

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RATLARDA KRONİK BÖBREK
YETMEZLİĞİ MODELİNDE KAVEOLİN
GEN EKSPRESYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Berna ÖZYAZGAN

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ

MALATYA-2013

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RATLARDA KRONİK BÖBREK
YETMEZLİĞİ MODELİNDE KAVEOLİN
GEN EKSPRESYONU**

Berna ÖZYAZGAN

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ

**Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından 2011/150 proje numarası ile desteklenmiştir.**

MALATYA-2013

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Tıbbi Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ



Danışman

Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ



Üye

Yrd. Doç. Dr. Ergül ALÇİN



ONAY :

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu...../...../2013 tarih ve 2013/.....sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sedat YILDIZ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın başından sonuna kadar yardımlarını esirgemeyen danışmanım Sayın Doç. Dr. Yılmaz Çiğremiş'e,

Deneysel analizlerin bazılarının yapılmasına katkısı bulunan Sayın Doç. Dr. Müslüm Akgöz'e

Yüksek lisans öğrenimime büyük katkılar sağlayan Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndaki hocalarıma,

Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencileri Zeynal Mete Karaca ve Yeliz Akgeyik'e,

2012-150 nolu yüksek lisans tez projeme maddi destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

ÖZET

Bu tezde siklosporin A ile deneysel böbrek yetmezliği oluşturulmuş sıçanların böbrek dokusunda Kaveolin gen ifadesini, böbrek MDA ve serum BUN ve kreatinin değerlerini araştırmak amacıyla 20 adet Wistar cinsi dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar, kontrol grubu ve deneysel kronik böbrek yetmezliği grubu olmak üzere iki gruba ayrıldılar. Deneysel grubundaki sıçanlara kilogram vücut ağırlığı başına 30 mg siklosporin A deri altı uygulama yolu ile 28 gün boyunca verildi. Kontrol grubu sıçanlara ise Siklosporin A'nın çözüldüğü taşıt madde olan cremofor EL çözeltilisi 28 gün boyunca deri altı yolla uygulandı. Deneysel sonunda gruplardan alınan böbrek dokularından kaveolin gen analizi ve MDA analizi yapıldı. Serumdan ise BUN ve kreatinin analizleri yapıldı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında deneysel grubu kaveolin gen ifadesinde istatistiki anlamlı bir azalma bulunurken ($P < 0,05$), MDA seviyesinde ise anlamlı bir artış tespit edildi. ($P < 0,05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında deneysel grubu serum BUN ve kreatinin seviyesi anlamlı olarak yükselmişti ($P < 0,05$).

Anahtar kelimeler: Kronik böbrek yetmezliği, kaveolin, siklosporin A, gen ekspresyonu, RT-PZT, rat

ABSTRACT

CAVEOLIN GENE EXPRESSION IN RATS MODEL OF CHRONIC RENAL FAILURE

In this thesis, the gene expression profile of caveoline, kidney MDA, and serum BUN and creatinine levels were investigated in experimentally induced renal failure by cyclosporine A. 20 female Wistar rats were used for this purpose. Rats were divided into two groups as control and experimentally induced chronic renal failure group. In the experimental group, rats were injected with 30 mg/kg of cyclosporin A via subcutaneous route for 28 days. In the control group, rats were injected with cremophor EL, vehicle for cyclosporin A, for 28 days. Caveolin gene analysis and MDA analysis in the kidney tissue as well as serum BUN and creatinine analysis were performed at the end of the experiment. Caveolin gene expression of experimental group was statistically significantly reduced ($P < 0.05$), while the MDA level was significantly increased compared to those of control ($P < 0.05$). Serum BUN and creatinine levels were significantly increased in the experimental group compared to the control group ($P < 0.05$).

Key words: Chronic renal failure, caveolin, cyclosporine A, gene expression, RT-PCR, rat

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
TABLOLAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1.Böbrek.....	2
2.2.1. Kronik Böbrek Yetmezliği (KBY).....	5
2.2.2. Kronik Böbrek Yetmezliği Etkenleri	6
2.3. Siklosporin A (CsA).....	7
2.4. Kaveola	8
2.5. Kronik Böbrek Yetmezliğinde Görülen Gen İfade Değişiklikleri	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM	14
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	14
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	14
3.3. Sıçanların Temini ve Bakımı	15
3.4.Grupların Oluşturulması.....	16
3.5. Dokuların Alınması ve Örneklerin Analizleri.....	16
3.6. Kullanılan Çözelti ve Tamponlar	17
3.6.1. Kontrol Grubu Taşıtının Hazırlanması.....	17
3.6.2. Siklosporin A'nın hazırlanması	17
3.6.3. RNA Saklama Solüsyonu.....	17
3.6.4. RNA Denatüre Solüsyonu (RLT Çözeltisi)	17
3.6.5. 5X TBE Çözeltisinin Hazırlanması.....	18
3.7. Total RNA Saflaştırması (Qiagen Kit Protokolü).....	18
3.8. RNA'nın Agaroz Jele Yükleme İşlemleri	18
3.9.cDNA Sentez Protokolü	19

3.10. Gerçek Zamanlı PZT Protokolü	19
3.11. Biyokimyasal Analizler	20
3.11.1 MDA Analizi	20
3.11.2. Serum Üre ve Kreatinin Analizleri	21
3.12. İstatistiksel Analizler	21
4. BULGULAR	22
4.1. Hayvanların Ağırlık Değerleri	22
4.2. Biyokimyasal Bulgular	23
4.2.1. Böbrek MDA seviyesi	23
4.2.2. Hayvanların Serum BUN Değerleri	24
4.2.3. Hayvanların Serum Kreatinin Değerleri	25
4.3. Moleküler Genetik Bulgular	26
5. TARTIŞMA	30
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	37
KAYNAKLAR	40
EKLER	50
Ek 1: Kaveolin Gen Dizilimi	50
EK 2: Beta Aktin Gen Dizilimi	53
Ek 3: Deney Hayvanları Etik Kurulu Kararı	55
ÖZGEÇMİŞ	56

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

KBY	:	Kronik Böbrek Yetmezliği
CsA	:	Siklosporin A
Kav-1	:	Kaveolin-1
Kav-2	:	Kaveolin-2
Kav-3	:	Kaveolin-3
cDNA	:	Tamamlayıcı DNA
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
Dnmt1	:	DNA metiltransferaz 1
dNTP	:	Deoksiribonükleozid trifosfat
NO	:	Nitrik oksit
NOS	:	Nitrik oksit sentaz
eNOS	:	Endotelial nitrik oksit sentaz
iNOS	:	İndüklenebilen nitrik oksit sentaz
nNOS	:	Nöronal nitrik oksit sentaz
MDA	:	Malondialdehit
mRNA	:	Haberci RNA
PZT	:	Polimeraz zincir tepkimesi
RNA	:	Ribonükleik asit
RT-PZT	:	Gerçek zamanlı PZT
TBA	:	Tiyobarbitürik asit

BUN	:	Kan üre azotu
GFH	:	Glomerül filtrasyon hızı
PTPRO	:	Protein tyrosine phosphatase receptor type O
NPHS1	:	Nephrosis 1, congenital, Finnish type (nephrin)
NPHS2	:	Nephrosis 2, idiopathic, steroid-resistant (podocin)
ACTN4	:	Actinin, alpha 4
TRPC6	:	Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 6
PLCE1	:	Phospholipase C, epsilon 1
CD2AP	:	CD2-associated protein
INF2	:	Inverted formin-2
ROT	:	Reaktif oksijen türleri
UV	:	Ultraviyole
DEPC	:	Dietilpirokarbonat
DM	:	Diabetes mellitus
SDBY	:	Son dönem böbrek yetmezliği
KGN	:	Kronik glomerülo nefrit
FSGS	:	Fokal segmental glomerüloskleroz
PKA	:	Proteinkinaz A
NF- κ B	:	Nükleer faktör kapa B
CTGF	:	Konnektif doku büyüme faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Böbreğin genel yapısı.	3
Şekil 2.4.1. Kaveolanın Yapısı.	9
Şekil 2.4.2. Kaveolin-1'in Üç Boyutlu Yapısı.	10
Şekil 2.4.3. Kaveolin gen ailesi	11
Şekil 4.1. Kontrol ve deney grubu sıçanların ağırlıkları (gr).	22
Şekil 4.2.1. Kontrol ve deney grubu sıçanların böbrek MDA seviyeleri.	23
Şekil 4.2.2. Kontrol ve deney grubu sıçanların serum BUN değerleri (mg/dl).	24
Şekil 4.2.3. Kontrol ve deney grubu sıçanların serum kreatinin değerleri (mg/dl) ..	25
Şekil 4.3.1. Qiagen RNeasy saflaştırma kiti ile böbrek örneklerinden saflaştırılan toplam RNA'nın UV-transilluminatör altındaki jel görüntüsü (% 1 agaroz jel).	26
Şekil 4.3.2. Kaveolin gen ifadesinin gerçek zamanlı PZT ile analizi. 'SYBR Green' kimyası kullanılarak deneysel KBY grubunun ve kontrol grubunun β -aktin ve Kaveolin mRNA'larından sentezlenen cDNA'ların gerçek zamanlı PZT ile çoğaltımı sırası çoğaltım (A) ve erime eğrileri (B).	27
Şekil 4.3.3. β -aktin ve Kaveolin'lerin cDNA'larının PZT'deki çoğaltımının agaroz jel elektroforezi. Kullanılan DNA Markeri 100 bp DNA Markeridir (Fermentas). ..	28
Şekil 4.3.4. Kontrol ve deney grubu sıçanların böbrek kaveolin mRNA seviyeleri oranları.	29

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.2.1. KBH evreleri	5
Tablo 3.3. Düşük Sodyumlu Yem İçeriği.....	15
Tablo 3.10. Primer dizilimleri	20
Tablo 3.11.1. Analizin yapılışı	20
Tablo 4.1. Gruplarda ölçülen sıçanların ağırlık değerleri (gr).....	22
Tablo 4.2.1. Gruplarda ölçülen MDA değerleri (nmol/gyd).	23
Tablo 4.2.2. Gruplarda ölçülen serum BUN değerleri (mg/dl).	24
Tablo 4.2.3 Gruplarda ölçülen serum Kreatinin değerleri (mg/dl).....	25
Tablo 4.3. Gruplarda ölçülen böbrek Kaveolin/ β Aktin mRNA seviyelerinin oranı. 28	

1. GİRİŞ

Kronik böbrek yetmezliği (KBY), üç aydan uzun sürede azotemi, hiperfosfotemi, hipokalsemi gibi biyokimyasal bulgularla gözlemlenen, geri dönüşümsüz, ilerleyici böbrek fonksiyon bozukluğudur (1).

KBY'nin nedenleri ve görülme sıklığı ülkelere göre değişmektedir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde son dönem böbrek yetmezliğinin (SDBY) % 44'ü *diabetes mellitus* (DM), % 28'in hipertansiyon ve % 7'si glomerülonefrit nedeniyle oluşmaktadır. ABD'de her yıl bir milyon kişiden 348'inde KBY gelişmektedir (2). Ülkemizde ise yılda ortalama 15000 hastaya KBY'nin son evresi olan SDBY tanısı konulmaktadır. Türk Nefroloji Derneği kayıtlarına göre Türkiye'de milyon nüfus başına 390 kişide SDBY bulunduğu belirtilirken 25000'in üzerinde hasta diyaliz tedavisi ile yaşamını sürdürmektedir (3). SDBY görülme sıklığı, 60-75 yaş grubunda böbrek hastalığı insidansının artması ve mortalite oranlarının hemen hemen sabit kalmasına bağlı olarak geçen on yılda yaklaşık olarak %8 artmıştır (3). Aslında son dönem kronik renal yetmezlik tüm dünya genelinde artmakta ve gelişmiş ülkelerde 75-350 milyon insanı etkilemektedir (4).

Kaveola hücre plazma membranının 50-100 nm boyutundaki flask şekilli invajinasyonları olup, ilk kez 1950'li yıllarda elektron mikroskobu ile tespit edilmiştir. Kaveolin, kaveolalarda uzun tübüler yapılarda bulunan proteindir (5, 6). Mezenkimal dokuların hücre zarının iskelet proteinlerinin bir grubunu oluşturan kaveolinlerin kaveolin-1, -2, -3 olmak üzere 3 çeşidi vardır. Bu proteinler böbrek distal tübül bazolateral membranında ve bowman kapsülünün paryetal hücrelerinde, endotel hücreleri ve düz kas hücrelerinde tespit edilmişlerdir (7).

Kaveolin-1 (Kav-1) membranın önemli bir bileşenidir. Hayvanlar üzerinde yapılan deneysel çalışmalarda Kav-1'in adipositlerde, endotel hücrelerinde, pnömositler, fibroblastlar ve düz kas hücrelerinde ifade edildiği gösterilmiştir (8). Kav-1, makromoleküler taşınım, patojenlerin endositozisi, lipid metabolizması ve hücrel sinyal iletimi gibi önemli hücrel faaliyetlerde hizmet vermektedir (8).

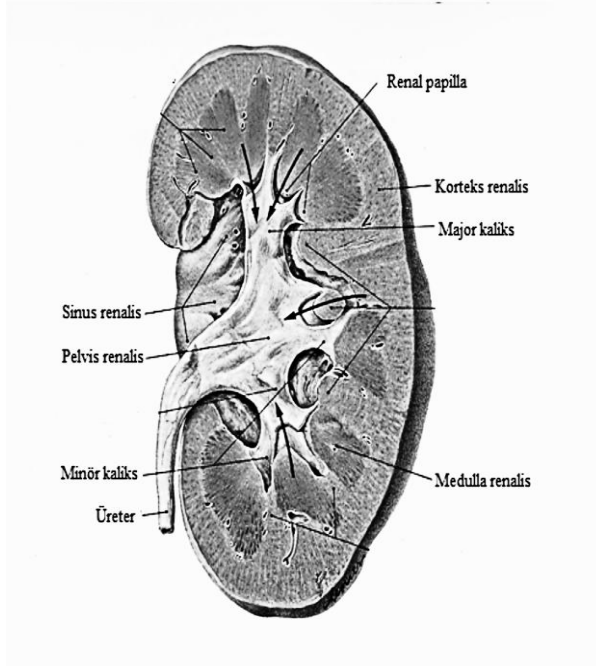
Bu tezde, siklosporin A (CsA) ile deneysel kronik böbrek yetmezliği modeli oluşturulmuş sıçanlarda böbrek kaveolin gen ifadesinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Böbrek

Böbrekler karın arka duvarında, vertebral kolonun her iki tarafında retroperitoneal olarak yerleşmişlerdir. Böbreği içten dışa doğru kapsula fibroz, kapsula adipoz ve fasya renalis olmak üzere üç kılıf sarar. Ağırlıkları toplam vücut ağırlığının ancak % 0,5'ini oluşturmaktadır (9). Her böbreğin medial kesiminde renal hilus denilen ve içinden renal arter, renal ven, renal pelvis, üreter, lenfatik ve sinirlerin geçtiği bir yapı bulunur (Şekil 2.1). Renal hilus içine renal arterler ve sinirler girerken, renal venler, lenfatikler ve üreter böbreği buradan terkeder. Sağ böbrek üstte sürrenal bez, üst ve önde karaciğer, hilus seviyesinde duodenum, alt ve lateral kenarda kolon ile komşudur. Sol böbrek ise üstte sürrenal bez, önde mide, dalak, pankreas, jejunum ve desendan kolon ile komşudur (9).

Her böbreğin mediyal kısmında hilum denen çukur bir bölge bulunur. Eğer böbrekler en üst noktası ile alt ucu arasındaki uzun ekseninden frontal planda ikiye kesilecek olursa dış kısımda korteks, iç kısımda medulla denen iki ana bölge ayırılır. Korteks, böbreğin en küçük fonksiyonel ünitesi olarak bilinen nefronların en önemli kısımlarını oluşturan glomerül kapiller yumaklarının tamamının bulunduğu bölgedir (10). Korteks yer yer medulla içine doğru uzantılar gösterir ve piramidler arasındaki bu korteks kesimlerine Bertin kolonları adı verilir. Böbreğin medullasında böbrek piramitleri denen koni biçimli çok sayıda doku kitleleri bulunur. Piramidlerin tabanı korteks ile medulla arasındaki sınırdan başlar ve üreterin huni biçimli üst ucunun devamından oluşan böbrek pelvisine doğru uzanan papillada son bulur. Böbrek tarafından oluşturulan idrarın papillalardan boşaltıldığı bu bölge, idrarın böbrekten sonra ulaşacağı mesaneye doğru yolunun ilk kısmıdır. Bu bölüme minör kaliks denilmektedir. Bunu sırasıyla birkaç minor kaliksin birleşmesiyle oluşan major kaliks ve 3-5 major kaliksin birleşmesinden oluşan pelvis renalis izler. Pelvis renalis, idrarın böbreği terk etmeden önce toplandığı son boşluktur ve üreterle devam eder (11).



Şekil 2.1. Böbreğin genel yapısı (12).

