

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DİYABETİK NEFROPATİ MODELİNDE TAURİNİN
EKSTRASELLÜLER MATRİKS PROTEİNLERİ ÜZERİNE ETKİSİ VE
İLİŞKİLİ SİNYAL İLETİ YOLAKLARININ İNCELENMESİ**

CEMRE URAL

ORCID: [0000-0002-4613-452](https://orcid.org/0000-0002-4613-452)

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

MOEKÜLER TIP DOKTORA PROGRAMI

DOKTORA TEZİ

İZMİR
HAZİRAN 2022

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2014970193

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DIYABETİK NEFROPATİ MODELİNDE TAURİNİN
EKSTRASELLÜLER MATRİKS PROTEİNLERİ ÜZERİNE
ETKİSİ VE İLİŞKİLİ SİNYAL İLETİ YOLAKLARININ
İNCELENMESİ**

CEMRE URAL

ORCID: [0000-0002-4613-452](https://orcid.org/0000-0002-4613-452)

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Zahide ÇAVDAR

ORCID: [0000-0002-5457-198X](https://orcid.org/0000-0002-5457-198X)

**Bu araştırma DEU Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü Tarafından
2017.KB.SAG.024 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**İZMİR
HAZİRAN 2022**

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

ETİK BEYANI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlanıp sunduğum ‘‘Diyabetik Nefropati Modelinde Taurinin Ekstrasellüler Matriks Proteinleri Üzerine Etkisi Ve İlişkili Sinyal İletim Yollarının İncelenmesi’’ başlıklı doktora tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Cemre URAL

23.06.2022

TEŞEKKÜR

Öğrenciliğe ilk adımı attığımdan bu güne kadar hep elimden tutan ve bundan sonraki adımlarımda da desteğini hissedeceğimi bildiğim, sadece eğitimime değil kişisel gelişimime de katkı sağlayan, bana hep sabır ve güler yüzle yaklaşarak ışığını yolumdan eksik etmeyen danışmanım Prof. Dr. Zahide Çavdar'a,

Desteğini her zaman hissettiğim Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Oğuz Altungöz'e ve tüm Moleküler Tıp AD ailesine,

Tez izleme komiteme, tez savunma jüri üyelerime ve tüm proje ekibimdeki hocalarıma,

Bütün akademik eğitimim boyunca yanımda olan, Akademik Leydiler başta olmak üzere beni ben yapan, her konuda her koşulda bana destek olan arkadaşlarıma, sadece tezimde değil başım her sıkıştığında yardıma koşan bana abi olan Dr. Memduh Bülbül'e ve diğer ARLAB çalışanlarına,

Bugünlere gelmemi sağlayan ebeveynlerime, sakin tavrıyla beni dengeleyen, varlığıyla bile hissettiğim huzuruma sebep canımdan can kardeşim Ali Emre Ural'a, kelimelerle anlatmam imkânsız olan kurduğum güzel, dingin, huzurlu ve mutlu ailemin üyeleri olan canım eşim Volkan Özkan'a ve canımdan öte kızım Nisan Özkan'a,

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

Cemre URAL

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
TABLolar DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1 Problemin Tanımı ve Önemi	1
1.2. Araştırmanın Amacı	3
1.3. Araştırmanın Hipotezi	3
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 DİYABETİK NEFROPATİ	3
2.1.1 Diyabetik Nefropati ile İlişkili Moleküler Mekanizmalar	4
2.1.1.1 Diyabetik Nefropati ve Oksidatif Stres	4
2.1.1.2 Diyabetik Nefropati ve Fibrozis.....	6
2.1.1.2.1 Diyabetik Nefropati ve Matriks Metalloproteinazlar	8
2.2 TAURİN	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	16
3.1. Araştırmanın Tipi	16
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	16
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları.....	16
3.4. Çalışma Materyali	16
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	16
3.6. Veri toplama Araçları	16
3.6.1. Deney Hayvanı	17
3.6.2 Histolojik Değerlendirmeler	20
3.6.3 Biyokimyasal İncelemeler	22

3.6.3.1 Dokuların Hazırlanması	22
3.6.3.2 Serum ve Böbrek Dokusu Taurin Düzeylerinin Analizi	23
3.6.3.3 Serum Kreatinin ve Kan Üre Azotu (BUN) Düzeylerinin Ölçülmesi.	23
3.6.3.4 İdrar Mikroalbumin, Protein ve Kreatinin Düzeyleri.....	24
3.6.3.5 Böbrek Dokusunda RNA İzolasyonu.....	24
3.6.3.6 Gerçek-Zamanlı PCR ile Gen İfadeleri Analizi	25
3.6.3.8 Böbrek Dokusu Total Oksidan Düzeyleri (TOS) Analizi	29
3.6.3.9 Böbrek Dokusu MDA Analizi	30
3.6.3.10 Böbrek Dokusu SOD Aktivite Analizi.....	31
3.6.3.11 Böbrek Dokusu MMP-2 ve MMP-9 Aktivite Analizi	33
3.6.3.12 Böbrek Dokusu TIMP-1 ve TIMP-2 Analizi	34
3.6.3.13 Böbrek Dokusu Western Blot: NOX4, Fibronectin, TGF- β reseptör 1, TGF- β /Smad2/3, p38 MAPK protein ifadeleri	35
3.6.3.14 Doku Protein Düzeylerinin Belirlenmesi.....	40
3.7. Araştırma Planı.....	41
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi.....	41
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	41
3.10. Etik Kurul Onayı	42
4. BULGULAR.....	42
4.1. Klinik Parametreler	42
4.2. Histolojik Bulgular	43
4.3. Biyokimyasal Bulgular.....	48
4.3.1 Böbrek Dokusu ve Serum Taurin Düzeyleri	48
4.3.2. Serum Kreatinin ve BUN Düzeyleri.....	49
4.3.3. İdrar Mikroalbumin/Kreatinin ve Protein/Kreatinin Düzeyleri.....	50
4.3.4. Böbrek Dokusu Oksidan-Antioksidan Parametreler	51
4.3.4.1 ROT Düzeyleri.....	51
4.3.4.2 TOS Düzeyleri	52
4.3.4.3 MDA Düzeyleri.....	53
4.3.4.4 NOX4 Protein Düzeyi.....	54
4.3.4.5 SOD Aktivite Düzeyleri.....	56

4.3.5 Böbrek MMP-2 ve MMP-9 mRNA ve Aktivite Düzeylerinin Belirlenmesi	56
4.3.6 Böbrek EMMPRIN mRNA İfadesi	58
4.3.7 Böbrek TIMP-1 ve TIMP-2 Düzeyleri	58
4.3.8. Böbrek Fibronektin mRNA ve Protein İfade Düzeyi	59
4.3.9. Böbrek TGF- β mRNA, TGF- β ve TGF- β Reseptör 1 Protein İfadeleri .	60
4.3.10. Böbrek Smad2 ve Smad3 mRNA ile Protein İfadeleri	61
4.3.11. Böbrek p38 MAPK Sinyal İleti Yolağı Protein İfadesi	63
4.3.12. Böbrek Protein Düzeyleri	64
5.TARTIŞMA	65
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	70
7. KAYNAKLAR	71
8. EKLER.....	82
EK-1 Etik Kurul Onayı	82
Ek-2 Kan şekeri ve ağırlık takibi	84

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. cDNA sentez karışımı ve prosedürü	26
Tablo 2. Gerçek Zamanlı PCR protokolü	27
Tablo 3. Gerçek Zamanlı PCR için kullanılan primerler	27
Tablo 4. SOD kiti çalışmasında kullanılan çözeltiler.....	33
Tablo 5. SDS PAGE ayırıcı jel (%12) çözeltileri	36
Tablo 6. SDS PAGE paketleyici jel (%4) çözeltileri	36
Tablo 7. Böbrek ağırlığı/hayvan ağırlığı, İçilen günlük su miktarı, Günlük idrar hacimleri.....	42

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Diyabetik nefropatideki patolojik lezyonlar	4
Şekil 2. NOX4 enzim kompleksi	5
Şekil 3. Antioksidan enzimlerin kimyasal reaksiyonları	6
Şekil 4. TGF- β /Smad2/3 yolağı	7
Şekil 5. NOX4 ifadesinin TGF- β ile indüklenme mekanizması	8
Şekil 6. MMP'lerin domain yapıları ve sınıflandırılması	9
Şekil 7. MAPK sinyal ileti yollarının şematik görüntüsü	11
Şekil 8. MMP ve TIMP'lerin böbrekte dağılım profilleri.....	12
Şekil 9. Taurinin kimyasal yapısı.....	13
Şekil 10. Taurin sentezi.....	14
Şekil 11. Böbreklerdeki taurin transport sistemi	15
Şekil 12. Deney akış şeması.....	17
Şekil 13. Deney hayvanlarına uygulanan 12 haftalık işlem planı	20
Şekil 14. ROT ölçüm kitinin çalışma prensibi	29
Şekil 15. SOD kitinin çalışma prensibi.....	32
Şekil 16. Kontrol grubuna ait normal yapıdaki böbrek dokusu	44
Şekil 17. Taurin grubuna ait normal yapıdaki böbrek dokusu	44
Şekil 18. DM grubuna ait böbrek dokusunda tubuler hiyalinizasyon, eritrosit ekstravazasyonu ve tübüler hücre debrisleri	45
Şekil 19. Resim 6:DM-Taurin grubuna ait böbrek dokusunda tübüler dilatasyon	45
Şekil 20. Histolojik skorlar	46
Şekil 21. Kontrol grubuna ait normal yapıdaki böbrek dokusu Masson Trikrom	46
Şekil 22. Taurin grubuna ait normal yapıdaki böbrek dokusu Masson Trikrom	47
Şekil 23. DM grubuna ait böbrek dokusunda peritübüler kollagen	47
Şekil 24. DM-Taurin grubuna ait böbrek dokusunda az miktarda peritübüler kollagen	48
Şekil 25. Böbrek taurin düzeyleri.....	49
Şekil 26. Serum BUN düzeyleri (A) ,Serum kreatinin düzeyleri (B)	50

Şekil 27. İdrar mikroalbumin/kreatinin düzeyleri (A), İdrar protein/kreatinin düzeyleri (B)	51
Şekil 28. Böbrek ROT düzeyleri	52
Şekil 29. Böbrek TOS düzeyleri	53
Şekil 30. Böbrek MDA düzeyi.....	54
Şekil 31. NOX4 Western blot temsili görüntü (A) Dansitometrik analiz bulguları (B)	55
Şekil 32. Böbrek SOD Aktivite düzeyleri	56
Şekil 33. MMP-2 ve MMP-9 mRNA ifadesi	57
Şekil 34. MMP-2 Aktivite Düzeyi (A), MMP-9 Aktivite Düzeyi (B).....	57
Şekil 35. EMMPRIN mRNA ifadesi.....	58
Şekil 36. Böbrek TIMP-1 Düzeyi (A), Doku TIMP-2 Düzeyi (B)	59
Şekil 37. Fibronektin mRNA ifadesi (A) Temsili Western blot görüntüsü (B), Dansitometrik analiz bulguları (C).....	60
Şekil 38. TGF- β mRNA ifadesi (A), Temsili Western blot görüntüsü (B), Dansitometrik Analiz Bulguları (C).....	61
Şekil 39. Smad2 (A) ve Smad3 (B) mRNA ifadesi.....	62
Şekil 40. p-Smad2 ve Smad2 Western blot temsili görüntü (A), p-Smad2/Smad2 dansitometrik analiz bulguları (B), p-Smad ve Smad3 western blot temsili görüntüsü (C), p-Smad3/Smad3 dansitometrik analiz bulguları (D).....	63
Şekil 41. p-p38 MAPK ve p38 MAPK western blot temsili görüntü (A), Dansitometrik analiz bulguları (B)	64
Şekil 42. Temsili BCA standart grafiği	65
Şekil 43. Taurinin diyabetik nefropatide koruyucu etkinliğine aracılık eden olası moleküler mekanizmalar.....	70

SİMGELER VE KISALTMALAR

APMA: p-Amino Fenilmerkürük Asetat

APS: Amonyum Persülfat

BCA: Bikinkoninik asit

BHT: Butilen Hidroksi Toluen

BSA: Sığır Serum Albumini

BUN: Kan Üre Azotu

DCF: 2', 7' - Diklorodihidroflorezin

DCFH: Diklorodihidrofloresin

DN: Diyabetik nefropati

ECL: Arttırılmış Kemilüminesans

ELISA: Enzim-Bağlı İmmünoSorbent Testi

EMMPRIN: Hücre dışı matriks metalloproteinaz indükleyicisi

ERK: Ekstrasellüler Sinyal Düzenleyici Kinaz

ESM: Ekstrasellüler Matriks

GFR: Glomerüler Filtrasyon Hızı

GLDH: Glutamat- Dehidrojenaz

HOCl: Hipokloröz Asit

HPLC: Yüksek Performanslı Likit Kromatografi

Ig: İmmünoglobulin

JNK: c-Jun N-Terminal Kinaz

KŞ: Kan Şekeri

MAPK: Mitojen ile Aktiflenen Protein Kinaz

MDA: Malondialdehit

MMP: Matriks Metalloproteinaz

mRNA: Haberci RNA

NADPH: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat

NOX: NADPH oksidaz

OPA: O-fitaldialdehit

PBS : Fosfat Tamponu

PUFA: Poliansatüre Yağ Asitleri

PVDF: Polivinilidendiflorid

RNS: Reaktif Nitrojen Türleri

ROT : Reaktif Oksijen Türleri

RT-PCR: Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SDBY: Son Dönem Böbrek Yetmezliği

SDS-PAGE : Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

SOD: Süperoksit Dismutaz

SPSS: Sosyal Bilimler İstatistik Paketi

STZ: Streptozotosin

TauT: Taurin Taşıyıcı Proteini

TBA: Tiyobarbitürik Asit

TBS: Tris Buffered Saline

TEMED : Tetrametiletilendiamin

TEP: 1, 1, 3, 6 tetraetoksiipropan

TGF- β : Transforme Edici Büyüme Faktörü

TIMP: Matriks Metalloproteinazların Doku İnhibitör Proteinleri

TOS: Total Oksidan Kapasite

DİYABETİK NEFROPATİ MODELİNDE TAURİNİN EKSTRASELLÜLER MATRİKS PROTEİNLERİ ÜZERİNE ETKİSİ VE İLİŞKİLİ SİNYAL İLETİ YOLAKLARININ İNCELENMESİ

Doktora Tezi

Cemre URAL

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Moleküler Tıp Anabilim Dalı

ÖZET

Son dönem böbrek hastalığının en önemli nedenlerinden biri olan diyabetik nefropati (DN), hücre dışı matriksin (ESM) birikmesi nedeniyle böbrekte morfolojik ve yapısal değişiklikler ile karakterizedir. Bu birikimin en önemli nedenlerinden biri oksidatif strestir. Yarı esansiyel bir amino asit olan taurin, antioksidan ve antifibrotik özelliklere sahiptir. Bu çalışmada, sıçanlarda diyabetik nefropati modelinde taurinin oksidatif stres ve fibrozise karşı, NADPH oksidaz (NOX4), TGF- β /Smad2/3 ve p38 MAPK sinyal ileti yolları ile bu yollarla ilişkili MMP, TIMP ve EMMPRIN proteinleri üzerine olası koruyucu etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Araştırmamızda 29 adet Wistar albino sıçan, kontrol (n=8), taurin (%1 içme suyu) (n=7), diyabet (45 mg/kg Streptozotosin) (n=7), diyabet+taurin (n=7) olmak üzere 4 gruba ayrıldı. 12 hafta sonra, biyokimyasal ve histolojik çalışmalar için böbrek dokusu, idrar ve serum toplandı. Histolojik analizler, diyabet grubunun böbrek dokusunda tübül dilatasyonu ve tübül fırça kenar kaybında önemli değişiklikler olduğunu gösterdi. Bu değişiklikler taurin ile anlamlı olarak azaldı. Fakat diyabet grubunda artan serum kreatinin ve BUN düzeylerindeki azalış anlamlı değildi. Taurin ile total oksidatif stres seviyelerinde ve malondialdehit (MDA) düzeylerinde anlamlı bir azalma olurken, diyabetli grupta azalmış SOD aktivite düzeyi taurin ile anlamlı olarak arttı. Ayrıca taurin, böbrekteki oksidatif stres için ana enzimatik kaynak olarak bilinen NOX4'ün protein ifadesini anlamlı olarak azalttı. Öte yandan, taurin, fibrozis süreci ile ilgili önemli bir hücre dışı matriks proteini olan fibronektinin hem mRNA'sında hem de protein ifadesinde anlamlı azalışlara neden oldu. Bu bulgular Masson Trichrome boyamasına paraleldi. Matriks metalloproteinazlar (MMP)-2 ve MMP-9 mRNA ifade seviyeleri ve aktiviteleri diyabette kontrole göre anlamlı olarak arttı ve bu artışlar taurin ile katlanarak daha yüksek seviyelere ulaştı. Ayrıca, taurin ile ekstraselüler matriks metalloproteinaz indükleyicisinin (EMMPRIN) diyabette

azalmış mRNA ifadesi anlamlı olarak artarken, diyabette artan TIMP-1 ve TIMP-2 ifadelereinin azalması istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bunlara ek olarak taurinin, diyabette indüklendiği bilinen p38 MAPK ve TGF- β /Smad2/3 sinyal yollarını anlamlı bir şekilde baskıladığı bulunmuştur. Tüm bu bulgular, taurinin renal diyabetik hasarı önlemek için geliştirilecek yeni tedavi stratejelerine aday olabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Diyabetik Nefropati, NOX4, Oksidatif stres, p38 MAPK, Taurin, TGF- β /Smad2/3

Tezin Sayfa adedi: 104

Danışman: Prof.Dr. Zahide ÇAVDAR



**THE EFFECTS OF TAURINE ON EXTRACELLULAR MATRIX PROTEINS
IN A DIABETIC NEPHROPATHY MODEL AND INVESTIGATION OF
ASSOCIATED SIGNALING PATHWAYS**

PhD Thesis

Cemre URAL

DOKUZ EYLUL UNIVERSITY HEALTH SCIENCE INSTITUTE

Department of Molecular Medicine

ABSTRACT

Diabetic nephropathy (DN), the cause of end-stage renal disease, is characterized by morphological and structural changes in the kidney due to the accumulation of extracellular matrix (ECM). One of the most important causes of this accumulation is oxidative stress. Taurine, a semi-essential amino acid, has antioxidant and antifibrotic properties. This study aimed to investigate the possible renoprotective effects of taurine via p38 MAPK and TGF- β /smad2/3 signaling pathways in a diabetic nephropathy model in rats. In our study, 29 Wistar albino rats were divided into 4 groups: control, taurine (1% with drinking water), diabetes (45 mg/kg Streptozotocin), diabetes+taurine. After 12 weeks, kidney and serum were collected for biochemical and histological studies. The histological analysis showed that there were significant changes in tubule dilatation and loss of tubule brush border in the kidney of the diabetes group. These changes were significantly decreased with taurine. However, there were no significant changes in serum creatinine and blood urine nitrogen levels among the groups. Further, taurine significantly reduced the protein expression of NADPH oxidase 4 (NOX4), known as a major enzymatic source of oxidative stress in the kidney. Also, there was a significant decrease in reactive oxygen species and malondialdehyde levels by taurine whereas the decreased SOD activity level in the diabetes group was significantly increased with taurine. On the other hand, taurine resulted in significant decreases in both mRNA and protein expression of fibronectin, which is a major extracellular matrix protein related to the fibrosis process. These findings were parallel to Masson Trichrome staining. The matrix metalloproteinases (MMP)-2 and MMP-9 mRNA expression levels and their activities increased significantly in diabetes compared to the control, and these increases were significantly reached higher levels with taurine. Also, the decreased mRNA expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) increased with taurine in the diabetes+taurine group. Moreover, it was found that taurine suppressed the p38 MAPK and TGF- β /smad2/3 signaling pathways. These findings indicate that taurine may be an effective practical strategy to prevent renal diabetic injury.

Keywords: Diabetic nephropathy, NOX4, Oxidative stress, p38 MAPK, Taurin, TGF- β /smad2/3

Page number: 104

Advisor: Prof. Dr. Zahide ÇAVDAR



1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1 Problemin Tanımı ve Önemi

Diyabetik nefropati (DN), son dönemde böbrek hastalıklarının ve kronik böbrek yetmezliğinin en yaygın nedenidir. DN, glomerülerde ekstrasellüler matriksin (ESM) birikimi ile karakterize edilir. *In vitro* ve in vivo yapılan çalışmalarda diyabet sırasında yüksek glukoz nedeniyle indüklenen NADPH oksidaz (NOX) enzimi ailesinin böbrekte bulunan NOX4 izoformunun reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimini arttırdığı gösterilmiştir (1–6). İntrasellüler ROT artmasıyla TGF- β uyarılır, böbrek hasarının sürecini ve gelişmesini hızlandırır (7). Böylece artan TGF- β ile fibrozis oluşumunda önemli rol oynayan TGF- β /Smad sinyal ileti yolağının aktive olduğu gösterilmiştir (8,9). TGF- β 'nın aynı zamanda NOX4 gen ifadesini de indükleyerek oksidatif stresin artmasında etkili olduğu bildirilmektedir (10).

DN'de diğer anahtar moleküllerden olan matriks metalloproteinazlar (MMP), çinko metalloproteaz ailesinin “matriksin” olarak tanımlanan alt grubunda yer alan ve ESM regülasyonundan sorumlu enzim ailesidir. MMP'ler içerdikleri yapısal organizasyonlarına ve substrat spesifitelerine göre Kollajenazlar, Jelatinazlar, Stromelisinler, Matrilizinler, Membran Tip MMP ve diğer MMP'ler olmak üzere 6 ayrı alt grupta sınıflandırılmaktadırlar (11). 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. Bu kısım jelatinazların jelatin ve kollajene yüksek afinite ile bağlanmalarını sağlar, proteolitik aktivitelerini artırır (12). MMP'lerin yapısal gen ifadesi normal koşullarda düşük olarak bildirilmektedir. Bununla birlikte ESM'nin yeniden modellenmesini gerektiren oksidatif stres, inflamasyon, yüksek glikoz gibi değişen fizyolojik koşullarda ifadeleri indüklenmektedir. MMP'lerin regülasyonları transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel seviyede düzenlenmektedir. MMP'lerin katalitik aktivitesi MMP'lerin doku inhibitörleri (TIMP) tarafından inhibe edilir. MMP aktivitesinin ESM substratları üzerine etkisi enzimler ve inhibitörleri arasındaki dengeye (MMP aktivitesi/TIMP)

bağlıdır. Bu denge birçok fizyolojik ve patolojik olayda merkezi rol oynamaktadır (13). EMMPRIN (basigin, CD147); Epitelyal kökenli tümör hücreleri üzerinde bir transmembran glikoprotein olarak tespit edilmiştir. EMMPRIN, başta MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-11 olmak üzere tüm MMP'lerin indüklenmesine ek olarak hücrenin proteolitik potansiyelini artırır (14–16). Ayrıca MMP-2 ve MMP-9 ifadesini düzenleyen sinyal ileti yolları, p38 kinaz, c-Jun N-terminal Kinaz (JNK) ve ERK yolağı (Ekstrasellüler Sinyal Düzenleyici Kinaz) olmak üzere üç MAP-kinaz (Mitojen ile Aktiflenen Protein Kinaz) yolağından oluşmaktadır. DN sürecinde artan oksidatif strese eşlenik olarak aktiflenen p38 MAPK sinyal ileti yolağının, MMP'lerin ifadelerini arttırdığı bildirilmiştir. TIMP'lerin ifadesinin daha fazla artmasıyla aktivitelerinin düştüğü ve MMP/TIMP dengesinin bozulduğu kanıtlanmıştır (17). Buna rağmen matriks birikimine rol açan mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır.

Son yıllarda gerçekleştirilen deneysel çalışmalar, antioksidan potansiyeli olan tedavilerin DN üzerinde iyileştirici ve/veya ilerlemeyi engelleyici bir etkiye sahip olabileceğine dikkat çekmektedir (18,19). Bu antioksidanlardan biri de taurindir. Taurin tüm memeli dokularda serbest olarak bulunan sülfür içeren bir aminoasittir. Ayrıca taurin, safra asitlerinin konjugasyonu, kolesterol atılımı, kan basıncının düzenlenmesi, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, hücre membranının stabilizasyonu ve hücre içi kalsiyum seviyelerinin modülasyonu gibi önemli fizyolojik fonksiyonlara sahiptir. Bunun yanında deneysel çalışmalar ile antiinflamatuvar, antioksidan ve antifibrotik etkisileri de kanıtlanmıştır (20–22). Taurinin, farklı deneysel böbrek hasar modellerinde antioksidan etkisi aracılığıyla olumlu etkileri gösterilmiş (23–27) olmakla birlikte diyabetik sıçanlarda da oksidatif stresi azaltarak, fibrozis oluşumunu engellediği bildirilmiştir (28,29). Ancak DN'de antioksidan ve antifibrotik etkisine aracılık eden moleküler mekanizmalar detaylı olarak araştırılmamıştır. Planladığımız bu projemizde sıçanlarda oluşturulmuş DN'de taurinin oksidatif stres ve fibrozise karşı, NOX4, TGF- β /Smad2/3 ve p38 MAPK sinyal ileti yolları ile bu yollarla ilişkili MMP, TIMP ve EMMPRIN proteinleri üzerine olası koruyucu etkinliğinin araştırılması hedeflenmiştir.

1.2. Araştırmanın Amacı

Çalışmamızda, antioksidan ve antifibrotik özelliklerine sahip taurinin DN hasarında oksidatif stres ve fibrozise karşı, NOX4, TGF- β /Smad2/3 ve p38 MAPK sinyal ileti yollarları ile bu yollarla ilişkili MMP, TIMP ve EMMPRIN proteinleri üzerine olası koruyucu etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

1.3. Araştırmanın Hipotezi

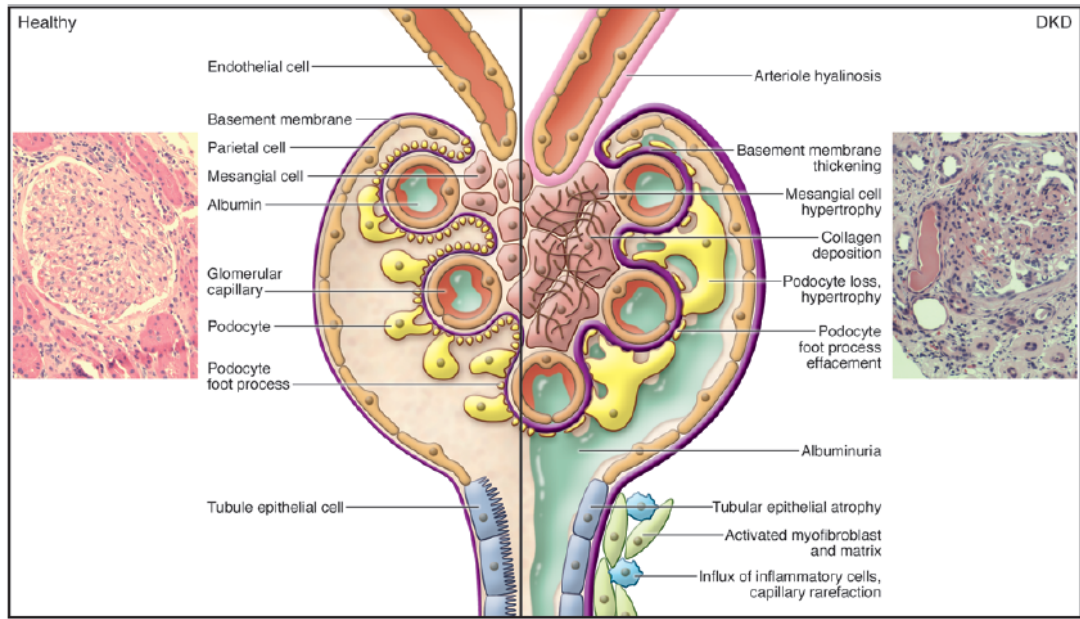
Taurin, böbrekte antioksidan etkinliği ile NOX4 ifadesini azaltarak, TGF- β /Smad2/3 ve p38 MAPK sinyal ileti yollarlarının aktivasyonlarını baskılar. Ayrıca MMP, TIMP ve EMMPRIN proteinlerini de regüle ederek antifibrotik etkisini gösterir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 DİYABETİK NEFROPATİ

Diyabetik nefropati (DN), dünya çapında son dönem böbrek yetmezliğinin (SDBY) önde gelen nedenidir ve diyabetli hastalarda mortalitenin en güçlü tek belirleyicisidir. DN, 1970'lerde yapılan bir çalışmada Danimarkalı doktorlar tarafından tanımlanmıştır (1). En erken bulgu mikroalbuminüridir (30-300 mg/gün), daha sonra makroalbuminüriye (>300 mg/gün) ilerler. Glomerüler filtrasyon hızında (GFR) düşüşe neden olur ve sonunda SDBY ile sonuçlanır (4). DN, çoğu diyabetik hastada makroalbuminüri saptanarak teşhis konulan klinik bir tanı haline geldi. Fakat son yapılan çalışmalarda, albuminürinin DN tanısı için net bir belirteç olmadığı ortaya çıkmıştır. Yani mikroalbuminüri gerileyebilir ve hastada belirgin proteinüri olmaksızın DN ilerleyebilir. Buna rağmen klinikte 'altın standart' olarak bilinen histolojik tanı nadiren kullanılır. Çünkü diyabetli hastalara uygulaması oldukça zordur. Glomerüler bazal membran kalınlaşması (beklenen yaş sınırlarının üzerinde), DN'li hastalarda görülen elektron mikroskopi ile tanımlanabilen en erken lezyondur. Hücre büyümesi ve

artan ekstrasellüler matriks sekresyonunun neden olduğu mezangial genişleme ise ışık mikroskopunda en sık gözlenen lezyondur. Glomerüler lezyonlar, arteriyel hyalinosis gibi spesifik vasküler lezyonlarla birlikte ortaya çıkar (Şekil 1). Tubulointerstisyel değişiklikler ise aktif miyofibroblastların birikimi, atipik kollajen, inflamatuvar hücreler ve kapiller yapıdır. Klinik olarak ilk bulgu hala mikroalbuminüri olmasına rağmen öncesinde patogenezinde birçok mekanizmanın rol oynadığı da bilinmektedir. Fakat DN patogenezi karmaşıktır ve hala tam olarak aydınlatılabilmiş değildir (1).



