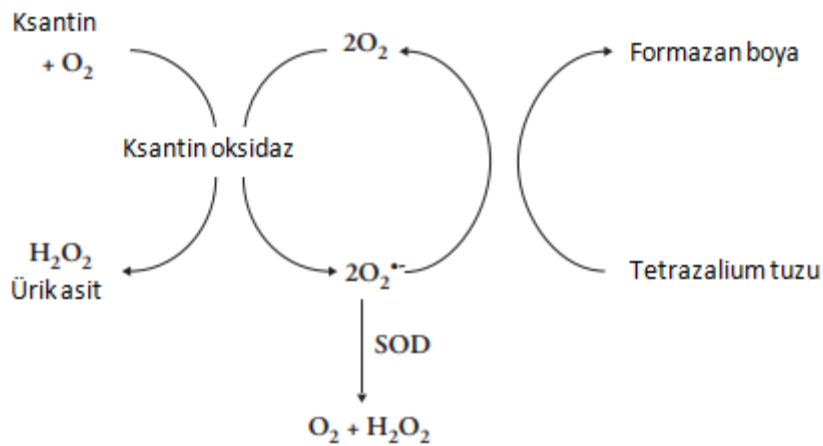
12. Standart kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak her örnekteki MDA düzeyleri µmol/µg protein olarak ifade edildi.

3.6.3.5. Doku SOD Analizi

Savunma mekanizmasında ilk olarak görev alan süperoksit dismutaz (SOD) süperoksit serbest radikalının hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir. Doku SOD düzeyleri kolorimetrik kit (Cayman Kat. No. 706002) ile değerlendirilmiştir. Kitin çalışma prensibi Şekil 18' de özetlenmiştir.

Uygulama basamakları aşağıda özetlenmektedir;

- 96'lık well plate'e 10 µl örnek veya hazırlanan standartlardan (0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 U/ml) konuldu.
- 200 µl radikal detektör eklendi.
- Reaksiyon başlatmak için 20 µl ksantin oksidaz eklendi.
- Oda sıcaklığında çalkalayıcıda 20 dakika hafif çalkalamaya bırakıldı.
- 450 nm arasında okuma yapıldı.
- Standart ve örnekler için lineer oranlar hesaplandı. Standart grafiği çizildi.
- SOD düzeyleri U/mg protein olarak ifade edildi.



Şekil 18. SOD kiti çalışma prensibi

3.6.3.6. MMP-2 ve MMP-9 mRNA Ekspresyonlarının Belirlenmesi

3.6.3.6.1. Total RNA İzolasyonu

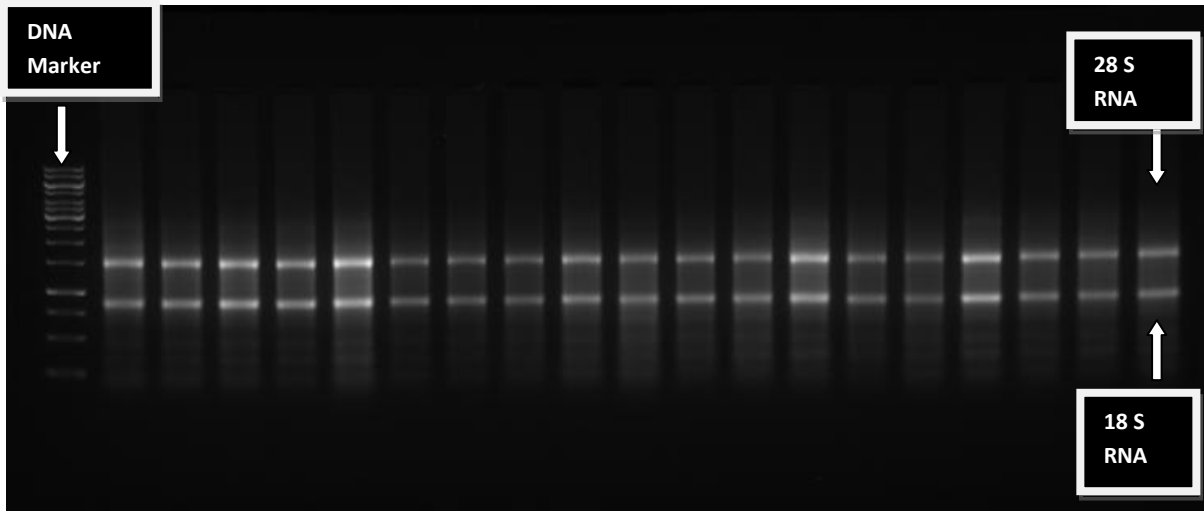
Total RNA izolasyonu trizol solüsyonu ve RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, katalog no: 74804) kullanılarak üretici firmanın önerdiği talimatlara göre gerçekleştirildi. 1 ml soğuk trizolün içine sıvı azot altında pulverize edilen 50 mg doku homojenatı konuldu. Trizolün içine konan homojenat ters-yüz edildi ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 12000 xg de 15 dakika +4°C de santrifüj edildi. Üst faz alınarak RNaz free ependorflara aktarıldı. 1:1 oranında soğuk %70 ethanol eklendi. Ters-yüz edildi. RNeasy kolonlarına aktarıldıktan sonra 8000 xg de 15 saniye santrifüj edildi. 700 µl RW1 kolona verildi. 9000 xg de 15 sn çevrildi. 500 µl buffer RPE eklenip 9000xg de 15 sn ardından tekrar 500 µl buffer RPE eklenip 9000 xg de 2 dakika santrifüj edildi. RNaz free ependorf takılı olan tüpe 40 µl RNaz free su eklenip 9000 xg de 1 dakika santrifüjlendi.

3.6.3.6.2. RNA'nın Ölçülmesi

RNA örneklerinin kalitesi ve konsantrasyonunun belirlenmesi için spektrofotometre (NanoDrop, MN913) kullanılarak ölçüm yapıldı. 230 nm fenol, 260 nm DNA ve, 280 nm ise proteinler için maksimum absorbans alındığı dalga boyudur. RNA'nın saflığı için A260/A280 oranının ~1.9 olmalı, A260/A230 oranının ise 1.8-2.2 olması gerekmektedir.

3.6.3.6.3 RNA' nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi

İzole edilen RNA kalitesi için %1 lik agaroz jel elektroforezinde 18S ve 28S bantlarına bakıldı. %1 lik agaroz jel, Tris-Asetik asit-EDTA (TAE) tamponu ile hazırlandı. Agarozun mikrodalga fırında çözünmesi sağlandı. Daha sonra soğutulup 1µl EtBr eklendi. Elektroforez sistemine döküldüğü taramalar takıldıktan sonra polimerize olması beklenildi. Tanka jel yerleştirdikten sonra 1X TAE yürütme tamponu ile dolduruldu. 3µl RNA örneği, 5µl saf su ve 2µl yürütme boyası ile muamele edilerek jeldeki kuyucuklara yüklendi. 90 V, maksimum 500 mA de 45 süresince yürütüldü. Yürütme bitince jel UV transilluminatörde görüntülenip DNR LightBis Prolmage Analysis System cihazında görüntüendi.



Şekil 19. RNA jel görüntüsü

3.6.3.6.4. cDNA Sentezi

cDNA sentezi EasyScript Plus (ABM, Kat. No.) cDNA sentez kitiyle üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. Sentezlenen cDNA lar RT-PCR yapmak üzere -20°C de saklandı.

Tablo 7. cDNA sentez karışımı ve prosedürü

Bileşenler	Hacim	Son Konsantrasyon
Total RNA		2,5 µg/ml
Oligo (dT) Primer	1µl	0,5µM
dNTP Karışımı	1µl	500µM
RNAaz içermeyen su		14,5 µl
Hazırlanan reaksiyon karışımı 65 ⁰ C de 5 dakika bekletilip buza alındı.		
5X RT tamponu	4µl	1X
Ribonukleaz inhibitörü	0,5µl	20 U/rxn
Reverse Transkriptaz Enzimi	1µl	200 U/rxn
Karışım cDNA sentezi için 50 ⁰ C de 50 dakika inkübe edildikten sonra reaksiyonu sonlandırmak için 85 ⁰ C de 5 dakika bekletildi.		

3.6.3.6.5. Real-Time PCR

Gerçek zamanlı PCR reaksiyonları Bioneer AccuPower GreenStar qPCR Premix Sybergreen kiti kullanılarak üretici firmanın önerdiği talimatlara göre gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Exicycler 3 programı kullanılarak hesaplandı ve 'house keeping' gen olan β -aktin'e göre normalize edilir. Her gen için ayrı ayrı amplikasyon sonucunda elde edilen Ct (threshold-eşik değeri) değerleri kullanılarak çalışmamızda belirtilen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri belirlendi (51).

Tablo 8. Real-Time PCR için kullanılan primer dizaynları

GEN		İleri ve Geri Primer (5'-3')
MMP-2	F	TGGTGTGGCACCACCGAGGA
	R	CCTTGCCATCGCTTCGGCCA
MMP-9	F	CCTCTGCATGAAGACGACATAA
	R	GGTCAGGTTTAGAGCCACGA
β -aktin	F	TGCAGAAGGAGATTACTGCC
	R	CGCAGCTCAGTAACAGTCC

q-PCR için Thermo Scientific marka (K0251) Maxima SYBR green qPCR kiti kullanılmıştır. üreticinin talimatları doğrultusunda analiz gerçekleştirilmiştir.

Tablo 9. qPCR karışımı

Bileşen	Hacim
Thermo master mix	10 µl
Primer F	0.75 µl
Primer R	0.75 µl
dH ₂ O	3.5 µl
cDNA	5 µl
Total hacim	20 µl
Denatürasyon sıcaklığı: 95 ⁰ C	
Sentez sıcaklığı: MMP-2 ve MMP-9 için 56 ⁰ C, β-aktin için 54 ⁰ C	
Uzama sıcaklığı: 72 ⁰ C ; 40 döngü	

3.6.3.7. MMP-2 ve MMP-9 Aktivite Ölçümü

Doku hazırlanması bölümünde anlatıldığı gibi hazırlanan homojenatlarında MMP-2 ve MMP-9 aktiviteleri kantitasyona yönelik ölçüme imkan veren ticari flurometrik kit (Calbiochem, CBA003) ile değerlendirildi. Kolajen benzeri üçlü sarmal yapının kullanıldığı ((Gly-Pro-Hyp*)5-Gly-Pro-Lys(Mca)-Gly-Pro-Pro-Gly/Val-Val-Gly-Glu-Lys(Dnp)-Gly-Glu-Gln-(Gly-Pro-Hyp)5-NH₂). *Hyp, 4-hidroksi-L-prolin; / = kesilme bölgesi) kitte, MMP-2 ve MMP-9 için oldukça spesifik olan bu yapının parçalanmasıyla açığa çıkan floresanstaki artış ölçülmüştür. Uygulama basamakları aşağıda özetlenmiştir;

- ✓ Kontrol olarak MMP-2 ve MMP-9 standardı kullanılmıştır.
- ✓ Aktivasyon tamponu p-aminofenilmerkürük asetat (APMA) ile aktiveleştirildi.
- ✓ Örnekler ve MMP-2 ve MMP-9 standartları (0,20, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 ng/ml) hazırlanan bu aktivasyon tamponuyla seyreltildi.
- ✓ 90 µl örnek veya standart üzerine saf su ile belli oranda seyreltilen çalışma solüsyonu eklendi.
- ✓ Flurometrik okuma 320-405 nm de yapıldı.
- ✓ MMP-2' ler için 3 saatlik ölçüm alındı. MMP-9 için ise 18 saatlik ölçüm alındı.
- ✓ Ölçüm sonuçları ng/ml olarak alındı.
- ✓ Hesaplamalar ng/µg protein olarak yapıldı

3.6.3.8. Western Blot ile p38 Protein Düzeylerinin Belirlenmesi

Western Blot analizi, poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrılmış olan protein karışımının içinde düzeyi ölçülmek istenen proteine özgü antikorunun kullanılmasına dayanan protein düzeyi belirleme yöntemidir. Western blot analizi; poliakrilamid jel elektroforezi ile proteinlerin ayrılması, proteinlerin membrana transferi ve ilgili proteinlerin görünür ve düzeyi ölçülebilir hale getirilmesi şeklinde üç aşamadan oluşmaktadır (52). Doku homojenatındaki total p-38 ve p-p38 protein ekspresyonunun değerlendirilmesi amacıyla Western blot yapıldı. Protein örnekleri % 10 SDS-PAGE jel ile ayrımlandı. Daha sonra poliviniliden diflorür (PVDF) membranına transfer edildi ve transfer sonrası bloklama tamponunda inkübe edildi. Yıkama aşamalarından sonra örnekler HRP ile işaretli sekonder antikor ile inkübe edilerek ve yıkama aşamalarından sonra membran bir film kasedine aktarıldı. Görüntüleme için kemiluminesans yöntemine dayanan ECL kiti kullanıldı. Tüm bu aşamalar ayrıntılarıyla aşağıda anlatılmıştır.

Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) Jelinin Hazırlanması

Jel yürütme işlemleri için Atto marka vertikal elektroforez sistemi kullanıldı. Bu sistem, AE-6220 Dual Slab Chamber elektroforez tankı ve Atto marka AE 6210 2 adet Slab Gel Cast jel kalıbı (ikişer adet 1mm'lik cam plaka, 12 kuyulu tarak ve conta) ve AE-8450 1000V güç kaynağından oluşmaktadır.

Uygulama Basamakları aşağıda özetlenmiştir;

- Çalışmalara jellerin hazırlanması ile başlandı. 16x16 cm boyutlarında iki cam düzlemin arasına silikonlar yerleştirilip sıkıştırılarak jel kalıbı hazırlandı.
- Sızıntı olup olmadığı su ile kontrol edildikten sonra bir pipet yardımıyla Tablo da gösterildiği gibi ayırıcı jel monomer karışımının polimerizasyonu amonyum persülfat (APS) ve tetrametiletildiamin (TEMED) eklenerek gerçekleştirildi ve pipet yardımıyla hazırlanan jel çözeltisi iki cam arasındaki boşluğa camın bir kenarından sızdırılarak döküldü. Poliakrilamid jeller monomerik akrilamidin poliakrilamid zincirlerine polimerizasyonu ve N,N'-metilen- bis akrilamid tarafından çapraz

bağlanması sonucu oluşmaktadır. Polimerizasyon reaksiyonu APS'nin eklenmesi ile başlatılmaktadır. Reaksiyon APS'den serbest radikallerin oluşmasını katalize eden TEMED ile hızlandırılmaktadır.