Böbreğin en küçük fonksiyonel ünitesi olan nefron glomerül kapiller yumak, bowman boşluğu, proksimal tübülüs, henle kulpu, distal tübülüs ve toplayıcı kanallardan oluşmaktadır. Herbir böbrekte yaklaşık olarak 1,2 milyon nefron bulunmaktadır. Her biri kendi başına idrar yapma yeteneğine sahip olan nefron sıvının kandan filtre edildiği bir glomerül ve filtre edilmiş sıvının sonunda idrara dönüştüğü uzun ve yer yer kıvrıntılı tübülden oluşur (13). Nefronlar glomerüler filtrasyon, tübüler reabsorpsiyon ve tübüler sekresyon mekanizmalarını kullanarak istenmeyen maddeleri plazmadan temizlemektedir. Glomerüler filtrasyonda glomerüldeki kanın plazmasının yaklaşık 1/5'i glomerüler membrandan filtre edilir. Filtre edilen sıvı tübüllerde ilerlerken su ve diğer vücut için gerekli olan maddeler tübüler reabsorpsiyon mekanizmasıyla geri emilir. Tübüler sekresyon ile de plazmadaki bazı maddeler tübüleri döşeyen epitel hücrelerince doğrudan tübüler sıvı içine sekrete edilir (14).

Böbreğin temel fonksiyonları ekskretuar ve metabolik olmak üzere ikiye ayrılır. Ekskretuar fonksiyonlar; idrar oluşumu, üre, ürik asit gibi metabolik artık maddelerin, ilaçlar ve toksinler gibi ekzojen maddelerin eliminasyonu, su dengesinin korunması, elektrolit ve asit baz dengesinin korunmasıdır (15). Metabolik

fonksiyonları ise Renin, D vitamini, eritropoetin, prostoglandinler, kallikrein-kinin, büyüme faktörlerinin sentezi, insülin, glukagon, parathormon, kalsitonin, prolaktin, büyüme hormonu, vazopressin, gastrointestinal hormonlar gibi peptid yapılı hormonların katabolizmasıdır (13). Metabolizma sonrası oluşan zararlı, artık maddelerin vücuttan uzaklaştırılması, sıvı-elektrolit, asit-baz dengesinin sağlanması, ilaçların eliminasyonu ve detoksifikasyonu gibi metabolik görevleri vardır. Böbrekler bu metabolik görevlerini idrar oluşturarak gerçekleştirir. İdrar oluşumu glomerüler filtrasyon ve tübüler transport aşamalarıyla oluşur (16).

Vücutta kreatinin gibi bazı yıkım ürünlerinin itrah hızı filtrasyon hızına eşit olup glomerüllerden filtre olup tübüllerden ne geri emilir ne de sekrete edilir. Kandaki amino asitler, glikoz gibi organizma için gerekli maddeler ise glomerüler kapillerden serbestçe filtre edilir fakat bütün filtre edilen miktar tübüllerden kana geri emildiği için idrarla atılmaz. Plazmadaki serbest ilaç fraksiyonları serbestçe glomerüler kapillerden filtre edilip geri emilmezken plazma proteine bağlı ilaç fraksiyonları peritübüler kapiller kandan böbrek tübulü içine salgılanarak kandan kolayca uzaklaştırılır. Plazmadaki her maddenin itrahi için, filtrasyon, geri emilim ve sekresyonun sonucu özel bir hız karışımı ortaya çıkar. Bir maddenin idrarla atılma hızı filtrasyon, geri emilim ve sekresyon hızlarına bağlıdır (17).

Böbrek klirensi, birim zamanda maddenin tümünün uzaklaştırıldığı plazma volümüdür. GFH (glomerül filtrasyon hızı) ölçümünde altın standart, inulin klirensi olsa da pratikte yalnızca plazma kreatinin ölçülmesi ve bunun GFH'nın göstergesi olarak kullanılması çok yaygındır. Atılan kreatininin çoğunun tübüler filtrasyon ile geri alındığı için plazma kreatinin konsantrasyonu ile GFH arasında ters bir orantı vardır (18).

2.2.1. Kronik Böbrek Yetmezliği (KBY)

KBY, temelde yatan böbrek hastalığının nedeni ne olursa olsun en az 3 ay süren böbrek hasarı ve/veya GFH'nin $60 \text{ ml/dk/1,73 m}^2$ 'nin altına inmesi durumu olarak tanımlanmaktadır. Böbrek hasarının başlangıcından itibaren tüm hastalık spektrumunu tanımlamak için kronik böbrek hastalığı (KBH) ifadesinin kullanımı önerilmektedir (19). KBH böbrek fonksiyonlarının derecesine göre 5 evreye ayrılmıştır (Tablo 2.2.1) (20).

Tablo 2.2.1. KBH evreleri

EVRE	TANIM	GFH (mL/dk/1.73 m^2)
1	Böbrek hasarı (normal veya artmış GFH)	≥ 90
2	Böbrek hasarı ve GFH'de hafif düşme	60-89
3	GFH'de orta düzeyde düşme	30-59
4	GFH'de belirgin düşme	15-29
5	Son Dönem Böbrek Yetmezliği	<15 (veya diyaliz)

GFH: glomerül filtrasyon hızı, SDBY: son dönem böbrek yetmezliği

Evre 1–4 KBH olan hastaların sayısı SDBY olan hastalardan yaklaşık 50 kat daha fazladır. SDBY'ne ulaşmadan önce alınacak tedbirler ve tedavi stratejileriyle hastalığın ilerleyici seyri yavaşlatılabilir ya da durdurulabilir (1). Türkiye'de renal replasman tedavisinin yıllık maliyetinin yaklaşık 500 milyon Amerikan doları civarında olduğundan ve Türkiye'nin toplam sağlık harcamalarının yaklaşık %5'ini oluşturması nedeniyle SDBY olan hastaların takipleri önem kazanmaktadır (21). ABD'de 372.000 hasta SDBY tanısı ile izlenmekte ve 2010 yılında 661.000 SDBY'li hasta olacağı tahmin edilmektedir (22). Dünyada her yıl 1 milyon kişiden 50-250'si SDBY'ne girmektedir (23).

Türk Nefroloji Derneği verilerine göre son 10 yılda ülkemizde son dönem böbrek yetersizliği insidansında iki kat, prevalansında ise beş kat artış gözlenmiştir. SDBY'nin önde gelen nedenleri yetişkinlerde diabetes mellitus ve hipertansiyon, çocuklarda ise vezikoüreteral reflü hastalığı ve primer glomerüler hastalıklardır (24).

ABD’de KBH ile ilişkili ölümler 9. sırayı almaktadır ve her yıl 80.000 hastaya KBY tanısı konulmaktadır (25). Türk Nefroloji Derneği’nin 2011 yılının sonunda elde ettiği verilerine göre ülkemizde 41352 hemodiyaliz, 3418 periton diyaliz hastası bulunmaktadır (26). Resmi olmayan veriler 2010 yılında ülkemizde diyalize giren hasta sayısının 40.000’i geçtiğini göstermektedir (27).

18 yaş üzeri 10748 erişkinde yapılan çalışmanın sonuçlarına göre ülkemizde yaklaşık her 8 kişiden 1’inde KBH vardır. Bu çalışmadan elde edilen verilere göre erişkin nüfusta yaklaşık 7 milyon insan kronik böbrek hastasıdır (28).

2.2.2. Kronik Böbrek Yetmezliği Etkenleri

Geçmişte KBY’nin etiyolojisinde glomerülonefrit önemli iken etkili tedavi yöntemleri sayesinde günümüzde artık yetmezliklerin altında yatan etyoloji diabetik ve hipertansif nefropatiler olarak karşımıza çıkmaktadır (29). Etiyolojide diabetes mellitus (%30,5) ve hipertansiyon (%27,2) büyük yer tutarken hastaların %13,7’sinde böbrek yetmezliğinin nedeni bilinmemektedir (19).

Kronik glomerülonefrit (KGN) ve diyabet en sık bilinen etiyolojik faktörler olup, olguların yine büyük bir kısmında sorumlu herhangi bir neden bulunamayabilir. Fokal segmental glomerüloskleroz (FSGS), KGN’lerin sık görülen bir tipi olup primer ve sekonder (enfeksiyon, ilaçlar, hipertansiyon, vezikoüreteral reflü,vb.) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (30).

SDBY’nin etiyolojisinde dünyada DM, KGN ve hipertansiyon bölgeye göre sıralaması değişmekle birlikte ilk 3 sırayı paylaşmaktadırlar. Ülkemizde SDBY’nin etiyolojisinde; diyabet %22,8’lik oranla birinci sırada, kronik glomerülonefritler %15 oranla ikinci sırada yer almaktadır (31).

KBY hastalardaki bulgular böbrek yetmezliğine spesifik olmamasıyla beraber ya böbrek yetmezliğine neden olan hastalığın ya da en çok hangi sistem etkilenmiş ise o sisteme ait belirti ve bulgulardır. Hastaların çoğunda böbrekte eritropoietin sentezi azaldığı için anemi görülür. İmmun sisteminin üyelerinden

lökositlerin opsonizasyonu ve kemotaksisindeki azalma sonucu sağlıklı bir bireyde rastlanmayacak enfeksiyonlar görülmesine neden olur (19). Nötrofil ve kompleman aktivasyonu, çözünen antioksidanların diyaliz ile uzaklaştırılması, NO indüksiyonu sonucu oluşan peroksinitrit formu kronik böbrek hastalarında oksidatif stresin artmasına neden olur (32). Vazodilatasyonunun bozulmasıyla organ perfüzyonu azalır ve oluşan hidroksi radikallerinin neden olduğu hücre hasarı inflamasyonu tetikler (32).

Serbest oksijen radikallerinin hücrelerde indüklediği lipid peroksidasyonun son ürünü olan malondialdehit (MDA) oksidatif stresin oluşturduğu hasar düzeyini göstermede kullanılmaktadır (33). Kronik CsA nefrotoksitesisi son dönem böbrek yetmezliğine yol açan renal fonksiyonların progresif bozulmasıyla ilişkilidir (34). Deneysel kronik CsA nefrotoksitesisinde böbrek MDA seviyelerinin yükseldiğini bildirilmiştir (35, 36).

2.3. Siklosporin A (CsA)

Kalsinörin inhibitörleri solid organ transplantasyonunda immünsupresif tedavi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Siklosporin nefrotoksite gibi bazı doza bağlı yan etkilere sahip olan bir kalsinörin inhibitörüdür. Akut nefrotoksite sıklıkla ilacın yüksek kan düzeyleri ve afferent arteriolun vazospazmına bağlı ani yükselen renal fonksiyon testleriyle bağlantılıdır. Genel olarak, akut toksite dozun azaltılması ile önlenebilir. Buna karşın, kronik nefrotoksite uzun süre düşük ilaç düzeylerine maruz kalmayla oluşur. Altta yatan morfolojik değişikliklerden dolayı, nefrotoksitenin kronik tipi doz azaltıldıktan sonra düzelmez. (37).

CsA allograft doku reddini önlemede yaygın olarak kullanılan bir immünsupresiftir. Bununla birlikte, renal vazokonstriksiyon ve arteriopati ve tübülointerstisyel fibröz gibi histolojik lezyonların gelişmesiyle karakterize nefrotoksik etkileriyle uzun süre kullanımı sınırlandırılmıştır (38).

Siklosporin, solid organ naklinde geleneksel immün baskılayıcılarla karşılaştırıldığında önemli ölçüde iyileşme ile sonuçlanan nakillerle dünya çapında

yeni bir dönemin açılmasına neden olmuştur. CsA'nın 1 yıllık greft sağkalım yararı, böbrek, kalp, karaciğer ve kemik iliği nakli erken klinik uygulanmasından sonra teyit edilmiştir. Tilney ve ark. (39) kadavra böbrek naklinden sonra % 48'den % 76'ya yükselen 2 yıllık greft sağkalım oranları bildirmişlerdir. CsA, T lenfositlerin hücre membranlarından kolaylıkla geçen lipofilik bir peptittir. CsA, kalsinörinin enzimatik aktivitesinin inhibe edilmesinden dolayı sitozolik siklofilin protein ile kompleks oluşturmaktadır (39).

Spironolakton'ın kronik CsA nefrotoksitesinde renal hasarı önlediği ve yapısal hasarı azalttığı kanıtlanmıştır (36). Böbrek damarlarının tonusunun düzenlenmesinde aldosteronun etkisini araştırmak için, kronik CsA nefrotoksitesindeki renokortikal vazoaktif yoldaki mRNA seviyeleri incelenmiş ve prorenin ve adenozin reseptörlerinde gen ifade değişiklikleri ile anjiotensinojen, anjiotensin reseptörlerinin (AT1A,AT1B) mRNA seviyelerinde azalma olduğu bildirilmiştir (38).

2.4. Kaveola

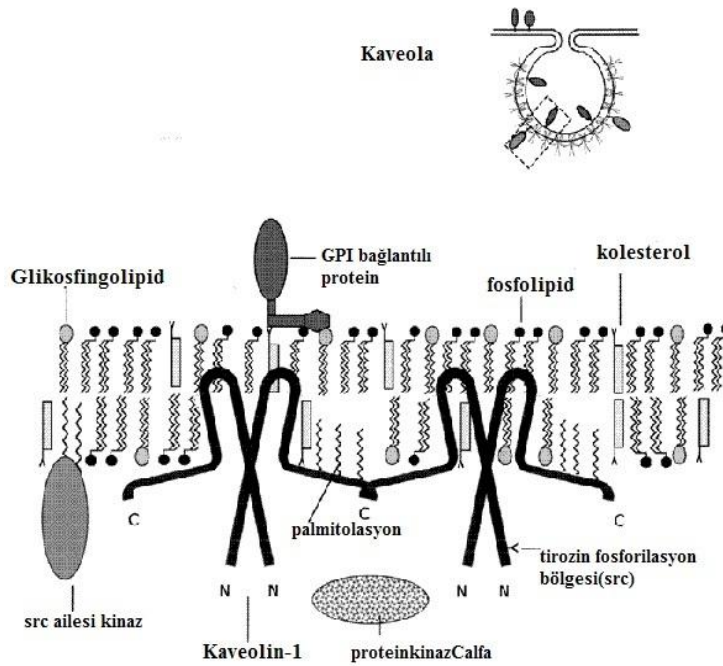
İlk kez Palade ve Yamada tarafından 50-100 nm büyüklüğünde klatrin kaplı olmayan plazmalemmal vezikülleri olarak tanımlanan kaveola, birçok hücresel fonksiyonun düzenlendiği plazma membranındaki invajinasyonlardır (40, 41).

1950'lerin başlarındaki keşfinden beri kaveola'nın fonksiyonel önemi ile ilgili birçok varsayım ileri sürülmüştür. Her ne kadar yapılan detaylı morfolojik incelemeler, bunların fonksiyonları hakkında bir fikir verse de, bu organellerin gerçek doğası ve önemi kaveolin zarf proteinlerinin keşfiyle gerçekleşmiştir (42, 43).

Kaveola ilk kez fare safra kesesi kılcal damar endotel hücreleri ve epitel hücrelerinde tespit edilmiştir. Kaveolanın adipositlerde, endotel hücrelerinde, akciğer pnömositlerinde, çizgili ve düz kas hücrelerinde bol bulunduğu rapor edilmiştir (42). Adipositlerin ultrastrüktürel analizi toplam plazma zarının %20'si kadarının kaveola tarafından işgal edildiğini göstermiştir. Böylece hücre zarında oluşturduğu girintiler

ve çıkıntılar sayesinde kaveolanın çok sayıda hücre tipinin yüzey alanını büyük ölçüde artırdığı gösterilmiştir. Bu özelleşmiş lipid salları hücre sinyalizasyonunu ve vezikül ulaşım kinetiğini hücresel fizyolojiyle son derece entegre bir biçimde sağlamıştır. Kaveola üzerindeki hücresel sinyalizasyon; sinyal molekülleri ve reseptör kümeleri ile etkin sinyal dönüşümüne imkan sağlamaktadır (Şekil 2.4.1).

Makromoleküllerin taşınması için birden fazla kaveola, trans-endotelial kanallar ve veziküler organeller oluşabilmektedir (42).



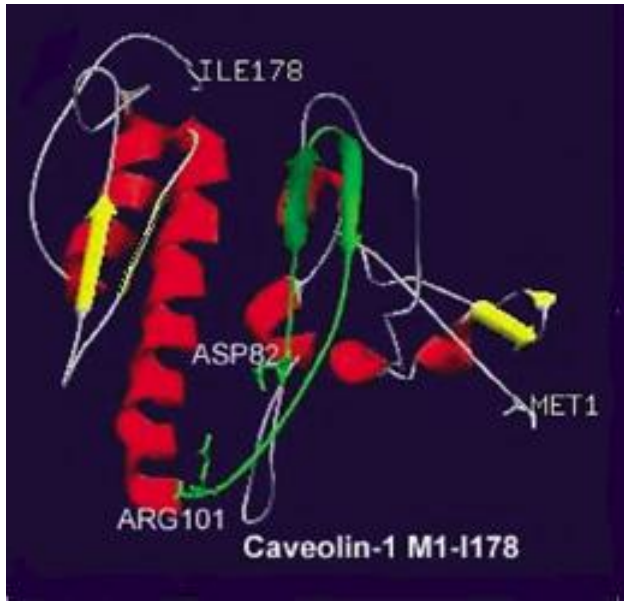
Şekil 2.4.1. Kaveolanın Yapısı (44).

Kaveola kılıf proteinleri olan kaveolinler, farklı hücre tiplerinde özel fonksiyonel rollere sahiptir. Bu kılıf proteinlerden kaveolin-1 (Kav-1), kaveolin-2 (Kav-2) ve kaveolin-3 (Kav-3), kaveolanın major yapısal komponentleridir (45).