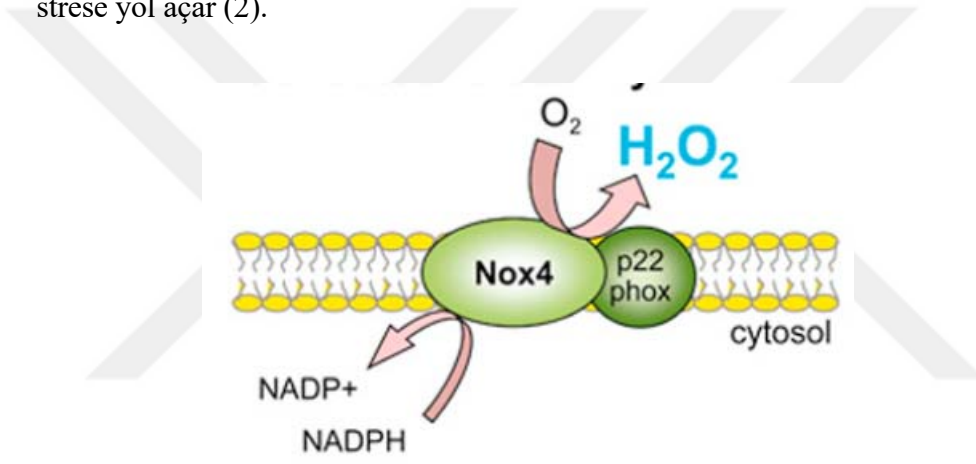
Şekil 1. Diyabetik nefropatideki patolojik lezyonlar (1)

2.1.1 Diyabetik Nefropati ile İlişkili Moleküler Mekanizmalar

2.1.1.1 Diyabetik Nefropati ve Oksidatif Stres

Diyabetik nefropatinin gelişiminin en önemli nedeni, diyabet hastalarda tam düzenlenemeyen yüksek kan glikoz düzeyidir. Kısacası, hiperglisemi çeşitli metabolik yolların aktivasyonu ve düzensizliği ile ilişkili böbrek hasarının başlatıcısıdır. Uzun süreli yüksek kan glikozuna maruz kalmak ROT seviyelerinde yükselmeye ve antioksidan üretimde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (2).

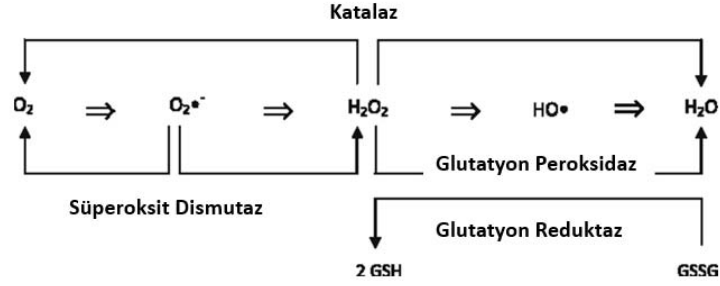
Ksantin oksidaz veya nitrik oksit sentaz gibi hücrelerde ve dokularda ROT kaynaklarının mevcut olmasına rağmen, böbrek hücrelerinde birincil ROT kaynağı, mitokondriyal elektron taşıma zinciri ve NADPH oksidaz (NOX) olduğu belirtilmiştir (2,30). Böbreğin ana yapısını oluşturan glomerüler ve tübülointerstisyel böbrek hücrelerinde etkili bir mekanizmaya sahip olan NOX hiperglisemiye oldukça duyarlıdır. NOX, ROT üretilmesinden sorumlu olan zara bağlı ve yapısal olarak aktif bir enzimdir (Şekil 2). Diyabette ortaya çıkan yüksek glikoz, özellikle böbrekte en sık görülen formu olan NOX4'ün yanı sıra Nox2, Nox1 ve p22phox'un (mRNA ve protein) ifadelerini indükleyerek, NOX'tan üretilen süperoksit ve hidrojen peroksit üretimini de arttırırlar. Böylece artan yüksek glikoz konstrasyonuna yanıt olarak üretilen aşırı ROT oksidatif strese yol açar (2).



Şekil 2. NOX4 enzim kompleksi (2)

Hücrelerde redoks dengesi bozulduğunda ortaya çıkan oksidatif stres, DNA, proteinler ve lipidler gibi hayati biyomoleküllere zarar verir (31). ROT biyolojik membranlarda bulunan poliansatüre yağ asitlerinde (PUFA) oksidasyona yol açarak lipid peroksidasyonunu başlatırlar. Peroksidasyon sonucundan oluşan lipid peroksitleri son ürünlerinden biri olan malondialdehite (MDA)'ya dönüşür (32). Hücre membranlarında oluşan peroksidasyon; membran akışkanlığında ve iyon geçirgenliklerinde bozulmaya yol açar, böylece membran bütünlüğü bozulur. Sonuç olarak peroksidasyon sonucu geri dönüşümsüz hücre hasarı meydana gelir. Bunun yanında hücreler serbest radikal saldırılarına karşı süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon gibi çeşitli enzimleri içeren içsel bir savunma mekanizmasına sahiptir

(Şekil 3) (8). Bu antioksidan mekanizmalardan ilk savunmayı yapan ise bir metalloenzim olan SOD'dur. SOD, üretilen süperoksit anyon radikallerini hidrojen peroksitle dönüştürür, böylece süperoksit anyonunun farklı bileşiklerle etkileşime girerek daha zararlı radikallerin oluşma olasılığını azaltır (33).



Şekil 3. Antioksidan enzimlerin kimyasal reaksiyonları

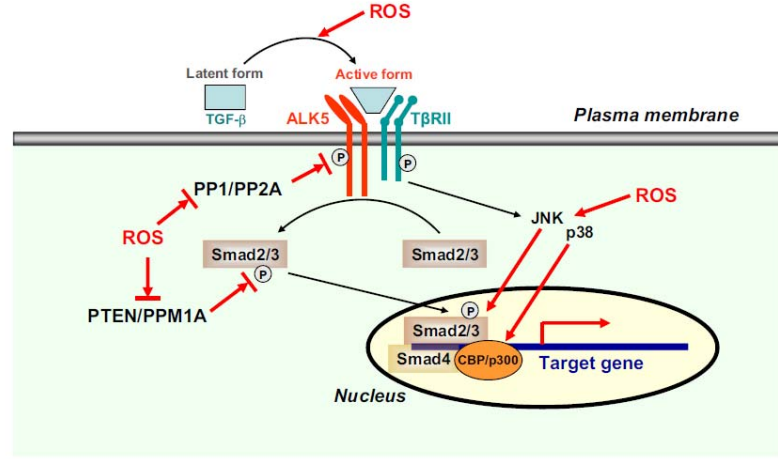
2.1.1.2 Diyabetik Nefropati ve Fibrozis

Önceden de belirtildiği gibi diyabetik nefropatinin gelişiminde en önemli moleküler mekanizmaların başında fibrozis gelmektedir. Böbrekte bulunan ve yüksek glikoz ile indüklenen NOX'lar oksidatif stres üretimine katkı sağlayarak, proinflamatuvar ve profibrotik olan TGF- β sitokinini aktive ederler (3). TGF- β , fibrozis sürecini düzenlemede temel bir role sahiptir.

Uyarılan TGF- β , özellikle glomerüler ve tübülointerstisyel hücrelerde Smad2 ve Smad3'ün fosforillenmesini sağlayarak nükleer translokasyonunu gerçekleştirirler ve burada transkripsiyon faktörlerini uyarırdıkları bilinmektedir. Nükleer translokasyondan sonra ekstrasellüler matriksteki fibronektin ve kollajen gibi proteinlerin üretimini arttırarak fibrozis geliştirir.

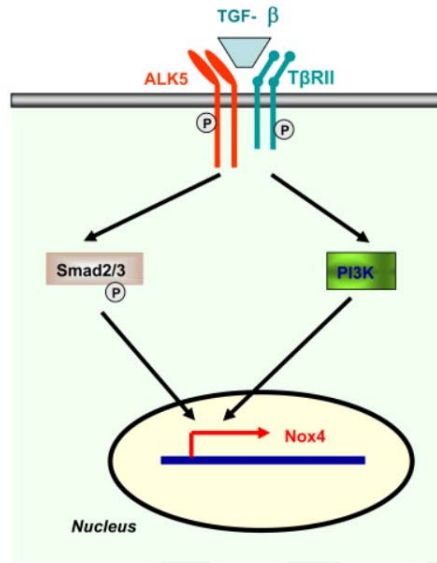
ROT'nin TGF- β ile indüklenen Smad fosforilasyonun mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Bununla birlikte, bu mekanizmayı açıklayabilecek birkaç olasılık öne sürülmüştür (7,10,34,35). ROT, TGF- β 'nın inaktif formunu aktif formuna dönüştürerek sinyal iletimini başlatır. TGF- β , TGF- β reseptörü I'e (TgF β RI, ALK5)

bağlanarak fosforillenmesini sağlar. Hücre içine iletilen sinyal ile de Smad2/3 yolağı aktive edilir. Bu aktivasyona ek olarak TGF- β aynı zamanda p38MAPK ve c-Jun N-terminal kinaz gibi MAPK sinyal ileti yollarını da indükler. Bu etkilenen sinyal ileti yolları aynı zamanda oksidatif strese duyarlıdır ve direkt olarak hücre içindeki ROT ile de aktive oldukları gösterilmiştir (Şekil 4) (7,10).



Şekil 4. TGF- β /Smad2/3 yolağı (10)

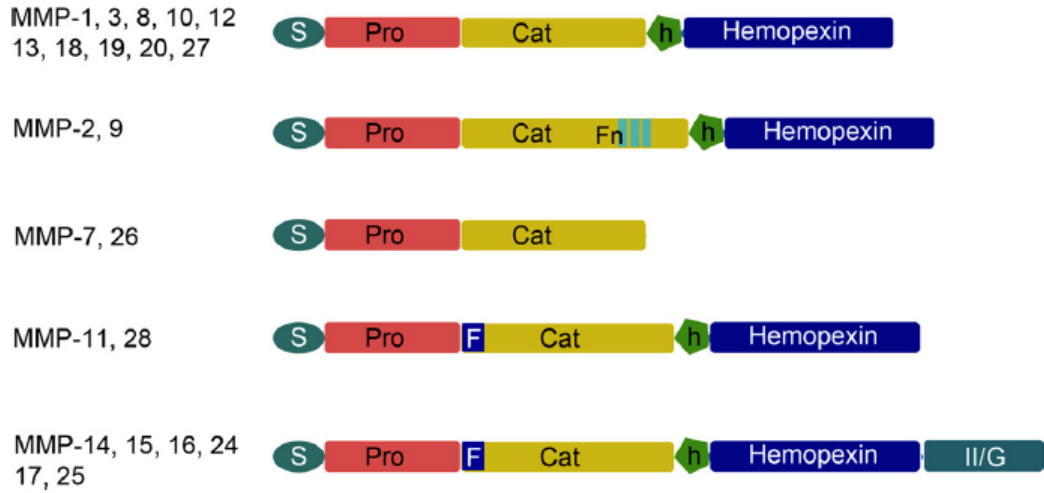
TGF- β aynı zamanda diyabette görülen yüksek glikoz seviyesinden etkilenen ve ROT'ların oluşumuna katkı sağladığı bilinen NOX4 gen ifadesini de indüklemektedir. TGF- β ile indüklenen NOX4 ifadesinde yer aldığı bilinen iki ana mekanizma vardır. Bunlardan biri Smad2/3 yolağı, diğeri ise fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) yolağıdır (Şekil 5) (10). Bu da NOX4'ün, NADPH oksidaz bağımlı redoks sinyali ile TGF- β /Smad sinyalini ileri beslemeli bir şekilde düzenleyebildiğini ve TGF- β ile indüklenen fibrozise aracılık etmede önemli bir rolü olduğu göstermektedir.



Şekil 5. NOX4 ifadesinin TGF-β ile indüklenme mekanizması (10)

2.1.1.2.1 Diyabetik Nefropati ve Matriks Metalloproteinazlar

Matriks metalloproteinazlar (MMP), ekstrasellüler matriksin tüm bileşenlerini (kollajenler, proteoglikanlar/glikozaminoglikanlar, elastin, fibronectin, lamininler ve vb.) proteolize edebilen çinko bağımlı endopeptidazların en geniş bir ailelerinden bir tanesidir (11,12). Tüm MMP'ler, bazı değişikliklerle beraber yüksek oranda korunmuş bir çekirdek yapıyı paylaşan multidomain enzimlerdir (Şekil 6). Şekil 6'da gösterildiği gibi; propeptit, katalitik alan, menteşe bölgesi ve bir hemopeksin benzeri alandan oluşur. Propeptit, substratın bağlanmasına yardım eden ve enzimin formunun bozulmasını önleyen sistein kalıntılarından oluşur. Katalitik alan, tek bir çinko iyonu ile koordine olan ve proteazın enzimatik aktivitesinden sorumlu olan üç histidinden oluşan bir bağlanma bölgesi içerir. Esnek bir menteşe bölgesinin ardından substrat spesifikliği sağlayan hemopeksin bölgesi yer alır. (13,36).



Şekil 6. MMP'lerin domain yapıları ve sınıflandırılması (13) Pro: propeptit, Cat: Katalitik Bölge

MMP'ler, substrat ve dizi homolojisine göre altı gruba ayrılır: kollajenazlar, jelatinazlar, stromelinler, matrilisinler, membran tip MMP'ler ve "diğer MMP'ler". Çalışmamızda odaklandığımız jelatinazların (MMP-2 ve MMP-9) yapısında diğer MMP'lerden farklı olarak katalitik bölgelerinde denatüre kollajenlerin bağlanmasını sağlayan 3 tekrarlı fibronektin bölgesi vardır. (14,15).

MMP'lerin çoklu fizyolojik süreçlerdeki rolü farklı faktörler tarafından kontrol edilir. Aslında, MMP'lerin düzensizliği, patolojik durumların gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. MMP aktivitesinin düzenlenmesi, transkripsiyonel, epigenetik ve transkripsiyon sonrası mekanizmalara, proteolitik aktivasyona, translasyon sonrası modifikasyonlara ve hücre dışı inhibisyona bağlıdır. MMP'ler normal fizyolojik durumlarda düşük seviyelerde bulunurlar. Bununla birlikte, ESM'nin yeniden şekillenmesi gerektiğinde, farklı uyaranlara yanıt olarak MMP'lerin ifadeleri indüklenir. Ek olarak, DNA metilasyonu veya histon asetilasyonu, MMP genlerinin transkripsiyonunun epigenetik mekanizmalarıdır (13).

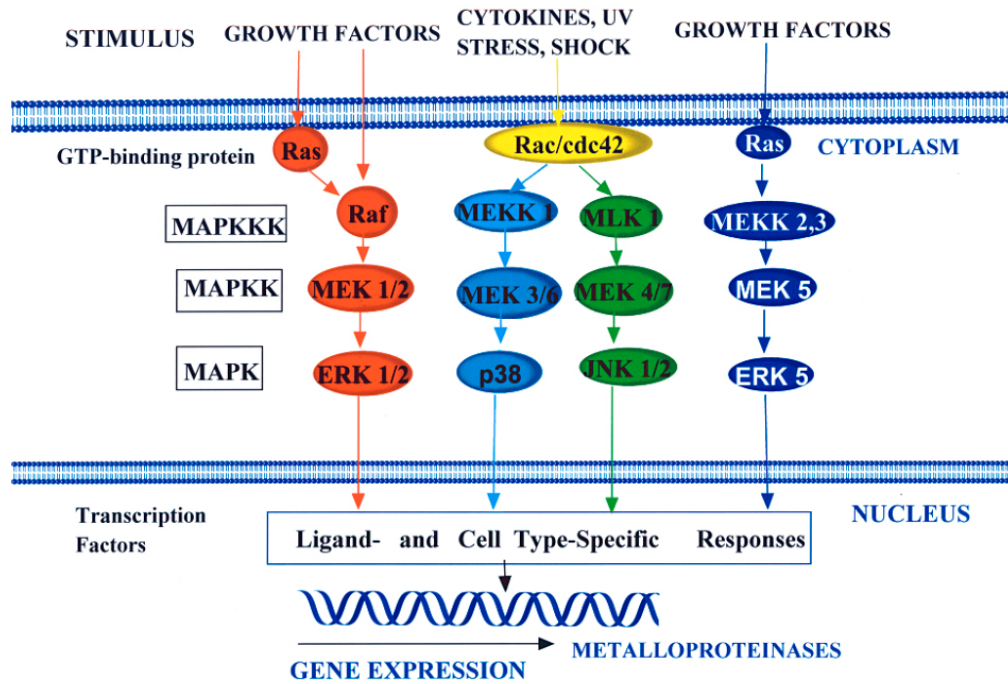
MMP'ler normal koşullarda Zn^{2+} bağımlı katalitik bölgeyi bloke eden propeptid bölgesinde bulunan "sistein anahtarı" motifi içeren propeptit nedeniyle inaktif

haldedirler. Çeşitli proteolitik enzimler (serin proteazlar, furin, plazmin ve hatta diğer MMP'ler) MMP'leri aktive edebildikleri gibi, oksidatif stres veya nitrik oksit (NO), proMMP'lerin “sistein anahtarının” destabilizasyonu yoluyla MMP'leri aktive edebilirler (16).

MMP'lerin aaktivitesi aynı zamanda, metalloproteinazların doku inhibitörleri (TIMP'ler) olarak bilinen, doğal olarak oluşan, endojen inhibitörler ailesi tarafından düzenlenir. Bilinen dört TIMP vardır ve farklı MMP'ler için değişen özgünlüklere sahip olsalar da bütün MMP'lere etki edebilirler. Örneğin, TIMP-1 tüm MMP'lere etki edebilirken, TIMP-2 özellikle MMP-2'yi inaktive eder. Genel olarak, TIMP'ler inhibisyona neden olmak için N-terminal bölgelerinden MMP'lerin katalitik bölgesine bağlanarak amino ve karbonil grubu ile katalitik çinko bölgesini inaktive eder (14).

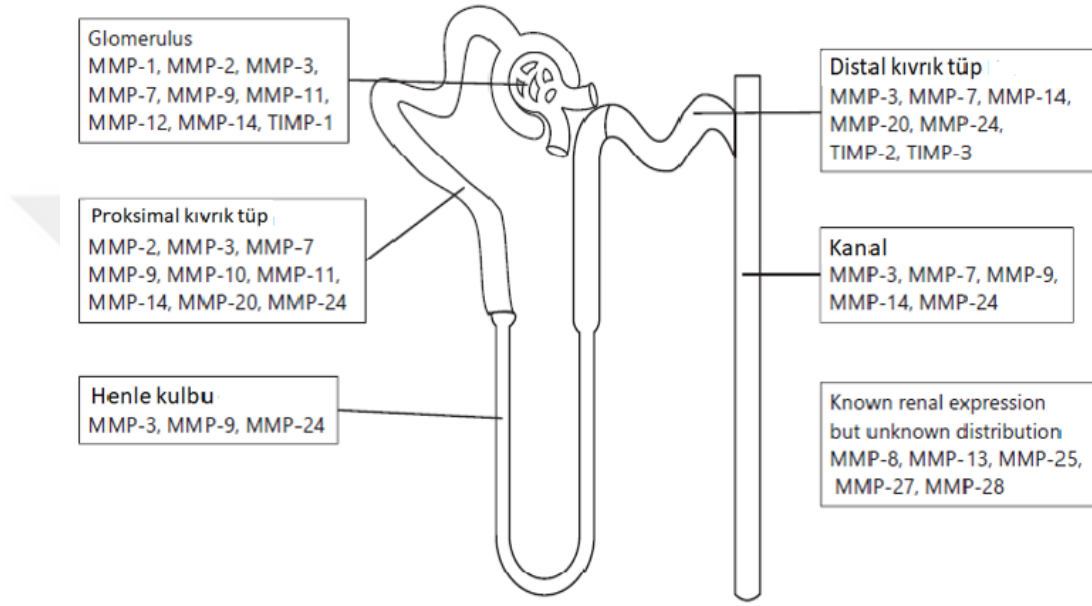
İnhibitörlerinin yanı sıra MMP'lerin EMMPRIN (Extracellular matrix metalloproteinase inducer, CD147) olarak bilinen aktivatörleri de bulunmaktadır. EMMPRIN, immünoglobulin (Ig) süper ailesine ait yüksek oranda glikozile edilmiş, Tip I bir transmembran proteindir. İki hücre dışı Ig benzeri alan, tek bir transmembran alanı ve kısa bir sitoplazmik alandan oluşur. Ekstrasellüler alanda 44. pozisyondaki asparagin kalıntısının N-glikozillenmiş olması, MMP indükleyici aktivitesi için çok önemlidir (37).

MMP'lerin regülasyonunu düzenleyen en önemli sinyal ileti yolağı ise, MAP-kinaz (Mitogenle Etkinleşen Protein Kinaz) yolağıdır. MAP-kinazlar, hedef substratların serin (Ser) ve treonin (Thr) aminoasitlerini fosforile eder ve birçok önemli hücresel aktiviteyi düzenler. Çok hücreli organizmalarda, MAPK'ların iyi karakterize edilmiş üç alt ailesi vardır. Bunlar, ekstrasellüler sinyalle ilgili kinazlar (extracellular signal-related kinases: ERK1 ve ERK2), c-Jun amino-terminal kinazlar (JNK 1, JNK 2 ve JNK 3) ve p38 MAPK (p38alfa, p38beta, p38gamma ve p38delta)'dır. ERK'ler forbol esterler, büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından aktive edilirken, p38 ve JNK'ler inflamatuvar sitokinler, ozmotik stres ve apoptotik sinyaller tarafından aktive edilir (Şekil 7). Özellikle p38 MAPK sinyal ileti yolağı reaktif oksijen türlerinden etkilenirler ve bu yüzden bu MAPK yolağı oksidatif stres sensörü olarak da bilinir (5). Çalışmamızda odaklandığımız ve MMP'lerin alt grubundan olan jelatinazların (MMP-2 ve MMP-9) MAPK sinyal ileti yolaklarından özellikle p38 MAPK ile indüklendiği gösterilmiştir (38).



Şekil 7. MAPK sinyal ileti yolaklarının şematik görüntüsü (5)

Böbreklerdeki MMP ifadeleri tam olarak karakterize edilememiş olsa da, yapılan birçok çalışma, böbrek yapısındaki düzenin korunmasından sorumlu oldukları gösterilmiştir. Normal ve patolojik koşullarda nefron boyunca MMP'lerin dağılım ve ifade profilleri Şekil 8'de verilmiştir. Yapılan çalışmalarda ayrıca MMP'lerin böbrek hastalıklarında terapötik müdahale için potansiyel hedefler olabileceği düşünülmektedir (14).



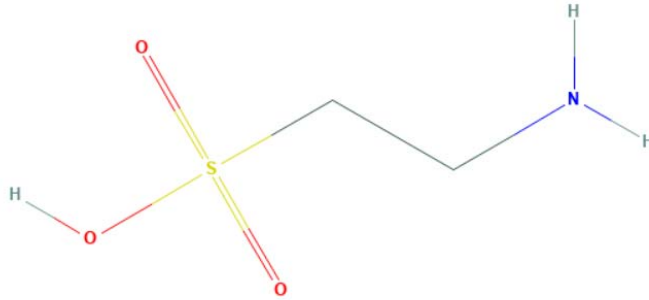
Şekil 8. MMP ve TIMP'lerin böbrekte dağılım profilleri (14)

Jelatinazlar, DN'de en çok çalışılan MMP'lerdir (39,40). MMP-2 ve TIMP-2 sistemindeki bir dengesizliğin diyabetik nefropatinin patogenezinde önemli bir role sahip olabileceği dikkat çekmektedir. Han ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, hiperglisemiden sonra MMP-2 ifadesinde bir artış saptanmıştır. Ancak diyabet geliştirilen sıçanlarda, 4 hafta sonra glomerüllerde TIMP-2 ifadesine bir yanıt olarak MMP-2 ifadesinin azaldığı gösterilmiştir (41). Ayrıca azalmış glomerüler MMP-2 ifadesi, ileri evre DN'de artmış kollajen ifadesine eşlik ettiği gösterilmiştir (42). MMP-2 profiline benzer şekilde MMP-9 ifade ve aktivitesinde de diyabetik koşullarda oksidatif strese eşlik ederek böbrek dokusunda arttığı bildirilmiştir (13,43). ESM birikiminin engellenmesinde önemli rolleri olan bu proteazların, ifade ve

aktivitelerinin artmasına rağmen ileri evre DN’de yeterli bir seviyeye ulaşamamaktadırlar. Bu da DN modellerinde MMP’lerin ve regülasyonlarında rol oynayan moleküler mekanizmaların aydınlatılmasını önemli kılmaktadır (19).

2.2 TAURİN

Taurin (2-aminoetan-sülfonik asit), İlk olarak 1827 yılında Alman bilim adamları Friedrich Tiedemann ve Leopold Gmelin tarafından öküz safrasından izole edilmiştir. Bu sebepten Latince boğa ve/veya öküz anlamına gelen 'taurus' olarak adlandırılmıştır (20–22). Kimyasal yapısına bakıldığında aminoasitlerdeki tipik karboksil grubundan yoksun olduğu, fakat bir sülfonat grubu içerdiği görülmektedir (Şekil 9). Taurinin bu yapısı, çoğu karboksil aminoasidin iyonize olmadığı fizyolojik pH’ta hem negatif hem pozitif yüklü olmasını sağlamaktadır. Bu sayede sudaki çözünürlüğü artarken, lipofilik özelliği azalmaktadır (44,45). Taurin; beyin, omurilik, lökosit, retina, kalp ve kas hücreleri başta olmak üzere vücudun her dokusunda ve hücresinde en bol bulunan amino asitlerden biridir.



Şekil 9. Taurinin kimyasal yapısı, $C_2H_7NO_3S$

Vitamin B6 varlığında metiyonin ve sisteinden sentez edilmesine rağmen en çok diyetle alınır. Taurinden zengin yiyecekler arasında yumurta, et ve deniz ürünleri bulunur. Memelilerde taurin dengesi; metionin/sistein’den sentezlenmesine, alınan

gıdadan bağırsaklarda emilimi ile idarardan böbrekte geri absorpsiyonuna, safra tuzu olarak veya konjuge edilmemiş taurinin böbrekten atılmasına bağlıdır. Kısaca taurin homeostazı emilim, dağılım, atılım ve sentez ile kontrol edilir (22,46). Karaciğer organizmadaki taurin seviyesini korumakla görevli ana organdır ve taurinin başlıca sentez edildiği yerdir (47). Taurin biyosentezinin birinci basamağı, sisteinin tiol grubu sistein dioksijenaz ile sistein sülfonik aside oksitlenmesidir (Şekil 10). Sistein sülfonik asit, sisteinsülfonik asit dekarboksilaz tarafından hipotaurin formuna karboksilleştirilir. Son basamak ise hipotaurinin hipotaurin oksidaz ile taurine okside olmasıdır. (22,44).



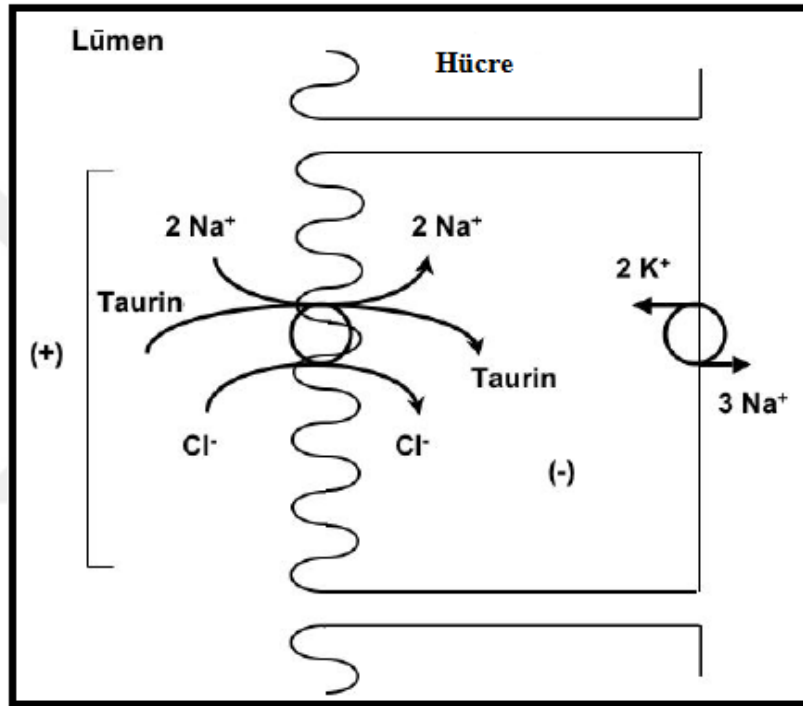
Şekil 10. Taurin sentezi

Asıl görevinin safra asidi konjugasyonu olduğu bilinen taurinin, yapılan deneysel çalışmalarla anti-inflamatuar, anti-apoptotik ve anti-oksidan etkileri olduğu da bildirilmektedir (48–50). Ana antioksidasyon mekanizması, taurin ile hipokloröz asidin (HOCl) reaksiyonu ile taurin kloramin oluşturulmasıdır.

Böbrekler taurin geri emilimini sağlayarak vücudun taurin homeostazısında ve vücuttaki dağılımda kilit rol oynamaktadır. Bunun yanında taurinin de böbrek yapısında kan akışını düzenleme, sodyum iyonu taşıma, hücre hacim düzenleme, antioksidan

özelliği ile oksidatif stresi azaltma gibi farklı birçok fizyolojik sürece katıldığı gösterilmiştir (29,51).

Taurinin hücre içine alımı esas olarak, plazma zarı üzerinde bulunan sodyum/klorür bağımlı sekonder aktif transport olan taurin taşıyıcı proteini (TauT) aracılığıyla gerçekteşir (52). Sodyumun yanı sıra böbrek epitellerinden taurin alımı, klor ve brom gerektirir. şekil 11'de transport sistemi gösterilmektedir (24).



şekil 11. Böbreklerdeki taurin transport sistemi

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Çalışmamız deneysel bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırmamız Şubat 2019 ile Mart 2020 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı'nda (ARLAB) ve Dokuz Eylül Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Bu çalışma deneysel hayvan çalışmasıdır. Çalışmada toplam 32 adet dişi Wistar albino sıçan kullanılmıştır.

3.4. Çalışma Materyali

Araştırmamızda deney hayvanı olarak Wistar albino sıçan kullanılmıştır. Sıçanların böbrek dokuları biyokimyasal ve histolojik incelemeler, toplanan kan ve idrar örnekleri de biyokimyasal analizler için kullanılmıştır.