- Jelin üst sınırının düzgün olması için hava ile temas eden yüzeyine propanol eklendi.
- Jel polimerize olduktan sonra üstteki propanol boşaltılıp su ile yıkandı.
- Paketleyici jel çözeltisi Tablo da belirtildiği gibi hazırlandı ve ayırıcı jelin üstüne boşaltıldı. 12 kuyulu tarak hava kabarcığı kalmayacak şekilde iki cam arasına yerleştirildi. Polimerizasyona bırakıldı.

Tablo 10. SDS-PAGE yönteminde ayırıcı jelin (%10) hazırlanması

JEL BİLEŞENLERİ	HACİM
Saf su	10.7 ml
Akrilamid/Bisakrilamid (%29.2/%0.8 w/v)	6.6 ml
3 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.5 ml
% 10 SDS	0.05 ml
%10 (w/v) Amonyum persülfat	0.2 ml
TEMED	0.02 ml
Total karışım	20.00 ml

Tablo 11. SDS-PAGE yönteminde paketleyici jelin (%4) hazırlanması

JEL BİLEŞENLERİ	HACİM
Saf su	6.00 mL
Akrilamid/Bis-akrilamid(%29.2/%0.8 w/v)	1.33 mL
1 M Tris-HCl (pH 6.8)	2.50 mL
% 10 SDS	0.10 mL
%10 (w/v) amonyum persülfat	0.10 mL
TEMED	0.01 mL
Total karışım	10.00 mL

Örnek Hazırlanması

Kuyucuk başına yaklaşık 60 µg protein olacak biçimde örnekler hazırlandı ve 95 °C’de 5 dakika tutuldu.

Jelin Yüklenmesi

Paketleyici jel polimerize olduktan sonra tarak çıkartıldı. İki cam arasında bulunan contalar çıkartılarak elektroforez tankı içine yerleştirildi ve 1 litre 1X yürütme tamponu (yürütme tamponu stok: Tris 15.1 g, Glisin 72 g, SDS 5 g, dH₂O 500 mL’de) ile dolduruldu. Kuyulara protein örnekleri ve moleküler ağırlık standartı (Geneaid Ladder V) yüklendi.

Elektroforetik Yürütme

Örnek yüklendikten hemen sonra sistem kapatıldı ve Atto Cell üzerine elektrotlar bağlandı. Örnekler ayırıcı jele girinceye kadar 100 Volt gerilim uygulandı. Örnek ayırıcı jele geçtikten sonra ise gerilim 120 Volt’a çıkarıldı. Brom fenol mavisi jelin alt ucuna varınca akım kesildi ve jel tanktan uzaklaştırıldı.

Proteinlerin Membrana Transferi

Çalışmamızda yarı-kuru transfer tekniği kullanıldı. Bu amaçla, ATTO marka elektroblotlama sistemi (AE-6675 HorizBlot ve AE-8450 1000VC güç kaynağı) kullanıldı.

- ✓ Transferde kullanılacak polivinilidendiflorid (PVDF) membran metanol ile doyuruldu. Filtre kağıtları (1703956 Thick blot paper 15x20cm) 1X transfer tamponu (Transfer stok çözeltisi: Tris 30.3 g, Glisin 14 g, dH₂O, Total hacim 500 mL) ile ıslatıldı.

- ✓ Western sandviçi hazırlandı: 2 adet filtre kağıdı (+) yüklü bloğa yerleştirildi, üzerine membran (Millipore, İmmobilon P, Kat No: IPVH09120; Sigma) ardından poliakrilamid jel yerleştirildi. Daha sonra filtre kağıtları transfer solüsyonu ile ıslatılarak en üste yerleştirildi. Bu aşamalar sırasında arada hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. (-) yüklü blok kapatılarak 200 mA sabit akımda 2 saat süre ile transfer gerçekleştirildi. Transfer işlemlerini sonlandırmak için güç kaynağı kapatıldı ve sistemin kapağı açıldı. Membran dikkatlice alındı.

Bloklama

Spesifik olmayan bağlanmaların engellenmesi amacıyla bloklama yapıldı. Değişik süt tozu konsantrasyonları denenerek en uygun konsantrasyon (% 5 süt tozu) seçildi. Bu sonuçlar doğrultusunda, transfer sonrası proteinleri bağlamış olan membran, bloklama çözeltisi (% 5'lik süt tozu % 0.05'lik NP-40 içeren PBS çözeltisi) içinde 60 dakika oda sıcaklığında bloke edildi. Bu süre sonunda membran üç kez % 0.05'lik NP-40 içeren PBS çözeltisi (yıkama çözeltisi) ile 10 dakika süre ile yıkandı.

Primer Antikor İle İnkübasyon

% 0.05'lik NP-40 içeren PBS çözeltisi içinde %5'lik süt tozu hazırlandı. Bloklama sonrasında membranlar, 1/200 oranında dilüe edilmiş p-38 ve p-p38 (Santa Cruz, sc-17852; sc-101759) antikorları içeren %5'lik süt tozu ile +4⁰C'de gece boyu inkübe edildi. Bu süre sonunda ortamdaki bağlanmamış antikor yıkama çözeltisi (% 0.05 NP-40 içeren % 10 PBS) ile 3 kez 10 dakika süre ile oda sıcaklığında yıkandı.

Sekonder antikor ile inkübasyon

Yıkama sonrasında membran primer antikorunu tanıyan sekonder antikorlarla (goat anti-rabbit IgG-Horseradish Peroxidase Conjugated Affinity Purified Antibody, Santa cruise,sc-2004) 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Sekonder antikorlar p-38 ve p-p38 %5 süt tozu içinde 1/2000 oranında % 0.05'lik NP-40 içeren PBS çözeltisi içinde oranında hazırlandı. Bu sürenin sonunda membran tekrar yıkama çözeltisi ile 10 dakika süre ile 3 kez yıkandı.

Membran silme (strip) protokolü

0.2 M glisin, %1 SDS ve %2 NP-40 içeren pH 2.2 membran silme solüsyonunda membran 2 defa 10 dakika yıkandı. Ardından 10 dakika 2 kere PBS ile çalkalandı. Son olarak 2 defa 5'er dakika PBS-NP 40 solüsyonunda yıkandı ve membran tekrar primer antikorla inkübe edildi.

Görüntüleme

Sinyalin görünür hale getirilmesi amacıyla Pierce marka (32106) ECL plus kiti kullanıldı (sinyal oluşturma çözeltisi: kit içindeki peroksit ve enhancer solüsyonları 1:1 oranında karıştırılarak hazırlandı) Kit, *horseradish* peroksidaz enziminin hidrojen peroksit varlığında substratı olan luminolü oksitlemesi ve luminolün uyarılmış durumdan bazal duruma geçerken film üzerinde kemilüminesans ışımaya oluşturmaya ilkesine dayanmaktadır. Bu filmlerin dansitometrik incelenmesi, protein düzeyinin belirtilmesini sağlamaktadır. Film aşaması: Kaset içine şeffaf dosya yerleştirildi ve bu dosyanın içine membran kondu. Üzerine sinyal oluşturma çözeltisi eklendi. Kaset (Amersham, RPN 11649) içerisine karanlık odada film (Kodak Biomax Light Film, Katolog No: 1788207) yerleştirildi. Film banyosunda (Konica SRX-101) görüntü alındı. Bant yoğunlukları Image J bilgisayar programıyla saptandı. Yoğunluk p-p38/total p38 kat değişimi olarak ifade edildi.

3.7. Araştırma Planı

Projelendirme	Ocak 2013
Etik Kurul Onayı	Mayıs 2013
Deney hayvanları alışması	Nisan 2014
RT-PCR	Eylöl 2014
SOD,MDA, Aktif MMP-2/9	Eylöl-Ekim 2014
Western Blot analizleri	Ekim-Kasım 2014
Tez Yazımı	Ekim-Aralık 2014
Tez Teslimi	Ocak 2015

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Araştırma sonuçlarının istatistik analizi SPSS 19.0 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Gruplara ait ortalama değerler Mann Whitney U ve Kruskal-Wallis testi kullanılarak karşılaştırdı. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Veriler ortalama $\pm$ standart hata biçiminde verildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırmamız deney hayvanı çalışmasıdır. Bilindięi gibi etik kurallar göz önüne alındığında en az hayvan sayısı ile deney yapmak esastır. Bu yüzden elimizdeki materyaller çok kıymetliydi. Doğrudan organizmaya uyarlanması ve uygulaması her ne kadar hücre kültüründen daha yakın olsa da her bir hayvanın kendine özgü farklılıklarından dolayı çalışma oldukça hassaslık gerektiren bir çalışmaydı. MAPKinaz sinyal ileti yolaklarından sadece p38 çalışılmıştır. Taurinin sinyal ileti yolaklarına olan etkisinin daha net öğrenebilmemiz için diğer sinyal ileti yolaklarıda çalışılmalıdır.

3.10. Etik Kurul Onayı

Dokuz Eylöl Üniversitesi Tıp Faköltesi Deney Hayvanları Etik Kurulu 20 Mart 2013 tarih ve 03/05/2013 no.lu kararında; 10/2013 protokol numaralı çalışmamızın etik açıdan sakıncalı olmadığına karar vermiştir.

4. BULGULAR

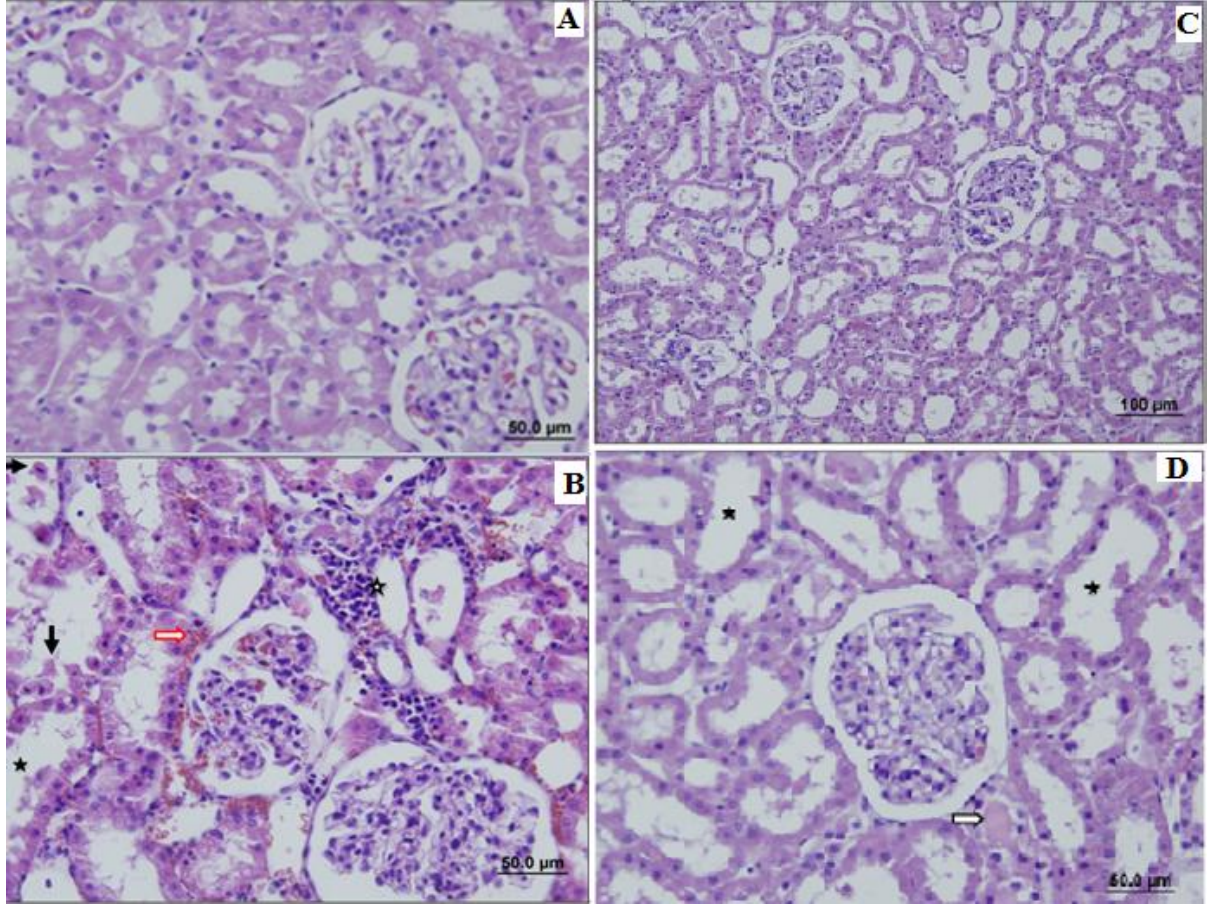
4.1. Histolojik Bulgular

Sham grubuna ait böbrek kesitleri incelendiğinde normal morfolojik özellikler gözlemlendi. Korteksin dışında fibröz kapsülün sağlam olarak yer aldığı, korteks ve medulla ayrımının rahatlıkla yapılabildiği gözlemlendi (Şekil 20A). Kortekste bulunan renal korpusküllerin normal yapıda olduğu, Bowman kapsülünün pariyetal ve visseral yaprağının normal histolojik yapıda olduğu belirlendi. Proksimal tübül ve distal tübül, Henle kulbu, kollektör tübüllerde yapıların normal olduğu gözlemlendi (Şekil 21A). Epitel hücreleri karakteristik yapı ve özelliklerini korumaktaydı. Herhangi bir hücre infiltrasyonu ve fırçası kenar kaybı gözlemlenmedi (Şekil 22A).

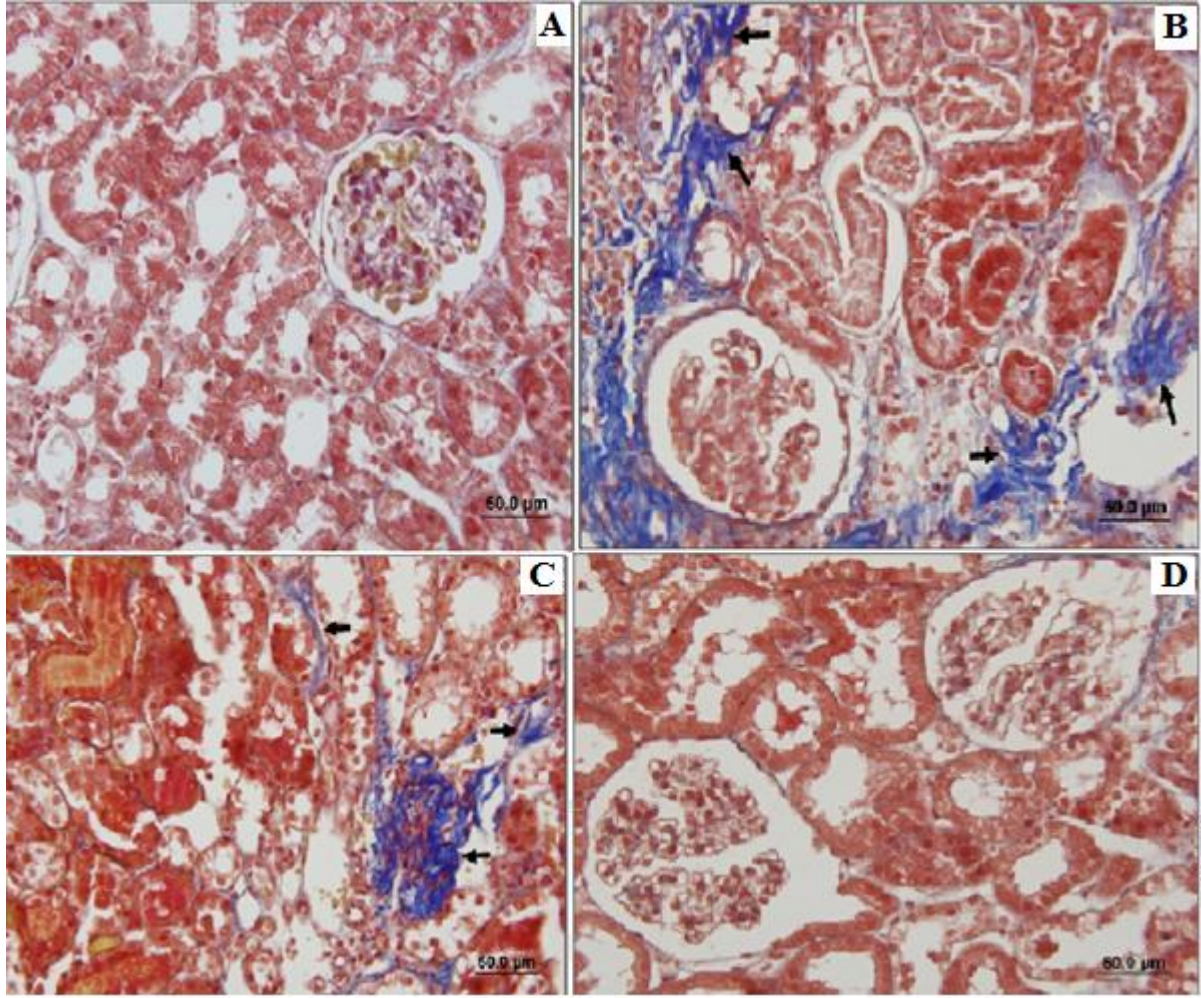
İskemi-reperfüzyon grubunda peritübüler alanda mononükleer hücre infiltrasyonu, proksimal tübül hücrelerinde fırçası kenar kaybı, tübüler atrofi, tübüler dilatasyon, ve vakuolizasyon gözlemlendi. Bazı tübüllerde proteinöz madde birikimi ile birlikte kast formasyonu ve tübül lümeninde hücre debrisleri izlendi. Kortekste bazı bölgelerde, damarlarda vazodilatasyon ve eritrosit ekstrevasyonu dikkati çekti (Şekil 20B, Şekil 21B, Şekil 21C, Şekil 22B).

Taurin grubunda kortikal bölgede özellikle peritübüler alanda mononükleer hücre infiltrasyonunda, tübül hücrelerinde gözlenen dejenerasyonlarda ve kortekste eritrosit ekstrevasyonunda iskemi-reperfüzyon göre azalma gözlemlendi. Tübülüslerde gözlenen fırçası kenar kaybı, tübüler atrofi, tübüler dilatasyon, vakuolizasyon, tübüllerde proteinöz madde birikimi ile birlikte tübül lümenine hücre debrisleri daha az oranda izlendi (Şekil 20C, Şekil 20D, Şekil 21D, Şekil 22C).

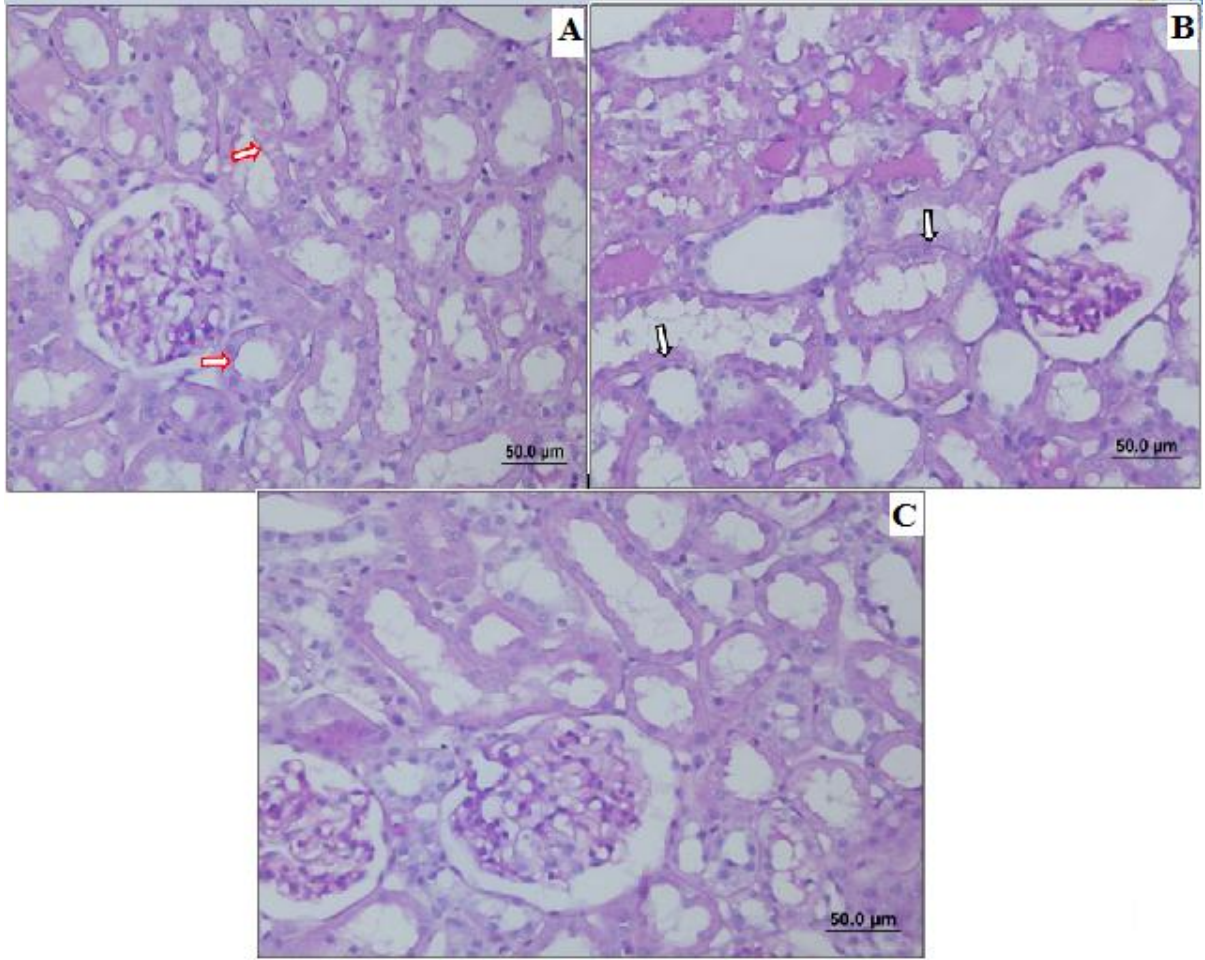
Gruplar arası istatistik yapıldığında iskemi/reperfüzyon grubunda sham grubuna göre artan yapısal değişikliklerin ($p=0.0004$), taurin grubunda anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır ($p=0.03$). Aynı şekilde tübüler değişimler sham grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak artmıştır ($p=0.0001$), bu artış taurin ile anlamlı ölçüde düşmüştür (0.004).



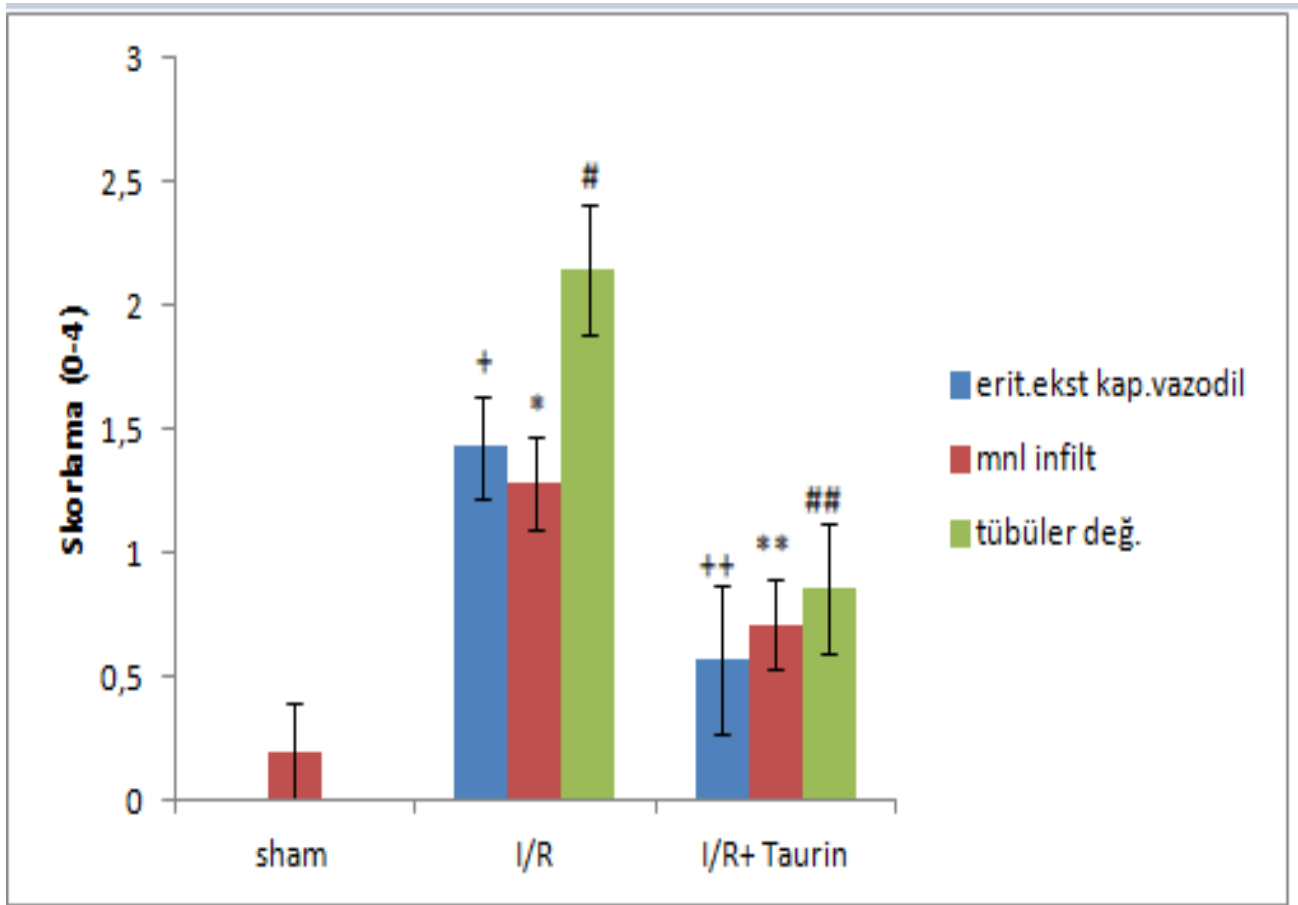
Şekil 20. H-E boyama ile böbrek dokularının incelenmesi A; Sham grubuna ait normal yapıdaki böbrek dokusuB;İskemi/Reperfüzyon grubuna ait böbrek dokusu C,D; Taurin grubuna ait böbrek dokusu mononükleer hücre infiltrasyonu (★), eritrosit ekstrasvazasyonu (⇒), tübüler hücre debrisleri (→) ve tübüler dilatasyon (★), tiroidizasyonu (⇨), H-E



Şekil 21. Masson Trikrom boyama ile böbrek dokularının incelenmesi A; Sham grubuna ait normal yapıdaki böbrek dokusu B,C; İskemi/Reperfüzyon grubuna ait böbrek dokusu D ; Taurin grubuna ait böbrek dokusu; peritübüler kollagen (➡➡)



Şekil 22. PAS boyama ile böbrek dokularının incelenmesi A; Sham grubuna ait normal yapıdaki böbrek dokusunda proksimal tübül epiteli ve fırça kenar (⇒) B; İskemi/Reperfüzyon grubuna ait böbrek dokusunda tübüler bazal membran kalınlaşması (⇨) C ; Taurin grubuna ait böbrek dokusu