178 amino asitten oluşan ortalama 22 kD büyüklüğünde bir integral membran proteini olarak Kav-1 ilk kez 1953'te bulunmuştur (Şekil 2.4.2) (46). Kaveolin proteini 1992 yılında Rothberg ve ark. (47) tarafından kaveolanın sitoplazmik yüzeylerinde çizgili tabaka oluşturan filamentler olarak tespit edilmiştir. Kav-1, Kav-

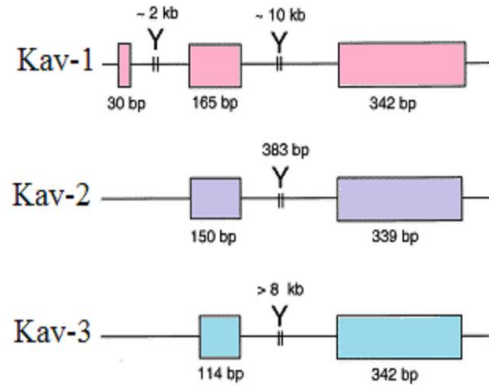
2 kardiovasküler sistemin çoğu hücre tipinde bulunurken Kav-3 özellikle düz kas, kalp ve iskelet kasında ifade edilmektedir. Kav-1 ve Kav-3 ifadesi kaveola oluşumu için gerekli iken Kav-2 ifadesi gerekli değildir. Endotelial Kav-1, kardiovasküler sistemi döşeyen endotel boyunca kaveola oluşumundan sorumludur. Kav-1, NO üretimini, mikrovasküler geçirgenliği, hücrel Ca^{+2} girişini, vasküler remodellenmeyi ve anjiogenezisi düzenlemektedir (48).

Kaveola oluşumunda Kav-2'nin rolü henüz belirgin değildir. Kav-2; akciğer endotelyumunda veya adipoz dokusunda kaveolae oluşumu için gerekli değildir ve Kav-2 neredeyse her zaman Kav-1 ile birlikte ifade edilmektedir (49). Kav-2 plazma membranına bağlı kaveola ve serin 36 fosforilasyonu ile Kav-1 ile birlikte mitozu düzenler (50). eNOS düzenlenmesi ve kaveola oluşumunda kritik bir rolü olan sarkolemmada bulunan Kav-3 çizgili kaslarda yüksek oranda ifade edilmektedir (51). Kanser, kas erimesi ve tip II diyabet dahil olmak üzere çok sayıda insan hastalıklarının patogeneğinde kaveolin gen ailesinin etkilendiğinin kanıtı artmaktadır (52, 53).



Şekil 2.4.2.Kaveolin-1'in Üç Boyutlu Yapısı (54).

Kaveolin gen ailesinin de ilk keşfedilen gen, türler arasında dizisi ve yapısı korunmuş üç ekzondan oluşan daha sonra Kav-1 olarak adlandırılan kaveolindir (Şekil 2.4.3).



Şekil 2.4.3. Kaveolin gen ailesi (53) .

Kav-1 prostat, over, böbrek kanserlerinde heterozigosite yokluğuyla ilişkili hassas bir bölge olan 7. kromozomun uzun kolunda lokalizedir (7q31.1). Bir tümör baskılayıcı gibi davranan Kav-1 yokluğunda farelerde göğüs kanseri (55), renal kalsiyum absorpsiyonu sonucu hiperkalsinüri gözlenmiştir. Kav-1 yokluğu, gözde genetik bir bozukluk olan retinitis pigmentozumun fenotipine benzer bir göz hastalığına neden olmaktadır. Kav-3 yokluğunda kardiomyopatiler ve duchenne kas distrofisi benzeri kas hastalıkları ortaya çıkabilmektedir (55, 56).

Kav-1 ve Kav-2'in kromozom üzerindeki lokalizasyonu D7S522 lokusuna yakındır. Önceki çalışmalar 7. kromozomun q31 bölgesinin delesyonunun (D7S522 mikrosatellite tekrar marker) prostat kanseri, renal hücreli kanser ve over kanseri gibi birçok neoplazi ile ilişkili olduğunu kanıtlamıştır. Bununla beraber Kav-1 D7S522 lokusundaki tümör baskılayıcı genin bir tipi gibi davranarak dokuların malign proliferasyona yönelmesini önlemektedir (55).

Kav-1 gen ifadesinin azalması göğüs ve kolon kanser hücrelerinde gösterilmiştir. Diğer yandan prostat adenokarsinom, renal hücreli karsinomunda yükselmiş Kav-1 seviyeleri rapor edilmiştir (57). Kav-1 gen ifadesindeki artışın,

prostat kanseri, akciğer adenokarsinomu ve özofagus skuamöz hücreli karsinomda kötü prognoz ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır (7).

İnsan kanser hücre hatlarında ve tümör örneklerinde Kav-1 ekspresyonu çeşitli çalışmalarda belgelenmiştir. Kav-1 ifadesi tümör tipi ve evresine bağlıdır. Birçok durumda Kav-1 ifadesinin düzenlenmesi azalırken, birçok sarkomda ve bazı adenokarsinomlarında Kav-1 ifade düzeyleri yüksek bulunmuştur (58).

2.5. Kronik Böbrek Yetmezliğinde Görülen Gen İfade Değişiklikleri

Oksidatif stres kronik böbrek yetmezliğinde önemli bir rol oynar. Reaktif oksijen türlerinin (ROT) büyük bir bölümü protein, nükleik asit ve lipidler gibi organik moleküllerde hasar riskini tetikler. Bu yüzden ROT'un uyardığı doku hasarı kronik böbrek yetmezliğinde ciddi komplikasyonlar (ateroskleroz, hipertansiyon, anemi ve erektil disfonksiyon) gelişimine katkıda bulunabilmektedir (59).

Nefronofthisis (NPHP) yaşamın ilk otuz yılında görülen KBH'nin en sık genetik nedenidir. NPHP'ye neden olan dokuz farklı resesif gende (*NPHP1-NPHP9*) mutasyon tanımlanmıştır (60).

Otozomal dominant polikistik böbrek hastalığında (ODPKBH) renal tübüler hücre farklılaşmasında önemli rol oynayan polisistin-1 ve polisistin-2 'yi kodlayan PKD1 ve PKD2 geni mutasyona uğramıştır. PKD1 genindeki iki resesif mutasyonun şiddetine bağlı olarak ergenlik veya çocukluk döneminde doğrudan KBH gelişir. ODPBH'nin moleküler genetik tanısı donör transplantasyonu ile bağlantılı olarak klinik karar verme aşamasında yardımcı olmaktadır (61).

Genetik mutasyonları çocuklarda nefrotik sendrom ve SDBY'ne neden olan *PTPRO* (protein tirozin fosfatase receptor type O) geninin keşfi böbrekte idrarla protein atılımını önleyen mekanizmaları oluşturan yapısal proteinlere bir yenisini eklenmiştir. Bu keşif genetik tanının hastalığın tedavisindeki önemini artırmıştır. Şu ana kadar tedaviye dirençli nefrotik sendromda podosit fonksiyonunu bozan genlerde (*NPHS1, NPHS2, ACTN4, TRPC6, PLCE1, CD2AP, INF2*) mutasyon saptandığında

tedavi sonlandırılması uygun bulunmuştur (62). Dializ ve böbrek nakil planlamaları yapılırken PTPRO mutasyonu saptanan hastalarda ise daha yoğun tedavinin faydalı olacağı bildirilmiştir (62).

Akut hipoksi veya toksik tübüler hasar plazma membranında kaveolin ifadesini değiştirmektedir (63). Akut tübüler hasardan sonra hücresel iyileşme süresince çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinlerinin tübüler yenilenmeye katkı sağladığı rapor edilmiştir (64).

Kronik böbrek yetmezliği ile ilişkili bir diğer gen de kronik böbrek yetmezliğindeki hastalarda ifadesinde anlamlı düşme gelişen klotho genidir (65). Anjiyotensin II'nin klotho gen ifadesinin düzenlenmesini azalttığı gösterilmiştir ve bunun hızlanmış anjiyotensin II ilişkili böbrek hasarına neden olabileceği savunulmuştur (66).

Gliserol ve iskemi aracılı böbrek hasarında akut hasar karşısında proksimal tübüllerden idrara kaveolin salınmış ve kaveolin proteinin akut tübüler hasarda kullanışlı bir belirteç olabileceği ileri sürülmüştür (67).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

Biorad-MyCycler marka PZT cihazı, Roche marka LC480 model gerçek zamanlı PZT cihazı, Denver Instrument marka terazi, Biorad marka elektroforez güç kaynağı, Jenco marka 6173 model pH metre, Hettich-zentrifugen marka micro 200 model masaüstü santrifüj cihazı, Ultra turrax T 25 model homejenizasyon cihazı, Biohit marka hassas otomatik pipetler ve uçları, Labart marka vorteks, Yellow line marka manyetik karıştırıcı

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Siklosporin A ($C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$; FW: 1202.61; Novartis, Sandimmun IV ampul), Cremofor EL (CAS:61791-12-6 Sigma-Aldrich), EDTA ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$; FW: 372.24; Sigma no: E5134), Tris Baz ($C_4H_{11}NO_3$; FW: 121.14 ; Sigma no: T6066), Borik asit (H_3BO_3 ; FW:61.83 ; Sigma no: B6768), Etidyum Bromür ($C_{21}H_{20}N_3.Br$; FW: 394.32; Sigma no: E8751), Agaroz (Sigma No: 5093), Sodyum Sitrat tribasik dihidrat ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$; FW:294.1; Sigma no: C8532), Guanidin Tiyosiyanat ($CH_5N_3.CHNS$; FW:118.16; Sigma no: G9277), Sodyum Hidroksit (NaOH; FW:40.00; Sigma no: S8045), Hidroklorik asit (HCl; FW:36.46; Sigma no: H1758-1 l), DEPC-O(COOC₂H₅)₂; FW: 162.14; sigma no:D5758), Beta-merkaptotanol (C_2H_6OS ; FW: 78.13; Sigma no: M3148), Sodyum Klorit (NaCl; FW: 58.44; Sigma no: S3014), Amonyum Sülfat ((NH₄)₂SO₄; FW132.14; Sigma no: A4915), dNTP (Invitrogen), Superscript III (Invitrogen), Primer (Operon veya Midland, Teksas, USA), Taq polimeraz (Sigma), RNA mini saflaştırma kiti (Qiagen), 1,1',3,3' tetrametoksipropan ((CH₃O)₂CHCH₂CH(OCH₃)₂; FW: 164.20; Sigma no: 102-52-3), Tiyobarbutirik asit (TBA; C₄H₄N₂O₂S; FW:144.15; Sigma no: 504-17-6), n butanol (CH₃(CH₂)₃OH;FW: 74.12; Sigma no: 71-36-3), fosforik asit(H₃PO₄ ;

FW:98.00; Sigma no: 7664-38-2), Düşük sodyumlu yem (MBD Yem Ticareti, Kocaeli)

3.3. Sıçanların Temini ve Bakımı

Bu araştırma için, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi deney hayvanları yerel etik kurulundan 09/06/2011 tarihli ve 2011/A-54 protokol no'lu kararı ile etik onay alındı. Araştırmada 8-10 haftalık dişi sıçanlar kullanıldı. Kontrol grubundaki sıçanların ağırlık ortalamaları $237,90 \pm 15,9$ gr iken (n=10) deneysel KBY grubundaki sıçanların ağırlık ortalamaları $249,80 \pm 33,5$ gr (n=9) idi. Araştırmada kullanılan dişi Wistar albino sıçanlar, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edilerek kullanıldı. Çalışma bütçesinin tamamı İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün 2011/150 no'lu projesinden karşılandı. Deney süresince sıçanlar sıcaklığın 21° C ve ortam neminin %55-60 olduğu, 12 saat ışık (08:00-20:00 saatleri), 12 saat karanlık uygulanan odalarda tutuldu ve ad libitum olarak düşük sodyumlu yemle beslendiler (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Düşük Sodyumlu Yem İçeriği

Yemi oluşturan maddeler	Yemdeki oranı
Ham Protein	%20
Ham Selüloz	%6,39
Ham Kül	%7,01
Ham Yağ	%2,90
Kalsiyum	%0,90
Total Fosfat	%0,54
Lizin	%0,96
Metionin	%0,36
Met-Cys	%0,66
Sodyum	%0,04
Metabolik Enerji(Kcal/Kg)	2650

3.4. Grupların Oluşturulması

Kronik böbrek yetmezliği modeli küçük modifikasyonlar ile Andoh ve ark. (68) metoduna göre oluşturuldu. Bütün deney süresince hayvanların ağırlıkları tartıldı. Araştırmada kullanılan sıçanlar kontrol (n=10) ve deney (n=9) grubu olarak ikiye ayrıldı. Kontrol ve deney grubundaki sıçanlar deney başlamadan 1 hafta öncesinde düşük sodyumlu yemle beslendiler (% 0,04 Na). Daha sonra sıçanlar 28 gün boyunca düşük sodyumlu yem ile beraber 1 ml hacminde günlük olarak siklosporin A'nın taşıt çözeltisi olan cremofor EL çözeltisini deri altı yolla aldılar. Deney (KBY) grubundaki sıçanlar 28 gün boyunca düşük sodyumlu yem ile beraber kg vücut ağırlığı başına 30 mg siklosporin A (Novartis, Sandimmun IV ampul) subkutan yol ile aldılar. Düşük sodyumlu yem ile besleme kronik böbrek yetmezliğini şiddetlendirmesi amacıyla kullanıldı (69).

3.5. Dokuların Alınması ve Örneklerin Analizleri

Deney sonunda kontrol ve deney grubundaki hayvanlar ksilazin-ketamin anestezisi altında (ketamin hidroklorür, Parke- Davis. Eczacıbaşı, İstanbul, 75 mg/kg ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorid Rompun, Bayer İlaç) dekapite edildi ve böbrek dokuları alındı. Kaveolin mRNA seviyelerinin tespiti için, gruplardan alınan böbrek dokuları, steril şartlarda ve buz üzerinde küçük parçalar halinde kesildi ve RNA saklama çözeltisi içinde -35° C derin dondurucuda analiz gününe kadar saklandı. Bu dokulardan Qiagen firmasının ürettiği RNeasy mini kit kullanılarak toplam RNA saflaştırılması yapıldı ve gerçek zamanlı PZT da grupların gen ifadesi ölçüldü. Geri kalan dokulardan spektrofotometreyle MDA analizi yapıldı. Deney başlangıcında ve sonunda hayvanlardan alınan kanların serumlarından kan üre nitrojen (BUN) ve kreatinin değerleri otoanalizatörde ölçüldü.

3.6. Kullanılan Çözelti ve Tamponlar

3.6.1. Kontrol Grubu Taşıttının Hazırlanması

2 ml cremophor EL solusyonu 1 ml %33'luk etanol ile karıştırıldı. Bu karışım %0,9 NaCl ile 1:5 oranında dilue edilip 28 gün boyunca taşıt grubundaki sıçanlara her gün 1 ml deri altı olarak uygulandı (70).

3.6.2. Siklosporin A'nın hazırlanması

Her 1 ml'de 50 mg siklosporin A içeren ampul üzerine % 0,9 NaCl eklenerek 1:5 oranında dilue edildi. Hazırlanan bu stok çözelti sıçanlara kg başına 30 mg siklosporin A olacak şekilde deri altı olarak uygulandı (70).

3.6.3. RNA Saklama Solüsyonu

70 gr Amonyum Sülfat 100 ml dietilpirokarbonat (DEPC)'lı suda çözüldü. Üzerine 10 mM EDTA (pH=8) ve 25 mM Sodyum Sitrat (pH=5,2) eklenip DEPC'li ile işlenmiş bidistile su ile 150 ml'ye tamamlandı ve pH 5,2'ye ayarlandı.

3.6.4. RNA Denatüre Solüsyonu (RLT Çözültisi)

4M Guanidin Tiyosiyanat, 25 mM Sodyum Sitrat (pH=7), % 0,5 Sarkosil içeren çözelti hazırlandı ve kullanımdan hemen önce son konsantrasyon % 1 olacak şekilde beta-merkaptöetanol eklendi.

3.6.5. 5X TBE Çözeltisinin Hazırlanması

0,4 M Tris baz, 0,4 M Borik asit, 20 mM EDTA bu tamponun hazırlanmasında kullanıldı. 1000 ml 5X TBE çözeltisi hazırlamak için 54 gr Tris baz, 27,5 gr Borik asit, 20 ml 0,5 M EDTA çözeltisi hazırlanarak 900 ml bidistile su içerisinde manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Çözelti pH 8,0 oluncaya kadar HCl eklendi. Çözeltinin toplam hacmi 1000 ml'ye tamamlandı.