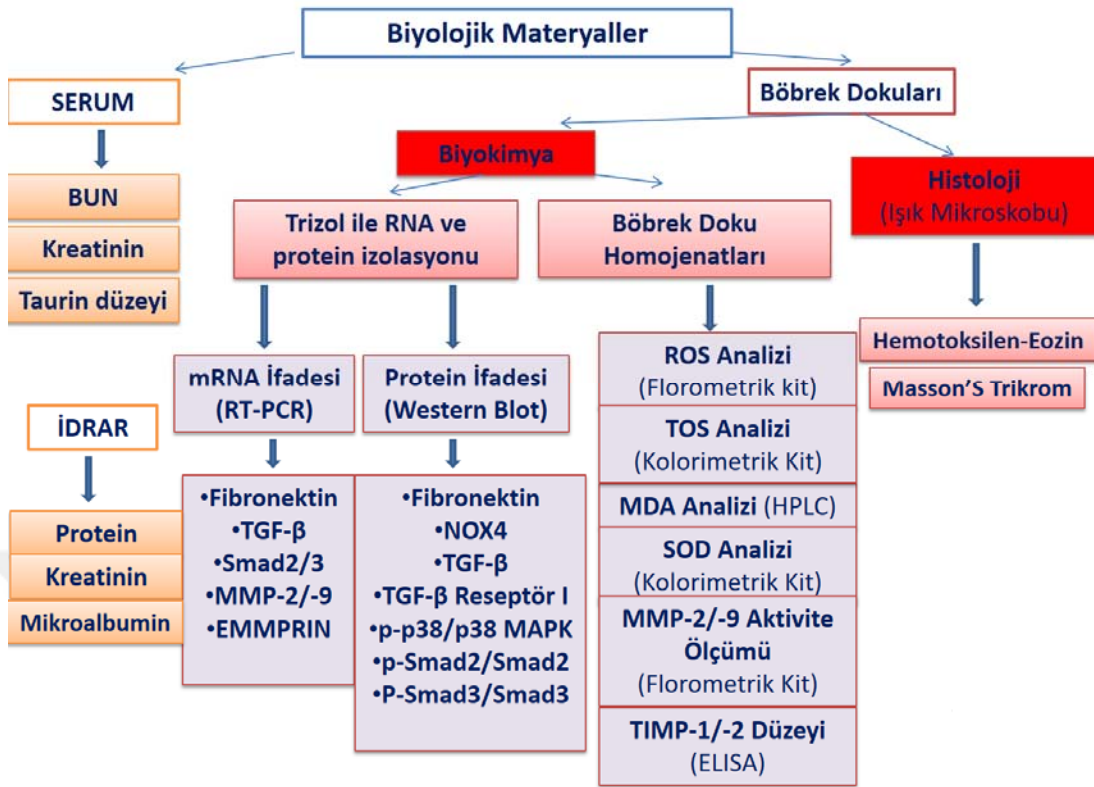
3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Çalışmanın bağımsız değişkeni: Taurin bileşiği

Çalışmanın bağımlı değişkeni: Diyabetik nefropati süresince oluşan yapısal ve biyokimyasal değişimler

3.6. Veri toplama Araçları

Toplanan biyolojik materyaller Şekil 12'de özetlendiği şekilde analiz edilmiştir.



Şekil 12. Deney akış şeması

3.6.1. Deney Hayvanı

DEÜTF Deneysel Araştırma Laboratuvarında çalışma gruplarının homojen olması için çalışmada konvensiyonel ortamda yetiştirilen 250-300 gr ağırlığında 12/12 saat gece-gündüz yaşatılan, ad libitum ile beslenen, erişkin sıçanlar kullanıldı. Mortalitesi %10 olan DN sıçan modeli için toplam 32 adet Wistar-Albino dişi sıçanlar rastgele seçilerek 4 çalışma grubu oluşturuldu (53). Sıçanlar 2154F (Tecniplast, İtalya) 480x270x200 mm iç ölçülerinde = 930 cm² steril edilebilir, polikarbonat standart sıçan kafeslerinde kafes içerisinde 3-4 adet olacak şekilde barındırıldı (54). Çalışma süresince deneye devam edemeyecek olan ve yaşamını yitiren denekler istatistik kapsamından çıkarıldı.

Deney hayvanı grupları

Sıçanların rastgele seçilerek oluşturulan 4 çalışma grubu aşağıda özetlenmiştir.

1. Kontrol grubu (n=8)
2. Kontrol grubu + Taurin (%1 içme suyu) (n=8)
3. Diyabet grubu (45 mg STZ/kg) (n=8)
4. Diyabet grubu (45 mg STZ/kg) + Taurin (%1 içme suyu) (n=8)

Diyabetik hayvan modeli

Sıçanlarda diyabet oluşturmak için sitrat tamponunda (0.02 M, pH 4.5) çözündürülmüş streptozotosin (STZ) (Sigma, Amerika Birleşik Devletleri) tek doz (45 mg/kg) olarak intraperitoneal (i.p.) enjekte edildi. İnjesiyondan sonraki 3. ve 4. günlerde kuyruk venlerinden alınan bir damla kan örneklerinden, glukometri cihazı (Medisense Optium glucometer (Abbott Laboratories, Bedford MA)) kullanılarak kan şekerleri ölçüldü ve kan şekeri 200 mg/dL ve üzerinde olanlar diyabetik kabul edildi. Tedavi gruplarında uygulamalar, diyabet gelişimi belirlendikten sonra başladı. 12 haftanın sonunda deney hayvanları sakrifiye edildi (55–57). Taurin (Sigma, St. Louis, MO, ABD) %1 oranında içme suyuna karıştırılarak verildi (28). Çalışma gruplarındaki işlemler aşağıda detaylı olarak belirtilmiştir;

1. Kontrol Grubu: Standart sıçan kafeslerinde barındırıldı ve verilecek olan STZ hacminde serum fizyolojik enjekte edildi. İnjesiyondan sonraki 3. günde kuyruk venlerinden alınan bir damla kan örneklerinden, glukometri cihazı (Medisense Optium glucometer (Abbott Laboratories, Bedford MA)) ile kan şekeri ölçüldü ve kayıt altına alındı. 12 hafta boyunca standart içme suyu verildi.
2. Taurin Grubu: Standart sıçan kafeslerinde barındırıldı ve verilecek olan STZ hacminde serum fizyolojik enjekte edildi. İnjesiyondan sonraki 3. günde kuyruk

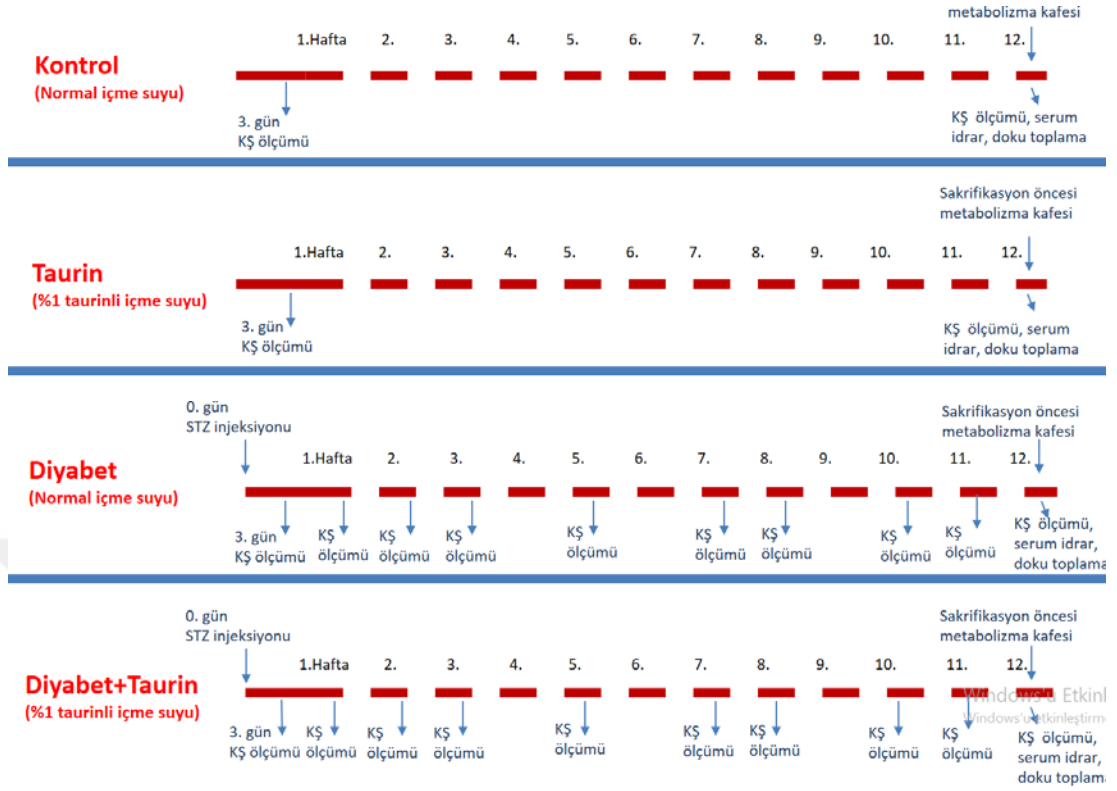
venlerinden alınan bir damla kan örneklerinden, glukometri cihazı ile kan şekeri ölçüldü ve kayıt altına alındı. 12 hafta boyunca içme sularına %1 oranında taurin eklendi.

3. Diyabet Grubu: Standart sıçan kafeslerinde barındırıldı ve tek doz 45 mg/kg STZ enjekte edildi. Enjeksiyondan sonraki 3. günde kuyruk venlerinden alınan bir damla kan örneklerinden, glukometri cihazı ile kan şekeri ölçüldü ve kayıt altına alındı. Diyabet modeli oluşturulan hayvanlara standart içme suyu verildi.

4. Diyabet Grubu + Taurin (%1): Standart sıçan kafeslerinde barındırıldı ve tek doz 45 mg/kg STZ enjekte edildi. Enjeksiyondan sonraki 3. günde kuyruk venlerinden alınan bir damla kan örneklerinden, glukometri cihazı ile kan şekeri ölçüldü ve kayıt altına alındı. Diyabet modeli oluşturulan hayvanların içme sularına 12 hafta boyunca %1 taurin karıştırıldı.

Deney hayvanları sürecinde haftada bir olacak şekilde kan şekeri ölçümleri ile ağırlık takipleri gerçekleştirildi. Ölçümler Ek 2' de tablo şeklinde verilmiştir. Deney sonunda metabolik kafese alınan hayvanlardan idrar toplandı. Toplanan idrarların ve hayvanlar tarafından içilen suların hacimleri not edildi. Hayvanlar deney sonunda dahil oldukları gruplara göre sakrifiye edildi. Sakrifikasyon sonrası böbrek fibrozisini belirlemek için tartımlar alındı. Aynı zamanda kanları alınarak serumlar ayrıldı (58).

Yapılan işlemler Şekil 13'te özetlenmiştir.



Şekil 6. Deney hayvanlarına uygulanan 12 haftalık işlem planı

(KŞ: kan şekeri, STZ: streptozotosin)

3.6.2 Histolojik Değerlendirmeler

Sakrifikasyondan sonra böbrek dokuları %10'luk formaldehit içerisinde alındı ve 48 saat fiske edildi. Ardından rutin doku takip prosedürü uygulandı, böbrek dokuları uygun şekilde parafin bloklara gömüldü. Bloklamadan sonra parafinlenmiş dokudan Rotary mikrotom (RM 2255, Leica, Germany) aracılığı ile 5 µm'lik kesitler alındı. Her deneğe ait kesitler dokunun genel histomorfolojik özelliklerini değerlendirmek için hematoxilen-eozin ve Masson-Trikrom ile boyandı.

Hematoksilen-Eozin boyaması

Alınan kesitler sırasıyla; deparafinizasyon, rehidrasyon, yıkama, hematoksilin (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyama, yıkama, eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyama, yıkama, dehidratasyon ve şeffaflaştırma basamaklarından geçirildi. Ardından entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı.

Masson-Trikrom boyaması

Alınan parafin kesitler öncelikle sırasıyla; deparafinizasyon, rehidrasyon, yıkama işlemlerinden geçirildi. 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 yıkama işlemi ve dehidratasyon işlemlerinden sonra şeffaflaştırma yapılarak entellan ile kapatıldı.

Böbrek dokusunun histomorfolojisinin değerlendirilmesi

Kesitlerden elde edilen görüntülerin incelenmesinde bilgisayarlı video kamera esaslı görüntü analiz yöntemi kullanıldı (UTHSC Image yazılım). 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) 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= % 0-10, 2= % 11-25, 3= % 26-45, 4= % 46-75, 5= % 76-100 olarak uygulandı (59).

3.6.3 Biyokimyasal İncelemeler

Analizler deney hayvanlarından alınan idrar, serum ve böbrek doku örneklerinde gerçekleştirildi. Serumda değerlendirilecek parametreler için ise kırmızı kapaklı tüplere alınan kan örnekleri 2500 rpm'de santrifüj edilerek üst faz alındı. İdrarlar falkonlara toplandı ve 1000rpm de santrifüj edilerek porsiyonlandı. Biyokimyasal analizler için sağ ve sol böbrek ayrı ayrı porsiyonlandı ve dokular porsiyonlandıktan hemen sonra sıvı nitrojene atılıp donması sağlandı. Bütün çalışılacak materyaller analiz zamanına kadar -80°C'de saklandı.

3.6.3.1 Dokuların Hazırlanması

Dokular analiz koşullarına göre uygun homojenizasyon tamponu ile homojenizasyon gerçekleştirildi. Tris-HCl pH 7.4 homojenizasyon tamponu ile dokular 1:8 oranında (w/v) homojenize edildi (TissueLyser II, Qiagen, Almanya). MDA ve doku taurin analizi için 2500 xg de santrifüj edildi, üst faz alındı. 11000 xg de ikinci santrifüj sonrası toplanan supernatant ise SOD enzim aktivitesi, ROT, TOS, TIMP ile MMP-2 ve -9 aktivite analizi ve protein ifadesi (Western blot) analizleri için kullanılmak üzere porsiyonlandı. Homojenizasyon tamponun tüm içeriği, 50 mM Tris-HCl, 0.15M NaCl, 10 mM CaCl₂, %0.05 Brij 35 ve proteaz/fosfatase inhibitörü (pH 7.0) şeklindedir. mRNA analizi için homojenizasyon trizol solüsyonu (Invitrogen, ABD) ile gerçekleştirildi. Trizolün içinde homojenize edilen dokuların RNA izolasyon adımları 'Böbrek dokusunda RNA izolasyonu' başlığının altında detaylı olarak

tanımlanmıştır. Elde edilen RNA'lar RNaz bakımından temiz olan ependorflara aktarılıp -80 °C' de saklandı.

3.6.3.2 Serum ve Böbrek Dokusu Taurin Düzeylerinin Analizi

Doku ve serum taurin düzeyleri Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile değerlendirildi. Yöntemin temeli, örneklerin o-fitalaldehit (OPA) ile türevlendirilmesine dayanmaktadır (60). Yöntemin uygulama basamakları aşağıda açıklanmıştır. Sonuçlar plazma taurine düzeyi için mg/mL ve doku düzeyi için mg/mg doku protein olarak ifade edildi.

Uygulama basamakları aşağıda özetlenmiştir:

- 300 µL örneklerin ve standartların üzerine 50 µL %20'lik sülfosalisilik asit ilave edildi ve vortekslendi.
- 15300 x g'de 5 dakika santrifüjlendi.
- Süpernatant 25 µL alınır ve üzerine 175 µL 0.4 M borat tamponu pH 10 eklendi.
- Karışımın üzerine 200 µL taze hazırlanmış OPA ilave edilir ve karıştırıldı.
- HPLC kolonuna enjekte edilebilmesi için cam tüplere aktarımı yapıldı.

3.6.3.3 Serum Kreatinin ve Kan Üre Azotu (BUN) Düzeylerinin Ölçülmesi

Serum Kreatinin ve kan üre azotu (BUN) düzeyleri için Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarından hizmet alımı yapılarak Abbott Architect C16000 otoanaliz cihazı ile çalışıldı. Cihaz, serum kreatinin ve BUN düzeylerini sırasıyla Jaffe ve üreaz reaksiyonu prensibiyle ölçmektedir. Jaffe reaksiyonunun prensibi, alkali pH'da örnekdeki kreatinin ile pikrik asit reaksiyona

girerek oluşturdukları kompleksin kolorimetrik ölçümüne dayanır (61). Üreaz reaksiyonunun prensibi ise; üre, su ve üreaz ile hidrolize olduktan sonra amonyak ve karbondioksit açığa çıkar. Açığa çıkan amonyak; glutamat- dehidrojenaz (GLDH), 2-oksoglutarat ve NADH ile birleşir. Glutamat ile NAD⁺ oluşur. Birim zamanda NADH absorbansındaki düşüş, üre konsantrasyonu ile orantılıdır (62).

3.6.3.4 İdrar Mikroalbumin, Protein ve Kreatinin Düzeyleri

İdrarda protein, mikroalbumin ve kreatinin düzeyleri için Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarından hizmet alımı yapıldı. Örnekler Bechman Coulter AU5800 otoanaliz cihazı ile çalışıldı. İdrar kreatinin düzeyi, Jaffe reaksiyonu prensibi ile idrar albümin ise immunotürbidimetrik yöntem ile çalışıldı. Türbidimetrik yöntemde anti-insan albümin antikorları, örnekteki albümin ile birleşir ve oluşan bu çökeltilinin absorbansı, numunedeki albümin miktarı ile orantılıdır. İdrar protein düzeyi ölçümü için kullanılan testin prensibi ise, pirogallol kırmızı-molibdat kompleksinin, protein moleküllerinin temel amino gruplarını bağladığında meydana gelen absorbans değişimine dayanmaktadır. Bu kompleksin absorbansı, örnekteki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (63).

3.6.3.5 Böbrek Dokusunda RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu trizol solüsyonu ile manuel olarak izole edildi (64). Yönteme ait basamaklar aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir;

RNA izolasyon adımları aşağıda özetlenmektedir:

- 0.1 g tartılan doku 1ml trizol ile homojenize edildi.
- Homojenizasyondan sonra 5-10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- 0.2 ml kloroform eklenir ve tüp ters-düz yapıldı.

- 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- 4 °C 12000g 15 dakika santrifüj edildi.
- Fazlar ayrılır ve üst fazda toplanan RNA'lar alınıp başka bir tübe aktarıldı.
- Üzerine 500 µl izopropanol kondu.
- Oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi.
- -80 °C'de bir gece boyunca inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası 4 °C 15000 x g 30 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant atılır ve %80 soğuk etanol ile yıkandı.
- 4 °C yüksek devirde 5 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant atılır ve 5-10 dakika RNA'ların kuruması, etanolün uzaklaşması için oda sıcaklığında bekletildi.
- Saf su (yaklaşık 50 µl) ile RNA pelleti çözüldü.

3.6.3.6 Gerçek-Zamanlı PCR ile Gen İfadeleri Analizi

Örneklerden elde edilen RNA'ların kalitesi ve konsantrasyonunun belirlenmesi için spektrofotometre (2000/2000c, NanoDrop, Thermo) kullanılarak ölçüm yapıldı. 230 nm fenol, 260 nm DNA ve 280 nm ise proteinler için absorbanlarının en fazla olduğu dalga boyudur. RNA'nın saf olduğunun anlaşılabilmesi için A260/A280 oranının ~1.9 olmalı, A260/A230 oranının da 1.8-2.2 olması beklenmektedir.

cDNA sentezi için OneScript Plus (ABM, Kat. No: G236) cDNA sentez kitiyle üretici firmanın ilettiği prosedür doğrultusunda termal döngü cihazında gerçekleştirildi.

cDNA sentez karışımı ve prosedürü Tablo 1’ de anlatılmaktadır. Sentezlenen cDNA’lar RT-PCR’ da çalışılınca kadar -20 °C’ de saklandı.

Tablo 1. cDNA sentez karışımı ve prosedürü

Bileşenler	Hacim	Son Konsantrasyon
Total RNA	x	2.5 µg/ml
Oligo (dT) Primer	1µl	0.5 µM
dNTP Karışımı	1µl	500 µM
RNAaz içermeyen su	14.5 µl-x	
Hazırlanan reaksiyon karışımı 65°C de 5 dakika bekletilip buza alınır ve kısa bir santrifüj yapılır.		
5X RT tamponu	4 µl	1X
Ribonukleaz inhibitörü	0.5 µl	20 U/rxn
Reverse Transkriptaz Enzimi	1µl	200 U/rxn
Karışım cDNA sentezi için 50 °C de 15 dakika inkübe edildikten sonra reaksiyonu sonlandırmak için 85 °C de 5 dakika bekletilir. Ardından 4 °C’ de soğutulur.		

Gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) reaksiyonları Qiagen marka RT² SYBR Green qPCR Mastermix kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Tablo 2’de özetlenen ticari kitin talimatları doğrultusunda deneyler kuruldu. Rotor gene (Qiagen, Almanya) cihazı ve yazılım programıyla sonuçlar elde edildi. Kullanılan her bir gen için ileri ve ters gen dizilimler 5’- 3’ olacak şekilde Tablo 3’de verilmiştir. Her bir gen kontrol geni olarak kullanılan β-aktine oranlandı ve amplikasyon sonucunda elde edilen Ct (thershold-eşik değer) değerleri kullanılarak çalışmamızda belirtilen genlerin mRNA ifade düzeyleri belirlendi (65).

Tablo 2. Gerçek Zamanlı PCR protokolü

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 °C Sentez sıcaklığı: 56 °C – 58 °C Uzama sıcaklığı: 72 °C; 40 döngü	

Tablo 3. Gerçek Zamanlı PCR için kullanılan primerler

GEN	5' - 3'	3'-5'
Fibronectin	GCTTCAAGCTGGGTGTACGA	AAGTTGGTTGGGGGAGACAG
TGF-β	TGTCCGGCAGTGGCTGAAC	GGCTTCGCACCCACGTAGT
Smad2	GCCGAGTGCCTAAGTGAT	AGACTGAGCCAGAAGAGC
Smad3	TGTCATCTACTGCCGCTTGTG	CAACACTGGAGGTAGCACTGG
MMP-2	TGGTGTGGCACCACCGAGGA	CCTTGCCATCGCTTCGGCCA
MMP-9	CCTCTGCATGAAGACGACATAA	GGTCAGGTTTAGAGCCACGA
EMMPRIN	ACAGCAGTGGCATTGACATC	TGTTCCGATTTCCTTCCCAC

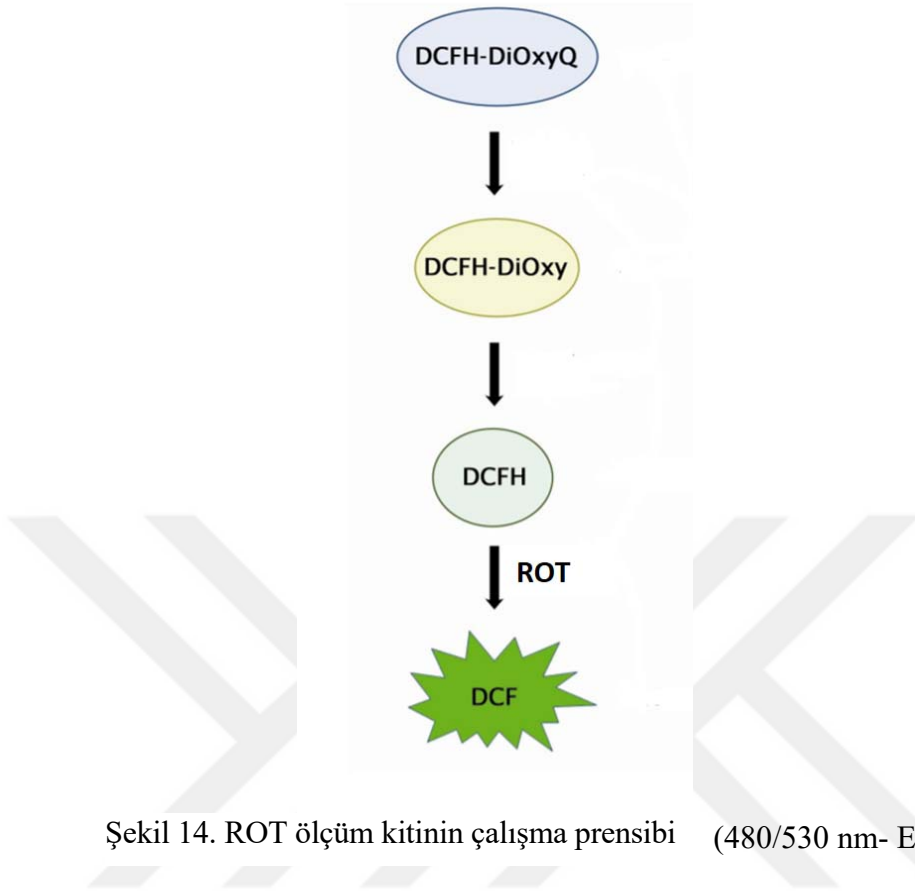
β -aktin	TGCAGAAGGAGATTACTGCC	CGCAGCTCAGTAACAGTCC
----------------	----------------------	---------------------

3.6.3.7 Böbrek Dokusu Reaktif Oksijen Türleri (ROT) Düzeyleri Analizi

Doku ROT düzeyleri florometrik kit (Cell Biolabs, STA-347, Amerika Birleşik Devletleri) ile değerlendirildi. Testte, 2', 7' diklorodihidrofloresin diasetat ile benzer yapıya sahip özel bir ROT probu olan florojenik diklorodihidrofluoresin DiOxyQ (DCFH-DiOxyQ) önce DCFH formuna dönüşür. Oluşan DCFH, ROT türleri ile reaksiyona girer ve DCF'ye oksitlenir (Şekil 14). Ortaya çıkan floresans yoğunluğu, örnek içindeki ROT seviyeleri ile orantılıdır.

Uygulama basamakları;

- Standart olarak DCF kullanılır. 0 / 1 / 10 / 100 / 1000 / 10000 nM olacak şekilde standartlar hazırlandı.
- 50 μ l örnek ve standart floresan okumaya uygun mikro plağa kondu.
- Herbir kuyuya 50 μ l katalizör eklendi.
- 100 μ l DCFH solüsyonu eklenir ve ışıktan uzak oda sıcaklığında 15-45 dakika bekletildi.
- 480/530 nm (Eksitasyon/Emisyon) dalga boylarında floresan okuma yapıldı.
- Elde edilen standart grafiği yardımıyla sonuçlar hesaplandı.
- Örneklerdeki ROT miktarı nM/mg protein olarak ifade edildi.



Şekil 14. ROT ölçüm kitinin çalışma prensibi (480/530 nm- Ex/Em)

3.6.3.8 Böbrek Dokusu Total Oksidan Düzeyleri (TOS) Analizi

Doku toplam oksidan düzeyleri (total oxidan status-TOS) kolorimetrik bir kit (Rel Assay Diagnostic, Türkiye) ile ölçüldü. Kit, örnekte bulunan oksidanların iyon-şelatör kompleksindeki demiri (Fe^{+2}) demir iyonuna (Fe^{+3}) oksitlemesiyle çalışır. Oksidasyon reaksiyonu sonunda oluşan demir iyonu asidik ortamda kromojen ile renkli bir kompleks oluşturur. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen renk yoğunluğu, örnekte bulunan oksidan moleküllerin toplam miktarı ile doğru orantılıdır (66).

Kitin uygulama basamakları aşağıda özetlenmiştir;

- 0-10 $\mu\text{mol/L}$ aralığında olacak şekilde 10 $\mu\text{mol/L}$ ana stoktan standart hazırlandı.
- Örnekler ve standartlardan 30 μl eklendi.

- Reaktif 1 den 200 µl ilave edildi.
- İyice karıştırıldıktan sonra Absorbans 1 (A1) sonucu için 530 nm 'de ölçüldü.
- Ölçümünden sonra 10 µl reaktif 2 eklendi.
- İyice karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika beklendi.
- Absorbans 2 (A2) için 530 nm 'de ölçüldü.
- Ölçümlerden sonra absorbans farkı alınarak standart grafiğinden faydalanarak sonuçlar hesaplandı.
- Sonuçlar µmol/g protein şeklinde verildi.

3.6.3.9 Böbrek Dokusu MDA Analizi

Doku MDA düzeyleri HPLC cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. 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) değerlendirildi. Mobil faz olarak %30 etanol içeren 10 mM, pH 7.0 fosfat tampon kullanıldı. 150-4.6 mm boyutlarında 5 µM tanecik çapında C18 kolon ve standart olarak 1.5, 3, 5, 10, 20, 40 µmol/L konsantrasyonlarında 1, 1, 3, 6 tetraetoksiipropen (TEP) (Sigma, 85H2501) kullanıldı (67). Doku MDA değerleri µmol/g protein olarak ifade edildi.

Uygulama basamakları aşağıda özetlenmektedir;

- 40 µl örnek ve standartlar falkon tüplere konuldu.
- 100 µl saf sudan sonra, 20 µl 2.8 mmol/L bütillen hidroksi tolüen (BHT) (etanolda) eklendi.
- 40 µl %8.1 SDS ve 600 µL 8 g/L TBA-Asetik asit karışımı eklendi.

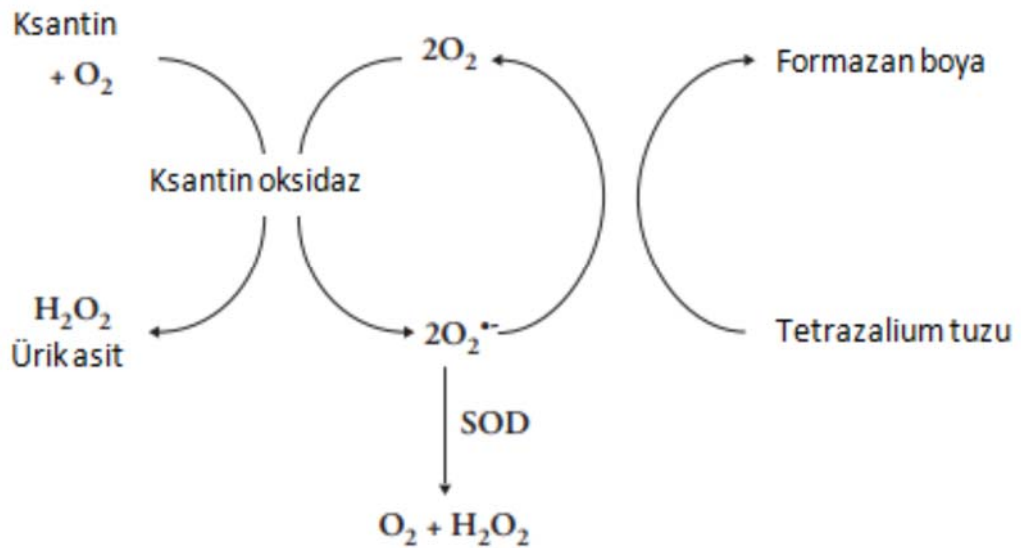
- 95 °C’ de 1 saat boyunca su banyosunda bekletildi.
- Su banyosundan çıkarıldıktan sonra reaksiyonun durması amacıyla buz banyosunda soğutuldu.
- 200 µl saf su ile 1000 µl butanol-piridin (15-1) eklenir ve 1 dakika boyunca karıştırıldı.
- Fazların ayrışması için 2-3 dakika bekletildi.
- Organik fazların ayrırıldığı gözlemlendikten sonra üst faz ependorf tübe aktarıldı.
- 10000 rpm’ de 5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası faz HPLC (Shimadzu VP Series, Japonya) cihazına verilmek üzere cam tüplere 100’er µl olacak şekilde aktarıldı.
- Cihazın kolonuna cam tüpten 10 µl enjekte edildi.
- Her bir örnek ve standartlara ait olan kromatogramlar üzerinden alan hesaplanarak MDA düzeyleri belirlendi.