Şekil 23. Histolojik skorlamaların değerlendirilmesi, Erit.ekst kap.vazodil için; +p<0,05 vs I/R ++p<0,05 vs I/R+Taurin; Mnl infilt için; *p<0,05 vs Sham **p<0,05 vs I/R; Tübüler değ. için; #p<0,05 vs I/R ##p<0,05 I/R+Taurin

erist. ekst/ kap. vazodil: Eritrosit ekstravazasyonu/ kapiler vazodilasyonu

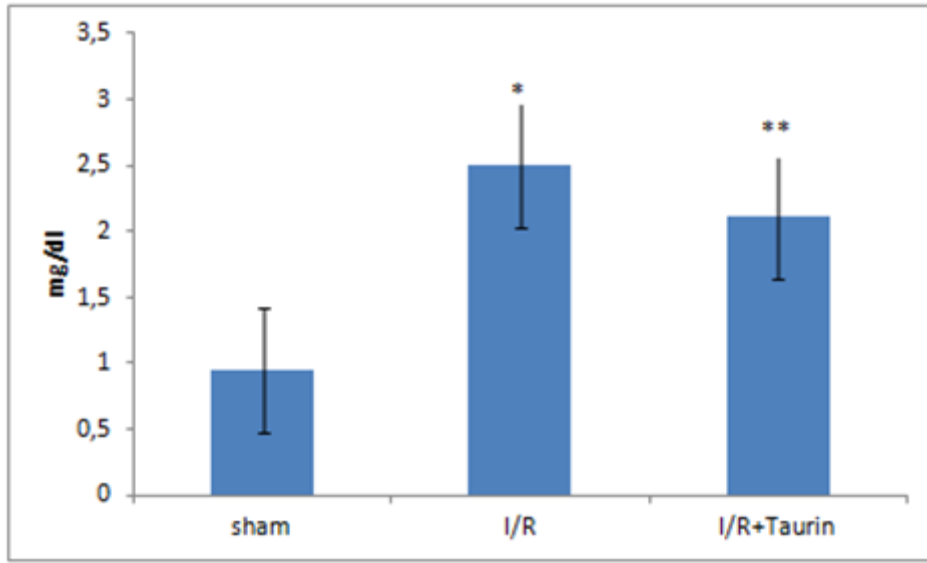
mnl infilt: Mononükleer hücre filtrasyonu

tübüler deę. : Tübüler değişim

4.2. Biyokimyasal Bulgular

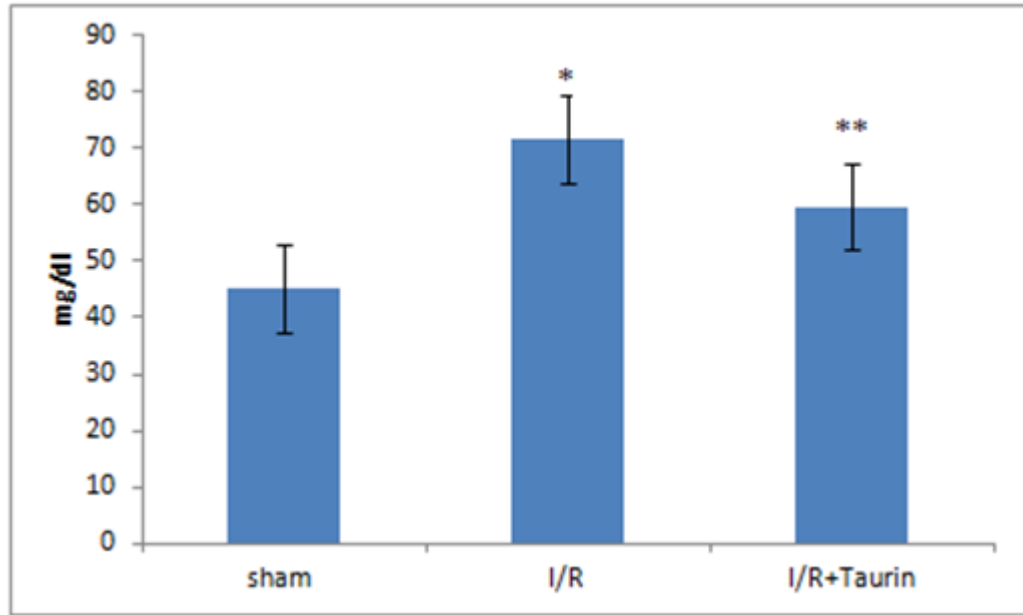
4.2.1. Serum Kreatinin ve BUN Düzeyleri

Sham grubu ile karşılaştırıldığında, kreatinin iskemi reperfüzyon grubunda anlamlı olarak arttı (0.946 ± 0.071 mg/dl, 2.503 ± 0.071 mg/dl, sırasıyla. $p=0.0000$) Bu artışın taurin ile anlamlı olarak azaldığı saptandı ($2,112 \pm 0.044$ mg/dl; $p=0.0009$).



Şekil 24. Serumda kreatinin düzeyi; * $p<0,05$ vs Sham ** $p<0,05$ vs I/R

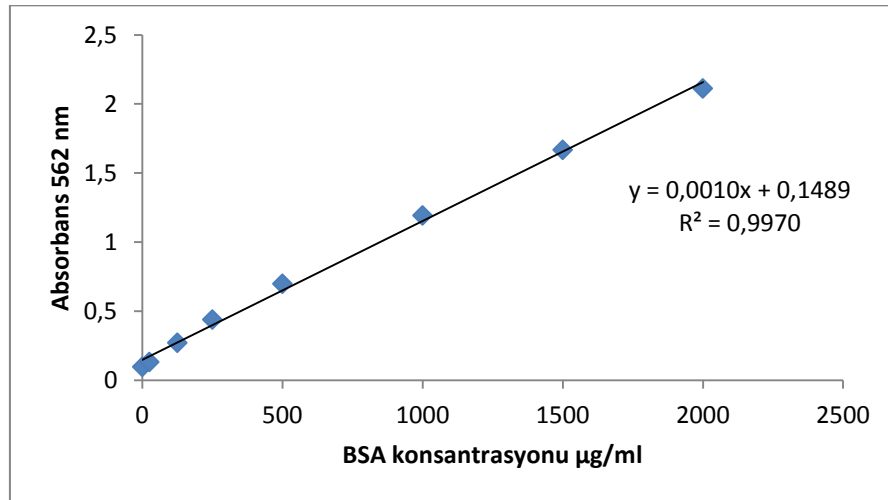
Sham grubu ile karşılaştırıldığında, BUN düzeyleri I/R grubunda sham grubunda göre anlamlı olarak arttı (45.14 ± 3.61 mg/dl, 71.64 ± 1.47 mg/dl, sırasıyla. $p=0.0008$) Bu artış taurin ile istatistiksel olarak anlamlı olarak azaldı (59.72 ± 2.63 mg/dl; $p=0.003$).



Şekil 25. Serum BUN düzeyi; *p<0,05 vs Sham **p<0,05 vs I/R

4.2.2. Doku Homojenatında Protein Düzeyleri

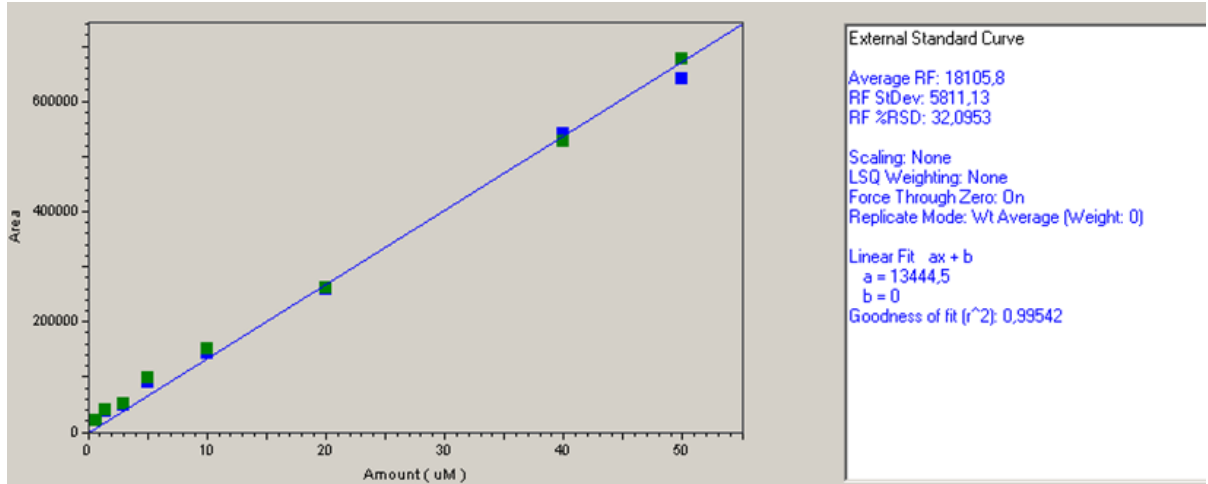
Her analiz için uygun olan fraksiyonlarda gerçekleştirilen protein analizi için temsili standart kalibrasyon eğrisi Şekil 26 'da gösterilmiştir.



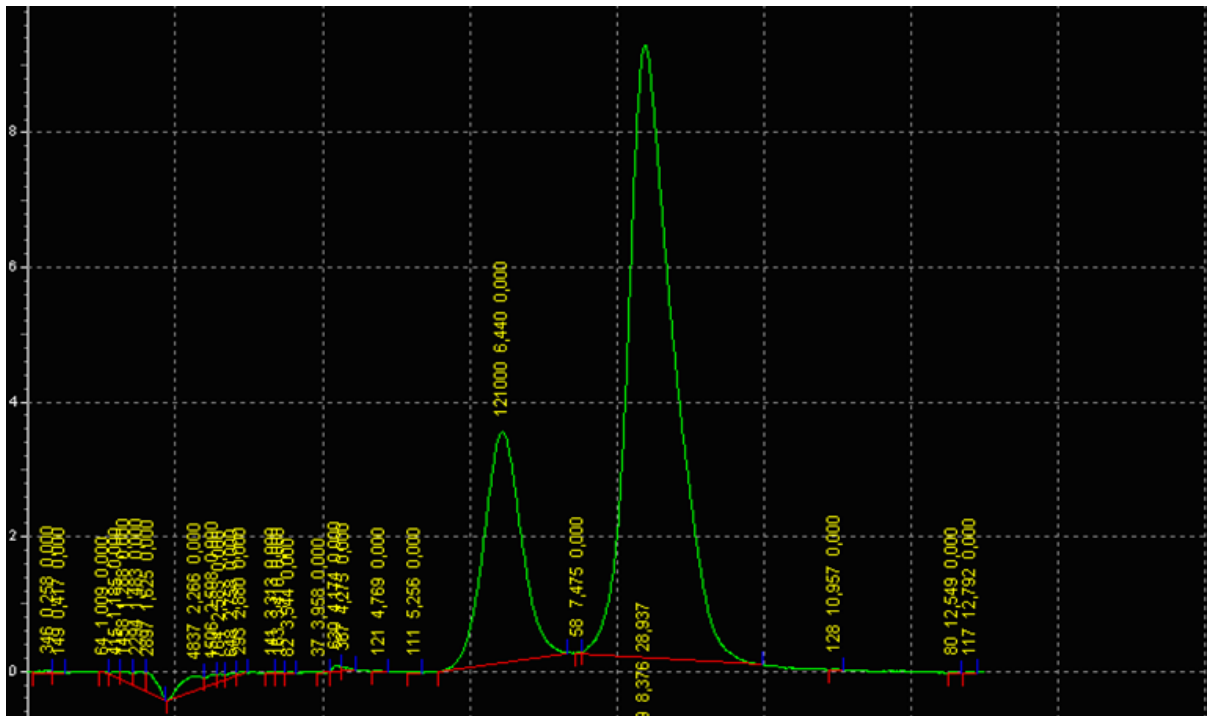
Şekil 26. Temsili BCA standart grafiği

4.2.3. Böbrek Doku Homojenatında MDA Düzeyleri

HPLC cihazından alınan ölçümlere dayanarak standart grafiği oluşturuldu. Hesaplamalar bu grafiğe göre cihaz tarafından kromotogram alanı hesaplandı.

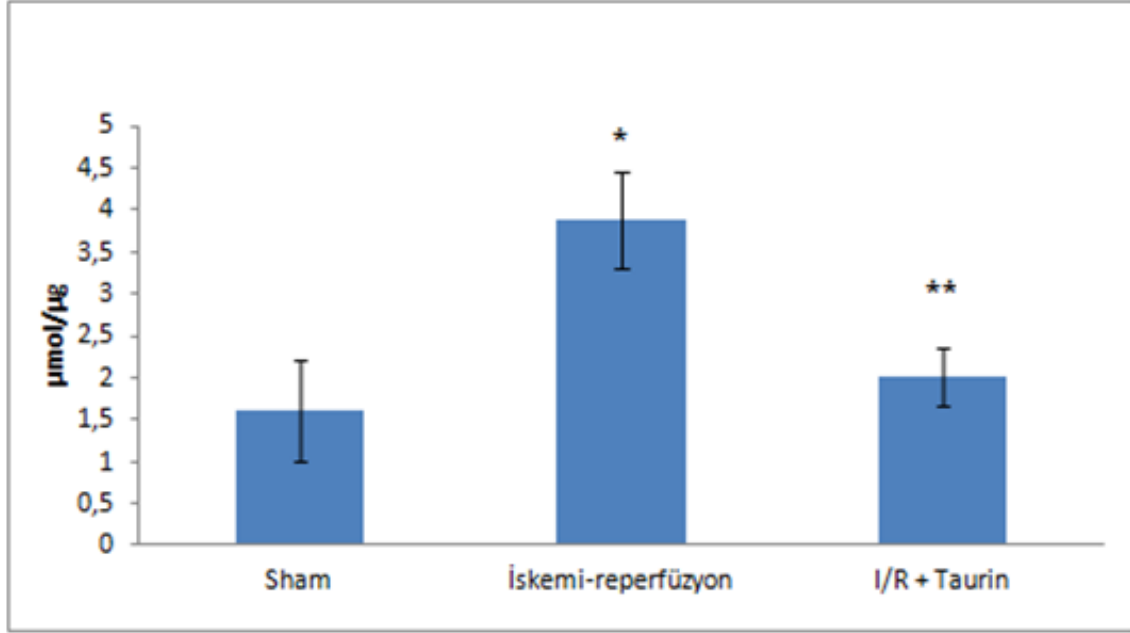


Şekil 27. MDA (1,1,3,3- tetraetoksi-propan) standart grafiği



Şekil 28. Temsili MDA kromatogram

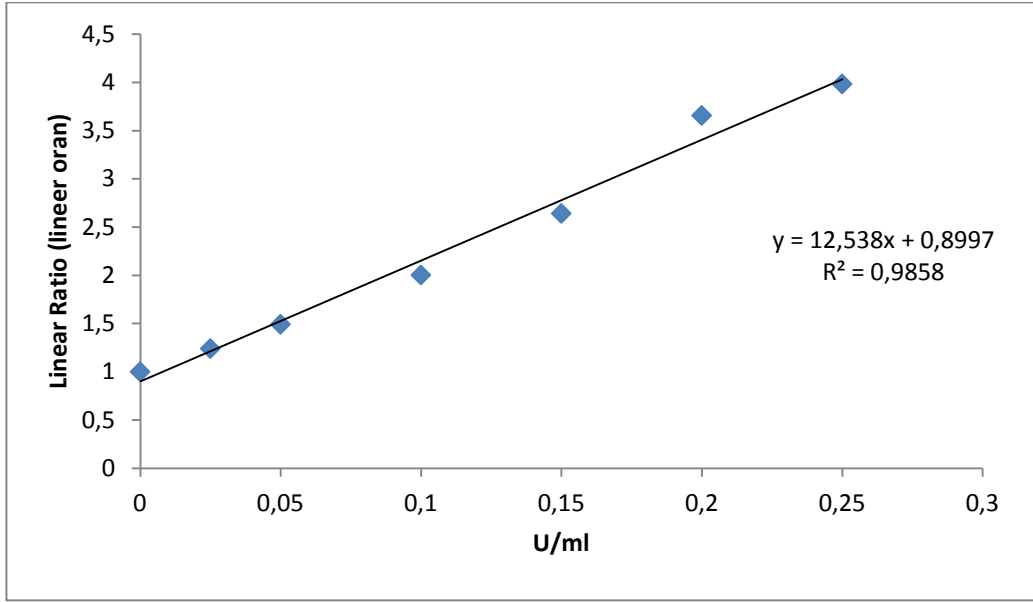
Sham grubu ile karşılaştırıldığında, MDA iskemi reperfüzyon grubunda anlamlı olarak arttı ($1.611 \pm 0.608 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$, $3.876 \pm 0.573 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$; sırasıyla. $p=0.023$) Bu artışın taurin ile anlamlı olarak azaldığı saptandı ($2.021 \pm 0.345 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$; $p=0.017$).



Şekil 29. Böbrek dokularında gruplar arası MDA düzeyleri; * $p<0,05$ vs Sham
** $p<0,05$ vs I/R

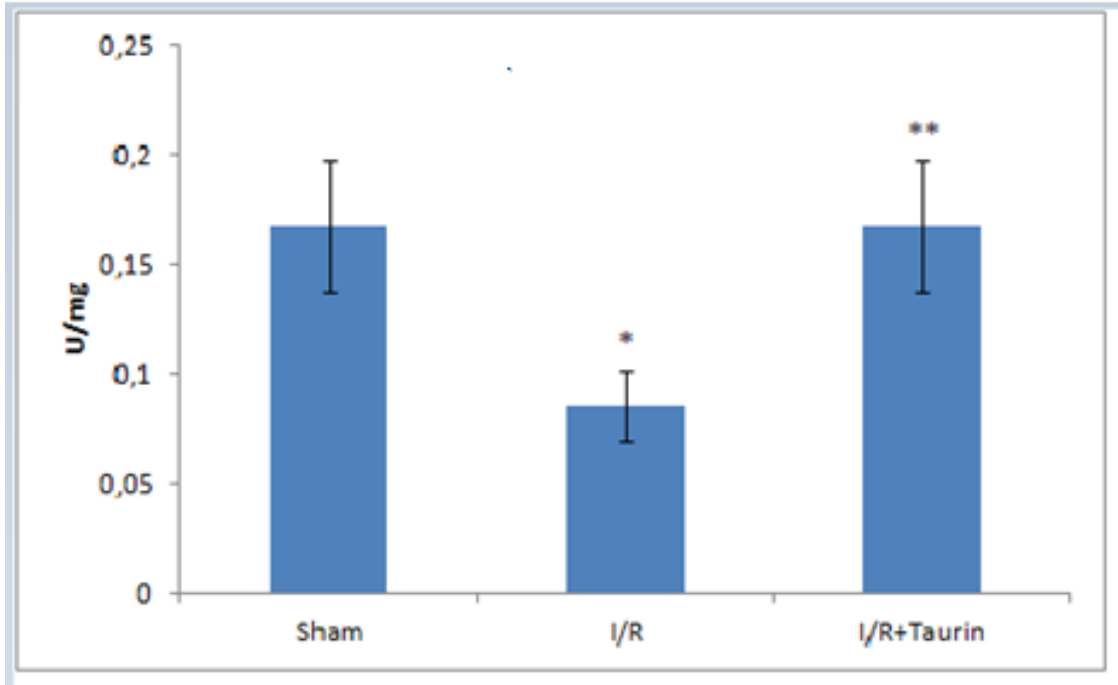
4.2.4. Böbrek Doku Homojenatında SOD Düzeyleri

SOD standart kalibrasyon eğrisi Şekil 30' da gösterilmektedir. SOD enzim aktivite düzeyleri bu grafikten yararlanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 30. SOD standart grafiği

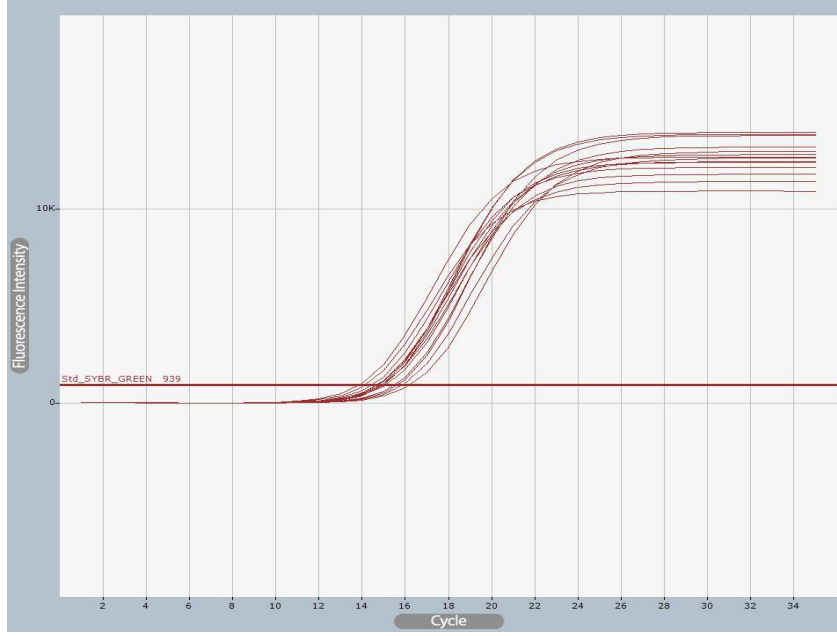
Sham grubu ile karşılaştırıldığında, SOD iskemi reperfüzyon grubunda anlamlı olarak azaldı. (0.0073 ± 0.0013 U/mg, 0.0037 ± 0.0007 U/mg; sırasıyla. $p=0.04$) Bu azalışın taurin ile anlamlı olarak arttığı saptandı (20.0071 ± 0.0012 U/mg ; $p=0.05$).



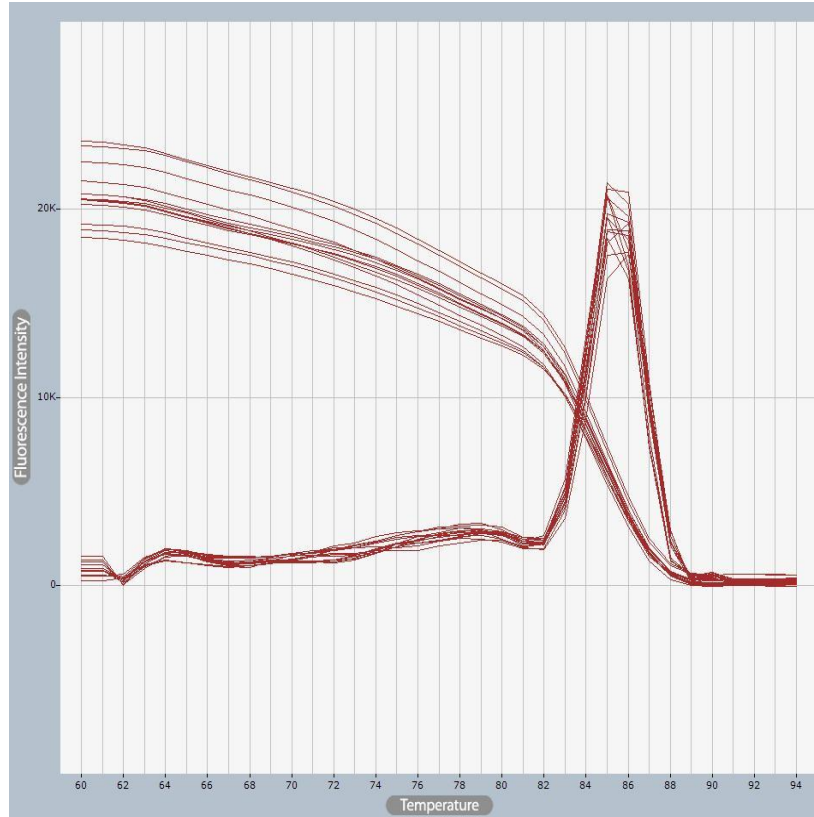
Şekil 31. Böbrek dokularında SOD düzeyleri; * $p < 0,05$ vs Sham ** $p < 0,05$ vs I/R

4.2.5. MMP-2, MMP-9 mRNA Ekspresyonları

Housekeeping gen olarak β -aktin primeri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Exicycler 3 programı kullanılarak hesaplanmış ve her bir gen için ayrı ayrı her kuyucuktaki floresan değerini gösteren amplikasyon analizi ve reaksiyon sonucunda oluşan ürünün erime sıcaklığını gösteren erime eğrisi analizi yapılmıştır. Amplikasyonda primerin çalıştığını ürün oluştuğunu; erime eğrisinde ise oluşan ürünün tek olduğunu her hangi bir dimerleşme ya da nonspesifik bir ürünün olmadığını görüyoruz. β -aktine ait amplikasyon ve erime eğrisi Şekil 32 ve Şekil 33' te verilmektedir. Sonuçlar karşılaştırılmalı Ct yöntemi ile hesaplanmıştır.

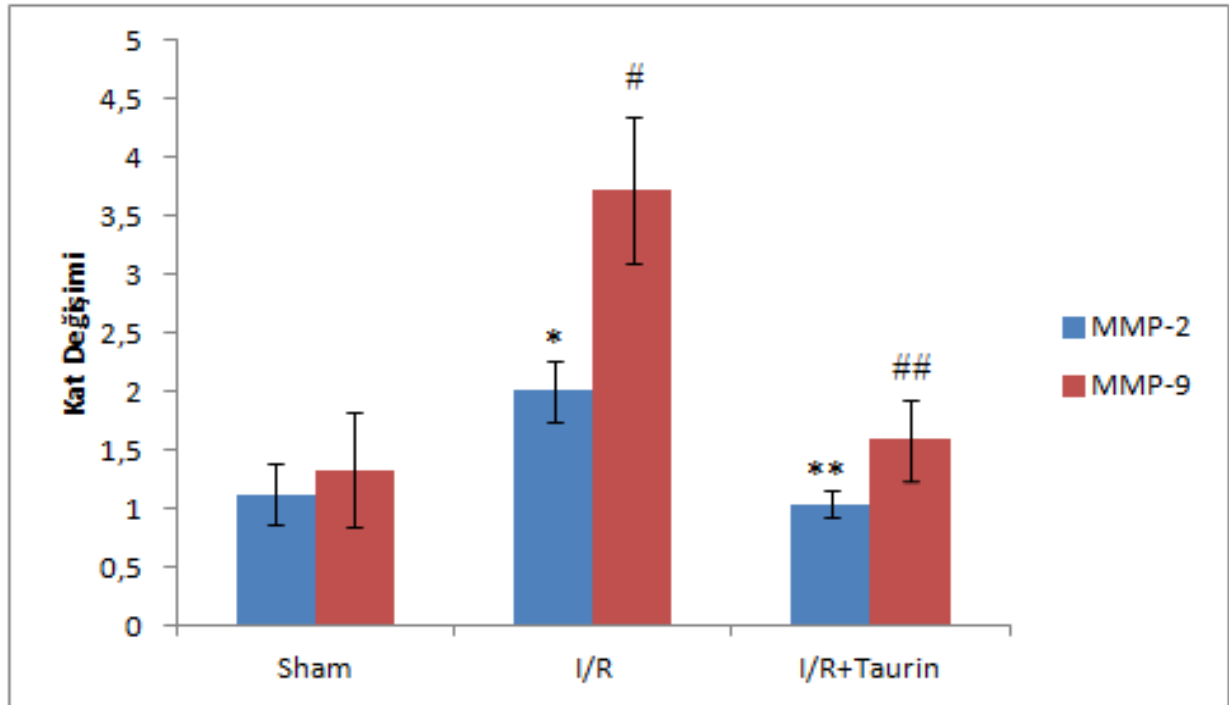


Şekil 32. β -aktin primeri ile yapılan q-PCR sonucunda elde edilen amplikasyon grafiği



Şekil 33. β -aktin primeri ile yapılan q-PCR sonucunda elde edilen erime grafiği

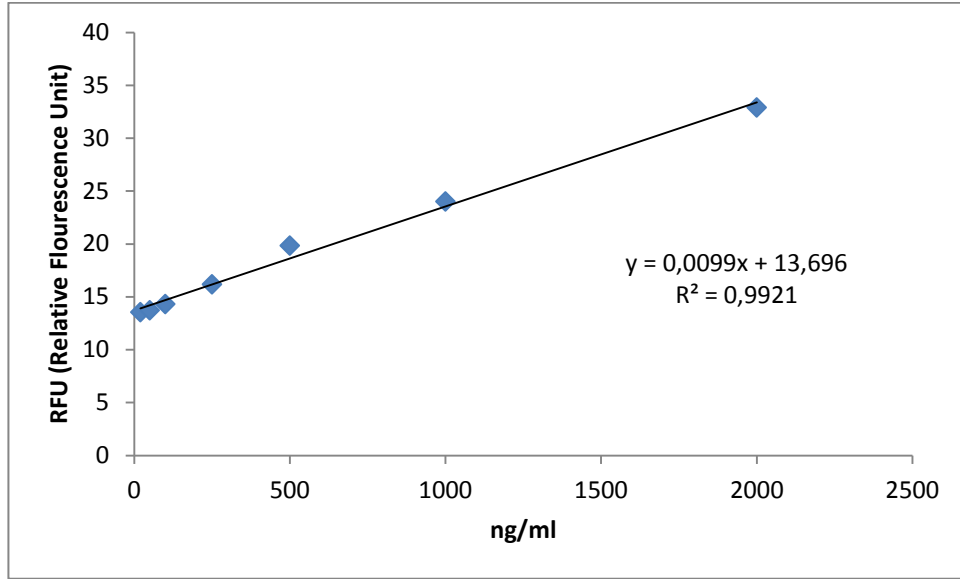
Sham, iskemi-reperfüzyon ve iskemi-reperfüzyon + taurin gruplarında böbrek dokusunda MMP-2 ve MMP-9 için mRNA düzeyinde ekspresyonu değerlendirilmiş ve β -aktine oranlanıp kat değişimi olarak ifade edilmiştir. MMP-2 için; sham grubu ile karşılaştırıldığında iskemi reperfüzyon grubunda artma, taurin grubunda ise azalma saptanmıştır. Bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlıdır (1.12 ± 0.26 , 2.01 ± 0.26 , 1.04 ± 0.12 ; sırasıyla. $p=0.05$, $p=0.00$). MMP-9 için; sham grubu ile karşılaştırıldığında iskemi reperfüzyon grubunda istatistiksel olarak büyük bir artış saptanmıştır (1.34 ± 0.43 , 3.73 ± 0.83 ; sırasıyla. $p=0.04$). Gözlemlenen bu artışın taurin ile azalışı ise anlamlı olarak tespit edilmiştir (1.59 ± 0.45 ; $p=0.03$)



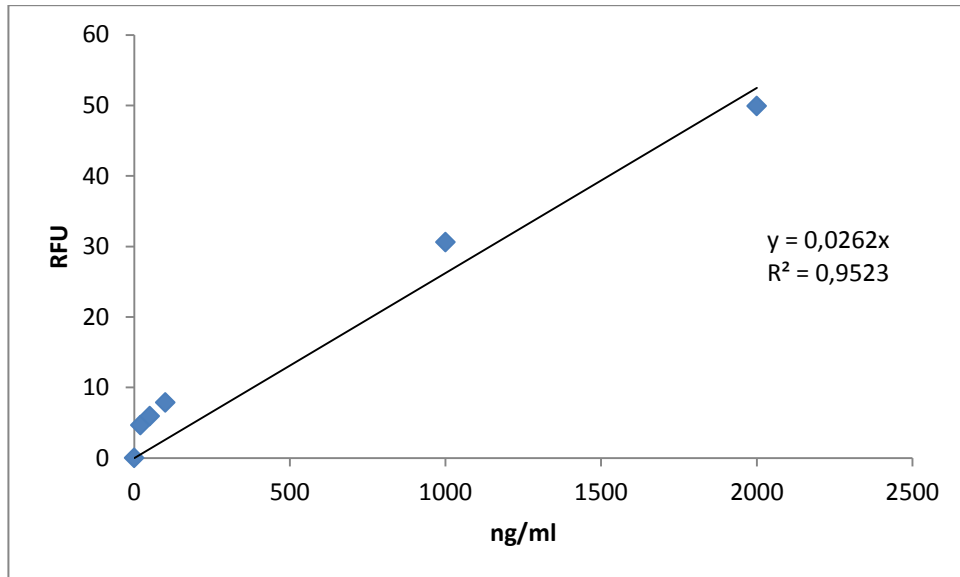
Şekil 34. Böbrek dokularında gruplar arası MMP-2 ve MMP-9 mRNA ekspresyon düzeyleri

MMP-2 için; * $p<0,05$ vs Sham ** $P<0,05$ vs I/R, MMP-9 için; # $p<0,05$ vs Sham
$p<0,05$ vs I/R

4.2.6. MMP-2 ve MMP-9 Aktivite Düzeylerinin Belirlenmesi

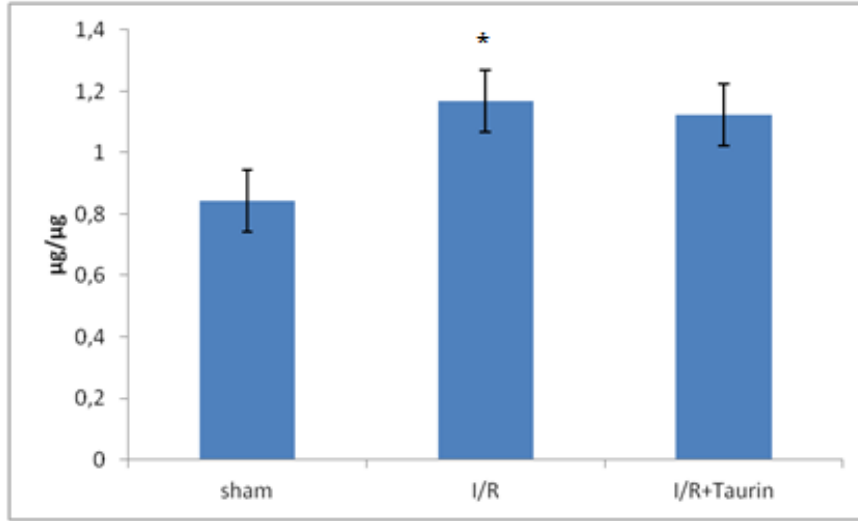


Şekil 35. MMP-2 aktivite standart grafiği



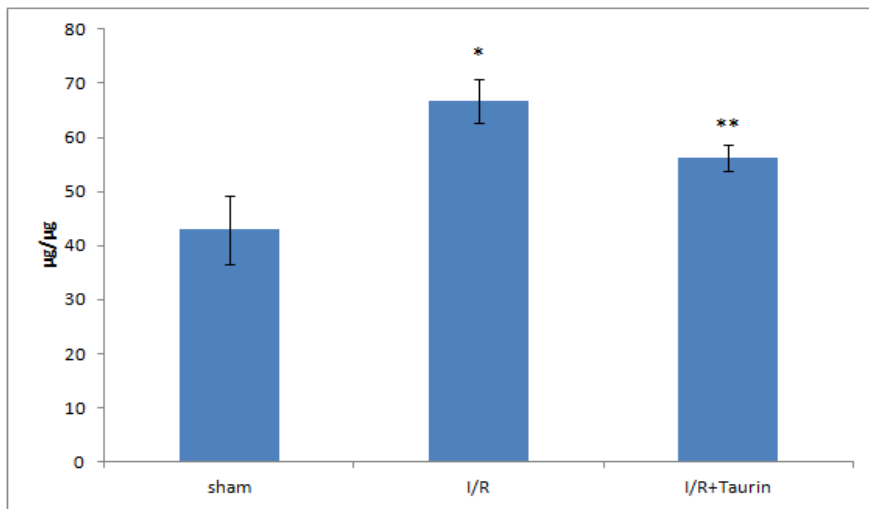
Şekil 36. MMP-9 aktivite standart grafiği

MMP-2 için; sham grubu ile karşılaştırıldığında iskemi/reperfüzyon grubundaki artış anlamlıdır (0.844 ± 0.069 , 1.16 ± 0.075 ; sırasıyla. $p=0.01$). Bu artış taurin ile azalmış olmasına rağmen istatistiksel anlamlığa ulaşamamıştır (1.12 ± 0.056 , $p=0.65$).



Şekil 37. MMP-2 aktivite düzeyi * $p<0,05$ vs Sham

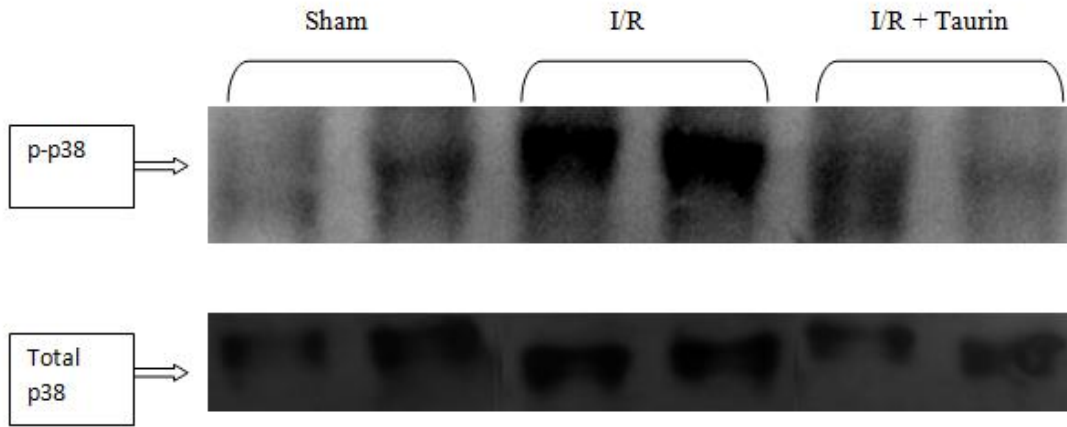
MMP-9 için; Sham grubu ile karşılaştırıldığında iskemi/reperfüzyon grubundaki artış anlamlıdır (42.9 ± 6.3 , 66.6 ± 3.9 ; sırasıyla. $p=0.01$). Bu artışın taurin ile anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir (56.2 ± 2.3 ; $p=0.04$).



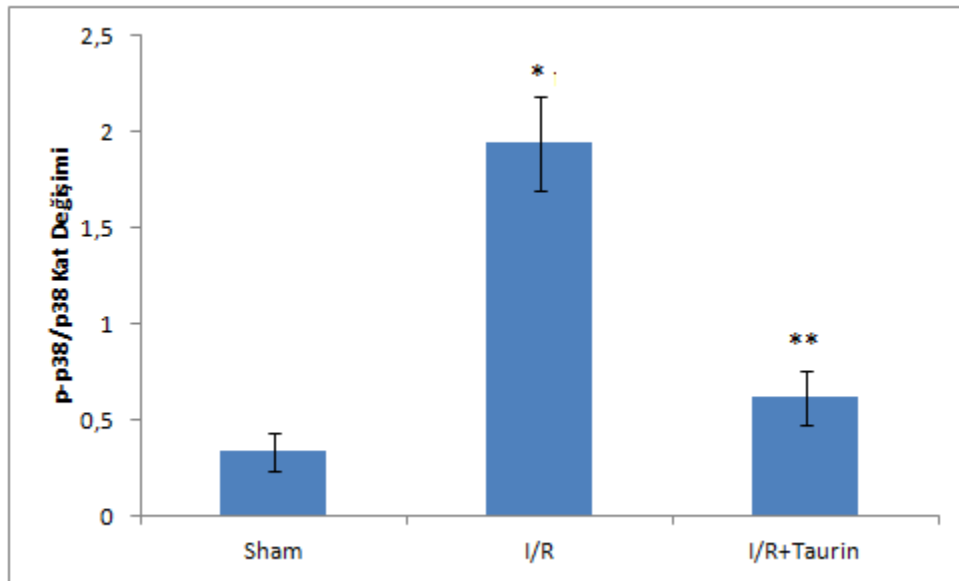
Şekil 38. MMP-9 aktivite düzeyi; * $p<0,05$ vs Sham ** $p<0,05$ vs I/R

4.2.7 Western Blot ile p38 Protein Düzeyleri

Şekil 39' da temsili western blot görüntüsü verilmektedir. Western Blot analizi ile her örneğe ait elde edilen bantlar dansitometrik analiz ile değerlendirildi ve p-p38/p-38 kat değişimi elde edildi. Sham grubu ile karşılaştırıldığında iskemi/reperfüzyon grubunda p-p38/p38 kat değişimi anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0.00$). Bu artışın taurin ile anlamlı olarak azaldığı saptandı ($p=0.01$).



Şekil 39. p-p38 ve total p38 protein ekspresyonları için temsili western blot görüntüsü



Şekil 40. p-p38 ve total p38 için kat değişiminin dansitometrik analiz ile belirlenmesi; * $p<0,05$ vs Sham ** $p<0,05$ vs I/R

5.TARTIŞMA

Çalışmamızda sıçanlarda renal iskemi/reperfüzyon modelinde taurinin morfolojik ve işlevsel olarak renal hasarlanmayı azalttığını gösterdik. Taurin bu azaltıcı etkisini ECM'yi regüle eden proteinler üzerinden göstermektedir. Sıçan böbrek dokularında taurin ile MMP-2 ve MMP-9 mRNA ekspresyonu ve enzim aktiviteleri istatistiksel olarak azalmış ve bu enzimleri regüle eden MAPKinaz sinyal yolağındaki oksidatif stresle indüklenen p38 protein ekspresyonunda da anlamlı azalma tespit edilmiştir.

Renal iskemi/reperfüzyon modelinde bulgular morfolojik ve fonksiyonel olarak değerlendirilmiştir. Daha önceki çalışmalardan iskemi/reperfüzyona uğrayan organların yapısal olarak değişiklik gösterdiği bilinmektedir. İskemi/reperfüzyon hasarında sıçan böbreklerindeki morfolojik değişiklikler tubular dilatasyon ve fırçamsı kenar kaybıdır (53). Çalışmamızda da I/R hasarına maruz bırakılan sıçan böbreklerinde tubular dilatasyon ve fırçamsı kenar kaybı gibi karakteristik morfolojik değişiklikler saptanmıştır. Histolojik olarak gözlemlenen bu bulgular, I/R hasarı sonrası serumda bakılan ve renal fonksiyon göstergesi olan kreatinin ve BUN seviyesinde saptanan anlamlı artış ile uyumludur. BUN ve kreatinindeki bu artış literatürdeki daha önceki renal I/R hasarını gösteren çalışmalarla da desteklenmektedir (54,55). Taurin uygulaması renal morfolojide ve fonksiyonlarda anlamlı iyileşmeler ile sonuçlandı. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak da anlamlıdır. Taurinin renal iskemi/reperfüzyon hasarı üzerine etkisini araştıran çalışmalar yönünden literatür incelendiğinde kısıtlı sayıda çalışmalara rastlanılmaktadır. Mozaffari ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, taurinin renal iskemi/reperfüzyon hasarında histolojik hasarları azaltmasına yönelik saptanan bulgular çalışmamızın bulguları ile paralellik göstermektedir (56). Ayrıca taurinin, renal I/R hasarında artmış kreatinin ve BUN düzeylerini azaltmasına yönelik bulgular da diğer çalışmalarda bildirilmektedir (57-59). Zhang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise sıçanlarda intestinal iskemi/reperfüzyon sırasındaki organ hasarlarına bakılmış ve taurinin meydana gelen hasarı azalttığı tespit edilmiştir (60). Bizim çalışmamızda da oluşturulan renal iskemi/reperfüzyon modelinde artan hasara karşı taurinin iyileştirici etkisi saptanmıştır.

İskemi/reperfüzyon hasarı sırasında reaktif oksijen türlerinin oluşumunun doku hasarı ile ilişkili olduğu bilinmektedir (25). ROT' lar hücre membranında lipit pereoksidasyonu yoluyla hasara sebep olur. MDA lipit peroksidasyonunun son ürünüdür ve protein

oksidasyonuna da sebebiyet vererek oksidatif hasarın artmasında rol oynar. Bununla birlikte organizmanın oksidatif hasara karşı bir savunma mekanizması vardır. Bu savunma mekanizmasında rol oynayan SOD, süperoksit anyonunu hidrojen peroksit ve oksijene çeviren antioksidan bir enzimdir. Bu sebeplerden dolayı çalışmamızda oksidatif hasar belirteci olarak MDA, savunma mekanizması adına da SOD bakıldı. Elde edilen sonuçlar ise hasar gurubunda MDA' nın anlamlı artış gösterdiği, SOD' un ise anlamlı olarak azaldığı yönündedir. Literatür incelendiğinde çalışmamızın daha önce renal iskemi/reperfüzyon modelleri ile yapılan çalışmaların bulguları ile benzer olduğu görülmektedir (61-63). Wang ve arkadaşları renal I/R modelinde gerçekleştirdikleri çalışmada, I/R sonrası BUN, kreatinin ve MDA' da artış, SOD seviyelerinde ise azalma saptamışlardır. Bu bulgular doğrultusunda, I/R süresince ortaya çıkan oksidatif hasarı renal hasar ile ilişkilendirmişlerdir. Yamanobe ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada ise SOD ^{-/-} farelerde renal iskemi reperfüzyon araştırılmıştır. SOD ^{-/-} farelerde SOD ^{+/+} farelere göre daha fazla hasar tespit edilmiştir (64). Rasoulion ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir diğer çalışmada ise, sıçanlara 40 dakika iskemi ve 20 dakika reperfüzyon uygulanmış ve bunun sonucunda SOD'un arttığını buna karşılık MDA düzeyinin değişmediğini göstermişlerdir (65). Çalışmamızda taurin, renal I/R süresince artan MDA düzeyini anlamlı olarak azaltırken, SOD seviyesini ise anlamlı olarak arttırdı. Bu bulgularımızın taurinin antioksidan özelliğinin bir göstergesi olabileceğini düşünmekteyiz. Literatür incelendiğinde, renal I/R hasarında taurinin MDA ve SOD üzerine olan etkisini araştıran çalışmalara rastlanmamaktadır. Sadece tek bir çalışmada, taurinin renal I/R hasarında I/R süresince artan MDA düzeyini düşürdüğü gösterilmiştir (66). Bu çalışma ve taurinin farklı organlarda oluşturulan I/R hasarı çalışmalarında SOD seviyesini arttırmaya, MDA düzeyini ise düşürmeye yönelik bulguları ile, bizim çalışmamızın bulguları uyum göstermektedir (67,68).

İskemi/reperfüzyon süresince oluşan ROT'ların MMP'leri aktive ettiği bildirilmektedir (37). Bu doğrultuda taurinin antioksidan özelliğini, renal I/R hasarında ECM regülasyonunda rol oynayan MMP-2 ve MMP-9' un mRNA ve enzim aktivitesi üzerine olan olası azaltıcı etkisini değerlendirerek araştırdık. Literatür incelendiğinde renal I/R modellerinde MMP-2 ve MMP-9 mRNA ekspresyonu üzerine yapılan çok az çalışma vardır. Caron ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada I/R hasarı sonrası MMP-2 ve MMP-9 mRNA ekspresyonuna bakılmıştır. Araştırmacılar hem MMP-2 hem de MMP-9 mRNA düzeyinde I/R sonrası artış olduğunu saptamışlar ve özellikle MMP-9 mRNA

ekspresyonunun daha çok indüklendiğini göstermişlerdir (69). Bununla birlikte literatürde renal I/R hasar sonrası MMP-2 ve MMP-9 protein ekspresyon ve aktivitelerini araştıran çalışmalara daha sık rastlanmaktadır. Bu çalışmalar sonucunda I/R sonrası artmış MMP-2 ve MMP-9' un akut böbrek hasarının patogeneğinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (55,56,70). MMP-2^{-/-} farelerde renal I/R sonucu gelişen akut böbrek hasarının MMP-2^{+/+} farelere göre daha az olduğu bildirilmektedir (71). Lee ve arkadaşları ise MMP-9 gen delesyonunun iskemik akut hasarında mikrovasküler kaybı azalttığını saptamışlardır (72). Geniş spektrumlu MMP inhibitörü olan marimastat kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada, sıçanlarda renal I/R hasarının azaldığı gösterilmiştir (73).

Renal I/R sonrası artmış olan MMP-2 ve MMP-9 'un protein ekspresyon ve enzim aktivite düzeylerini inceleyen çalışmalarda daha çok immunohistokimyasal yöntemler ve jelatin zimografi yöntemi kullanıldığını görmekteyiz. İmmunohistokimyasal yöntemler ile MMP-2 ve MMP-9 protein ekspresyonunun daha çok renal tübüllerde olduğu gösterilmiştir (48,70). Renal tübülerde eksprese olan bu MMP'lerin inflamatuvar hücreler tarafından üretildiği düşünülmektedir (74). Çalışmamızda histolojik olarak göstermiş olduğumuz tübüler hasarın bu bulgular ile ilişki olduğunu düşünmekteyiz. Çalışmamızda I/R süresince değerlendirdiğimiz MMP-2 ve MMP-9 mRNA ekspresyonu gerçek zamanlı PCR yöntemi ile, enzim aktivite düzeyleri ise kantitasyona yönelik florometrik temelli yöntem ile araştırılmıştır. Çalışmamızda I/R süresince meydana gelen MMP-2 ve MMP-9 mRNA ekspresyon ve aktivite artışlarına yönelik bulgularımız yukarıda sözü edilen daha önce gerçekleştirilmiş çalışmalarla uyumludur (71,72). Taurin uygulamasında ise mRNA ekspresyonlarındaki ve MMP-9 aktivitesindeki artmanın anlamlı olarak azaldığı tespit edilmişken, MMP-2 enzim aktivitesindeki azalışta anlamlılık yakalanamamıştır. MMP-9 ve MMP-2' nin post transkripsiyonel regülasyonları birbirinden farklıdır. MMP-9' un intrasellüler aktivasyon mekanizması TIMP-1'ler aracılığı ile; MMP-2' nin ise aktivasyonu TIMP-2 bağımlı MT-1-MMP aracılığı ile gerçekleşir. TIMP-2 dual fonksiyona sahip olup düşük konsantrasyonlarda aktivasyona aracılık ederken, yüksek konsantrasyonlarda ise inhibisyona neden olur. Bu bilgilere dayanarak taurinin I/R süresince artan MMP-2 aktivasyonu üzerine etkileri olabilmesi için TIMP-2 ekspresyonun üzerine de arttırıcı etkiye sahip olması gerektiğini öngörmekteyiz. Literatürde, taurinin renal I/R süresince artan MMP-2 ve MMP-9 mRNA ekspresyonları ve enzim aktivite düzeylerine yönelik etkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Taurinin renal I/R süresince artan MMP-2 ve MMP-9

mRNA ekspresyonları ve MMP-9 enzim aktivite düzeylerine azaltıcı etkisi literatür için özgündür.

MMP'lerin ekspresyonunun düzenlenmesinde MAPKinaz sinyal ileti yollarının (p38 kinaz, c-Jun N-terminal Kinaz (JNK) ve ERK yolağı) rolü olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda odaklandığımız p38 sinyal ileti yolağının reaktif oksijen türleri ile indüklenebileceği gösterilmiştir. Diğer bir ifade ile, p38 MAPK oksidatif stres sensörü olarak çalışmaktadır (21). Tüm bu bulgular ışığında, renal I/R süresince artan MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonunun, meydana gelen oksidatif stres ile indüklenen p38 sinyal ileti yolağı ile ilişkili olabileceğini düşündük ve çalışmamız p38 sinyal ileti yolağı çalışılarak genişletildi. Çalışmamızda sinyal ileti yolağını değerlendirmek amacı ile fosforile p38 (p-p38) ve total p38 protein ekspresyonları western blot yöntemi ile analiz edildi. Yapılan analizlerde sham grubuna göre iskemi/reperfüzyon hasarında p-p38/ total p38 kat değişiminin, anlamlı olarak arttığı, bununla birlikte bu artışın taurin ile anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır. Literatür incelendiğinde, I/R hasarında indüklenen p38 ekspresyonunu gösteren kısıtlı sayıda çalışmaya rastlanılmaktadır. Ashraf ve arkadaşları tarafından *in vitro* koşullarda fare atriye miyosit hücrelerinde hipoksi/reoksijenasyon uygulayarak gerçekleştirilen çalışmada hipoksi/reoksijenasyon süresince indüklenen p38'in, hücre ölümüne yol açtığı bildirilmektedir (75). Meldrum ve arkadaşlarının yine *in vitro* koşullarda hipoksi/reoksijenasyon uygulayarak renal tubuler epitel hücrelerinde yaptıkları çalışmada da, iskemi sırasında renal tubüllerde TNF- α üretiminin arttığı ve bunun sonucunda meydana gelen TNF- α bağımlı apoptozda p38 MAPKinaz sinyal ileti yolağının rol aldığı gösterilmiştir (76). Deney hayvanlarında gerçekleştirilen renal I/R modellerinde de I/R süresince indüklenen p38 sinyal ileti yolağını hücre ölümü ile ilişkilendiren çalışmalara rastlanmaktadır (77,78). Çalışmamızda odakladığımız renal I/R süresince artan MMP-2 ve MMP-9 ve bu enzimlerin regülasyonunda rol oynayan p38 sinyal ileti yolağını birlikte inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bunu ek olarak taurinin de renal ve diğer organlar üzerine gerçekleştirilen I/R hasarında p38 sinyal ileti yolağı üzerine etkisini araştıran çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda saptadığımız renal I/R süresince artan MMP-2, MMP-9 ve p38 ekspresyonuna taurinin azaltıcı etkisi literatür için yeniliktir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar dikkate alındığında I/R hasarı süresince artan p38 ekspresyonunun hücre ölümüne yol açtığı gösterilmiştir. Yine I/R süresince artan MMP'lerin de hücre ölümü ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (76,77). Lee ve arkadaşlarının beyin endotel hücreleriyle yaptığı *in*

vitro çalışmada, hipoksi-reoksijenasyon sonrası indüklenen MMP-2 ve MMP-9' un apoptotik ölüm ile sonuçlandığı kullanılan, MMP inhibitörü ile apoptotik ölümün engellendiği gösterilmiştir (8). Diğer bir *in vitro* çalışmada ise, antioksidan etkinliğe sahip olan resveratrol uygulamasının beyin endotel hücrelerinde hipoksi-reoksijenasyon süresince indüklenen MMP-2 ve -9 üzerine azaltıcı etkiye sahip olduğu ve bunun sonucunda hücre hasarının engellendiği bildirilmiştir (79). Bu doğrultuda çalışmamızda renal I/R süresince indüklenen hem MMP hem de p38 üzerine azaltıcı etki gösteren taurinin, hücre hasarını önleme yönündeki etkinliği dikkat çekicidir.

Sonuç olarak, böbrekler özellikle karmaşık mikrovasküler yapıları ve yüksek enerji gereksinimlerinden dolayı iskemi-reperfüzyon hasarında oldukça duyarlıdırlar. Günümüzde artan organ bağışını da göz önünde bulundurursak, böbrek nakli sırasında ortaya çıkan bu oksidatif hasarı azaltmak oldukça önem taşımaktadır. Çalışmamızda taurinin renal I/R süresince artan oksidatif strese eşlik eden artmış MMP-2 ve MMP-9 mRNA ekspresyon ve aktivitelerini ve bununla beraber oksidatif hasar ile indüklenen p38 protein ekspresyonunu modüle ettiği gösterilmiştir. Bu bağlamda taurinin renal I/R hasarına karşı geliştirilen stratejilerde aday moleküller arasına girebileceğini öngörmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırmanın hipotezi, 'Taurin antioksidan etkisi ile renal iskemi/reperfüzyon sırasında meydana gelen oksidatif stres ile indüklenen MMP-2 ve MMP-9'un mRNA ve aktivite düzeylerini p38 sinyal ileti yolağını baskılayarak azaltır' şeklinde kurgulandı. Çalışmamızın bulguları hipotezimizin iskemi sonrası MMP-2 ve MMP-9 mRNA ekspresyon düzeyindeki artışın taurinle azaltıcı etkisini destekler niteliktedir. Ayrıca MMP-9 aktivite düzeyindeki ve p38 sinyal ileti yolağındaki p38 protein ekspresyonundaki artışın taurinle azaltığı kanıtlanmıştır. Fakat taurinin MMP-2 aktivite artışına inhibe edici etkisi tespit edilememiştir. Literatür incelendiğinde renal iskemi/reperfüzyon süresince oluşan oksidatif stresin indüklediği hem MMP-2 ve MMP-9 hem de bu enzimlerin regülasyonlarında rol oynayan p38 MAPKinaz sinyal ileti yollarına taurinin etkisinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Bulgularımızın ileri çalışmalara temel oluşturacağını düşünmekteyiz.

7.KAYNAKLAR

1. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2012;298:229-317.
2. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med*. 2011 Nov 7;17(11):1391-401. doi: 10.1038/nm.2507.
3. Wen X, Murugan R, Peng Z, Kellum JA. Pathophysiology of acute kidney injury: a new perspective. *Contrib Nephrol*. 2010;165:39-45.
4. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 2002; 82:47-95.
5. Dominik Lipka, Janusz Boratyński. Metalloproteinases. Structure and function. *Postepy Hig Med Dosw*. 2008; 62: 328-336
6. Jones GT. Matrix metalloproteinases in biologic samples. *Adv Clin Chem*. 2014;65:199-219
7. Galliera E, Tacchini L, Corsi Romanelli NM. Matrix metalloproteinases as biomarkers of disease: updates and new insights. *Clin Chem Lab Med*. 2014; 05:20-24.
8. Lee SR, Lo EH. Induction of caspase-mediated cell death by matrix metalloproteinases in cerebral endothelial cells after hypoxia-reoxygenation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004; 24: 720-727.
9. Cavdar Z, Oktay G, Egrilmez MY, Genc S, Genc K, Altun Z, Islekel H, Guner G. In vitro reoxygenation following hypoxia increases MMP-2 and TIMP-2 secretion by human umbilical vein endothelial cells. *Acta Biochim Pol*. 2010;57(1):69-73.
10. Catalyurek H, Oktay G, Guzeloglu M, Cavdar Z, Acikel U, Silistreli E, Hazan E. Insulin-blood cardioplegia decreases matrix metalloproteinase activity in ischemia-reperfusion injury during coronary artery bypass surgery. *J Int Med Res*; 2008 36: 551-8.
11. Haorah, J., Ramirez, S.H., Schall, K., Smith, D., Pandya, R., Persidsky, Y. (2007) Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction. *J Neurochem*.101, 566-76.
12. Lu, A., Clark, J.F., Broderick, J.P., Pyne-Geithman, G.J., Wagner, K.R., Ran, R., Khatri, P., Tomsick, T., Sharp, F.R. (2008) Reperfusion activates metalloproteinases that contribute to neurovascular injury. *Exp Neurol* 210, 549-559.

13. Basile DP, Fredrich K, Weihrauch D, Hattan N, Chilian WM. Angiostatin and matrix metalloprotease expression following ischemic acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;286(5):F893-902.
14. Caron A, Desrosiers RR, Béliveau R. Ischemia injury alters endothelial cell properties of kidney cortex: stimulation of MMP-9. *Exp Cell Res*. 2005;310(1):105-16.
15. Catania JM, Chen G, Parrish AR. Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiology. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;292(3):F905-11.
16. Kunugi S, Shimizu A, Kuwahara N, Du X, Takahashi M, Terasaki Y, Fujita E, Mii A, Nagasaka S, Akimoto T, Masuda Y, Fukuda Y. Inhibition of matrix metalloproteinases reduces ischemia-reperfusion acute kidney injury. *Lab Invest*. 2011 ;91(2):170-80.
17. Brosnan JT, Brosnan ME. The sulfur-containing amino acids: an overview. *J Nutr*. 2006;136(6 Suppl):1636S-1640S.
18. Kim C, Cha YN. Production of reactive oxygen and nitrogen species in phagocytes is regulated by taurine chloramine. *Adv Exp Med Biol*. 2009;643:463-72. Review.
19. Mina M. Benjamin and Raouf A. Khalil. Matrix Metalloproteinase Inhibitors as Investigative Tools in the Pathogenesis and Management of Vascular Disease. NIH Public Access. 2012 ; 103: 209–279
20. Roderick J. Tan and Youhua Liu. Matrix metalloproteinases in kidney homeostasis and diseases. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012, 302: F1351–F1361
21. Spinale FG, Villarreal F. Targeting matrix metalloproteinases in heart disease: lessons from endogenous inhibitors. *Biochem Pharmacol*. 2014 90(1):7-15.
22. Beaudoux JL, Giral P, Bruckert E, Foglietti MJ. Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 42:121–131
23. Rodrigo R, Libuy M, Feliú F, Hasson D. Oxidative stress-related biomarkers in essential hypertension and ischemia-reperfusion myocardial damage. *Dis Markers*. 2013;35:773-90.
24. Morrison DK. MAP Kinase Pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4:a011254
25. Ziswiler R, Daniel C, Franz E, Marti HP. Renal matrix metalloproteinase activity is unaffected by experimental ischemia-reperfusion injury and matrix

- metalloproteinase inhibition does not alter outcome of renal function. *Exp Nephrol*. 2001; 9:118-24.
26. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. The molecular events underlying ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc*. 2002, 34:2518-9.
 27. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 2002; 105: 248-58.
 28. Grebenchikov OA, Likhvantsev VV, Plotnikov EI, Silachev DN ve ark. Molecular mechanisms of ischemic-reperfusion syndrome and its personalized therapy. *Anesteziol Reanimatol*. 2014; 3:59-67.
 29. Danobeitia JS, Djamali A, Fernandez LA. The role of complement in the pathogenesis of renal ischemia-reperfusion injury and fibrosis Fibrogenesis Tissue Repair. 2014 Nov 1;7:16.
 30. Cai Y, Xu H, Yan J, Zhang L, Lu Y. Molecular targets and mechanism of action of dexmedetomidine in treatment of ischemia/reperfusion injury. *Mol Med Rep*. 2014; 9:1542-50
 31. Mohamed Ael-H, Lasheen NN. Comparative study on the protective role of vitamin C and L-arginine in experimental renal ischemia reperfusionin adult rats. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2014 Oct 11;6(3):153-65
 32. Siems W, Quast S, Carluccio F, Wiswedel I ve ark. Oxidative stress in chronic renal failure as a cardiovascular risk factor. *Clin Nephrol*. 2002; 58: 12-9.
 33. Jaeschke H, Woolbright BL. Current strategies to minimize hepatic ischemia-reperfusion injury by targeting reactive oxygen species. *Transplant Rev* .2012; 26:103-14.
 34. Kosieradzki M, Rowin W. Ischemia/Reperfusion Injury in Kidney Transplantation: Mechanisms and Prevention. *Transplantation Proceedings*. 2008; 40: 3279 –3288
 35. Friedewald JJ, Rabb H: Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. *T.Kidney Int* 2004; 66: 486-91.
 36. Dimas G, Iliadis F, Grekas D. Matrix metalloproteinases, atherosclerosis, proteinuria and kidney disease: Linkage-based approaches. *Hippokratia*. 2013; 17:292-7.
 37. Eline Dejonckheere, Roosmarijn E. Vandenbroucke, Claude Libertinjury. Matrix Metalloproteinases as drug targets in ischemia/reperfusion injury. *Drug Discovery Today* 2011;volume 16: number17-18

38. Ripps H, Shen W. Review: taurine: a "very essential" amino acid. *Mol Vis.* 2012;18:2673-86.
39. Bouckenooghe T, Remacle C, Reusens B. Is taurine a functional nutrient? *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 2006;6: 728–33.
40. Chesney RW, Han X, Patters AB. Taurine and the renal system. *Journal of Biomedical Science* 2010, 17(Suppl 1):S4
41. Stephen W. Schaffer • Chian Ju Jong • Takashi Ito • Junichi Azuma. Effect of taurine on ischemia–reperfusion injury. *Amino Acids.* 2014; 46:21–30
42. Mozaffari MS, Abdelsayed R, Patel C, Wimborne H ve ark. Differential effects of taurine treatment and taurine deficiency on the outcome of renal ischemia reperfusion injury. *Journal of Biomedical Science.* 2010; 17:1-32
43. Akdemir O, Hede Y, Zhang F, Lineaweaver WC, Arslan Z, Songur E. Effects of taurine on reperfusion injury. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2011;64:921-8.
44. Men X, Han S, Gao J, Cao G, ve ark. Taurine protects against lung damage following limb ischemia reperfusion in the rat by attenuating endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Acta Orthop.* 2010; 81:263-7
45. Kennedy SE, Erlich JH. Murine renal ischaemia-reperfusion injury. *Nephrology (Carlton).* 2008; 13 :390-6
46. Yasuda H, Yuen PS, Hu X, Zhou H ve ark. Simvastatin improves sepsisinduced mortality and acute kidney injury via renal vascular effects. *Kidney Int.* 2006; 69: 1535-1542.
47. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK ve ark. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Biochem.* 1985; 150 (1): 76–85
48. Olguner GÇ, Koca U, Altekin E, Ergür BU ve ark. Ischemic preconditioning attenuates lipid peroxidation and apoptosis in the cecal ligation and puncture model of sepsis. *Exp Ther Med.* 2013; 5(6): 1581–1588.
49. Burtis CA, Bruns DE. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.* 7nd ed. Elsevier Health Sciences. 2014.
50. Hong YL, Yeh SL, Chang CY, Hu ML. Total plasma malondialdehyde levels in 16 Taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance liquid chromatography-based method. *Clin Biochem.* 2000;33(8):619-25.

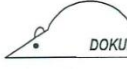
51. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method. *Nature Protocols*. 2008; 6: 1101- 1108
52. Bonifacino, JS, Dasso, M, Harford, JB, Lippincott-Schwartz, J, and Yamada, KM. *Current Protocols in Cell Biology*, 2000 ; Wiley, New York.
53. Aydin MS, Caliskan A, Kocarslan A, Kocarslan S ve ark. Intraperitoneal curcumin decreased lung, renal and heart injury in abdominal aorta ischemia/reperfusion model in rat. *Int J Surg*. 2014;12:601-5
54. Jin X, Zhang Y, Li X, Zhang J ve ark. C-type natriuretic peptide ameliorates ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury by inhibiting apoptosis and oxidative stress in rats. *Life Sci*. 2014 ;117:40-5
55. Sen H, Deniz S, Yedekci AE , Inangil G. Effects of dexpanthenol and N-acetylcysteine pretreatment in rats before renal ischemia/reperfusion injury. *Informa Healthcare*. 2014. 36: 1570-1574
56. Mozaffari MS, Abdelsayed R, Patel C, Wimborne H ve ark. Differential effects of taurine treatment and taurine deficiency on the outcome of renal ischemia reperfusion injury. *J Biomed Sci*. 2010;17 : S32
57. Latchoumycandane C, Nagy LE, McIntyre TM. Chronic ethanol ingestion induces oxidative kidney injury through taurine-inhibitable inflammation. *Free Radic Biol Med*. 2014;69:403-16
58. Koh JH, Lee ES, Hyun M, Kim HM ve ark. Taurine alleviates the progression of diabetic nephropathy in type 2 diabetic rat model. *Int J Endocrinol*. 2014;2014:397307
59. Wang L, Zhang L, Yu Y, Wang Y ve ark. The protective effects of taurine against early renal injury in STZ-induced diabetic rats, correlated with inhibition of renal LOX-1-mediated ICAM-1 expression. *Ren Fail*. 2008;30:763-71
60. Zhang F, Tong L, Qiao H, Dong X ve ark. Taurine attenuates multiple organ injury induced by intestinal ischemia reperfusion in rats. *J Surg Res*. 2008;149:101-9
61. Suleyman Z, Sener E, Kurt N, Comez M ve ark. The effect of nimesulide on oxidative damage inflicted by ischemia-reperfusion on the rat renal tissue. *Ren Fail*. 2014; 24:1-9
62. Jiang H, Chen R, Xue S, Zhu H ve ark. Protective effects of three remote ischemic conditioning procedures against renal ischemic/reperfusion injury in rat kidneys: a comparative study. *Ir J Med Sci*. 2014; 15

63. Yang S, Chou WP, Pei L. Effects of propofol on renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Exp Ther Med*. 2013;6:1177-118
64. Yamanobe T, Okada F, Iuchi Y, Onuma K ve ark. Deterioration of ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in SOD1-deficient mice. *Free Radical Research*, February 2007; 41(2):200–207
65. Rasoulilian B, Jafari M, Noroozzadeh A, Mehrani H ve ark. Effects of ischemia-reperfusion on rat renal tissue antioxidant systems and lipid peroxidation. *Acta Medica Iranica*. 2008; Vol. 46, No. 5
66. Schaffer SW, Jong CJ, Ito T, Azuma J. Effect of taurine on ischemia–reperfusion injury. *Amino Acids*. 2014; 46:21–30
67. Guler L, Tavlasoglu M, Yucel O, Guler A ve ark. Taurine attenuates lung ischemia-reperfusion injury after lung transplantation in rats. *J Anesth*. 2014; 28:347-53
68. Abbasoğlu L, Kalaz EB, Soluk-Tekkeşin M, Olgaç V ve ark. Beneficial effects of taurine and carnosine in experimental ischemia/reperfusion injury in testis. *Pediatr Surg Int*. 2012; 28:1125-31
69. Caron, A. Ischemia–reperfusion injury stimulates gelatinase expression and activity in kidney glomeruli. *Can. J. Physiol. Pharmacol* 2005; 83, 287–300
70. Sevin G, Sozer GO , Keles D, Gokce G ve ark. Taurine inhibits increased MMP-2 expression in a model of oxidative stress induced by glutathione depletion in rabbit heart. *European Journal of Pharmacology*. 2013;706:98–106
71. Kunugi S, Shimizu A, Kuwahara N, Du X ve ark. Inhibition of matrix metalloproteinases reduces ischemia-reperfusion acute kidney injury. *Lab Invest*. 2011; 91:170-80
72. Lee SY, Hörbelt M, Mang HE, Knipe NL ve ark. MMP-9 gene deletion mitigates microvascular loss in a model of ischemia acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011; 301:101-9
73. Novak KB, Le HD, Christison-Lagay ER, Nose V ve ark. Effects of metalloproteinase inhibition in a murine model of renal ischemia- reperfusion injury. *Pediatr Res*. 2010; 67:257-62
74. Kadkhodae M, Khastar H, Seifi B, Najafi A ve ark. Renal oxidative injury after leukocyte transfer from ischemia-reperfusion-induced kidney damage in Balb/c mice. *Acta Physiol Hung*. 2013; 100:99-106

75. Ashraf MI, Ebner M, Wallner C, Haller M ve ark. A p38MAPK/MK2 signaling pathway leading to redox stress, cell death and ischemia/reperfusion injury. *Cell Commun Signal.* 2014; 14:12:6
76. Meldrum KK, Meldrum DR, Hile KL, Yerkes EB ve ark. p38 MAPK mediates renal tubular cell TNF-alpha production and TNF-alpha-dependent apoptosis during simulated ischemia. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;281(2):C563-70.
77. Yu D, Li M, Tian Y, Liu J, ve ark. Luteolin inhibits ROS-activated MAPK pathway in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Life Sci.* 2014;14: S0024-3205
78. Ye S, Zhu Y, Ming Y, She X ve ark. Glycyrrhizin protects mice against renal ischemia-reperfusion injury through inhibition of apoptosis and inflammation by downregulating p38 mitogen-activated protein kinase signaling.
79. Cavdar Z, Eğrilmez MY, Altun Z, Arslan N ve ark. Resveratrol decreases hypoxia/reoxygenation induced MMP-2 secretion in human brain microvascular endothelial cells. *Int J Vit Nutr Res.* 2012;82: 260-267

8. EKLER

EK-1 Etik Kurul Onay


DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
35340, Inciraltı, İzmir-232 4122234

Toplantı No : 03/05/2013
Toplantı Tarihi : 20 Mart 2013

Sayın, Yard.Doç.Dr.Zahide ÇAVDAR
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı

10/2013 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Renal iskemi-reperfüzyon modelinde taurinin ekstrasellüler matriks bütünlüğü üzerine olası koruyucu etkisinin ve ilişkili sinyal yollarının tanımlanması" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

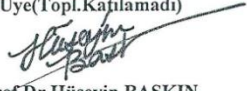
Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.


Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Başkanı

Prof.Dr.A.Necati GÖKMEN
Başkan Yardımcısı
(Topl.Katılamadı)

Prof.Dr.Alper SOYLU
Üye

Prof.Dr.O.Nejat SARIOSMANOĞLU
Üye(Topl.Katılamadı)

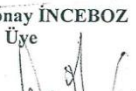
Prof.Dr.Ayşe GELAL
Üye(Topl.Katılamadı)

Prof.Dr.Hüseyin BASKIN
Üye

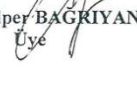
Prof.Dr.Abdullah KUMRAL
Üye (Topl.Katılamadı)

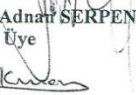
Prof.Dr.Turna İLKNUR
Üye

Prof.Dr.Gülşin OKTAY
Üye


Prof.Dr.Şermin GENÇ
Üye


Doç.Dr.Tonay İNCEBOZ
Üye


Doç.Dr.H.Alper BAĞRIYANIK
Üye


Vet.Hekim Adnan SERPEN
Üye

Zehra KINAM
Üye

Doç.Dr.Pembe UYGUN KESKİNOĞLU
Üye(Topl.Katılamadı)

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde **bold** karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır

ÖZGEÇMİŞ

Cemre URAL

TC Kimlik No / Pasaport No:	45961422508
Doğum Yılı:	1988
Yazışma Adresi :	Dokuz Eylül Üni. Sağlık Bilimleri Enst. Moleküler Tıp AD 35340 İnciraltı/İZMİR
Telefon :	4124675
Faks :	
e-posta :	cemreural@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Ege Üniversitesi	FEN FAKÜLTESİ	BİYOKİMYA	Lisans	2010

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	TEMEL TIP BİLİMLERİ	Araştırma Görevlisi	2014-

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)	Boğaziçi Üniversitesi, Yabancıdil Eğitimi (İngilizce) Mart-Eylül 2014		

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
☐			

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Z Cavdar , S Ozbal , A Celik , BU Ergur, E Guneli , **C Ural** , T Camsari , GA Guner. The effects of alpha-lipoic acid on MMP-2 and MMP-9 activities in a rat renal ischemia and re-perfusion model. Biotechnic & Histochemistry. 2013; 1–11

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Zahide Cavdar, Seda Özbal, Aslı Çelik, Bekir Uğur Ergür, Ensari Güneli, Cemre Ural, Taner Çamsarı, Gül Güner Akdoğan. Alfa-lipoik asitin renal iskemi reperfüzyon hasarında MMP- 2 ve MMP-9 enzim aktiviteleri üzerine etkileri. 25.Ulusal Biyokimya Kongresi, 3-6 Eylül, 2013, İzmir