3.7. Total RNA Saflaştırması (Qiagen Kit Protokolü)

Bu işlem için Qiagen RNA mini saflaştırma kiti, aşağıda verilen şekliyle kullanıldı. Yaklaşık 100 mg doku parçası alındı ve % 5 (w/v) doku olacak şekilde RLT çözeltisi içine kondu. Numune homojenizatörde 13.500 rpm hızda, buz üzerinde 1 dakika homojenize edildi. Homojenattan 600 µl alındı, 10 dakika 18.000 rpm'de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantanta %70 etanol (DEPC'li bidistile su ile hazırlandı) eklendi. Çözeltinin 600 µl'si filtreye kondu ve altındaki tüple beraber 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Kite bulunan RWI solüsyonundan 700 µl eklendi ve 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. 500 µl RPE solüsyonu ilave edildi ve 15 saniye 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Tekrar 500 µl RPE eklendi ve 2 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edildi. 50 µl RNAaz içermeyen bidistile su eklendi ve 1 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Bu basamak tekrarlanarak 50 µl RNAaz içermeyen bidistile su konularak tekrar 1 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edildi, alt tüpteki saf toplam RNA hemen -35 °C'de saklandı.

3.8. RNA'nın Agaroz Jele Yükleme İşlemleri

Böbrek örneklerinden saflaştırılan toplam RNA'lar, %1'lik agaroz jel üzerinde, elektroforezde 100 mV'da koşturuldu. 28S ve 18S keskin ribozomal RNA bantlarının elde edildiği ve herhangi bir yıkımın olmadığı RNA'lar cDNA işleminde kullanıldı (Şekil 4.3.1.). Örneklerin RNA miktarları spektrofotometrede 260 nm UV

spektrumda okundu. RNA miktar hesaplanmasında 260 nm deki OD x Sulandırma faktörü x 40/1000 formülü kullanıldı. RNA miktarı $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ cinsinden bulundu.

3.9.cDNA Sentez Protokolü

cDNA sentezi için Invitrogen firmasının ürettiği SuperScript III ters transkriptaz enzim kiti kullanıldı. cDNA sentezi firmanın önerdiği şekilde yapıldı. Kısaca, 100 μl 'lik PZT tüpüne 1 μg toplam RNA, 1 μl primer (4 pmol gen spesifik primer veya 100 pmol PoliT-18 primeri), 1 μl dNTP (10 mM) ve toplam hacim 13 μl olacak şekilde ddsu eklendi, karıştırıldı ve 65 °C'de 15 dakika PZT makinesinde ısıtıldı. Bu karışım üzerine 4 μl 5x First Strand tamponu, 2 μl DTT, 1 μl ddH₂O, 1 μl SuperScript III ters transkriptaz enzimi eklendi ve karıştırıldı ve PZT makinesinde 50 °C'de 60 dakika ve 70 °C'de 15 dakika ısıtıldı, daha sonra da -20 °C de analize kadar saklandı.

3.10. Gerçek Zamanlı PZT Protokolü

Gerçek zamanlı PZT cihazı Roche LC480 modeli olduğu için ROCHE gerçek zamanlı 2x "syber green" boyası içeren PZT kit karışımı (Roche 04707516001) kullanıldı ve veriler $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ metoduna göre analiz edildi. Reaksiyonlar 20 μl toplam hacimde yapıldı. Bunun için 10 μl SYBR Green I ana karışımı (Enzim, dNTP, Mg, tampon ve su), 1 μl cDNA, 1 μl ileri ve 1 μl geri primerler (10 pmol/ μl) ve 7 μl bidistile su olacak şekilde hazırlandı. Primerlerin optimizasyonu sonrası PZT şartları; ilk denatürasyon, 10 dakika 95 °C, denaturasyon 20 saniye 95 °C, bağlanma 60°C'de 20 saniye ve polimerizasyon 70°C'de 30 saniye olarak oluşturuldu ve döngü sayısı 45 olarak kullanıldı. Tüm gerçek zamanlı PZT çalışmaları, kantitatif doğruluğunu sağlamak için aynı gün içinde üç kopya halinde yapıldı.

Tablo 3.10' de dizilimleri ve büyüklükleri verilen primerler kaveolin gen ifadesinin analizinde kullanıldı (71).

Tablo 3.10. Primer dizilimleri

Genler	Primer dizilimleri	Ürün büyüklüğü (bp)
β -Aktin-ileri	5'-CATCACTATCGGCAATGAGC-3'	159
β -Aktin-geri	5'-GACAGCACTGTGTTGGCATA-3'	
Kaveolin-ileri	5'-TCTACAAGCCCAACAACAAGG-3'	304
Kaveolin-geri	5'-AGGAAAGAGAGGATGGCAAAG-3'	

3.11. Biyokimyasal Analizler

3.11.1 MDA Analizi

Lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA, Uchiyama and Mihara'nın yöntemine göre çalışıldı (72). Sıçan böbrek numunesi, % 1,15'lik KCl çözeltisi içinde, % 10'luk homojenat oluşturacak şekilde, 15000 devir/dakikada, 1 dakika süreyle buz üzerinde homojenize edildi. Bu homojenat doğrudan MDA analizinde kullanıldı.

Tablo 3.11.1. Analizin yapılışı

	Numune
Homojenat	250 μ l
% 1'lik fosforik asit	1500 μ l
% 0,6'lık TBA	1500 μ l

Hazırlanan çözeltiler deney tüplerine eklendi, vortekslendi ve tüpler kaynar suda (en az 95 derecede) 1 saat bekletildi. Çeşme suyunda soğutulan tüplere 2 ml n-butanol eklendi ve 5 dakika boyunca vortekslendi. Daha sonra numuneler 3000xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Spektrofotometrede süpernatantın absorbansı butanol körüne karşı 535 nm ve 520 nm'de okunarak, numunelerin MDA konsantrasyonları 1,1',3,3' tetrametoksipropan ile hazırlanan standart grafikten değerlendirildi ve sonuç nmol/gram yaş doku (gyd) olarak gösterildi.

3.11.2. Serum Üre ve Kreatinin Analizleri

Hayvanlardan alınan kan örnekleri oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi, santrifüjde 3,000 rpm de 15 dakika santrifüj edilerek numunelerin serumlarının her hangi bir antikoagülan içermemesine dikkat edilerek serum ayrıldı. Daha sonra elde edilen bu serumlardan üre ve kreatinin seviyeleri, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya laboratuvarında, Abbott Architect c8000 otoanalizatöründe ölçüldü (Abbott Laboratories. Abbott Park, Illinois, U.S.A.).

3.12. İstatistiksel Analizler

İstatistik incelemede, SPSS for Windows 9.05 istatistik paket programı kullanıldı. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediği öncelikle Shapiro-Wilk testiyle değerlendirildi ve verilerin normal dağılıma sahip olduğu tespit edildi ($P > 0,05$). Gen ifadelerinin ve böbrek MDA değerlerinin istatistikî karşılaştırılmaları bağımsız örneklem t testi ile yapıldı. Hayvanların deney öncesi ve sonrası ağırlık, serum BUN ve kreatinin değerlerinin istatistikî karşılaştırılması eşli t testi ile yapıldı. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak verildi. P değerinin 0,05 den küçük olduğu değerler istatistikî olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

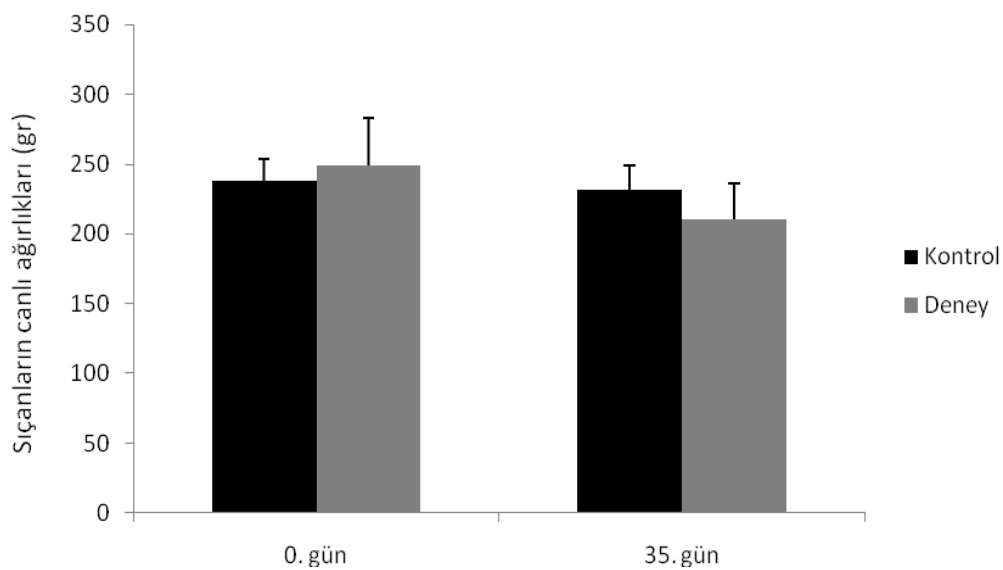
4.1. Hayvanların Ağırlık Değerleri

Deney başlangıcı (0. Gün) ve deney sonunda (35. Gün) kontrol grubu sıçanların vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında istatistikî olarak herhangi anlamlı bir fark tespit edilemedi ($P > 0,05$). Deneysel KBY oluşturulan gruptaki hayvanlarda ise 0. gün ve 35. gün vücut ağırlıkları arasında istatistikî karşılaştırma yapıldığında KBY grubundaki hayvanların vücut ağırlıklarının 35. günde, 0. güne göre anlamlı bir azalma gösterdiği tespit edildi ($P < 0,05$) (Tablo 4. 1).

Tablo 4.1.Gruplarda ölçülen sıçanların ağırlık değerleri (gr).

Günler	Gruplar (ort ± ss)	
	Kontrol (n=10)	Deney(n=9)
0.gün	237,90 ± 15,9 ^a	249,80 ± 33,5 ^a
35.gün	231,22 ± 17,9 ^a	210,22 ± 25,2 ^b

Sütunlarda birbirinden farklı olan harfler istatistiki olarak birbirlerinden anlamlı farklılığı ifade eder ($P < 0,05$).



Şekil 4.1.Kontrol ve deney grubu sıçanların ağırlıkları (gr).

4.2. Biyokimyasal Bulgular

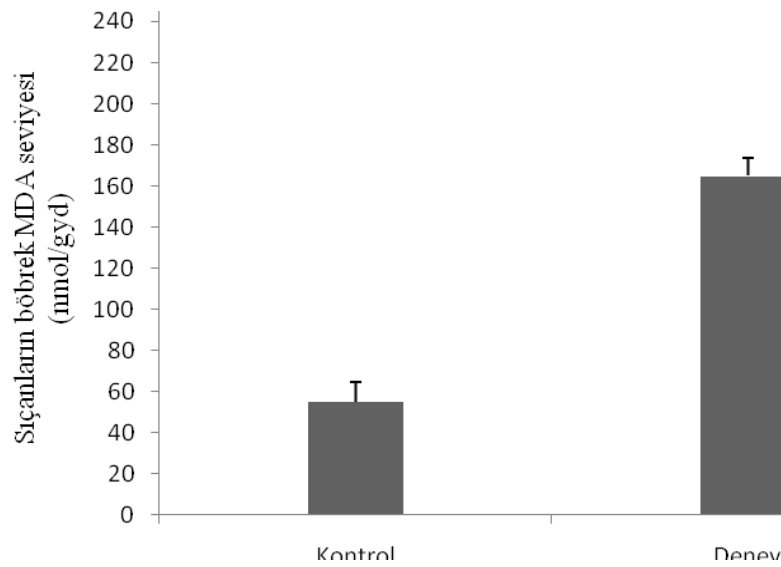
4.2.1. Böbrek MDA seviyesi

Deney grubu hayvanların böbrek MDA değerlerinin kontrol grubu hayvanların böbrek MDA seviyesine göre istatistikî olarak anlamlı bir artış gösterdiği tespit edildi ($P < 0,05$). (Tablo 4.2.1).

Tablo 4.2.1. Gruplarda ölçülen MDA değerleri (nmol/gyd).

Gruplar	MDA (ort ± ss)
Kontrol (n=10)	54,52± 10,1 ^a
Deney(n=9)	165,09±8,3 ^b

Sütunlarda birbirinden farklı olan harfler istatistiki olarak birbirlerinden anlamlı farklılığı ifade eder ($P < 0,05$).



Şekil 4.2.1. Kontrol ve deney grubu sıçanların böbrek MDA seviyeleri.

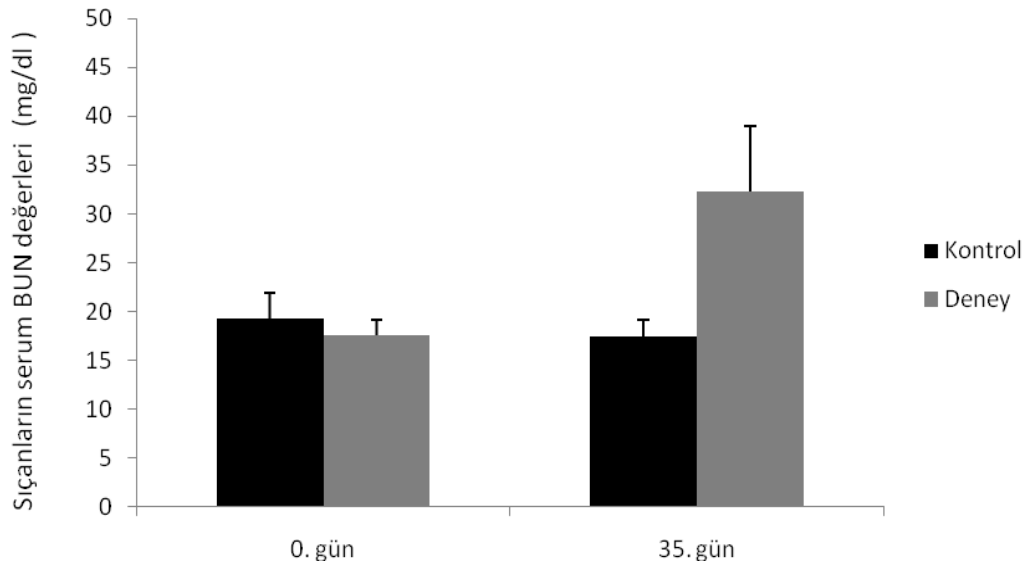
4.2.2. Hayvanların Serum BUN Değerleri

Kontrol grubu hayvanların 0. gün ve 35. gün'de serum BUN değerleri karşılaştırıldığında istatistikî olarak herhangi anlamlı bir fark tespit edilemedi ($P > 0,05$). Deneysel KBY oluşturulan hayvanlarda ise 0. gün ve 35. gün serum BUN değerleri arasında istatistikî karşılaştırma yapıldığında KBY grubundaki hayvanların serum BUN değerlerinin 35. günde, 0. güne göre anlamlı bir artış gösterdiği tespit edildi ($P < 0,05$) (Tablo 4. 2.2).

Tablo 4.2.2.Gruplarda ölçülen serum BUN değerleri (mg/dl).

Günler	Gruplar (ort ± ss)	
	Kontrol (n=10)	Deney(n=9)
0.gün	19,25± 2,7 ^a	17,55 ± 1,6 ^a
35.gün	17,50 ± 1,6 ^a	32,22 ± 6,7 ^b

Sütunlarda birbirinden farklı olan harfler istatistiki olarak birbirlerinden anlamlı farklılığı ifade eder ($P < 0,05$).



Şekil 4.2.2.Kontrol ve deney grubu sıçanların serum BUN değerleri (mg/dl).

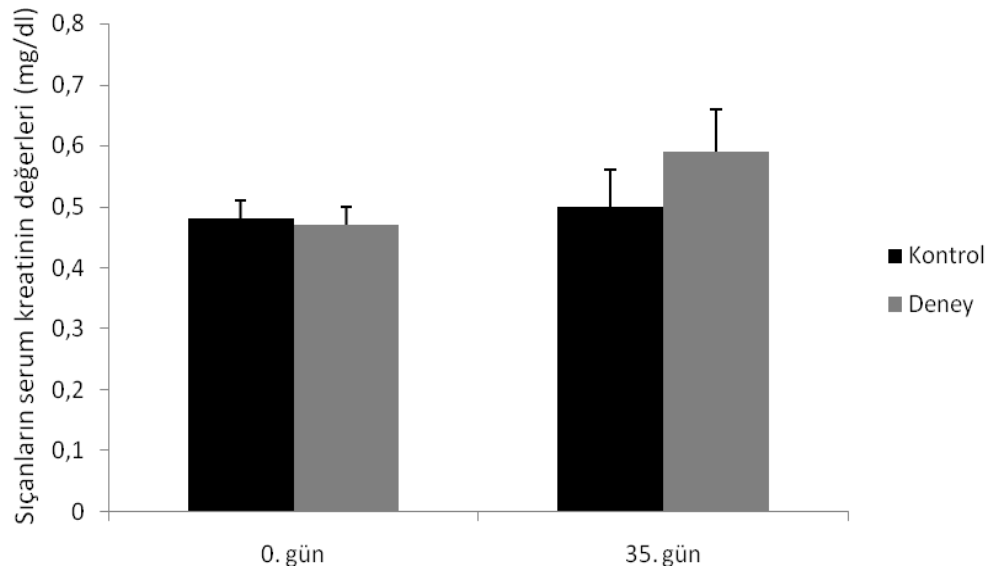
4.2.3. Hayvanların Serum Kreatinin Değerleri

Kontrol grubu sıçanların serum kreatinin değerlerinde 0. gün ve 35. gün arasında istatistikî olarak herhangi anlamlı bir fark tespit edilemedi ($P > 0,05$). Deneysel KBY oluşturulan hayvanlarda ise 0. gün ve 35. gün serum kreatinin değerleri arasında istatistikî karşılaştırma yapıldığında serum kreatinin değerlerinin 35. günde, 0. güne göre anlamlı bir artış gösterdiği tespit edildi ($P < 0,05$) (Tablo 4.2.3).