3.6.3.10 Böbrek Dokusu SOD Aktivite Analizi

SOD, en önemli antioksidan enzimlerden biridir. Süperoksit anyonunun hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürür. Kullanılan SOD analiz kitinde (Katalog no: K335-100, Biovision, Amerika Birleşik Devletleri), süperoksit anyonunun indirgenmesiyle suda çözünür bir formazan boyası olan WST-1 açığa çıkar. Bir süperoksit anyonun indirgeme hızı ile ksantin oksidaz aktivitesi doğrusal olarak ilişkilidir ve SOD tarafından bu eşlenik reaksiyon inhibe edilir. Çalışma prensibi Şekil 15’te gösterilmektedir. Kitte kullanılan solüsyonların miktarlar ise Tablo 4’ te özetlenmiştir. Sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

Uygulama basamakları aşağıda özetlenmiştir:

- Her kuyudaki çözelti hacimleri miktarı Tablo 'de belirtilmektedir.
- Eklemeler en son enzim çalışma solüsyonu olacak şekilde kondu.
- 37°C' de 20 dakika bekletildi.
- Süre sonunda 450 nm'de ölçümler alındı.
- Sonuçlar SOD inhibisyonu aşağıda gösterilen formülle hesaplandı.
- SOD aktivite (İnh. oranı) = $\frac{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}}) - (A_{\text{örnek}} - A_{\text{blank2}})}{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}})} \times 100$
- Kitle beraber alınan standart SOD (Biovision, Katalog No: 4802) ile % inhibisyon, SOD aktivitesine çevrildi.



Şekil 15. SOD kitinin çalışma prensibi

Tablo 4. SOD kiti çalışmasında kullanılan çözeltiler

	Örnek-standart	Blank 1	Blank2	Blank 3
Örnek veya standart	20 µl		20 µl	
Saf su		20 µl		20 µl
WST çalışma çözeltisi	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
Enzim çalışma çözeltisi			20 µl	20 µl

3.6.3.11 Böbrek Dokusu MMP-2 ve MMP-9 Aktivite Analizi

Hazırlanan doku homojenatlarında MMP-2 ve MMP-9'un aktiviteleri florometrik kit (CBA003, Calbiochem, Almanya) 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 spesifik olan bu yapının parçalanmasıyla birlikte açığa çıkan floresans ışımadaki artış ölçüldü.

Uygulama basamakları aşağıda özetlenmiştir;

- Örnekler ve hazırlanan MMP-2 ve MMP-9 standartları (0, 20, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 ng/ml) aktivasyon tamponu (APMA: p-aminofenilmerkürük asetat) ile seyreltildi.
- 90 µl örnek ve standart üzerine saf su ile hazırlanan çalışma çözeltisi eklendi.
- Fluorometrik okuma 320 / 405 nm (Ex/Em) de yapıldı.
- MMP-2' ler için 3 saatlik ölçüm alınırken, MMP-9 için ise 18 saatlik ölçüm alındı.
- Sonuçlar µg MMP/µg protein olarak ifade edildi.

3.6.3.12 Böbrek Dokusu TIMP-1 ve TIMP-2 Analizi

Hazırlanan doku homojenatlarında MMP-2 ve MMP-9'un endojen inhibitörleri olan TIMP-1 ve TIMP-2 protein düzeyleri ELISA kitleri ile değerlendirildi. TIMP-1 ve TIMP-2 ELISA (Enzim-Bağlı İmmünoSorbent Testi) kitlerinde (EK0583, EK1302, sırasıyla; Boster, Çin) sıçan TIMP-1 ve TIMP-2'ye özgü antikorla kaplanmış plak kullanılmış ve bağlanmadaki artışla doğru orantılı olarak değişen renk şiddetleri ölçülmüştür. Ön denemeler sonucunda hazırlanan örnekler 1/100 seyreltme yapılarak kullanıldı. Sonuçlar ng/mg protein olarak ifade edildi.

Uygulama basamakları;

- Yöntem için, TIMP-1 ve TIMP-2 standartları kullanıldı.
- TIMP-1 için standartlar 0-31.2-62.5-125-250-500-1000 pg/ml; TIMP-2 için 0-156-313-625-1250-2500-5000 pg/ml olacak şekilde hazırlandı.
- Örnek ve standartlardan her bir kuyucuğa 100 µl eklendi.
- 90 dakika beklendi.
- Süre dolduktan sonra mikropak içeriği döküldü.
- TIMP-1 ve TIMP-2 antibody solüsyonu hazırlandıktan sonra her bir kuyucuğa 100 µl eklendi.
- 37 °C' de 60 dakika bekletildi.
- Mikropak tekrar temizlenir ve 3 defa 300 µl PBS tamponu ile yıkandı.
- ABC antikor solüsyonu hazırlandıktan sonra 100'er µl eklendi.
- 37 °C' de 30 dakika bekletildi.
- ABC solüsyonu döküldükten sonra 5 defa 300 µl PBS ile yıkandı.

- Yıkama işleminden sonra 90 µl renk solüsyonu eklenir ve TIMP-1 için 25-30 dakika, TIMP-2 için 15-20 dakika beklendi.
- Kuyucuklarda da renk değişimi gözlendikten sonra 100 µl Stop solüsyonu eklendi.
- Sarı renge dönen kuyucuklar 450 nm' de okundu.

3.6.3.13 Böbrek Dokusu Western Blot: NOX4, Fibronektin, TGF- β reseptör 1, TGF- β /Smad2/3, p38 MAPK protein ifadeleri

Western Blot analizi, poliakrilamid jel elektroforezi ile molekül kütlelerine göre ayrılmış olan protein karışımında ilgilenilen proteinin düzeyini ölçmek için kullanılan bir yöntemdir. Yöntemde, ölçülmek istenen proteine özgü antikorunun kullanılmasıyla protein düzeyi belirlenir. Western blot analizi kısaca; poliakrilamid jel elektroforezi ile protein ayrılması, jeldeki proteinlerin membrana aktarımı ve ilgili proteinin ölçülebilir hale getirilmesi şeklinde üç basamaktan oluşur.

Basamaklar aşamalarıyla ayrıntılı olarak aşağıda açıklanmıştır.

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

Jel yürütme işlemi için vertikal elektroforez sistemi (BioRad, Amerika Birleşik Devletleri) kullanıldı. Bu sistem, yürütme tankı, jel taşıyan camlar (1,5 mm cam, ince cam, 10 kuyulu tarak), camları tutan kelepçe sistemleri ve güç kaynağından oluşmaktadır.

- 101. X 7.3 cm boyutlarındaki iki cam üstüste konulduktan sonra sabitlendi ve dökme standına yerleştirildi.
- Dökme standına yerleştirilen camlara pipet yardımıyla Tablo 5'te içeriği gösterilen ayırıcı jel karışımı belli bir hızda döküldü. Polimerizasyonun hızlı olabilmesi için oksijenle teması propanolle kaplanarak kesildi. Poliakrilamid

jel, monomerik olan akrilamidin poliakrilamid zincirlerine polimerizasyonu ve N,N'-metilen- bisakrilamidin çapraz bağlanması sonucu oluşmaktadır.

- Polimerizasyon tamamlandıktan sonra izopropanol uzaklaştırıldı ve jellerin üstü saf su ile yıkandı.
- Paketleyici jel çözeltisi Tablo 6'da içeriği gösterildiği gibi hazırlandı. Ayırıcı jelin üstüne döküldü ve kuyucuk oluşabilmesi için taraklar takıldı.

Tablo 5. SDS PAGE ayırıcı jel (%12) çözeltileri

JEL BİLEŞENLERİ	HACİM
Saf su	9.3 ml
%30 Akrilamid/Bisakrilamid	8 ml
3 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.5 ml
% 20 SDS	0.05 ml
%10 (w/v) Amonyum persülfat	0.2 ml
TEMED	0.02 ml
Total karışım	20.00 ml

Tablo 6. SDS PAGE paketleyici jel (%4) çözeltileri

JEL BİLEŞENLERİ	HACİM
Saf su	6.00 mL
%30 Akrilamid/Bis-akrilamid	1.33 mL
1 M Tris-HCl (pH 6.8)	2.50 mL
% 20 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 80 µg protein olacak biçimde daha önce elde edilen her bir homojenattan 5X örnek tamponu (25 mM Tris pH 6.8, %5 SDS, %2.2 merkaptotanol, %10 gliserol, %0.002 bromfenol blue) ile örnekler hazırlandı ve 95 °C'de 5 dakika tutuldu.

Jelin Yüklmesi

Paketleyici jel polimerize olduktan sonra tarak çıkartıldı. Camlar yürütme aparatına yerleştirildi ve tanka konuldu. Tank ve yerleştirilen camların arası 1X yürütme tamponu (0,25 M Tris, 1.92 M glisin, %1 SDS) ile dolduruldu. Kuyucuklara hazırlanan protein örnekleri ve moleküler ağırlık standartı (Kat. no: G252, abm, Kanada) yüklendi.

Elektroforetik Yürütme

Örnekler yüklendikten sonra sistemin kapağı kapatılarak elektrotlara bağlandı. İlk başta 70 V, örnekler ayrıcı jele gelince akım 100 V'a yükseltildi. Örneklerle birlikte yüklenen ağırlık standardı takip edildi. Proteinler arası yeterli ayrılma sağlandıktan sonra sistem kapatıldı ve jeller çıkarıldı.

Proteinlerin Membrana Transferi

Çalışmamızda ıslak transfer yapıldı. Transferde kullanılacak olan PVDF membran metanol ile yıkandı. Filtre kâğıtları 1X transfer tamponu (2 M glisin, 0,25 M Tris) ile ıslatıldı. Membranla (Kat No: IPVH09120, İmmobilon P, Millipore, Amerika Birleşik Devletleri) jel üstüste konulduktan sonra 2'şer adet filtre kâğıdı arasına sıkıştırıldı. Western sandiviçi olarak adlandırılan bu yapı transfer kelepçesiyle sabitlendi ve tanka yerleştirildi. 1 lt 1X %20 metanol içeren transfer tamponu tanka konuldu. 400 mA sabit akımda 1 saat süre ile transfer gerçekleştirildi. Transfer işlemi bitince sistem güç kaynağından kapatıldı ve düzenek açılarak membran dikkatlice alındı.

Bloklama

Spesifik olmayan bağlanmaları engellenmek için bloklama yapıldı. Transfer sonrası proteinlerin bağlandığı membran, bloklama çözeltisi (% 5'lik süt tozu % 0.05'lik Tween20 içeren TBS çözeltisi) ile 60 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda membran üç defa % 0.05'lik Tween 20 içeren TBS çözeltisi (yıkama çözeltisi) ile 10'ar dakika yıkandı.

Primer Antikor İle İnkübasyon

Bloklama sonrası membranlar primer antikorlarla muamele edildi. Primer antikorlar, % 0.05'lik TBS-T (TBS+Tween 20) çözeltisinde hazırlanan %5'lik süt tozunda seyreltildi. Membranlar gece boyunca 4°C'de NADPH oksidaz (NOX4) (1:1000), TGF- β (1:750), fibronektin (1:1000), p-p38 (1:750), p38 (1:1000), p-smad2/3 (1:500) ve smad 2/3'e (1:750) karşı oluşturulmuş primer antikorlarla inkübe edildi. Süre sonunda membranlar yıkama çözeltisi olan TBS-T ile 3 defa 10'ar dakika yıkandı.

Sekonder antikor ile inkübasyon

Yıkama sonrasında membran primer antikora spesifik sekonder antikorlarla (goat anti-rabbit IgG /Horseradish Peroxidase Conjugated, Cell Signaling 7075, Amerika Birleşik Devletleri) 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Sekonder antikor, % 0.05'lik TBS-T çözeltisinde hazırlanan %2'lik süt tozunda 1/1000 oranında seyreltildi. Sürenin sonunda membran tekrar yıkama çözeltisi ile 10 dakika süre ile 3 kez yıkandı.

Membran silme (strip) protokolü

Ticari olarak satın alınan strip tamponu (21059, Thermo Scientific, Amerika Birleşik Devletleri) kullanıldı. Temizlenmek istenen membran 5-15 dakika oda sıcaklığında strip tamponu ile muamele edildi. Ardından 3 defa 10'ar dakika yıkama yapıldı. Ardından primer antikor inkübasyon basamağına geri dönüldü.

Görüntüleme

Sekonder antikor inkübasyonundan sonraki yıkamalar tamamlandığında membran görüntüleme için hazır hale gelir. Sinyalin görünür hale getirilmesi amacıyla ECL (Enhanced chemiluminescence/ Arttırılmış kemilüminesans) kiti (WBLUR0100, Millipore, Amerika Birleşik Devletleri) kullanıldı. Kitin prensibi, horseradish peroksidaz enziminin hidrojen peroksit ile substratı olan luminolün oksitlemesi ve uyarılmış durumdan bazal duruma geçerken ışıma oluşturmaya dayanmaktadır. Bu kemilüminesans ışımada karanlık odada film üzerine aktarılır. Hazırlık aşamasında önce, görüntüleme kasedi içine uygun boyutlarda kesilerek şeffaf dosya yerleştirildi ve dosyanın içine membran konuldu. Üzerine sinyal oluşturmak için ECL çözeltisi dökülür ve çözeltisi eklendi. Kaset (Amersham, RPN 11649) içerisine karanlık odada film (Kodak Biomax Light Film, Katolog No: 1788207) konur ve belirli bir süre beklemenin ardından film banyo solüsyonlarından (Developer-Fikser-Su) geçirilir. Elde edilen filmlerin, dansitometrik incelenmesiyle protein düzeyinin belirtilmesi sağlanmaktadır. Bant yoğunlukları Image J bilgisayar programıyla analiz edildi. β -Aktin protein ifadesi, yükleme kontrolünü doğrulamak için kullanıldı. Bu amaçla aynı membran üzerinde ya proteinlerin fosforile ve total formları da ilgilenilen protein ile β -Aktin ifadesi gösterildi. Fosforile proteinler total proteinlerine, diğerleri ise β -Aktine oranlandı ve sonuçlar analiz edildi.

3.6.3.14 Doku Protein Düzeylerinin Belirlenmesi

Tüm doku örneklerinde yapılan analiz sonuçları mg proteine orantılanarak verildi. Protein düzeyleri Bikinkoninik asit (BCA) yöntemi ile belirlendi. Elabscience (Katalog No: E-BC-K318-M) protein analiz kiti kullanıldı. Yöntemin temeli alkali ortamda Cu^{+2} -protein kompleks oluşumuna ve Cu^{+2} 'nin Cu^{+} 'e indirgenmesine dayanmaktadır (68). Bakır sülfat BCA çözeltisine eklendiğinde açık yeşil bir renk oluşturur ve bu çözelti protein çözeltisine ile birleştiğinde, proteinin peptid bağlarıyla etkileşime girerek, bazik koşullarda Cu^{+2} iyonları Cu^{+} iyonlarına indirgenerek mavi/mor renkli bir çözelti oluşturur. Oluşan rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Uygulama basamakları aşağıda özetlenmiştir;

- Protein standardı olarak sığır serum albümini (BSA) kullanılır. Standartlar saf su içinde 0-0.05-0.1-0.2-0.4-0.6-0.8-1 mg/ml konsantrasyonlarında hazırlandı.
- Standartlar ve uygun seyreltmeleri yapılan örneklerden 20'şer µl mikroplağa kondu.
- 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.
- Çalışma çözeltisinden 100 µl her kuyucuğa eklendi.
- 37 °C'de 30 dakika bekletildi.
- Süre sonunda 562 nm absorbansta okundu.
- Protein konsantrasyonları standart grafiği kullanılarak hesaplanır ve sonuçlar mg/ml olarak ifade edildi.

3.7. Araştırma Planı

Projelendirme	2015
Etik Kurul Onayı	10 şubat 2015
Deney hayvanları çalışması	şubat-Nisan 2019
RT-PCR	Mayıs-Ağustos 2019
ELISA ve kit alışmaları	Eylöl-Kasım 2020
Western Blot analizleri	Aralık 2019- Mart 2020
Tez Yazımı	Mayıs 2021- Nisan 2022
Tez Teslimi	Haziran 2022

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Çalışma sürecinde elde edilen verilerin istatistiksel analizleri SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 24.0 bilgisayar paket programında yapıldı. Değerlendirmede ortalama ve standart hatalar belirlendi. Gruplararası farklılık Kruskal Wallis testi ile gruplar arasındaki farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı ise Mann-Whitney U testi ile analiz edildi. $p<0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Veriler ortalama $\pm$ standart hata biçiminde verildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırmamız deney hayvanı çalışmasıdır. Deney hayvanı etik kurullarında ise 3R kuralının gözettiğı etik açıdan deneylerde en az hayvan sayısı ile çalışmak esastır. Bu yüzden elimizdeki mevcut hayvan sayımız ve onlardan elde edilen çalışma materyalleri çok değerliydi. Doğrudan organizmaya uyarlanması, uygulanması ve modelin gereğē en yakın şekilde oluşması, her ne kadar hücre kültüründen daha yakın olsa da her bir hayvanın kendine özgü farklılıkları ve diyabetli hayvanların mortalite oranlarının yüksek olmasından dolayı çalışma oldukça hassaslık gerektiren bir çalışmaydı. Kontrol grubu hariç gruplardan birer hayvan deney sürecinde kaybedilmiştir.

3.10. Etik Kurul Onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu 10 Şubat 2015 tarih ve 02/03/2015 no.lu kararında; 05/2015 protokol numaralı çalışmamızın etik açıdan sakıncalı olmadığına karar vermiştir.

4. BULGULAR

4.1. Klinik Parametreler

Çalışılan parametrelerin bulguları Tablo 7’de verilmiştir. Kontrol ve diyabet grubu ile karşılaştırıldığında; Böbrek/hayvan ağırlığı, içilen su miktarı ve idrar hacimleri arasında anlamlı olarak artış gözlemlendi ($p=0.0022$; $p=0.0054$, $p=0.0365$; sırasıyla). Diyabet ve DT grupları arasında istatistiksel olarak bir farklılık bulunamamıştır.

Tablo 7. Böbrek ağırlığı/hayvan ağırlığı, İçilen günlük su miktarı, Günlük idrar hacimleri

	Kontrol (n=8)	Taurin (n=7)	Diyabet (n=7)	Diyabet+Taurin (n=7)
Böbrek ağırlığı/hayvan ağırlığı (mg/g)	6.544 ± 0.14	6.618 ± 0.29	9.672 ± 0.78	10.01 ± 0.71
İçilen su miktarı (ml)	44.38 ± 3.831	55.00 ± 6.172	120.7 ± 19.92	112.1 ± 19.11
İdrar hacimleri (ml)	$31.63 \pm 3,722$	$25.86 \pm 3,882$	$77.71 \pm 13,36$	77.86 ± 15.80

4.2. Histolojik Bulgular

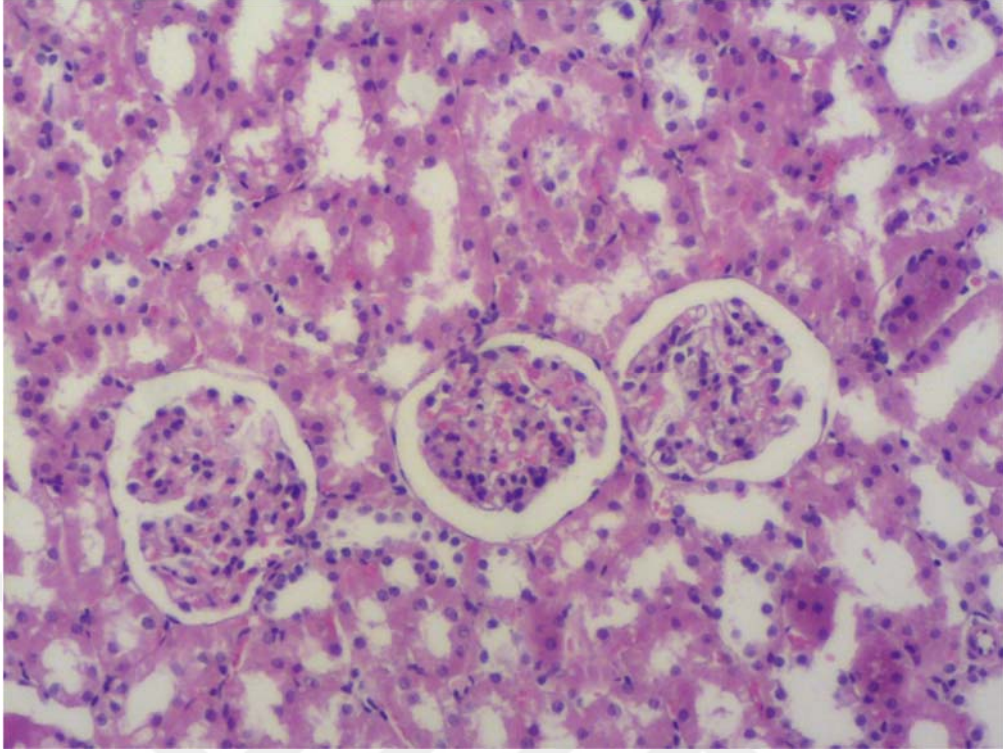
Kontrol grubuna ait böbrek kesitleri incelendiğinde normal morfolojik özellikler gözlemlendi. Korteksin dışında fibröz kapsülün sağlam olarak yer aldığı, korteks ve medulla ayrımının rahatlıkla yapılabildiği gözlemlendi. Kortekste bulunan renal korpusküllerin normal yapıda olduğu, Bowman kapsülünün pariyetal ve visseral yaprağının normal histolojik yapıda olduğu belirlendi. Proksimal tübül ve distal tübül, henle kulbu, kollektör tübüllerde yapıların normal olduğu gözlemlendi. Epitel hücreleri karakteristik yapı ve özelliklerini korumaktaydı (Şekil 16). Herhangi bir hücre infiltrasyonu ve bağ doku artışı gözlemlenmedi (Şekil 18).

Taurin grubunun kontrol grubuna benzer özellikler gösterdiği görüldü.

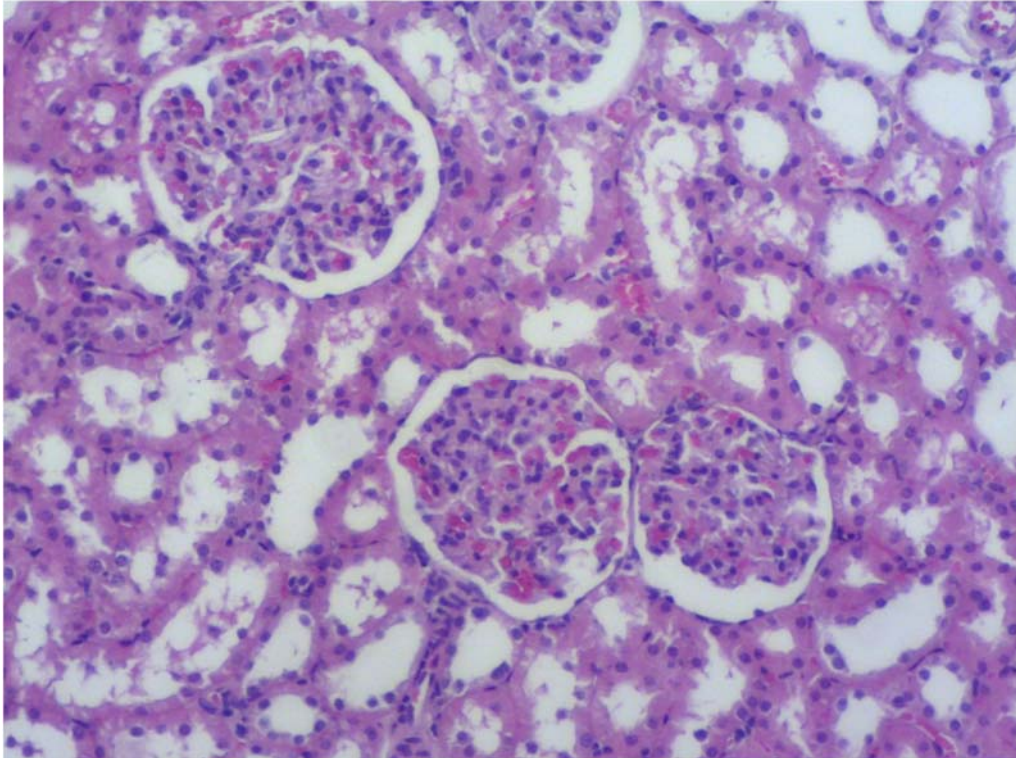
Diyabet grubunda peritübüler alanda mononükleer hücre infiltrasyonu, proksimal tübül hücrelerinde fırçası kenar kaybı, tübüler atrofi, tübüler dilatasyon ve vakuolizasyon gözlemlendi. Bazı tübüllerde proteinöz madde birikimi ile birlikte kast formasyonu ve tübül lümeninde hücre debrisleri izlendi. Kortekste bazı bölgelerde, damarlarda vazodilatasyon ve eritrosit ekstrevasyonu dikkati çekti (Şekil 16). Peritübüler alanlarda yaygın bağ doku artışı gözlemlendi (Şekil 18).

Diyabet-Taurin grubunda kortikal bölgede özellikle peritübüler alanda mononükleer hücre infiltrasyonunda, tübül hücrelerinde gözlenen dejenerasyonlarda ve kortekste eritrosit ekstrevasyonunda iskemik-reperfüzyon göre azalma gözlemlendi. Tübüler atrofi, tübüler dilatasyon, vakuolizasyon, tübüllerde proteinöz madde birikimi ile birlikte tübül lümenine hücre debrisleri daha az oranda izlendi (Şekil 16). Peritübüler alanlarda bağ doku artışının az miktarda olduğu gözlemlendi (Şekil 18).

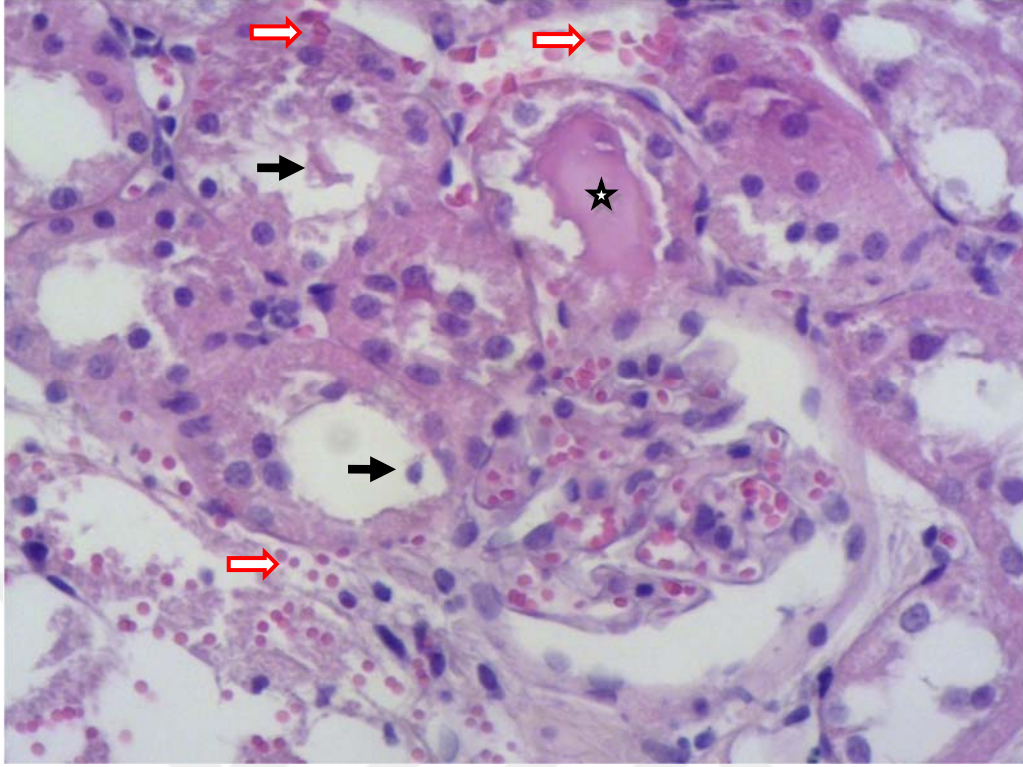
Diyabet grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında; böbreklerde tübüler dilatasyon ve fırçası kenar kaybı gibi karakteristik morfolojik değişiklikler oluştu ($p=0.0152$ and $p=0.000$, sırasıyla). Bununla birlikte, Taurinin, diyabette meydana gelen hasarı fırçası kenar kaybında anlamlı olarak önlediği gösterildi ($p=0.000$). İnterstisyel inflamasyon bulguları da, diyabet grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0.0004$). Bu inflamasyon artışı taurin ile anlamlı olarak azaldığı gösterildi ($p=0.0024$) (Şekil 17).