Tablo 4.2.3 Gruplarda ölçülen serum Kreatinin değerleri (mg/dl).

Günler	Gruplar (ort ± ss)	
	Kontrol (n=10)	Deney(n=9)
0.gün	0,48± 0,03 ^a	0,47 ± 0,03 ^a
35.gün	0,50 ± 0,06 ^a	0,59 ±0,07 ^b

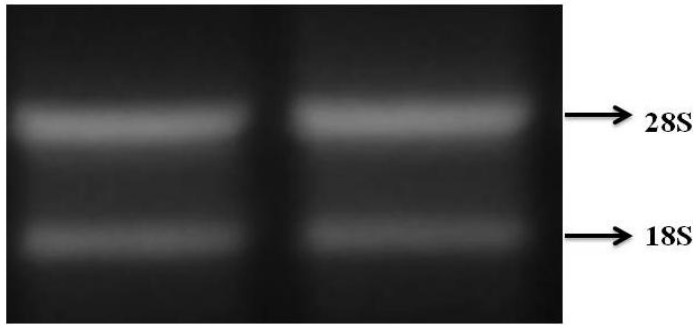
Sütunlarda birbirinden farklı olan harfler istatistiki olarak birbirlerinden anlamlı farklılığı ifade eder ($P < 0,05$).



Şekil 4.2.3.Kontrol ve deney grubu sıçanların serum kreatinin değerleri (mg/dl)

4.3. Moleküler Genetik Bulgular

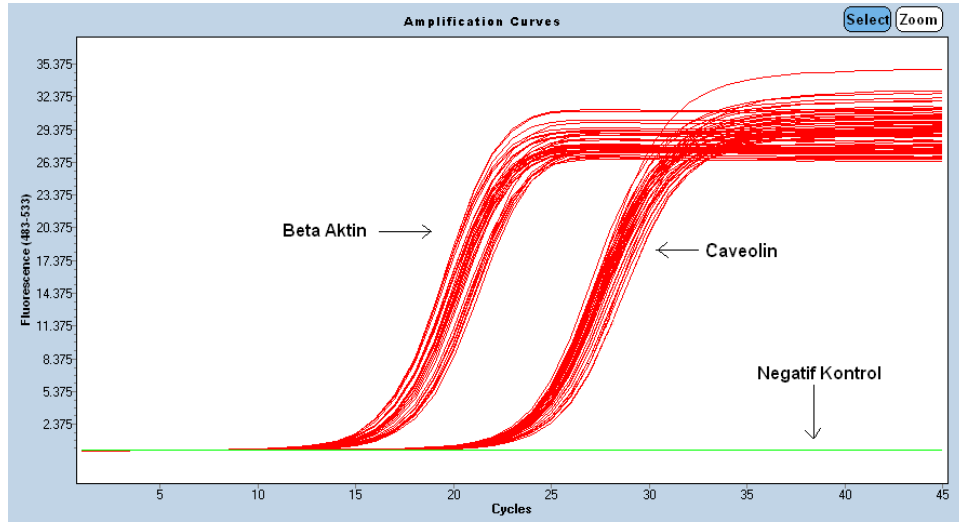
RNA'lar saflaştırıldıktan sonra %1 lik agaroz jele yüklenerek incelendiler. Şekil 4.3.1.'de her gruptan seçilen saflaştırılmış RNA'ların %1'lik agaroz jelde koşturulmuş resmi görülmektedir. Şekilde de görüldüğü üzere saflaştırılan RNA'larda herhangi bir yıkılım olmadığı gibi; 28S ve 12S'lik iki ribozomal bant da büyük saflıkta elde edildi (Şekil 4.3.1) .



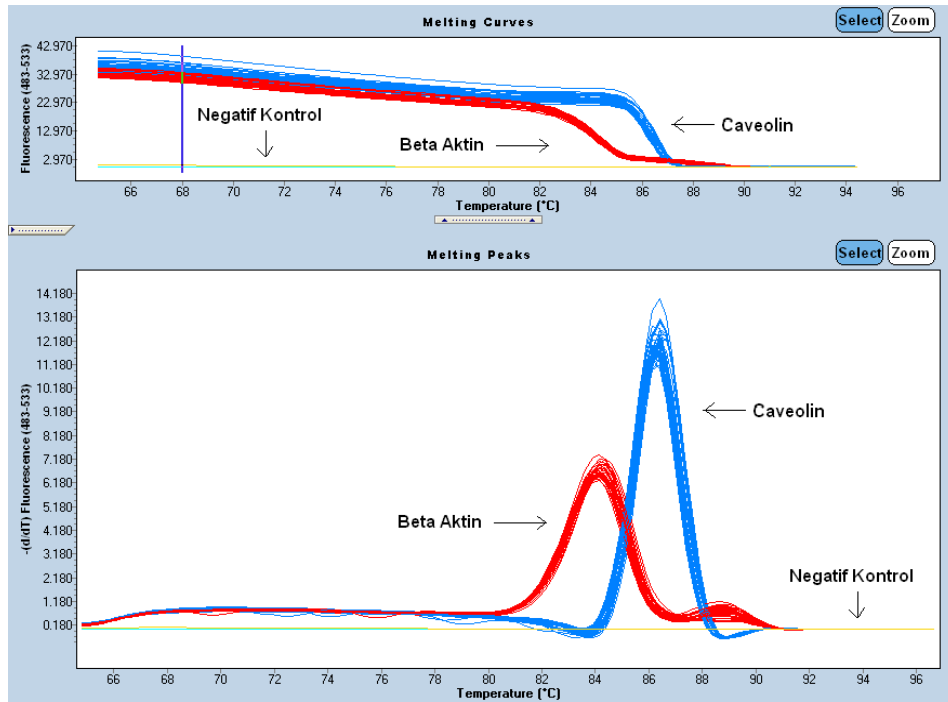
Şekil 4.3.1. Qiagen RNeasy saflaştırma kiti ile böbrek örneklerinden saflaştırılan toplam RNA'nın UV-transilluminatör altındaki jel görüntüsü (% 1 agaroz jel).

Poly-T18 primeri kullanılarak tüm örneklerden cDNA sentezi gerçekleştirildi. Bir sonraki basamakta da, β –aktin ve kaveolin genlerine özgü primerler kullanılarak gerçek zamanlı PZT ile kaveolin gen ifadesindeki değişim β –aktin genine oranla belirlendi. Daha sonra da kontrol grubu ve deney grubu kaveolin/ β –aktin gen ifadeleri karşılaştırıldı. (Şekil 4.3.2).

A)

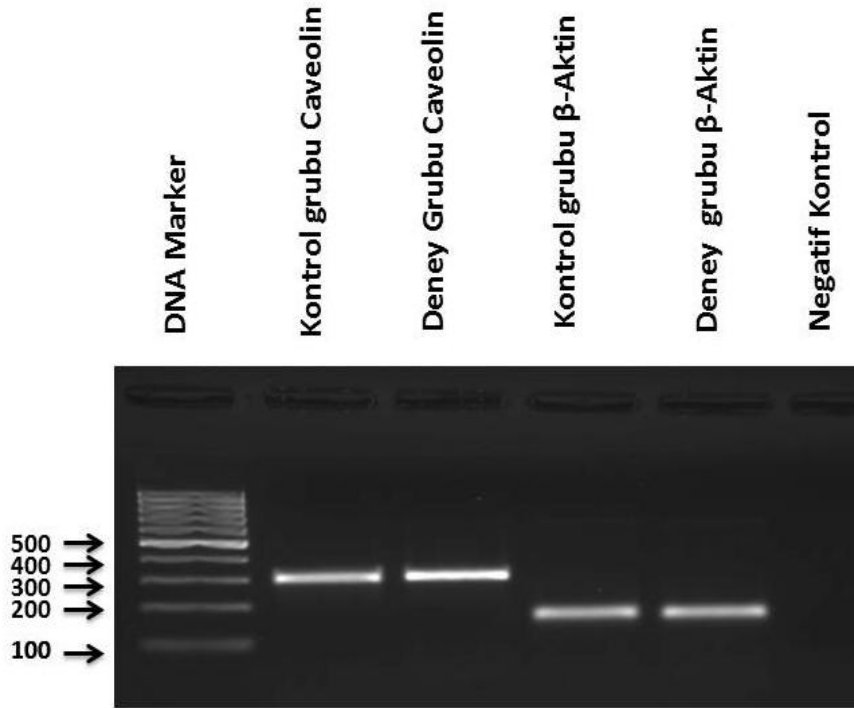


B)



Şekil 4.3.2. Kaveolin gen ifadesinin gerçek zamanlı PZT ile analizi. 'SYBR Green' kimyası kullanılarak deneysel KBY grubunun ve kontrol grubunun β -aktin ve Kaveolin mRNA'larından sentezlenen cDNA'ların gerçek zamanlı PZT ile çoğaltımı sırası çoğaltım (A) ve erime eğrileri (B).

β -aktin ve kaveolin'lerin cDNA'ları kullanılarak yapılan gerçek zamanlı PZT sonrası Agaroz jelinde örnekler koşturularak primer bağlanmasının özgülüğü kontrol edildi. Analiz sonucunda her iki gen için de tek ve istenilen boyda bir DNA bandı oluşturduğu görüldü (Şekil 4.3.3).



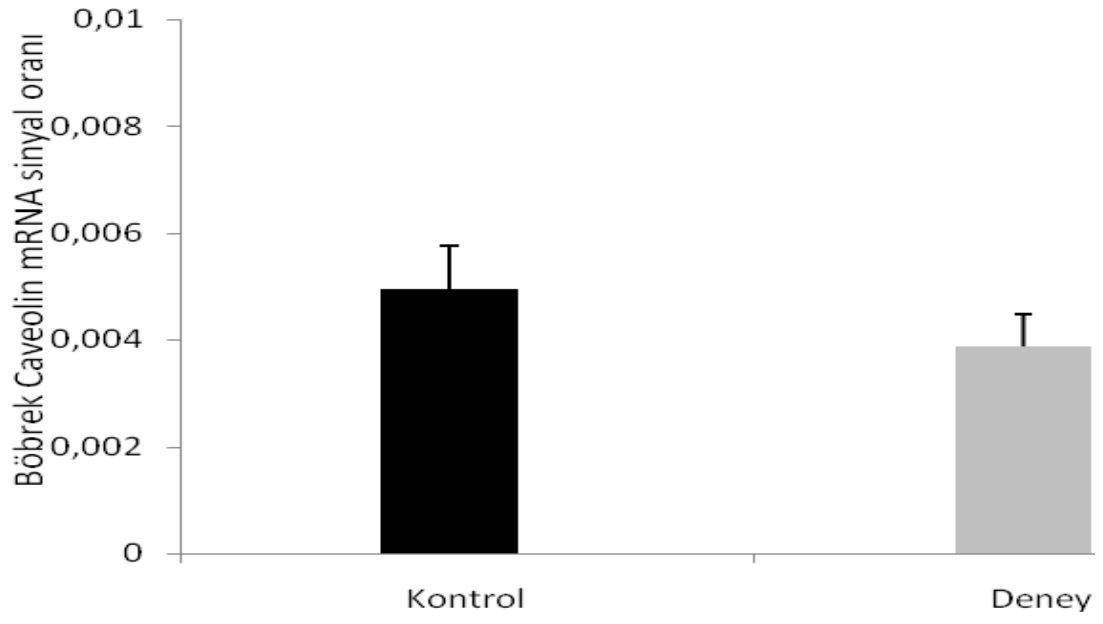
Şekil 4.3.3. β -aktin ve Kaveolin'lerin cDNA'larının PZT'deki çoğaltımının agaroz jel elektroforezi. Kullanılan DNA Markeri 100 bp DNA Markeri'dir (Fermentas).

Kontrol ve KBY grubu sıçanların böbrek Kaveolin/ β -aktin mRNA seviyeleri karşılaştırıldığında, KBY grubu Kaveolin/ β -aktin mRNA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi ($P < 0,05$).

Tablo 4.3. Gruplarda ölçülen böbrek Kaveolin/ β Aktin mRNA seviyelerinin oranı.

Gruplar	Kaveolin/ β Aktin (ort \pm ss)
Kontrol (n=10)	0,00496 \pm 0,0008 ^a
Deneysel (n=9)	0,00387 \pm 0,0006 ^b

Sütunlarda birbirinden farklı olan harfler istatistiki olarak birbirlerinden anlamlı farklılığı ifade eder ($P < 0,05$).



Şekil 4.3.4. Kontrol ve deney grubu sıçanların böbrek kaveolin mRNA seviyeleri oranları.

5.TARTIŞMA

Bu tezde, sıçanlarda düşük sodyum diyeti destekli CsA ile oluşturulan deneysel kronik böbrek yetmezliği modelinde, böbrek Kav-1 gen ifadesi, böbrek MDA seviyesi ve serum kreatinin ve kan üre nitrojeni değerlerinin incelenmesi amaçlandı. Araştırmamızda hayvanlar kontrol ve deney olmak üzere iki gruba ayrıldılar. 35 günlük deney süresinin sonunda kontrol grubuna göre deneysel kronik böbrek yetmezliği olan grubun böbrek Kav-1 gen ifadesinin istatistiki olarak anlamlı seviyede azaldığı ($p < 0,05$), böbrek MDA değerlerinin kontrol grubuna göre deney grubunda anlamlı bir artış gösterdiği ($p < 0,05$), serum kreatinin ve kan üre nitrojenin ise deney grubunda anlamlı olarak yükseldiği ($p < 0,05$) tespit edildi.

Kaveolinler; kaveolayı oluşturan ve mezenkimal, epitelyal ve nöronal dokularda ifade edilen kaveolanın temel yapısal proteinlerindedir (58). Kaveolalar, hücre membranının %20'sini oluşturan küçük şişe benzeri girintilerdir. Kaveola kolesterol taşınımı, konakçı hücelere patojenlerin girişinde kullandığı yol olan klatrin bağımsız endositoz gibi hücresel transport süreçlerinde aracılık etmektedir. Hücresel kaveolalar enzimlerin fonksiyonu ve reseptör sinyalizasyonun düzenlenmesini sağlar (73). Kaveolinler, farklı hücre tiplerinde özel fonksiyonel rollere sahiptir. Kaveolinlerin, Kav-1, Kav-2 ve Kav-3 olmak üzere üç tipi bulunmaktadır (45). Kav-1 ifadesi özellikle insan böbreğinin distal tübülünde ve pariyetal endotel hücrelerinde tanımlanmaktadır. Aynı zamanda Kav-1 ifadesinin kapiller tübül şekillenmesiyle ilişkili olduğu da saptanmıştır (74). Taugner ve ark. (75) jukstaglomerüler hücrelerde renin granüllerinin kaveolin içerdiğini bildirmişlerdir. Kav-1 iç plazma membranında çoklu sinyal moleküllerinin aktivitesinin düzenlenmesinde elzem bir molekül olup (76), hücre sinyalizasyonunu, doğrudan protein etkileşimiyle reseptör düzeyinde veya gen ifadelerini transkripsiyonel düzeyde transkripsiyon faktörleriyle kontrol eder. Her2/neu/ErbB2/ras/raf/ERK kaskadı gibi büyüme faktörlerini içeren birçok reseptör, proinflamatuvar sitokinler, sitozolik tirozin kinazlar, nitrik oksit sentaz (NOS), G-proteinleri Kav-1 etkileşimiyle inhibe olmaktadır. Bu etkileşim sonrası proliferasyon, vazodilatasyon ve inflamasyon sınırlandırılmaktadır (58). Kav-1, IGF-

I/Insulin/PI3/AKT'nin posttranskripsiyonel regülasyonunu ve nükleer faktör kappaB (NF-κB) sinyal yolağı gibi birçok antiapoptotik yolakları (58) ve epidermal büyüme faktör reseptörünün (EGFR) tirozin kinaz aktivitesini de düzenlemektedir (77). Kav-1 aynı zamanda bir tümör baskılayıcı veya birçok farklı tümörde promotör gibi davranmaktadır. Muhtemelen tümör gelişim boyunca farklı etkileşim partnerleri olduğundan dolayı bu şekilde davrandığı bildirilmiştir (76). Kav-1'in in vivo olarak tümörlerde doku ve safha spesifik düzenleyici rol oynadığı öne sürülmektedir (76). Kav-1 hücrel yaşlanmayı düzenlemesiyle hücre dönüşümü ve tümör oluşumu üzerinde negatif düzenleyici olarak görev yaparken, aynı zamanda prostat kanserinin oluşumuna neden olabileceği, bu farklılıkların plazma membranında veya sitoplazmada bulunan Kav-1'in lokalizasyonu ile alakalı olduğu ileri sürülmüştür (78). Kav-1 birçok protoonkogenin fonksiyonel sinyalizasyonunu inhibe ederek hücrelerin transformasyon süreçlerini sekteye uğratan bir tümör baskılayıcı protein olarak da görev yapmaktadır (79).

Yapılan çeşitli araştırmalarda böbrek yetmezliğinde Kav-1 ifadesindeki değişimler incelenmiştir. Araştırma bulgularımıza benzer olarak, Bai ve ark. (80) sıçan böbreğinde NOS, Kav-1, AKt, çözünebilir guanilat siklaz ifadeleri üzerine renal hasar uyarılı nörojenik hipertansiyon modelinin etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, sıçanlara tek doz fenol enjekte ederek hipertansiyon modeli oluşturmuşlar ve hipertansif böbrekte Kav-1 ifadesinde önemli bir azalış tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, Kav-1 ifadesindeki azalmanın nedenini tam olarak açıklayamamışlardır.

Yine bir başka çalışmada, Yang ve ark. (76) kalsiyum düzeyinin Kav-1 gen ifadesine transkripsiyonel seviyede olan etkilerini incelemişlerdir. Araştırmacılar, BALB/c farelerden yüksek miktarda Kav-1 gen ifadesine sahip olan FBJ-S1 virüs indüksiyonlu metastatik fare osteosarkom hücre hatları hazırlamışlardır. Yüksek seviyede Kav-1 ifade eden FBJ-S1 hücrelerini kalsinörün inhibitörü olan siklosporin A ile muamele ettiklerinde, bu hücrelerde Kav-1 gen ve Kav-1 protein ifadelerinin azaldığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu bulguyla kaveolin-1 gen ifadesinin pozitif olarak transkripsiyonel seviyede L-tipi kalsiyum kanal / Ca^{+2} / kalsinörün /

NFAT aracılı yeni bir kalsiyum sinyal yolağı ile düzenlenebileceğini ifade etmişlerdir.

Li ve ark. (102) sıçanlarda kalıtsal obezitenin böbrek NO sentaz, Kav-1, Akt, Guanilat siklaz ve kalmodulin ifadeleri üzerine etkilerini incelemek amacıyla 22 haftalık erkek obez olan ve olmayan sıçanları kullanmışlar, western blot analizi sonucunda Kav-1 böbrek protein ifadesinin ve böbrek doku eNOS ve nNOS ifadelerinin obez sıçanlarda azaldığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar obez sıçanlarda albuminuri tespit etmişler ve böbrek glomerulosklerozun oluştuğunu ortaya koymuşlardır.

Bizim araştırma sonuçlarımızdan farklı olarak, Sindhu ve ark. (81) deneysel kronik böbrek yetmezliği modelinde kronik böbrek yetmezliğinin böbrek Kav-1 protein ifadesine olan etkilerini araştırmak amacıyla, sıçanların sol böbreğinin 5/6'sı aldıktan 4 gün sonra sağ böbreklerini alarak kronik böbrek yetmezliği oluşturmuşlardır. Altı hafta takip edilen sıçanların böbrek, torasik aorta ve karaciğer dokularında immunoblot analiziyle Kav-1 proteinin arttığını kalp dokularında ise değişmediğini tespit etmişlerdir. Çalışma sonunda kronik böbrek yetmezliği grubundaki sıçanların ağırlıklarının (358 ± 8) kontrol grubuna (404 ± 5) kıyasla önemli miktarda azaldığını, kronik böbrek yetmezliği grubundaki sıçanların plazma kreatinin düzeylerinin (0.77 ± 0.05) kontrol grubuna (0.47 ± 0.01) göre önemli miktarda yükseldiğini bulmuşlardır. Araştırmacılar kronik böbrek yetmezliğinin Kav-1 protein seviyesinde bir artışa neden olduğunu, artan Kav-1 proteinin eNOS'u inhibe ettiğini ve böylece NO miktarını azalttığını ve bunun sonucunda da böbrek yetmezliğinde meydana gelen hipertansiyona ve kardiovasküler hastalıklara neden olabileceğini bildirmişlerdir.

İskemik akut böbrek yetmezliği patogeneğinde Kav-1 rolünü araştırmak amacıyla yapılan bir başka araştırmada, sıçanlarda in vivo oluşturulan otuz dakika bilateral renal iskemiye takip eden reperfüzyon modeli oluşturulmuş ve Kav-1 ve tübüler hasar arasındaki ilişki incelenmiştir. Bu araştırmada Kav-1 protein ifadesi immunohistokimyasal ve immunoblot yöntemiyle incelenmiş, iskemik renal yetmezliği olan hayvanların böbreklerinin hasarlanmış proksimal tubullerinde Kav-1 protein ifadesinin arttığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar, apoptotik hücrelerde çok

yoğun Kav-1 protein ifadesine rastlanmasından dolayı, akut böbrek yetmezliğinde hücre hasarının artan Kav-1 protein ifadesine bağlı olarak membran adhezyon kaybı, apoptozis veya nekrozis nedeniyle hücre ölümünden kaynaklanabileceği yorumunu getirmişlerdir (82).

Bir başka araştırmada ise sıçanların böbrek proksimal tübüllerinde çok düşük bazal seviyedeki Kav-1 ve Kav-2 ifadelerinin, gentamisin enjeksiyonuna cevap olarak önemli derecede arttığı ortaya konulmuştur (83). Bu araştırmaların bizim çalışmamızdan farklılık göstermesinin nedeni hepsinin de akut dönemde böbrek hasarları modellenmesi yapmış olmalarından ve Kav-1 ifadesini yalnızca protein kaynaklı ölçmüş olmaları nedeni ile olabilir.

Kav-1 gen ifadesinin üç bağımsız yolak ile transkripsiyonel seviyede düzenlenmesinin azaldığı bildirilmiştir. Bu yollar Ras-p44/42 MAPK, reseptör olmayan tirozin kinazlar ve protein kinaz A'dır. Kav-1 ifadesi bir mitojen sensitif promotörün bazal transkripsiyonel aktivasyonu ve Ras/MAPK aracılı olarak inhibe edilebilmektedir. Kav-1 gen ifadesi doğrudan p44/42 MAP kinaz kaskadının aktivasyonu ile düzenlenmektedir (84). Araştırmamızda azalan Kav-1 gen ifadesi, hücre içi artan Ras-p44/42 MAPK aktivitesinden veya PKA aktivitesinden kaynaklanmış olabilir. Engelman ve ark. (84) H-Ras (G12V), v-Abl, ve v-Src- ile dönüşmüş NIH 3T3 ve CHO hücrelerinde Kav-1 ifadesinin düzenlenmesi ile ilgili yaptıkları araştırmada, Ras veya Raf ile transforme olmuş NIH 3T3 hücrelerini MEK inhibitörleriyle (PD 98059) muamele ederek Kav-1 protein ifadesini araştırmışlardır. Aynı zamanda bu çalışmada araştırmacılar v-src ve v-abl ile transforme olmuş NIH 3T3 hücrelerini de bu inhibitörlerle muamele etmişlerdir. H-Ras ve K-Ras ile transforme olmuş NIH 3T3 hücrelerinin MEK inhibitörü ile muamele edilmesi Kav-1 ifadesini tekrar düzenlerken v-src ve v-abl ile transforme edilmiş NIH 3T3 hücrelerinin MEK inhibitörüyle muamele edilmesinin Kav-1 ifadesini tekrar düzenlemediğini tespit etmişlerdir. H-Ras (G12V) ile dönüşmüş NIH 3T3 hücreleri, MEK inhibitörü olan PD 98059 ile muamele ettiklerinde Kav-1 ifadesinin arttığını ve p44/42 MAP kinaz aktivasyonu inhibe edildiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu çalışmanın sonucunda azalan Kav-1 ifadesinde iki veya üç yolağın etkin olduğunu söylemişlerdir. Bunlardan bir tanesi p44/42 MAP kinaz bağımlı, diğerleri p44/42

MAP kinaz bağımsız ve reseptörü olmayan tirozin kinazlardır. Araştırmacılar aynı zamanda protein kinaz A (PKA) yolağının farmakolojik ajanlar (IBMX and forskolin) tarafından aktivasyonun veya aşırı ifade edilmesinin Kav-1 promotor aktivitesi ve protein ifadesinin düzenlenmesini azalttığını göstermişlerdir. Bu yüzden, Ras-p44/42 MAP kinaz, reseptör olmayan tirozin kinazlar (NRTKs) ve PKA olmak üzere üç tane bağımsız sinyal yolağı transkripsiyonel olarak Kav-1 gen ifadesinin düzenlenmesini azaltabileceğini ileri sürmüşlerdir (84).

Araştırmamızda, azalan Kav-1 ifadesinin bir diğer nedeni hücre içi kalsiyumun, CsA tarafından azaltılmasına bağlı olarak meydana gelmiş olabilir. Yang ve ark. (76) transkripsiyonel seviyede kalsiyumun Kav-1 gen ifadesini nasıl düzenlediğini araştırdıkları çalışmalarında BALB/c farelerden yüksek miktarda Kav-1 gen ifadesine sahip olan FBJ-S1 virüs indüksiyonlu metastatik fare osteosarkom hücre hatları hazırlamışlardır. Araştırmacılar yüksek seviyede Kav-1 ifade eden FBJ-S1 hücrelerini kalsinörün inhibitörü olan siklosporin A ile muamele ettiklerinde bu hücrelerde kaveolin-1 gen ifadesinin ve Kav-1 protein düzeylerinin azaldığını bildirmişlerdir. Hücre içindeki kalsiyum konsantrasyonundaki artış kalmodulini aktive edip kalsinörünün aktivasyonuna neden olur. Siklosporin A ise kalsinörün aktivasyonunu bloke ederek hücre içi kalsiyum miktarını düşürmekte, bu da Kav-1 gen ifadesini azaltmaktadır. Araştırmacılar bu bulguyla Kav-1 gen ifadesinin pozitif olarak transkripsiyonel seviyede L-tipi kalsiyum kanal/ Ca^{+2} / kalsinörün / NFAT aracılı yeni bir kalsiyum sinyal yolağı ile düzenlenebileceğini bildirmişlerdir (76).

Böbrek Kav-1 gen ifadesinin azalmasının bir diğer nedeni oksidatif stres kaynaklı olabilir. Fakhrzadeha ve ark. (92) güçlü bir oksidan olan ozon inhalasyonuna fareleri maruz bırakarak alveolar makrofajlarda Kav-1 ifadesinin azaldığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu çalışmada TNF- α 'nın NF κ B aktivasyonunda ve toksisitede önemli bir rol oynadığını, TNF- α sinyalizasyonun NF κ B aktivasyonunda önemli olan p44/42 MAPkinaz enzim yolağında işe karıştığını ve ozon inhalasyonunun p44/42 MAPkinaz'ın hızlı ve geçici bir yükselişine neden olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar sonuç olarak TNF- α 'nın özellikle makrofajlarda NO üretimini sitümüle ettiğini bununda ozon kaynaklı oksidatif doku hasarının patogenezinde işe karıştığını ve akabinde Kav-1 ifadesinin baskılandığını

ifade etmişler ve azalan Kav-1 ifadesinin, p44/42 MAP kinaz yolu ile TNF- α tarafından Kav-1 fosforillenmesinin Kav-1'de konformasyonel değişime yol açarak olabileceğini bildirmişlerdir. Gerçektende bu bulgularımızı destekler nitelikte olarak serbest radikal kaynaklı hasarın dokudaki belirteçlerinden biri olan MDA seviyesinin kronik böbrek yetmezliği olan grupta yükseldiğini tespit ettik. Araştırma sonuçlarımıza benzer olarak birçok çalışmada kronik böbrek yetmezliğinde artan lipid peroksidasyonuna dikkat çekilmiştir. Yükselen MDA değeri, CsA kaynaklı oluşan serbest oksijen radikallerinden kaynaklanmış olabilir. CsA'nın ROT ve lipid peroksidasyonunu artırarak doğrudan nefrotoksik olduğu ve antioksidan kullanımının siklosporinin yan etkilerini azalttığı gösterilmiştir (85). L-karnitin tedavisi KBY'de MDA ürünlerini inhibe ederek eritrosit antioksidan enzim aktivitelerini düzeltmiştir (85). Vaziri ve ark. (86) erkek Sprague Dawley sıçanlarda sol böbreğin 5/6'sini ve 4 gün sonra ise sağ böbreği alarak oluşturdukları kronik böbrek yetmezliği modelinde, deney ve kontrol grubunu altı hafta takip etmişlerdir. Altı hafta sonunda serum ve böbrek, kalp, torasik aorta ve beyin dokularından yaptıkları analiz sonucu plazma MDA seviyelerinde artış, doku Cu,Zn-SOD seviyelerinde azalış tespit etmişlerdir. Benzer olarak Şener ve ark. (59) Kronik böbrek yetmezliği grubunda doku MDA seviyelerinde artış bulurken, GSH seviyelerinde düşme olduğunu bildirmişlerdir. Bir başka araştırmada Ural ve ark. (87) CsA ile sıçanlarda nefrotoksisite oluşturmuş ve serbest radikal kaynaklı böbrek hasarını antioksidan özelliği olan vitamin C ve vitamin E tedavisiyle düzeltmişlerdir. Yine Rezzani ve ark. (88), CsA'nın sıçanların böbrek dokusunda artmış lipid peroksidasyon ürünlerine ve böbrekte tübüler fibröze neden olduğunu bildirmişlerdir. Benzer olarak CsA uygulamasının sıçanların böbrek korteksinde lipid peroksidasyon ürünü olan MDA'yı yükselttiği gösterilmiştir (89).

Araştırmamızda gözlediğimiz artan böbrek MDA değeri CsA'nın böbrekte afferent arteriyolde yaptığı vazokonstriksiyon ve buna bağlı olarak oluşan serbest radikaller nedeni ile meydana gelmiş olabilir. Kronik CsA uygulamasını takiben böbrek MDA seviyesindeki artış CsA'nın yapmış olduğu nefrotoksik etkinin muhtemel patofizyolojik mekanizmalarından birinin serbest radikal kaynaklı hasardan dolayı oluşan oksidatif stres olabileceğini göstermektedir. CsA'nın süperoksit radikal üretimini artırdığı bildirilmiştir (91). Böbrek MDA seviyesindeki artışın bir diğer nedeni azalan Kav-1 ifadesine bağlı olabilir. Kav-1'i yetersiz olan

stromal hücrelerde oksidatif stresin iki antioksidan belirteci olan peroksiredoksin 1 ve katalaz'ın aktivitesinin reaktif oksijen türlerinin üretimiyle arttığı bildirilmiştir (90). Stromal Kav-1'in ifadesinin kaybı oksidatif stresi uyarabilmektedir. Bu hipotez doğrultusunda Pavlides ve ark. (90) Cav-1 (-/-) eksik stromal hücrelerde normalde oksidatif stres ve reaktif oksijen türlerinin üretimi ile bağlantılı olan iki antioksidan proteinin (peroksiredoksin 1 ve katalaz) ifadesinde artış olduğunu göstermişlerdir.

6.SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak CsA ile oluşturulan kronik böbrek yetmezliğinin muhtemel nedeni Kav-1 ifadesindeki azalmadan kaynaklanabilir. Bu azalmanın muhtemel sebepleri arasında; CsA kaynaklı hücre içi kalsiyum azalması, aktivitesi artan p44/42 MAPK veya PKA kaynaklı veya artan oksidatif stres nedeni olabilir. Son çalışmalar Kav-1'in inflamasyon ve hücre sel strese karşı genel koruyucu protein olmasını destekler niteliktedir (58). Kav-1 proteini sinyal kaskadlarının Src, epidermal büyüme faktör reseptörü, Raf, MEK, ERK, G proteini α subüniteleri, adenilat siklaz ve PKA gibi genel kaveolin bağlayıcı motifin tanınmasıyla kaveola membranında lokalize olan birçok molekülün inhibitörü gibi davranabilmektedir (84). Kav-1, sinyal iletiminde oldukça etken rol oynayan kaveolanın bütünlüğünün sürdürülmesinde elzem bir molekül olup (93), azalan Kav-1, kaveolanın bütünleyici yapısının bozulmasına neden olarak böbrek hasarının oluşumunda temel mekanizmalardan biri olarak karşımıza çıkabilir. Aktive olmuş onkogenlerin bir çeşitiyle (b-abl, bcr-abl, H-ras (G12V)) transforme olmuş NT-3T3 hücrelerinde Kav-1 mRNA ve protein ifadesi azalmış veya tamamen yok olmuştur ve bu transforme hücrelerde ise kaveola tamamen yok olmaktadır (84).

Kav-1 ayrıca, p44/42 MAP kinaz kaskadını inhibe ederek mitojenik sinyalin düzenlenmesini azaltmaktadır. Kav-1 ifadesinin azalmasıyla birlikte artan p44/42 MAP kinaz yolağı hücre sel büyüme faktörlerini tetikleyerek renal fibrözise yol açabilir. Böbrek yetmezliğindeki ana etkenlerden bir tanesi olan fibrozis böbrek hastalıklarında son dönem böbrek yetmezliğinin tanımlanmasında genel yoldur. TGF- β 1 böbrek fibrözisinin ana mediatörü olarak görev yapan pleiotropik sitokindir. TGF- β 1-uyarılı MKK3-p38 MAPK kaskadının aktivasyonunun tip I kollajen ifade edilmesine neden olduğu bildirilmiştir (94). MAPK kaskadı hücre büyümesinin, farklılaşmasının apoptozisin ve çevresel streslere karşı hücre sel cevabın düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır.