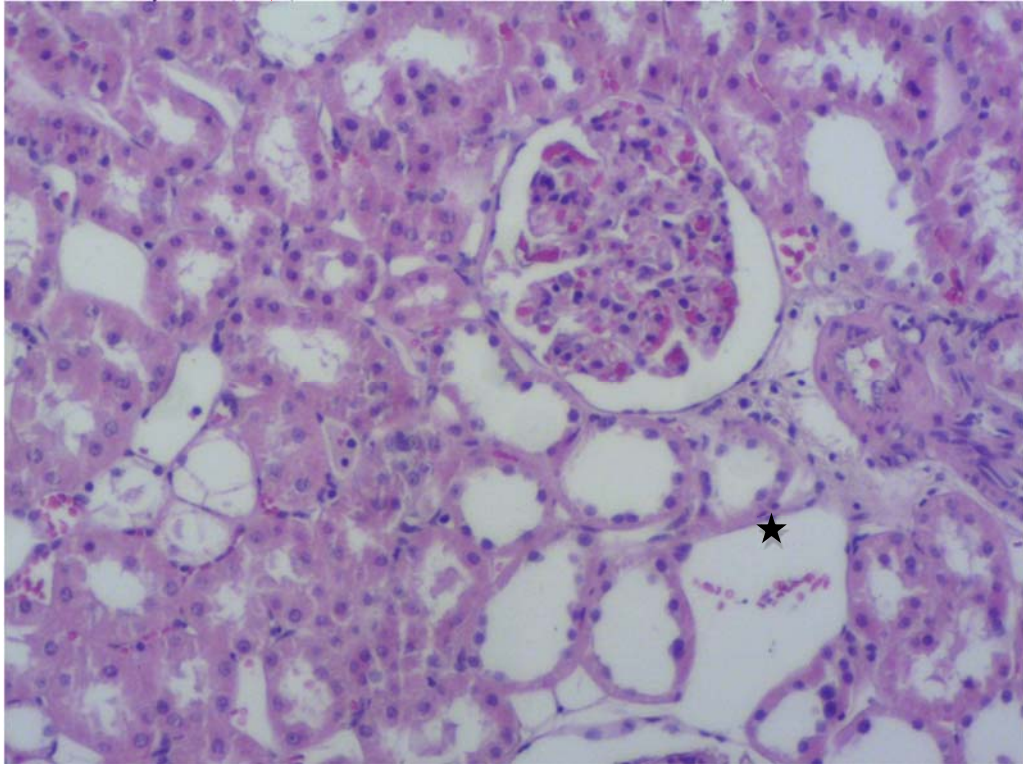
Şekil 16. Kontrol grubuna ait normal yapıdaki böbrek dokusu H-E x40



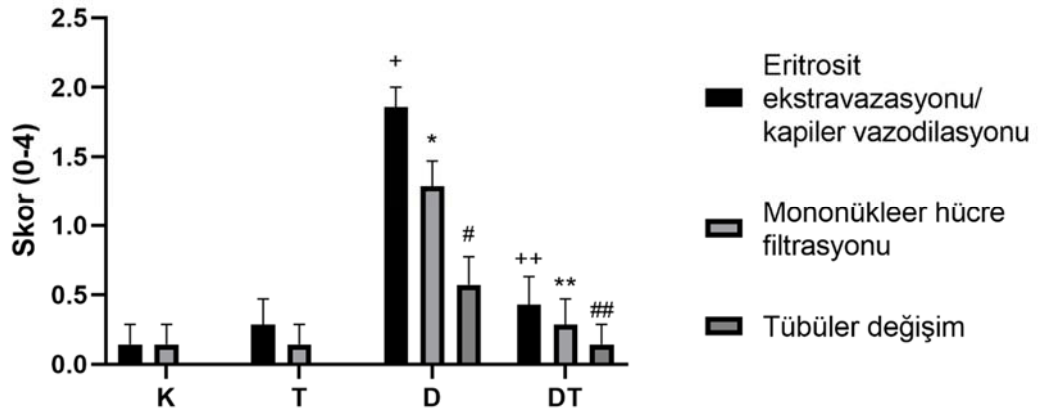
Şekil 17. Taurin grubuna ait normal yapıdaki böbrek dokusu H-E x40



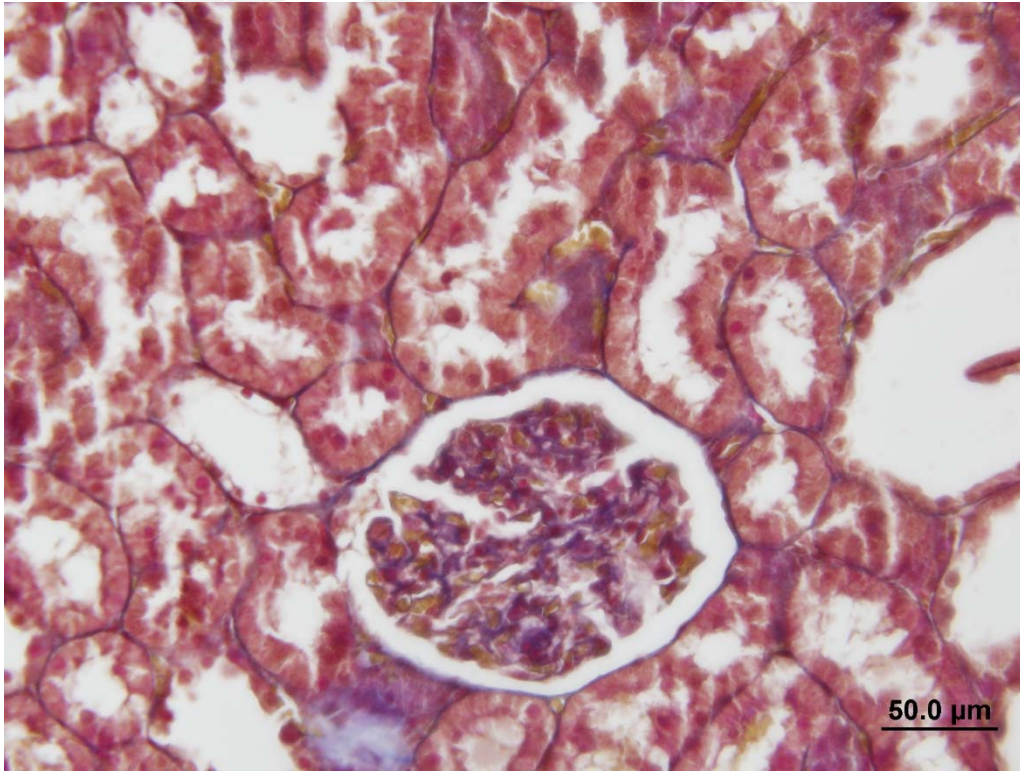
Şekil 18. DM grubuna ait böbrek dokusunda tubuler hiyalinizasyon (★), eritrosit ekstravazasyonu (⇨) ve tübüler hücre debrisleri (➡), H-E x40



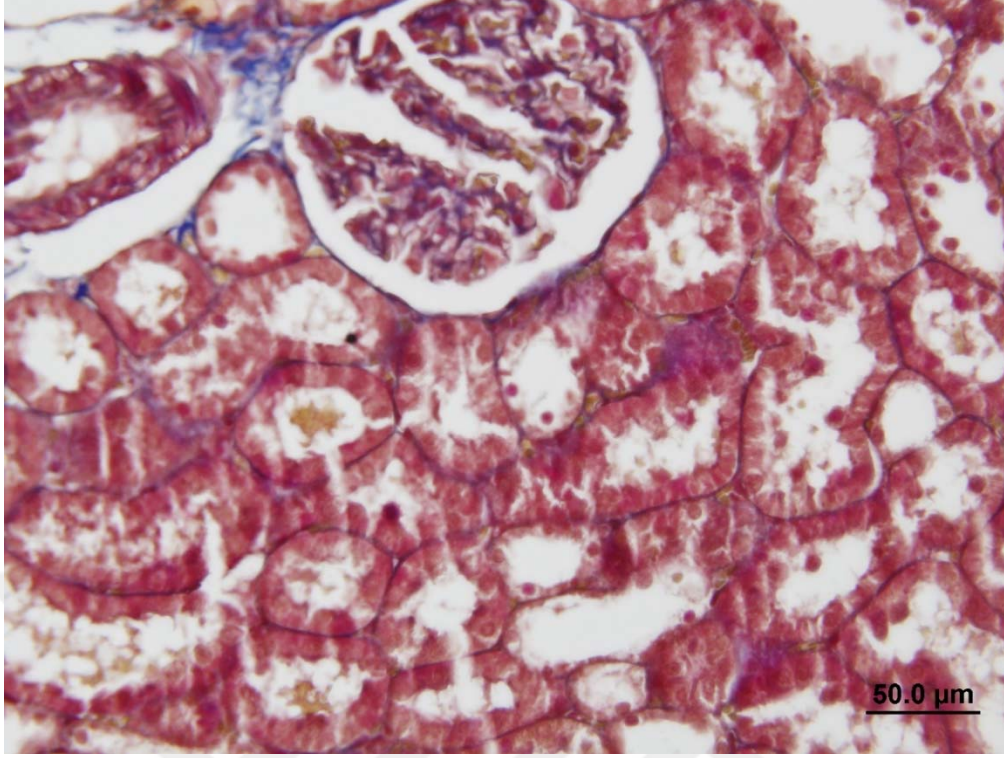
Şekil 19. Resim 6:DM-Taurin grubuna ait böbrek dokusunda tübüler dilatasyon (★), H-E x40



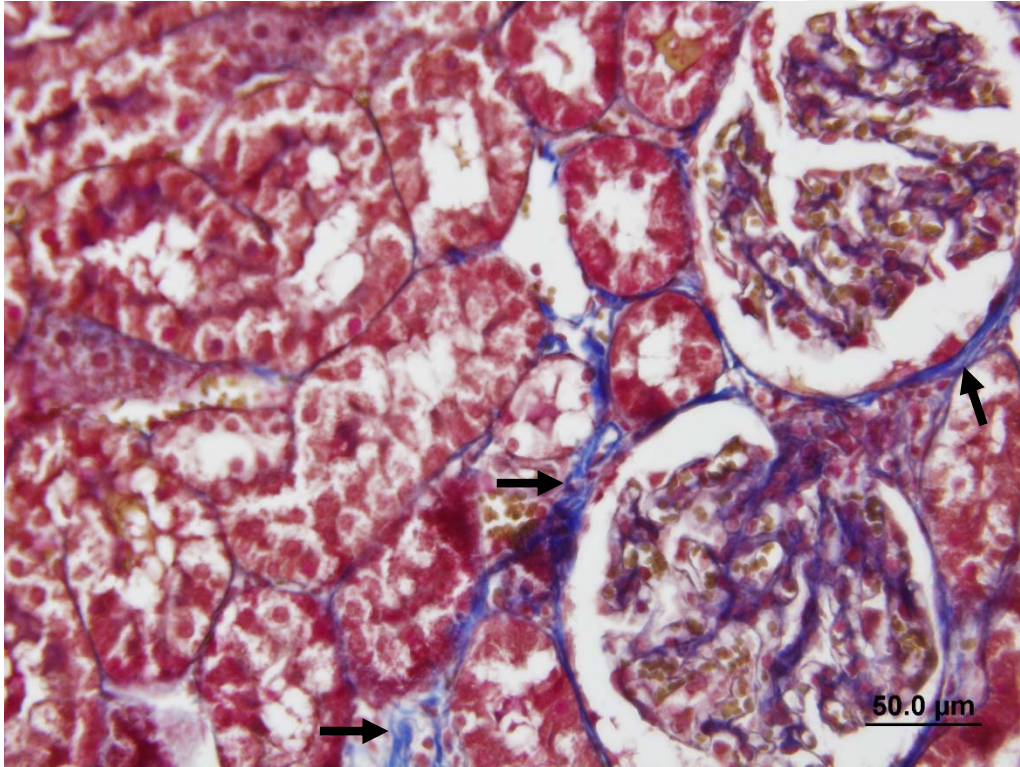
Şekil 20. Histolojik skorlar Eritrosit ekstravazasyonu/ kapiler vazodilasyonu için; +p<0.05 vs K ++p<0.05 vs D; Mononükleer hücre filtrasyonu için; K: Kontrol (n=8), T: Taurin (n=7), D: Diyabet (n=7), DT: Diyabet+Taurin (n=7) *p<0.05 vs K **p<0.05 vs D; Tübüler değişim için; #p<0.05 vs K ##p<0.05 vs D



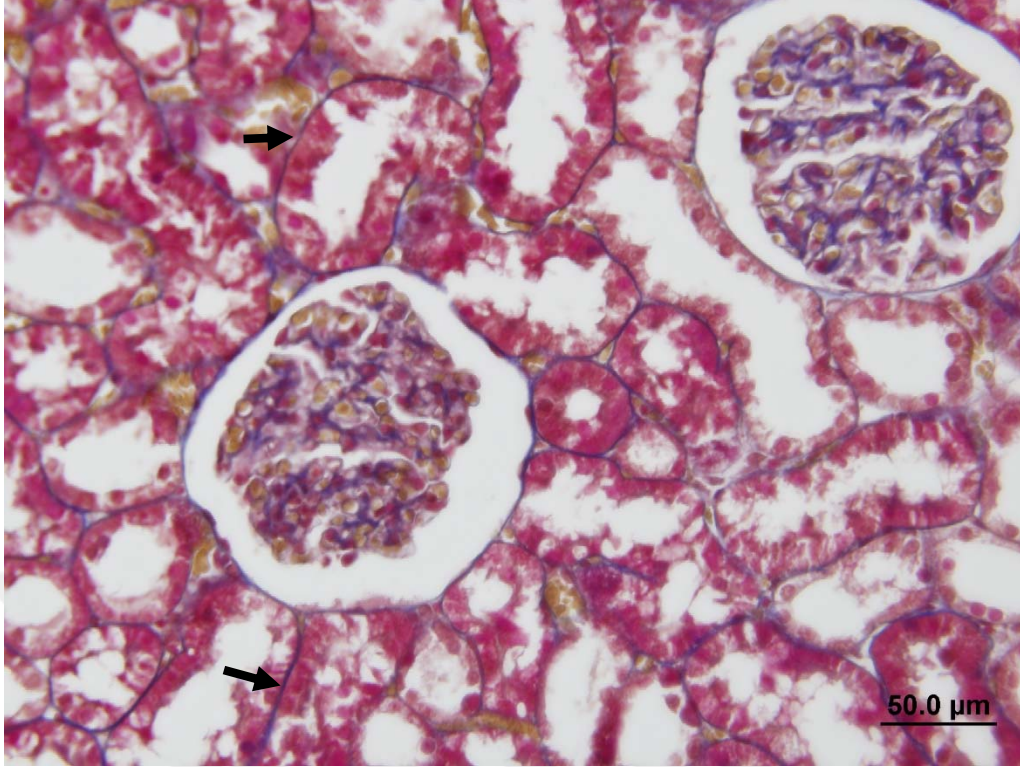
Şekil 21. Kontrol grubuna ait normal yapıdaki böbrek dokusu Masson Trikrom x40



Şekil 22. Taurin grubuna ait normal yapıdaki böbrek dokusu Masson Trikom x40



Şekil 23. DM grubuna ait böbrek dokusunda peritübüler kollagen (→), Masson Trikom x40



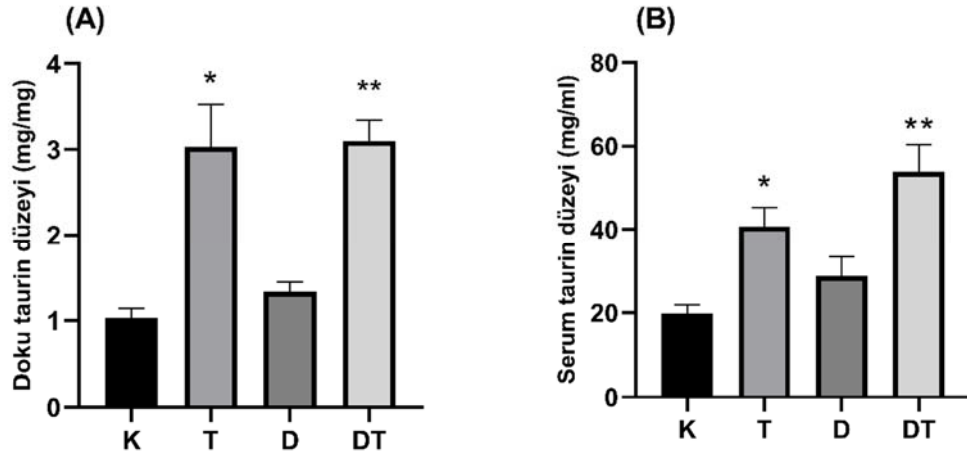
Şekil 24. DM-Taurin grubuna ait böbrek dokusunda az miktarda peritübüler kollagen (➡) Masson Trikrom x40

4.3. Biyokimyasal Bulgular

4.3.1 Böbrek Dokusu ve Serum Taurin Düzeyleri

Deney süresince verilen taurinin doku içine geçişi, taurin (3.03 ± 0.5 mg/mg) ve diyabet+taurin (3.1 ± 0.2 mg/mg) grubu ile karşılaştırıldığında kontrol (1.03 ± 0.1 mg/mg) ve diyabet (1.34 ± 0.1 mg/mg) grubuna göre anlamlı artış gösterildi ($p=0.0006$ ve $p=0.0012$; sırasıyla) (Şekil 19A).

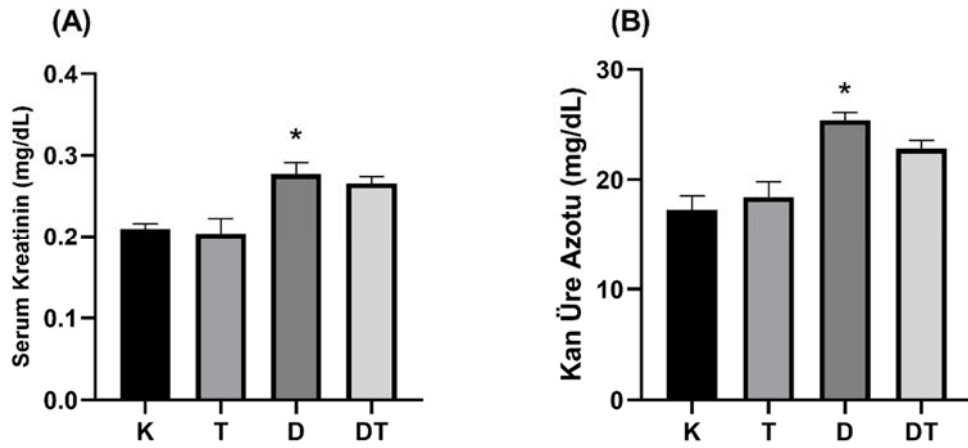
Serum taurinin düzeyleri bulguları da benzerdir. Kontrol grubuyla taurin grubu karşılaştırıldığında serumdaki taurin miktarının artışı anlamlıdır (19.77 ± 2.1 , 40.76 ± 4.5 ; $p=0.0041$). Beklenildiği gibi DT grubunda ise diyabet grubuna göre artış anlamlıdır (53.91 ± 6.4 mg/ml, $p=0.0082$) (Şekil 19B).



Şekil 25. Böbrek taurin düzeyleri (A), Serum taurin düzeyleri (B) K: Kontrol (n=8), T: Taurin (n=7), D: Diyabet (n=7), DT: Diyabet+Taurin (n=7) *p<0.05 vs K, **p<0.05 vs D

4.3.2. Serum Kreatinin ve BUN Düzeyleri

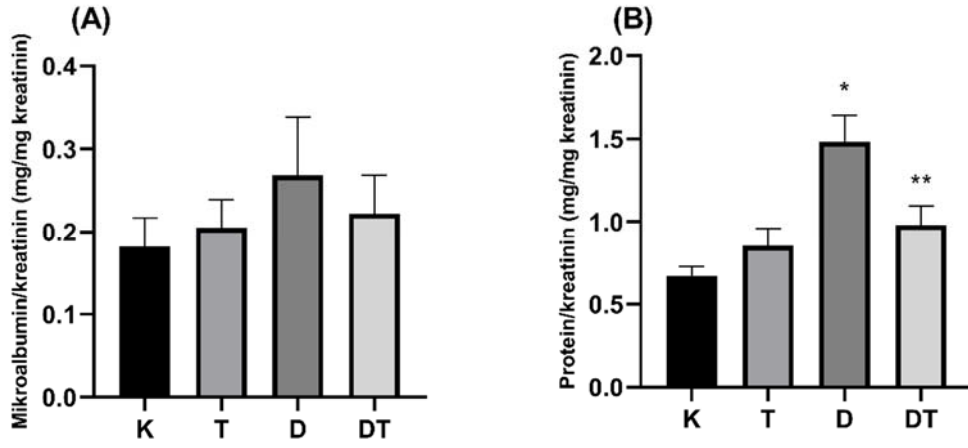
Kreatinin düzeyleri diyabet grubunda (0.28 ± 0.014 mg/dL), kontrol grubuna (0.21 ± 0.007 mg/dL) göre anlamlı olarak arttı ($p=0.0002$). DT grubunda ki azalış istatistiksel olarak anlamlı değildir (0.27 ± 0.008 mg/dL) (Şekil 20A). Kontrol grubu (17.28 ± 1.3 mg/dL) ile karşılaştırıldığında, BUN düzeyleri deney süresince diyabet grubunda (25.42 ± 0.7 mg/dL) anlamlı olarak arttı ($p=0.0003$). Bu artış taurin ile azalmasına rağmen anlamlılık yakalanamamıştır (22.81 ± 0.8 mg/dl) (Şekil 20B).



Şekil 26. Serum BUN düzeyleri (A) ,Serum kreatinin düzeyleri (B) K: Kontrol (n=8), T: Taurin (n=7), D: Diyabet (n=7), DT: Diyabet+Taurin (n=7) *p<0.05 vs K

4.3.3. İdrar Mikroalbumin/Kreatinin ve Protein/Kreatinin Düzeyleri

Mikroalbumin/kreatinin düzeylerinde, grafikte görülen artış ve azalışta anlamlı bir fark bulunamadı (Şekil 21A). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, protein/kreatinin düzeyleri diyabet grubunda anlamlı olarak arttı (0.67 ± 0.06 , 1.48 ± 0.16 mg/mg kreatinin; sırasıyla, $p=0.0003$). Bu artışın taurin ile anlamlı olarak azaldığı DT grubunda gösterildi (0.98 ± 0.11 mg/mg kreatinin, $p=0.0262$) (Şekil 21B).



Şekil 27. İdrar mikroalbumin/kreatinin düzeyleri (A), İdrar protein/kreatinin düzeyleri (B)

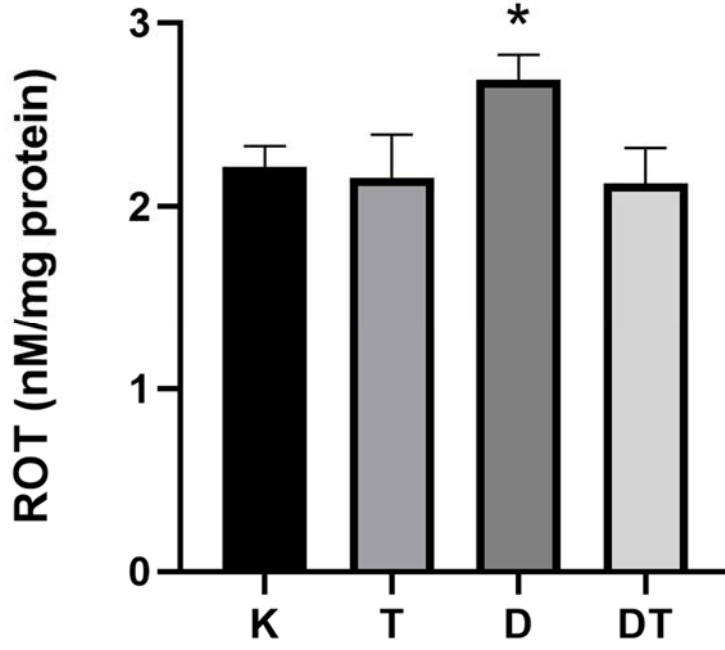
K: Kontrol (n=8), T: Taurin (n=7), D: Diyabet (n=7), DT: Diyabet+Taurin (n=7)

*p<0.05 vs K, **p<0.05 vs D

4.3.4. Böbrek Dokusu Oksidan-Antioksidan Parametreler

4.3.4.1 ROT Düzeyleri

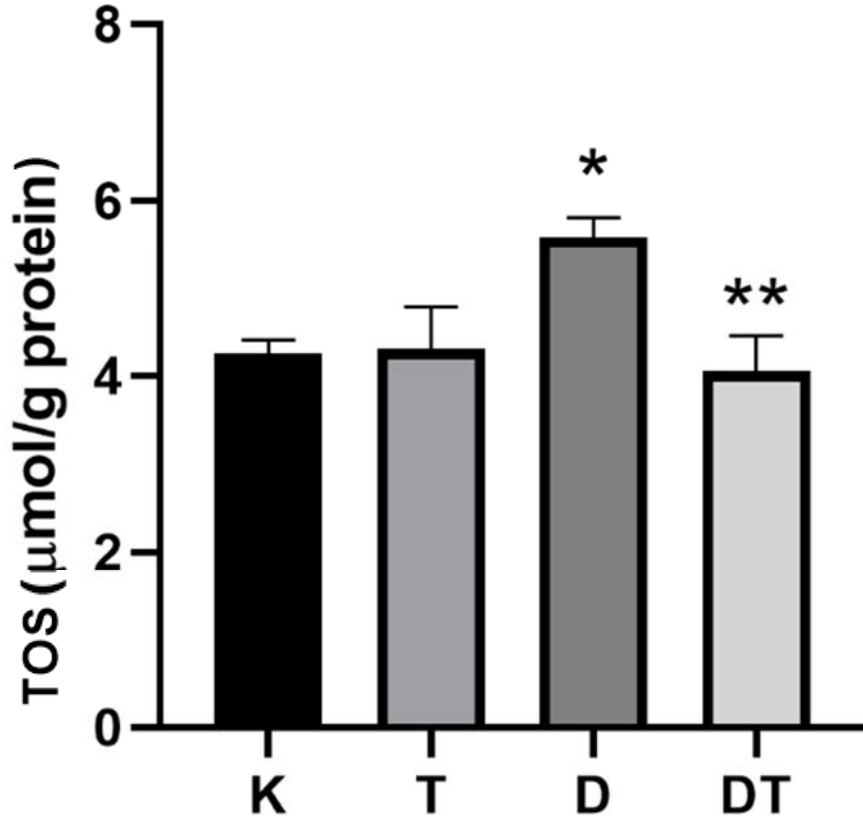
Kontrol grubu (2.22 ± 0.11 nM/mg protein) ile karşılaştırıldığında, böbrek dokusu ROT düzeyleri diyabet grubunda (2.69 ± 0.14 nM/mg protein) anlamlı olarak arttı ($p=0.0221$). DT grubunda taurin uygulaması ile azalma saptanmamış olmasına rağmen istatistiksel anlamlılığa ulaşamamıştır (2.12 ± 0.2 nM/mg protein) (Şekil 22).



Şekil 28. Böbrek ROT düzeyleri K: Kontrol (n=8), T: Taurin (n=7), D: Diyabet (n=7), DT: Diyabet+Taurin (n=7) *p<0.05 vs K

4.3.4.2 TOS Düzeyleri

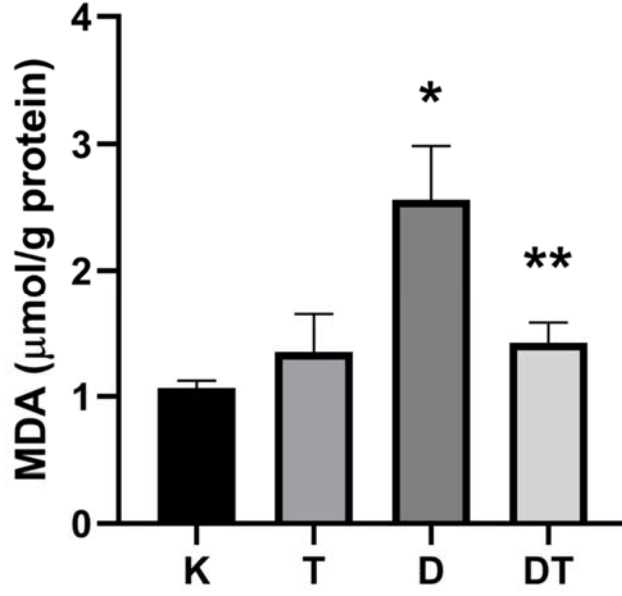
Kontrol grubuna (4.17 ± 0.12 $\mu\text{mol/g}$ protein) göre diyabet grubunda (5.74 ± 0.22 $\mu\text{mol/g}$ protein) böbrek dokusu TOS düzeyleri anlamlı olarak artmıştır ($p=0.0043$). Taurin verilmesiyle birlikte artış anlamlı olarak azalmıştır (4.01 ± 0.25 $\mu\text{mol/g}$ protein, $p=0.0159$) (Şekil 23).



Şekil 29. Böbrek TOS düzeyleri K: Kontrol (n=8), T: Taurin (n=7), D: Diyabet (n=7), DT: Diyabet+Taurin (n=7) *p<0.05 vs K, **p<0.05 vs D

4.3.4.3 MDA Düzeyleri

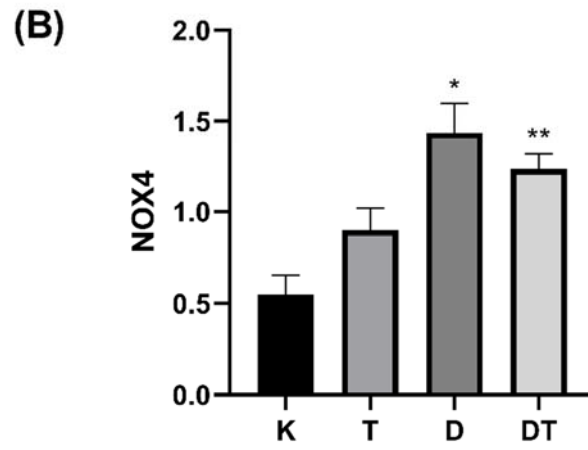
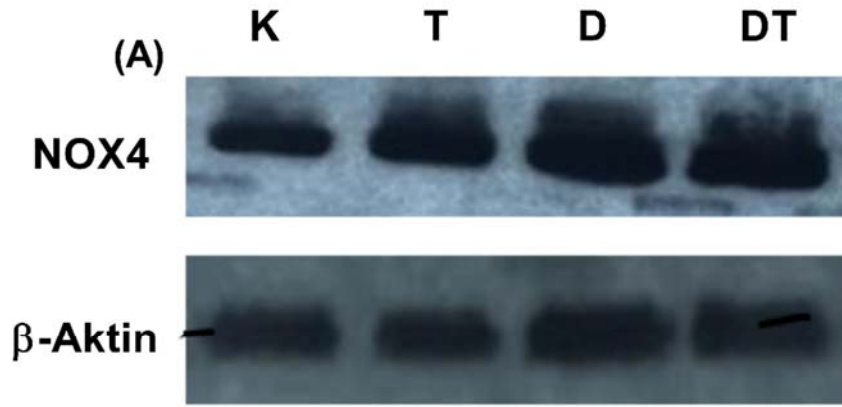
Diyabet grubunda (2.56 ± 0.42 $\mu\text{mol/g protein}$) böbrek dokusu MDA düzeyleri kontrol grubuna (1.07 ± 0.06 $\mu\text{mol/g protein}$) göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0.0025$). Taurin uygulandığında ise bu artışın anlamlı olarak azaldığı saptandı (1.43 ± 0.16 $\mu\text{mol/g protein}$, $p=0.0303$) (Şekil 24).



Şekil 30. Böbrek MDA düzeyi K: Kontrol (n=8), T: Taurin (n=7), D: Diyabet (n=7), DT: Diyabet+Taurin (n=7) *p<0.05 vs K, **p<0.05 vs D

4.3.4.4 NOX4 Protein Düzeyi

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında diyabet grubunda böbrek dokusu NOX4 protein ifadesi anlamlı olarak yüksek bulundu (p=0.0003). Bu artışın taurin ile anlamlı olarak azaldığı saptandı (p=0.011) (Şekil 25).



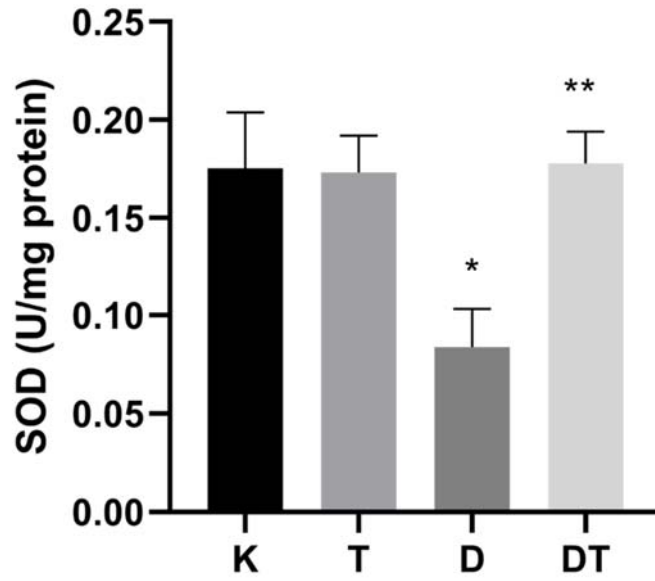
Şekil 31. NOX4 Western blot temsili görüntü (A) Dansitometrik analiz bulguları (B)

K: Kontrol (n=8), T: Taurin (n=7), D: Diyabet (n=7), DT: Diyabet+Taurin (n=7)

*p<0.05 vs K, **p<0.05 vs D

4.3.4.5 SOD Aktivite Düzeyleri

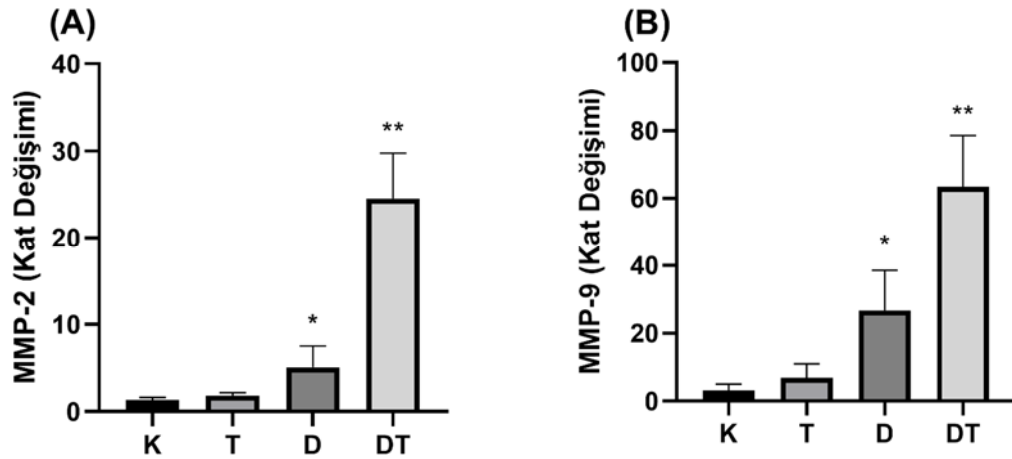
Kontrol grubu (0.175 ± 0.028 U/mg protein) ile kıyaslandığında, diyabet grubunda (0.083 ± 0.019 U/mg protein) böbrek dokusu SOD aktivite düzeyleri anlamlı olarak azalmıştır ($p=0.0379$). Taurin ile bu azalış anlamlı olarak artmıştır (0.178 ± 0.016 U/mg protein, $p=0.0111$) (Şekil 26).



Şekil 32. Böbrek SOD Aktivite düzeyleri K: Kontrol (n=8), T: Taurin (n=7), D: Diyabet (n=7), DT: Diyabet+Taurin (n=7) * $p<0.05$ vs K, ** $p<0.05$ vs D

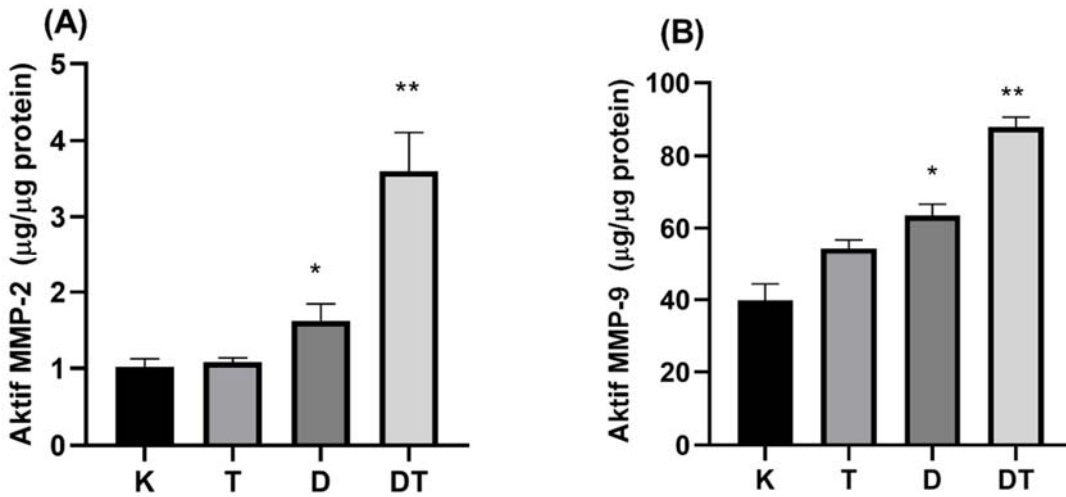
4.3.5 Böbrek MMP-2 ve MMP-9 mRNA ve Aktivite Düzeylerinin Belirlenmesi

Diyabet grubunda böbrek dokusu MMP-2 ve MMP-9 mRNA ifadeleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ($p=0.0205$, $p=0.0047$; sırasıyla). Bununla birlikte taurin bu artışı anlamlı olarak katlayarak arttırmıştır ($p=0.0070$, $p=0.0346$; sırasıyla) (Şekil 27).



Şekil 33. MMP-2 ve MMP-9 mRNA ifadesi K: Kontrol (n=8), T: Taurin (n=7), D: Diyabet (n=7), DT: Diyabet+Taurin (n=7) *p<0.05 vs K, **p<0.05 vs D

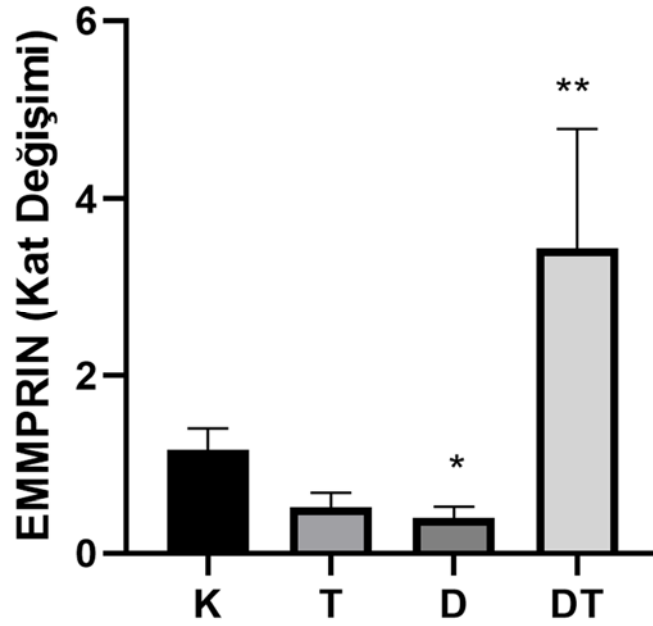
MMP-2 için; kontrol grubu ($1.02 \pm 0.11 \mu\text{g}/\mu\text{g protein}$) ile karşılaştırıldığında diyabet grubundaki ($1.63 \pm 0.22 \mu\text{g}/\mu\text{g protein}$) artış anlamlıdır ($p=0.0401$). Diyabet+taurin grubunda ($3.60 \pm 0.5 \mu\text{g}/\mu\text{g protein}$), diyabet grubuna göre anlamlı artış gözlemlenmiştir ($p=0.0070$) (Şekil 28A). MMP-9 için de MMP-2 'ye benzer şekilde kontrol grubu ile diyabet grubu arasında ve diyabet ile diyabet+taurin grubu arasındaki artışla istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır (39.91 ± 4.45 , 63.54 ± 3.18 , $88.06 \pm 2.47 \mu\text{g}/\mu\text{g protein}$; $p=0.0022$, $p=0.0006$; sırasıyla) (Şekil 28B).



Şekil 34. MMP-2 Aktivite Düzeyi (A), MMP-9 Aktivite Düzeyi (B) K: Kontrol (n=8), T: Taurin (n=7), D: Diyabet (n=7), DT: Diyabet+Taurin (n=7) *p<0.05 vs K, **p<0.05 vs D

4.3.6 Böbrek EMMPRIN mRNA İfadesi

Böbrek dokusu EMMPRIN mRNA ifadesi kontrol grubuna diyabet grubunda göre anlamlı olarak azalmıştır ($p=0.0135$). Bununla birlikte taurin bu azalışı anlamlı olarak arttırmıştır ($p=0.0041$) (Şekil 29).

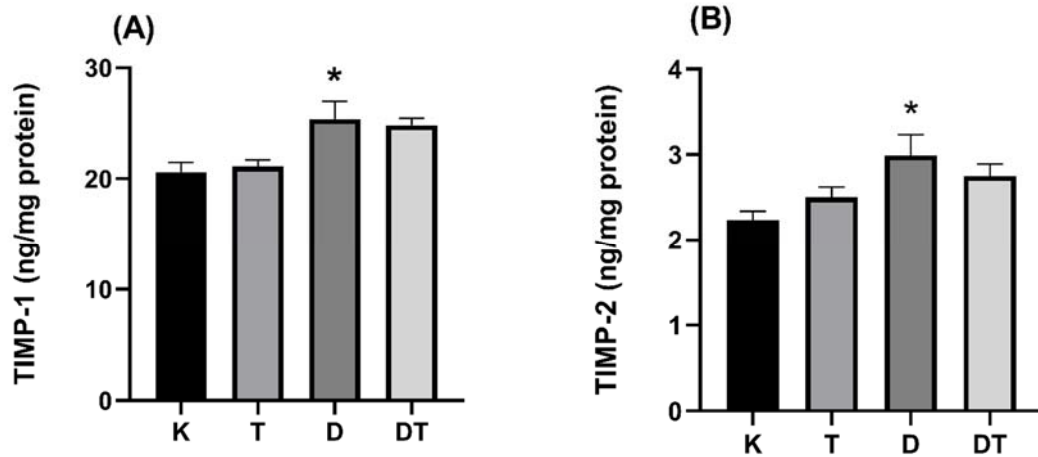


Şekil 35. EMMPRIN mRNA ifadesi K: Kontrol (n=8), T: Taurin (n=7), D: Diyabet (n=7), DT: Diyabet+Taurin (n=7) * $p<0.05$ vs K, ** $p<0.05$ vs D

4.3.7 Böbrek TIMP-1 ve TIMP-2 Düzeyleri

Diyabet grubunda (25.39 ± 1.60 ng/mg protein) böbrek dokusu TIMP-1 düzeyleri kontrol grubuna (20.6 ± 0.87 ng/mg protein) göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0.0293$). Artan TIMP-1 düzeyleri taurin ile azalmış olsa da anlamlılık yakalanamamıştır (24.83 ± 0.64 ng/mg protein) (Şekil 30A).

TIMP-2’de de TIMP-1 verilerine benzer olarak diyabet grubunda (2.99 ± 0.24 ng/mg protein) kontrol grubuna (2.23 ± 0.1 ng/mg protein) göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0.0293$). Artan TIMP-2 düzeyleri ise taurin ile azalmış olsa da anlamlılık yakalanamamıştır (2.75 ± 0.13 ng/mg protein) (Şekil 30B).

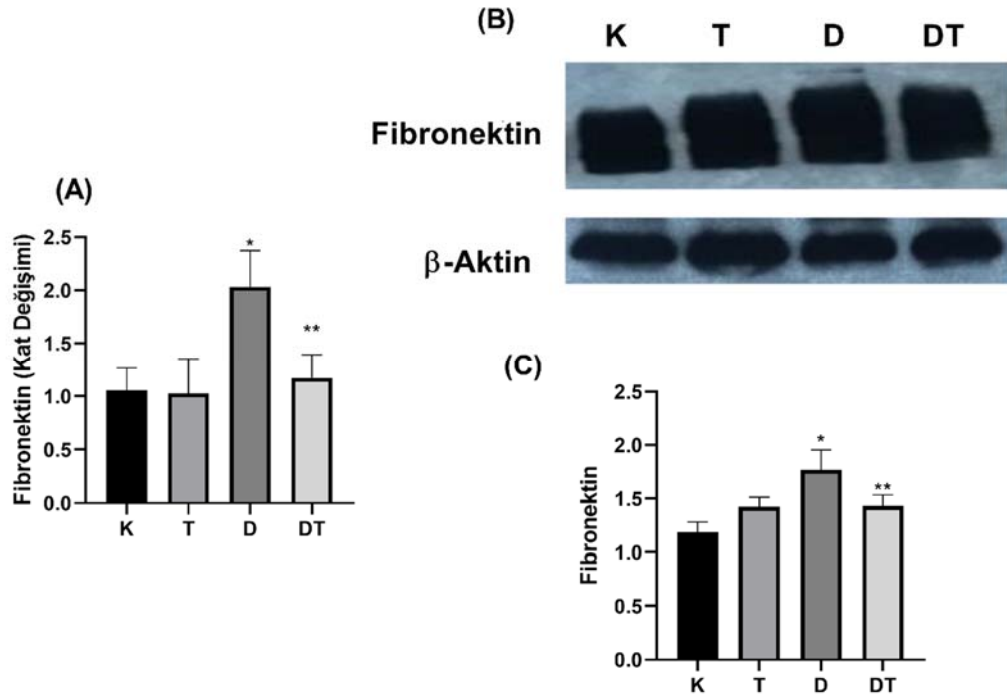


Şekil 36. Böbrek TIMP-1 Düzeyi (A), Doku TIMP-2 Düzeyi (B) K: Kontrol (n=8), T: Taurin (n=7), D: Diyabet (n=7), DT: Diyabet+Taurin (n=7) * $p<0.05$ vs K

4.3.8. Böbrek Fibronektin mRNA ve Protein İfade Düzeyi

Diyabet grubunda, kontrol grubuna göre fibronektin mRNA ifadesi anlamlı olarak artmıştır ($p=0.0350$). Taurin ise artan ifadeyi anlamlı olarak azaltmıştır ($p=0.0350$) (Şekil 31A).

Diyabet grubundaki fibronektin protein ifade artışı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.0003$). İfadedeki bu artış taurin ile anlamlı olarak azalmıştır ($p=0.0041$) (Şekil 31B).



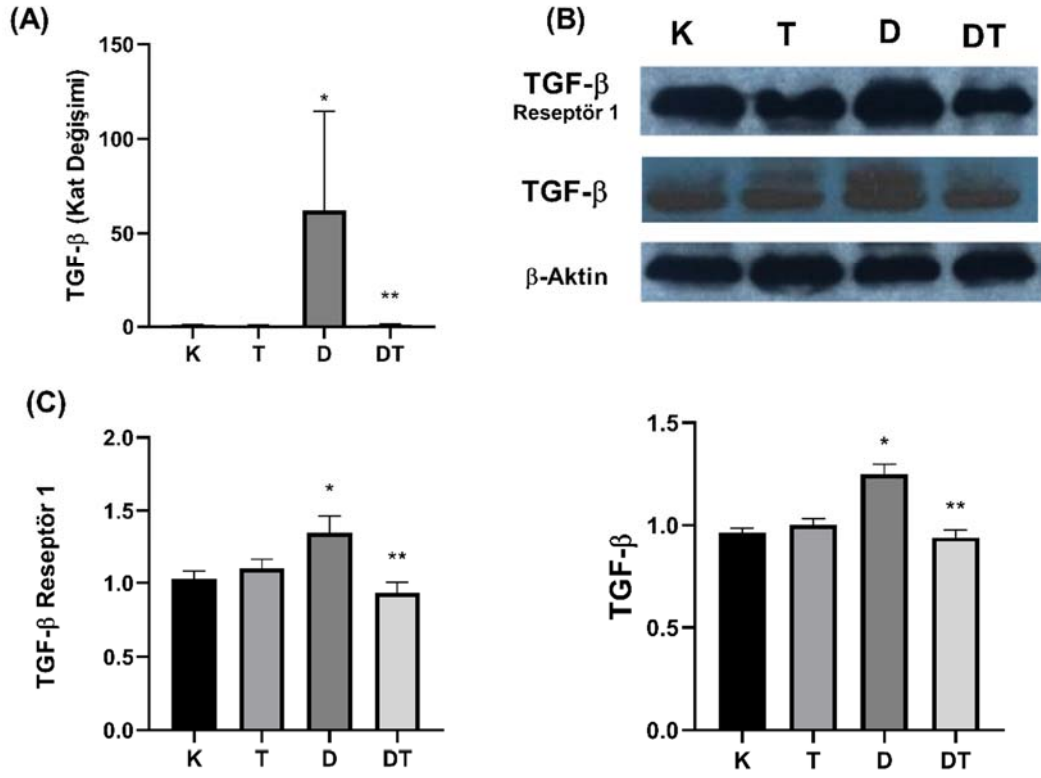
Şekil 37. Fibronektin mRNA ifadesi (A) Temsili Western blot görüntüsü (B), Dansitometrik analiz bulguları (C)

K: Kontrol (n=8), T: Taurin (n=7), D: Diyabet (n=7), DT: Diyabet+Taurin (n=7)

*p<0.05 vs K, **p<0.05 vs D

4.3.9. Böbrek TGF- β mRNA, TGF- β ve TGF- β Reseptör 1 Protein İfadeleri

Böbrek dokusu TGF- β 'nin mRNA ifadeleri diyabet grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış, taurin ise bu artışı baskılamıştır ($p=0.0426$, $p=0.0152$; sırasıyla) (Şekil 32A). TGF- β protein ifade bulguları da mRNA bulguları ile benzerdi (Şekil 32B ve C). Diyabette anlamlı olarak artan ($p=0.0003$) TGF- β protein ifadesi, taurin ile anlamlı olarak baskılandı ($p=0.0006$). Bunlara ek olarak TGF- β reseptör 1 protein ifadesi incelendiğinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında diyabet grubunda anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0.0003$). Bu artışların taurin ile anlamlı olarak azaldığı saptandı ($p=0.0006$).



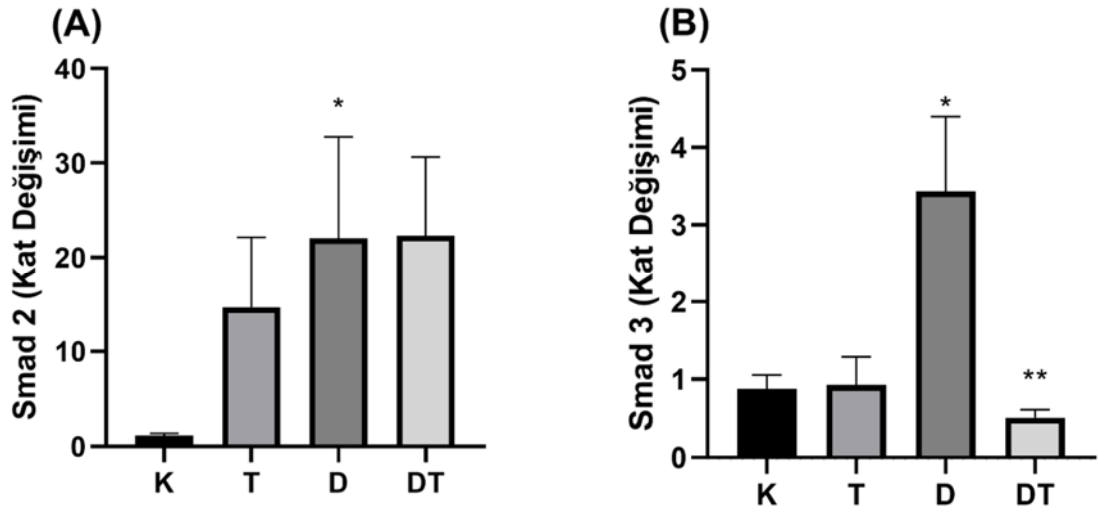
Şekil 38. TGF-β mRNA ifadesi (A), Temsili Western blot görüntüsü (B), Dansitometrik Analiz Bulguları (C)

K: Kontrol (n=8), T: Taurin (n=7), D: Diyabet (n=7), DT: Diyabet+Taurin (n=7)

*p<0.05 vs K, **p<0.05 vs D

4.3.10. Böbrek Smad2 ve Smad3 mRNA ile Protein İfadeleri

Diyabet grubunda, kontrol grubuna göre Smad2 ve Smad3'ün mRNA ifadeleri anlamlı olarak artmıştır (p=0.0003, p=0.0260; sırasıyla). Taurin tedavisi ise sadece Smad3'ün mRNA düzeylerinde anlamlı azalmaya sebep olmuştur (p=0.0022) (Şekil 33).

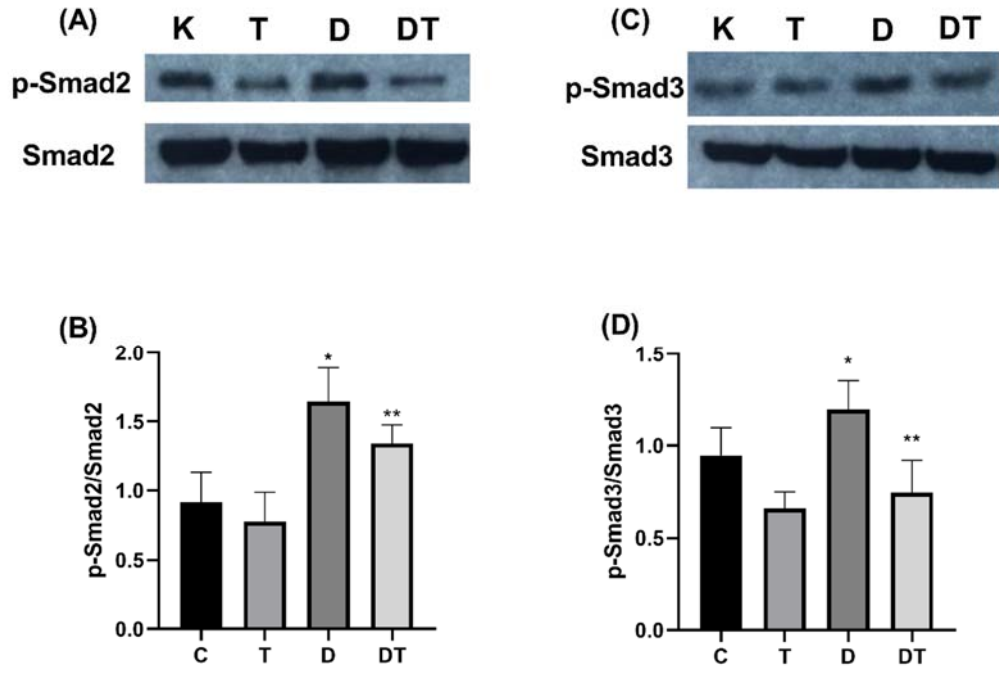


Şekil 39. Smad2 (A) ve Smad3 (B) mRNA ifadesi

K: Kontrol (n=8), T: Taurin (n=7), D: Diyabet (n=7), DT: Diyabet+Taurin (n=7)

*p<0.05 vs K, **p<0.05 vs D

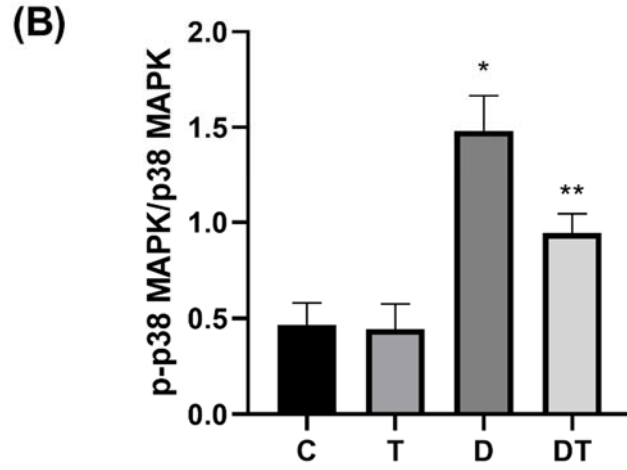
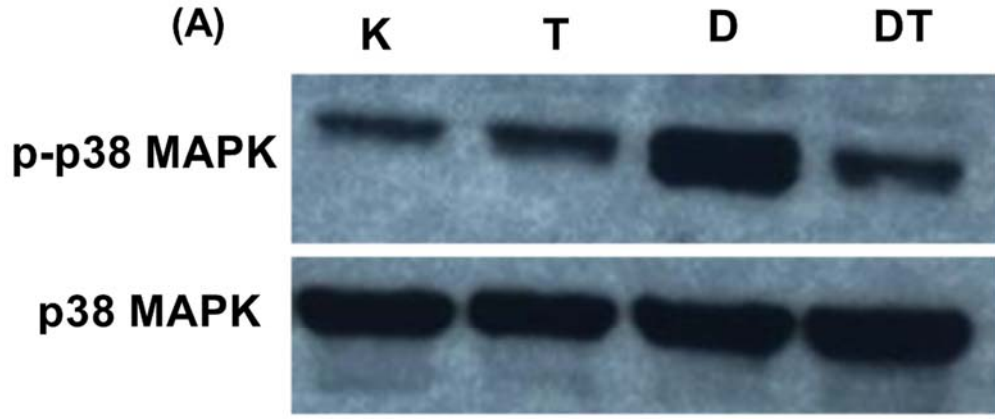
p-Smad2/Smad2 ve p-Smad3/Smad3 oranlarının anlamlı olarak arttığı gösterildi (p=0.0003, p=0.0140; sırasıyla). Bu artışların taurin ile anlamlı olarak azaltıldığı tespit edildi (p=0.0175, p=0.0006; sırasıyla) (Şekil 34).



Şekil 40. p-Smad2 ve Smad2 Western blot temsili görüntü (A), p-Smad2/Smad2 dansitometrik analiz bulguları (B), p-Smad ve Smad3 western blot temsili görüntüsü (C), p-Smad3/Smad3 dansitometrik analiz bulguları (D) K: Kontrol (n=8), T: Taurin (n=7), D: Diyabet (n=7), DT: Diyabet+Taurin (n=7) *p<0.05 vs K, **p<0.05 vs D

4.3.11. Böbrek p38 MAPK Sinyal İleti Yolağı Protein İfadesi

p38 MAPK sinyal ileti yolağı proteininin aktivasyonu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında diyabet grubunda artış, taurin grubunda ise azalma saptanmıştır (p=0.0003, p=0.0006; sırasıyla) (Şekil 35).



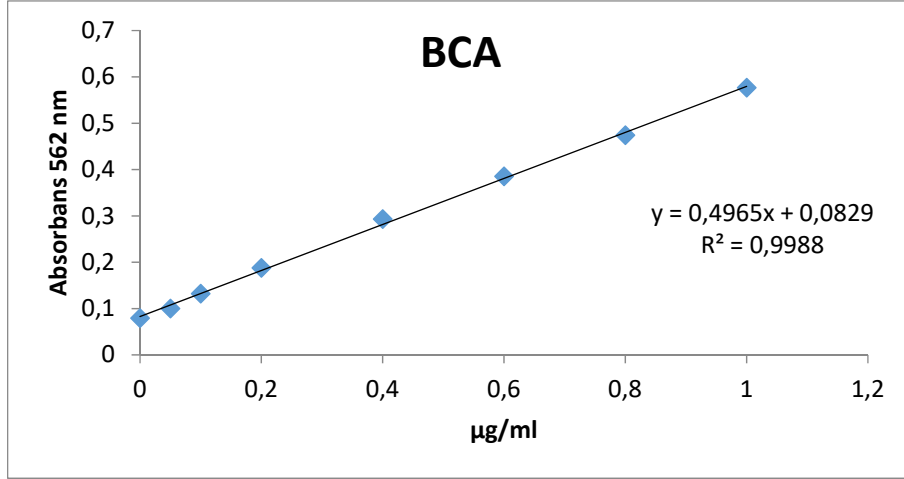
Şekil 41. p-p38 MAPK ve p38 MAPK western blot temsili görüntü (A), Dansitometrik analiz bulguları (B)

K: Kontrol (n=8), T: Taurin (n=7), D: Diyabet (n=7), DT: Diyabet+Taurin (n=7)

*p<0.05 vs K, **p<0.05 vs D

4.3.12. Böbrek Protein Düzeyleri

Böbrek dokusunda çalışılan parametrelerde protein miktarlarına oranlanarak sonuçlar verildi ve her analiz için uygun olan fraksiyonlarda protein analizi gerçekleştirildi. Temsili standart kalibrasyon eğrisi Şekil 36'da gösterildi.



Şekil 42. Temsili BCA standart grafiği

5.TARTIŞMA

Çalışmamızda taurinin diyabetik nefropatide indüklenen özellikle oksidatif stres ve fibrozise karşı koruyucu etkinliği, NOX4 protein ifadesi, TGF- β /Smad2/3 ve p38 MAPK sinyal ileti yolağı ile bu yollardan etkilenen MMP-2 ve -9, TIMP-1 ve TIMP-2, EMMPRIN ve fibronektin proteinleri üzerine olası etkileri ile ilişkilendirilerek araştırıldı.

Gerçekleştirdiğimiz projemizde 45 mg/kg STZ kullanılarak oluşturulmuş deneysel diyabet modelinde 12 hafta (ileri evre) sonra sıçanlarda hiperglisemi, poliüri, polidipsi ve kilo alım yavaşlığı gibi tipik diyabet mellitus özelliklerine sahip oldukları gözlemlendi. Sakrifikasyon sonrası ölçülen böbrek ağırlığı/ vücut ağırlığı oranında ise diyabetli hayvanlarda kontrol hayvanlarına göre artış olduğunun saptanması böbrek fibrozisinin geliştiğine dikkat çeken önemli bir bulguydu.

Diyabetik nefropati modelinde, ilk deneysel aşamada bulgular morfolojik ve fonksiyonel olarak değerlendirildi. Daha önceki çalışmalardan diyabetten etkilenen böbreklerin yapısal olarak değişiklik gösterdiği bilinmektedir. Özellikle sıçan böbreklerindeki morfolojik değişiklikler tubular dilatasyon ve fırçamsı kenar kaybıdır

(28,69). Çalışmamızda da diyabetik nefropati gelişiminde gerçekleşmesi beklenen morfolojik değişikliklerden olan tubular dilatasyon ve fırçamsı kenar kaybı gibi karakteristik morfolojik değişiklikler saptandı. Histolojik olarak gözlemlenen bu bulgular, diyabetik nefropatide serumda bakılan ve renal fonksiyon göstergesi olan kreatinin ve BUN seviyesinde saptanan anlamlı artış ile uyumludur. Öte yandan diyabette artması beklenen renal fonksiyon testlerinden olan idrar protein ve mikroalbumin değerleri de histoloji ve serum parametrelerini benzer olarak DN gelişimini desteklemekteydi. Taurin uygulaması renal morfolojide anlamlı iyileşmeler ile sonuçlanırken, serum BUN ve kreatinin düzeylerinde saptanan azalmalar istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşamamıştır. Artan idrar protein düzeyinin ise taurin tedavisiyle anlamlı olarak azaldığı saptandı. Literatüre bakıldığında taurinin diyabetik nefropati hasarında histolojik hasarları azaltmasına ve renal fonksiyon testleri üzerine olan etkisine yönelik saptanan bulgular, çalışmamızın bulguları ile paralellik göstermektedir (69–73).

Çalışmamızda aynı zamanda sıçanların serum ve böbrekteki taurin miktarları değerlendirildi. Özellikle taurin verilen hayvanların böbreklerinde kontrol ve diyabet grubuna göre anlamlı artışlar tespit edildi. Bunun yanında serum düzeylerinde de böbrek taurin düzeylerine benzer bir profil görüldü. Bu bulgularımızı literatürde yer alan çalışmalardan ayıran bulgu ise diyabet grubunda serum ve böbrek dokularındaki taurin seviyelerinin değişmemesidir. Önceki çalışmalarda diyabet gruplarında taurin seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir (28,74). Bu çalışmalar, seçilen deney hayvanı, diyabeti oluşturan kimyasal ajan ve nefropati gelişimi için belirlenen süreler konusunda birbirinden farklıdır. Bu farkın nereden kaynaklandığını anlaşılabilmesi için hücre yüzeylerinde bulunan taurin taşıyıcı (TauT) protein ifadelerinin incelenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Diyabet süresince oksidatif stresin arttığı bilinmektedir ve meydana gelen oksidatif stresin diyabetik nefropatide fibrozis sürecinin en önemli nedenlerinden biri olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (75,76). Çalışmamızda, taurin, diyabet süresince artan ROT düzeyini azaltsa da anlamlılık yakalanamamıştır. Fakat ROT yanında reaktif nitrojen türleri (RNT)'ni de ölçmeye imkan veren TOS bulguları değerlendirildiğinde taurinin antioksidan etkisi ile diyabet grubunda artan TOS'ni

istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı saptanmıştır. Bu bulgumuz, taurinin diyabet grubunda gelişen oksidatif stresi azaltıcı etkisini destekler niteliktedir. Artan oksidatif stres, hücre membranlarında lipid peroksidasyonuna neden olarak direkt hücresel membran hasarına yol açarlar. MDA bir lipidperoksidasyon ürünü olup oksidatif hasar belirteçidir. Çalışmamızda, taurin, diyabet süresince artan MDA düzeylerini anlamlı olarak iyileştirmiştir. Taurin verilmesinin MDA seviyesini azalttığını bildiren gerek *in vitro* gerek *in vivo* çalışmalar mevcuttur ve bulgularımız bu çalışmalar ile uyumludur (28,69,77,78).

Reaktif oksijen türlerinin üretiminden sorumlu olduğu bilinen NOX4'ün diyabette ortaya çıkan yüksek glukoz nedeniyle indüklendiği ve buna bağlı olarak da oksidatif stresin arttığı bilinmektedir (2). Çalışmamızda diyabetik süreçte böbrekte artan NOX4 ifadesinin taurin ile anlamlı olarak azalttığı bilgisi literatür için özgün bir bilgidir. Sadece diyabet geliştirilmiş tavşanlar ile yapılmış tek bir çalışmada izoform ayırt edilmeksizin NADPH oksidaz aktivitesine bakılmış ve üç haftanın ardından böbrekte artan aktivitenin taurin ile azaltıldığı belirtilmiştir (74). Ayrıca diyabet sürecinde azalan SOD aktivitesini taurin ile anlamlı olarak artmasına yönelik bulgumuz da literatür ile uyumludur (28,69).

Diyabetik nefropati patogenezinin en önemli ayırt edici özelliği fibrozise neden olan artmış bir ESM birikimi olduğu bilinmektedir. Diyabette artması beklenen ESM proteinlerinden biri olan fibronektinin hem mRNA hem de protein ifadesinin arttığı, bu artışın ise taurin ile anlamlı olarak baskılandığı gösterilmiştir. Bu bulgumuz özellikle *in vitro* koşullarda yapılan önceki çalışmalarda taurinin fibronektin ekspresyonlarını azaltmasına yönelik gösterilen bulgular ile uyumluydu (79–82).

Öte yandan hücre dışı matriks bileşenlerinin regülasyonunda rol alan MMP'lerin, diyabetik nefropatide artış gösterdikleri bilinmektedir (83). Çalışmamızda taurin uygulamasıyla diyabetik süreçte artan MMP-2 ve MMP-9 mRNA ifadelerinin ve aktivitelerinin anlamlı olarak katlanarak arttığı gösterildi. Literatür incelendiğinde ise taurinin MMP-2 ve MMP-9 üzerine etkisini bildiren çalışma henüz mevcut değildir. Sadece erken evre diyabetik nefropatili hastalara günde oral olarak 3 gr taurin verilen ve serum MMP-9 protein ifadelerinde değişiklik olmadığının kaydedildiği tek bir çalışmaya rastlanılmaktadır (84). Diyabetik nefropati

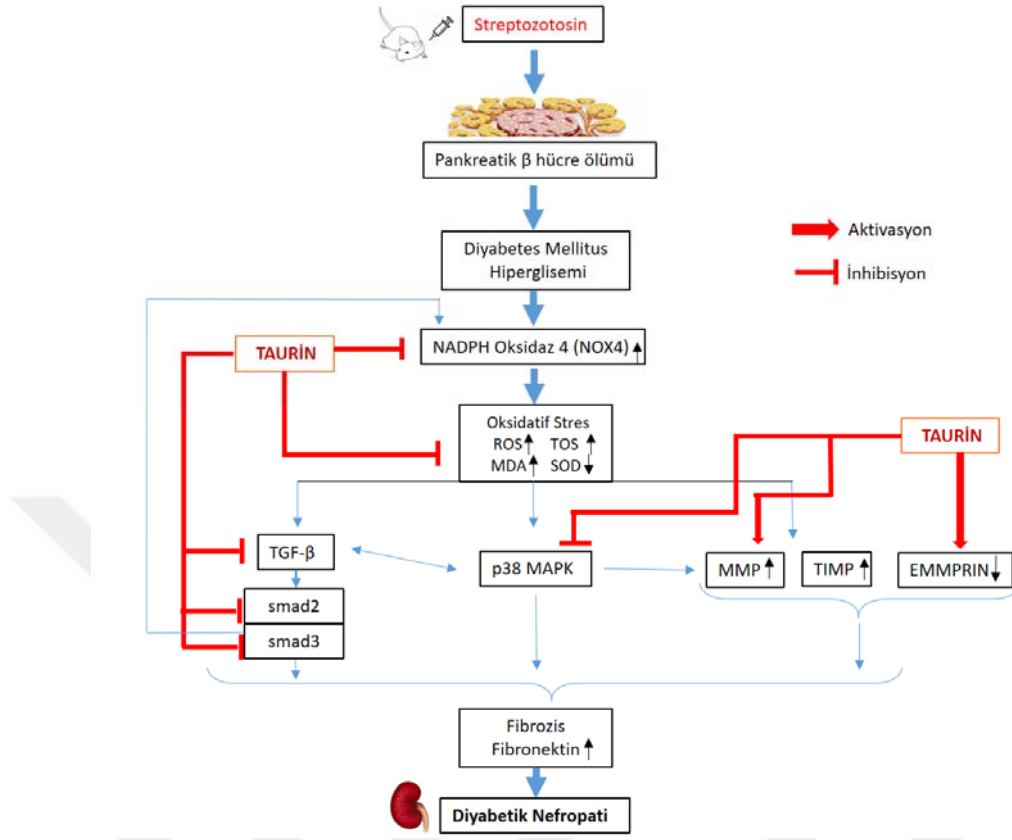
modeli oluşturulan deneysel çalışmalar, renal homeostazı sürdürmek için MMP seviyeleri ile inhibitörleri olan TIMP'ler arasında bir dengeye ihtiyaç olduğunu düşündürmektedir (13,15). Diyabet süresince TIMP-1 ve TIMP-2 protein ifade arttığını gösterdiğimiz bulgularımız daha önceki çalışmalarla uyumludur (13,15,78). Ayrıca MMP'lerin üretiminin ana düzenleyicisi ve indükleyici olan EMMPRIN'in de diyabetik nefropatide arttığı gösterilmiştir (78). Diyabetik nefropati sürecinde artan TIMP'ler üzerine ise taurinin azaltıcı etkisi istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşamamıştır. Literatürde, taurinin TIMP-1 ve TIMP-2 ifadelerine yönelik etkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Aktivatör olarak bilinen EMMPRIN'in diyabet süresince azalan mRNA ifadesinin taurin ile anlamlı olarak arttığı çalışmamızda ilk kez gösterildi. Bu bulgular taurinin böbrek dokusunda MMP ve EMMPRIN üzerine olan etkileri antifibrotik etkisini güçlü kılmaktadır.

Çalışmamızın ilerleyen aşamasında fibrozis mekanizmasının en önemli moleküllerden olan TGF- β ifadesi ile Smad2/3 yolağının ifade ve aktivasyonu değerlendirildi. Diyabet grubunda TGF- β 'nın hem mRNA hem de protein ifadelerinin arttığı bulundu. Bulgularımız DN daha önceki çalışmalar ile benzerdir (34,85–88). Bunun yanında TGF- β reseptör 1 (TgF β RI)'in diyabet süresince artışına yönelik bulgularımızda daha önce yapılmış çalışmalar ile uyumluydu (7,89). Ayrıca çalışmamızda TGF- β 'nin alt hedef moleküllerinden olan Smad2/3'ün diyabetik nefropati sürecinde Smad2 ve Smad3'ün mRNA ifadelerinin ve aktivasyonlarının arttığına yönelik bulgularımız daha önceki çalışmalarla benzerdir (86–88). Taurinin, diyabet süresince artan TGF- β üzerine azaltıcı etkisine yönelik çalışmalarla karşılaştırılmasına (77,79,90,91) rağmen TgF β RI'i baskılamasına yönelik saptadığımız bulgu literatür için özgündür. Ayrıca Smad2 ve Smad3 aktivasyonları üzerine taurinin baskılayıcı etkisi henüz literatürde bildirilmemektedir. Bu bulgular taurinin, MMP ve EMMPRIN üzerine olan indükleyici etkileri aracılığıyla gerçekleşen antifibrotik etkinliğine, ayrıca NOX4, TgF β RI ve TGF- β /Smad2/3 sinyal ileti yolları üzerine olan baskılayıcı etkilerinin de rol aldığına dikkat çekmektedir. Diyabetik fareler üzerinde yapılan bir çalışmada Smad3'ün, NOX4'ün promotör bölgesine bağlanarak ROT üretimini indüklediği gösterilmiştir (92). Bulgularımız, MMP regülasyonlarında

oksidatif stresin ve TGF- β 'nin rol aldığı da dikkate alındığında tüm bu moleküllerin birbiriyle etkileşim içinde olabileceğine işaret etmektedir.

Çalışmamızın en son aşamasında oksidatif stres ile indüklendiği bilinen p38 MAPK sinyal ileti yolağının aktivasyonu değerlendirildi. Literatürde p38 MAPK sinyal ileti yolağı aktivasyonunu diyabetik nefropati modelinde inceleyen çalışmalar ile bulgularımız uyumludur (93–95). Taurinin diyabet süresince artan p38 MAPK aktivasyonunu baskılayıcı etkisine yönelik bulgumuzu karşılaştırdığımız çalışma sayısı ise çok kısıtlıdır. DN' de artan p38 MAPK sinyal ileti yolağını inceleyen tek bir çalışmaya rastlanılmaktadır. İlgili çalışmada renal tübül hücrelerinde taurinin p38 MAPK fosforilasyonunun baskılanmasıyla fibronektin ifadesinin azaldığı gösterilmiştir (80). Bu doğrultuda taurinin fibronektin ifadesi üzerine azaltıcı etkisine yönelik bulgumuzun, taurinin p38 MAPK sinyal ileti yolağı aktivasyonu üzerine baskılayıcı etkisiyle de ilişkili olabileceğini öngörmekteyiz.

Sonuç olarak, tüm bulgular birlikte ele alındığında taurinin sıçanlarda DN modelinde koruyucu etkinliğine yönelik olası moleküler mekanizmalar Şekil 37' de özetlenmektedir. Tüm bu bulgular, taurinin diyabetik nefropati hasarında koruyucu olduğu ve bu hasara karşı geliştirilecek yeni tedavi stratejilerinde aday molekül olabileceğine dikkat çekmektedir.



Şekil 43. Taurinin diyabetik nefropatide koruyucu etkinliğine aracılık eden olası moleküler mekanizmalar

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırmanın hipotezi, Taurin, böbrekte antioksidan etkinliği ile NOX4 ifadesini azaltarak, TGF-β/Smad2/3 ve p38 MAPK sinyal ileti yollarının aktivasyonlarını baskılar. Ayrıca MMP, TIMP ve EMMPRIN proteinlerini de regüle ederek antifibrotik etkisini gösterir şeklinde kurgulandı. Çalışmamızın bulguları hipotezimizin destekler niteliktedir. Literatür incelendiğinde diyabetik nefropati süresince oluşan oksidatif stresin etkilediği proteinler (fibronectin, TGF-β, MMP-2/9, TIMP-1/2) ve regülasyonlarında rol oynayan sinyal ileti yollarına (Smad2/3, p38) taurinin etkisinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Bulgularımızın ileride yapılacak olan deneysel ve klinik çalışmalara temel oluşturacağını düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Reidy K, Kang HM, Hostetter T, Susztak K. Molecular mechanisms of Diabetic kidney disease. Vol. 124, Journal of Clinical Investigation. American Society for Clinical Investigation; 2014. p. 2333–40.
2. Gorin Y, Block K. Nox4 and diabetic nephropathy: With a friend like this, who needs enemies? Vol. 61, Free Radical Biology and Medicine. 2013. p. 130–42.
3. Warren AM, Knudsen ST, Cooper ME. Diabetic nephropathy: an insight into molecular mechanisms and emerging therapies. Expert Opinion on Therapeutic Targets. 2019 Jul 3;23(7):579–91.
4. Rocco M v., Berns JS. KDOQI in the Era of Global Guidelines. American Journal of Kidney Diseases. 2009 Nov 1;54(5):781–7.
5. Reuben PM, Cheung HS. Regulation of matrix metalloproteinase (MMP) gene expression by protein kinases. Vol. 11, Frontiers in Bioscience. 2006.
6. Cheng X, Gao W, Dang Y, Liu X, Li Y, Peng X, et al. Both ERK/MAPK and TGF-Beta/Smad signaling pathways play a role in the kidney fibrosis of diabetic mice accelerated by blood glucose fluctuation. Journal of Diabetes Research. 2013;2013.
7. Wang L, Wang HL, Liu TT, Lan HY. TGF-beta as a master regulator of diabetic nephropathy. International Journal of Molecular Sciences. 2021 Aug 1;22(15).
8. Yaribeygi H, Sathyapalan T, Atkin SL, Sahebkar A. Molecular Mechanisms Linking Oxidative Stress and Diabetes Mellitus. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2020;2020.

9. Newsholme P, Cruzat VF, Keane KN, Carlessi R, de Bittencourt PIH. Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. Vol. 473, Biochemical Journal. Portland Press Ltd; 2016. p. 4527–50.
10. Jiang F, Liu GS, Dusting GJ, Chan EC. NADPH oxidase-dependent redox signaling in TGF- β -mediated fibrotic responses. Vol. 2, Redox Biology. Elsevier B.V.; 2014. p. 267–72.
11. Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. Vol. 97, Advanced Drug Delivery Reviews. Elsevier B.V.; 2016. p. 4–27.
12. Tan RJ, Liu Y. Matrix metalloproteinases in kidney homeostasis and diseases. Am J Physiol Renal Physiol [Internet]. 2012;302:1351–61.
13. Garcia-Fernandez N, Jacobs-Cachá C, Mora-Gutiérrez JM, Vergara A, Orbe J, Soler MJ. Matrix metalloproteinases in diabetic kidney disease. Vol. 9, Journal of Clinical Medicine. MDPI; 2020.
14. Zakiyanov O, Kalousová M, Zima T, Tesař V. Matrix metalloproteinases in renal diseases: A critical appraisal. Kidney and Blood Pressure Research. 2019 Jun 1;44(3):298–330.
15. Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, Rosa CCD la, Ramirez-Acuña JM, Perez-Romero BA, Guerrero-Rodriguez JF, et al. The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases. International Journal of Molecular Sciences. 2020 Dec 2;21(24):1–53.
16. Bozzuto G, Ruggieri P, Molinari A. Molecular aspects of tumor cell migration and invasion. Ann Ist Super Sanita . 2010;66–80.
17. Conway BR, Betz B, Sheldrake TA, Manning JR, Dunbar DR, Dobyns A, et al. Tight blood glycaemic and blood pressure control in experimental diabetic nephropathy reduces extracellular matrix production without regression of fibrosis. Nephrology. 2014 Dec 1;19(12):802–13.

18. Kandhare AD, Mukherjee A, Bodhankar SL. Antioxidant for treatment of diabetic nephropathy: A systematic review and meta-analysis. Vol. 278, Chemico-Biological Interactions. Elsevier Ireland Ltd; 2017. p. 212–21.
19. Tang G, Li S, Zhang C, Chen H, Wang N, Feng Y. Clinical efficacies, underlying mechanisms and molecular targets of Chinese medicines for diabetic nephropathy treatment and management. Vol. 11, Acta Pharmaceutica Sinica B. Chinese Academy of Medical Sciences; 2021. p. 2749–67.
20. Brosnan JT, Brosnan ME. 5th Amino Acid Assessment Workshop [Internet]. Vol. 136, J. Nutr. 2006. Available from:
21. Kim C, Cha YN. Production of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Phagocytes is Regulated by Taurine Chloramine. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2009;463–72.
22. Ripps H, Shen W. Review: Taurine: A “very essential” amino acid [Internet]. 2012.
23. Cavdar Z, Ural C, Celik A, Arslan S, Terzioglu G, Ozbal S, et al. Protective effects of taurine against renal ischemia/reperfusion injury in rats by inhibition of gelatinases, MMP-2 and MMP-9, and p38 mitogen-activated protein kinase signaling. *Biotechnic and Histochemistry*. 2017 Oct 3;92(7):524–35.
24. Han X, Chesney RW. The role of taurine in renal disorders. *Amino Acids*. 2012;2249–2236.
25. Roy A, Manna P, Sil PC. Prophylactic role of taurine on arsenic mediated oxidative renal dysfunction via MAPKs/ NF-B and mitochondria dependent pathways. *Free Radical Research*. 2009;43(10):995–1007.
26. Kato T, Tsunekawa M, Wang S, Yamashita T, Ma N. Effect of taurine on iNOS-mediated DNA damage in drug-induced renal injury. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2017;975:717–27.

27. Das J, Ghosh J, Manna P, Sil PC. Taurine protects acetaminophen-induced oxidative damage in mice kidney through APAP urinary excretion and CYP2E1 inactivation. *Toxicology*. 2010 Feb;269(1):24–34.
28. Das J, Sil PC. Taurine ameliorates alloxan-induced diabetic renal injury, oxidative stress-related signaling pathways and apoptosis in rats. *Amino Acids*. 2012 Oct;43(4):1509–23.
29. Chesney RW, Han X, Patters AB. Taurine and the renal system [Internet]. 2009.
30. Gnudi L, Coward RJM, Long DA. Diabetic Nephropathy: Perspective on Novel Molecular Mechanisms. Vol. 27, *Trends in Endocrinology and Metabolism*. Elsevier Inc.; 2016. p. 820–30.
31. Ighodaro OM. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. Vol. 108, *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson SAS; 2018. p. 656–62.
32. Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oxidative stress and its impacts on intracellular lipids, proteins and DNA. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*. 2015 Nov 6;6(3).
33. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. Vol. 17, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2003. p. 24–38.
34. Tang PMK, Tang PCT, Chung JYF, Lan HY. TGF- β 1 signaling in kidney disease: From Smads to long non-coding RNAs. Vol. 2, *Non-coding RNA Research*. KeAi Communications Co.; 2017. p. 68–73.
35. Chung ACK, Zhang H, Kong YZ, Tan JJ, Huang XR, Kopp JB, et al. Advanced glycation end-products induce tubular CTGF via TGF- β -independent Smad3 signaling. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2010 Feb;21(2):249–60.

36. Tan RJ, Liu Y. Matrix metalloproteinases in kidney homeostasis and diseases. *Am J Physiol Renal Physiol* [Internet]. 2012;302:1351–61.
37. Kaushik DK, Hahn JN, Yong VW. EMMPRIN, an upstream regulator of MMPs, in CNS biology. Vols. 44–46, *Matrix Biology*. Elsevier; 2015. p. 138–46.
38. Cheng Z, Limbu MH, Wang Z, Liu J, Liu L, Zhang X, et al. MMP-2 and 9 in chronic kidney disease. Vol. 18, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2017.
39. Zhang SX, Wang JJ, Lu K, Mott R, Longeras R, Ma JX. Therapeutic potential of angiostatin in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2006 Feb;17(2):475–86.
40. Kolset SO, Reinholt FP, Jenssen T. Diabetic Nephropathy and Extracellular Matrix. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2012;60(12):976–86.
41. Han SY, Jee YH, Han KH, Kang YS, Kim HK, Han JY, et al. An imbalance between matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 contributes to the development of early diabetic nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2006 Sep;21(9):2406–16.
42. Inada A, Nagai K, Arai H, Miyazaki JI, Nomura K, Kanamori H, et al. Establishment of a diabetic mouse model with progressive diabetic nephropathy. *American Journal of Pathology*. 2005;167(2):327–36.
43. Qing-Hua G, Ju-Ming L, Chang-Yu P, Zhao-Hui L, Xiao-Man Z, Yi-Ming M. The kidney expression of matrix metalloproteinase-9 in the diabetic nephropathy of Kkay mice. *Journal of Diabetes and its Complications*. 2008 Nov;22(6):408–12.
44. Lambert IH, Kristensen DM, Holm JB, Mortensen OH. Physiological role of taurine – from organism to organelle. Vol. 213, *Acta Physiologica*. Blackwell Publishing Ltd; 2015. p. 191–212.

45. Jong CJ, Sandal P, Schaffer SW. The role of taurine in mitochondria health: More than just an antioxidant. Vol. 26, *Molecules*. MDPI AG; 2021.
46. Wen C, Li F, Zhang L, Duan Y, Guo Q, Wang W, et al. Taurine is Involved in Energy Metabolism in Muscles, Adipose Tissue, and the Liver. Vol. 63, *Molecular Nutrition and Food Research*. Wiley-VCH Verlag; 2019.
47. Stipanuk MH, Dominy JE, Lee JI, Coloso RM. 5th Amino Acid Assessment Workshop Mammalian Cysteine Metabolism: New Insights into Regulation of Cysteine Metabolism 1,2 [Internet]. 2006.
48. Marcinkiewicz J, Kontny E. Taurine and inflammatory diseases. 2012;
49. Menzie J, Pan C, Prentice H, Wu JY. Taurine and central nervous system disorders.
50. Surai PF, Earle-payne K, Kidd MT. Taurine as a natural antioxidant: From direct antioxidant effects to protective action in various toxicological models. Vol. 10, *Antioxidants*. MDPI; 2021.
51. Caine JJ, Geraciotti TD. Taurine, energy drinks, and neuroendocrine effects. Vol. 83, *Cleveland Clinic Journal of Medicine*. Cleveland Clinic Educational Foundation; 2016. p. 895–904.
52. Baliou S, Kyriakopoulos AM, Goulielmaki M, Panayiotidis MI, Spandidos DA, Zoumpourlis V. Significance of taurine transporter (TauT) in homeostasis and its layers of regulation (review). *Molecular Medicine Reports*. 2020 Sep 1;22(3):2163–73.
53. Qin Tang L, Liu S, Tang Zhang S, Na Zhu L, Ling Wang F. Berberine regulates the expression of E-prostanoid receptors in diabetic rats with nephropathy.
54. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 2011 Dec 27;

55. Eren Z, Günal MY, Arı bakir E, Çoban J, Çağlayan B, Ekimci N, et al. Effects of Paricalcitol and Aliskiren Combination Therapy on Experimental Diabetic Nephropathy Model in Rats. *Kidney Blood Press Res* [Internet]. 2014;581–90.
56. Gumustekin M, Tekmen I, Guneli E, Tugyan K, Topcu A, Ergonen AT, et al. Short-term melatonin treatment improved diabetic nephropathy but did not affect hemorheological changes in diabetic rats. *Pharmazie* [Internet]. 2007 Sep [cited 2022 Feb 3];62(9):693–8.
57. Wang L, Zhang L, Yu Y, Wang Y, Niu N. 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. *Renal Failure*. 2008 Sep;30(8):763–71.
58. Close B, Croft B, Lane B, Knoll B. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1.
59. Yasuda H, Yuen PST, Hu X, Zhou H, Star RA. Simvastatin improves sepsis-induced mortality and acute kidney injury via renal vascular effects. *Kidney International*. 2006 May;69(9):1535–42.
60. Ferreira IMPLVO, Nunes M v., Mendes E, Remião F, Ferreira MA. Development of an HPLC-UV method for determination of taurine in infant formulae and breast milk. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 1997;20(8):1269–78.
61. Liu BC, Lan HY, Lv LL. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1165
62. *USE OF ANTICOAGULANTS IN DIAGNOSTIC LABORATORY INVESTIGATIONS*. 2002;
63. Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, Bruns DE, Horvath AR, Kirkman MS, et al. Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. 2011 [cited 2022 May 21]

64. Chomczynski P. (PDF) A Reagent for the Single-step Simultaneous Isolation of RNA, DNA and Proteins from Cell and Tissue Samples [Internet]. BioTechniques. 1993 [cited 2022 Jan 25].
65. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*. 2008 May;3(6):1101–8.
66. Tarpey MM, Wink DA, Grisham MB, Grisham MB. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2004;286:431–44.
67. Lykkesfeldt J. Determination of malondialdehyde as dithiobarbituric acid adduct in biological samples by HPLC with fluorescence detection: Comparison with ultraviolet-visible spectrophotometry. *Clinical Chemistry*. 2001;47(9):1725–7.
68. Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD, Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Investigation of the Bicinchoninic Acid Protein Assay: Identification of the Groups Responsible for Color Formation. *Analytical Biochemistry*; 1988.
69. Pandya K, Clark GJ, Lau-Cam CA. Investigation of the role of a supplementation with taurine on the effects of hypoglycemic-hypotensive therapy against diabetes-induced nephrotoxicity in rats. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2017;975:371–400.
70. Koh JH, Lee ES, Hyun M, Kim HM, Choi YJ, Lee EY, et al. Taurine alleviates the progression of diabetic nephropathy in type 2 diabetic rat model. *International Journal of Endocrinology*. 2014;2014.
71. Lin S, Yang J, Wu G, Liu M, Luan X, Lv Q, et al. Preventive effect of taurine on experimental type II diabetic nephropathy [Internet]. 2009.

72. Trachtman H, Futterweit S, Maesaka J, Ma C, Valderrama E, Fuchs A, et al. Taurine ameliorates chronic streptozocin-induced diabetic nephropathy in rats [Internet]. 1995.
73. Lee EA, Seo JY, Jiang Z, Yu MR, Kwon MK, Ha H, et al. Reactive oxygen species mediate high glucose-induced plasminogen activator inhibitor-1 up-regulation in mesangial cells and in diabetic kidney. Vol. 67, *Kidney International*. 2005.
74. Winiarska K, Szymanski K, Gorniak P, Dudziak M, Bryla J. Hypoglycaemic, antioxidative and nephroprotective effects of taurine in alloxan diabetic rabbits. *Biochimie*. 2009 Feb;91(2):261–70.
75. Sedeek M, Nasrallah R, Touyz RM, Hébert RL. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and the kidney: Friend and foe. Vol. 24, *Journal of the American Society of Nephrology*. 2013. p. 1512–8.
76. He T, Guan X, Wang S, Xiao T, Yang K, Xu X, et al. Resveratrol prevents high glucose-induced epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells by inhibiting NADPH oxidase/ROS/ERK pathway. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2015 Feb 5;402:13–20.
77. Pandya KG, Budhram R, Clark G, Lau-Cam CA. Comparative evaluation of taurine and thiotaurine as protectants against diabetes-induced nephropathy in a rat model. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2013;775:371–94.
78. Huang Z, Wang C, Wei L, Wang J, Fan Y, Wang L, et al. Resveratrol inhibits EMMPRIN expression via P38 and ERK1/2 pathways in PMA-induced THP-1 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008 Sep 26;374(3):517–21.
79. Ha H, Yu MR, Kim KH. Melatonin and Taurine Reduce Early Glomerulopathy in Diabetic Rats. *Free Radical Biology & Medicine*; 1999.

80. Huang JS, Chuang LY, Guh JY, Huang YJ. Effects of nitric oxide and antioxidants on advanced glycation end products-induced hypertrophic growth in human renal tubular cells. *Toxicological Sciences*. 2009;111(1):109–19.
81. Huang JS, Chuang LY, Guh JY, Huang YJ, Hsu MS, Huang JS, et al. Antioxidants attenuate high glucose-induced hypertrophic growth in renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* [Internet]. 2007;293:1072–82.
82. Huang JS, Chuang LY, Guh JY, Yang YL, Hsu MS. Effect of taurine on advanced glycation end products-induced hypertrophy in renal tubular epithelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2008 Dec 1;233(2):220–6.
83. Thrailkill KM, Clay Bunn R, Fowlkes JL. Matrix metalloproteinases: their potential role in the pathogenesis of diabetic nephropathy. Vol. 35, *Endocrine*. 2009. p. 1–10.
84. Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Shimada N, Ohmuro H, Ebihara I, et al. Letter to the Editor Effects of Taurine and Vitamin E on Microalbuminuria, Plasma Metalloproteinase-9, and Serum Type IV Collagen Concentrations in Patients with Diabetic Nephropathy. *Nephron*. 1999;83:361–2.
85. Loeffler I, Wolf G. Transforming growth factor- β and the progression of renal disease. Vol. 29, *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2014.
86. Lan HY. Transforming growth factor- β /Smad signalling in diabetic nephropathy. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2012 Aug;39(8):731–8.
87. Zhou L, Fu P, Ru Huang X, Liu F, K Chung AC, Neng Lai K, et al. Mechanism of chronic aristolochic acid nephropathy: role of Smad3. *Am J Physiol Renal Physiol* [Internet]. 2010;298:1006–17.

88. Zeng LF, Xiao Y, Sun L. A Glimpse of the Mechanisms Related to Renal Fibrosis in Diabetic Nephropathy. *Advances in Experimental Medicine and Biology* [Internet]. 2019 [cited 2022 Feb 3];1165:49–79.
89. Okazaki Y, Yamasaki Y, Uchida HA, Okamoto K, Satoh M, Maruyama K, et al. Enhanced TGF- β /Smad signaling in the early stage of diabetic nephropathy is independent of the AT1a receptor. *Clinical and Experimental Nephrology*. 2007 Mar;11(1):77–87.
90. Park SH, Choi HJ, Lee JH, Woo CH, Kim JH, Han HJ. High glucose inhibits renal proximal tubule cell proliferation and involves PKC, oxidative stress, and TGF-1. Vol. 59, *Kidney International*. 2001.
91. Higo S, Miyata S, Yun Jiang Q, Kitazawa R, Kitazawa S, Kasuga M. Taurine Administration after Appearance of Proteinuria Retards Progression of Diabetic Nephropathy in Rats. Vol. 54, *Kobe J. Med. Sci*. 2008.
92. Wang JN, Yang Q, Yang C, Cai YT, Xing T, Gao L, et al. Smad3 promotes AKI sensitivity in diabetic mice via interaction with p53 and induction of NOX4-dependent ROS production. *Redox Biology*. 2020 May 1;32.
93. Tang SCW, Lai KN. The pathogenic role of the renal proximal tubular cell in diabetic nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2012 Aug;27(8):3049–56.
94. Huang W jun, Liu W jing, Xiao Y hua, Zheng H juan, Xiao Y, Jia Q, et al. Tripterygium and its extracts for diabetic nephropathy: Efficacy and pharmacological mechanisms. Vol. 121, *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson SAS; 2020.
95. Han J, Pang X, Zhang Y, Peng Z, Shi X, Xing Y. Hirudin Protects Against Kidney Damage in Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy Rats by Inhibiting Inflammation via P38 MAPK/NF- κ B Pathway. 2020

8. EKLER

EK-1 Etik Kurul Onayı

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

Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 02/03/2015
Toplantı Tarihi : 10 Şubat 2015

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

05/2015 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Diyabetik nefropati modelinde taurinin ekstraselüler matriks proteinleri üzerine etkisi ve ilişkili sinyal ileti yollarının incelenmesi" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Prof.Dr.Osman YILMAZ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı	Prof.Dr.Ali Necati GÖKMEN Başkan Vekili
Prof.Dr.Turna İLKNUR Üye (Topl.Katılmadı)	Prof.Dr.Safiye AKTAŞ Üye (Topl.Katılmadı)
Prof.Dr.Alper SOYLU Üye (Topl.Katılmadı)	Prof.Dr.Hüsnü Alper BAĞRIYANIK
Prof.Dr.Gülşüm OKTAY Üye	Prof.Dr. Hatice Nur OLGUN Üye (Topl.Katılmadı)
Prof.Dr.M.Ensari GÜNELİ Üye (Araştırmacı)	Doç.Dr.Türkay FERTAY
Doç.Dr.Meral KARAMAN	Doç.Dr.Pembe UYGUN KEŞKİNOĞLU
Doç.Dr.Günay KIRKIM	Doç.Dr.Nermin Nüket GÖÇMEN MAS Üye
Yard.Doç.Dr.Orhan KALEMCI Üye (Topl.Katılmadı)	Vet.Hekim Adnan SERPEN Üye
Zehra KINAM Üye	

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

Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 04/16/2016
Toplantı Tarihi : 23 Ağustos 2016

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

05/2015 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Diyabetik nefropati modelinde taurinin ekstrasellüler matris proteinleri üzerine etkisi ve ilişkili sinyal ileti yollarının incelenmesi" isimli projede gönderilen ek hayvan talep formu incelenerek, 8 adet Wistar Albino dişi rat'ın verilmesi uygun bulunmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz

Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Başkanı
(Topl.Katılmadı)

Prof.Dr.Safiye AKTAŞ
Üye

Prof.Dr.Gülün OKTAY
Üye (Topl.Katılmadı)

Doç.Dr.Meral KARAMAN

Doç.Dr.Türkan ERTAY
Üye (Topl.Katılmadı)

Doç.Dr.Zekiye Sultan ALTUN
Üye

Zehra KINAM
Üye

Prof.Dr.Ali Necati GÖKMEN
Başkan Vekili

Prof.Dr. Hatice Nur OLGUN
Üye

Prof.Dr.Güney KIRKIM

Prof.Dr.Pembe UYGUN KEŞKİNOĞLU

Doç.Dr.Nermin Nüket GÖÇMEN MAS
Üye

Yard.Doç.Dr.Orhan KALEMCI

Vet.Hekim Aydın BERPEN

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

Ek-2 Kan şekeri ve ağırlık takibi

Haftalar	Deney hayvanları (KŞ: mg/dL)															
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	DT1	DT2	DT3	DT4	DT5	DT6	DT7	DT8
1.	550	Hİ	438	Hİ	466	416	Hİ	Hİ	188	456	532	512	425	339	392	558
2.	381	288	238	155	415	437	Hİ	597	Hİ	Hİ	Hİ	Hİ	Hİ	126	481	518
3.	477	447	334	214	493	493	473	558	238	372	464	589	384	356	416	472
4.	533	500	418	159	548	Hİ	550	Hİ	330	400	456	557	358	244	483	491
6.	503	259	327	297	520	585	483	486	125	512	Hİ	Hİ	477	181	400	412
8.	410	X	244	147	Hİ	Hİ	Hİ	Hİ	347	536	460	X	407	334	445	487

9.	424	X	303	312	Hi	Hi	Hi	Hi	202	400	467	X	Hi	209	502	468
11.	424	X	436	317	Hi	580	581	Hi	367	425	453	X	364	121	463	479
12 (skr. Günü)	400	X	276	266	552	479	503	570	171	511	468	X	494	253	593	Hi
	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5	T 6	T 7	T 8
1.	118	122	108	100	132	124	115	89	104	124	94	114	114	106	107	110
Son	180	139	136	140	163	153	159	128	205	174	168	163	154	186	221	X

Haftalar	Deney hayvanları (g)															
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	DT1	DT2	DT3	DT4	DT5	DT6	DT7	DT8
1.	217	225	217	224	215	211	210	215	240	222	214	220	218	215	212	238
2.	214	229	213	233	226	219	215	217	247	230	214	215	223	226	220	232
3.	220	244	249	244	220	205	214	213	263	248	225	211	233	237	235	235
4.	224	243	250	246	227	207	235	214	260	238	218	201	234	238	225	229
6.	212	228	262	243	231	219	255	219	265	239	237	220	243	244	222	243
8.	227	X	278	255	218	211	224	217	270	241	219	X	235	262	255	244
9.	234	X	293	258	230	231	265	237	276	258	232	X	246	263	265	265
11.	230	X	307	261	230	223	259	235	281	270	251	X	257	271	281	258

12 (Sakrifikasyon Günü)	230	X										X				
			307	266	238	234	259	239	276	259	223		250	271	270	261
	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5	T 6	T 7	T 8
1.	236	254	240	235	251	209	223	213	244	239	230	245	245	234	243	265
12. hafta sonu	253	292	242	294	286	279	286	290	281	266	272	260	290	334	317	X

KATKI

Proje başvurusu DEÜ SBE Yönetim Kurulu tarafından 07.11.2016 tarihinde rektörlük BAP birimine gönderilmiştir. BAP Komisyonu'nun uygunluğunun alınmasının ardından rektörümüz'ün 10.05.2017 tarihli Olur'u ile kabul edilmiştir. BAP 2017.KB.SAG.024 no'lu projemizin 49.990,62 TL bütçe ve 24 ay süresinin ardından 20.000 TL ek bütçe ve 6 ay ek süre ile desteklenmesi uygun bulunmuştur.



ÖZGEÇMİŞ



CEMRE URAL ÖZKAN

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

Telefon

E-posta

İnternet Sayfası

Öğrenim Bilgileri

05 Eylül 2006 - 11 Haziran 2010 (3 yıl 10 ay)
Usans, Anadal/Normal Öğretim, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN FAKÜLTESİ, BİYOKİMYA PR.
Diploma Numarası: 16654
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.25 / 4.0

Deneyim / İşyeri Bilgileri

03 Şubat 2014 - Şu Anda (8 yıl 5 ay) (Tam Zamanlı)
ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TEMEL TIP
BİLİMLERİ BÖLÜMÜ TIP EĞİTİMİ ANABİLİM DALI

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanları

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanı Bilgileri

Sağlık Bilimleri -- Tıp -- Temel Tıp Bilimleri -- Biyokimya

Anahtar Kelimeler

Fibrozis
Nefroloji
Matris Metalloproteinazlar

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

A. KOÇAK SEZGİN, C. URAL ÖZKAN, D. HARMANCI KARAGÜLLE, M. A. OKTAN, A. AFAGH, S. SARIOĞLU, O. YILMAZ, A. M. BİRLİK, G. AKDOĞAN & Z. ÇAVDAR, Protective effects of alpha-lipoic acid on bleomycin-induced skin fibrosis through the repression of NADPH Oxidase 4 and TGF-β1/Smad3 signaling pathways, Human & Experimental Toxicology, 2022, 0960-3271, 41.

Z. ÇAVDAR, M. A. OKTAN, C. URAL ÖZKAN, A. KOÇAK SEZGİN, M. CALIŞIR, C. HEYBELİ, S. YILDIZ, S. ÖZBAL, S. ARSLAN, B. U. ERGÜR, O. YILMAZ & C. ÇAVDAR, Alpha lipoic acid attenuates Iron Induced oxidative acute kidney injury in rats, BIOTECHNIC HISTOCHEMISTRY, 2021, 1052-0295, 96, 6, 409-417.

M. A. OKTAN, C. HEYBELİ, C. URAL ÖZKAN, A. KOÇAK SEZGİN, G. BİLİCİ, S. ÖZBAL, Ş. ARSLAN, O. YILMAZ & C. ÇAVDAR, Alpha-lipoic acid alleviates collagen nephrotoxicity in rats, Human & Experimental Toxicology, 2021, 0960-3271, 40.

G. BİLİCİ, C. URAL ÖZKAN, U. SAÇIK, Z. ÇAVDAR & G. ERBİL, The effects of hypothyroidism and hyperthyroidism on placental Hofbauer cells of pregnant rats, Biotechnic & Histochemistry, 2021, 1052-0295.

Y. A. MANİSALIGİL, M. GÜMÜŞTEKİN, S. CILAKER MIÇILI, C. URAL ÖZKAN, Z. ÇAVDAR, G. ŞİŞMAN & A. YURT, The role of small GTPase Rac1 in Ionizing radiation-induced testicular damage, International Journal of Radiation Biology, 2021, 0955-3002, 98.

A. KOÇAK SEZGİN, C. URAL ÖZKAN, D. HARMANCI, P. AKOKAY, A. KAYATAŞ, B. GÜL, E. YILDIZ, C. A. KARABAÇAK, İ. EMİK, Ç. PEKÇETİN & Z. ÇAVDAR, GAINING RESEARCH CULTURE IN MEDICAL EDUCATION: A SPECIAL STUDY MODULE EXAMPLE, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 2020, 1300-6622, 34, 3, 219-230.

Z. ÇAVDAR, M. A. OKTAN, C. URAL ÖZKAN, M. ÇALIŞIR, A. KOÇAK, C. HEYBELİ, S. YILDIZ, M. A. ARICI, H. ELLİDOKUZ, A. ÇELİK, O. YILMAZ & S. SARIOĞLU, Renoprotective Effects of Alpha Lipoic Acid on Iron Overload-Induced Kidney Injury in Rats by Suppressing NADPH Oxidase 4 and p38 MAPK Signaling, BIOLOGICAL TRACE ELEMENT RESEARCH, 2020, 0163-4984.

A. KOÇAK, C. URAL ÖZKAN, S. SİFİL, B. SEZER, H. ÇAKIRLAR, E. E. TUNGA, P. AKOKAY, D. HARMANCI KARAGÜLLE, Ç. PEKÇETİN & Z. ÇAVDAR, Tıp Eğitiminde Özel Çalışma Modülü: Sisplatin Kaynaklı Testis Hasarında Alfa Lipoik Asit'in Koruyucu Etkilerinin Araştırılması, STED/Süreklî Tıp Eğitimi Dergisi, 2020, 1300-0853.

A. KOÇAK SEZGİN, D. HARMANCI, Z. ÇAVDAR, C. URAL ÖZKAN, A. M. BİRLİK, S. SARIOĞLU, O. YILMAZ & G. AKDOĞAN, Antioxidant Effect of Epigallocatechin-3-Gallate in a Bleomycin-Induced Scleroderma Model, ARCHIVES OF RHEUMATOLOGY, 2019, 2148-5046, 34, 1, 1-8.

M. A. ARICI, A. ŞAHİN, Z. ÇAVDAR, B. U. ERGÜR, C. URAL ÖZKAN, P. AKOKAY, Ş. KALKAN & Y. TUNÇOK, Effects of resveratrol on alpha-amanitin-induced nephrotoxicity in BALB/c mice, HUMAN EXPERIMENTAL TOXICOLOGY, 2019, 0960-3271, 39, 3, 328-337.

Z. ÇAVDAR, C. URAL ÖZKAN, A. KOÇAK SEZGİN, S. ARSLAN, S. ERSAN, S. ÖZBAL, M. TATLI, A. DUBOVA & C. ÇAVDAR, Paricalcitol pretreatment attenuates renal ischemia/reperfusion injury by inhibiting p38 MAPK and activating PI3K/Akt signaling pathways, TURKISH JOURNAL OF BIOCHEMISTRY-TURK BİYOKİMYA DERGİSİ, 2019, 0250-4685, 44, 4, 452-461.

S. ERSAN, A. ÇELİK, M. TANRISEV, İ. KOSE, Z. ÇAVDAR, M. UNLU, A. KOÇAK SEZGİN, C. URAL ÖZKAN, B. YILMAZ & T. KOSE, Pretreatment with paricalcitol attenuates level and expression of matrix metalloproteinases in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury, CLINICAL NEPHROLOGY, 2017, 0301-0430, 88, 5, 231-238.

Z. ÇAVDAR, C. URAL ÖZKAN, A. ÇELİK, Ş. ARSLAN, G. TERZİOĞLU, S. ÖZBAL, S. YILDIZ, B. U. ERGÜR, M. E. GÜNELİ, T. ÇAMSARI & G. AKDOĞAN, Protective effects of taurine against renal ischemia/reperfusion injury in rats by inhibition of

gelatinases, MMP-2 and MMP-9, and p38 mitogen-activated protein kinase signalling, *Biotechnic Histochemistry*, 2017, 0000-0000.

C. URAL ÖZKAN, Z. ÇAVDAR, A. ÇELİK, Ş. ARSLAN, T. GÜLSÜM, S. ÖZBAL, B. U. ERGÜR, M. E. GÜNELİ, T. ÇAMSARI & G. AKDOĞAN, The Investigation of possible protective effect of taurine on extracellular matrix and related signalling pathway in renal Ischemia reperfusion model, *FEB5 JOURNAL*, 2015, 1742-464X.

Z. ÇAVDAR, S. ÖZBAL, A. ÇELİK, B. U. ERGÜR, M. E. GÜNELİ, C. URAL ÖZKAN, T. ÇAMSARI & G. AKDOĞAN, The effects of alpha lipoic acid on MMP 2 and MMP 9 activities in a rat renal Ischemia and re perfusion model, *BIOTECHNIC & HISTOCHEMISTRY*, 2014, 0000-0000.

Bildiriler

C. URAL ÖZKAN, S. ÇOBAN, S. YILDIZ, E. BOZKAYA, Z. ÇAVDAR, Ş. M. ÜNLÜ, M. ÇALUŞIR, O. YILMAZ & T. ÇAMSARI, The Investigation Of The Therapeutic Effect Of Pirfenidone On Peritoneal Fibrosis In Sclerosing Encapsulating Peritonitis Model In Rats, Sözlü Sunum, Extracellular Matrix: Cell Regulation, Epigenetics and Modeling, 23 Eylül 2018, 02 Ekim 2018.

A. KOÇAK, D. HARMANCI KARAGÜLLE, S. SARIOĞLU, A. M. BİRLİK, Z. ÇAVDAR, O. YILMAZ, C. URAL ÖZKAN & G. AKDOĞAN, Antioxidant effects of epigallocatechin-3 gallate in scleroderma experimental model, Poster Sunumu, International Biochemistry Congress, 19 Eylül 2017, 23 Eylül 2018, 42, 1.

O. YILMAZ, G. AKDOĞAN, Z. ÇAVDAR, A. M. BİRLİK, S. SARIOĞLU, A. KOÇAK, D. HARMANCI KARAGÜLLE & C. URAL ÖZKAN, Deneyisel Scleroderma modelinde Epigallocatechin-3 gallate'nin antioksidan etkisine aracılık eden moleküllerin mekanizması, Sözlü Sunum, 18. Ulusal Romatoloji Kongresi, 18 Ekim 2017, 22 Ekim 2017.

A. KOÇAK, H. KILINÇ, E. S. ÇAMLI, A. OFLAZ, J. S. ÖZGÜR, N. YILDIZ, O. TEKNECİ, D. HARMANCI KARAGÜLLE, C. URAL ÖZKAN, Z. ÇAVDAR & G. AKDOĞAN, Fibroz Gelişiminin O₂g?renilmesinde Skleroderma Fare Modelinin Kullanılması, Poster Sunumu, Uluslararası Biyokimya kongresi/ 28. Ulusal Biyokimya Kongresi, 19 Eylül 2017, 23 Eylül 2017.

C. URAL ÖZKAN, Z. ÇAVDAR, S. ERSAN, A. KOÇAK, Ş. ARSLAN, S. ÖZBAL, A. ÇELİK & C. ÇAVDAR, Parikalsitolün Renal İskemi Reperfüzyon Hasarında P38 MAPK Sinyal Yolu Aracılığıyla Korumucu Etkileri, Sözlü Sunum, Uluslararası Biyokimya Kongresi/ 28. Ulusal Biyokimya Kongresi, 19 Eylül 2017, 23 Eylül 2017.

A. KOÇAK, D. HARMANCI KARAGÜLLE, S. SARIOĞLU, A. M. BİRLİK, Z. ÇAVDAR, O. YILMAZ, C. URAL ÖZKAN & G. AKDOĞAN, Skleroderma deney modelinde Epigallocatechin-3 gallate'nin antioksidan etkileri, Poster Sunumu, Uluslararası Biyokimya kongresi /28. Ulusal Biyokimya Kongresi, 19 Eylül 2017, 23 Eylül 2017.

D. HARMANCI KARAGÜLLE, A. GURUP, E. T. YİĞİTELİ, O. ERTÜRK, M. BÜLBÜL, C. URAL ÖZKAN, A. KOÇAK, Z. ÇAVDAR & G. AKDOĞAN, Tıp Eğitiminde Deneyisel Özel Çalışma Modülü Örneği: Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi ile Hücre Lizatlarında Selenyum Düzeylerinin Ölçülmesi, Poster Sunumu, Uluslararası Biyokimya Kongresi/ 28. Ulusal Biyokimya Kongresi, 19 Eylül 2017, 23 Eylül 2017.

Z. ÇAVDAR, B. HAKKOYMAZ, B. ONUS, E. E. ERKOL, C. URAL ÖZKAN, D. HARMANCI KARAGÜLLE, A. KOÇAK, M. BÜLBÜL & G. AKDOĞAN, Tıp Eğitiminde Özel Çalışma Modülü: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Kırmızı Şarapta Resveratrol Analizi, Poster Sunumu, Uluslararası Biyokimya kongresi/ 28. Ulusal Biyokimya Kongresi, 19 Eylül 2017, 23 Eylül 2017.

C. URAL ÖZKAN, Z. ÇAVDAR, S. ERSAN, A. KOÇAK, Ş. ARSLAN, S. ÖZBAL, A. ÇELİK & C. ÇAVDAR, The Protective Effect of Paricalcitol on Renal Ischemia/Reperfusion Injury In Rats Through The Inhibition of P38 MAPK Signaling Pathway, Poster Sunumu, 42nd FEB5 Congress, 10 Eylül 2017, 14 Eylül 2017.

C. URAL ÖZKAN, D. ÖZAYDIN, A. HABİBULLAH, D. HARMANCI KARAGÜLLE, A. KOÇAK, Z. ÇAVDAR & G. AKDOĞAN, A Special Study Module In Medical Education: Investigation of Oxidative Stress In a Model of Peritoneal Fibrosis, Poster Sunumu, New Horizons In Biochemistry and Molecular Biology Education Conference, 06 Eylül 2017, 08 Eylül 2017.

D. HARMANCI KARAGÜLLE, S. SAĞLAM, C. DOĞAN, M. KARACA, M. ÖZBEK, S. KARAMAN, A. N. İŞÇEN, T. GÖREN, A. KOÇAK, C. URAL ÖZKAN, Z. ÇAVDAR & G. AKDOĞAN, An example of applying wet-lab special study module in Dokuz Eylül School of Medicine: The apoptotic effects of epigallocatechin-3-gallate on glioblastoma multiforme cells., Poster Sunumu, New Horizons In Biochemistry and Molecular Biology Education Conference, 06 Eylül 2017, 08 Eylül 2017.

Z. ÇAVDAR, C. URAL ÖZKAN, A. ÇELİK, Ş. ARSLAN, G. TERZİOĞLU, S. ÖZBAL, S. YILDIZ, B. U. ERGÜR, M. E. GÜNELİ & G. AKDOĞAN, The effect of taurine on extracellular matrix and related signalling pathway in renal ischemia Reperfusion Model, Poster Sunumu, The 29th International Symposium on the Chemistry of Natural Products and The 9th International Conference on Biodiversity, 24 Eylül 2016, 27 Eylül 2016.

S. ERSAN, A. ÇELİK, M. TANRISEV, I. KÖSE GÜLDOĞAN, Z. ÇAVDAR, Ş. M. ÜNLÜ, A. KOÇAK SEZGİN & C. URAL ÖZKAN, PARICALCİTOL ATTENUATE ACTİVİTY AND EXPRESSION OF MATRIX METALLOPROTEINASES IN A RAT MODEL OF RENAL İSCHEMİA-REPERFUSİON İNJURY, Poster Sunumu, THE 41ST FEB5 CONGRESS, 08 Eylül 2016, 08 Eylül 2016.

U. SAÇIK, G. ERBİL, Z. ÇAVDAR & C. URAL ÖZKAN, THE EFFECT OF FERULIC ACID AGAINST TESTİCULARİSCHEMİA/REPERFUSİON İNJURY İN RATS, Poster Sunumu, THE 41ST FEB5 CONGRESS, 08 Eylül 2016, 08 Eylül 2016.

U. SAÇIK, G. ERBİL, Z. ÇAVDAR & C. URAL ÖZKAN, Siçanlarda torsiyon detorsiyon modelinde hasara karşı ferulik asitlin etkisi, Poster Sunumu, 13th National Histology and Embryology Congress with International Participation, 30 Nisan 2016, 03 Mayıs 2016.

Ç. PEKÇETİN, S. CİLAKER MIÇILI, S. ÖZBAL, Z. ÇAVDAR, A. R. ŞİŞMAN, B. U. ERGÜR & C. URAL ÖZKAN, SIÇANLARDA SİSPLATİN İLE İNDÜKLENMİŞ TESTİS HASARINA KARŞI ALFA LİPOİK ASİDİN KORUYUCU ETKİSİ, Poster Sunumu, 27. ULUSAL BİYOKİMYA KONGRESİ, 05 Kasım 2015, 05 Kasım 2015.

C. URAL ÖZKAN, Z. ÇAVDAR, A. ÇELİK, Ş. ARSLAN, G. TERZİOĞLU, S. ÖZBAL, B. U. ERGÜR, M. E. GÜNELİ, T. ÇAMSARI & G. AKDOĞAN, TAURİNİN İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINDA MMP-2, MMP-9 VE İLİŞKİLİ SİNYAL İLETİ YOLAĞI ÜZERİNE ETKİLERİ, Sözlü Sunum, 27. ULUSAL BİYOKİMYA KONGRESİ, 04 Kasım 2015, 04 Kasım 2015.

C. URAL ÖZKAN, Z. ÇAVDAR, A. ÇELİK, Ş. ARSLAN, G. TERZİOĞLU, S. ÖZBAL, B. U. ERGÜR, M. E. GÜNELİ, T. ÇAMSARI & G. AKDOĞAN, THE İNVESTİGATION OF TAURİNE ON EXTRACELLULAR MATRIX AND RELATED SİGNALİNG PATHWAY İN RENAL İSCHEMİA/REPERFUSİON MODEL, Poster Sunumu, 40. FEB5 -THE BIOCHEMİCAL BASIS OF LİFE KONGRESİ, 05 Temmuz 2015, 05 Temmuz 2015.

C. URAL ÖZKAN, Z. ÇAVDAR, A. ÇELİK, Ş. ARSLAN, G. TERZİOĞLU, S. ÖZBAL, B. U. ERGÜR, M. E. GÜNELİ, T. ÇAMSARI & G. AKDOĞAN, The Investigation Of Possible Protective Effect Of Taurine On Extracellular Matrix And Related Signaling Pathway In Renal Ischemia Reperfusion Model, Basılı, V. International congress of Molecular Medicine, 20 Mayıs 2015, 22 Mayıs 2015.

Projeler

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Bleomisinle oluşturulmuş deneysel skleroderma modelinde lipoik asitlin olası koruyucu etkisine aracılık eden moleküler mekanizmaların araştırılması, Yürütülen Kuruluş: SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ,

Destek Alınan Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ (Yurt içi) , 01 Nisan 2019, 01 Ekim 2020.

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Sıçanlarda Kolistin Nefrotoksitesine Karşı Alfa-Lipoik Asit'in Koruyucu Rolünün Araştırılması, Yürütülen Kuruluş: TIP FAKÜLTESİ, Destek Alınan Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ (Yurt içi) , 01 Ocak 2019, 01 Eylül 2020.

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Diyabetik nefropati modelinde taurinin ekstrasellüler matriks proteinleri üzerine etkisi ve ilişkili sinyal ileti yollarının incelenmesi, Yürütülen Kuruluş: SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, Destek Alınan Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ (Yurt içi) , 01 Eylül 2017, 01 Haziran 2020.

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Sıçan Modelinde Küçük GTPaz'ların İyonlaştırıcı Radyasyon Hasarlarındaki Rolü, Yürütülen Kuruluş: SAĞLIK HİZMETLERİ MESLEK YÜKSEKOKULU, Destek Alınan Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ (Yurt içi) , 01 Aralık 2017, 01 Aralık 2019.

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Gebe ratlarda hipotiroidi ve hipertroidinin sonuçları ve hofbauer hücre davranışı, Yürütülen Kuruluş: TIP FAKÜLTESİ, Destek Alınan Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ (Yurt içi) , 01 Kasım 2016, 01 Ekim 2018.

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Deneyisel Erişkin Sıçan Hipertiroidi Modelinde Quercetin'in Testis Dokusundaki Etkisinin Histolojik Olarak İncelenmesi, Yürütülen Kuruluş: TIP FAKÜLTESİ, Destek Alınan Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ (Yurt içi) , 01 Ağustos 2016, 01 Ağustos 2018.

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, DEÜ Tıp Fakültesi ARLAB Bünyesinde Araştırma Hücre Hattı Koleksiyonunun Kurulumu, Yürütülen Kuruluş: TIP FAKÜLTESİ, Destek Alınan Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ (Yurt içi) , 01 Mayıs 2016, 01 Mayıs 2018.

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Over Torsiyonundaki İskemi-Reperfüzyon Hasarında Meydana Gelen Değişikliklere Silymarinin Tedavi Edici Etkisinin Biyokimyasal, Işık Mikroskopik ve Elektron Mikroskopik Düzeyde İncelenmesi, Yürütülen Kuruluş: TIP FAKÜLTESİ, Destek Alınan Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ (Yurt içi) , 01 Nisan 2017, 01 Nisan 2018.

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Alfa-Amanitine Bağlı Böbrek Toksikitesinin Önlenmesinde Silibinin İle Resveratrolün Etkinliğinin Karşılaştırılması, Yürütülen Kuruluş: TIP FAKÜLTESİ, Destek Alınan Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ (Yurt içi) , 01 Nisan 2017, 01 Ekim 2017.

BAP, ARAŞTIRMACI, SIÇANLARDA TORSİYON/DETORSİYON MODELİNDE HASARA KARŞI FERULİK ASİTİN ETKİSİ, Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Yurt içi) , 15 Nisan 2015, 14 Nisan 2016.

BAP, ARAŞTIRMACI, RENAL İSKEMİ/REPERFÜZYON MODELİNDE TAURİNİN EKSTRASELLÜLER MATRİKS BÜTÜNLÜĞÜ ÜZERİNE OLASI KORUYUCU ETKİSİNİN VE İLİŞKİLİ SİNYAL İLETİ YOLAKLARININ TANIMLANMASI, Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Yurt içi) , 06 Kasım 2013, 08 Nisan 2015.

BAP, ARAŞTIRMACI, RENAL İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINDA LİPOİK ASİTİN MMP-2 VE MMP-9 ENZİMLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI, Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Yurt içi) , 04 Ocak 2012, 17 Nisan 2013.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Proje Bilgileri

2205454, Sklerodermada Peptid Pd29 ve Upadactinib (Abt-494) Etkinliğinin İncelenmesi, 3501 - Karıyer, Araştırmacı/Uzman, Yürürlükte, ARDEB, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Kabulma/Aynılma Tarihleri: 01.02.2021 - 01.02.2023, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.02.2021 - 01.02.2023.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Hakemlik/Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0