Crean ve ark. (95), primer insan mezenkimal hücrelerinde konnektif doku büyüme faktörü (CTGF) uyarısıyla ilk 10 dakikada p44/42 MAPK'ın

fosforilasyonunun en yüksek seviyeye ulaştığını bildirmişlerdir. Konnektif doku büyüme faktörü, doku tamiri ve farklılaşması süresince devam eden kompleks biyolojik süreçleri koordine eden erken gen ürünleri ailesinin bir üyesidir. Nefropatilerde glomerulosklerozisin patogeneğinde önemli bir mediatör olarak görev yaparlar. CTGF'in ortama eklenmesi primer mezangial hücrelerde fibronektin üretimini, hücre göçü ve sitoskelet yeniden yapılanmasını uyarmaktadır (95).

CsA'nın bozduğu oksidan-antioksidan denge sonucu ve böbrekte oluşturduğu vazokonstriksiyon sonrası başlayan inflamatuvar süreçte Kav-1 ifadesinin azalması antiinflamatuvar süreci sekteye uğratabilmektedir. Antiinflamatuvar sistem üzerinde pozitif etkisi olan Kav-1'in ifadesinin azaldığında bu süreç inflamasyona doğru yön değiştirebilmektedir. Wang ve ark. (96) bunu destekler nitelikte doku makrofajlarında Kav-1'in ifadesinin yeterli olduğu şartlarda interlökin-10 (IL-10) üretiminin arttığını, TNF- α ve interlökin-6 (IL-6) 'yı azalttığı ve bunun sonucunda inflamatuvar uyarı üzerine antiinflamatuvar etkiler oluştuğunu bildirmişlerdir (97). Gerçektende Fakhrzadeha ve ark. (92) TNF- α 'nın mevcudiyetinde oksidatif stresin arttığını ve Kav-1 ifadesinin azaldığını bildirmişlerdir.

CsA uygulaması ile azalan böbrek Kav-1 ifadesi ve NO üretiminin bozulması böbrekte görülen yetmezliğin bir diğer nedeni olarak karşımıza çıkabilir. NO, böbrek vasküler direncin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar ve böbrek kan akışı, glomerul filtrasyon hızı, böbrek kan akışı ve böbrek vasküler direncinin düzenlenmesine katkıda bulunur (99). Ayrıca NO, doğrudan sodyum geri emilimi baskılamasıyla ve dolaylı olarak böbrek medullar kan akışının düzenlenmesiyle sodyum salınımını yönetir (100). Lungu ve ark. (101) CsA'nın, kaveoladaki kolesterol içeriğini azaltarak endotel hücrelerinde eNOS aktivitesini inhibe ettiğini, CsA tarafından kaveoladaki kolesterol azalmasının CsA indüklü endotelial bozulmanın ve hipertansiyonun önemli bir patojenik mekanizmalardan biri olabileceğini bildirmişlerdir.

Bizim sonuçlarımız göstermektedir ki kronik böbrek yetmezliği modelinde Kav-1 gen ifadesi azalması beraberinde Kav-1 protein ürünlerinin çoğunlukla kaveola membranında yerleşmiş olan src, EGFR, ras, G protein α subünitesi, adenilat siklaz ve PKA gibi sinyal yollarının birçok elementinin regulasyonunda görev

alamayacağını göstermektedir (84). Garcia ve ark. (98) tarafından Kav-1'in neonatal obstruktif nefropati sürecinde renal fibrozisin güçlü bir biyolojik belirteçi olabileceği ileri sürülmüştür. Birçok araştırma fibroziste görülen düşük Kav-1 ifadesi nedeni ile Kav-1'in teröpatik hedef olarak kullanılmasını önermiştir. CsA kaynaklı kronik böbrek yetmezliği modelinde azalan Kav-1 gen ifadesinin tekrar düzenlenmesi böbrek dokusunda hasar mekanizmalarını önleyebileceği kanaatini taşımaktayız.

KAYNAKLAR

1. Coresh, J., Astor, B. C., Greene, T., Eknoyan, G., Levey, A.S. (2003). Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US population: Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Kidney Dis*, 41(1), 1-12.
2. United States Renal Data System. (2012). Annual Data Report: atlas of end-stage renal disease in the United States. Volume one. 41-51.
3. Türk Nefroloji Derneği. (2011). Registry Of The Nephrology, Dialysis And Transplantation In Turkey (Registry 2010). Türk Nefroloji Derneği Yayınları.
4. Bethesda, M. (2006). Renal Disease in the United States. National Institutes of Health. *National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases*.
5. Van Meer, G., Burger, K. (1992). Sphingolipid trafficking-sorted out? *Trends Cell Biol*, 2, 332-337.
6. Van Meer, G., Stelzer, E. H., Wijnaendts-van-Resandt, R. W., Simons, K. (1987). Sorting of sphingolipids in epithelial (Madin-Darby canine kidney) cells. *The Journal of cell biology*, 105, 1623-1635.
7. Tamaskar, I., Choueiri, T., Sercia, L., Rini, B., Bukowski, R., Zhou, M. (2007). Differential Expression of Caveolin-1 in Renal Neoplasms. *Cancer*, 110, 776-782.
8. Garcia, E., Li, M. (2006). Caveolin-1 Immunohistochemical Analysis in Differentiating Chromophobe Renal Cell Carcinoma From Renal Oncocytoma. *Am J Clin Pathol*, 125, 392-398.
9. Aydın, S. (2006). İnsan Anatomisi Ve Fizyolojisi. *Anadolu Üniversitesi yayınları*.
10. Skandalakis, J., Colborn, G. (2008). Böbrekler ve Üreterler Cerrahi Anatomi. (11. bs.). *Ankara : Palme yayıncılık*.
11. Moore, K. (1992). *The abdomen. Clinically Oriented Anatomy*. Baltimore: Williams&Wilkins.
12. Paulsen, F., Waschke, J. (2011). *Sobotta İnsan Anatomi Atlası İç Organlar*. Ankara: Beta.

13. Tisher, C., Goldman, L., Bennet, J. C. (2000). *Structure and Function of Kidneys: Cecil Textbook of Medicine*. Pennsylvania: WB Saunders Company.
14. Guyton A., H. J. (1996). *Urine Formation by The Kidneys:Gromerular Filtrastion, Renal Blood Flow, and Their Control:Textbook of Medical Physiology*. 315-330.
15. Guyton , A. (1990). *Böbrekler ve Vücut Sıvıları, Fizyoloji*. İzmir: Güven Kitabevi Yayınları.
16. Brady, H. R., Brenner, B. (1998). Chronic Renal Failure:Harrison's Principles Of Internal Medine. *Ondördüncü baskı. The McGraw-Hill Companies USA*. 1654-1663.
17. Çağlar, Ş. (1986). *Klinik Nefroloji*. Ankara: Medial Yayınları.
18. Douglas, C., Eaton, J. P. P. (2005). *Vander'in Böbrek Fizyolojisi*. Ankara: Palme Yayıncılık.
19. Tanrıverdi, M., Karadağ, A., Hatipoğlu, E. (2010). Kronik Böbrek Yetmezliği. *Konuralp Tıp Dergisi*, 2, 27-32.
20. Foundation., N. K. (2002). K/DOQI Clinical Practice guidelines for Chronic Kidney Disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Di*, 39(2), 1–266.
21. Erek, E., Sever, M. Ş., Akoğlu, E., Sarıyar, M., Bozfakıoğlu, S., Apaydın, S. (2004). Cost of renal replacement therapy in Turkey. *Nephrology*, 9(1) ,33-38.
22. Bethesda, M. (2003). United States Renal Data System. Annual Data Report, National Institutes of Health, . *Diabetes and Digestive and Kidney Diseases*.
23. Vural, A. (2002). *Kronik böbrek yetmezliği ve tedavisi*. Ankara: GATA Basımevi. 339-358.
24. Süleymanlar, G. (2007). Kronik Böbrek Hastalığı ve Yetmezliği: Tanımı, Evreleri ve Epidemiyolojisi. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci*, 23, 1-7.
25. Collins, A. J., Kasiske, B., Herzog, C., Chen, S.C., Everson, S., Constantini , E., Grimm, R. (2003). Excerpts from the United States Renal Data System

- 2003 Annual Data Report: atlas of end-stage renal disease in the United States. *Am J Kidney Dis*, 42, 1-230.
26. Süleymanlar, G., Altıparmak, M.R. (2011). Türkiye'de Nefroloji-Dializ ve Transplantasyon, Registry 2011. *Türk Nefroloji Derneği Yayınları*. İstanbul. 2012.
 27. Ünal, H., Korkmaz, M., Selçuk, H. (2010). Kronik Böbrek Hastalarında Malnütrisyon Patogenezi Ve Değerlendirilmesi. *Güncel Gastroenteroloji*, 14, 103-111.
 28. Süleymanlar, G., Utaş, C., Arınsoy, T., Ateş, K., Altun, B., Altıparmak, MR., Eceder, T., Yılmaz, ME., Çamsarı, T., Başçı, A., Serdengeçti, K. (2011). A population-based survey of Chronic Renal Disease in Turkey-the CREDIT study. *Nephrol Dial Transplant*, 26, 1862-1871.
 29. Braunwald, E., Fauci, A. S., Kasper, D. L. (2004). *Harrison İç Hastalıkları Prensipleri (Çev ed: Sağlık Y)* Nobel Tıp Kitabevleri. 1551-1566.
 30. Güngör, Ö., Şen, S., Tamer, A., Tatar, E., Aşçı, G., Akçiçek, F. (2012). Kronik Böbrek Yetmezliğinin Nadir Bir Nedeni: Kronik Lityum Kullanımı. *Turk Neph Dial Transp*, 21, 313-315.
 31. Erek, E., Süleymanlar, G., Serdengeçti, K. (2005). Registry of the Nephrology Dialysis and Transplantation in Turkey (Registry 2004).
 32. Caimi, G., Carollo, C., Lo Presti, R. (2005). Pathophysiological and clinical aspects of malnutrition in chronic renal failure. *Nutr Res Rev*, 18, 89-97.
 33. Nielsen, F., Mikkelsen, B. B., Nielsen, J. B., Andersen, H. R., Grandjean, P. (1997). Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clin Chem*, 43, 1209-1214.
 34. Fellstrom, B. (2004). Cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant. Proc*, 220-223.
 35. Al-Amran, F. G., Hadi, N. R., Kamoona, T. H., Kadhum, D. J. (2011). Amelioration of chronic cyclosporine A-induced nephrotoxicity by telmisartan in rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(4), 500-505.

36. Monsour, M. A., El-Odemi, M. H. (2009). Effect of Rosiglitazone (PPAR- γ ligand) on Cyclosporine Induced Chronic Nephrotoxicity in Rats. Histological, Immunohistochemical and Biochemical Study. *J. Histol*, 32, 145-155.
37. Uz, E., Uz, B., Kaya, A., Akdeniz, D., Ruzgaresen, N., Uz, E., Turgut, F., Bayrak, R., Akcay, A.(2011). Protective Effect of Erdosteine on Cyclosporine Induced Chronic Nephrotoxicity in Rats. *Nephro-Urol Mon*, 3, 280-284.
38. Pe´rez-Rojas, J., Derive, S., Blanco, J., Cruz, C., Maza, L., Gamba, G., Bobadilla, N. (2005). Renocortical mRNA expression of vasoactive factors during spironolactone protective effect in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol*, 289 , 1020–1030.
39. Busauschina, A., Schnuelle, P., Woude, F. J. (2004). Cyclosporine Nephrotoxicity. *Transplant Proc*, 36, 229-233.
40. Palade, G. (1953). Fine structure of blood capillaries. *J Appl Phys.* 24, 1424.
41. Yamada, E. (1955). The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol*, 1, 445-458.
42. Stan, R. (2005). Structure of caveolae. *Biochim Biophys Acta*, 1746, 334-348.
43. Simons, K., Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. . *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1, 31-39.
44. Bender, F., Montoya, M., Monardes, V., Leyton, L., Quest, A.F.G. (2002). Caveolae and caveolae-like membrane domains in cellular signaling and disease: Identification of downstream targets for the tumor suppressor protein caveolin-1. *Biol Res*, 35, 139-150.
45. Krajewska, W., Maslowska, I. (2004). Caveolins: structure and function in signal transduction. *Cell Mol Biol Lett*, 9, 195–220.
46. Senetta, R., Stella, G., Pozzi, E., Sturli, N., Massi, D.,Cassoni, P. (2013). Caveolin-1 as a promoter of tumour spreading: when, how, where and why. *J. Cell. Mol. Med*, 17, 325-336.
47. Rothberg, K., Heuser ,JE., Donzell ,WC., Ying ,YS., Glenney ,J. R., Anderson, R. G. (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*, 68(4), 673-682.

48. Williams, T., Lisanti, M. P. (2004). The Caveolin genes: from cell biology to medicine. *Ann Med*, 36, 584–595.
49. Razani, B., Wang, X., Engelman, J., Battista, M., Lagaud, G., Zhang, X. (2002). Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae. *Mol Cell Biol*, 22, 2329-2344.
50. Sowa, G., Xie, L., Xu, L., Sessa, W. (2008). Serine23 and 36 phosphorylation of caveolin-2 is differentially regulated by targeting to lipid raft/caveolae and in mitotic endothelial cells. *Biochemistry*, 47, 101-111.
51. Venema, V., Ju, H., Zou, R., Venema, R. (1997). Interaction of neuronal nitric-oxide synthase with caveolin-3 in skeletal muscle. Identification of a novel caveolin scaffolding/inhibitory domain. *J Biol Chem*, 272, 28187–28190.
52. Frank, P., Woodman, S., Park, D., Lisanti, M. P. (2003). Caveolin, Caveolae, and Endothelial Cell Function. *Arteriosclerz Thromboz Vascular Biology*, 23, 1161-1168.
53. Cohen, A., Hnasko, R., Schubert, W., Lisanti, M. P. (2004). Role of Caveolae and Caveolins in Health and Disease. *Physiol Rev*, 84, 1341–1379.
54. Quan-Cai, C., Qing-Wu, J., Gen-Ming, Z., Qiang, G., Guang-Wen, C., Teng, C. (2003). Putative caveolin-binding sites in SARS-CoV proteins. *Acta Pharmacol*, 24 (10), 1051-1059.
55. Hewitson, T., Ono, T., Becker, G. J. (2009). Small animal models of kidney disease: a review. *Methods Mol Biol*, 466, 41-57.
56. Carriona, R., Morganb, B., Tannenbauma, M., Salupa, R. (2003). Caveolin expression in adult renal tumors. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 21, 191–196.
57. Barresi, V., Cerasoli, S., Paioli, G., Vitarelli, E., GiuVrè, G., Guiducci, G., Tuccari, G., Barresi, G. (2006). Caveolin-1 in meningiomas: expression and clinico-pathological correlations. *Acta Neuropathology*, 112, 617–626.
58. Burgermeister, E., Liscovitch, M., Röcken, C., Schmid, R., Ebert, M. (2008). Caveats of caveolin-1 in cancer progression. *Cancer Letters*, 268, 187–201.

59. Şener, G., Paskaloğlu, K., Şatiroğlu, H., Alican, I., Kaçmaz, A., Sakarcan, A. (2004). L-Carnitine Ameliorates Oxidative Damage due to Chronic Renal Failure in Rats *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 43, 698-705.
60. Torres, V. E., Harris, P. (2009). Autosomal dominant polycystic kidney disease: the last 3 years. *Kidney Int*, 76, 149-168.
61. Gubler, M. C. (2008). Inherited diseases of the glomerular basement membrane. *Nat Clin Pract Nephrol*, 4, 24-37.
62. Ozaltin, F., Ibsirlioglu, T., Taskiran, E., Baydar, D., Kaymaz, F., Buyukcelik, M., Kilic, B., Balat, A., Iatropoulos, P., Asan, E., Akarsu, N., Schaefer, F., Yilmaz, E., Bakkaloglu, A. (2011). Disruption of PTPRO Causes Childhood-Onset Nephrotic Syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 89, 139-147.
63. Schwartz, E. A., Reaven, E., Topper, J. N., Tsao, P. S. (2005). Transforming growth factor-beta receptors localize to caveolae and regulate endothelial nitric oxide synthase in normal human endothelial cells. *Biochemical Journal*, 390, 199.
64. Nakagawa, T., Sasahara, M., Haneda, M., Kataoka, H., Nakagawa, H., Yagi, M., Kikkawa, R., Hazama, F. (1999). Role of PDGF B-chain and PDGF receptors in rat tubular regeneration after acute injury. *The American journal of pathology*, 155, 1689-1699.
65. Negri, A. (2005). The klotho gene: A gene predominantly expressed in the kidney is a fundamental regulator of aging and calcium/phosphorus metabolism. *J Nephrol*, 18, 654-658.
66. Yavuz, D., Yavuz, R., Siren, S. (2012). Yaşlılık Döneminde Nefrolojik Sorunlar. *Turk Neph Dial Transpl*, 21, 217-223.
67. Zager, R., Johnson, A., Hanson, S., Dela Rosa, V. (2002). Altered cholesterol localization and caveolin expression during the evolution of acute renal failure. *Kidney Int*, 61, 1674-1683.
68. Andoh, T., Lam, T., Lindsley, J., Alpers, C., Bennett, W. (1997). Enhancement of chronic cyclosporine nephrotoxicity by sodium depletion in an experimental mouse model. *Nephrology*, 3, 471-478.

69. Elzinga , L., Rosen, S., Bennett, W. M. (1993). Dissociation of glomerular filtration rate from tubulointerstitial fibrosis in experimental chronic cyclosporine nephropathy: role of sodium intake. *J Am Soc Nephro*, 4, 214-221.
70. Al-Amran, F., Hadi, N. R., Kamoona, T. H., Kadhum, Z. J. (2011). Amelioration of chronic cyclosporine A-induced nephrotoxicity by telmisartan in rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(4), 500-505.
71. Yang, N., Ying , C., Xu, M., Zuo, X., Ye, X., Liu, L., Nara, Y., Sun, X. (2007). High-fat diet up-regulates caveolin-1 expression in aortaof diet-induced obese but not in diet-resistant rats. *Cardiovascular Research*, 76, 167–174.
72. Uchiyama, M., Mihara, M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor intissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*, 86, 271–278
73. Soazig, L., Kurzchalia,T. (2005). Getting Rid Of Caveolins: Phenotypes Of Caveolin-deficient Animals. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1746, 322-333.
74. Liu, J., Wang, X. B., Park, D. S., Lisanti, M. P. (2002). Caveolin-1 expression enhances endothelial capillary tubule formation. *J. Biol. Chem*, 277,10661–10668.
75. Taugner, R., Bahrle, C. P., Nobiling, R. (1984). Ultrastructural changes associated with renin secretion from the juxtaglomerular apparatus of mice. *Cell and tissue research*, 237, 459-472.
76. Yang, X. Y., Huang, C. C., Kan, Q. M., Li, Y., Liu , D., Zhang ,X. Ç., Sato, T., Yamagata ,S., Yamagata, T. (2012). Calcium regulates caveolin-1 expression at the transcriptional level. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 426, 334-341.
77. Agelaki, S., Spiliotaki, M., Markomanolaki, H., Kallergi, G.,Mavroudis, D., Georgoulas, V., Stournaras, C. (2009). Caveolin-1 regulates EGFR signaling in MCF-7 breast cancer cells and enhances gefitinib-induced tumor cell inhibition. *Cancer Biology & Therapy*, 8, 1470-1477.

78. Volonte, D., Zhang, K., Lisanti, M. P., Galbiati, F. (2002). Expression of caveolin-1 induces premature cellular senescence in primary cultures of murine fibroblasts. *Mol Biol Cell*, 13, 2502-2517.
79. Engelman, J. A., Wykoff, C. C., Yasuhara, S., Song, K. S., Okamoto, T., Lisanti, M. P. (1997). Recombinant Expression of Caveolin-1 in Oncogenically Transformed Cells Abrogates Anchorage-independent Growth. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 16374-16381.
80. Bai, Y., Ye, S., Mortazavi, R., Campese, V., Vaziri, N. D. (2007). Effect of renal injury-induced neurogenic hypertension on NO synthase, caveolin-1, AKt, calmodulin and soluble guanylate cyclase expressions in the kidney *Am J Physiol Renal Physiol*, 292, 974–980.
81. Ram, K., Sindhua, R., Ehdaiea, A., Vaziria, N. D., Roberts, C. K. (2004). Effects of chronic renal failure on caveolin-1, guanylate cyclase and AKT protein expression. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1690, 231–237.
82. Mahmoudi, M., Willgoss, D., Cuttle, L., Yang, T., Pat, B., Winterford, C., Endre, Z., Johnson, D., Gob'e, G. (2003). In vivo and in vitro models demonstrate a role for caveolin-1 in the pathogenesis of ischaemic acute renal failure. *Journal of Pathology*, 200, 396–405.
83. Fujigaki, Y., Sakakima, M., Sun, Y., Goto, T., Ohashi, N., Fukasawa, H., Tsuji, T., Yamamoto, T., Hishida, A. (2007). Immunohistochemical study on caveolin-1 α in regenerating process of tubular cells in gentamicin-induced acute tubular injury in rats. *Virchows Arch*, 450, 671–681.
84. Engelman, J. A., Zhang, X. L., Razani, B., Pestelli, R.G., Lisanti, M. P. (1999). p42/44 MAP Kinase-dependent and -independent Signaling Pathways Regulate Caveolin-1 Gene Expression *J. Biol. Chem*, 274, 32333-32341.
87. Ural, M., Özgüner, M., Şenal, D., Sütçü, R., Delibaş, N. (2005). Siklosporin A'nın sıçanlarda oluşturduğu nefrotoksisiteye Vitamin C ile Vitamin E'nin ve verapamilin etkilerinin Işık mikroskopunda değerlendirilmesi. *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg*, 12(4), 28-35.
88. Rezzani, R. (2004). Cyclosporine A and adverse effects on organs: histochemical studies. *Prog Histochem Cytochem*, 39, 85-128.

89. Inselmann, G., Baumann, K. (1990). Effect of Cyclosporine a on Accumulation of Tetraethylammonium and p Aminohippurate, and on Lipid Peroxidation in Rat Renal Microsomes and Cortical Slices. *Renal Failure*, 12, 165-169.
90. Pavlides, S., Whitaker-Menezes, D., Castello-Cros, R., Flomenberg, N., Witkiewicz, A. K., Frank, P. G., Casimiro, M. C., Wang, C., Fortina, P., Addya, S., Pestell, R. G., Martinez-Outschoorn, U. E., Sotgia, F., Lisanti, M. P. (2009). The reverse Warburg effect Aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle*, 8, 3984-4001.
91. Dietrich, D., Skopec, J., Diederich, A., Dai, F. X. (1994). Cyclosporine produces endothelial dysfunction by increased production of superoxide. *Hypertension*, 23(2), 957-961.
92. Fakhrzadeha, L., Laskinb, J. D., Laskina, D. (2008) . Regulation of Caveolin-1 Expression, Nitric Oxide Production and Tissue Injury by Tumor Necrosis Factor- α following Ozone Inhalation *L.Toxicol Appl Pharmacol*, 15: 380–9.
93. Jacques Couet, J., Belanger, M. M., Roussel, E., Drolet, M.C. (2001). Cell biology of caveolae and caveolin. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 49, 223-235.
94. Chin, B. Y., Mohsenin, A., Li, S. X., Choi, A.M.K., Choi, M. E. (2001). Stimulation of pro- α 1(I) collagen by TGF- β 1 in mesangial cells: role of the p38 MAPK pathway. *Am J Physiol Renal Physiol*, 280, 495-504.
95. John, K. G. Crean, J. K. G., Finlay, D., Murphy, M., Moss, C., Godson, C., Martin, F., Brady, H. R. (2002). The Role of p42/44 MAPK and Protein Kinase B in Connective Tissue Growth Factor Induced Extracellular Matrix Protein Production, Cell Migration, and Actin Cytoskeletal Rearrangement in Human Mesangial Cells. *J. Biol. Chem*, 277, 44187-44194.
96. Wang, X., Kim, H. P., Song, R., Choi, A. M. (2006). Caveolin-1 confers antiinflammatory effects in murine macrophages via the MKK3/p38 MAPK pathway. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*, 34, 434–442.

97. Chen, S., Liou, J. Y., Huang, T. Y., Lin, Y. S., Yeh, A. L., Tam, K. (2010). Caveolin-1 facilitates cyclooxygenase-2 protein degradation. *J Cell Biochem*, 109, 356-362.
98. García, I., Mazzei, L., Benardón, M. E., Oliveros, L., Cuello-Carrión, F. D., Lorenzo, A. G., Manucha, V., Vallés, P. G. (2012). Caveolin-1–eNOS/Hsp70 interactions mediate rosuvastatin antifibrotic effects in neonatal obstructive nephropathy. *Nitric Oxide*, 27, 95-105.
99. Mattson, D. L., Bellehumeur, T. D. (1996). Neural nitric oxide synthase in renal medulla and blood pressure regulation. *Hypertension*, 28, 297-303.
100. Mattson, D. L., Nakanishi, K. (1994). Effect of chronic renal medullary nitric oxide inhibition on blood pressure. *Am J Physiol*, 266, 1918-1926.
101. Lungu, A. O., Jin, Z. G., Yamawaki, H., Tanimoto, T., Wong, C., Berk, B. C. (2004). Cyclosporin A inhibits flow-mediated activation of endothelial nitric-oxide synthase by altering cholesterol content in caveolae. *J Biol Chem*, 19, 794-800.
102. Li, Z., Rodríguez-Iturbe, B., Ni, Z., Shakhkarami, A., Sepassi, L., Vaziri, N. D. (2005). Effect of hereditary obesity on renal expressions of NO synthase, caveolin-1, AKt, guanylate cyclase, and calmodulin. *Kidney Int*, 68, 2766–2772.

EKLER

Ek 1: Kaveolin Gen Dizilimi

Sıçan kaveolin geninin 2468 baz çiftinden oluşan mRNA dizilimi ve primerlerin dizilimdeki yerleri gösterilmiştir. Gen Bankası Kayıt No. NM_031556.2

```

1  ggaaacctcctcagagcctgcagccagccacgcgccagcatgtctgggggtaaatacgta
61  gactccgagggacatctctacactgttcccatccgggaacagggcaacatctacaagccc
    >>>>>>>>>>
121 aacaacaaggccatggcagacgaggtgaatgagaagcaagtgtacgacgcgcacaccaag
    >>>>>>>>>
181  gagattgatctggtcaaccgcgaccccaagcatctcaacgacgacgtggtcaagattgac
241  tttgaagatgtgattgcggaaccagaagggacacacagtttcgacggcatctggaaggcc
301  agcttcaccaccttcactgtgacaaaatattggttttaccgcttgctgtctaccatcttc
361  ggcattccctatggcgctcatctggggcatctactttgccatcctctctttcctgcacatc
    <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
421  tgggcagttgtaccgtgcatcaagagcttctctgattgagattcagtgcatcagccgtgtc
481  tattccatctacgtccacaccttctgtgatccactctttgaagcgattggcaagatattc
541  agcaatatccgcatcagcacgcagaaagagatatgagtgacatttcagggatggaaggct
601  tttctcccccttactattcccttggtgccaattccaagttgctatcacagccgtgatttc
661  tgaatggtttgtcttgggtcaagaacaaagaattcattccctccattttcatgtatactgc
721  ttgtctctcctgagctactgcatctatttttgacagctctggaatgtttaaacccattcct
781  gctctcccgttccttgggtgatcattgtttcattggctaaaatataaacatgttgttgaa
841  agatactttgagaaaaaataggaagactgggaggcggaggatgagtgccaacaccctcga

```

901 ctgcctgctctaggggatgaggttatagaaaggggaagagtttcaggatatggctgtgtgt
961 gtagggggcatgaaggcagggtataaacaataatataatcccagctgcctaaggagttggttg
1021 ctgtcctcactcttaacaatccagtgggatctagtgatcaacatcagtttgagactcta
1081 atcttcatgctcatgtattcatcctgacattttaacttgttattctgtgtgaccgaatac
1141 ttgttataacctagaatacgcactaagtgccttctgatttctcatgatttcttttcaaaca
1201 gggctctaagtcacttacttgcatTTTTGCCAGAAGCTCTCCGGAAAAACAAAGCATACAAAA
1261 tctacttgctatTTTCTGTACTTGTTTCTGACTCTGAGACACAGAACCCTGTTGAAGTTG
1321 atctctgcgcttggtttttagcgtctTTTCTCTATACTAAGCCCAGTCAACATTAACCA
1381 gtgaaatgattcaaagcagacaaaacggggctgagacctccctggaagaaataggagccaa
1441 ctttactggccactcagcactgaatgaggccctcgggtctattcagtttcacttattttc
1501 aagaataatcacacattcccgactcttacgctaaccctcaccaggatggtttagtgacc
1561 aaccaagatggcttaatgaccaaccaggatggtttagggactcaaccctgtgctccctt
1621 tcagctgatgagtgagccttcaggagggggtgtcaaaaaacgagtctgccaaagcaagat
1681 tgccaaacctgTTGCAAACGCAACCCCTTCTAGGCATAGCACAAAGTAATAGTCTGTAAC
1741 gctgcaagcctgacctctccccctgccaggagcctttggcctaactcaagcaccatttt
1801 gttcagagagaagatgggggaggggtggttaaaaaagcttgaggtaatgttcttgctgga
1861 ataagttcaagtctttctgaacccaaactgtggaatttcacctgtgtacctgagtctcca
1921 gaatcctgctgctgggacacccaaaaggcttttattccccctgctcacatgacagctc
1981 tgcccttggggatatttttaagactgcagataggcctttgttttactttcatacattta
2041 ttggaactctgcttgacttggtactccttcagttttgctgacactttaccaaccgcta

2101 cctatTTTgattgTtccattTgaaacagacactggcatggccacagTTTgactTTTTaa

2161 actgtgtacataactgaaaatgtactagactgtatacctgtTTaaatgtagagataTcct

2221 ttatTTTTatataaggaaaatcactTgggaagtggTtctacgTTTcagTctTTaaactgt

2281 gTtccaagacatgtctgtTctTcctagatactcagTcttatgcaagtcaattgctgatcc

2341 aaaaggTtactgaaatTTTtatatgctTactgatatTTTtactTTTTatgctgcatgtc

2401 ctataaagattTcaaTctgcacaataaaattgtTTaacagtaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

2461 aaaaaaaaa

EK 2: Beta Aktin Gen Dizilimi

Sıçan beta aktin geninin 1293 bazdan oluşan mRNA dizilimi ve primerlerin dizilimdeki yerleri gösterilmiştir. Gen Bankası Kayıt No. NM_031144.3

```

1  gtcgagtcgctccacccgagtagacaaccttcttgcagctcctccgtcgccggtccac
61  acccgccaccagttcgccatggatgacgatatcgctgcgctcgctcgacaaacggctcc
121 ggcattgtgcaaggccggcttcgcgggcgacgatgctccccgggcccgtcttcccctccatc
181 gtgggccgcccctagggcaccaggggtgatggggatgggtcagaaggactcctacgtg
241 ggcgacgaggcccagagcaagagaggcatcctgaccctgaagtacccattgaacacggc
301 attgtcaccaactgggacgatatggagaagatttggcaccacactttctacaatgagctg
361 cgtgtggcccctgaggagcaccctgtgctgctcaccgaggcccctctgaaccctaaggcc
421 aaccgtgaaaagatgaccagatcatgtttgagaccttcaacaccccagccatgtacgta
481 gccatccaggctgtggttgcctgtatgcctctggctcgtaccactggcattgtgatggac
541 tccggagacggggtcaccacactgtgcccattatgagggttacgcgctccctcatgcc
601 atcctgcgctctggacctggtggccgggacctgacagactacctcatgaagatcctgacc
661 gagcgtggctacagcttaccaccacagctgagagggaaatcgtgcgtgacattaaagag
721 aagctgtgctatggtgcccctagacttcgagcaagagatggccactgccgcatcctcttcc
781 tccctggagaagagctatgagctgcctgacggtcaggtcatcactatcggcaatgagcgg
      >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
841 ttccgatgccccgaggctctctccagccttccttcctgggtatggaatcctgtggcatc
901 catgaaactacattcaattccatcatgaagtgtgacgttgacatccgtaaagacctctat
      <<<
961 gccaacacagtgctgtctgggtggcaccaccatgtaccaggtcattgctgacaggatgcag

```

<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<

1021 aaggagattactgccttggtccttagcaccatgaagatcaagatcattgctcctcctgag

1081 cgcaagtactctgtgtggattggtggctctatcctggcctcactgtccaccttccagcag

1141 atgtggatcagcaagcaggagtacgatgagtcgccccctccatcgtgcaccgcaaatgc

1201 ttctaggcggactgttactgagctgcgttttacaccctttctttgacaaaacctaacttg

1261 cgcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

Ek 3: DeneY Hayvanları Etik Kurulu Kararı

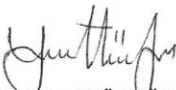






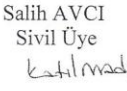



İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 09-06-2011
 Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya
 Araştırma Protokol no.su : 2011/A-54
 DeneYde Kullanılacak Hayvanın Türü : Wistar Albino
 DeneYde Kullanılacak Hayvanın Soyu : Rat
 DeneYde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez
 DeneYde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 20 adet
 DeneYde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı : 8-12 haftalık/200-250 gram

Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ'in yürütücüsü olduğu "Ratlarda Kronik Böbrek Yetmezliği Modelinde Kaveolin Gen Ekspresyonu" isimli 2011/A-54 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi DeneY Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

 Prof.Dr. Yusuf TÜRKÖZ Başkan	 Doç.Dr. Abdurrahman KARAMAN Başkan Yard.	 Yrd.Doç.Dr. Mustafa KARAKAPLAN Raportör
 Prof.Dr. Ahmet KIZILAY Üye	 Prof.Dr. Selim DOĞANAY Üye katılmadı	 Yrd. Doç. Dr. M. Arif ALADAĞ Üye
 Vet.Hek.M.Zafer BOZDAĞ Üye	 Salih AVCI Sivil Üye katılmadı	 Yasin EROĞLU Sivil Üye

ÖZGEÇMİŞ

Denizli doğumlu. İlk ve orta öğretimini Malatya'nın Hekimhan ilçesinde tamamladı. Turgut Özal Süper Lisesi'nden 2001'de bölüm ikincisi olarak mezun oldu. Aynı yıl İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü'nü kazandı. Lisans döneminde biyokimya, mikrobiyoloji ve deney hayvanları laboratuvarındaki çalışmalara katıldı. Bipolar Bozuklukların Genetik Temelleri adlı derleme teziyle mezun oldu. 2010-2011 güz döneminden İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı.