

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL OLARAK HİPERTANSİYON
VE DİYABET OLUŞTURULMUŞ
RATLARDA GLOMERÜLER
DEĞİŞİKLİKLERİN
ELEKTRONMİKROSKOBİK VE
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK
İNCELENMESİ**

ARAŞ. GÖR. SERAP CİLAKE MICİLİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

İZMİR-2011

TEZ KODU: DEÜ.HSL.PhD-2005970011

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL OLARAK HİPERTANSİYON
VE DİYABET OLUŞTURULMUŞ
RATLARDA GLOMERÜLER
DEĞİŞİKLİKLERİN
ELEKTRONMİKROSKOBİK VE
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK
İNCELENMESİ**

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ARAŞ. GÖR. SERAP CİLAKEK MICİLİ

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. BEKİR UĞUR ERGÜR

2. Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. CANDAN ÖZOĞUL

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2005.SAG.045 sayı ile desteklenmiştir

TEZ KODU: DEÜ.HSL.PhD-2005970011

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Doktora programı öğrencisi Serap Cilaker Mıcılı'nın **'DENEYSEL OLARAK HİPERTANSİYON VE DİYABET OLUŞTURULMUŞ RATLARDA GLOMERÜLER DEĞİŞİKLİKLERİN ELEKTRONMİKROSKOBİK VE İMMÜNHİSTOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ'** konulu Doktora tezini 27. 05. 2011 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.



Doç. Dr. BEKİR UĞUR ERGÜR

BAŞKAN



Prof. Dr. CANDAN ÖZOĞUL
ÜYE



Prof. Dr. SÜLEN SARIOĞLU
ÜYE



Doç. Dr. H. ALPER BAĞRIYANIK
ÜYE



Prof. Dr. SEVİNÇ İNAN
ÜYE

TEŞEKKÜR

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki doktora eğitimim süresince, akademik gelişimime büyük katkıları olan ve her anlamda bana sonsuz destek olan, çok değerli tez danışmanlarım Doç.Dr. Bekir Uğur Ergür ve Prof. Dr. Candan Özoğul'a,

Tez izleme Jürimde bulunan ve bu süreçte bilimsel bilgi, deneyim, ilgi ve değerli kişilikleri ile her zaman yol gösterici olan Anabilim Dalı başkanımız Doç.Dr. H. Alper Bağrıyanık ve Prof. Dr. Sülen Sarıoğlu'na,

Akademik bilgi ve deneyimleri ile hayata dair görüşlerini benimle paylaşan ve iyi niyetlerini ve özverilerini hiçbir zaman esirgemeyen anabilim dalımınızın değerli hocaları Doç.Dr. Kazım Tugyan, Doç.Dr. Çetin Pekçetin, Doç.Dr. Işıl Tekmen, Doç.Dr. Ülker Sönmez ve Doç. Dr. Güven Erbil'e,

Her anlamda yanımda olan, sevgi ve anlayışlarını her zaman hissettiğim Araş. Gör. Seda Özbal, Öğr. Gör. Başak Baykara ve Doç. Dr. Müge Kiray'a, Biyolog Özcan Üstün ve Biyolog Sedef Menkü'ye,

Bu süreçte saygı ve sevgiyle çalıştığım değerli arkadaşlarım, Uzm. Biyolog Nazlı Can, Uzm. Biyolog Ziya Denek, Uzm. Biyolog Ezgi Dursun, Uzm. Biyolog Soner Atmaca ve Uzm. Biyolog Ceyda Yıldız'a, diğer tüm asistan arkadaşlarıma,

Bana verdiği her türlü destek, sevgi ve anlayış için değerli eşim İlhan Mıcılı'ya, ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SERAP CİLAKEK MİCİLİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa no

ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
KISALTMALAR.....	xiv

İçindekiler

1	ÖZET.....	1
2	GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
3	GENEL BİLGİLER.....	8
3.1	Böbreğin (REN, NEPHROS) Temel Yapısı ve Anatomisi	8
3.1.1	Böbreğin Damarlanması	8
3.1.2	Böbreğin Lenfatik Dolaşımı	10
3.1.3	Böbreğin Sinir İnnervasyonu.....	10
3.2	Böbreğin Histolojisi	10
3.2.1	Nefronların Yapısı	11
3.2.2	Proksimal kıvrıntılı tübüller	15
3.2.3	Henle Kulpu.....	16
3.2.4	Distal kıvrıntılı tübül	17
3.2.5	Kollektör Tübüller (toplayıcı kanallar)	18
3.2.6	Renal interstisyum	18
3.3	Böbreğin Fizyolojisi	18
3.4	Böbrek Hastalıkları	22
3.5	Diabetes Mellitus.....	24
3.5.1	Diabetes Mellitus'un Epidemiyolojisi	27
3.5.2	Diabetes Mellitus'un Tanı Kriterleri.....	27
3.5.3	Diabetes Mellitus'un Patogenezi.....	28
3.5.4	Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları.....	29
3.5.5	Diabetes Mellitus'un Renal Komplikasyonları.....	30

3.5.6	<i>Deneyisel Diyabet Modelleri</i>	34
3.6	Hipertansiyon	35
3.6.1	<i>Hipertansiyonun patogenezi:</i>	36
3.6.2	<i>Hipertansiyonun Etiyolojisi</i>	36
3.6.3	<i>Hipertansiyon Böbrek İlişkisi:</i>	38
3.6.4	<i>Deneyisel Hipertansiyon Modelleri</i>	41
3.7	Diyabet ve Hipertansiyon İlişkisi	44
3.7.1	<i>Anjiyotensin II tip I (AT1)-reseptörü</i>	45
3.7.2	<i>VEGF Ailesi</i>	46
3.7.3	<i>Endotelin-1</i>	46
3.7.4	<i>Kaspaz Ailesi</i>	47
3.8	Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	48
3.9	Antioksidan Savunma Mekanizmaları	51
3.10	Lipoik asitin kimyasal yapısı ve genel özellikleri	53
3.11	Lipoik asit, Diabetes Mellitus ve Hipertansiyon İlişkisi	54
4	GEREÇ VE YÖNTEM	56
4.1	Araştırmanın Tipi	56
4.2	Araştırmanın Yeri ve Zamanı	56
4.3	Araştırmanın Örneklemi/Çalışma Grupları	56
4.4	Deneyisel ve Laboratuvar İncelemeleri Sırasında Kullanılan Materyaller	57
4.5	Araştırmanın Değişkenleri	58
4.6	Verilerin Eldesi	59
4.6.1	<i>Deneyisel Modeller</i>	59
4.6.2	<i>Doku örneklerinin hazırlanması</i>	61
4.6.3	<i>Işık mikroskopik inceleme</i>	61
4.6.4	<i>İndirekt immunohistokimyasal yöntem (İHK)</i>	65
4.6.5	<i>Ultrastrüktürel inceleme</i>	67
4.6.6	<i>Renal hasarın belirlenmesinde kullanılan morfolojik değerlendirme kriterleri</i>	68
4.6.7	<i>Biyokimyasal analizler</i>	71
4.7	Araştırma planı ve takvimi	71
4.8	Verilerin istatistiksel analizi	71
4.9	Araştırmanın Güçlü Yanları ve Sınırlılıkları	72

4.10	Etik Kurul Onayı	72
5	BULGULAR	73
5.1	Deneyisel Verilerin Değerlendirilmesi	73
5.1.1	<i>Vücut ağırlıklarının değerlendirilmesi</i>	73
5.1.2	<i>Kan glikozunun değerlendirilmesi</i>	74
5.1.3	<i>Kan basıncının değerlendirilmesi</i>	76
5.2	Işık Mikroskopik Bulgular	77
5.3	Renal hasarın histomorfometrik değerlendirilmesi	98
5.3.1	<i>Bowman Dış Yaprak Kalınlık Ölçümleri (μm)</i>	98
5.3.2	<i>Glomerül başına düşen nukleus sayısı (μm)</i>	99
5.3.3	<i>Glomerül Çapı Ölçümleri (μm)</i>	100
5.3.4	<i>Renal skar alanının değerlendirilmesi (μm^2)</i>	101
5.3.5	<i>Glomerüller Sklerozun değerlendirilmesi</i>	102
5.4	Elektron Mikroskopik (Ultrastrüktürel) Bulgular	103
5.4.1	<i>Elektron mikroskopik (Ultrastrüktürel) olarak GBM ve BDY Kalınlık Ölçümleri</i>	112
5.5	İmmunohistokimyasal Bulgular	116
5.6	Biyokimyasal Bulgular	137
5.6.1	<i>Serum BUN düzeyleri</i>	137
5.6.2	<i>Serum kreatinin düzeyleri</i>	139
5.7	Korelasyon Analizleri	141
6	TARTIŞMA	142
7	SONUÇ VE ÖNERİLER	163
8	KAYNAKLAR	164
9	EKLER	180
9.1	EK 1 : Tezin Etik Kurul Rapor Örneği	180
9.2	EK 2: Arbis Özgeçmiş Formu	181

SEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Böbreğin damarlanması	9
Şekil 2: Renal korpuskülün yapısı.	12
Şekil 3: Glomerüler bazal membran (GBM) yapısı.	13
Şekil 4: GBM'nin ultrastrüktürel yapısı.....	14
Şekil 5: Nefron ve böbrek tübüllerinin yapısı	16
Şekil 6: Plazma klirens hesaplaması.	20
Şekil 7: Hipertansiyonda renal hasar oluşum mekanizması.....	40
Şekil 8: Antioksidanların sınıflandırılması	52
Şekil 9: Lipoik asitin kimyasal yapısı	53
Şekil 10: 5/6 Nf modelinin oluşturulması..	59
Şekil 11: Karotis arterden kan basıncı ölçümü.	60
Şekil 12: MP30 Biopac Sistemi ile kan basıncı ölçümü örnekleri.....	60
Şekil 13: Böbreğin histomorfometrik incelenmesi.	68
Şekil 14: Renal hasarın image tool analiz programı ile ölçümleri.	70
Şekil 15: Deneklerin deney başlangıcı ve deney sonu ağırlıkları.	74
Şekil 16: Deneklerin deney başlangıcı ve deney sonu kan glikoz değerleri.	75
Şekil 17: Deney sonu karotis arterden KB ölçümleri.....	76
Şekil 18: Kontrol grubu HE boyanması..	78
Şekil 19: Kontrol grubu HE boyanması.	78
Şekil 20: Kontrol grubu PAS boyanması.	79
Şekil 21: Kontrol grubu MT boyanması.	79
Şekil 22: DM grubu HE boyanması.	80
Şekil 23: DM grubu HE boyanması.....	81
Şekil 24: DM grubu PAS boyanması.	81
Şekil 25: DM grubu MT boyanması	82

Şekil 26: 5/6 Nf grubu HE boyanması.	83
Şekil 27: 5/6 Nf grubu HE boyanması.	83
Şekil 28: 5/6 Nf grubu PAS boyanması.	84
Şekil 29: 5/6 Nf grubu PAS boyanması.	84
Şekil 30: LA grubu HE boyanması.	86
Şekil 31: LA grubu HE boyanması.	86
Şekil 32: LA grubu PAS boyanması.	87
Şekil 33: LA grubu MT boyanması.	87
Şekil 34: 5/6 Nf+DM grubu HE boyanması.	88
Şekil 35: 5/6 Nf+DM grubu HE boyanması.	89
Şekil 36: 5/6 Nf+DM grubu PAS boyanması.	89
Şekil 37: 5/6 Nf+DM grubu MT boyanması.	90
Şekil 38: DM+LAT grubu HE boyanması.	91
Şekil 39: DM+LAT grubu HE boyanması.	91
Şekil 40: DM+LAT grubu PAS boyanması.	92
Şekil 41: DM+LAT grubu MT boyanması.	92
Şekil 42: 5/6Nf+LAT grubu HE boyanması.	93
Şekil 43: 5/6Nf+LAT grubu HE boyanması.	94
Şekil 44: 5/6Nf+LAT grubu PAS boyanması.	94
Şekil 45: 5/6Nf+LAT grubu MT boyanması.	95
Şekil 46: 5/6Nf+DM+LAT grubu HE boyanması.	96
Şekil 47: 5/6Nf+DM+LAT grubu HE boyanması.	96
Şekil 48: 5/6Nf+DM+LAT grubu PAS boyanması.	97
Şekil 49: 5/6Nf+LAT grubu MT boyanması.	97
Şekil 50: BDY kalınlıkları.	99
Şekil 51: Glomerül Başına Düşen Nukleus Sayısı.	100

Şekil 52: Glomerül Çapı Ölçümü.....	101
Şekil 53: İntersitisiyel Fibrozis Alanı Ölçümü	102
Şekil 54: Glomerüler skleroz skorlaması.	103
Şekil 55: Kontrol grubunun ince kesiti	104
Şekil 56: Kontrol grubunun ince kesiti..	104
Şekil 57: DM grubu ince kesiti.	105
Şekil 58: DM grubu ince kesiti	105
Şekil 59: 5/6 Nf grubu ince kesiti.	106
Şekil 60: 5/6 Nf grubu ince kesiti..	106
Şekil 61: LA grubu ince kesiti.....	107
Şekil 62: LA grubunun ince kesiti	107
Şekil 63: 5/6 Nf+DM grubu ince kesiti.....	108
Şekil 64: 5/6 Nf+DM grubu ince kesiti.....	108
Şekil 65: DM+LAT grubu ince kesiti.....	109
Şekil 66: DM+LAT grubu ince kesiti.....	109
Şekil 67: 5/6 Nf+LAT grubu ince kesiti.....	110
Şekil 68: 5/6 Nf +LATgrubu ince kesiti.....	110
Şekil 69: 5/6 Nf+DM+LAT grubu ince kesiti.	111
Şekil 70: 5/6 Nf+DM+LAT grubu ince kesiti.	111
Şekil 71: GBM kalınlığı (EM)	112
Şekil 72: BDY kalınlık ölçümü (EM)	113
Şekil 73: BDY kalınlıklarının ultrastrüktürel görüntüleri.	114
Şekil 74: BDY kalınlıklarının ultrastrüktürel görüntüleri.	115
Şekil 75: Kontrol grubu AT1 immunohistokimyası	117
Şekil 76: DM grubu AT1 immunohistokimyası.	118
Şekil 77: 5/6Nf grubu AT1 immunohistokimyası.....	118

Şekil 78: LA grubu AT1 immunohistokimyası.....	119
Şekil 79: 5/6Nf+DM grubu AT1 immunohistokimyası.....	119
Şekil 80: DM+LAT grubu AT1 immunohistokimyası.....	120
Şekil 81: 5/6Nf+LAT grubu AT1 immunohistokimyası.....	120
Şekil 82: 5/6Nf+DM+LAT grubu AT1 immunohistokimyası.....	121
Şekil 83: Kontrol grubu VEGF immunohistokimyası.....	122
Şekil 84: DM grubu VEGF immunohistokimyası.....	123
Şekil 85: 5/6Nf grubu VEGF immunohistokimyası.....	123
Şekil 86: LA grubu VEGF immunohistokimyası.....	124
Şekil 87: 5/6 Nf+DM grubu VEGF immunohistokimyası.....	124
Şekil 88: DM+LAT grubu VEGF immunohistokimyası.....	125
Şekil 89: 5/6Nf+LAT grubu VEGF immunohistokimya.....	125
Şekil 90: 5/6Nf+DM+LAT grubu VEGF immunohistokimyası.....	126
Şekil 91: Kontrol grubu ET-1 immunohistokimyası.....	127
Şekil 92: DM grubu ET-1 immunohistokimyası.....	128
Şekil 93: 5/6Nf grubu ET-1 immunohistokimyası.....	128
Şekil 94: LA grubu ET-1 immunohistokimyası.....	129
Şekil 95: 5/6Nf+DM grubu ET-1 immunohistokimyası.....	129
Şekil 96: DM+LAT grubu ET-1 immunohistokimyası.....	130
Şekil 97: 5/6Nf+LAT grubu ET-1 immunohistokimyası.....	130
Şekil 98: 5/6 Nf+DM+LAT grubu ET-1 immunohistokimyası.....	131
Şekil 99: Kontrol grubu ET-1 immunohistokimyası.....	133
Şekil 100: DM grubu ET-1 immunohistokimyası.....	133
Şekil 101: 5/6Nf grubu ET-1 immunohistokimyası.....	134
Şekil 102: LA grubu ET-1 immunohistokimyası.....	134
Şekil 103: 5/6Nf+DM grubu ET-1 immunohistokimyası.....	135

Şekil 104: DM+LAT grubu ET-1 immunohistokimyası.....	135
Şekil 105: 5/6Nf+LAT grubu ET-1 immunohistokimyası.....	136
Şekil 106: 5/6 Nf+DM+LAT grubu Kaspaz-3 pozitif	136
Şekil 107: Deney başlangıcı ve sonu serum Bun değeri ölçümleri.....	138
Şekil 108: Deney sonu serum kreatinin ölçümleri.	140
Şekil 109: Korelasyon Değerleri.....	141

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Diabetes Mellitus'un Etyolojik Sınıflandırılması	26
Tablo 2: Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kriterlerine göre Oral Glikoz Tolerans Testi Değerleri	28
Tablo 3: Hipertansiyon Sınıflaması.....	36
Tablo 4: Işık mikroskopik doku takip metodu.....	61
Tablo 5: Hematoksilen-Eozin boyama metodu	62
Tablo 6: PAS boyama metodu.....	63
Tablo 7: Masson's Trikróm boyama metodu.....	64
Tablo 8: İmmunohistokimyasal Boyama Metodu	66
Tablo 9: Elektronmikroskopik doku takip metodu.....	67
Tablo 10: AT1 immunohistokimyası değerlendirilmesi.....	116
Tablo 11: VEGF immunohistokimyası değerlendirilmesi.....	122
Tablo 12: ET-1 immunohistokimyası değerlendirilmesi.....	127
Tablo 13: Kaspaz-3 immunohistokimyası değerlendirilmesi.....	132

KISALTMALAR

•OH	:	Hidroksil radikali
5/6 Nf	:	5/6 nefrektomi
ABD	:	Amerika Birleşik Devleti
ACE	:	Anjiyotensin dönüştürücü enzim
ADH	:	Antidiüretik hormon
Ang II	:	Anjiyotensin II
ANF	:	Atrial natriüretik factor
APG	:	Açlık plazma glikozu
AT1	:	Anjiyotensin 1 reseptörü
AT2	:	Anjiyotensin 2 reseptörü
ATP	:	Adenosintrifosfat
BDYK	:	Bowman dış yaprak kalınlığı
BGT	:	Bozulmuş glikoz toleransı
BHR	:	Borderline hipertansif rat
CAT	:	Katalaz
Cl	:	Klor
DHLA	:	Dihidrolipoik asit
DKA	:	Diyabetik ketoasidoz
DM	:	Diabetes Mellitus
DNP	:	Diyabetik nefropati
DOCA	:	Deoksikortikosteron asetat
EGÜ	:	Erken glikasyon ürünleri
EM	:	Elektron mikroskop
ESS	:	Ekstrasellüler sıvı
ET	:	Endotelin
ET1	:	Endotelin 1
GAD	:	Glutamat dekarboksilaz

GBM	:	Glomerüler bazal membrane
GFH	:	Glomerüler filtrasyon hızı
GSH-Px	:	Glutasyon peroksidaz
H	:	Hidrojen
H₂O₂	:	Hidrojen peroksit
HbA1c	:	Hemoglobin A1c
HDL	:	Yüksek dansiteli Lipoprotein
HLA	:	İnsan lökosit antijeni
HO₂[•]	:	Hidroperoksil radikali
HOCl	:	Hipoklorik asid
IDDM	:	İnsüline bağımlı Diabetes Mellitus
İGÜ	:	İleri glikasyon ürünleri
JNC7	:	Joint of National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure
K	:	Potasyum
LA	:	Lipoik asit
L1-L2	:	Lumbar 1-2
LD50	:	Letal doz
LDL	:	Düşük dansiteli lipoprotein
L-NAME	:	Nonselektif nitrik oksid sentetaz inhibitörü
Mg	:	Magnezyum
MODY	:	Erişkin tip diyabeti (Maturity onset diabetes of the young)
MT	:	Masson trikrom
Na	:	Sodyum
NaCl	:	Sodyum klorür
NF-kB	:	Nükleer faktör kappa beta
NGT	:	Normal glikoz toleransı
NH₃	:	Amonyak
NIDDM	:	İnsüline bağımlı olmayan Diabetes Mellitus

NKHD	:	Nonketotik hiperosmolar durum
NO	:	Nitrik oksid
NO₂[•]	:	Nitrojen oksidler
O₂[•]	:	Süperoksit radikali
O₂	:	Singlet oksijen
O₃	:	Ozon
ONO	:	Peroksinitrit
OsO₄	:	Osmiyum tetroksit
PAI-1	:	Plazminojen aktivör inhibitör
PAS	:	Periodik asit Schiff
PKC	:	Protein kinaz C
PIGF	:	Plasental büyüme faktörü
RAS	:	Renin anjiyotensin sisteminin
RIĞÜ	:	İleri glikasyon ürünleri reseptörü
RO[•]	:	Alkoksil radikali
RO₂[•]	:	Peroksil radikali
ROT	:	Reaktif oksijen türleri
SDBY	:	Son dönem böbrek yetmezliği
STZ	:	Streptozotosin
TGF-β	:	Dönüştürücü büyüme faktörü-beta1
TUNEL	:	Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) to transfer biotin-dUTP nick and labeling
VEGF	:	Vasküler endoteliyal büyüme faktörü
VP	:	Vazopressin
WHO	:	Dünya Sağlık Örgütü

1 ÖZET

DENEYSEL OLARAK HİPERTANSİYON VE DİYABET OLUŞTURULMUŞ RATLARDA GLOMERÜLER DEĞİŞİKLİKLERİN ELEKTRONMİKROSKOPİK VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ

Serap Cilaker Mıcılı

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı, Balçova, İzmir.

Diabetes Mellitus ve hipertansiyonun birlikte seyretmesi böbrek hasarı üzerinde ilerletici etki göstermektedir. Bu çalışmada, ayrı ayrı ve birlikte deneysel diyabet ve nefrektomi modelleri uygulandı ve bu hastalıkların böbrek üzerindeki etkilerinin ultrastrüktürel ve immunhistokimyasal olarak değerlendirilmesi ve bir antioksidan olan lipoik asidin olası tedavi edici etkisinin incelenmesi amaçlandı.

Çalışmamızda Wistar suşu ratlar 8 gruba (n=7) ayrıldı. I. grup; Kontrol, II. grup DM, III. grup; 5/6 Nf, IV. grup LA, V. grup 5/6 Nf+DM, VI. grup DM+LAT, VII. grup 5/6 Nf+LAT ve VIII. grup 5/6Nf+DM+LAT. Diyabet modeli 45mg/kg STZ enjeksiyonu ile oluşturuldu ve hipertansiyon modeli için 5/6 nefrektomi modeli uygulandı. dl- α -Lipoic acid 30mg/kg/gün olacak şekilde 8 hafta oral gavaj yöntemi ile deneklere uygulandı. Böbrek dokusu HE, Masson Trikrom ve PAS boyası ile boyandı. İmmünohistokimyasal olarak AT1, VEGF ve ET-1 ve Kaspaz-3 antikorları işaretlendi. Ultrastrüktürel olarak GBM ve Bowman dış yaprak kalınlıkları ölçüldü. Biyokimyasal olarak kan örneklerinde kreatinin ve BUN değerleri incelendi.

Diyabet ve nefrektomi modellerinin ayrı ayrı ve birlikte uygulandığı deneysel gruplarda glomerüllerde, glomerüloskleroz yapıları, mononükleer hücre infiltrasyonu, intersitisiyel fibrozis, damarlarda ve tübüllerde dilatasyon ve hiyalin materyal birikimi ile tübüler yapıların dejenerasyonu gözlemlendi. Renal hasar histomorfometrik olarak değerlendirildiğinde Bowman dış yaprak kalınlığı, glomerül çapı, glomerül/çekirdek oranı, Bowman dış yaprak kalınlığı, renal skar alanı ve glomerüloskleroz değerleri ve ultrastrüktürel olarak GBM ve BDYK'ları diyabet ve nefrektomi uygulanan gruplarda artmıştı. Tübülointersitisiyel ve glomerüler AT1 azalırken, VEGF, ET-1 ve Kaspaz-3 artış göstermişti.

Aynı gruplarda kreatinin ve BUN değerleri artmıştı. LA verilen gruplarda ise değerlerin kontrol grubuna yakın olduğu gözlemlendi.

Elde ettiğimiz veriler ışığında, diyabet ve hipertansiyonun birlikte gözlenmesinin böbrek hasarının hızlı ilerlemesine neden olduğu, lipoik asidin bu hastalıklara karşı böbrek üzerinde koruyucu/tedavi edici etkisinin olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Böbrek, nefrektomi, Diabetes Mellitus, ultrastrüktür, immunhistokimya

SUMMARY

THE ELECTRONMICRSOSCOPIC AND IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION OF GLOMERULAR CHANGES IN AN EXPERIMENTALLY INDUCED HYPERTENSIVE AND DIABETIC RAT MODEL

Serap Cilaker Mıcılı

Dokuz Eylül University, Health Science İnstitüte, Department of Histology and Embryology, Balçova, İzmir

The concurrence of Diabetes Mellitus and hypertension has a progressive effect on renal damage. In this study experimental diyabetes and nephrectomy have been applied together and separately to evaluate their effects on kidneys both ultrastructurally and immunohistochemically and to investigate lipoic acid, an antioxidant as a possible therapeutic agent.

Wistar rats were divided into 8 groups (n=7). Group I; Control, group II; DM, group III; 5/6 Nx, group IV; LA, group V; 5/6 Nx+DM, group VI; DM+LAT, group VII; 5/6 Nx+LAT and group VIII; 5/6Nx+DM+LAT. Diyabetes was formed by 45mg/kg STZ injection and for hypertension nephrectomy 5/6 model was applied. dl- α -Lipoic acid 30mg/kg/day was fed by oral gavage for 8 weeks. Kidney tissue was stained by HE, Masson Trikrom and PAS. AT1, VEGF, ET-1 and Caspase-3 antibodies were labelled immunohistochemically. GBM and bowman outer shell thickness were measured ultrastructurally. Creatinine and BUN levels were measured in blood biochemically.

In groups where diyabetes and nephrectomy were applied separately and together, glomerulosclerosis, mononuclear cell infiltration, interstitial fibrosis, vascular and tubular dilatation and hyalin deposition and degeneration of tubular structures were seen in glomerules. When renal damage was evaluated histomorphometrically, bowman capsul thickness, glomerule diameter, glomerule/nucleus ratio, renal scar area and glomerulosclerosis values, and ultrastructural GBM and BCT were increased in diyabetes and nephrectomy groups. Tubulointerstitial and glomerular AT1 was decreased but VEGF, ET-1 and Caspase-3 were increased. Creatinine and BUN values were increased in the same groups. Groups which were given LA had values similar to the control group.

In the light of these results we have come to the conclusion that diabetes and hypertension together increases the rate of renal injury and lipoic acid has a protective/therapeutic effect on kidneys.

Key words: Kidney, nephrectomy, Diabetes Mellitus, ultrastructure, immunohistochemistry

2 GİRİŞ VE AMAC

Diabetes Mellitus (DM), hiperglisemi, dislipidemi, glikozüri ve bunlara eşlik eden bir grup metabolik bozukluğu içine alan kronik bir metabolik hastalıktır (14, 15). Hipertansiyon ise mikrovasküler ve makrovasküler hastalıklar için bilinen bir risk faktörü olup diyabeti olan bireylerde oldukça yaygın bir durumdur. Normal popülasyona göre diyabeti olan bireylerde iki kat daha fazla gözlenir. Günümüzde hızla artan ve toplumlarda çok sık olarak rastlanan diyabet ve hipertansiyonun birlikte gözleendiği durumlar, progresyonu hızlı gelişen böbrek hasarına neden olmaktadır. Diyabet ve hipertansiyon kronik böbrek yetersizliği olgularının yaklaşık yarısından sorumludur (119).

Diyabetik nefropatide, hiperglisemi sonucunda solübl faktörlerin etkileşimi (büyüme faktörleri, AT II, endotelin (ET), ileri glikasyon ürünler (İGÜ), renal mikrosirkülasyonda hemodinamik değişiklikler (glomerüler hiperfiltrasyon, glomerüler kapiller basınçta artış), glomerüllerde yapısal değişiklikler (ekstrasellüler matrikste artış, bazal membran kalınlaşması, mezenjiyal genişleme, fibrozis) gözlenir (15, 17). Hipertansif renal hasar patofizyolojisi ise farklı seyretmekte ve preglomerüler vasküler dilatasyon ve bozulmuş renal otoregülasyon sistemik kan basıncı yükünün büyük bir oranda renal mikrovasküler yatağa yansımaya neden olmaktadır. Bu nedenle, hasar vasküler yapıdan daha fazla glomerüler düzeyde gerçekleşmektedir (122). Hipertansiyonun tek başına böbrek hasarı üzerine etkileri tartışmalı iken, diyabetik nefropatisi olan deneklere sistemik hipertansiyon eklendiğinde glomerüloskleroz gelişiminin arttığı gözlenmiştir.

Deneysel olarak diyabet ve hipertansiyon modelleri cerrahi ve kimyasal yollar ile gerçekleştirilmektedir. Literatüre baktığımızda hipertansiyon ve diyabetin böbrek üzerine etkilerinin birlikte incelendiği deneysel çalışmalar genellikle spontan hipertansif ratlara streptozotosin (STZ) uygulanması, transgenik farelere STZ uygulanması ile diyabet oluşturulması şeklindedir. Klinik çalışmalarda ise prospektif olarak tip II diyabeti olan ve olmayan hipertansif bireylerde böbrek hasarı değerlendirilmiştir (124, 125, 126). Bizim çalışmamız ise deneysel olarak cerrahi yolla 5/6 nefrektomi modeli kullanılarak deneysel hipertansiyon oluşturulan ve STZ ile diyabet eklenen ilk çalışma modelidir ve literatüre bu modelin de katkısı olacağı düşünülmektedir.

Diyabet ve remnant (kalan) böbrek modellerinin patogenezi böbrekte mezangiyal hücre proliferasyonunu, ekstrasellüler matriks birikimini, glomerüler hipertrofini, epiteliyal hücre hasarını, makrofaj infiltrasyonu ve glomerüler skleroz oluşumunu içerir. Biz de çalışmamızda literatüre benzer şekilde böbreğin histolojik ve histomorfometrik özelliklerini sayısal olarak değerlendirmek amacıyla glomerüler skleroz, renal skar alanı ölçümü, glomerül başına düşen çekirdek sayısını hesapladık (28, 108, 129 130, 138). Aynı zamanda ölçümlemimize bowman dış yaprak kalınlığı ve glomerül çapı gibi ölçümleri de ekleyerek parametrelerimizi arttırdık. Bu parametreler arasındaki korelasyonların belirlenmesi ile literatüre katkı sağlayacağını düşündük.

Diyabetik böbrekte glomerül yapısı ultrastrüktürel olarak incelendiğinde glomerüler bazal membranda ve mezangiyal matriskte artış ve foot proces efasmanı gözlenmiştir. Nefrektomi modellerinde de benzer şekilde hücresel hipertrofi, foot proces efasmanı, glomerüler kapiller loop dilatasyonu, endoteliyal hücrelerde ve bazal membranda yapısal anormallikler olarak tanımlanmıştır (142, 143). Biz de ışık mikroskopik bulgularımızı desteklemek amacıyla elektron mikroskopik olarak glomerüler bazal membran ölçümü ve bowman dış yaprak kalınlık ölçümleri yaptık.

Diyabette, dolaşımdaki renin anjiyotensin sistemi baskılanırken, böbrek dokusundaki renin anjiyotensin sisteminin (RAS) sistemi aktive olmaktadır. Hiperglisemi sonucu indüklenen oksidatif stres, endoteliyal hasar, vazokonstriksiyon, trombozis, inflamasyon sonucunda dokuda AII artar. AII'nin etkileri plazma membranında bulunan AT1 ve AT2 reseptörlerinin alt tipleri aracılığı ile gerçekleşir. RAS sistemi ayrıca hipertansiyonu etkileyen, kan basıncının düzenlenmesinde ve hücre dışı sıvı hacminin korunmasında da önemli rol oynar. İntraglomerüler basıncın artışı hem kapiller hasara yol açması, hem de proteinüriyi artırması açısından sakıncalıdır. Proteinüri sonucunda böbrek hasarı oluşmaya başlar. Diabetes Mellitus RAS aktivasyonu kadar PKC aktivasyonu, sitokin ve büyüme faktörlerinin aktivasyonu ve bunun sonucunda da birçok patolojik durum ile birlikte seyretmektedir. Hiperglisemi sonucunda AII, vasküler endoteliyal büyüme faktörü (son dönemlerde diyabetik nefropati patogenezinde gözlenen bir sitokin) ve bir vazokonstriktör olan endotelin de artmaktadır. Diyabetik böbreklerde glomerüler endotel üzerinde VEGF reseptörlerinin de artmış olduğu gösterilmiştir (165). Ancak ileri aşamadaki DM'lerde, şiddetli glomerüloskleroz gözlenmesi durumunda VEGF'in azaldığı ve bu azalmanın podosit kaybı ile

ilişkili olduğu düşünülmüştür (166). Ayrıca VEGF tedavisinin remnant böbrek modelinde endotelial proliferasyon, kapiller yoğunluğunun devamı, interstisiyel fibrozisin azalması ve renal fonksiyonların stabilizasyonunu sağladığını göstermişlerdir (175). ET-1'in mezengiyal hücrelerde diyabetik nefropatide hiperglisemi nedeniyle artış gösterdiğini bildirmişlerdir (178). Biz de literatürde diyabette, hipertansiyon modellerinde ayrı ayrı ve diyabet+hipertansiyon modelinin birlikte uygulandığı gruplarda immunhistokimyasal olarak AT1, VEGF ve ET-1 moleküllerinin kombine edildiği bir çalışmaya rastlayamadık.

Programlı hücre ölümü olan apoptozis böbrek hastalıklarında farklı etkiler göstermektedir. Bazı deneysel çalışmalarda apoptozisin iyileşme evresinde mezengiyal, tübüler ve endotelial hücrelerin sayısal düzenlenmesinde rol aldığı ileri sürülürken, diğer taraftan böbrekteki sklerotik süreçten sorumlu olduğu düşünülmüştür (70). Biz de böbrekteki hasar mekanizmasına ek olarak apoptozisin hücrede başlama belirtisi olan kaspase-3 antikorunun dağılımını incelemeyi amaçladık. Diyabetik nefropati mekanizmasında da nefrektomi modellerinin uygulandığı deneysel çalışmalarda da başlangıçta doku turn-overında homeostazi sağlayacak kadar olması beklenirken, ilerleyen zamanlarda apoptoz oranında değişiklikler gözlenmiş, ancak glomerüler ve tübüler hasarın artışı son dönemlerde apoptozisde oldukça artmış olarak gözlenmiştir (192).

Diyabet kronik metabolik bir hastalıktır ve aynı zamanda artmış bir oksidatif stres durumudur. Artan serbest radikaller lipidler, proteinler ve nükleik asitler ile etkileşerek membran bütünlüğünün kaybına proteinlerde yapısal ve fonksiyonel değişikliklere ve genetik mutasyonlara yol açar. Organizma ise bu zararlı radikallerin etkisinden kurtulmak için enzimatik ve non-enzimatik antioksidan savunma sistemlerine sahiptir. Ayrıca eksojen olarak alınabilen antioksidanlar ile serbest radikallerin etkileri ile savaşmaya çalışılmaktadır. Alfa lipoik asid ağır metallerle oluşan zehirlenmelerde detoksifikasyon ajanı olarak kullanılan bir antioksidandır. Antioksidan özelliği kendisinin dihidro lipoik aside indirgenirken, serbest radikalleri temizlemesinden ve metal iyonlarıyla şelat yapmasından kaynaklanmaktadır. Hücrelerin glikoz kullanımını arttırdığı için diyabet tedavisinde de kullanılmaktadır (131). Spontan hipertansif ratlarda kan basıncını düşürdüğü gözlenmiştir (135). Bilinen bu etkileri nedeniyle diyabet ve hipertansiyonun ayrı ayrı ve birlikte oluşturulduğu gruplarda lipoik asidin tedavi etkisinin incelendiği çalışmaya literatürde rastlamamamız nedeniyle bu araştırmada lipoik asidi kullanmayı planladık.

3 **GENEL BİLGİLER**

3.1 **Böbreğin (REN, NEPHROS) Temel Yapısı ve Anatomisi**

Böbrekler retroperitoneal bölgede, kolumna vertebralis'in iki yanında, T12-L3 seviyesinde bulunan erişkin erkeklerde her biri yaklaşık 125-170 gr, kadınlarda ise 115-155 gr ağırlığında olan organlardır. Karaciğerin konumu nedeniyle sağ böbrek sol böbrekten 1-2 cm aşağıda yerleşmiştir. Makroskopik olarak dışta fibröz bir kapsül, kapsülün altında korteks ve en içte medulla bulunur. Her böbreğin konkav olan medial kenarındaki vertikal yarık hilum renale'dir. Buradan arteria renalis sinus renale girer, vena renalis ve pelvis renalis çıkar (1, 2, 3). Her böbreğin anterior (Facies anterior) ve posterior yüzü (Facies posterior), medial (Margo medialis) ve lateral kenarı (Margo lateralis), superior (Extremitas superior) ve inferior ucu (Extremitas inferior) vardır. Lateral kenarı dış bükey, medial kenarı içbükeydir ve medial kenarında sinus renalis ve pelvis renalis yer alır. Çentikli medial kenar ise böbreğe özgü fasulye şeklinde görüntüyü verir (2, 4). Böbrekleri içten dışa doğru kapsula fibrosa denen fibröz kılıf, kapsula adiposa denen perirenal yağ tabakası ve bir kese gibi tüm bu oluşumları içine alan fascia renalis ile sarılıdır.

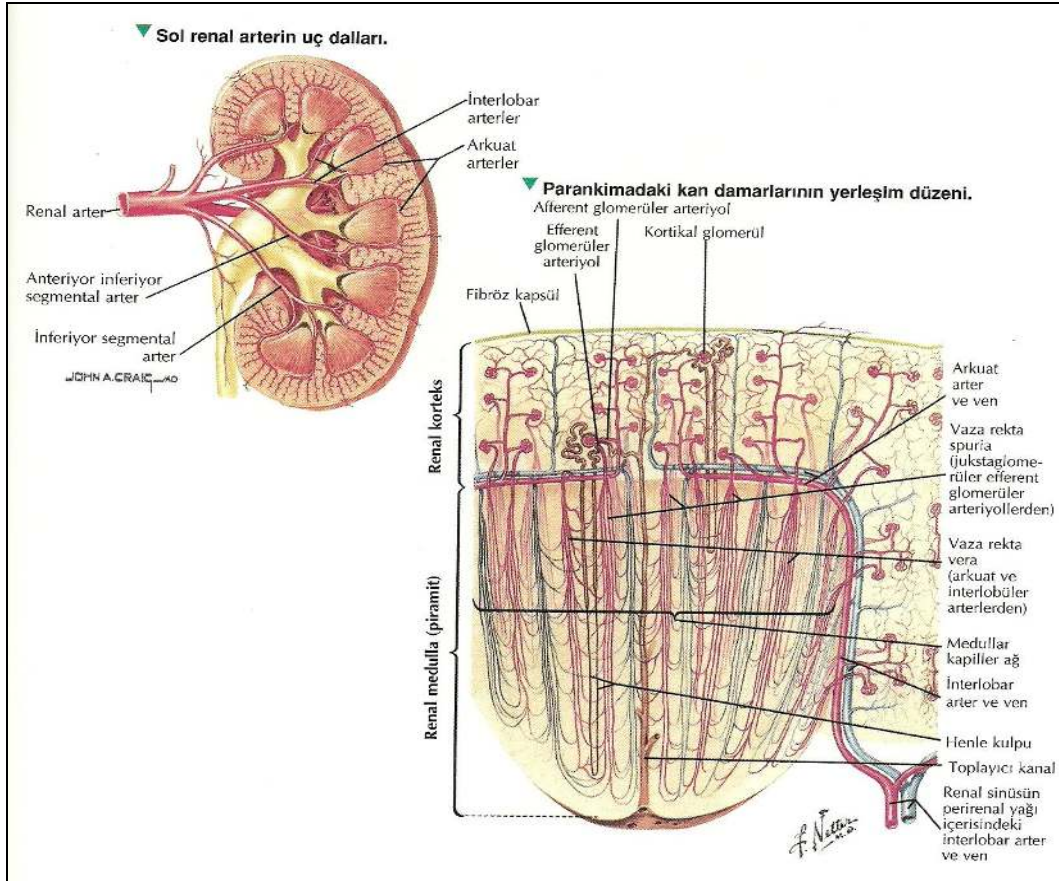
3.1.1 **Böbreğin Damarlanması**

Arteria renalisler L1 ve L2 vertebraları arasındaki intervertebral disk hizasında aorta abdominalis'den çıkarlar. Daha uzun olan sağ a. renalis v. cava inferiorun arkasından geçer. Her arter hilumun yakınında beş segmental uç (end) artere ayrılır. Bu segmentler yerleşimlerine göre; segmentum superior uçta, segmentum inferiorus alt uçta, segmentum anterieus-superius ve segmentum anterieus-inferius ön yüzün orta kısmında, segmentum posterius arka yüzün orta kısmında bulunur. A. segmentalis superior (apikal) superior segmente, a.segmentalis anterosuperior anterosuperior segmente ve a. segmentalis anteroinferior segmente ve a. segmentalis inferior segmente dağılır. Bu arterler a.renalis'in anterior dalından çıkarlar. A. segmentalis posterior, a.renalis'in posterior dalının devamıdır ve böbreğin posterior segmentini besler (2, 4). A. segmentalislerin dördü pelvis renalis'in önünden geçerken segmentum posterius'a ait olan dal arkasından geçer. Ön ve arka dallar daha sonra sinus renalis'de tekrar dallanır.

Oksijenlenmiş kan renal arterden gelir, renal arter renal sütunlar içinden piramitlerin kenarları boyunca medullayı geçen birçok loblararası arterlere (interlobar) ayrılır. Korteks-medulla kavşağında interlobar arterler arkuat arterleri oluştururlar ve yatay olarak devam

ederek korteks-medulla sınırı boyunca devam ederler. Arkuat arterlerden çıkan dikey dallar olan lobçuklararası (interlobüler) arterler kortekse girer. Lobçuklararası arterler dış kortekse yükselerek afferent glomerüler arteriyolları oluşturmak üzere dallanırlar.

Afferent glomerüler arteriyol glomerüler kapiller ağı oluşturur ve efferent glomerüler arter olarak devam eder (arteriyel portal sistem). Efferent arteriyoller kapsülaltı bölgeye yakın yerde peritübüller kapiller ağı oluşturur. Jukstamedüller bölgeye yakın olan efferent glomerüler arteriyoller vaza rektayı oluşturur. Peritübüler kapiller ağ önce stellat vene, ardından lobçuklararası (interlobüler) vene boşalır. Lobçuklararası venler arkuat veni oluşturmak üzere birleşirler ve renal ven ile devam ederler (5) (Şekil 1).



Şekil 1: Böbreğin damarlanması (6).

3.1.2 Böbreğin Lenfatik Dolaşımı

Renal lenf damarları renal venleri takip eder ve lumbal lenf nodlarına (nodi lymphatici lumbales) dökülürler (2, 4).

3.1.3 Böbreğin Sinir İnnervasyonu

Böbrekler başlıca sinirlerini çölyak pleksustan alırlar ve daha az olarak süperfisial hypogastric plexus ve torasik, üst splanchnicus ve intermezenterik sinirlerden alırlar. Sempatik liflerinin splanchnicus minor ve n. splanchnicus minimus'dan, parasempatiklerini ise n. vagus'dan alır. Preganglionik sempatik ve parasempatik lifler a. renalis üzerindeki plexus renalis içindeki ganglionik nöronlarla sinaps yapar, postganglionik sempatik lifler ise a. renalis'in böbrek içindeki dallarında dağılırlar. Sempatiklerin vazokonstriktör etkisi ile damardan geçen kan miktarı azalır ve bunun sonucunda kandan süzülen idrar miktarı azaltılmış olurken, parasempatik sinirler a. renalis'in dalları boyunca böbreğe dağılır ve vazodilatör etki gösterir (4, 7).

3.2 Böbreğin Histolojisi

Böbrekler dıştan bir bağ doku kapsülü ile sarılıdır. Bu kapsülün dış tabakası fibroblast hücreleri ve kollajen fibrillerden oluşurken, iç tabakası miyofibroblastların oluşturduğu hücresel tabakadan meydana gelir. Böbreğin medial kısmında kan ve lenf damarlarının böbreğe girip çıktığı hilus bulunur.

Böbreğe çıplak gözle bakıldığında kırmızımsı koyu renkli korteks ve içte açık renkli 12-18 adet piramid ya da koni şekilli renal piramitleri içeren medulla gözlenir (3). Bu renal piramitlerin apikal yüzleri hiluma doğru uzanan papilla renalisleri yaparken, bazal yüzleri kortekse bakar. Papilla renalislerin uç kısımlarında böbrek tübüllerinin kaliks minörlere açıldığı 20 kadar foramina papillare'ler bulunur. Papillaların delikli tepe kısımları area kribroza adını alır. Bu piramitleri dıştan ve yanlardan korteks çevreler ve iki piramit arasında yer alan kısmına Bertini sütünü denir. Bir piramit ve buna nefronların drene olduğu korteks kısmı beraber böbrek lobunu ifade eder (3, 6, 7).

Böbrek lobçuğu, iki komşu çıkan lobçuklararası (interlobüler) arterle yan yana gelen korteks bölümüdür. Metanefrik blastemdeki primitif lopların kaynaşma bölgelerinden arta kalan yapılar olan Bertini sütunları bir böbrek lobunun sınırını oluşturur. Her böbrek lobunun tepesi minör kaliksle çevrelenen papillada sonlanır. Her minör kaliks bir papilladan gelen

idrarı toplar. Minör kaliksler major kaliksleri, ardından da pelvisi oluşturmak üzere birleşirler (5).

3.2.1 Nefronların Yapısı

Böbreğin işlevsel temel birimi nefronlar ve kollektör (toplayıcı) tübüllerden oluşan ürinifer tübüllerdir. Her iki böbrekte yaklaşık 2 milyon nefron vardır. Kortekste glomerüller, proksimal ve distal tübüller ve dış kortekste nefronların Henle kulpları bulunur. Medullada ise toplayıcı kanallar, henle kulpları ve vasa rektalar bulunur. Medullada bulunan toplayıcı kanallar sırasıyla küçük kaliks, büyük kaliks ve pelvis renalise açılır. Nefronlar böbrek dokusu içinde ilerledikleri derinliğe göre kortikal (subkapsüller) nefronlar ve jukstaglomerüler nefronlar (tüm nefronların 1/5 ve 1/3'üdür) olarak yerleşmektedirler (1, 3, 8).

Nefronlar temel olarak iki kısımdan oluşur.

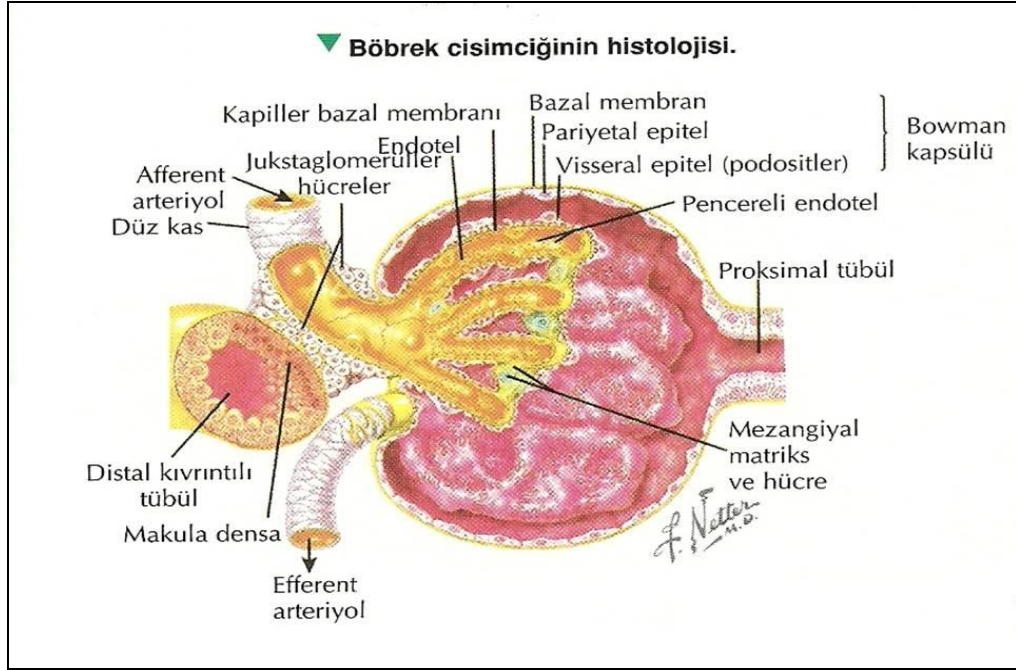
1-Sıvının kandan filtre edildiği renal korpuskül ya da glomerüller yumak.

2-Filtre edilmiş sıvının idrara dönüştüğü tübül kısmı (Proksimal kıvrıntılı tübüller, henle kulpu, distal kıvrıntılı tübülün çıkan parçası)

Renal korpuskül: Dolaşımdan gelen kanın filtre edilerek glomerüler filtratın oluşturulduğu kısımdır. 200-250 mikrometre çapında kapiller yumak ve onu saran 2 tabakalı Bowman kapsülünden oluşur. Glomerüler filtrat Bowman kapsülünün bu iki yaprağı arasında oluşturulur. Her renal korpuskülde afferent arteriolün girdiği ve efferent arteriollün çıktığı bir damar kutbu ve proksimal tübüllerin başladığı yerde idrarın öncüsü olan ultrafiltratın olduğu idrar kutbu bulunur.

Bowman kapsülünün iç yaprağı podosit olarak adlandırılan modifiye epitel hücreleri, dış yaprağı olan pariyetal yaprak ise ince bir bazal lamina üzerine oturan ve ince bir retiküler lif tabakası ise desteklenen tek katlı yassı epitelden oluşur (1, 3, 8).

Visseral yaprağa ait podosit hücreleri glomerüler kapiller yüzeyi tümüyle çevrelereyen ve pediseller denen primer ve sekonder hücresel uzantılara sahiptir (3, 5) (Şekil 2).

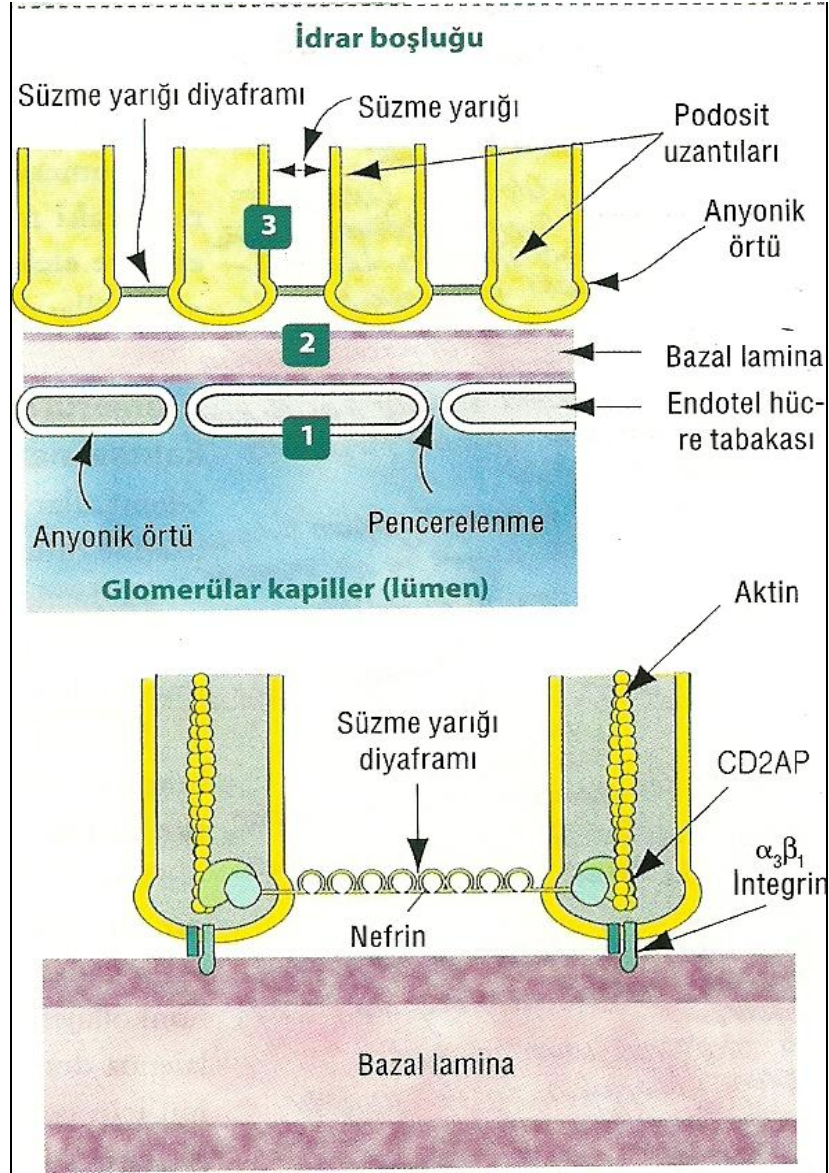


Şekil 2: Renal korpuskülün yapısı (6).

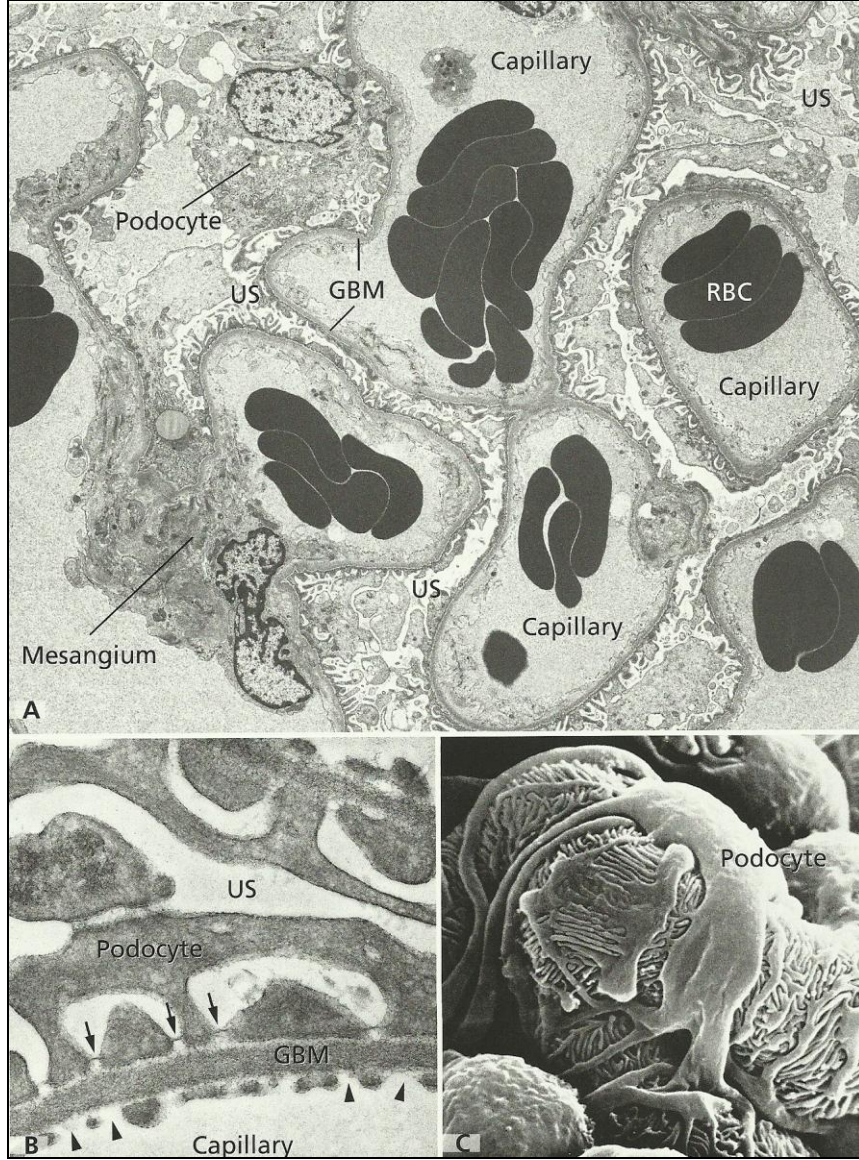
Glomerüler kapillerler pencereleli endotel hücreleri, podosit ayak uzantılarının üzerine oturduğu bir bazal lamina ile örtülüdür. Endotel su, üre, glikoz ve küçük proteinlere geçirgendir. Bazal lamina podositlerce sentezlenirler ve endotel hücre laminası major proteinlerden tip IV kollagen, fibronektin, laminin entaktin gibi glikoproteinler, gliokozaminglikanlar, sialoproteinler ve partiküler heparan sülfat içerir. Bazal laminanın kalınlığı yaklaşık 300 nm.dir (5). İnce yapısına bakıldığında ortada elektron yoğun lamina densa, her iki yanında da daha fazla elektron geçirgen lamina rara tabakası bulunur. Lamina densa tabakası yaklaşık 100 nm kalınlığındadır ve tip IV kollajen içerir. Lamina rara, laminin fibronektin, heparan sülfattan zengin polianyonik proteoglikanlar içerir. Lamina rara, podosit ayaklarının yan tarafında lamina rara externa, kapiller endoteli yanında ise lamina rara interna olarak ayrılır. Bazal lamina bu yapılanma ile lamina densanın fiziksel bir filtre olarak iş gördüğü lamina raradaki anyonik bölgelerin ise elektriksel bir engel oluşturduğu seçici makromolekül filtredir. 10 nm'den büyük partiküllerin geçişine izin vermez. Molekül ağırlığı albuminin molekül ağırlığından (MW 69000) daha fazla olan negatif olan proteinler ise membrandan eser miktarda geçerler (3, 8, 9).

Podositler, glomerüler kapiller yumaktaki pencereleli endotel hücreleri ve bunların ilişkide olduğu bazal lamina glomerüler süzme (filtrasyon) bariyerini oluşturur. Bir podosit ve

komşu podosit hücresinin pediselleri bazal laminayı kaplamak için birbirlerinin içine geçerler ve süzme (filtrasyon) yarıkları ile birbirlerinden ayrılırlar. Süzme yarıkları membranöz bir materyal olan filtrasyon yarığı diyaframı ile birbirlerine bağlanırlar. Pediseller negatif yüklü sialoprotein olan podokaliksinden meydana gelir. Pediseller ise bazal laminaya $\alpha_3\beta_1$ integrin ile tutunurlar. Süzme yarığı diyaframı aktin filamentlerine pedisel içinden CD2AP proteini ile tutunan nefrin proteininden oluşur (5, 9) (Şekil 3, 4).



Şekil 3: Glomerüler bazal membran (GBM) yapısı (5).



Şekil 4: GBM'nin ultrastrüktürel yapısı (10).

Mezangiyum: Mezangiyum glomerüler kapillerler arasında bulunan mezangiyal hücreler ve mezangiyal matriksten oluşur. Glomerül içerisinde bulunan mezangiyal hücreler intraglomerüler mezangiyal hücreler olarak adlandırılırken, glomerül dışında damar kutbuna doğru yerleşmiş olanlar ise extraglomerüler mezangiyal hücreler olarak adlandırılır. Mezangiyal hücreler düz kas hücreleri ve makrofaj özelliğindeki perisit hücreleridir. Çoğalma yeteneğine sahiptirler. Kollajen ve matriks salgırlar, prostoglandin ve endotelin salgılayarak afferent ve efferent glomerüler arteriyollerin kasılmasını uyarırlar (5).

Endotelinler efferent glomerüler arteriyollerin kasılması uyarırlar. Glomerüler kapillerlere mekanik destek sağlarlar, fagositik aktiviteleri ile glomerüler bazal lamina

materyallerinin dönüşümünü kontrol ederler, kasılma aktiviteleri ile kan akışını düzenlerler. Süzme bariyerini geçemeyen immunglopülinler ve komplement moleküller mezengial matrikse girebilirler (5).

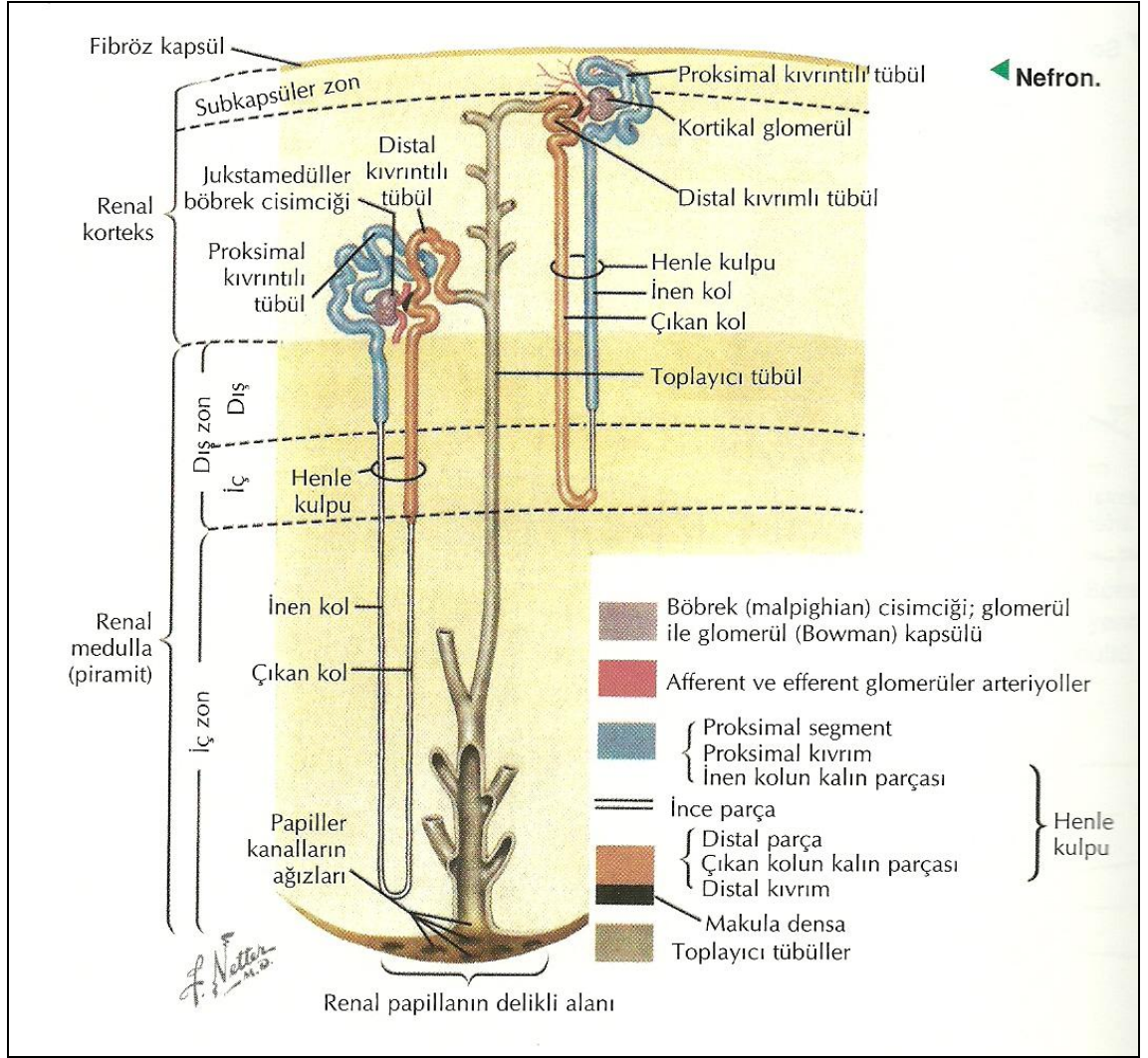
3.2.2 Proksimal kıvrıntılı tübüller

Renal korpuskülün idrar kutbunda bowman kapsülünün pariyetal yaprağının tek katlı yassı epiteli proksimal kıvrıntılı tübüllerde prizmatik epitel şeklinde devam eder. Proksimal kıvrımlı tübüller apikal sıkı bağlantılar ile bir arada bulunan tek katlı kübik ya da prizmatik epitle döşelidir. Üriner boşluktaki plazma ultrafiltratı, aktif ve pasif mekanizmalar ile süzölmüş su, glikoz, sodyum (Na), klor (Cl), potasyum (K) ve diğer katıların %70 kadarının geri emildiği proksimal tübüllere aktarılır. Tübül hücreleri emilim için uygun yapısal özelliklere sahiptir.

Hücrelerde bulunan çok sayıda uzamış mitokondriler nedeniyle hücreler asidofilik sitoplazmaya sahiptir. Hücrelerin apikalinde bulunan mikrovilluslar fırçası kenar oluşturur.

Bazolateral bölgede yoğun hücre zarı kıvrımları ve interdigitasyonları bulunur. İyonların magnezyum (Mg)' a bağımlı Na ve K aktive olmuş pompa ile transportu için gerekli olan adenosintrifosfatı (ATP) çok sayıda bulunan mitokondriler sağlar.

Endositoz ve küçük proteinlerin aminoasitlere yıkımı için gerekli olan apikal tübüloveziküllere ve lizozomlara sahiptir. Proksimal kıvrıntılı tübüller suya çok geçirgendir ve su; ozmoz ile sıkı bağlantılar arasından (parasellüler yol) ile hücrelerarası boşluğa geçer. Hücrelerarası hidrostatik basınç artışı da sıvı ve katıların kapiller ağına itilmesini sağlar (3, 8, 9) (Şekil 5).



Şekil 5:Nefron ve böbrek tübüllerinin yapısı (6).

3.2.3 Henle Kulpu

Proksimal tübüllere benzeyen kalın inen kol, ince inen kol, çıkan ince kol ve distal tübül benzeri kalın çıkan koldan oluşur. İnen parçaların uzunluğu jukstamedüller kordonlarda çok uzun olup medullanın derinlerine kadar inerken, kortikal nefronlarda kısadır. Kolların kalın parçaları alçak kübik epitel veya prizmatik epitel ile döşelidir, ince parçalar ise basit yassı epitel ile döşelidir. Çıkan kol suya geçirgen değildir o nedenle süzülen suyun geri emilimi inen kolda tübüler ve intersitisiyel sıvı arasındaki osmotik gradyanla gerçekleşir. Çıkan kolda proksimal tübülde olduğu gibi Na, K, ATPaz pompası katıların geri emilimine yardımcı olur (3, 9, 11) (Şekil 5).

3.2.4 *Distal kıvrıntılı tübül*

Henle kulpunun çıkan kolu distal tübül olarak devam eder. Henle kulpunun çıkan parçasında başlatılan tübüler sıvının aktif olarak seyreltilmesi distal kıvrıntılı tübüller ile devam eder. Kübik epitel ile döşelidir ve lümenleri proksimal tübüllere göre daha geniştir. Belirgin bir fırçası kenar gözlenmez. Proksimal tübüllerdeki gibi bazolateral yüzlerdeki hücre zarı katlantılıdır ve buralarda mitokondriler bulunur. Distal kıvrıntılı tübüller kortekste izledikleri yol boyunca kendi nefronlarına ait renal korpusküllerin damar kutbuna değerkler. Bu değme noktasında afferent arteriyol ve distal tübül değışikliğe uğrar. Distal tübülün hücreleri prizmatik hale dönüşür ve çekirdekleri bir araya toplanır. Bu hücrelere makula densa hücreleri adı verilir. Makula densada hücreler geri dönüşümlü polarite gösterirler, çekirdek apikal yerleşimlidir. Bazal yüz golgi aygıtı içerir ve jukstaglomerüler hücrelere ve ekstramezangiyal hücrelere bakar. Makula densa hücreleri tübüler sıvıdaki Na derişimindeki değışikliklere duyarlıdır (3, 9, 11).

Jukstaglomerüler Aygıt:

Bu aygıt aşağıdaki yapılardan oluşan bir endokrin yapıdır.

- Makula densa hücreleri
- Ekstraglomerüler mezengiyal hücreler (lakis hücreleri)
- Afferent glomerüler arteriyolde daha fazla olup, efferent glomerüler arteriyolde de bulunan renin üreten jukstaglomerüler hücreler,

Makula densa sodyum klorür (NaCl) derişimindeki değışikliklere duyarlıdır ve jukstaglomerüler hücrelerden renin salınımını etkiler. NaCl derişimi ve kan basıncı düştüğünde kan basıncı düştüğünde renin salgılanır. Jukstaglomerüler aygıt renal kan akımı ve glomerüler filtrasyonun otoregölasyonu ile ilgili tübüloglomerüler geri besleme mekanizmasının bir bileşenidir ve extramezangiyal hücreler birbirlerine ve jukstaglomerüler hücrelere gap-junctiponlarla bağlanırlar. Jukstaglomerüler hücreleri uyaran sempatik (adrenerjik) sinir lifleridir. Renin salınımı adrenerjik sinir liflerinden salınan nörepinefrin ve dopamin ile artırılır. Nörepinefrin, afferent glomerüler arteriyoldeki α_1 -adnenerjik reseptörlere vazokonstriksiyon oluşturmak üzere bağlanır. Parasempatik innervasyon gözlenmez (3, 9, 11).

3.2.5 Kollektör Tübüller (toplayıcı kanallar)

Distal kıvrıntılı tübüllerden geçen idrari toplayıcı tübüllere aktarılır. Toplayıcı kanallar kortikal ve medüller toplayıcı kanallardan oluşur. Küçük toplayıcı tübüller kübik epitel ile döşelidir medullanın derinliklerine doğru inildikçe hücrelerin boyu ve çapı artar. Hücrelerin sitoplazmaları az sayıda organel içerir ve elektron geçirgen özelliktedirler. Kortekste bulunan toplayıcı kanallar her medullar ışına boşalan birkaç küçük toplayıcı tübül aracılığı ile dik açılar ile birbirine bağlanır. Toplayıcı tübül epiteli esas hücreler ve interkalat hücrelerden oluşur. Esas hücreler az sayıda katlantı ve mitokondrilere sahip bazolateral yüze sahiptir. Na ve suyu geri emerler ve Na^+K^+ -ATPaz pompasına bağımlı durumdaki K^+ 'yı salgırlar. İnterkalat hücrelerin mitokondrileri çoktur, ya hidrojen (H^+) iyonunu ve K^+ 'u geri emerler. Asit-baz dengesinin düzenleyicisi olarak görev yaparlar (3, 9, 11) (Şekil 5).

3.2.6 Renal interstisyum

Hem korteks hem de medullada ürinifer tübüller, kan ve lenf damarları arasında bulunan özelleşmiş hücrelere intersitisyel hücreler denir. Prostaglandin ve ara maddenin oluşturulmasını sağlarlar. Kortekste iki tip intersitisyel hücre bulunur, tübüllerin bazal membranı ile peritübüler kapillerlerin yakınındaki fibroblast benzeri hücreler ve makrofaj hücreleri. Bu fibroblast hücreleri intersitisiyumun ekstrasellüler matriks elemanlarından kollajen ve glikozaminglikanları sentezler. Medullada ise esas interstisyel hücreler miyofibroblast benzeri olan hücrelerdir. Hücre sitoplazmaları aktin filament öncüllerini, düz endoplazmik retikulum, iyi gelişmiş golgi ve lizozom içerir. Lipid damlalarının varlığı diürez mekanizmasındaki artış ya da azalmaya göre değişiklik gösterir (3, 9, 10, 11).

3.3 Böbreğin Fizyolojisi

Böbreklerin temel görevleri, iç ortamın hacmi, su konsantrasyonu ve inorganik iyon bileşiminin yani kan hacminin düzenlenmesidir. Bu işlevleri maddelerin vücuttaki miktarlarını sabit tutmak amacıyla yeterli miktarda su ve inorganik iyon atarak yaparlar. İkinci olarak metabolik atıkları üretildikleri hızla idrarla atarlar böylece metabolik artıkların vücutta birikmesi önlenir. Diğer görevi ilaç, pestisit, besin katkı maddeleri ve onların metabolitleri gibi toksik kimyasalları idrarla atmaktır. Dördüncü görevi uzun süreli açlık halinde aminoasit ve diğer öncül maddelerden glikoz üreterek kana vermek olan glukoneogenezistir. Son olarak da böbrekler bir endokrin organ gibi davranarak kana

eritropoetin, kan basıncının kontrolünde görev alan renin ve Ca^{++} metabolizması ile ilgili olan 1,25-hidroksivitamin D'yi sekrete ederler (12).

İdrar yapımı: Proteinlerin yıkımı ile oluşan ürün amonyaktır (NH_3). NH_3 , hücreler için çok toksiktir. Bu nedenle karaciğerde üre haline dönüştürülür ve böbrek tarafından atılır (13). Böbreklerde idrarın oluşturulduğu en küçük birimi nefronlardır. İdrar yapımı plazmanın glomerüler yataktan bowman aralığına filtrasyonu ile başlar. Bu işleme glomerüler filtrasyon (süzülme) denir ve oluşan sıvıya da glomerüler filtrat denir. Hücre içermez ve protein hariç tüm maddeler plazmadakine eş konsantrasyondadır. Bu tip filtrata ultrafiltrat denir.

Filtratın bileşimi maddelerin tübülden peritübüler kapillere ve kapillerden tübüle hareketi ile değişir. Hareketin yönü peritübüler kapillerdeki plazmaya doğru olduğu zaman tübüler geri emilim, peritübüler plazmadan lümene doğru olan harekete ise tübüler sekresyon denir (12).

Glomerüler filtrasyon: İdrar oluşumunun ilk adımıdır. Glomerüldeki kanın plazmasının bir bölümünü glomerüler bazal membrandan tübüler sisteme filtre eder. Glomerülden filtrasyonda su ve küçük peptidler dahil küçük molekül ağırlıklı molekülleri birlikte sürükleyen bir kitle akım işlevi vardır. Albumin ve globulin dışında plazma proteinlerini çoğu filtrasyonun dışında kalır. Birim zamanda glomerüllerden bowman aralığına filtre edilen sıvı hacmi glomerüler filtrasyon hızı (GFH) olarak tanımlanır. GFH günde ortalama 180 litredir. Kalp damar sisteminde toplam plazma hacmi 3 litre iken, böbrekler plazma hacmini günde 60 kez filtre etmiş olur. Ancak çıkarılan idrar miktarı ortalama 1–1,5 litre kadardır. Buradan süzülen miktarın %99 kadarı tübüllerden geri emilerek tekrar kana verilir (12).

Afferent arterin daralması glomerüler kapillerlerdeki hidrostatik basınç artışına yol açar. Bu artış arterler ve kapillerler arasındaki mesafedeki kapiller basıncında önemli düşmeye yol açar. Efferent arteriyolün daralması ise tam tersi etkiye neden olur.

Glomerüler kapillerleri çevreleyen mezengiyal hücrelerin kasılması kapiller yüzeyini küçülterek herhangi bir süzme basıncında GFH'nin azalmasına neden olur.

Bowman kapsülü içindeki sıvının basıncının artması filtrasyonu azaltır. Örn; böbrek taşları basıncı artırarak GFH'yi azaltır (1, 12).

Tübüler Geriemilim (reabsorbsiyon): Filtre edilen sıvı tübüllerde seyrederken başta su olmak üzere gereken maddeler peritübüler kapiller ağdaki plazma içine difüzyon ve kitle akımı ile reabsorbe edilirken istenmeyen maddeler geri emilmez ve idrar oluşumuna katkıda bulunur. Bowman aralığındaki üre konsantrasyonu peritübüler plazma ve tübülün çevresindeki hücrelerarası sıvı ile aynıdır. Böylece filtre edilen sıvı proksimal tübül boyunca ilerlerken su geri emilimi olur. Suyun uzaklaştırılması tübüler sıvıdaki üre konsantrasyonunu artırır ve peritübüler kapillerdeki ve hücreler arasındaki üre konsantrasyonundan yüksek olur. Böylece üre tübüler lümeninden peritübüler kapillerlere geçer. Geriemilim işlevi transellüler (hücre içi) ya da difüzyon ile gerçekleşir. Na^+ , glikoz, aminoasit ve birçok madde her iki yolla da geri emilir (1,12).

Tübüler sekresyon: İstenmeyen maddelerin idrarla atılmasını sağlayan mekanizmadır. Plazmadaki bazı maddeler doğrudan tübülleri döşeyen epitel hücrelerince tübüler sıvı içine sekrete edilirler. Geriemilim gibi difüzyon ve transellüler taşıyıcı aracılığı ile gerçekleşir. Tübüllerden sekrete edilen en önemli maddeler H^+ iyonu ve K^+ dur, ancak vücutta yapılan kreatinin ve kolin gibi maddeler de sekrete edilir.

Tübüllerdeki iş bölümüne bakıldığında, proksimal tübülün esas görevi filtre olan suyun ve katı maddelerin önemli kısmını geri emmektir. Ayrıca potasyum hariç proksimal tübül önemli bir sekresyon bölgesidir. Henle kulpu ise çok miktarda ana iyonları geri emerler, daha az olarak da suyu geri emer. Distal segmentte ise maddelerin birçoğunun geriemilim ve sekresyonları ayarlanarak idrar ile atılacak son miktarları belirlenir.

Böbrek fonksiyonunun en iyi anlaşılmasını sağlayan terim ise böbrek klirensi (arıtma) dir. Klirens; bir maddeden birim zamanda tamamen arındırılan plazma miktarıdır. Böbreklerin 1 dakika içerisinde herhangi bir maddeyi kaç ml. plazmadan arındırdığını belirlemek için **klirens değeri** kullanılır (12) (Şekil 6).

$\text{Plazma Klirensi (pk)} = \frac{\text{Maddenin idrardaki konsantrasyonu (mg/ml)} \times \text{idrar hacmi (ml/dk)}}{\text{Maddenin plazma konsantrasyonu (mg/ml)}}$
--

Şekil 6. Plazma klirens hesaplaması (12).

Su ve sodyum plazmada serbest halde bulunan ve küçük molekül ağırlıklı moleküller oldukları için glomerülden bowman aralığına kolayca filtre olurlar. %99 kadarı geri emilime maruz kalır ancak sekrete edilmezler. Kitle halinde su ve sodyumun geri emilmesinin 2/3'ü proksimal tübüllerde olur. Ancak geri emilimin hormonal kontrolü distal kıvrıntılı tübül ve toplayıcı kanallarda olur. Sodyum geri emilimi henle kulpunun inen kısmı hariç tüm tübül segmentlerinde olurken, su emilimi sodyum geri emilimine bağlı basit difüzyonudur. Toplayıcı kanallarda ise suyun geri emilimini düzenleyen arka hipofizden salınan antidiüretik hormon (ADH) ya da vazopressin denen hormondur. Tübülün son kısmına ulaşana kadar filtre olan sodyumun önemli kısmı emildiği için distal kıvrıntılı tübül ve korteksteki toplayıcı kanallardan sodyumun geri emilimini adrenal korteksten salgılanan aldosteron denen steroid hormon düzenler. Aldosteron salınımını ise düzenleyen Anjiyotensin II (AT II) hormonudur ve böbrekteki kan hacminin, kan basıncının ve glomerül kapillerdeki basıncın dolayısıyla GFH'nin düzenlenmesi yönünde çalışan bir sistem olan Renin-Anjiyotensin Sistemidir (RAS). Renin jukstaglomerüler aparatındaki jukstaglomerüler hücreler tarafından salınan bir enzimdir. Kana geçince karaciğer tarafından yapılan ve büyük bir polipeptid olan anjiyotensinojeni, küçük bir polipeptid olan anjiyotensin I'e çevirir. Anjiyotensin I, tekrar yıkıma uğrayarak renin anjiyotensin sisteminin aktif elemanı olan anjiyotensin II'ye çevrilir. Bu dönüşüm kapiller endotelinin luminal yüzeyinde bulunan anjiyotensin dönüştürücü enzim (Angiotensin converting enzim, ACE) aracılığı ile olur. Anjiyotensin II aldosteron yapımını uyarak tuz ve su tutulumunu artırır ve arteriyollerde daralma yapar (12). Efferent arteri daraltarak glomerül basıncını artırır. Ayrıca angiotensin II kan basıncını yükseltir. Hipotalamusa etki ederek ADH salgısını ve susama hissini uyarır. Sonuçta kan basıncı yükseltilip hücre dışı sıvı hacmi artırılmış olur (12). Renin anjiyotensin sistemi sodyum dengesine dolayısıyla plazma hacminin ayarlanmasına yardım ederek arteriyel kan basıncının ayarlanmasına yardım etmiş olur.

Su ve NaCl'nin geri emilimini etkileyen hormon ve faktörler özetle şöyle sıralanabilir;

- AT II proksimal kıvrımlı tübüldeki NaCl ve su geri emilimini uyarır ve hücre dışı sıvı hacminde azalma, RAS'ı aktive eder ve plazma AT II yoğunluğunu artırır.

- Adrenal korteksin glomerülosa hücrelerinden sentezlenen aldosteron, henle kulpunun çıkan kolunda, distal kıvrıntılı tübülde ve toplayıcı tübülde NaCl geri emilimini uyarır. AT II ve K^+ 'un plazma yoğunluğundaki artış aldosteron salınımını uyarır.
- Atrial natriüretik faktör (ANF) (kalbin atriyal hücreleri tarafından sentezlenir ve salınır) NaCl ve suyun idrarla atılımını artırır ve nörohipofizden ADH salınımını engeller. Ürodilatin ise distal kıvrıntılı tübül ve toplayıcı tübülün epitel hücrelerinden salınır ve toplayıcı tübülün medulladaki kısmından NaCl ve suyun geri emilimini engeller.
- ADH hipotalamusun supraoptik ve paraventriküler çekirdeklerinde yerleşik nöroendokrin hücrelerde sentezlenir, hücre dışı sıvı hacmi azaldığında toplayıcı tübülün suya geçirgenliğini artırır böylece su geri emilimi artar. ADH yokluğunda toplayıcı tübül suya geçirgen değildir.

D vitamini güneş ışığı ve bitkilerden kaynaklanır ve hidroksil gruplarının eklenmesi ile önce 25-hidroksilaz enzimi ile karaciğerde daha sonra da belirli böbrek tübül hücrelerinde 1-hidroksilaz enzimi ile metabolize olur. Bu değişimlerin son ürünü 1,25-dihidroksivitamin D dir. Başlıca etkisi kalsiyumun barsaktan emilimini uyarmaktır (13).

Böbreklerin bir diğer görevi de plazma bikarbonat konsantrasyonunu değiştirerek vücuttan hidrojen iyonlarını atmak ve ekleme. İdrarla bikarbonat atılması vücuda hidrojen iyonu eklenmiş gibi plazma hidrojen iyonu konsantrasyonunu artırır, plazmaya bikarbonat ilavesi plazmadan hidrojen iyonu uzaklaştırılmış gibi plazma hidrojen iyon konsantrasyonunu azaltır. Dolayısıyla, plazma hidrojen iyon konsantrasyonu azaldığında (alkoloz) böbreklerin homeostatik cevabı büyük miktarda bikarbonat atılmasını sağlamaktır. Bu da hidrojen iyon konsantrasyonunu normale döndürür. Plazma hidrojen iyon konsantrasyonu arttığında (asidoz) böbrekler idrarla bikarbonat atılmasını sağlamaz, bunun yerine tübüler hücreler yeni bikarbonat yaparlar ve plazmaya ilave ederler. Böylece plazma hidrojen iyon konsantrasyonu normale döner (13).

3.4 Böbrek Hastalıkları

Böbrek hasarları glomerüler ve/veya tübüler fonksiyonları etkileyebilir. Böbrek hastalıklarının en sık görülen belirtisi idrarda protein bulunmasıdır. Normal böbrekte glomerüler filtratta çok az miktarda protein bulunur, çünkü renal korpuskül membranı proteinlere, özellikle de düşük molekül ağırlıklı olanlara tamamen geçirimsiz değildir. Ancak

proksimal tübül hücreleri bu filtre olan proteinleri tübüler lümeninden tamamen uzaklaştırır ve son idrarda hiç protein bulunmaz. Ancak glomerül ya da proksimal tübül hasarında idrarda protein gözlenir.

Bozulmuş renal fonksiyonda azalmış bir renal atılım ile zararlı veya faydası olmayan ürikasit, üre, kreatinin gibi madde atılımları azalır ve bunların plazma düzeyleri artar. Bozuk tübüler rearbsorbsiyon vücut için gerekli elektrolit, mineral, bikarbonat, glikoz ve aminoasitlerin kaybına neden olur (13, 14).

Hormonlar renal atılımı düzenler ve yönlendirir. Hormon salınım bozuklukları renal atılım fonksiyonunu etkileyebilir. Örneğin, renin salgılanmasındaki değişimler de böbreklerde hasara neden olur. Reninde artışın ilk nedeni makula densaya sodyum gelişinin azalması ve etkilenmiş nefronlarda perfüzyonun az olmasıdır. Sonuçta plazma AT II konsantrasyonu artar ve renal hipertansiyon gelişir. Kan basıncını azaltmak ve sodyum su dengesini düzeltmek için ACE inhibitörleri ve AT II reseptör blokerleri kullanılır (13). Ayrıca böbrek hasarı sonucu eritropoietin yapan hücreler hasar görür ve anemiye neden olabilir (14).

Bazal membranda bulunan tip IV kollagenlerin hasarında Goodpasture sendromu, Alport sendromu gibi bazal membran hastalıkları gözlenebilir. Glomerüler hasarlarda glomerüler hücre ve bazal laminaya karşı antikorlar ve kandaki antijen-antikor kompleksleri glomerüler hasar ve glomerülonefrite yol açabilir. Antikorların tip IV kollagene bağlanması immunfloresanda yaygın çizgisel yapı oluşturur. Antijen-antikor birikimi granüler yapı oluşturur. İmmun komplekslerin mezengiyumda glomerüler kapillerlerin endotel hücreleri ve ve bazal lamina arasında (subentotelial birikimler), daha seyrek olarak da bazal lamina ve podosit ayak uzantıları arasında (subepitelyal birikimler) birikebilirler. Bu birikimler sonucunda nötrofiller kapiller lümeninde birikerek lümeni tıkarlar. Bunların sonucunda idrarda kan (hematuri), normalden az idrar (oligoüri) gözlenir.

Bakteriyel enfeksiyonlardan sonra oluşan immunbileşikler glomerüler hücrelerin (endotel ve mezenjiyal) çoğalmasına neden olur ve nötrofiller monositleri kendilerine çekerler ve daha çok çocuklarda gözlenip akut proliferatif glomerülonefrit olarak adlandırılırlar. Erişkinde ise hızlı ilerleyen glomerülonefrite (hilal biçimli=kresentrik) dönüşebilir ve daha ciddidir. Hem hücresel hem de hilal biçimli yapılar glomerüler kapillerleri sıkıştırır (11).

İnflamasyonlar glomerül kaynaklı değilse böbrekte inflamasyona interstisiyel nefrit denir. Böbrek dokusu inflamasyon hücreleri (özellikle granulosit) ile doludur ve böbrekte lokal harabiyete neden olur. En çok gözlenen şekli bakteriyeldir ve pyelonefrit olarak adlandırılır. Ayrıca alerjik, radyasyon, transplant reaksiyonları sonucunda da oluşabilir (13, 14). Bu tip birçok bozukluk sonucunda akut ya da kronik böbrek yetmezliği gelişebilir.

3.5 Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus (DM), hiperglisemi, dislipidemi, glikozüri ve bunlara eşlik eden bir grup metabolik bozukluğu içine alan kronik bir metabolik hastalıktır (14, 15). Tarihçesine baktığımızda milattan önce 1500’lerde Mısır Ebers Papiruslarında fazla idrar yapılan, idrar yoluyla şeker kaybedilen bir hastalık olarak tanımlanmış, milattan 200 yıl sonra Cappadocia’lı Areateus hastalığa Diyabetes ismini vermiştir. 1860’da Langerhans’ın pankreas adacıklarını, 1875’de Claud-Bernard’ın diyabetin nöro-hormonal mekanizmasını, 1889’da V.Mering ve Minkowski’nin pankreotektomi ile diyabet oluşumunu ortaya koyarak şeker hastalığının merkez organını tanımlamalarından sonra hastalığa yeni boyutlar getirilmiştir (14).

Diabetes Mellitus’un sınıflandırılması yapıldığında hastalığın etyolojisi ve patogenezi göz önüne alınır. Diyabetin bütün tipleri hiperglisemi ile karakterizedir ancak hipergliseminin ortaya çıkış mekanizmaları farklılık gösterir (15). Diyabetin bazı formları mutlak insülin yetersizliği veya insülin sekresyonunda kusura yol açan genetik bir hata ile karakterize iken, bazı formlarında da insülin direnci söz konusudur. Diyabet esas olarak tip 1 ve tip 2 diyabet olarak sınıflandırılır. Tip 1 diyabetin en belirgin özelliği insülin çekildiğinde ketoz ve zamanla diyabetik ketoasidoz (DKA) gelişmesidir ve bu hastalar endojen insülin üretmedikleri için yaşam boyu insülin bağımlıdırlar (16). Tip 1A DM, insülin yetersizliği ile karakterize iken ketoza yatkınlık gösterir, Tip 1B diyabetik bireylerde ise beta hücresinin otoimmün yıkım sürecinin immunolojik göstergeleri yoktur (15). Tip 2 DM, insülin etkisine çevresel direnç ve yüksek serum glikoz seviyelerine karşın insülin salgılanmasında azalma ile karakterizedir. Tip 2 diyabette bir miktar endojen insülin salındığı için DKA gelişmez (16).

Diabetes Mellitus’un son dönem sınıflandırılmasında ise ilk olarak *insüline bağımlı Diabetes Mellitus (IDDM)* ve *insüline bağımlı olmayan Diabetes Mellitus (NIDDM)* terimleri kullanılmaktaydı. Tip 1 diyabetik hastaların (daha önceki IDDM) hemen hepsinde mutlak insülin tedavisi gerektiği, buna karşın tip 2 diyabetiklerin (daha önceki NIDDM) birçoğunda DKA’yı önlemek için insülin tedavisi gerekmediği gözlemine dayanmaktaydı. Bununla

birlikte tip 2 diyabetiklerin bir çoğunda glisemiye kontrol etmek için insülin tedavisi gerekli olabildiğinden eski tanımlama kafa karışıklığı yaratmaktaydı. Diğer bir fark ise artık yaşın kriter olarak kullanılmamasıdır. Tip 1 DM genellikle 30 yaşın altında görülür her yaşta beta hücre yıkımı gözlenebildiği ve 30 yaşın üzerinde gelişen DM'li bireylerin %5-10'unda Tip 1A DM söz konusu olduğu gözlenmiştir (15).

Diabetes Mellitusun diğer tipleri insülin sekresyonundaki veya etkisindeki genetik kusurlar, insülin sekresyonunu bozan metabolik anormallikler ve glikoz toleransını bozan durumlara göre yapılır. Gençlerin erişkin tip diyabeti (*maturity onset diabetes of the young: MODY*) otozomal dominant kalıtım, erken başlayan hiperglisemi ve insülin sekresyonunda bozulma ile karakterizedir. DM, pankreas adacıklarının çoğunluğunun yıkılması halinde ekzokrin pankreas hastalığı olarak da ortaya çıkabilir. İnsülin etkisini antogonize eden hormonların aşırı sekresyonu sonucunda ortaya çıkabilir. Ayrıca DM, diğer hastalık ve ilaçlardan kaynaklanabilmektedir (15) (Tablo 1).

Gebelik diyabeti (gestasyonal diyabet) gebelik sırasında gelişen glikoz tolerans bozukluğudur. Kalıtım yoluyla beta hücre rezervindeki azalma, pankreasın plasenta hormonları tarafından oluşturulan insülin direncini kırabilecek miktarda insülin salgılayamamasının sonucudur. Gebeliklerin %2-5'inde görülür ve tedavi edilmezse fetal makrozomi, hipoglisemi, hipokalsemi ve hiperbilirubinemiye yol açabilir. Diabetes Mellitusun son dönem sınıflandırılması Tablo 1'de gösterilmiştir (16).

Tablo 1: Diabetes Mellitus'un Etyolojik Sınıflandırılması

I. Tip I Diyabet

A. İmmün aracılıklı

B. İdiopatik

II. Tip II Diyabet

A. Obez

B. Nonobez

III. Gebelik (Gestasyonel) Diyabeti

IV. Diğer Spesifik Türler

A. Beta hücre fonksiyonunun genetik defektleri

MODY 1- Hepatosit nükleer transkripsiyon faktörü (HNF-4 α)

MODY 2-Glukokinaz

MODY 3-HNF-1 α

MODY 4-İnsülin promotor faktör (IPF-1)

MODY 5- HNF-1 β

MODY 6-NöroD1

B. İnsülinin etkisindeki genetik defektler

Tip A İnsülin rezistansı

Leprechaunism

Rabson-Mendelhall Sendromu

Lipoatrofik Diyabet

C. Eksokrin pankreas hastalıkları

Pankreatit, pankrektomi, neoplazi, kistik fibroz, hemokromatozis

D. Endokrinopatiler

Cushing sendromu, glukagonoma, hipertiroidi, somatostatinoma

E. İlaç ya da kimyasal maddeye bağlı

Vacor, glukokortikoidler, tiroid hormonu, tiazidler, beta blokerler

F. Enfeksiyona bağlı

Rubella, sitomegalovirüs, koksaki

G. İmmünaracılıklı diyabetin nadir formları

Stiff man sendromu

H. Diyabetle bazen ilişkili olan diğer genetik sendromlar

Down sendromu, Klinefelter sendromu, Turner Sendromu, Prader willi sendromu

3.5.1 *Diabetes Mellitus'un Epidemiyolojisi*

Diyabet prevalansı ve insidansı toplumlarda her geçen dekatta dramatik olarak artmaktadır ve daha da artacağı düşünülmektedir. Diyabetin görülme sıklığında coğrafyanın rolü, yaş ve cinsin rolü, genetik yatkınlık, kilo ve gebeliğin etkisi vardır. Tip 1 ve tip 2 diyabetin her ikisinin de prevalansı dünya çapında artmakla birlikte artan obezite ve azalan aktivite nedeniyle özellikle tip 2 diyabetin prevalansının hızla artması beklenmektedir.

Hem tip 1 DM, hem de tip 2 DM'nin insidansı coğrafi farklılıklar büyük ölçüde bağlıdır. Örneğin en yüksek tip 1 DM insidansı İskandinavya'dadır (Fillandiya'da yıllık insidans 35/100.000). Buna karşılık tip 1 DM insidansı Pasifik kıyısında çok daha düşüktür (Japonya ve Çin'de yıllık insidans 1-3/100.000). Kuzey Avrupa ve Amerika Birleşik Devletlerinde (ABD) ara değerlerdedir (8-17/100.000). Tip 1 DM deki artışta farklı coğrafik bölgelerdeki etnik gruplarda yüksek riskli insan lökosit antijenleri (Human leukocyte antigen, HLA) allelleri de etkilidir.

Tip 2 DM ve onun öncüsü olan bozulmuş glikoz toleransı prevalansı bazı Pasifik adalarında en yüksek, Hindistan ve ABD ülkelerinde orta, Rusya ve Çinde ise göreceli olarak düşüktür.

Diyabetin sıklığının yaşla da arttığı bilinmektedir; 20-39 yaş arasında %1.5 iken, 75 yaş üzerinde yaklaşık %20'dir.

DM'nin sıklığı erkek ve kadın arasında çoğu yaş aralığında benzerken, 60 yaş üzerindeki erkeklerde biraz daha yüksektir.

Afrikalı Amerikalılarda, İspanyol kökenli Amerikalılarda ve yerli Amerikalılarda İspanyol kökenli olmayan beyazlara göre yaklaşık iki kat fazladır ve bu tip etnik farklılıkların nedeni hala bilinmemektedir (15).

3.5.2 *Diabetes Mellitus'un Tanı Kriterleri*

Diabetes Mellitus için tanı ölçütleri Ulusal Diyabet Data Grubu'ndan (National Diabetes Data Group) ve Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation, WHO) tarafından belirlenmektedir. Temel alınan kriterler, açlık plazma glikozu (APG) spektrumu ve oral glikoz yüklemesine yanıt ve diyabete özgün komplikasyonların gözlemlendiği glikoz düzeyidir. Ayrıca bozulmuş açlık glikozu da son dönem tanı kriterlerindendir. Glikoz toleransı APG'ye göre üç sınıfa ayrılır:

1. APG<6.1 mmol/L (110 mg/dL) normal
2. APG≥6.1 mmol/L (110 mg/dL) fakat <7.0 mmol/L(126mg/dL)bozulmuş açlık glikozu
3. APG≥7.0 mmol/L (126 mg/dL) DM olarak tanımlanır.75 g oral glikoz yüklemesinden sonra 2. saatte plazma glikoz düzeyinin7.8-11.1 mmol/L (140-200 mg/dL) olması tanımlanan bozulmuş glikoz toleransı ile anologdur (15) (Tablo 2).

Tablo 2: Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kriterlerine göre Oral Glikoz Tolerans Testi Değerleri (17).

WHO kriterlerine göre OGTT(Oral glikoz tolerans testi)			
Kan glikoz düzeyi	NGT (normal glikoz toleransı)	BGT (bozulmuş glikoz toleransı)	DM (diyabetik)
Açlık plazma glikozu(mg/dL)	<100	100-125	≥126
120 dk.	<140	≥140-199	≥200

Diyabetin klasik semptomlarının (poliüri, polidipsi, kilo kaybı) eşlik ettiği durumlarda rasgele bakılan kan şekerinin ≥11.1 mmol/L olması DM tanısı yeterlidir.

Laboratuvar bulgularına bakıldığında; üre analizlerinde glikozuri ve ketanuri gözlenmesi, kan serumunda, plazma glikoz düzeylerinin artması, Hemogloblin A1c (HbA1c) değerinin artması (kan şekeri yükselmesi ile güçlü bir korelasyon gösterdiği için), serum albumin düzeyinin yükselmesi, lipoprotein anormalikleri (örneğin dislipidemi) gözlenebilmektedir (17).

3.5.3 Diabetes Mellitus'un Patogenezi

Tip 1A DM; pankreas beta hücrelerini harap eden genetik, çevresel ve immunolojik faktörlerin sinerjist etkileri sonucu gelişir. Genetik yatkınlığı olan bireylerde doğumda normal beta hücre kitlesi gözlenirken, gelişen otoimmün yıkımla beta hücrelerini kaybetmeye başlarlar. Beta hücrelerinin %80-90'ı zarar gördükten sonra hiperglisemi görülür ve DM tanısı konur. Beta hücre kitlesi azaldıkça insülin salgılanması, mevcut insülin normal kan glikoz seviyelerini artık sağlayamadığı düzeye kadar azalır.

Genetik olarak bakıldığında; Tip 1A DM için major yatkınlık geni HLA bölgesinde 6. kromozomda bulunur. Bu bireylerin çoğunda HLA DR3 ve/veya DR4 haplotipi vardı.

İmmunolojik olarak; Glutamat dekarboksilaz (GAD), insülin, IA-2/ICA512 (tirozin fosfotazlar ile analog), adacık hücre antikorları (islet cell autoantibody: ICA) otoantikorlarının varlığı tip 1 diyabet için iyi bir belirteçtir (15, 16).

Tip 2 DM; güçlü bir genetik eğilime sahiptir. Değişik genetik lokalizasyonlar hastalığa duyarlı kılar ve çevresel faktörler hastalığın fenotipik görünümü belirler. Tip 2 DM insülin sekresyonunda bozulma, periferik insülin direnci ve aşırı hepatik glikoz üretimi ile karakterizedir. Hastalığın erken dönemlerinde glikoz toleransı normal kalabilir, pankreas beta hücreleri insülin çıkışını arttırarak insülin direncine rağmen durumu kompanse eder. İnsülin direnci ve kompensatuar hiperinsülinemi ilerledikçe, pankreas adacıkları bu durumu sürdürmez. Ardından postprandiyal glikoz düzeyinde yükselme ile karakterize bozulmuş glikoz toleransı gelişir. İnsülin sekresyonunda artan azalma ve hepatik glikoz üretiminde artış açlık hiperglisemisi ile birlikte diyabete yol açar ve beta hücre yetersizliği ortaya çıkar (15, 16).

3.5.4 Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları

Diyabetin akut ve kronik komplikasyonları gözlenmektedir.

Akut Komplikasyonlar: Diyabetik ketoasidoz (DKA) ve nonketotik hiperosmolar durum (NKHD) diyabetin akut komplikasyonlarıdır. DKA derin insülin yetersizliği mevcut insülini etkisiz kılan yüksek düzeydeki düzenleyici karşıt hormonlar ile (örneğin, glukagon, kortizol, büyüme hormonu, epinefrin) birleşince meydana gelir. DKA birincil olarak Tip I diyabet hastalarında gözlenir. DKA'nın primer özellikleri dehidratasyon, asidoz ve elektrolit tükenmesidir. NKHD ise çoğunlukla yaşlı Tip 2 diyabetik hastalarda gözlenir. En belirgin bulguları poliüri, ortostatik hipotansiyon ve çeşitli nörolojik semptomlardır. İnsülin eksikliği ve yetersiz sıvı alımı gözlenir. İnsülin yetersizliği nedeni ile hepatik glikoz üretimi artar (glikoneogenesis aracılığı ile) ve iskelet kasında glikoz kullanımı bozulur. Bu durum yetersiz sıvı alımının şiddetlendirdiği intravasküler volüm azalmasının belirginleşmesine neden olur (15, 16).

Kronik komplikasyonlar: Diyabetin kronik komplikasyonları birçok organ sistemini etkileyebilir ve diyabetle ilişkili morbidite ve mortalitenin birçoğundan sorumludur. Kronik komplikasyonlar vasküler ve nonvasküler olarak sınıflandırılabilir. Vasküler komplikasyonlar

da ayrıca mikrovasküler (retinopati, nöropati, nefropati) ve makrovasküler komplikasyonlar olarak (koroner arter hastalığı, periferik vasküler hastalık, serebrovasküler hastalık) olarak sınıflandırılabilir. Nonvasküler komplikasyonlar ise gastroparezi, seksüel disfonksiyon ve deri değişiklikleri gibi problemlerdir (15, 16).

3.5.5 *Diabetes Mellitus*’un Renal Komplikasyonları

Diyabetik nefropati son dönem böbrek yetmezliğinin (SDBY) ve diyabetle ilgili mortalite ve morbiditenin önde gelen nedenidir. Ülkemizde Türk Nefroloji Derneği 2005 verilerine göre diyaliz hastaları arasında DM, %25,3 ile SDBY nedenleri arasında birinci sırada yer almaktadır (18). Son yirmi yıllık Diabetes Mellitus izlemi sonucunda diyabetik nefropatinin görülme sıklığının, Tip 1 DM’de %30-40, tip 2 DM’de %15-25 olduğu bildirilmektedir (19). Diyabetik nefropati gelişiminde; diyabetin başlama yaşı, hastalığın süresi ve insülin rezistansı, genetik yatkınlık, ırk, cinsiyet, glisemik kontrol bozukluğu, hipertansiyon, obesite, insülin rezistansı, hiperlipidemi, diyetle yüksek protein alımı, albüminüri varlığı, sigara kullanımı gibi çeşitli faktörler hastalığın seyrini etkilemektedir (20-22).

Diyabetik nefropatinin patogenezi kronik hiperglisemi ile ilişkilidir. Hiperglisemi solübl faktörlerin etkileşimi (büyüme faktörleri, AT II, endotelin (ET), ileri glikasyon ürünler (İGÜ), renal mikrosirkülasyonda hemodinamik değişiklikler (glomerüler hiperfiltrasyon, glomerüler kapiller basınçta artış), glomerüllerde yapısal değişiklikler (ekstrasellüler matrikste artış, bazal membran kalınlaşması, mezenjiyal genişleme, fibrozis) ile ilişkilidir (15, 17).

Hiperglisemi süreci ile başlayan diyabetik nefropatinin gelişim süreci WHO tarafından 5 evreye ayrılmıştır.

Evre I (Hiperfiltrasyon): Aynı yaştaki kişilere göre GFH %20-40 oranında artar, Albumin salgılama hızı artar, renal plasma akımının da %9-14 arttığı gösterilmiştir. Nefronlarda genişleme ve hafif hücre proliferasyonu vardır.

Evre II (Sessiz Dönem): GFH’da gerileme olmakla birlikte yüksek ve/veya normaldir. Glomerüler bazal membran (GBM)’da kalınlaşma ve mezengiyal hücre ve matrikste artış vardır ve glomerüloskleroz gelişebilir. Normal glisemik kontrolle bu evre 5-15 yıl sürer.

Evre III (Mikroalbuminüri): Başlangıçta normal GFH vardır ancak mikroalbuminüri arttıkça düşmeye başlar. İdrarla atılan albümin 30-300 mg/gün ve/veya 20-200 mg/dk arasındadır. Bu evrede GFH yılda yaklaşık 1,1 ml/dk azalır. GBM kalınlığı ve interstisyel volüm artışı ne kadar fazla ise GFR'deki düşüş o kadar fazladır. Tip 2 DM hastalarının çoğu, tanı konduğunda bu dönemdedir. Histolojik değişimler, glomerüler bazal membran kalınlaşmaları ve mezengiyal volüm artışı devam etmektedir.

Evre IV (Açık Nefropati): Klinik olarak permanant proteinüri dönemidir. >500 mg/gün proteinüri, >300 mg/gün albüminüri olan bu evrede, GFH azalmaya, kan basıncı artmaya devam eder. Mezengiyumda glikoprotein madde birikimi olur ve mezengiyum genişler. Hastaların çoğunda hipertansiyon vardır ve bunun varlığı prognozu kötüleştirir. Hipertansiyon şiddeti ile GFH'deki kayıp hızlanır.

Evre V (SDBY): Genellikle diyabetin 20. yılından sonra gelişir. GFH'nın 20 ml/dk'nın altına düştüğü durumlarda renal replasman tedavisi gerektirir. Glomerüllerde tıkanma ve nefron kayıpları vardır. Hastaların Tip 1 DM'de %50'si, Tip 2 DM'de ise %20-30'u, 10 yıl içinde evre IV'ten V'e geçer (15, 16, 20).

Diyabetik nefropati patogenezinin gelişiminde hemodinamik mekanizma ile birlikte glikotoksitite ve anormal lipid profili ile seyreden metabolik olaylar yer alır. Hipergliseminin aracılık ettiği birçok metabolik süreçler birbirinden bağımsız gibi görünseler de birbirleri ile mutlak etkileşim içerisindeyler.

Hemodinamik mekanizmada; glomerüler bazal membranda, tübüler bazal membranda ve bowman kapsülünde kalınlaşma gözlenir. Mezenşimal hücreler hipertrofikleşir ve ekstrasellüler matriks üretimleri artar. Afferent ve efferent arteriyollerde hiyalinizasyon gözlenir. Glomerüllere düşen mezenşimal hacim artış gösterdiği için glomerüler kapiller yüzeyi azalır ve GFH azalır. Bunun sonucunda da glomerüllerde sklerotik lezyonlar gelişir. Bu değişimler ile eş zamanlı filtrasyon alanında ve nefron kitlesinde azalma, kalan nefronlarda yüksek kapiller akıma, dolayısıyla intraglomerüler hipertansiyon, hiperfiltrasyon ve bazal membrandaki seçici geçirgen mekanizmadaki bozukluklar nedeni ile ilerleyen proteinüri oluşumuna neden olur. Ayrıca efferent arteriyollerde vazokonstriksiyona neden olan ATII düzeyinin artmasına, renal vazodilatasyona ve glomerüler hipertansiyonun

artmasına neden olur. Renal fonksiyon bozuldukça sistemik ve glomerüler hipertansiyon artış gösterir ve bir kısır döngü oluşur (23).

Hiperglisemi ile seyreden mekanizmalar ise şu şekilde özetlenebilir:

Nonenzimatik glikozillenme ve ileri glikasyon ürünleri (İGÜ) nin oluşumu:

Hiperglisemide glikoz ve amino gruplarının, enzimatik olmayan bağlanmaları ile ‘Schiffbase’ ürünleri oluşur. Bu ürünler kan glikoz konsantrasyonuna uygun olarak belirli bir seviyeye ulaşır. Ardında erken glikasyon ürünleri (EGÜ) oluşur. Uzun süreli hiperglisemi sonrası kollajen, intrasellüler protein ve nükleik asitler gibi stabil makromoleküllerin kümülatif ve giderek artan değişiklikleri gözlenir. EGÜ’ler ileri glikasyon ürünlerini (İGÜ) oluşturmak üzere birleşirler (23). İGÜ’ler endotel, monosit, makrofajların üzerindeki kendine özgü reseptörlere (RİGÜ) bağlanırlar ve bu bağlanmadan sonra hücre içi sinyal yolu uyarılarak, reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olur ve nükleer faktör kappa beta (NF- κ B)’yı aktive ederler.

Bu glikalize proteinlerin birikimi ile, glomerüler kapiller sistem oklüzyona uğrar. Aynı şekilde dolaşımdaki proteinlerde glikalize olabilir ve glikalize olan bu proteinler (İGÜ) oluşur bunlar glomerüler kapiller yatakta depolanır (24, 25). Glikasyon oranı, kan şekeri, renal fonksiyon ve protein turnover ile değişmektedir. Serum ve doku İGÜ düzeyleri, kan glikoz düzeyi ve diyabetik komplikasyonların şiddeti ile korrelasyon göstermektedir. Böylelikle çok sayıda sitokin, kimokin ve vazoaktif hormon üretimini uyarırlar, ve NF- κ B hücre aktivasyonu ile sitokin ve growth faktörlerin salınımına neden olarak sonuçta anormal hücre proliferasyonu ve matriks artışı yapar. İGÜ, vasküler permeabilite, prokoagülan aktivite ve adezyon molekülleri ekspresyonunu arttırarak vasküler hasara neden olmaktadır. Mezanşiyal matriks genişlemesi, özellikle fibronektin, laminin, klasik kollajen zincirlerinden α 1(IV) ve α 2(IV) gibi ekstraselüler matrix moleküllerinin sentezlerindeki artış ve yıkımlarındaki azalmaya bağlı matriks birikimidir (24-26).

Protein kinaz C (PKC) aktivasyonu: Serin treonin kinaz grubu olarak bilinen PKC, vücutta yaygın olarak bulunan bir enzimdir. PKC, kan akımının düzenlenmesi, hücrel farklılaşma, sitokin oluşumu gibi birçok vasküler fonksiyonda rol alır. Kinazlar vasküler permeabiliteyi, hücrel proliferasyonu ve vasküler kontraktileti artırır. Diyabetik

hayvanlarda gözde retina, aorta, kalp ve glomerülde arttığı gözlenmiştir (23, 27). Ayrıca AII vasküler endotelial büyüme faktörünü (VEGF) ve ET oluşumunu artırmaktadır (28).

Sorbitol ve poliöl yolu: Sinir, glomerül ve lens ve retina gibi insüline bağlı olmayan dokularda hücre içi glikoz seviyesi hiperglisemiye bağlı olarak gelişir. Polyol yolunun aktivitesini sınırlayan aldoz redüktaz enzimi glikozu sorbitole çevirirken, sorbitol dehidrogenaz enzimi sorbitolu fruktoza çevirir. Sorbitol hücre zarını geçemediğinden hücre içinde birikir ve ozmotik etkiler ile piridin nükleotidlerinin redoks durumunu değiştirerek (NADP/NAD⁺ oranında ve PKC’de artış) hücre içi miyoinositol seviyelerini azaltır ve doku hasarına neden olur (20). Yüksek glikoz düzeyleri ve reaktif oksijen türleri (ROT), diaçilgliserol oluşumunu arttırarak vasküler endotelial hücrelerde PKC’yi de aktive eder. Aktive olmuş PKC, sitokinler, ekstraselüler matriks, plazminojen aktivatör inhibitör (PAI-1) ve vazokonstriktör endotelin-1 (ET-1) yapımını arttırır. Ayrıca PKC, VEGF aktivitesinde rol alır yapar. Bu değişiklikler sonucunda bazal membran kalınlaşması, vasküler oklüzyon, artmış vasküler permeabilite ve artmış anjiogenezise neden olur.

Renin anjiotensin aldosteron sistemi (RAS): RAS bir endokrin sistemdir. Vücudun birçok olayında rol alır. En önemlilerinden biri de kan basıncı düzenlenmesinde, su ve elektrolit dengesinin sağlanmasında önemli rol almasıdır (29). Vücutta birçok dokuda RAS sistemi elemanlarının mevcut olduğu, depo edildiği ve salgılandığı saptanmıştır. Doku RAS’ı etkilerini otokrin, parakrin veya intrakrin olarak gösterir. Lokal doku RAS’ı sistemik RAS’tan etkilenir ve onu destekler, fakat bağımsız olarak görev yapar. RAS’ın %10’unu klasik olarak bilinen dolaşım sistemindeki %80-90’ını dokulardaki lokal RAS oluşturmaktadır. Böbrekler, damar endoteli, sürrenal bez, beyin, kalp ve yağ dokularında renin, anjiotensinojen gibi RAS’ın temel elemanları bulunmuştur. İnsanda 4 tip A II reseptörü bilinmektedir (30). A II’nin farklı kromozomlarda tanımlanmış, G protein ailesinden olan (31-33) ve en iyi bilinen 2 reseptörü vardır A II-tip 1 (AT1) ve A II-tip 2 (AT2) olarak adlandırılır. AII hemodinamik, endokrin ve mitojenik etkilerini AT1 reseptörü üzerinden gösterir. AII’nin renal doku üzerindeki etkisi, kan basıncı ve glomerüler geçirgenlikte artışla hem hemodinamik hem de hormonal ve metabolik yolla gerçekleşmektedir. Bu etkiler arasında oksidatif stres, büyüme faktörleri, dönüştürücü büyüme faktörü beta-1 (transforming growth factor beta-1, TGF-β1), fibroblast ve fibroziste artış, monosit aktivasyonu önemli yer alır (33).

AII, hemodinamik etkilerinin yanısıra, renal hücreler üzerinde, trofik, inflamatuvar ve profibrinojenik etkilerde yapmaktadır. Ayrıca AII, TGF- β , aktivitesini de uyarmaktadır. Endotelial hücrelerde meydana gelen etkilenmelere ve anjiyotensin II artışına bağlı olarak ET-1 düzeyleri de artmakta ve intraglomerüler basınç artışına katkıda bulunmaktadır.

Sitokinlerin aktivasyonu: Bu moleküllerin uygunsuz sentezlerinin, mikrovasküler hastalıkların gelişmesinde merkezi bir rol oynadıkları bildirilmektedir (34). En önemli sitokin, birçok değişik fibrotik olayın patogenezinin sorumlu olan TGF- β 1'dir. Normal fonksiyonu, doku onarımı ile ilgili fizyolojik işlevlerin düzenlenmesidir. Hücrelerdeki matriks protein sentezini uyarır, hücre farklılaşması ve proliferasyonunu etkiler. Hipergliseminin, TGF- β 1 sentezini uyararak kollajen yapımını artırdığı belirlenmiştir (34). Tip IV kollajen özellikle fibrozis oluşumunda önemlidir. Bağ doku büyüme faktörü (Connective tissue growth factor) (CTGF), VEGF, epidermal growth faktör gibi diğer bazı sitokinlerin de diyabetik nefropati (DNP) gelişiminde rol aldığı düşünülmektedir. Mekanik etki ve TGF- β 1 tarafından uyarılan ve özellikle tip I kollajen sentezine yol açan CTGF'nin diyabetik böbrekte 10 kat arttığı bildirilmiştir (35). Buna karşın, epidermal growth faktörün glomerüler hasarın onarımı ile ilişkisinin olduğu bildirilmektedir (36).

3.5.6 Deneysel Diyabet Modelleri

Deney hayvanlarında deneysel diyabet oluşturulması cerrahi yolla, kimyasal ajanlarla, spontan olarak, genetik olarak veya virüs aracılığıyla yapılabilmektedir (37).

Cerrahi yolla yapılan diyabet modellerinde pankreas tamamen çıkarılarak diyabet oluşturulur.

Genetik olarak glikoz metabolizmasında anahtar rol oynayan proteinlerin transgenik ya da knock-out hale getirilmesi ile diyabet oluşturulur.

Kimyasal ajanlarla diyabet oluşturulmasında alloksan ve streptozotosin (STZ) bu amaçla kullanılan kimyasal ajanlardır. Her ikisi de intravenöz, intraperitoneal ya da subkutanöz yolla uygulanabilir.

- **Alloksan:** Selektif olarak pankreas beta hücrelerini hasarlayarak insüline bağımlı diyabete neden olduğu bildirilmiştir (37, 38).

- **Streptozotosin (STZ):** N-(Methylnitrosocarbamoyl)- α -D-glucosamine yapısındadır, ışıktan korunmalıdır. Nötral pH’da hızla dekompoze olduğundan optimum stabilitesi için ortamın pH’sı 4-4.5 olmalıdır. Bu nedenle STZ çözündürülürken sitrat tamponu kullanılmalıdır. Pankreas β hücrelerini hasarlayarak hem insüline bağımlı hem de insüliniden bağımsız diyabete neden olmaktadır. Yetişkin sıçanlarda tek doz (40-60mg/kg) damar içi yolla STZ uygulamasının insüline bağımlı diyabete yeni doğmuş sıçanlara tek doz periton içi veya damar içi yolla 100 mg/kg STZ uygulamasının ise insüliniden bağımsız diyabet neden olduğu bildirilmiştir (37, 38). Tezimizde 45 mg/kg STZ uygulanmıştır.

Açlık kan şekeri düzeyinin ölçülmesi: Kan şekeri ölçümü biyokimya laboratuvarlarındaki otoanalizör cihazıyla yapılabileceği gibi, bir damla kanla ölçüm yapabilen kan ölçüm cihazlarıyla da yapılabilir. Otoanalizör içindaha fazla kan gerektiğinden çalışma boyunca bir kez kan ölçümü yapılacak ise bu cihazla ölçüm yapılması uygun olur. Ancak kan glikoz seviyesi gün boyunca belirli aralarla ölçülecek ise bir damla kanla çalışan cihazları seçmek daha uygun olacaktır. Deney hayvanının kuyruğundan alınan bir damla taze kan, ölçüm cihazının stripine emdirilir. Cihazın türüne göre 15 veya 20 saniyesonra kan şekeri düzeyi cihazın ekranından okunur. Bu cihazların kan glikoz seviyesini ölçmesi “glikozoksidazperoksidaz” metodu ile olmaktadır (38).

3.6 Hipertansiyon

Hipertansiyon endüstri toplumlarının birçoğunda erişkin nüfusun %25’inin etkileyen temel sağlık sorunudur (39). Arterlerde ölçülen kan basıncının normal kabul edilen değerlerin üzerinde olması olarak tanımlanır. Epidemiyolojik verilere göre otuzlu yaşlarda %20-25 olan hipertansiyon prevalansının 60 yaş ve üzerinde %50'lere çıktığı gösterilmiştir (40). Ülkemizde hipertansiyon prevalansının erişkin erkeklerde %36,3 erişkin kadınlarda ise %49,1 olduğu bulunmuştur (41).

Kan basıncı sürekli bir değişkenlik gösterir. Vücudun aktivitesine ve emosyonel uyarılara bağlı olarak değişiklik gösterebileceği gibi günün saatlerine göre de değişiklik gösterir. Bu fizyolojik değişiklikler içinde en yüksek kan basıncına sabah saat 8-12 arasında rastlanır. Normal kan basıncı değerlerinin saptanması için uzun süreli kitlesel araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Son yıllarda kesin hipertansiyon seviyesi gittikçe aşağı seviyelere çekilerek 160/95mmHg’lerden 140/90 mmHg seviyelerine inmiştir. Bu konuda en son

yayımlanan JNC7 (Joint of National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure) raporuna göre hipertansiyonun sınıflaması Tablo 3'deki gibidir.

Tablo 3: Hipertansiyon Sınıflaması (42).

Kan Basıncı Sınıfı	Sistolik Kan Basıncı	Diastolik Kan Basıncı
Normal	<120	Ve < 80
Prehipertansiyon	120-139	Veya 80-89
Evre 1 Hipertansiyon	140-159	Veya 90-99
Evre 2 Hipertansiyon	≥160	≥100

3.6.1 Hipertansiyonun patogenezi:

Kan basıncının oluşumunda kalp debisi ve periferik damar direnci rol oynar ve bu faktörleri etkileyen nedenler hipertansiyona yol açar. Hipertansiyonun patogenezinde birden fazla faktör rol almaktadır. Bu faktörler arasında genetik faktörler, böbrekten tuz atılım yetersizliği, renin anjiyotensin sistemi, sempatik sinir sistemi, kalp atım hacmini arttıran faktörler, periferik damar direnci, vasküler hipertrofi, endotel kökenli faktörler ve insülin direnci yer alabilir. Bu faktörlerin hepsi hastalığın etyolojisinin belirlenmesinde rol almaktadır (1).

3.6.2 Hipertansiyonun Etiyolojisi

Hipertansiyonun %90'dan fazlası idiyopatik iken (primer ya da esansiyel), %5-10'u ikincil bir nedene bağlanabilir (sekonder hipertansiyon).

Esansiyel hipertansiyon: Arteriyel hipertansiyonu olan ve tanımlayıcı sebebi olmayan hastaların primer, veya idiyopatik hipertansiyonu var denir. Esansiyel hipertansiyonu etkileyen faktörler arasında aşağıdaki nedenler yer almaktadır (43).

- ❖ **Sempatik sinir sisteminin hiperaktivitesi:** Taşikardi ve kardiyak output'un artışı ile karakterize olup genç kişilerde daha çok gözlenir.

❖ **Anormal kardiyovasküler ve renal gelişim:** Büyük arterlerin elastisitesinde bozukluk meydana gelirse miyokardiyal oksijen tüketimi minimize olurken, koroner akım maksimize olur.

❖ **Renin anjiyotensin sistem aktivitesi:** Renin, böbreğin jukstaglomeruler hücresinden sekrete edilen ve aldosteronla negatif feedback halkasında bağlantılı bir enzimdir.

Değişken faktörler onun sekresyon oranını belirlerken, birincil belirleyici diyetteki sodyum alımındaki değişikliklerle kısmen ilişkili olarak, bireyin volüm durumudur. Reninin kendi substratı üzerine etkisinin son ürünü, AII peptidinin neslidir. Hedef organların bu peptite cevapları tek olarak önceki diyetle elektrolit alım ile belirlenir. Örneğin, sodyum alımı, normal olarak AII'ye adrenal ve renal damar cevaplarını düzenler. Sodyum kısıtlamasıyla, adrenal cevaplar arttırılır ve renal damarsal cevapları azaltılır. Sodyum yüklenmesi tam tersi etkiye sahiptir. Hipertansif bireylerde plazma renin aktiviteleri aralığı normotansif bireylerdekilere daha geniştir. Sonuç olarak, bazı hipertansif hastalar düşük-renin ve diğerleri yüksek-renin esansiyel hipertansiyonuna sahip diye tanımlanmıştır (44, 45).

Düşük-renin esansiyel hipertansiyonu: Tüm diğer kriterlerle esansiyel hipertansiyona sahip hastaların yaklaşık %20'si suprese plazma renin aktivitesine sahiptir. Bu durum Afrika soyundan gelen bireylerde, beyaz hastalarda daha yaygındır. Bu hastalar hipokalemik olmalarına rağmen, tanımlanamayan bir mineralokortikoid aşırı üretilmesine bağlı olarak sodyum retansiyonu ve renin supresyonuna sahip oldukları ileri sürülmektedir fakat kanıtlanmamıştır.

Yüksek-renin esansiyel hipertansiyon: Esansiyel hipertansiyonlu hastaların olarak %15'i normal sınırın üstünde plazma renin aktivitesine sahiptir. Plazma reninin bu hastalardaki yükselmiş arteriyel basıncın patogeneğinde önemli bir rol oynadığı öne sürülmüştür.

❖ **İntrasellüler sodyum ve kalsiyum alımı:** İntrasellüler Na^+ artışının intrasellüler Ca^{++} konsantrasyonunda da artışa neden olabileceği ve hipertansiyonun karakteristiği olan vasküler düz kas tonusunda artışla açıklanmaya çalışılmıştır.

❖ **Diğer faktörler:** İnsülin direnci iskelet kaslarında glikozun kullanımının azalmasıyla karakterize metabolik bir bozukluktur (46). Aşırı insülin sodyum tutulumuna ve hücrel proliferasyon ve matriks genişlemesi gibi vasküler yanıtlara neden olur.

Hiperinsülinemide AII, ET ve vazopressin (VP) gibi nörohumoral faktörler endotel ve vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu hızlandırır. Son olarak insülinin çeşitli büyüme faktörlerine etkisi ile ateroskleroza hızlandırarak damar hasarı yapar. Bu faktörler nefropati geliştirmeye genetik meyilli insanlarda damarlarda ve son organlarda hasarı arttırır. Yaş, ırk, sigara içimi, aşırı alkol alımı, serum kolesterolü, glikoz intoleransı ve obezite bu hastalığın prognozunu değiştirebilir (43).

Sekonder hipertansiyon: Sekonder hipertansiyon belirlenebilir bir nedeni olan hipertansiyondur ve tüm hipertansif populasyonun %5-10'unu etkilemektedir. Sekonder hipertansiyonun araştırılma endikasyonları arasında: sekonder hipertansiyon düşündürecek hikaye, fizik muayene laboratuvar bulguları, üçlü ilaç tedavisine yanıtızsızlık, önceden iyi kontrol edilmiş hipertansiyonun kontrolünün kötüleşmesi, malign hipertansiyon, aile hikayesi olmaksızın diastolik kan basıncının > 110 mmHg olması olabilmektedir.

Sekonder hipertansiyonun nedenleri şöyle özetlenebilir:

- Böbreğin parankimal hastalıkları (akut parankimal, kronik glomerulonefrit, intersitisiyel nefrit, polikistik böbrek, bağ dokusu hastalıkları, diyabetik böbrek hastalığı, renin salgılayıcı tümörler).
- Renovasküler hastalıklar.
- Endokrin nedenler (Akromegali, Hipotiroidi, Hipertiroidi, Hiperkalsemi, Cushing sendromu, Primer aldosteronizm, Konjental adrenal hiperplazisi, İnsülin direnci/hiperinsülinemi, obezite).
- Nörolojik nedenler (Kafa içi basınç artması, beyin tumorleri, ensefalit, posterior fossa lezyonları, Guillain-Barre sendromu).
- Diğer nedenler (Aort kaortasyonu, gebelik hipertansiyonu, intravasküler volüm artması, alkol, ilaçlar, Porfiriya, Bilginturan sendromu sayılabilir (1)).

3.6.3 Hipertansiyon Böbrek İlişkisi:

Hipertansiyonun böbrek fonksiyon bozukluğu ile ilişkisi olduğu kavramı ilk kez 1800'li yıllarda yılında Bright tarafından öne sürülmüş, kalbin hipertrofisi ile böbreğin küçülmesi arasındaki ilişkiyi tanımlamış ve bunun nedeninin böbrek yetmezliğinde biriken iritan humoral maddelerin daralttığı damarların kan pompalama gereksiniminin arttırdığı 'kardiyak yükü' olarak tanımlamıştır (39). Renal hipertansiyonda sıvı birikiminin rolü ise ilk kez 1871 yılında Traube tarafından ortaya konmuştur ve renal parankimin büzüşmesi sonucu

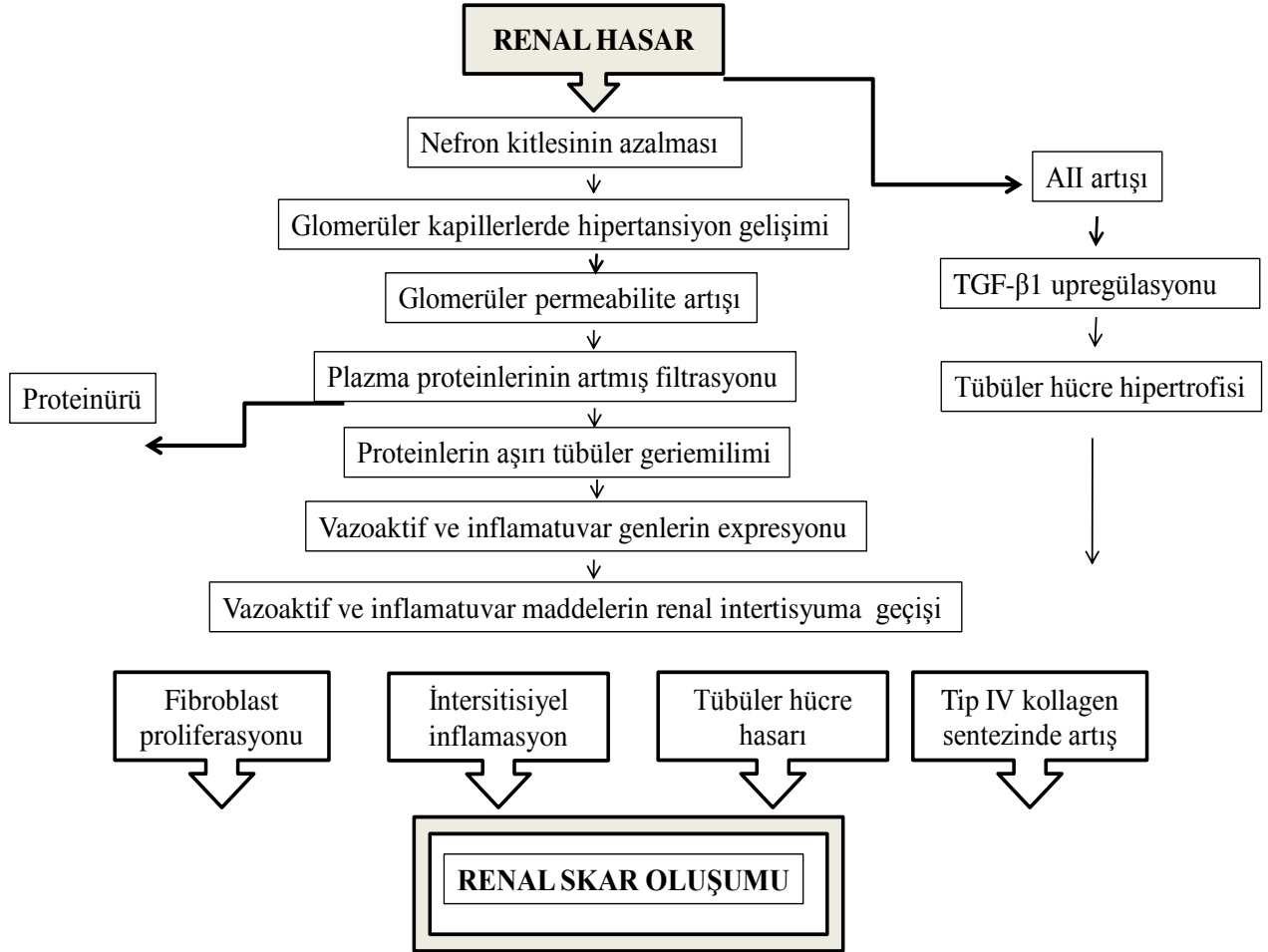
üriner sekresyon yolu ile arterial sistemden uzaklaştırılan sıvı miktarının azaldığını, sonuçta hipertansiyon ortaya çıktığını ileri sürmüştür (39).

Böbreğin histolojisi normal olsa bile esansiyel hipertansiyonun patogeneğinde merkezi rol aldığı düşünülmektedir. Son dönem yapılan çalışmalarda hipertansiyonun Mendeliyan geçişli şekilli ilişkin 8 gende mutasyon olduğunu göstermişlerdir (39). Bu genetik bozuklukların her birinde renal tübüler sodyum geri Emilimi artmakta (bozulmuş natriürez) ve tuz duyarlı hipertansiyon ortaya çıkmaktadır. Ayrıca primer renal parankim hastalıklar ve renal damarlardaki anormallikler sekonder hipertansiyona neden olabilmektedir. Diğer yandan böbrekler hipertansiyon yükünden rahatsız olmaktadır. Ayrıca diyabetik nefropati ve diğer primer böbrek hastalığı nedenlerine bağlı olarak kronik böbrek yetersizliğinin ilerlemesinde hipertansiyonunun temel bir progresyon faktörü olduğu görülmektedir.

Bu karmaşık ilişkiye başka bir açıdan bakıldığında kan basıncı düzenlenmesinde Ohm kanunlarına göre arteriyel kan basıncı kardiyak debi ile sistemik vasküler direncin çarpımı tarafından belirlenmektedir. Yani hipertansiyon iki değişkenden birinin artışına bağlı olarak değişir. Bu durumda böbreğin extrasellüler sıvı (ESS) hacminin düzenlenmesindeki merkezi rolü nedeniyle kan basıncı üzerinde çok önemli bir etkisi olduğu gözlenmektedir. Böbrekte su ve tuz tutulumu, ESS hacminin artmasına, kan hacminin artmasına, venöz dönüş ve dolum basıncına neden olmakta ve bunların sonucunda kalp debisinin arttırarak hipertansiyona neden olmaktadır (39).

Hipertansiyonun erken dönemlerinde böbrekte kan akımında azalma olmasına rağmen filtrasyon fraksiyonunda artış olur. Böylece glomerüler filtrasyon değerinde bir değişiklik gözlenmez. Hipertansiyonun böbrekte oluşturduğu yapısal değişiklikler benign ve malign arteriyoller nefroskleroz olarak incelenir. Benign arteriyoller nefrosklerozda görülen vasküler değişiklikler tüm vasküler sistemde hipertansiyonun yol açtığı değişikliklerin bir parçasıdır ve hipertansiyonun süre ve şiddetine bağlıdır ve tipik lezyon her büyüklükteki damar duvarında kalınlaşmadır. Malign arteriyoller nefrosklerozda ise histopatolojik bulguları intimal proliferasyon ve fibrinoid nekrozdur. Hipertansif hastalarda saptanan bu yapısal ve fonksiyonel değişikliklerin bir kısmının ise hipertansiyonunun nedeni mi sonucumu olduğu halen tartışmalıdır. Hipertansiyonun ülkemizde de en sık son dönem böbrek yetmezliği nedenlerinden biridir. Türk Nefroloji Derneği verilerine göre son dönem böbrek yetmezliğinin %25'i hipertansiyona bağlıdır (1).

Deneysel çalışmalara bakıldığında, ilk kez 1934 yılında Goldblatt ve ark.ları hayvan deneylerinde böbrek damarlarında daralma meydana getirerek hipertansiyon oluşturmuşlar ve hipertansiyon patogenezinin anlaşılmasına katkıda bulunmuşlardır (39). Goldblatt hipertansiyonun bir diğer şekli olan iki böbrek/bir klips hipertansiyonunda bir böbreğe dokunmayıp diğer böbreğin arterini klipslemiştir. Bu şekilde oluşturulan insanlardaki unilateral renal arter stenozu ile benzerdir. Bu modelde bir arterin sıkıştırılması ile iskemik böbrek tarafından renin üretiminin artması sonucunda kan basıncında hızlı bir yükselme olur. RAS'ın aktivasyonu, AII'ye bağlı vazokonstrüksiyona ve iskemik böbrekte olduğu kadar karşı böbrekte de natriürezin bozulmasına ve hipertansiyona yol açar (39) (Şekil 7).



Şekil 7: Hipertansiyonda renal hasar oluşum mekanizması

Böbreğin az kanlaması renin anjiyotensin mekanizması stimülasyonu ile hipertansiyona neden olur. Renin renal iskemide jukstaglomerüler aparattan salınıp karaciğerden gelen plazma proteini anjiyotensinojenden anjiyotensin I'i ayırıp birçok dokuda varlığı bilinen converting enzimi etkisi ile AII'nini yapımını sağlar. AII, aldosteron ve ADH salgısını, Na⁺ kanalları ve su kanalları üzerinden etkileyip NaCl ve su retensiyonuna neden olur.

3.6.4 Deneysel Hipertansiyon Modelleri

Deneysel hipertansiyon modelleri tavşan, maymun, domuz, fare gibi denekler üzerinde çalışılmaktadır.

Deneysel modeller:

1-Renovasküler Hipertansiyon

Bu modelde RAS sistemi önemli rol oynar. Periferik renin anjiyotensin sistemi ve sempatik sinir sistemini aktive eden renal arter konstrüksiyonu esasına dayanır (47, 48). Renin sempatik aktivite arttığı zaman böbrekten salınır ve anjiyotensin I'i anjiyotensinojene çevirir. AI anjiyotensin konverting enzim tarafından AII ye çevrilir. AII potansiyel bir vazokonstriktördür ve kan basıncını artırır. Aynı zamanda artmış kan basıncı ve hipertansiyon ile sonuçlanan tuz ve su geri emilimine neden olan aldosteron salgılamasına neden olur.

Renovasküler hipertansiyonun çeşitli türleri vardır:

1.Goldblatt yöntemi: Goldblatt ve ark.ları 1934 yılında köpeklerde renal arterin kısmi daraltılması ile hipertansiyon oluşturmuşlardır. Tavşan ve ratlarda halen devam eden yöntemdir. U şekilli gümüş şerit ile renal arter daraltır ya da 4.0 ipek sütür ile renal arter ligate edilmiştir. Ligasyondan 4 hafta sonra sistolik kan basıncı 160 mmHgden yüksek bulunmuştur. Kalıcı hipertansiyonun ise 12 ay civarında olduğu gözlenmiştir (47, 48).

a) İki Böbrek-Bir Klip hipertansiyon (Two kidney-one clip 2K1C): Renal arter sadece bir tarafta daraltılır. AII nin dolaşımdaki artışı ise plazma renin aktivitesindeki artış yüzünden kan basıncındaki artışın devam etmesi ile sonuçlanır. Tuz ve su kaybı olmaz çünkü diğer böbrek sağlamdır. Yaklaşık 6 hafta sonra artmış AII tuz ve suyun dereceli tutulumu ile sonuçlanan adrenal korteksten aldosteron salgılamasını uyarır. Tuz ve suyun tutulumu ile renin ürünleri azalır. Bu safhadan sonra hipertansiyon volüm bağımlıdır. Tuz ve su dengesi renovasküler

hipertansiyonun patogenezi ile ilişkilidir. Artmış kan basıncı ve artmış renin aktivitesi kliplerin çıkarılması ile geri döner (47, 48).

b) Bir böbrek bir klip hipertansiyon (one kidney-one clip 1K1C): Böbreklerden birinin renal arteri daraltılırken, diğer böbrek alınır. Birkaç saat içerisinde kan basıncı artar. Böbreklerden biri olmadığı için diüre ve natriüre basıncı yoktur ve su ve tuz tutulum hızı artar. Plazma renin aktivitesi genellikle normaldir. Hipertansiyon volüme bağımlı hale gelir (47, 48).

c) İki böbrek iki klip hipertansiyon (two kidney two clip 2K2C): Her iki renal böbreğin renal arterleri ya da aortaları daraltılır. İskemik böbrek dokusu meydana gelir (47, 48).

II. Aortanın daraltılması: Renal kan akımı aortanın bağlanması ile azaltılabilir ve kan basıncı değiştirilir.

III. Azaltılmış renal kitle (1/2 ya da 5/6 nefrektomi): 5/6 renal kitlenin çıkarılması ile oluşturulur. Sağ böbrek alınır, sol böbreğin ise renal arterinin 3 dalından ikisi daraltılır.

2. Renal parankime dışarıdan basınç uygulanması ile oluşturulan hipertansiyon

a) Yaprak hipertansiyon (Page hypertension): İlk kez 1939 gerçekleştirilmiştir. Böbreğin etrafına selülozdan ince bir kağıt yerleştirilir ve renal hilustan böbrek bağlanır. Her iki böbrek ya da sadece biri bu şekilde sarılır diğeri çıkarılır. Bir fibrokollagenez kabuk 3-5 günde böbreği sarar. Bu kabuğun renal parankime olan baskısı sonucunda vasküler basınç azalır. Periferel direnç ve kan basıncı artar (47, 48).

b) Grollman hipertansiyon: Böbrek dokusu 8 rakamı şeklinde ligature edilir. İki böbrek bir ligatür (2K1L) ya da bir böbrek bir ligatür (1K1L) şeklinde uygulanabilir (47, 48).

3. Diyetel hipertansiyon

Tuz alımında artış: Fizyolojik olarak normal bir böbrek extrasellüler volümde belli oranda bir artışa izin vermeden günlük tuz atılımını devam ettirir. Ortalamadan yüksek tuz alan popülasyonlarda hipertansiyon prevalansında artış gözlenmiştir. Bu durum ratlarda da benzer şekildedir. Deneyisel olarak %1-2 lik NaCl içeren su alımı ile 9-12 ayda hipertansiyon olduğu gözlenmiştir (47, 48).

Obesite oluşturularak da deneyisel hipertansiyon oluşturulabilir.

4. Endokrin hipertansiyon

I. Mineralokortikoid indüklü hipertansiyon: Mineralokortikoidler böbreklerde basınç artışı yüzünden diüre kaçıışı oluşması ile tuz ve su tutulumu artışına neden olur. Çok ileri seviyede sodyum ve su tutulumu olmaz ancak vücutta genel seviyeleri hafif olarak artar (hp15, hp7, 69,70). Deoksikortikosteron asetat (DOCA) ürünlerinin ratlarda hipertansiyonu arttırdığı gösterilmiştir. DOCA indüklenmesi ile tuz ve su geri emiliminde ve dolasıyısı ile kan basıncında artış gözlenmiştir. Su geri emilimi ve vazokonstrüksiyon ile sonuçlanan vazopressin salınımında da artış gözlenmiştir. Ayrıca renin anjiyotensin sisteminin aktive olması sonucunda sempatik aktivitede artış gözlenmiştir (47, 48).

II. Adrenal regenerasyon hipertansiyon: Tek taraflı nefrektomiye takiben sağ ve sol adrenal bezlerin çıkarılması takip eder (47, 48).

5. Nörogenik hipertansiyon: Karotid sinüs ve aortik arkın içine baroreseptör yerleştirilmesi ile kan basıncının kontrolünde negatif feedback mekanizması kullanılır. Santral sinir sisteminin stimülasyonu ile de oluşturulabilir (47,48).

6. Fizyogenik hipertansiyon: Tekrarlayan stres ile hipertansiyon oluşturulur. Borderline hipertansif ratlar (BHR) kullanılır. Günlük 20 dakikadan 120 dakikaya kadar air-jet stümulasyonu ile fizyolojik stres oluşturulur (47, 48).

7. Genetik hipertansiyon: 1963 yılında Okimato ve Aoki tarafından fizyolojik, farmakolojik ve cerrahi bir girişim gerektirmeyen model olarak tasarlanmıştır. Genetik inbreed türlerin geliştirilmesi ile spontan hipertansif ratlar oluşturulmuştur ve hipertansiyonun tüm komplikasyonları gözlenebilmektedir. Fenotipik kökenli ve genetik kökenli olabilir (47, 48).

8. Diğer modeller:

- Kolinometrik ajan indüklü hipertansiyon: Santral kolinerjik mekanizmanın ve sempatik sinir sisteminin kolinometrik ajanlar ile (physostigmine, kholinesterase inhibitörü gibi) indüklenmesi ile oluşturulur.

-AII indüklü hipertansiyon: AII nin subkutan enjeksiyonu ile oluşturulur.

-Kadmiyum indüklü hipertansiyon

-Kronik nitrikoksit inhibisyonu-indüklü hipertansiyon: SHR ratlara nonselektif nitrik oksit sentetaz inhibitörü (L-NAME) verilerek oluşturulur.

-Uterin iskemi: Preeklampsi ile indüklenebilir (47, 48).

Deneyisel Hipertansiyon Modellerde Kan Basıncı Ölçümü

Deneyisel hipertansiyon modellerinde tekrarlayan ölçümler tercih edilmektedir. Akut deneylerde, hayvanlar anestezi altındadır ve ulaşılabilen artere kanül ile girilir ve basınç transdüzer ile basınç ölçümü yapılır. Ancak anestezi ajanlar kardiyovasküler refleksleri etkileyebildiği için kan basıncını değiştirdiği düşünülmektedir.

Genel olarak direkt ve indirekt yöntemler kullanılmaktadır:

Direkt Yöntem: Ratlarda anestezi altında sağ ya da sol karotid arterden ve ya femoral arterden normal SF içinde %1'lik heparin ile aseptik koşullarda kanule edilerek yapılır. Biz tezimizde bu yöntemi kullandık.

İndirekt yöntem: Ratlarda tail cuff denilen kuyruk manşeti ile sistolik kan basıncının ölçülmesi esasına dayanır. Ratın kuyruğuna tail cuff sifingomano-metre ya da basınç ölçer takılarak ölçüm yapılır (47, 48).

3.7 Diyabet ve Hipertansiyon İlişkisi

Diyabetik hastalarda hipertansiyon, koroner, serebral ve vasküler yatağı etkileyen büyük damar atherosklerotik hastalığı için önemli bir risk faktörüdür. Büyük damar hastalığı insidansı hem tip I hem de tip II diyabetliler için dramatik olarak artar ve önemli mortalite ve morbidite sebepleri arasında yer alır. Hipertansiyon, nefropati ve retinopati gibi diyabetik mikroanjiyopatik komplikasyonların progresyonunu da hızlandırır. Hipertansiyonda var olan hemodinamik bozuklukların şiddetini artırıp glomerüler kapiller kaçış ve basıncı daha da yükselterek renal hasarın hızlandığı düşünülmektedir. Kötü glisemik kontrol afferent arteriyolde vazodilatasyona yol açarak yükselmiş kan basıncının glomerüle daha fazla yansımaya izin verir. Nefropati geliştirecek diyabetik hastalarda, hipertansiyon prevalansı ve ortalama kan basıncı, nefropati geliştirmeyecek diyabetik hastalardan daha yüksektir. Ebeveynlerinde hipertansiyon öyküsü olan tip I diyabetiklerde nefropati riski üç kat fazladır ve esansiyel hipertansiyona yatkınlığın nefropati riskini de arttırdığını düşündürmektedir (39).

STZ ile diyabet oluşturulmuş fare modelinde Goldblattın iki böbrek/bir klips hipertansiyonunun etkilerine ilişkin bir çalışmada, yüksek sistemik basınca maruz kalan klipslenmemiş böbrekte şiddetli diyabetik nefropati gelişimi gözlenirken, yüksek sistemik basınçtan korunan klipsli böbrekte nefropati gelişmemiştir (39). Hipertansiyonun diyabetik nefropati patogeneziindeki merkezi rolünü gösteren bu çalışmalar, diyabeti ve tek taraflı renal arter stenozu olan hastaların otopsi bulgularına ilişkin yayınlarca da desteklenmektedir. Glomerüler bazal membran kalınlaşması ve nodüler Kimmelstein-Wilson lezyonları, sadece yüksek arteriyel basınca maruz kalan ve renal arteri açık böbrekte gözlenmemektedir (39).

Biz tezimizde diyabet ve hipertansiyonun ayrı ayrı ve birlikte oluşturulduğu deneysel modellerde etkili olan Anjiyotensin II tip I AT1-reseptör, VEGF, Endotelin-I ve Kaspaz-3 antikorlarının immunohistokimyasal olarak dağılımlarının ve şiddetinin değerlendirmeyi planladık.

3.7.1 Anjiyotensin II tip I (AT1)-reseptörü

RAS kan basıncının düzenlenmesinde ve hücre dışı sıvı hacminin korunmasında önemli rol oynamaktadır. AII, RAS'ın esas mediatörüdür. Geniş spektrumlu bir hormondur ve dolaşım dışında böbrekler, adrenaller, beyin, hipofiz bezi, damar düz kasları, kalp ve sempatik sinir sistemi gibi dokularda da bulunmaktadır. Diğer peptid hormonlar gibi hedef hücrelerinin plazma membranlarında bulunan reseptörler aracılığı ile etki eder (49). Bu reseptörler AII tip I (AT1) ve AII tip II (AT2) reseptörleri olarak adlandırılır. AT1 reseptörleri 7 transmembran bölümünden oluşan 360 aminoasitli peptid yapısındadır. AT1 reseptörlerinde uyarı fosfoinositol/kalsiyum yolunun inhibisyonu ile gerçekleşir. AT1 reseptörlerinin uyarımı vazokonstriksiyon, aldosteron salınımı, böbrekte sodyum tutulumu, kardiyovasküler hipertrofi, hücre proliferasyonu, susuzluk hissinde artış gibi AII'nin temel etkilerini ortaya çıkarır. AT1 reseptörlerinin AT1a ve AT1b olmak üzere iki alt grubu vardır. Bu reseptörler böbrek, karaciğer ve dalakta eşit oranlarda bulunurken, AT1a alt grubu damar düz kas hücreleri, kalp ve akciğerde daha fazla bulunur. AT1b alt grubu ise adrenal bez, ön hipofiz, beyinde periventriküler bölgede bulunur. AT1a'nın vazokonstriksiyon, AT1b'nin ise hormon salınımı ile ilgili olduğu düşünülmektedir (50).

RAS sisteminde aktive olan AII damar düz kas hücrelerine direkt etki ederek güçlü bir vazokonstriksiyona neden olur ve kalbin kasılmasını ve atım sayısını arttırırken, böbreklerde proksimal tübüllerdeki sodyum-hidrojen antiportunu uyarak sodyum geri

emilimini arttırır ve böbreküstü bezinin korteksinden aldosteron salınımını uyararak, distal tübüllerden sodyum geri emilimini arttırır. AII'nin glomerüler efferent arteriyoller üzerine vazokonstrüktör etkisi, afferent arteriyoller üzerindeki vazokonstrüktör etkisinden daha belirgin olduğu için RAS sisteminin uyarılması intraglomerüler basıncı etkiler. İntraglomerüler basıncın artışı hem kapiller hasara hem de proteinüriye yol açmaktadır (51).

3.7.2 VEGF Ailesi

VEGF doku büyümesi ve organ hasarında tamir mekanizması süreci olan anjiyogenezis ve vaskülogenezis süreçlerinde rol alan bir bileşendir. Trombosit kaynaklı büyüme faktörleri süperailisinin üyesidir. Organizmada hem fizyolojik olaylarda, hem de tümör büyümesi ve yayılması gibi patolojik birçok hastalığın etiolojisinde rol oynar. Molar olarak vasküler geçirgenlikte histaminden 50.000 kat daha güçlü olduğu saptanmıştır. Vasküler geçirgenlik faktörü, ilk kez klonlandığı ve eksprese edildiği 1989 yılına kadar kısmi olarak tanımlanabilmiş ve bu tarihte güçlü bir in vitro endotelial hücre büyüme stimülatörü ve in vivo neovaskülarizasyon stimülatörü olduğu gösterilmiştir (52).

VEGF endotelial hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve vasküler geçirgenliği arttırarak endotel vazodilatasyonunu düzenler. VEGF ailesi: VEGF-A (Human-VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve Plasenta büyüme faktörü (Placental growth factor; PlGF) adı verilen altı üyeden meydana gelmektedir (53, 54). En iyi tanımlanan VEGFR-1 ve VEGFR-2 reseptörleri yüksek affiniteli transmembran tirozin kinaz reseptörleridir (55).

VEGF'in böbrek ile olan ilişkisine bakıldığında, VEGF ve iki VEGFR'nin tamamı normal glomerüller podositler ve renal tübüllerin fonksiyonu için gereklidir (56). Glomerüler podositlerden salınan VEGF glomerüler kapiller endotelial hücreler üzerindeki VEGFR-2'yi aktive eder ve endotelial fenestrasyon ve permeabilitenin düzenlenmesinde görev alır (53, 57). Fare ve insan böbreğinde, VEGF messenger-RNA (mRNA) ve/veya proteinleri glomerül podositlerinde, distal tübülde, toplayıcı kanallarda ve daha az olarak proksimal tübüllerde rastlanmıştır. Hipergliseminin farklı hücrelerde VEGF üretimini arttırdığı gösterilmiştir (58).

3.7.3 Endotelin-1

Endotelin-1 (ET-1) ilk olarak domuz aorta endotel hücrelerinden izole edilmiş 21 aminoasitlik siklik peptid yapısında bir moleküldür. Aminoasit düzenlenimi ve sayısına göre Endotelin-2 (ET-2) ve Endotelin-3 (ET-3) izoformları vardır. ET-1 vasküler düz kas hücreleri

ve endotelial hücrelerdeki reseptörlerinden en az birine bağlanarak otokrin ya da parakrin yolla aktivasyon gösterir. Organizmada sadece endotel hücrelerinde değil kardiyomiyositlerde, böbrek epitel hücrelerinde, nöronal stromal hücrelerde, lökositlerde de varlığı gösterilmiştir (59). Endotelinin, ET_A ve ET_B olmak üzere G protein çifti reseptörlerinin süperailisine ait reseptörleri bulunmaktadır. ET_A reseptörü esas olarak düz kas hücreleri ve kardiyak kas hücrelerinde bulunurken, ET_B reseptörleri baskın olarak endotelial hücrelerde gözlenir. Ancak her iki reseptörde organizmada yaygın olara gözlenir, örneğin ET_B reseptörleri makrofaj ve plateletlerde de gözlenirken, böbrekte her iki reseptöre de rastlanmıştır (59).

Endotelin sentezi ve salınımında kan akımının önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Shear stress reseptörleri olarak adlandırılan faktörler kan akımındaki artışın bir sonucu olarak vazodilatasyona cevaben endotelial hücreleri etkiler böylece nitrikoksit (NO) salınır ve ET-1'in salınımı ve üretimi azalır (60). Ayrıca ET-1 mRNA'sı TGF-beta, interlökinler, insülin, AII ve trombin gibi sitokinlerin etkisi ile artış gösterir (61). ET-1 renal sistemde toplayıcı kanalların epitel hücrelerinde ve vasküler endotelial hücrelerde salgılanmaktadır. Her iki ET reseptörü de renal vasküler ve epitelyum hücrelerde gözlenirken, ET_B predominant reseptör tipidir (59).

İnsanlarda ET-1 uygulamasının renal kan akımını, glomerüler filtrasyon oranını ve üriner volümü anlamlı şekilde azalttığı gözlenmiştir. Hemodinamik etkilerinin yanı sıra ET-1'in tuz ve su geriemiimi, asit-baz dengesi inflamatuvar hücre aktivasyonu glomerüler ve mezengiyal hücre büyümesine ilişkin de etkileri gözlenmiştir (62).

3.7.4 Kaspaz Ailesi

Apoptozis canlı hücrelerde, pre-implantasyon döneminden başlayarak tüm biyolojik süreçler içerisinde istenmeyen veya gereksiz hücrelerin ortadan kaldırılmasında ve doku homeostasisinde rol alan bir hücre ölüm mekanizmasıdır (63).

Apoptozis terimi ilk olarak 1972 yılında İskoçyalı araştırmacılar Kerr, Wyllie ve Currie tarafından canlı dokulardaki hücre azalmalarını tanımlamak için kullanılmıştır (64). Kaspazlar, zimojen (inaktif prekürsör) olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein yer aldığından sistein proteazlar olarak adlandırılan bir enzim grubudur ve aspartik asitten sonraki peptid bağını kırarlar. Şu ana kadar 14 tanesi tanımlanmıştır ve çoğu

apoptozisde rol almaktadır (65,66). Hücrede inaktif olarak bulunan kaspazlar, birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir kaskada neden olurlar. Kaspaz 2, 8, 9, 10 *başlatıcı kaspazlar* olarak bilinirken, Kaspaz 3, 6, 7 *efektör kaspazlar* olarak bilinir. Başlatıcı kaspazlar, apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara naklederler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar. İlk tanımlanan enzim interlökin 1- β dönüştürücü enzimdir (ICE) ve pro-kaspaz 1 olarak bilinir (67).

Kaspazların çoğu sitoplazmada bulunur ancak bazıları, örneğin kaspaz 12, golgi aparatında, kaspaz 2, kaspaz 3 ve kaspaz 9 mitokondride bulunabilir (68). En önemli başlatıcı kaspazlar mitokondri aracılı intrinsik yol için kaspaz 8, hücre yüzey molekülleri aracılı-ekstrinsik yol için kaspaz 9, endoplazmik retikulum aracılı yol için kaspaz 12'dir. Kaspaz 3 aktivasyonu programlanmış hücre ölümünde geri dönüşümsüz noktanın en önemli göstergesidir (69).

Apoptozis böbrek hastalıklarında farklı etkiler göstermektedir. Deneysel proliferatif glomerülonefrit modellerinde endotelial veya mezengiyal hücrelerin sayısal düzenlenmelerinde apoptozisin rolü olduğu ileri sürülmüştür. Böbrekte gözlenen sklerotik alanlarda apoptotik cisimcikler gözlenmiştir. Sklerotik lezyonlarda terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) to transfer biotin-dUTP nick and labeling (TUNEL) pozitif hücrelerin artış göstermesi, apoptozun başlangıçta bir kontrol mekanizması olmasına rağmen, daha sonraları kontrol dışı apoptoza gittiğini göstermektedir (70).

3.8 Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Oksidatif stres serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin bozulması sonucunda oluşmaktadır. Dış orbitallerinde bir ya da daha fazla ortaklanmamış elektron içeren kimyasal yapılar ve 'serbest radikal' olarak adlandırılır ve hücrelere giren oksijeni %1-4 oranında ROT dönüştürürler (71). Serbest radikaller reaktif bir yapıya sahip olup eşlenmemiş elektronlarını paylaşmak için diğer moleküllerle hızla reaksiyona girerler ve non-radikal bir molekülden tek bir elektron kaybı, non-radikal bir molekülün tek bir elektron kazanması ya da homolitik yarıma denilen normal bir molekülün kovalan bağının homolitik yarıması sonucu eşleşmiş elektronlardan her birinin ayrı parçada kalması sonucunda oluşabilirler (72).

Biyolojik sistemlerdeki radikaller aşağıdaki gibi sınıflandırılırlar:

Oksijen merkezli serbest radikaller: Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet}$), Hidroksil radikali ($\bullet OH$), Alkoksil radikali ($RO^{\bullet}$), Peroksil radikali ($RO_2^{\bullet}$), Hidroperoksil radikali ($HO_2^{\bullet}$)

Oksijen merkezli olmayan serbest radikaller: Karbon merkezli (Lipid radikalleri) Alkoksil radikaller, Sülfür merkezli (Sülfür radikali), Hidrojen merkezli (Hidrojen radikali), Demir merkezli (Perferil radikali), Azot merkezli (Nitrik oksit, Nitrojen dioksit)

Radikal olmayan reaktif oksijen türleri: Ozon (O_3), Hidrojen peroksit (H_2O_2), Hipoklorik asit ($HOCl$), Singlet oksijen (1O_2), Peroksinitrit ($ONOO$) (72, 73).

Serbest radikaller, vücuttaki kayıp elektronlarını bulmak için dolaşırlar ve çeşitli maddelere atak yaparak bunları deformasyona uğratıp aşındırırlar. Eşlenmemiş elektrona sahip bu moleküller elektronunu başka bir moleküle vererek veya elektron alarak daha kararlı hale geçme eğilimindedirler (74, 75, 76). Organizmalar için serbest radikallerin başlıca kaynağı moleküler oksijendir. Biyolojik sistemlerde büyük öneme sahip serbest radikaller oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest radikaller aynı zamanda oksidan moleküller, serbest oksijen radikalleri veya ROT olarak da adlandırılmaktadır.

Normal metabolizma sürecinde oluşan oksidasyon-redüksiyon olayları sonucunda ROS'un biyolojik bozukluklara neden olmamasına rağmen; iskemi, inflamasyon, radyasyon, elektromanyetik alan, hiperoksi vb. durumlarda daha fazla üretilmeleri sonucu membranlar, nükleik asitler, polisakkaritler ve enzimler üzerinde farklı etkiler yaparak, değişik derecelerde çeşitli dokularda hasara yol açmaktadırlar (77, 78). Bunlar (radikaller) ve (radikal olmayanlar) olarak iki grupta toplanabilirler. Radikaller elektron eksiklikleri nedeniyle başlıca moleküllerle kolayca elektron alış-verişi yapabilirler. Radikal olmayanlar ise elektron eksiklikleri olmadığı halde başka moleküllerle daha zayıf bir şekilde birleşirler. En iyi bilinen radikaller şu şekilde özetlenebilir:

Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet-}$) biyolojik sistemlerde en fazla oksijeni taşıyan serbest radikaldir. Bu radikalın en önemli kaynakları mitokondri, kloroplast ve endoplazmik retikulum elektron transport zincirinden sızan elektronlardır, organizmaya direk zarar vermese de bir hidrojen peroksit kaynağıdır. Ayrıca nitrik oksit ile reaksiyona girerek reaktif oksijen türevi olan peroksinitriti ($ONOO^-$) oluşturmaktadır.

Hidrojen Peroksit (H_2O_2); normalde serbest radikal değildir. Fakat serbest elektron içermesi, serbest hidroksil radikali oluşturabilmesi ve hücre membranlarına kolaylıkla

girebildiği için önemlidir. H_2O_2 geçiş metal iyonlarının varlığında kolayca parçalanarak yüksek oranda toksik olan hidroksil radikalini oluşturmaktadır (58,66). SOD aktivitesi sonucu ortaya çıkan H_2O_2 ; katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimleri ile su ve oksijene dönüştürülür.

Hidroksil Radikali ($OH^\bullet$): Birçok molekülle reaksiyona girdiğinden oldukça reaktiftir. Oksidatif strese en güçlü radikal olarak bilinir. $OH^\bullet$, DNA hasarına ve iyonize radyasyonun membranlara zarar vermesine neden olur. Ayrıca tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden proton kopmasına ve yeni radikallerin oluşmasına neden olmaktadır. Lipid peroksidasyon sürecini de başlatmaktadır.

Singlet Oksijen (O_2): Serbest radikal olmamasına rağmen serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına neden olduğu için önemlidir. Süperoksit radikalının dismutasyonu ve hidrojen peroksitin hipoklorit ile reaksiyonu sonucunda da oluşabilir (74,79).

Nitrojen oksidler ($NO_2^\bullet$): nitrik oksid (NO), renksiz bir gazdır ve dış yörüngesinde eşlenmemiş bir elektron taşıdığı için bir serbest radikaldir. Suda ve organik solventlerde çözünmesi nedeniyle hücre membranlarından kolaylıkla geçebilmektedir. Eşlenmemiş elektronu oksidasyon ya da redüksiyon reaksiyonlarına girerek çeşitli nitrojen türevleri ve hidroksil radikali oluşturabilir. Ayrıca havadaki moleküler oksijenle reaksiyona girerek kendisinden çok daha reaktif bir serbest radikal olan nitrojen dioksit ($NO_2^\bullet$) oluşturabilir (80, 81).

Serbest radikallerin kaynakları

Endojen ve eksojen olmak üzere başlıca iki önemli kaynağı vardır;

1.Eksojen Kaynaklar (Çevresel kaynaklı; hiperoksijenasyon, pestisitler, sigara, solventler, anestezikler, hava kirliliği, manyetik alan, radyasyon, stres, alkol, uyuşturucu, karsinojen maddeler, sıcak şoku güneş ışınları, antineoplastik ajanlar; nitrofurantoin vb.)

2.Endojen Kaynaklar (Küçük moleküllerin otooksidasyonu; tioller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, tetrahidropterinler, antibiyotikler vb. (74, 76, 82). Çözünür enzimler ve proteinler; ksantin oksidaz, flavoprotein dehidrogenaz, triptofan dioksijenaz, dihidroorotat dehidrogenaz, aminoasit oksidaz gibi enzimler, hemogloblin vb. (74, 83). Mitokondrial elektron transportu, endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron

transport sistemleri; sitokrom P 450, sitokrom b5 peroksizomlar; oksidazlar, flavoproteinler, plazma membranı; lipoksijenaz, NADPH oksidaz, prostaglandin sentetaz, lipid peroksidasyonu, oksidatif stres oluşturan durumlar; iskemi, travma, intoksikasyon aktive olmuş fagositlerdir (74, 83).

Serbest radikallerin etkileri Antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz kaldığı durumlarda serbest radikaller membran lipidleri, DNA, karbonhidratlar, proteinler ile reaksiyona girerek hücre hasarına ve hücre ölümüne neden olurlar (84, 85, 86). Proteinler aminoasit kompozisyonlarına bağlı olarak serbest radikal hasarından etkilenirler. Triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikal hasarına açıktırlar (74, 87). Serbest radikaller DNA'nın nukleotid yapısını oluşturan purin ve pirimidin bazları üzerine etki ederek DNA yapısında mutasyon, karsinogenez ve hücre ölümüne yol açabilirler. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan H₂O₂ hücre çekirdeğine ulaşarak hücre disfonksiyonuna DNA hasarına ve hatta hücre ölümüne neden olabilir (74, 88). Hücre membranındaki lipidler serbest radikallere karşı oldukça hassastırlar. Lipid peroksidasyonu membran yapısını oluşturan fosfolipid, glikolipid, gliserid ve sterol yapısındaki poliunsature yağ asitlerinin, reaktif oksijen türleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehytler, hidroksi yağ asitleri, etan, pentan gibi sekonder ürünlere yıkılma reaksiyonudur. Lipid peroksidasyonu dejeneratif bir süreçtir ve zincirleme reaksiyonlar şeklinde ilerleyerek membranlarda geri dönüşümsüz hasarlara neden olur (74, 88).

3.9 Antioksidan Savunma Mekanizmaları: Okside olabilen bir maddenin oksidasyonunu geciktiren ya da önleyebilen maddeler antioksidan olarak tanımlanmaktadır (89). Belirli bir düzeye kadar olan oksidan molekül artışı yine vücutta daima belirli bir seviyede bulunan doğal endojen antioksidan moleküller tarafından etkisiz hale getirilmektedir. Böylece organizmada oksidan düzeyi ve antioksidanların gücü bir denge içindedir. Oksidanlar belirli bir düzeyin üzerinde oluşur veya antioksidanlar yetersiz kalırsa, oksidan moleküller organizmanın yapı taşları olan protein, lipid, karbohidrat, nükleik asid ve yararlı enzimleri hasara uğratırlar (73, 90).

Antioksidanlar etkilerini 2 şekilde gösterirler (74, 91).

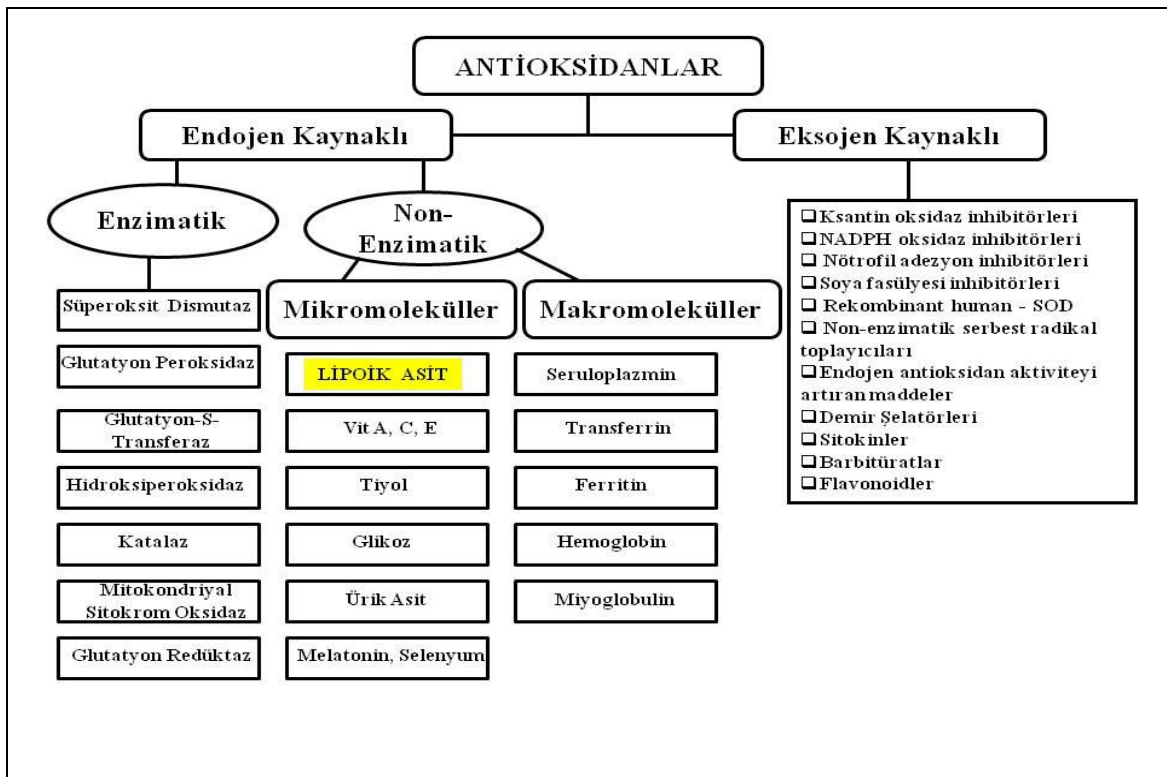
I. Serbest radikal oluşumunun önlenmesi:

- ✧ Başlatıcı reaktif türevlerinin uzaklaştırılması
- ✧ Oksijenin uzaklaştırılması veya konsantrasyonunun azaltılması
- ✧ Katalitik metal iyonlarının uzaklaştırılma

II. Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi

III. Antioksidanlar, oksidanlara karşı, çeşitli mekanizmalarla etki gösterirler. Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemi şeklinde “süpürücü” bir etki, serbest radikallere bir hidrojen vererek aktivitelerini azaltıp veya inaktif hale getiren “bastırıcı”, “giderici” etki, serbest radikalleri kendilerine bağlayarak zincirleme devam eden reaksiyonları kırarak “zincir kırıcı” bir etki ya da “onarıcı” bir etki şeklinde gerçekleştirebilmektedirler. Küçük moleküller antioksidan enzimler toplayıcı özellik gösterirken; flavanoidler, antosiyanoidler, vitaminler, trimetazidin bastırıcı fonksiyona sahiptirler. Hemoglobin, mineraller ve seruloplazmin ise zincir kırıcı etki gösterirler (74).

Endojen ve eksojen kaynaklı olmak üzere antioksidanlar 2 gruba ayrılır (Şekil 8).



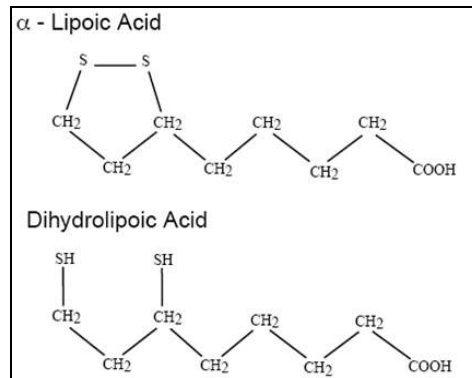
Şekil 8: Antioksidanların sınıflandırılması

3.10 Lipoik asitin (LA) kimyasal yapısı ve genel özellikleri

Alfa-Lipoik asit kimyasal okunuşu (1-2-ditiyolan-3-pentatonik asit) ya da (1,2-ditiyolan-3-valerik asit) olan ve *tiyotik asit* olarak da adlandırılan, disülfid yapısında sekiz karbonlu bir endojen kofaktördür (92). İlk olarak 1937’de *Lactobacillus* türlerinin , patates ekstraktında bulunmuş, bakterilerin gelişimlerinde oynayan bir madde olarak rol aldığı gözlenmiş ve “potato growth factor” olarak adlandırılmıştır (93). 1951 yılında Redd ve ark.ları tarafından sığır karaciğeri artıklarından elde edilen krebs siklusunda kofaktör olarak görev gören bir molekül olarak tanımlanmıştır (94). Yarı ömrü 30 dakikadır (95).1980’lerde güçlü bir antioksidan olarak tanımlanmıştır (92).

LA, çok toksik olan hidroksil ve nitrik oksit radikallerini, peroksi nitrit anyonunu, hidrojen peroksiti yakaladığı ve single oksijeni söndürdüğü bilinmektedir. Hem in vitro hem de in vivo deneylerde lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir. İnsan ve hayvan hücreleri tarafından sentezlenebilmektedir (96). Piruvatın oksidatif dekarboksilasyon reaksiyonunu katalizler ve karaciğerde sentezlenir (97). Glikoz, yağ asitleri ve diğer enerji kaynaklarının ATP’ye dönüşümünden sorumlu mitokondiyal enzimlerin kofaktörü olarak işlev görür.

LA, hem yağda hem de suda çözünen oksijen radikallerine karşı güçlü bir antioksidandır. LA hem okside formunda hem de indirgenmiş formunda (Dihidrolipoik asit-DHLA) antioksidan aktivite göstermektedir. DHLA, dihidroaskorbik asidi yeniden askorbik aside çevirebilir, direk olarak C vitamininin, indirek olarak E vitamininin yeniden oluşumunu sağlayabilir. Bu özelliğinden dolayı diğer antioksidanları da rejenere edebildiği için antioksidanların antioksidanı olarak da adlandırılmaktadır (92) (Şekil 9).



Şekil 9: Lipoik asitin kimyasal yapısı (92).

LD50 (letal doz) değeri sıçanlarda dördüncü uygulamadan sonra ve köpeklerde oral alınan dozdan sonra 400-500 mg/kg olarak bulunmuştur (98). Karsinojenik veya teratojenik etkilerine dair kanıt gözlenmemiştir. Tiamin eksikliği bulunan sıçanlarda yüksek dozda i.p. olarak kullanılması fetal komolikasyonlara nedne olduğundan tiamin eksikliği durumlarında bu madde ile birlikte kullanılmalıdır (98).İnsanlarda terapötik olarak önerilen günlük dozaj 600-1800 mg'dır 92).

Farmokinetik özelliklerine bakıldığında, R- α -Lipoik asit, LA'in biyolojik olarak aktif ve doğal olarak bulunan formudur. S- formu ise LA'in sentetik üretimi ile elde edilir ve tek başına etkili değildir. LA'in ticari formu, R- ve S- enansiyomerlerinin 1:1 oranındaki rasemik karışımıdır (92).

3.11 Lipoik asit (LA), Diabetes Mellitus ve Hipertansiyon İlişkisi

Diabetes Mellitus, hiperglisemi ile seyreden mikrovasküler ve makrovasküler problemlerin en önemli nedenlerinden olan kronik bir hastalıklar grubudur. Diyabet sonucunda artan oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin formasyonuna neden olmaktadır. Lipoik asit diyabet tedavisinde antioksidan etkisinin yanı sıra, glikoz kontrolü ve nöropati gibi hiperglisemi ilişkili kronik hastalıkların önlenmesinde rol almaktadır.

LA'nın diyetle alınmasının karbonhidrat metabolizması, kan basıncının düşürülmesi ve normalize edilmesi ile ilgili biyokimyasal ve histopatolojik değişikliklerde koruyucu etkileri gösterilmiştir (99).

α -Lipoik asitin rat dokularında glikoz alımını arttırdığı ilk olarak 1970'li yıllarda Singh ve Bowman tarafından gösterilmiştir (100). Daha sonra insulin direnli hayvan modellerinde, izole iskelet kasında glikoz transport üzerine rasemik α -Lipoik asit etkileri araştırılmış ve glikoz alımını önemli bir şekilde artırdığını ve bunun da glikoz sentezindeki anlamlı artışla ilişkili olduğu gözlenmiştir (101).

Potensiyel bir antioksidan olarak ratlarda pankreatik ada hücrelerinin reaktif oksijen radikalleri tarafından yıkılmasını önledikleri gözlenmiştir (102).

Protein depolarını koruyup, sirkülasyondan gelen glikozunda korunmasını sağlayarak, protein kaynaklarından glikoz üretimini inhibe ettiği yani glikoneogenezde rol aldığı bilinmektedir (103).

Diyabetik hastalarda lipid peroksidasyon ürünlerinin artışı ve askorbik asit, redükte glutatyon gibi protektif antioksidanların düzeyinin azaldığı gözlenmiştir (104).

Aşırı glikoz ile beslenme hipertansiyon ve insulin rezistansına neden olur. α -lipoik asitin antihipertansif etki ve insulin direncinin önlemesinin antioksidan etki üzerinden olduğu düşünülmektedir. Aşırı glikoz diyeti ile beslenen hayvan modellerinde O_2^- Üretiminin normalleşmesi ve glutatyon peroksidaz aktivitesindeki düşmenin engellenmesi yoluyla oksidatif stress ve kan basıncındaki artışı önlediği düşünülmüştür (105).

Ayrıca α -lipoik asitin kan lipid düşürücü özelliği ve düşük densiteli lipoprotein (LDL) oksidasyonuna karşı koruma özelliği nedeniyle kardiyovasküler hastalıkların risk faktörlerine karşı olası koruyucu etkileri olduğu düşünülmektedir (106).

4 **GEREC VE YÖNTEM**

4.1 **Araştırmanın Tipi:** Deneysel Araştırma

4.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı: Bu çalışma, Diabetes Mellitus ve 5/6 nefrektomi modellerinin ayrı ayrı ve birlikte oluşturulduğu ratlarda LA'nın koruyucu etkisinin olup olmadığını gözlemek için deneysel olarak planlanmıştır.

Bu çalışmada Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Biriminden temin edilen, Wistar suşu toplam 56 erkek sıçan (250-300gr) kullanıldı. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, Wistar suşunun bulunması ve literatür ile uyumlu olması nedeniyle bu tür seçildi. Tüm hayvanlar deney sonlanıncaya kadar Deney Hayvanları Laboratuvarlarında 12/12 saat karanlık/aydınlık periyodunda, 20-22 °C oda sıcaklığında barındırıldı. Hayvanlar dinlendirilmiş musluk suyu ve standart pellet yem ile beslendi.

4.3 Araştırmanın Örneklemi/Çalışma Grupları: Deneklerden rasgele 8 çalışma grubu oluşturuldu.

I. grup; Kontrol grubu: Ab libitum beslenen hiçbir madde uygulanmamış bazal değerler için kullanılan deney grubu (n=7)

II. grup; Diabetes Mellitus (DM) deney grubu: İntraperitoneal (ip) yöntem ile 45 mg/kg Streptozotosin ile Diabetes Mellitus oluşturuldu ve 8 hafta süre ile beklendi (n=7).

III. grup; 5/6 Nefrektomi (5/6 Nf) deney grubu: Sağ renal arterleri ligasyon yapılarak arter-venler bağlandı ve sağ böbrek çıkarıldı, 1/2 renal arter ligasyonu sağlandı. Sol renal arter-venlerin üçünden 2 tanesi ligasyon yapıldı ve toplam 5/6 renal arter ligasyonu sağlandı, 8 hafta süre ile beklendi (n=7).

IV grup; Lipoik asit (LA) deney grubu: 45 mg/kg/gün LA 8 hafta süre ile oral gavaj yöntemiyle verildi (n=7).

V. grup; 5/6 Nefrektomi+Diabetes Mellitus (5/6 Nf+DM) deney grubu: 5/6 nefrektomi modeli oluşturulduktan 3 hafta sonra 45 mg/kg Streptozotosin ile Diabetes Mellitus oluşturuldu ve 8 hafta daha beklendi (n=7).

VI. grup; Diabetes Mellitus + Lipoik asitin tedavi edici etkisi (DM+LAT) deney grubu: İntraperitoneal (ip) yöntem ile 45 mg/kg Streptozotosin ile Diabetes Mellitus oluşturuldu ve 8 hafta süre ile 45 mg/kg/gün LA oral gavaj yöntemiyle verildi (n=7).

VII. grup; 5/6 Nefrektomi + Lipoik asitin tedavi edici etkisi (5/6 Nf+LAT) deney grubu: 5/6 nefrektomi oluşturuldu ve 8 hafta süre ile 45 mg/kg/gün LA oral gavaj yöntemiyle verildi (n=7).

VIII. grup; 5/6 Nefrektomi + Diabetes Mellitus + Lipoik asitin tedavi edici etkisi (5/6Nf+DM+LAT) deney grubu: 5/6 nefrektomi modeli oluşturulduktan 3 hafta sonra 45 mg/kg Streptozotosin ile Diabetes Mellitus oluşturuldu ve 8 hafta süre ile 45 mg/kg/gün LA oral gavaj yöntemiyle verildi (n=7).

Deneysel modeller uygun steril şartlar altında ve cerrahi setler ile gerçekleştirildi. Sakrafikasyondan sonra hayvanlar ve ortaya çıkan atıklar, tıbbi atık torbalarına alınarak deney hayvanları multidisiplin laboratuvarı tarafından hastanenin imha bölümüne gönderilerek kurallara uygun koşullarda yok edildi.

4.4 Deneysel ve Laboratuvar İncelemeleri Sırasında Kullanılan Materyaller

Cihazlar

- ✧ Trasmisyon elektron mikroskobu (Carl Zeiss Libra 1200)
- ✧ Işık mikroskop (Olympus DP70)
- ✧ Mikrotom (RM 2255, Leica)
- ✧ Digital kamera (Olympus DP71)
- ✧ Glukometre (Accu-Chec Active, Roche)
- ✧ Dijital pH metre (Thermo, Orion 3 Star)
- ✧ Santrifüj (Sigma1-14)
- ✧ Hassas Terazî (Sartorius, GC803S-0CE)
- ✧ Otomatik Pipet (Eperndorf)
- ✧ Mikrodalga fırın (Galanx)
- ✧ Etüv (Dedeoğlu)
- ✧ Vorteks (Velp Scientifica)
- ✧ MP30, BPT 300 Transducer (MP30 Biopac System Inc, Santa Barbara, California, USA)
- ✧ Bilgisayarlı naliz sistemi (İmage Tool Analiz Programı (UTHSCSA))

- ✧ Otoanalizör (Roche/ Hitachi Modular Analytics (Model : D-P Modul))
- ✧ Spektrofotometre (Arcitect 16000)

Kimyasallar

- ✧ Sodyum sitrat (Codex, MA:294.1, Sodio Citrat 2 Hidrat)
- ✧ Streptozocin (STZ) (S0130-1G, Sigma)
- ✧ dl- α -Lipoic acid (Sigma, St Louis, MO, USA)
- ✧ Kanül (PE 14 polyetilen tüp)
- ✧ Hematoksilen (Surgipath, 01562E, Bretton, Cambridgeshire)
- ✧ Eozin (Surgipath, 01602, Canada)
- ✧ Entellan (Merck 1.07961.0100, Darmstadt, Almanya)
- ✧ Masson Trikrom boyama seti (2049 GBL, İstanbul, Türkiye)
- ✧ Anti-anjiyotensin II tip 1 reseptör (ab9391-1, Abcam)
- ✧ Anti-Endotelin-1 (T-4050, Peninsula Laboratories)
- ✧ Vegf (sc-7269, Santa cruz)
- ✧ Kaspaz-3 (RB1197, Neomarkers)
- ✧ Trypsin (Kat No:00-3008 Digest All 2A, Zymed, San Francisco, California, CA)
- ✧ Sekonder Kit (Invitrogen, Histostain- Plus Broad Spectrum Cat No:85-9043)
- ✧ Diaminobenzidin (DAB) (Katolog no: 1718096, Roche)
- ✧ Propilen oksit (Merk®)
- ✧ Araldite CY212 Resin (TAAB®) ve DDSA (dodecenyl suuccinic anhidride TAAB®)
- ✧ Rodajlı lam (Isotherm 76X26 mm)
- ✧ PBS (Fluka, 79383)
- ✧ Lamel (Citoglas 24X60 mm)
- ✧ Proteinaz K (Sigma-Aldrich P6556)

4.5 Araştırmanın Değişkenleri

Araştırmanın Bağımlı Değişkeni: Böbrek

Araştırmanın Bağımsız Değişkeni: Diabetes Mellitus, Hipertansiyon

4.6 Verilerin Eldesi

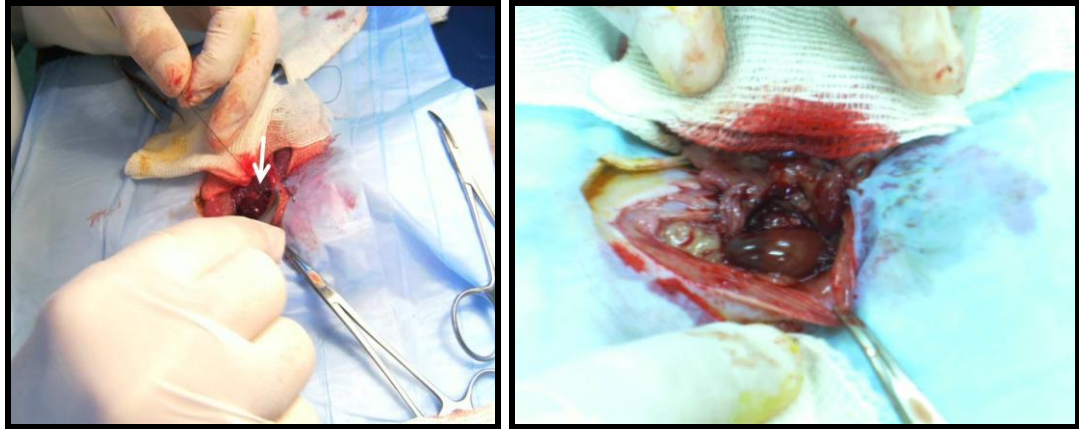
4.6.1 Deneyisel Modeller

4.6.1.1 Streptozotosin (Stz) ile Diabetes Mellitus oluşturulması

STZ enjeksiyonundan önce deneklerin başlangıç ağırlıkları (gr) ve bazal kan glikoz değerleri (mg/dl) glukometre ile ölçüldü. Biyokimyasal ölçümler için kuyruk veninden kan örnekleri alındı. Daha sonra deneklere intraperitoneal olarak sodyum sitrat (pH:4.5) içinde çözünmüş olan 45 mg/kg Streptozocin (STZ) uygulandı (107). Uygulamayı takip eden 3. günde, deneklerin kuyruk veninden alınan kan örnekleri glukometre kullanılarak kan glikoz değerleri ölçüldü ve 250 mg/dl ve üzerinde bulunanlar diyabetik kabul edildi (107).

4.6.1.2 5/6 Nf modelinin oluşturulması

Hipertansiyon oluşturulacak olan denekler 35 mk/kg ketamin + 5mg/kg xylasine anestezisi altında sırt üstü yatırılıp traş edildi ve ardından dezenfekte edildi. Daha sonra 3-4 cm linea alba çizgisi üzerindeki deri ve kas geçildikten sonra ratların sağ renal arterleri ligasyon yapılarak arter-venler bağlandı ve sağ böbrek çıkarılacak ve 1/2 renal arter ligasyonu sağlandı. Sol renal arter-venlerin de 2 tanesi ligasyon yapılarak 5/6 renal arter ligasyonu sağlandı (108). Hipertansiyon modelleri oluşturulduktan sonra deneklerin kas ve deri tabakaları 4.0 ipek ile dikildi ve hayvanlar derlenmeye bırakıldı (şekil 10).



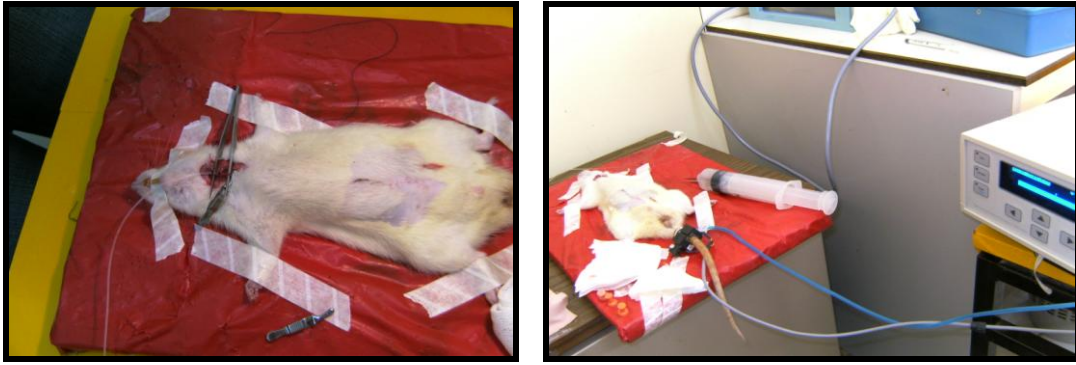
şekil 10: 5/6 Nf modelinin oluşturulması. (↓) renal arterin ligate edilmesini göstermekte.

4.6.1.3 LA uygulanması

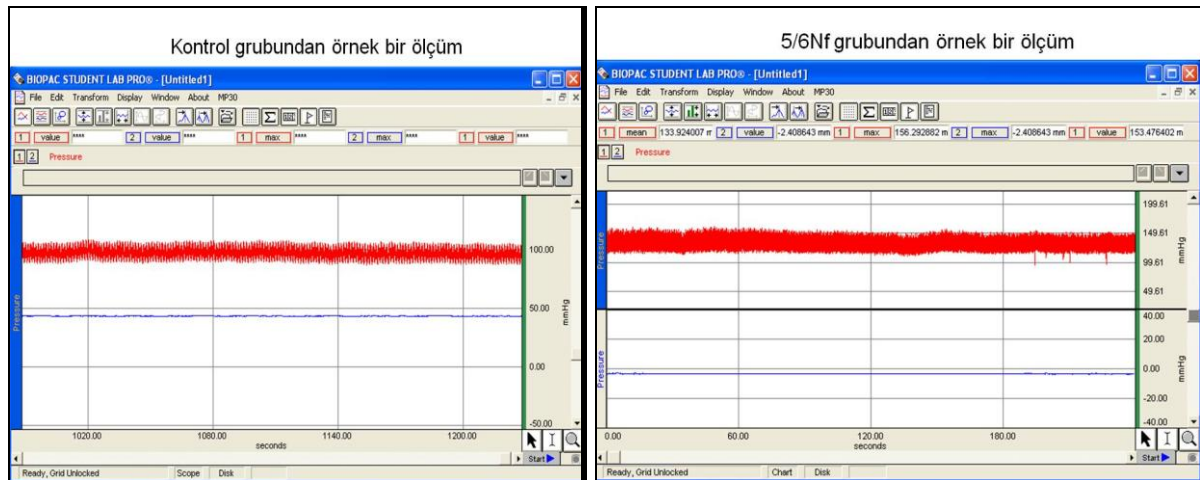
ALA 30mg/kg/gün olacak şekilde oral gavaj yöntemi ile deneklere uygulandı. LA steril saline ile karıştırıldıktan sonra karışım çözünene kadar 1M NaOH eklendi. Ardından pH'sı 1M HCl eklenerek 7.4'e ayarlandı (109). Hergün aynı saatte oral gavaj yöntemi ile 8 hafta süresince deneklere verildi.

4.6.1.4 Karotis arterden kan basıncı ölçümü

Deneklere anestezi uygulanıp uyumaları sağlandıktan sonra karotis arterden ölçümün yapılacağı alana sabitlendiler. Trakea açılıp ile hava girişinin devamlılığını sağlamak amacıyla kanule (PE 14 polyetilen tüp) edildi. Ardından sistemik arteriyel basıncın ölçülebilmesi için sağ carotid arter kanule edildi (PE 50 polyetilen tüp). Arteriyel katater heparinize salin ile dolduruldu (250 U/ml) ve MP30, BPT 300 Transducer ile basınç ölçümü sağlandı (109). Her denek için 5 dakikalık ölçüm yapıldı ve programdan ortalamaları alındı (Şekil 11, 12).



Şekil 11: Karotis arterden kan basıncı ölçümü. Denek anestezi sonrası sabitlendi ve karotis arter açılarak kanule edildi ve MP30 Biopac System yardımı ile arteriyel kan basıncı ölçümleri alındı.



Şekil 12: MP30 Biopac Sistemi ile kan basıncı ölçümü örnekleri

4.6.2 Doku örneklerinin hazırlanması

Deney süresi biten sıçanların ağırlıkları sakrifikasyondan önce hassas terazi ile tartıldı. Sonra sıçanlar eter anestezisi altında perfüze edildi. Perfüzyonun ardından deney sonu biyokimyasal değerleri ölçebilmek amacıyla kan alındı ve santirifüjlenerek serumları ayrıldı ve incelemeler için böbrek dokuları çıkarıldı. Böbrek dokuları simetrik bir şekilde her iki kısımda korteks ve medullayı içerecek şekilde vertical olarak ayrıldı ve böbreğin simetrik olan bir yarısı ışık mikroskopik inceleme için %10'luk tamponlu formaldehite, diğer yarımın korteksinden alınan parça ise elektron mikroskopik inceleme için %2,5'luk gluteraldehide alınıp fiksasyonları sağlandı. %10'luk tamponlu formaldehitte 2 gün bekletilen testis dokuları rutin histolojik takip işlemlerinden geçirildi.

4.6.3 Işık mikroskopik inceleme

4.6.3.1 Rutin ışık mikroskopik doku takibi protokolü

%10'luk tamponlu formaldehit ile tespit edilen doku örnekleri, fiksatifin uzaklaştırılmaları amacıyla 1 gece akarsu altında yıkandı. Rutin doku takibindeki tüm işlemler 60°C etüvde gerçekleştirildi. Dehidratasyon amacıyla 20'şer dakika %70'den %96'ya artan etil alkol serilerinden geçirildi. Ardından 20'şer dakika 4 değişim aseton solusyonlarından geçirildikten sonra 2 değişim 30'ar dakika de tutuldu. 60°C'lik etüv içerisinde 2 değişim parafin uygulanıp 1'er saat parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular parafin bloklar içerisine gömüldü. Parafin bloklardan inceleme yapmak amacıyla mikrotom aracılığı ile 4 ve 5µm'lik kesitler alındı (Tablo 4).

Tablo 4: Işık mikroskopik doku takip metodu

İşlem	Madde	Süre
Tespit	%10 formalin,	24 saat-48 saat
Fiksatifin uzaklaştırılması	Akar su	1 gece
Dehidratasyon	% 70, 80,90 etil alkol	20'şer dk
	Aseton (4 değişim)	20 dk
Şeffaflaştırma		30x2 dk
Emdirme %60 C etüv	Parafin	1 saat
Gömme	Parafin	

4.6.3.2 Hematoksilen-Eozin boyama metodu

Mikrotom aracılığı ile alınan 5µ'luk parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 20'ar dakika üç değişim e tabi tutuldu. Ardından dehidratasyon işlemi için %95'den %70'e azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 10 dakika akarsu altında yıkandı. 10 dakika hematoksilen ile boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika eozin boyası ile boyandı. Ardından sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim de tutulduktan sonra entellan ile kapatıldı (Tablo 5).

Tablo 5: Hematoksilen-Eozin boyama metodu

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	(3 değişim)	20 dk
Dehidratasyon	% 95 alkol	Yıkama
	% 80 alkol	Yıkama
	% 70 alkol	Yıkama
Yıkama	Akar su	10 dk
Boyama	Hematoksilen	10 dk
Yıkama	Akar su	10 dk
Boyama	Eosin	2 dk
Yıkama	Akar su	5 dk
	% 80 alkol	1 yıkama
	% 95 alkol	1 yıkama
Şeffaflaştırma	(3 değişim)	20 dk
Kapama	Entellan	

4.6.3.3 Periodik asit-schiff boyaması (PAS)

Alınan parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 1 saat (etüvde) diğer ikisi 30'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için 2 değişim absolü alkol ve %96'dan %70'e azalan alkol serilerinden geçirildi, kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 3-5 dakika peryodik asit ile boyandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 1-2 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 20-25 dakika schiff boyası ile boyandı. Boyamadan sonra 5 dk akarsuda tutuldu. Daha sonra dehidratasyon işlemi için sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri Absolü alkol serilerinden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan ile kapatıldı (Tablo 6).

Tablo 6: PAS boyama metodu

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	1 Gece
Deparafinizasyon	1 (Etüvde)	1 Saat
Deparafinizasyon	2-3 (Oda Isısında)	30 Dakika
Rehidratasyon	%100-100-96-80-70'lik Alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	10 Dakika
Boyama	Periodik Asit	3-5 Dakika
Yıkama	Akarsu	1 Dakika
Boyama	Schiff	20-25 Dakika
Yıkama	Akarsu	1-2 Dakika
Boyama	Hematoksilen	2 Dakika
Yıkama	Akarsu	5 Dakika
Dehidratasyon	% 60–70–80–96-100'lük Alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1–2–3	20'şer Dakika
Kapama	Entellan	

4.6.3.4 Masson's trikrom boyaması (MT)

Alınan parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 1 saat (etüvde) diğer ikisi 30'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için 2 değişim absolü alkol ve %96'dan %70'e azalan alkol serilerinden geçirdi. Ve akarsuda 5 dakika bekletildikten sonra Masson Trikrom boyama seti içerisinde dokular üzerine 8 damla Weigert hematoksin boyası ile 8 damla ferrik klorür çözeltisi damlatıldı ve 20 dakika bekletildi. 1 dk distile su ile yıkandıktan sonra 8 damla asit-alkol çözeltisi ile 1 dakika bekletilen kesitler distile suyla iyice yıkandı. Ardından 8 damla Ponceau asit fuksin azofloksin çözeltisi dokunun üzerini tamamen kaplayacak şekilde uygulandı. 5 dakika sonra uzaklaştırıldı ve 1 ml stok asit çözeltisi ve 29 ml distile su ile hazırlanan asitli su ile kısaca yıkandı. 8 damla fosfomolibdik asit turuncu G boyası ile 20 dakika muamele edildikten sonra asitli su ile yıkandı ve 8 damla açık yeşil boya ile 5 dakika boyandı. Boyamanın ardından akarsu altında yıkanan kesitler artan alkol serilerinden geçirildi. Ksilen ile şeffaflaştırma yapıldıktan sonra entellan ile kapatıldı (Tablo 7).

Tablo 7: Masson's Trikrom boyama metodu

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	1 Gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (Etüvde)	30 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (Oda Isısında)	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3 (Oda Isısında)	20 Dakika
Rehidratasyon	%100'luk alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%100'luk alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%96'lık alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%80'lik alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	No:1 + No:2 Solusyonu	10 Dakika
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	No: 3	4 Dakika

Boyama	No: 4	5 Dakika
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	No: 5	10 Dakika
Boyama	No: 6	5 Dakika
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	No: 7	5 Dakika
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Dehidratasyon	% 70–80–96–100–100'lük Alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 Dakika
Kapama	Entellan	

4.6.4 İndirekt immunohistokimyasal yöntem (İHK)

Anti-anjiyotensin II tip I reseptör (AT1), Anti-endotelin-1, VEGF ve Kaspaz-3, immunreaktivitelerinin gösterilmesi amacıyla tavşan spesifik anti-anjiyotensin II tip 1 reseptör, anti-Endotelin-1, Vegf, ve Kaspaz-3 antikorları kullanıldı. İmmunohistokimyasal inceleme için 60°C lik etüvde 1 gece ve de 3 değişim 20'şer dakika deparafinize edilen doku kesitleri, azalan alkol serilerinde rehidrate edildikten sonra 10 dakika distile su ile yıkandı. Dokuya zarar vermeden kurulanıp dakopen (Dako, Glostrup, Denmark) ile çevreleri sınırlandı. Kaspaz-3 boyanmasında sitrat buffer (pH:6) içinde ısıtıldıktan sonra soğmaya bırakıldı. Diğer antikorlar için tripsin solüsyonu içinde 37°C etüvde 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük Hidrojen peroksit uygulandı. 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler 1 saat oda ısısında bloklama solusyonu ile enkübe edildi ve ardından yıkama yapılmadan kaspaz-3 ve VEFG antikoruna ile bir saat +4°C'de enkübe edildi. Ardından fosfatlı tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler biyotinlenmiş sekonder antikor (ile 30 dk enkübe edildi. PBS solusyonu ile yıkama yapıldıktan sonra enzimle işaretli (peroksidaz) avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) 30 dakika uygulandı. Reaksiyonun görünür hale getirilmesi için Diaminobenzidin (DAB)

kullanıldı. Zemin boyaması Harris hematoksilin ile yapıldı. Dereceli alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı (Tablo 8).

Tablo 8: İmmunohistokimyasal Boyama Metodu

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen (3 değişim)	20 dakika
Dehidratasyon	% 95, 80, 70 alkol	2 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Tripsin	37°C 15 dk
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	%3'lük hidrojen peroksit	5 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Bloklama	Blok solusyonu	1 saat
Antikor ile inkübasyon	Caspase-3, VEFG	2 saat, 4de
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Biotinlenmiş sekonder a.	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Streptavidin sekonder a.	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Boyama	DAB	5 dk
Yıkama	Distile su	10 dakika
Zıt boyama, yıkama, dehidratasyon, kapama	Mayer's hematoksilin	5 dakika

4.6.5 Ultrastrüktürel inceleme

4.6.5.1 Elektron mikroskopik doku takip metodu (EM)

Diseksiyon ile böbrek dokusundan 1 mm³ parçalar alınarak %2,5 fosfat tamponlu gluteraldehid içerisinde fikse edildi. Örnekler Sorenson fosfat buffer ile 3–4 kez değiştirilerek 15–20 dakika yıkandı. Örnekler 1 kısım PBS+1 kısım osmium tetroksit (OsO₄) solüsyonu karışımında 1 saat bekletildi (ependorf tüplerin içine 500 µl OsO₄ + 500 µl tampon konuldu). Tüpler alüminyum folyo ile kapatılıp oda sıcaklığında 1 saat karanlık ortamda bekletildi. PBS ile 15–20 dakika yıkandı (Üç küçük beher içine PBS kondu. OsO₄' ten çıkan parçalar sırası ile üç kez çalkalandı. Çıkan parçalar kurutma kağıdında süzdürülüp en son içinde tampon olan eppendorf tüpe kondu. Dehidratasyon işlemi için % 70 alkolde 10 dakika, %100 (Absolu) alkolde 2 değişim 10'ar dakika tutuldu. Propilen oksit ile iki değişim 15 dakika tutulan dokular infiltrasyon işlemi kurumayacak şekilde 1:1 oranında hazırlanan propilen oksit + araldit karışımına alındı. Oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Arada hafif hareketlerle karıştırıldı. Araldite CY212 Resin ve DDSA (dodecenyl suuccinic anhidride) (1:1) oranında karıştırıldı her şişeye 2 mL konuldu. Dokular yeni araldit karışımında yaklaşık 6-12 saat bekletildi. Araldite CY212 Resin ve DDSA 1:1 oranında hazırlanan bu yeni karışıma (gömülecek materyal sayısına göre hesaplanarak) BDMA (Benzyl Dimethylamine) ilave edilerek gömme materyali hazırlandı. Bu karışım içine gömülen dokular 60°C 'lik etüvde 48 saat polimerize edildi. Daha sonra yarı ince kesitleri alınarak toluidin mavisiyle boyanıp alan belirlendi. Belirlenen alanlardan ince kesitler formuvar kaplı gridler üzerine alındı. Uranil asetat ve kurşun sitratla kontrastlaması yapıldı ve transmisyon elektron mikroskopunda değerlendirildi (Tablo 9)

Tablo 9: Elektronmikroskopik doku takip metodu

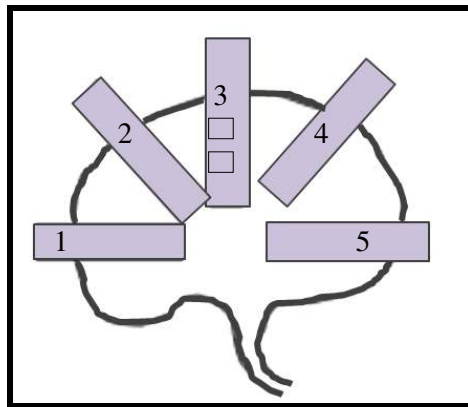
İşlem	Madde	Süre
Fiksasyon	%2,5'lik Gluteraldehit	1-48 Saat (+4 ⁰ C)
Yıkama	Sorenson Fosfat Buffer (PBS)	15-20 Dak.
Post Fiksasyon	PBS+Osmium Tetraoksit 1/1	1 Saat Karanlıkta
Yıkama	PBS	15-20 Dakika

Dehidratasyon	%70, 100x2 Alkol	10 Dakika
Dehidratasyon	Propylene Oxid x2	15 Dakika
İnfiltrasyon	Propylene Oxid+Araldit 1/1	1 Saat
	Saf Araldit	6-12 Saat
	Yeni Araldit	2 Saat
Gömme	Saf Araldit + DMP	
Polimerisasyon		48 Saat 60 ⁰ c

4.6.6 Renal hasarın belirlenmesinde kullanılan morfolojik değerlendirme kriterleri

Deneyler sonunda elde edilen böbrek dokularından korteks ve medullayı içerecek şekilde 5 µm'lik kesitler alındı ve genel doku histolojisini değerlendirmek amacıyla Hematoksilen-Eozin boyaması, intersitisiyel hasar ve glomerüler hasarı değerlendirmek amacıyla 4 µm'lik kesitler alınıp Periodic Acid Schiff (PAS) ve Masson's Trikrom (MT) boyamaları yapıldı.

İntersitisiyel hasar ve glomerüler hasarı değerlendirmenin standart olması amacıyla böbrek dokusu kesitlerinde farklı bölgelerden 5 standart alan seçildi ve şekilde görüldüğü gibi değerlendirildi (Şekil 13).



Şekil 13: Böbreğin histomorfometrik incelenmesi.

Böbrek dokusunda belirlenen standart alanlardan ışık mikroskopunda elde edilen digital kamera ile elde edilen görüntüler Dp Controller Olympus (3.1.1.267) programında sabitlendi.

Görüntü elde etmek için her standart alandan glomerülleri içeren 3 kortikal görüntü sabitlendi. Böylece her denek için 15 görüntü elde edildi. Elde edilen görüntülerde incelenecek parametreler şu şekilde belirlendi:

- ❖ **Glomerüllerde bowman dış yaprak kalınlığı (BDYK):** x100 lük büyütmede her deneğe ait 15 adet glomerül yapısı değerlendirildi, (PAS boyaması)(Şekil 14, a).
- ❖ **Glomerül başına düşen nukleus sayısı:** x20 lik büyütmede her deneğe ait 15 adet glomerül yapısı değerlendirildi, (HE boyaması) (Şekil 14, b).
- ❖ **Glomerül çapı:** x20 lik büyütmede her hayvana ait 15 adet glomerül yapısı değerlendirildi, (HE boyaması) (Şekil 14, c).
- ❖ **Renal skar alanları ölçümü:** Her olgu için böbrek kesiti üzerinde belirlenen 5 sabit alanın toplamı, total test alanı olarak, mikronmetre kare olacak şekilde hesaplandı. Total alanlar içerisinde skarlanmış renal alanlar ölçüldü, (MT boyaması) (108, 111, 112, 113) (Şekil 14, d).

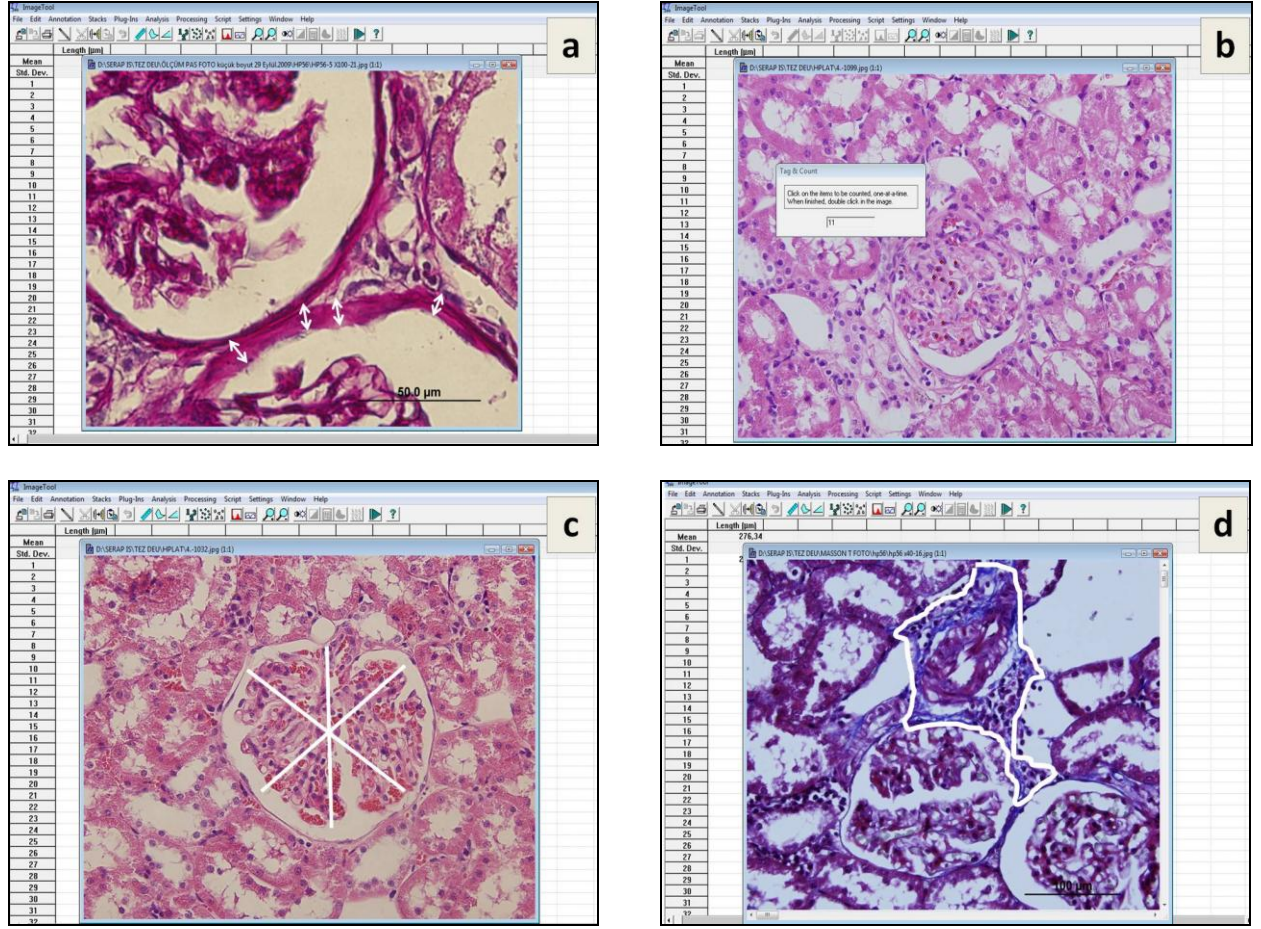
Bu alanlar içerisinde;

- Global skleroz gösteren glomerüller
- Normalden daha koyu boyanan ve daha solid görünümlü interstisyel fibrozis alanları
- Kalınlaşmış bazal membranı bulunan normalden daha küçük tübüller ya da kist olarak değerlendirilen büyüklükteki tübüller dahil, ince epiteli bulunan ve normalden daha büyük olan tübüller şeklinde tanımlanan atrofik tübüller ile
- Bütünüyle oblitere vasküler yapılar yer aldı.

İmaj analizi sisteminde, interaktif alan ölçüm yöntemiyle her bir hayvan için, onbeş görüntü alanında, tanımlanan morfolojik bulguları içeren interstisyel skarlanma alanları ölçülüp, bu değerlerin toplamı her bir hayvan için toplam interstisyel skarlanma alanı (Tskar) olarak belirtildi. Standart total test alanının toplam değerlendirilen görüntü sayısı olan 15 ile çarpılmasından standart bir değer (ST) elde edildi ve her bir hayvan için; yukarıda belirtilen morfolojik görünümleri içeren toplam interstisyel skarlanma alanının (Tskar), hesaplanan standart değere (ST) bölünmesiyle bir oran belirlendi (114).

Oran= $\frac{\text{Toplam interstisyel skarlanma alanı (Tskar)}}{\text{ST (Standart total test alanı x 15)}}$

ST (Standart total test alanı x 15)



Şekil 14: Renal hasarın image tool analiz programı ile ölçümleri. a: Bowman dış yaprak kalınlığı, b: Glomerül başına düşen nukleus sayısı, c: Glomerül çapı, d: Renal skar alanı

❖ **Glomerüler sklerozun değerlendirilmesi:** Glomerüler skleroz HE ve PAS boyamalarında değerlendirildi. Glomerüler skleroz kapıllar duvarındaki düzensizlik ve kollaps ile ilişkili mezengiyal matriks artışı , mezengiyumda PAS-pozitif hiyalin material birikimi şeklinde değerlendirildi. Her rat için renal kesitlerde 100'er glomerül değerlendirildi. Skorlama normal (0), orta derecede sklerotik (1) (%50'den az glomerüler tuft içeren lezyonlar), şiddetli sklerotik (2) (%50'den çok glomerüler tuft içeren), global (3) (%100 glomerüler tuft içeren) şeklinde derecelendirildi (108). Tüm ölçümler Bilgisayarlı analiz sistemi İmage Tool Analiz Programı ile değerlendirildi.

4.6.7 Biyokimyasal analizler

Deney gruplarında, deney öncesi ve sonrasında, ratlardan düz kan alındı, serum ayrıldı ve serumda BUN ve kreatinin parametreleri değerlendirildi.

Biyokimyasal BUN, Kreatinin Ölçümü: 1cc. kandan elde edilen serum örnekleri spektrofotometrik olarak ölçüldü. Spektrofotometrik olarak ölçümü yapılan parametreler üre (Protein metabolizmasının yıkım ürünü olan toksik etkili amonyağın detoksifikasyonu amacı ile oluşan üre suda çözünebilir ve böbrek yolu ile idrarla atılır), üre azotu (BUN) ve Kreatinin (iskelet kaslarındaki kreatinin'in su kaybetmesi ile oluşur) dir. Serum kreatinin düzeyi vücut kas kitlesinden ve kas yıkımından etkilenmekle birlikte, diyetle alınan protein içeriğinden çok az etkilenir. Bu nedenle, böbrek fonksiyonlarını değerlendirmede, serum üre ya da BUN düzeyine göre daha duyarlı olduğu için seçildi.

4.7 Araştırma planı ve takvimi

Kaynak tarama- araştırma planlama: Kasım 2005- Ocak 2007

Deneyisel Ön Çalışma: Şubat 2007-Aralık 2007

Deneyisel Çalışma: Ocak 2008-Ocak 2009

Laboratuvar ve Veri Analizleri: Şubat 2009-Şubat 2010

Yazım: Ocak 2010- Ocak 2011

4.8 Verilerin istatistiksel analizi

Çalışma sürecinde elde edilen verilerin istatistiksel analizleri SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 15.0 bilgisayar paket programında yapıldı. Değerlendirmede ortalama, ve standart sapmalar belirlendi. Gruplar arası farklılık Kruskal Wallis ve One-Way ANOVA testi ile, gruplar arasındaki farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı ise Mann-Whitney U testi ile analiz edildi. Deney öncesi ve sonrası değerlerin karşılaştırılmasında Wilcoxon sıralı işaretler testi, korelasyon analizleri için Spearman korelasyon testleri kullanıldı. Tüm sonuçlarda $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.9 Araştırmanın Güçlü Yanları ve Sınırlılıkları

Güçlü Yanları

- ❖ Çalışmamızda hipertansiyon ve diyabetin birlikte çalışıldığı STZ+Cerrahi uygulanması modeli bulunmamaktadır ve çalışmamız bu açıdan literatüre yenilik getirmektedir.
- ❖ Diyabet ve hipertansiyonun birlikte seyrettiği durumlarda böbrek hasarının progresyonu ile ilgili deneysel olarak histomorfolojik, ultrastrüktürel ve immünohistokimyasal açıdan incelendiği bir çalışma olarak literatüre katkı sağlayacak bir çalışmadır.

Kısıtlılıkları

- ❖ Deneysel modelin zorluğu nedeniyle deneklerin yaşatılması konusunda zorluklar yaşandı.
- ❖ Deney süreci, malzeme alımı, literatür taranması ve tezin yazılması konusunda başka kısıtlılıklar ile karşılaşılmamıştır.

4.10 Etik Kurul Onayı: Tüm bu çalışmalar Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurulu'nun 91/2005 protokol no'lu 16.09.2005 gün ve 77 sayılı etik kurulu onayı doğrultusunda gerçekleştirildi (EK 1)

5 **BULGULAR**

5.1 **Deneyel Verilerin Değerlendirilmesi**

5.1.1 *Vücut ağırlıklarının değerlendirilmesi*

Deneyin başlangıç ve bitiş tarihlerinde tartılan deneklerin ağırlıkları arasındaki farklar Wilcoxon sıralı işaretler testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. $p < 0,05$ den küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Başlangıç ağırlıklarına bakıldığında grupların ağırlık düzeyleri ortalamaları; Kontrol grubunda 239.0 ± 28.5 gr, DM grubunda 263.8 ± 17.0 gr, 5/6 Nf grubunda 276.6 ± 34.4 gr, LA grubunda 252.3 ± 36.6 gr, 5/6Nf+DM grubunda 256.0 ± 26.9 gr, DMLAT grubunda 277.8 ± 19.7 gr, 5/6 NfLAT grubunda 283.2 ± 7.9 gr, 5/6NfDMLAT grubunda 295.7 ± 11.6 gr olarak saptandı.

Deney sonu ağırlıklarına baktığımızda; Kontrol grubunda 255.8 ± 21.9 gr, DM grubunda 221.0 ± 35.1 gr, 5/6 Nf grubunda 298.5 ± 64.5 gr, LA grubunda 275.3 ± 25.3 gr ve 5/6Nf+DM grubunda 204.5 ± 44.5 gr, DMLAT grubunda 258.4 ± 14.6 gr, 5/6Nf+LAT grubunda 235.0 ± 10.7 gr, 5/6NfDM+LAT grubunda 214.8 ± 11.3 gr olarak saptandı (Şekil 15).

Kontrol grubunun başlangıç ve deney sonu ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış gözlemlendi ($p=0,018$).

DM grubunun başlangıç ve deney sonu ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalma gözlemlendi ($p=0,005$).

5/6Nf grubunun başlangıç ve deney sonu ağırlıklarını karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalma olduğu gözlemlendi ($p=0,028$).

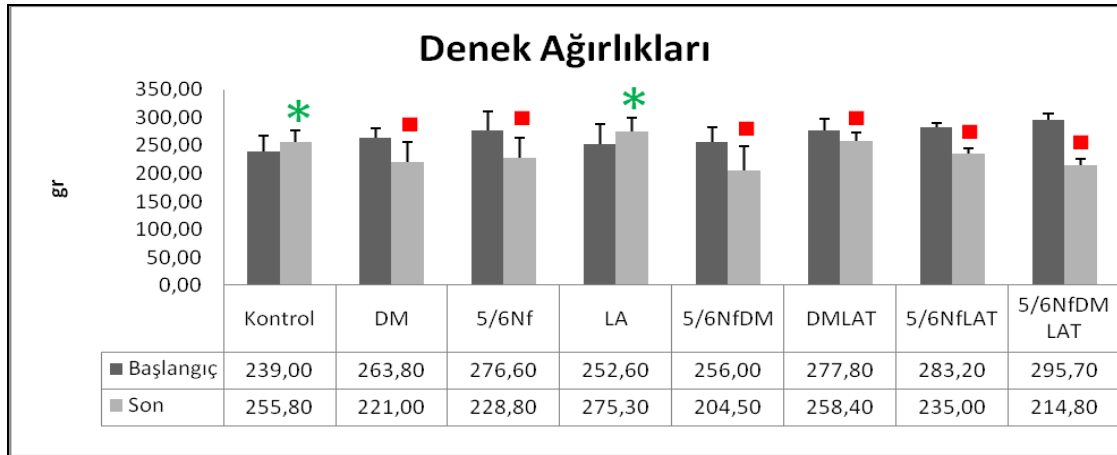
LA grubunun başlangıç ve deney sonu ağırlıklarını karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ($p=0,046$).

5/6Nf+DM grubunun başlangıç ve deney sonu ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalma gözlemlendi ($p=0,028$).

DM+LAT grubunun başlangıç ve deney sonu ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalma gözlemlendi (p=0,018).

5/6Nf+LAT grubunun başlangıç ve deney sonu ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalma gözlemlendi (p=0.018).

5/6Nf+DM +LAT grubunun başlangıç ve deney sonu ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalma gözlemlendi (p=0.018).



Şekil 15: Deneklerin deney başlangıcı ve deney sonu ağırlıkları. *: Anlamlı artış, ■: Anlamlı azalma. Wilcoxon Sıralı İşaretler Testi, $p \leq 0.005$.

5.1.2 Kan glikozunun değerlendirilmesi

Deneyin başlangıç ve bitiş tarihlerinde ölçülen kan glikoz değerleri arasındaki farklar Wilcoxon sıralı işaretler testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. $p < 0,05$ den küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Başlangıç kan glikoz değerlerine bakıldığında grupların kan glikoz düzeyleri ortalamaları; Kontrol grubunda 151.8 ± 4.1 ml/dl, DM grubunda 150.0 ± 9.2 mg/dl, 5/6 Nf grubunda 150.0 ± 4.2 mg/dl, LA grubunda 147.4 ± 4.1 mg/dl ve 5/6Nf+DM grubunda 159.6 ± 11.4 mg/dl, DMLAT grubunda 146.2 ± 19.8 mg/dl, 5/6 NfLAT grubunda 151.0 ± 1.9 mg/dl 5/6NfDMLAT grubunda 147.5 ± 2.4 mg/dl olarak saptandı.

Deney sonu kan glikoz değerlerine baktığımızda; Kontrol grubunda 156.0 ± 9.5 ml/dl, DM grubunda 419.5 ± 42.0 mg/dl, 5/6 Nf grubunda 157.0 ± 9.6 mg/dl, LA grubunda 170.8 ± 5.7 mg/dl, 5/6Nf+DM grubunda 399.8 ± 136.7 mg/dl, DM+LAT grubunda 384.0 ± 65.4

mg/dl, 5/6 Nf+LA grubunda **150.0±4.9** mg/dl, 5/6Nf+DM+LAT grubunda **337.0±21.9** mg/dl olarak saptandı (Şekil 16).

Kontrol grubunun başlangıç ve deney sonu kan glikoz değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p=0,176$).

DM grubunun başlangıç ve deney sonu kan glikoz değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış gözlemlendi ($p=0,005$).

5/6Nf grubunun başlangıç ve deney sonu kan glikoz değerleri karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi ($p=0,170$).

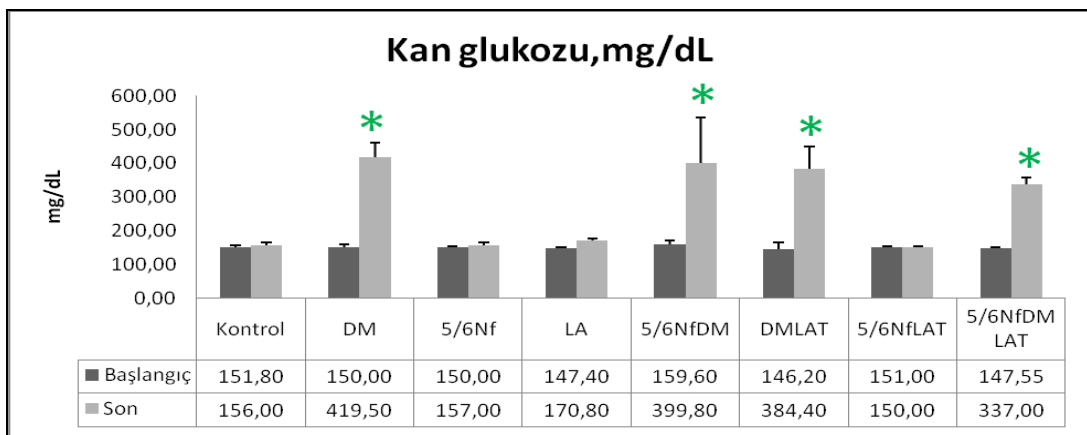
LA grubunun başlangıç ve deney sonu kan glikoz değerleri karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi ($p=0,270$).

5/6Nf+DM grubunun başlangıç ve deney sonu kan glikoz değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış gözlemlendi ($p=0,028$).

DM+LAT grubunun başlangıç ve deney sonu kan glikoz değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış gözlemlendi ($p=0,018$).

5/6NfLAT grubunun başlangıç ve deney sonu kan glikoz değerleri arasında istatistiksel olarak fark gözlenmedi ($p=0,553$).

5/6Nf+DM+LAT grubunun başlangıç ve deney sonu kan glikoz değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış gözlemlendi anlamlı ($p=0,018$).



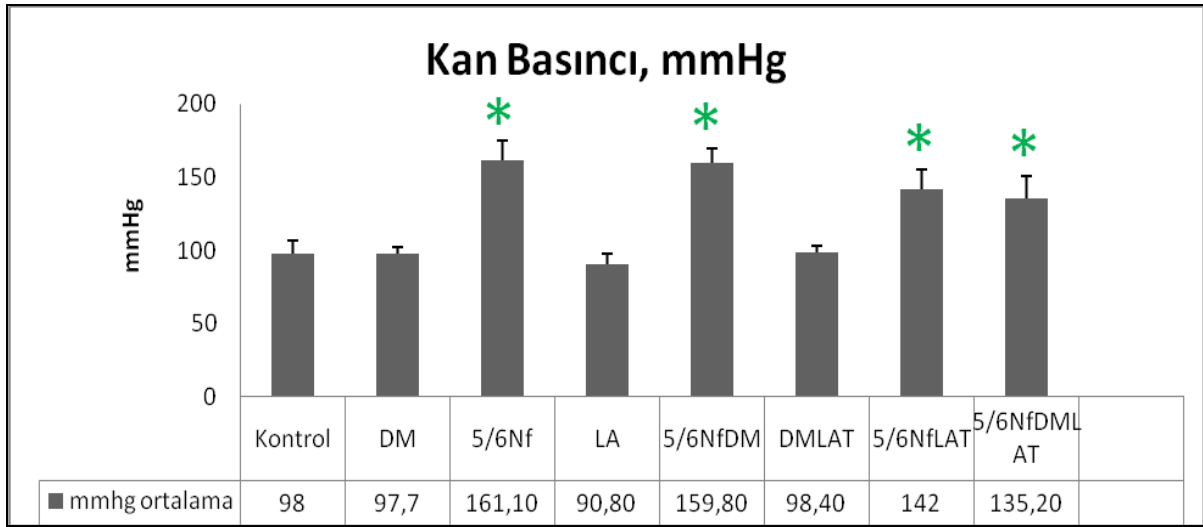
Şekil 16: Deneklerin deney başlangıcı ve deney sonu kan glikoz değerleri. *: Anlamlı artış, ■: Anlamlı azalma. Wilcoxon Sıralı İşaretler Testi, $p \leq 0,005$.

5.1.3 Kan basıncının değerlendirilmesi

Deney sonunda karotis arterden invaziv olarak ölçülen kan basıncı değerleri arasındaki farklar Oneway ANOVA testi ve Bonferroni post-hoc testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. $p < 0,05$ den küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (Şekil 15).

Deney sonu kan basıncı değerlerine baktığımızda; Kontrol grubunda 98 ± 8.6 mmHg, DM grubunda 97.7 ± 4.2 mmHg , 5/6 Nf grubunda $161,1 \pm 13,6$ mmHg, LA grubunda 90.8 ± 6.8 mmHg, 5/6Nf+DM grubunda 159.8 ± 10.1 mmHg, DM+LA grubunda 98.4 ± 4.5 mmHg, 5/6 Nf+LA grubunda 142.1 ± 13.1 mmHg, 5/6Nf+DM+LA grubunda 135.2 ± 15.5 mmHg olarak saptandı

5/6Nf, 5/6Nf+DM, 5/6Nf+LAT ve 5/6Nf+DM+LAT gruplarının kan basıncı değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0.00$). 5/6Nf ve 5/6 Nf+DM grupları karşılaştırıldığında anlamlı fark gözlenmedi ($p=1.00$), 5/6Nf ve 5/6Nf+LAT grupları karşılaştırıldığında 5/6Nf+LAT grubunda anlamlı düşüş olduğu ($p=0.03$) ve 5/6Nf+DM ve 5/6Nf+DM+LAT grupları karşılaştırıldığında grubunda anlamlı düşüş olduğu ($p=0.001$) gözlemlendi (Şekil 17).



Şekil 17: Deney sonu karotis arterden KB ölçümleri. *: Anlamlı artış.

5.2 Işık Mikroskopik Bulgular

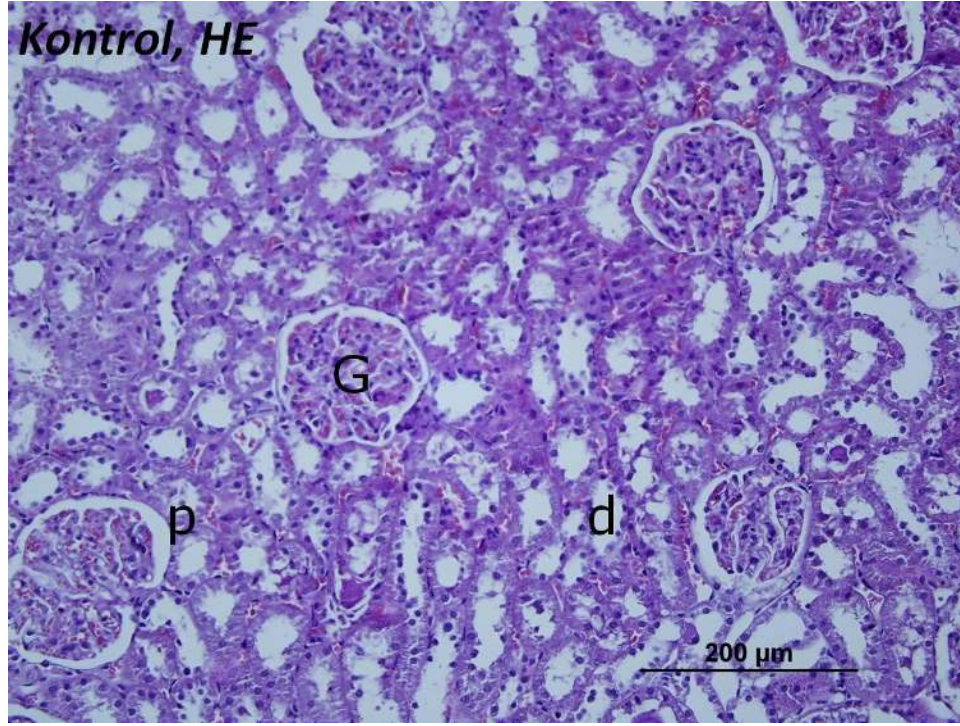
Tüm deney gruplarında Hematoksilen-Eozin, Periyodik Asit Schiff ve Masson Trikrom boyamaları yapılarak histolojik olarak böbrek dokusu değerlendirildi.

Kontrol grubuna ait böbrek kesitleri incelendiğinde;

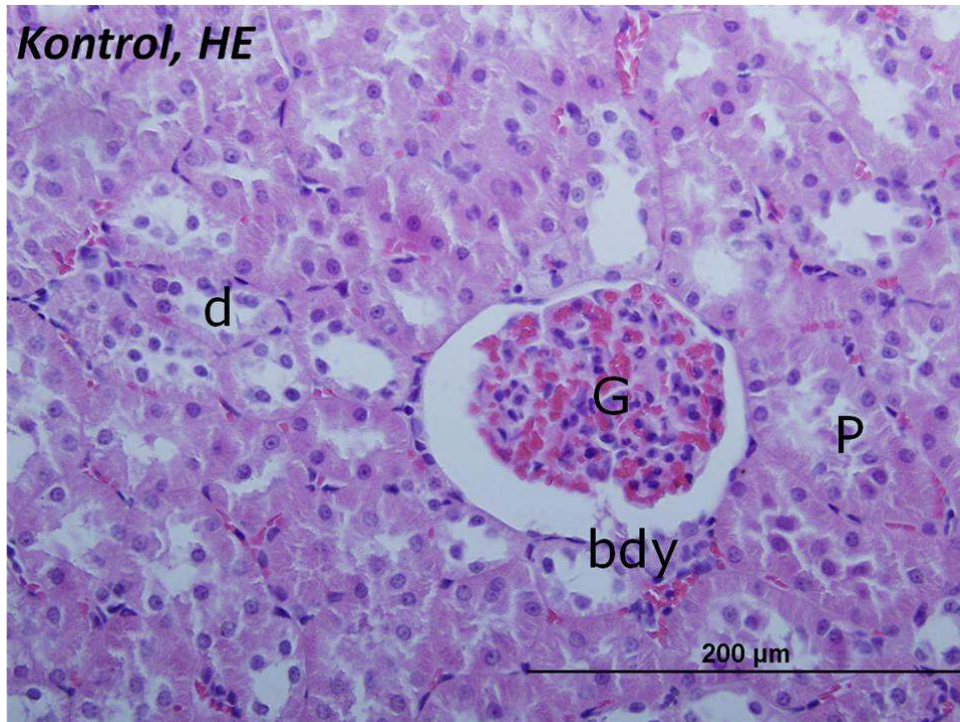
HE boyanmasında, böbreğin dıştan fibröz bir kapsül ile sarılı olduğu, içte ise korteks ve medulla ayrımının yapıldığı gözlemlendi. Kortekste gözlenen renal korpusküller normal görünümdeydi. Bowman kapsüllerinin dış yaprağı olan visceral tabaka ve iç yaprağı olan pariyetal tabaka ile bu yaprak arasındaki idrar boşluğu normal histolojik yapı gösterdi. Proksimal tübüllerin tek katlı kübik-silindirik epitelle döşeli oldukları ve içerdikleri mitokondiler nedeniyle asidofilik sitoplazmaya sahip oldukları ve lümenlerinin dar olduğu gözlemlendi. Distal tübüllerde hücreler kübik, açık sitoplamalı olarak gözlemlendi ve lümenleri proksimal tübüllere göre daha büyüktü. Distal tübüllerin kortekste izledikleri yol boyunca kendi nefronlarına ait olan renal korpuskülün duvarında oluşturdukları makula densalar normal olarak gözlemlendi. Henle kulpunda ise yassı epitel hücreleri ve belirgin lümen gözlemlendi. Kolektör tübüllerde alçak kübik boylu epitel ve geniş lümen gözlemlendi (Şekil 18, 19).

PAS boyanmasında, proksimal tübül hücrelerinin apekslerinde mikrovilluslardan oluşan fırçamsı kenarlar belirgin olarak gözlemlendi (Şekil 20).

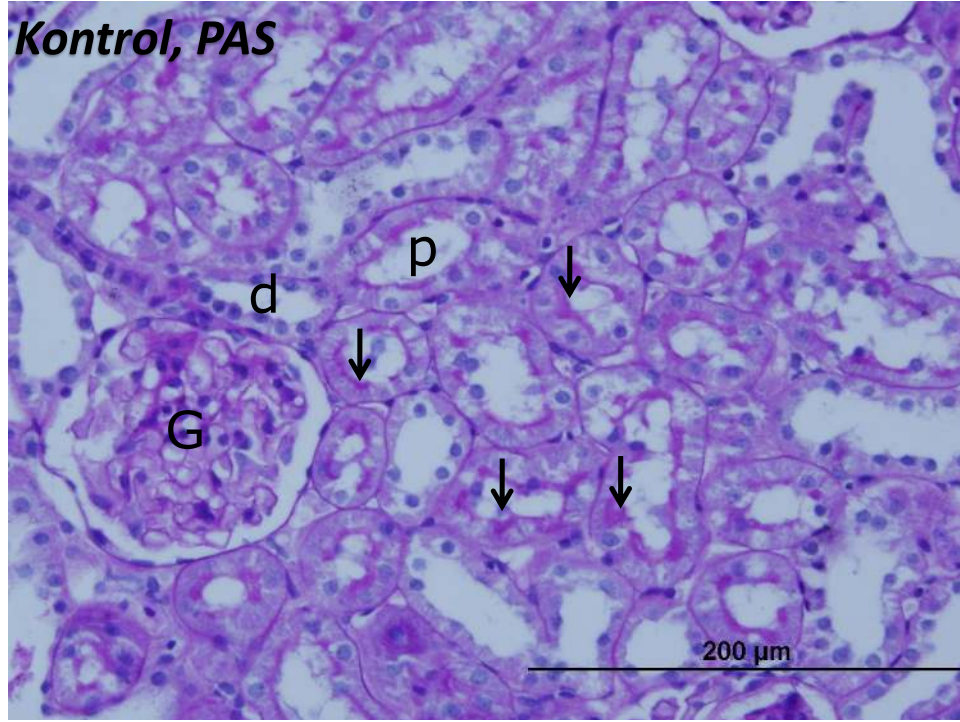
MT boyanmasında, herhangi bağ doku ve ya kollagen artışı gözlenmeyip böbrek dokuları normal görünümdeydi (Şekil 21).



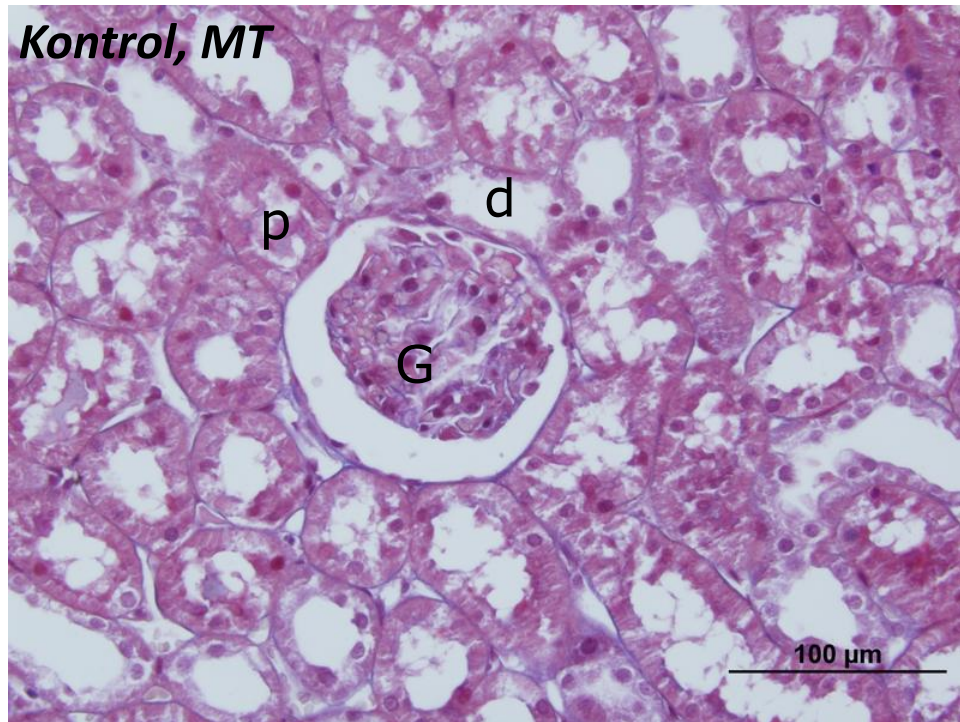
Şekil 18: Kontrol grubu HE boyanması. **G:** Glomerül, **p:**Proksimal tübül, **d:**Pistal tübül. Scale bar 200µm.



Şekil 19: Kontrol grubu HE boyanması. **G:** Glomerül, **p:**Proksimal tübül, **d:**Distal tübül, **bdy:** Bowman dış yaprağı. Scale bar 200µm.



Şekil 20: Kontrol grubu PAS boyanması. **G:** Glomerül, **p:**Proksimal tübül, **d:**Distal tübül, (↓): fırçamsı kenar. Scale bar 200μm.



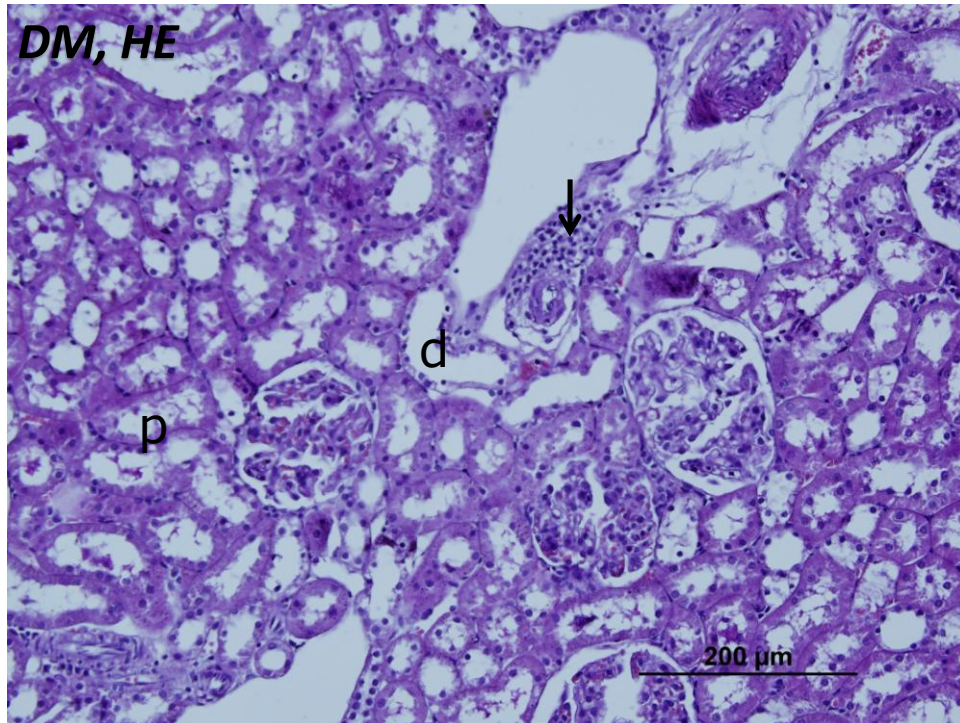
Şekil 21: Kontrol grubu MT boyanması. **G:** Glomerül, **p:**Proksimal tübül, **d:**Distal tübül. Bağ doku artışı gözlenmemekte. Scale bar 100μm.

DM grubunda;

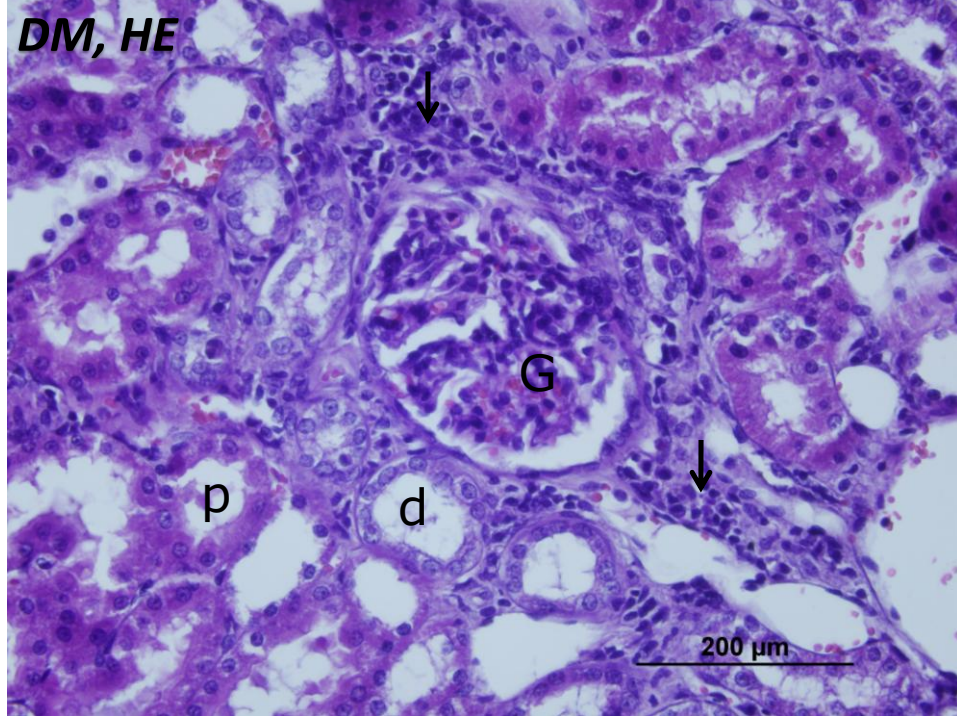
HE boyanmasında; Kortekste glomerüller ve tübüler yapıların kontrol grubuna göre hasarlı oldukları gözlemlendi. Glomerüllerin etrafında ve kapillerlerin etrafında mononükleer hücre infiltrasyonu, damarlarda dilatasyon, tübüllerde dilatasyon ve hiyalin materyal birikimi ile tübüler yapıların dejenerasyonu ve tübüllerde kast formasyonu gözlemlendi. Proksimal tübül epitelinde debris gözlemlendi. Bazı glomerüllerde diffuz glomerüloskleroz gözlemlendi (Şekil 22, 23).

PAS boyanmasında; proksimal tübül hücrelerinde fırça kenar kayıpları, inklüzyonlar ve nekroz gözlemlendi. Glomerül bowman dış yapraklarında kalınlaşma, glomerüler mezengiyumda matriks artışı gözlemlendi. Ayrıca proteinöz birikimler olduğu gözlemlendi (Şekil 24).

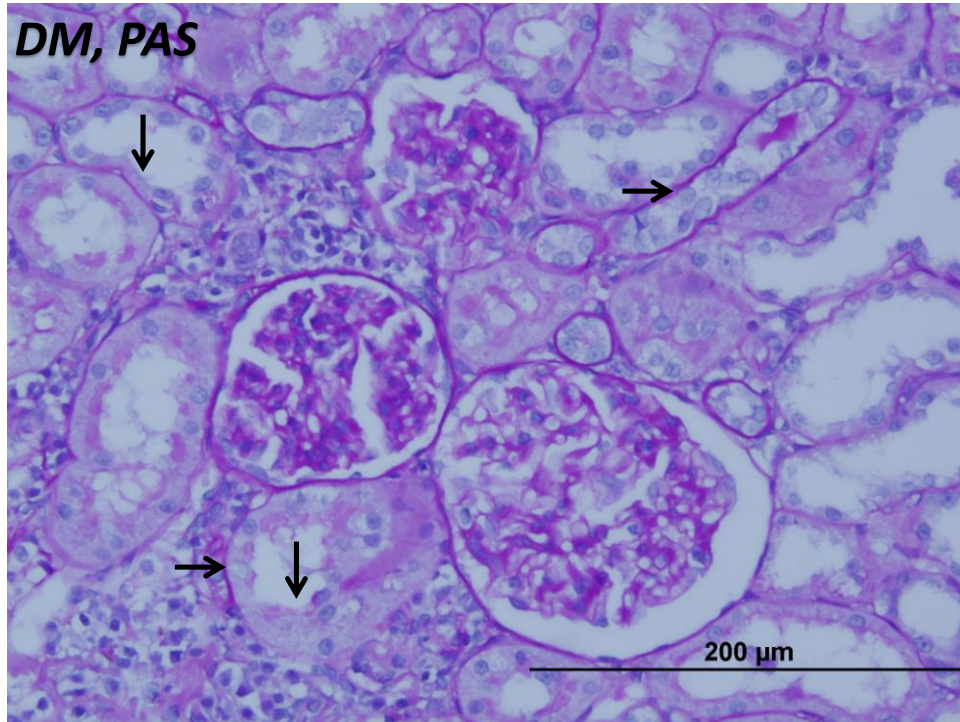
MT boyanmasında interstisiyel fibrozisin oldukça artmış olduğu gözlemlendi (Şekil 25).



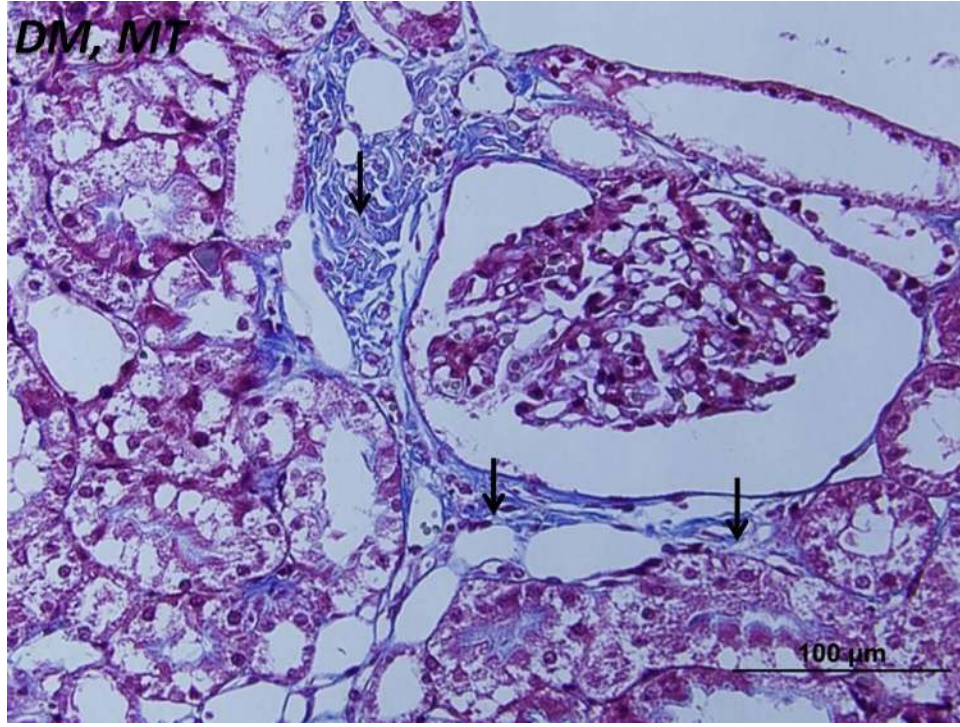
Şekil 22: DM grubu HE boyanması. (↓):Mnl infiltrasyonu **p**:Proksimal tübül, **d**:Distal tübül. Scale bar 200 µm.



Şekil 23: DM grubu HE boyanması. **G:**Glomerül sklerotik yapı göstermekte, **p:**Proksimal tübül, **d:**Distal tübül, (↓):Mnl infiltrasyonu. Scale bar 200 μ m.



Şekil 24: DM grubu PAS boyanması. (↓) Fırça kenar kaybı, (→) tübül bazal membranında kalınlaşma. Scale bar 200 μ m.



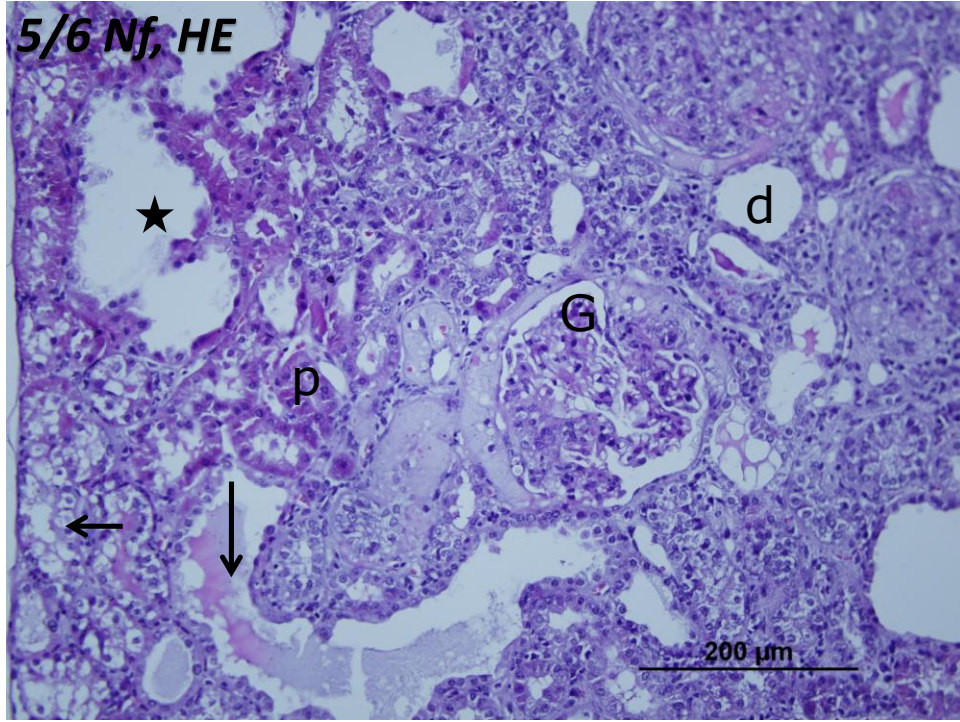
Şekil 25: DM grubu MT boyanması (↓): İntersitisiyel fibrozis. Glomerül içinde de matriks artışı gözlenmektedir. Scale bar 100µm.

5/6Nf grubunda;

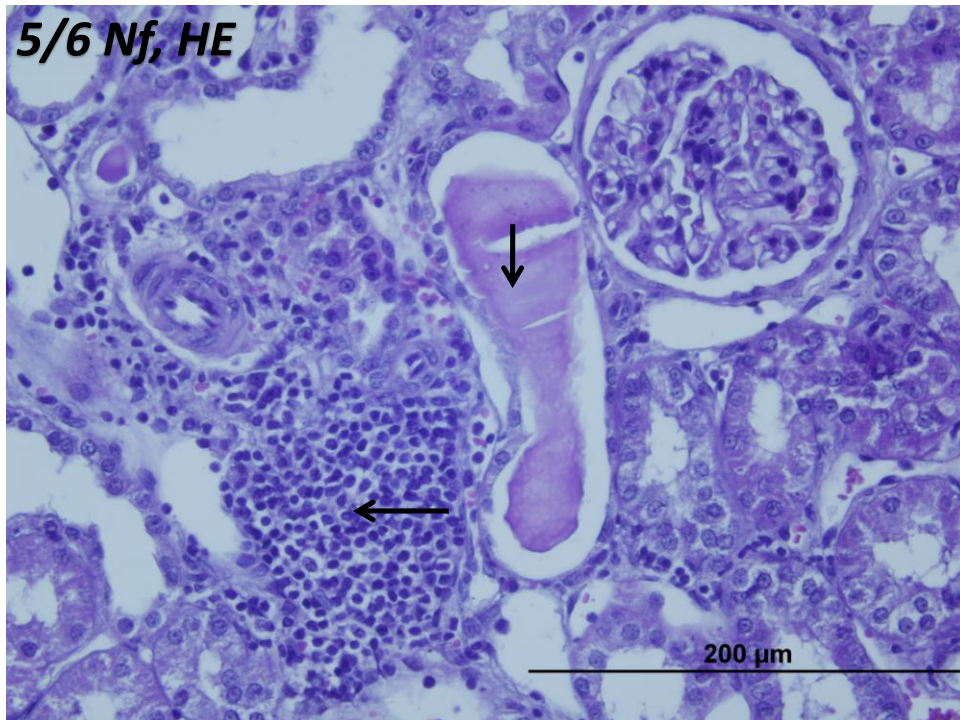
HE Boyanmasında; kortekste glomerüller ve tübüler yapıların hasarlı oldukları gözlemlendi. Glomerüllerde diffüz glomerüloskleroz, glomerüllerin etrafında ve kapillerlerin etrafında mononükleer hücre infiltrasyonu, damarlarda dilatasyon, tübüllerde dilatasyon ve hiyalin materyal birikimi ile tübüler yapıların dejenerasyon ile tübüllerde kast formasyonu gözlemlendi. Proksimal tübül epitelinde debris gözlemlendi (Şekil 26, 27).

PAS boyamasında ise proksimal tübül hücrelerinde fırça kenar kayıpları, inklüzyonlar ve nekroz gözlemlendi. Glomerül bowman dış yapraklarında kalınlaşma, glomerüller mezengiyumda matriks artışı gözlemlendi. Glomerüllerde diffüz ve nodüler glomerüloskleroz gözlemlendi. Ayrıca tübüllerde proteinöz birikimler olduğu gözlemlendi (Şekil 28).

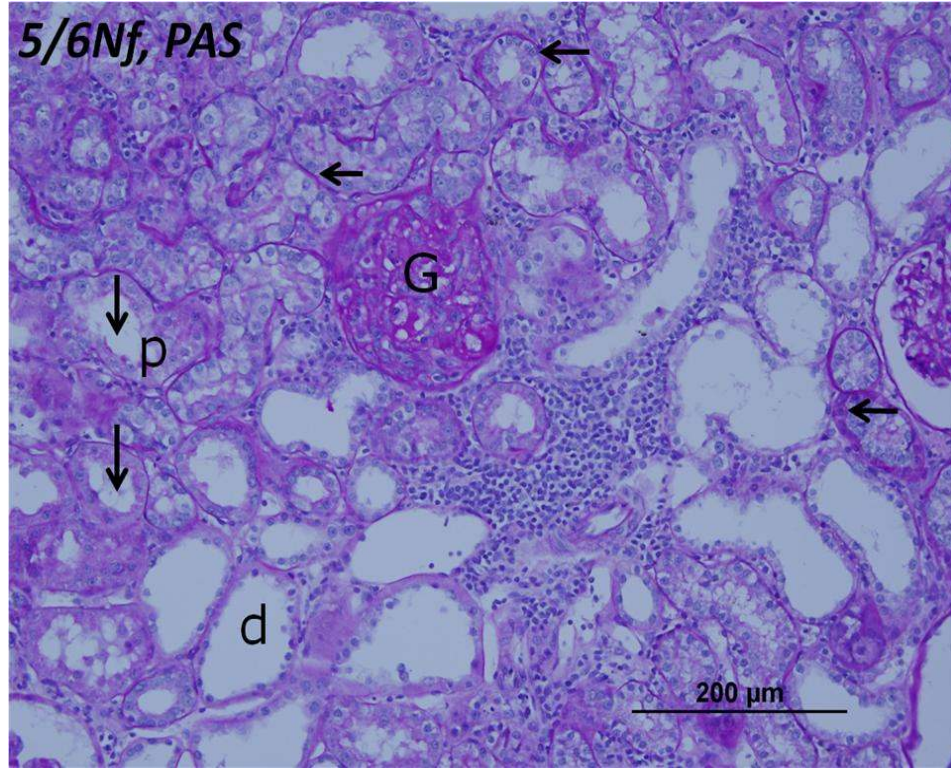
MT boyamada dokuda oldukça artmış interstisiyel fibrozis gözlemlendi (Şekil 29).



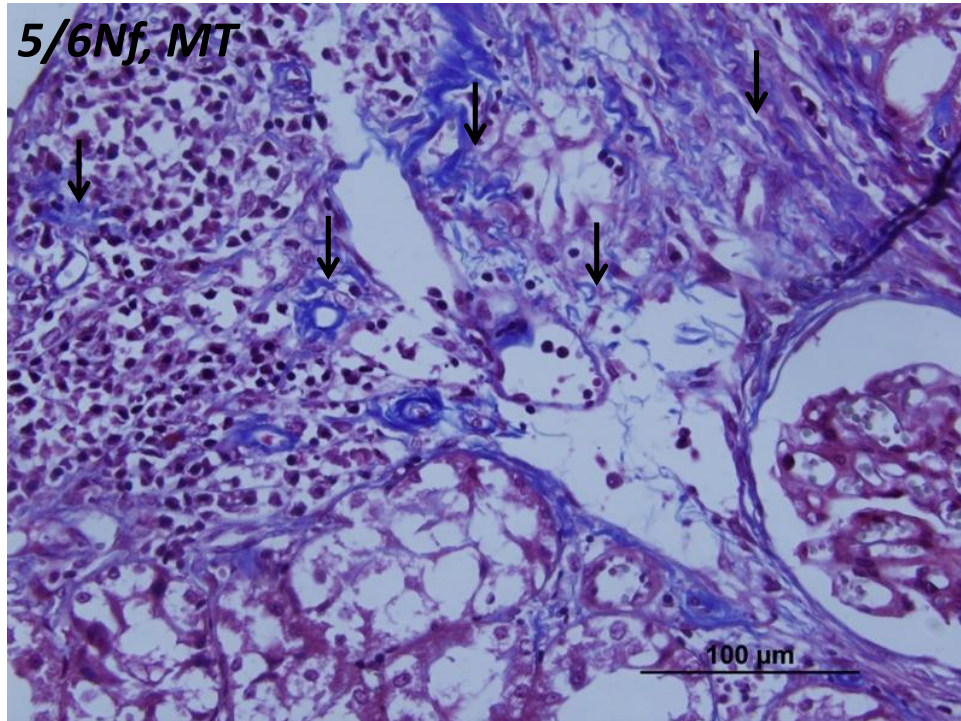
Şekil 26: 5/6 Nf grubu HE boyanması. **G:**Glomerül, **p:**Proksimal tübül, **d:**Distal tübül, (**↓**): Tübüllerde proteinöz madde birikimi, (**↙**) tübüllerde vakukolizasyon, **★**: Tübüllerde dilatasyon Scale bar 200μm



Şekil 27: 5/6 Nf grubu HE boyanması. (**↙**)Tübüllerde proteinöz madde birikimi, (**↓**)Tübüllerde vakuolizasyon. Scale bar 200μm.



Şekil 28: 5/6 Nf grubu PAS boyanması. **G:** Glomerül, (**↓**): Tübüllerde fırça kenar kaybı (**↓**): Tübül bazal membranında kalınlaşma. Scale bar 200µm



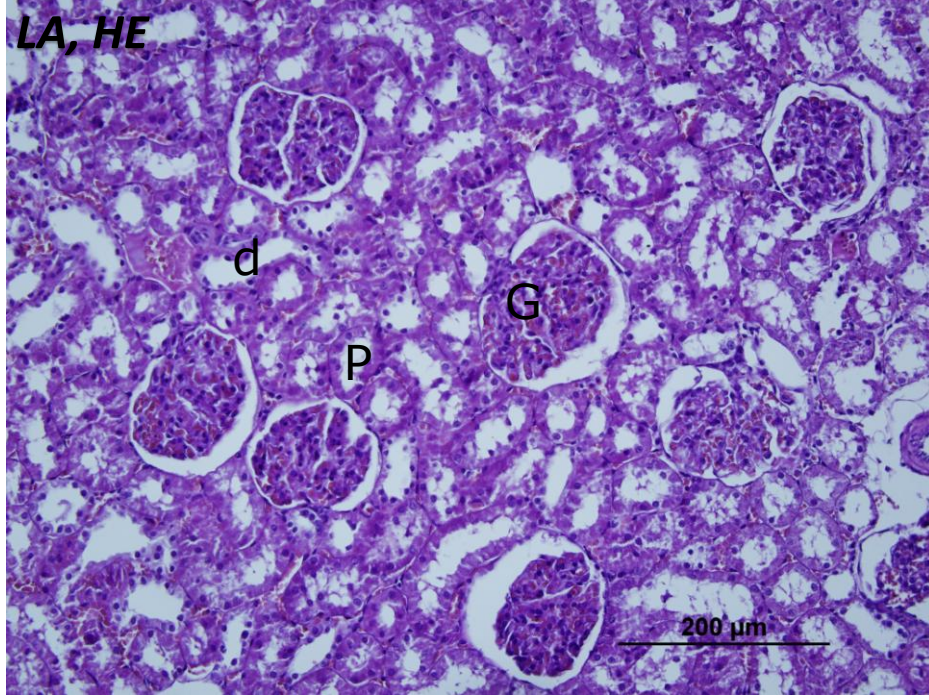
Şekil 29: 5/6 Nf grubu PAS boyanması. (**↓**) İntersitisiyel bağ doku artışı. Scale bar 100µm

LA grubunda;

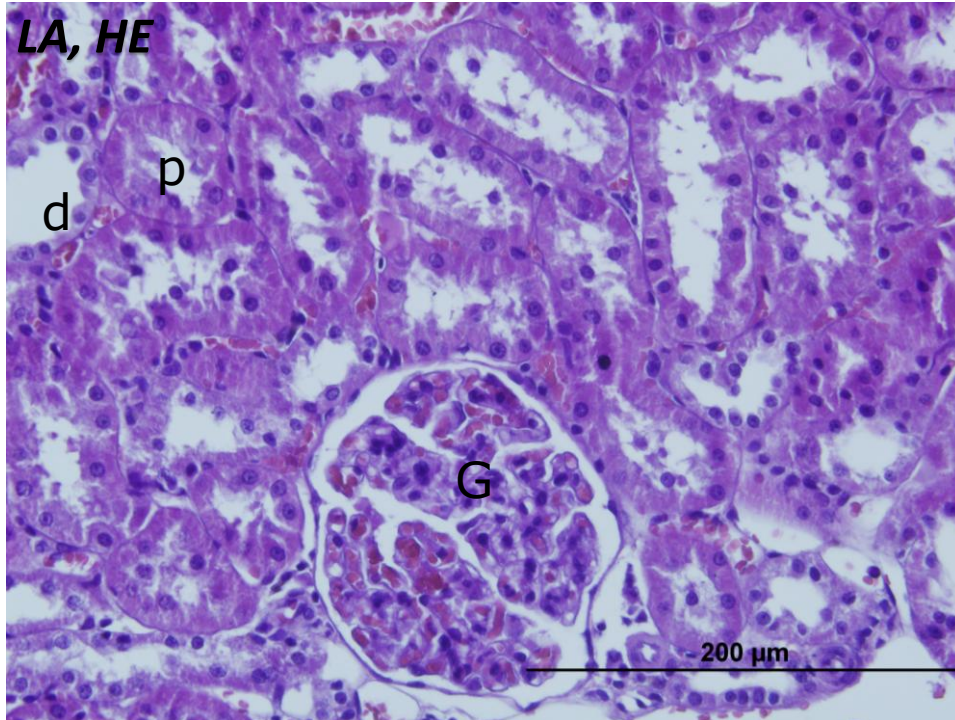
HE boyanmasında, kontrol grubuna benzer şekilde, böbreğin dıştan fibröz bir kapsül ile sarılı olduğu, içte ise korteks ve medulla ayrımının yapıldığı gözlemlendi. Kortekste gözlenen renal korpusküller normal görünümdeydi. Bowman kapsüllerinin dış yaprağı olan visceral tabaka ve iç yaprağı olan pariyetal tabaka ile bu yaprak arasındaki idrar boşluğu normal histolojik yapı gösterdi. Proksimal tübüllerin tek katlı kübik-silindirik epitelle döşeli oldukları ve içerdikleri mitokondiler nedeniyle asidofilik sitoplazmaya sahip oldukları ve lümenlerinin dar olduğu gözlemlendi. Distal tübüllerde hücreler kübik, açık sitoplamalı olarak gözlemlendi ve lümenleri proksimal tübüllere göre daha büyüktü. Distal tübüllerin kortekste izledikleri yol boyunca kendi nefronlarına ait olan renal korpuskülün duvarında oluşturdukları makula densalar normal olarak gözlemlendi. Henle kulbunda ise yassı epitel hücreleri ve belirgin lümen gözlemlendi. Kolektör tübüllerde alçak kübik boylu epiteli ve geniş lümen gözlemlendi (Şekil 30, 31).

PAS boyanmasında, proksimal tübül hücrelerinin apekslerinde mikrovilluslardan oluşan fırçamsı kenarlar belirgin olarak gözlemlendi (Şekil 32).

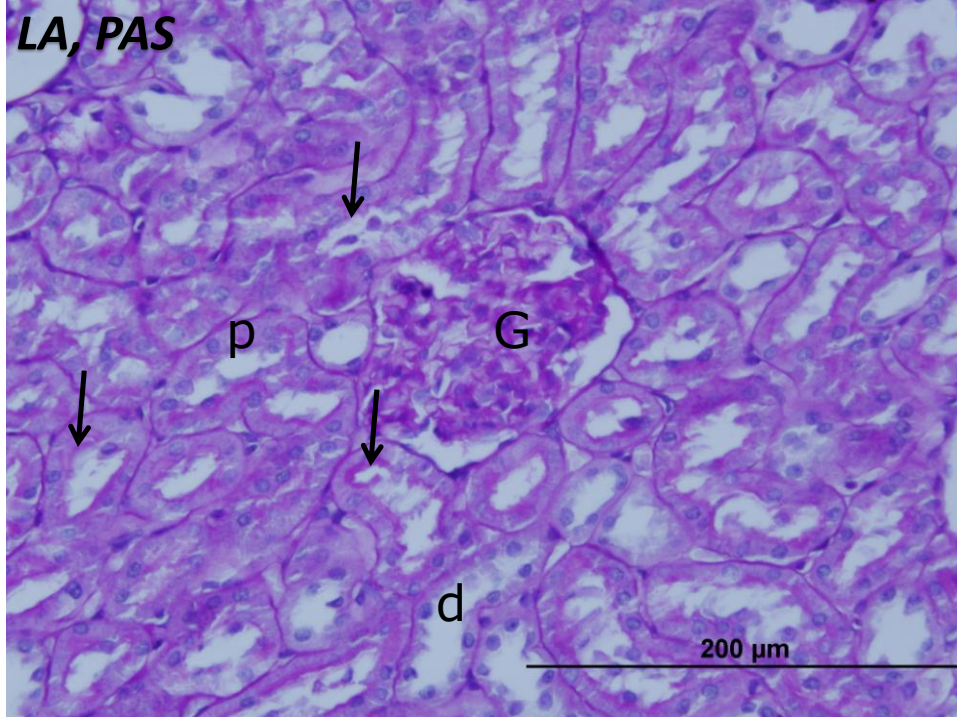
MT boyanmasında, herhangi bir bağ doku ve ya kollagen artışı gözlenmeyip böbrek dokuları normal görünümdeydi (Şekil 33).



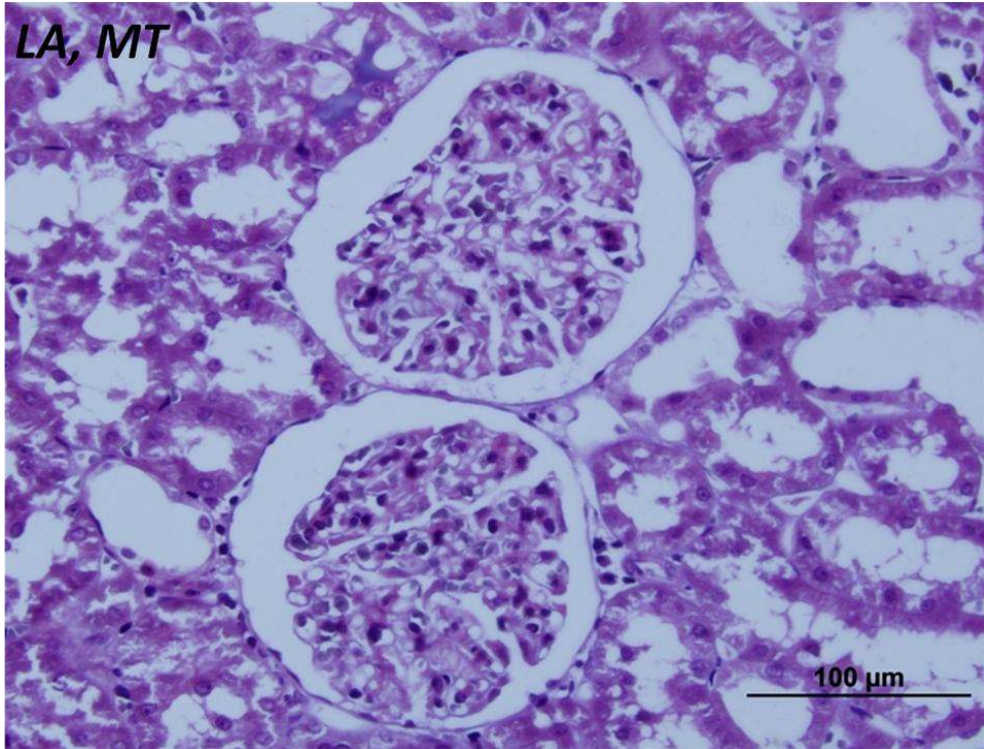
Şekil 30: LA grubu HE boyanması. **G:**Glomerül, **p:**Proksimal tübül, **d:**Distal tübül. Kontrol grubuna benzer böbrek yapısı gözlenmekte. Scale bar 200µm.



Şekil 31: LA grubu HE boyanması. **G:**Glomerül, **p:**Proksimal tübül, **d:**Distal tübül. Scale bar 200µm



Şekil 32: LA grubu PAS boyanması. **G:**Glomerül, **p:**Proksimal tübül, **d:**Distal tübül, (↓) fırçamsı kenar . Scale bar 200µm



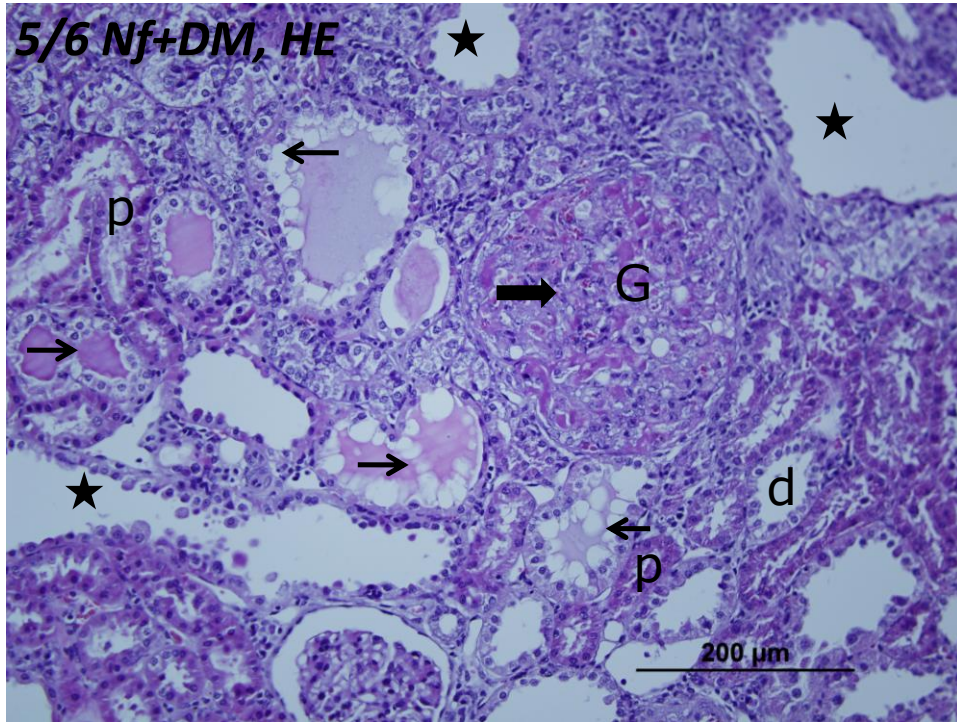
Şekil 33: LA grubu MT boyanması. İntersitisiyel bağ doku artışı gözlenmemekte. Scale bar:100 µm.

5/6Nf+DM grubunda;

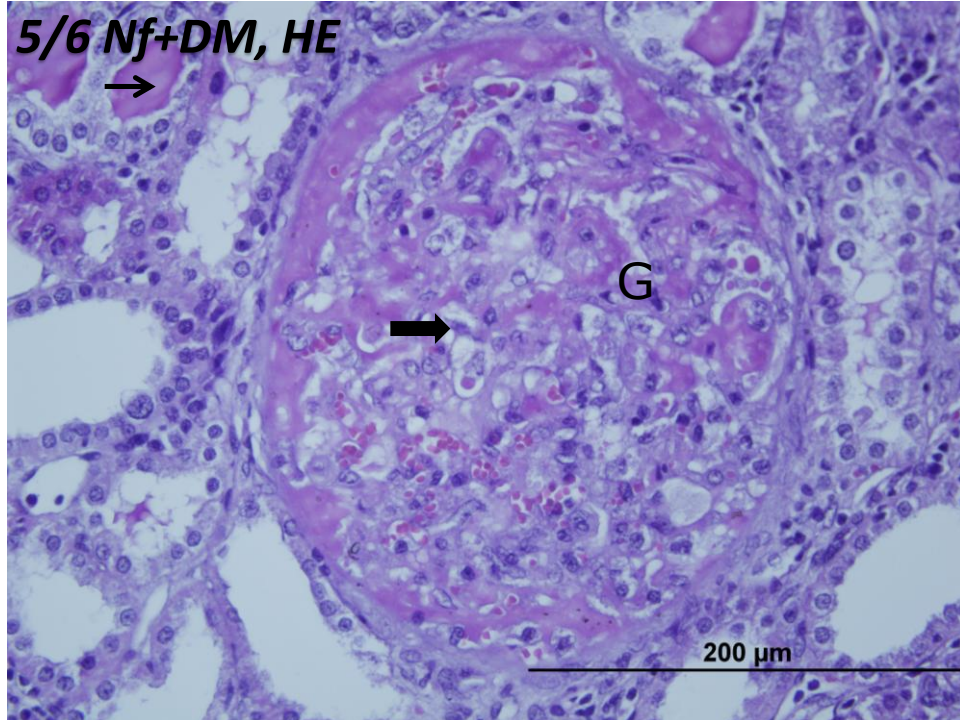
HE Boyanmasında; DM ve 5/6 Nf grubunda gözlenen bulgular gözlemlendi. Kortekste glomerüller ve tübül yapıların hasarlı oldukları gözlemlendi. Glomerüllerde diffüz glomerüloskleroz nodüler ve segmental glomerüloskleroz yapıları, glomerüllerin etrafında ve kapillerlerin etrafında mononükleer hücre infiltrasyonu, intersitisiyel fibrozis, damarlarda dilatasyon, tübüllerde dilatasyon ve hiyalin materyal birikimi ile tübül yapıların dejenerasyonu ile tübüllerde kast formasyonu gözlemlendi. Proksimal tübül epitellerinde debris gözlemlendi (Şekil 34, 35).

PAS boyamasında ise proksimal tübül hücrelerinde fırça kenar kayıpları, inklüzyonlar ve nekroz gözlemlendi. Glomerül bowman dış yapraklarında kalınlaşma, glomerüler mezengiyumda matriks artışı gözlemlendi. Tübüllerde proteinöz birikimler olduğu gözlemlendi (Şekil 36).

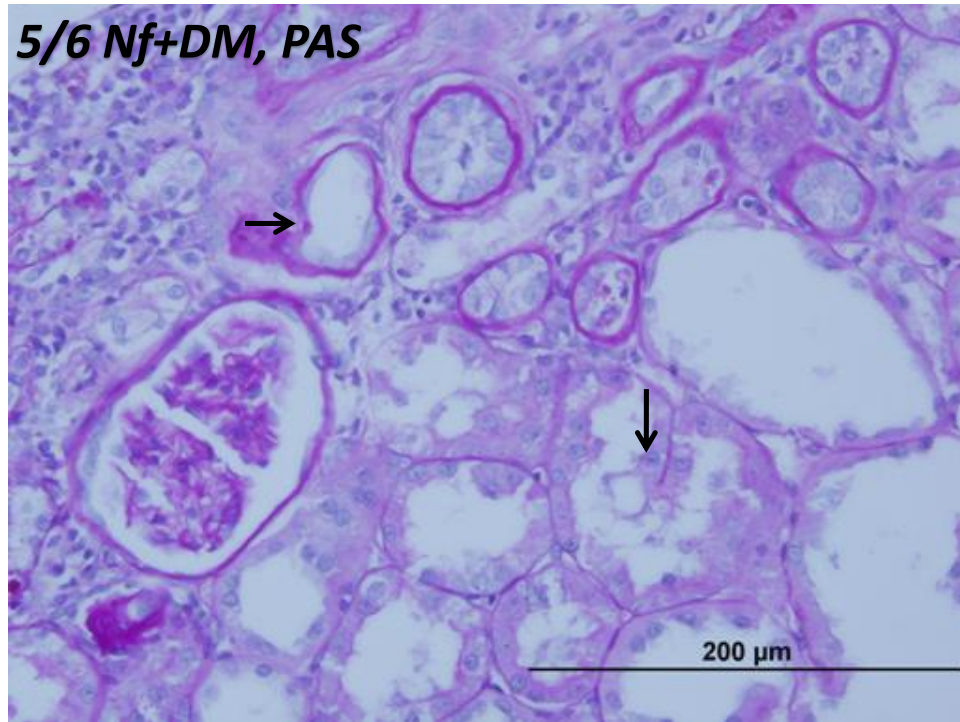
MT boyamada dokuda artmış intersitisiyel fibrozis gözlemlendi (Şekil 37).



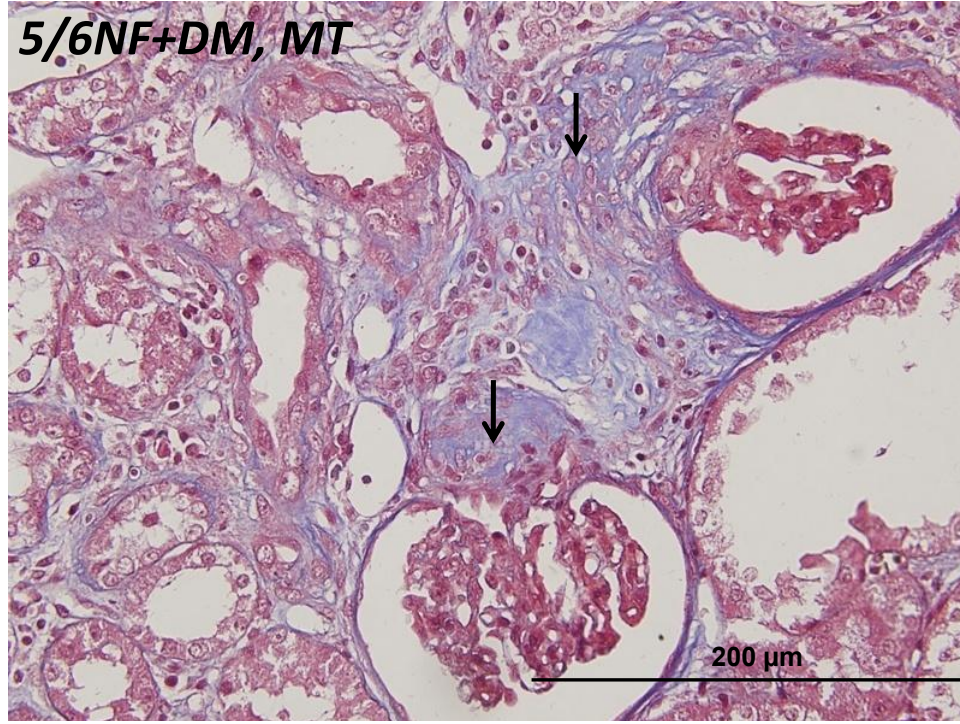
Şekil 34: 5/6 Nf+DM grubu HE boyanması. **G:** Glomerül, **p:** Proksimal tübül, **d:** Distal tübül, (→) Tübüllerde proteinöz madde birikimi, (←) tübüllerde vakukolizasyon ★: Tübül lerde vakuolizasyon. ➡: Glomerüler skleroz. Scale bar 200μm



Şekil 35: 5/6 Nf+DM grubu HE boyanması. G:Glomerül, (→): Glomerüler skleroz. Scale bar 200µm



Şekil 36: 5/6 Nf+DM grubu PAS boyanması. (↓) Fırça kenar kaybı, (→) Glomerüllerde sklerotik yapılar gözlenmekte. Scale bar 200µm.



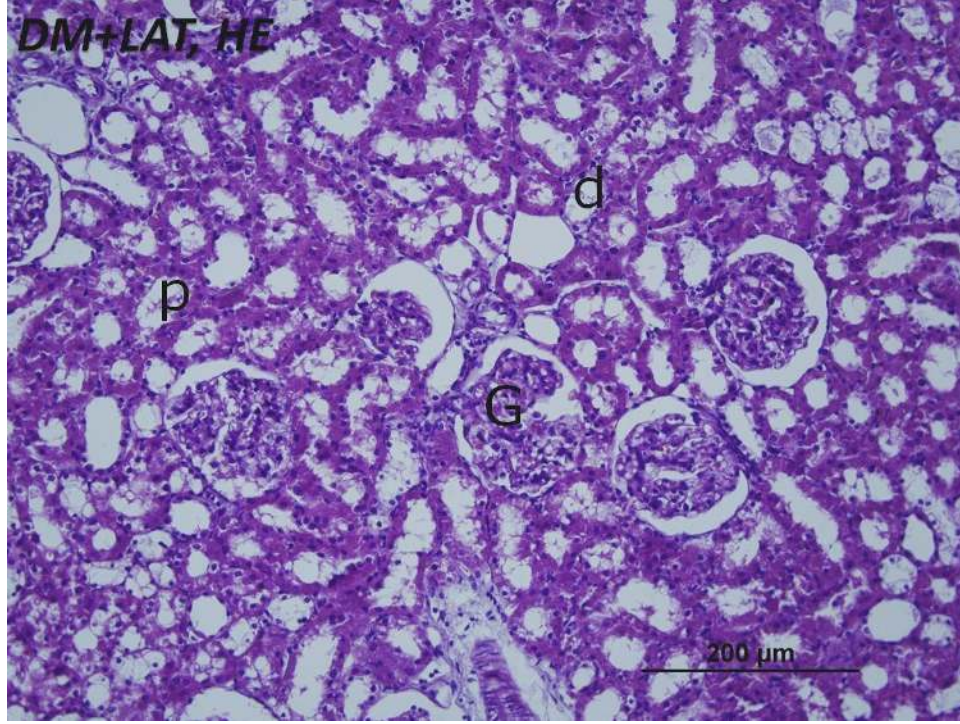
Şekil 37: 5/6 Nf+DM grubu MT boyanması. (↓) İntersitisiyel fibrozis. Scale bar 200µm.

DM+LAT grubunda;

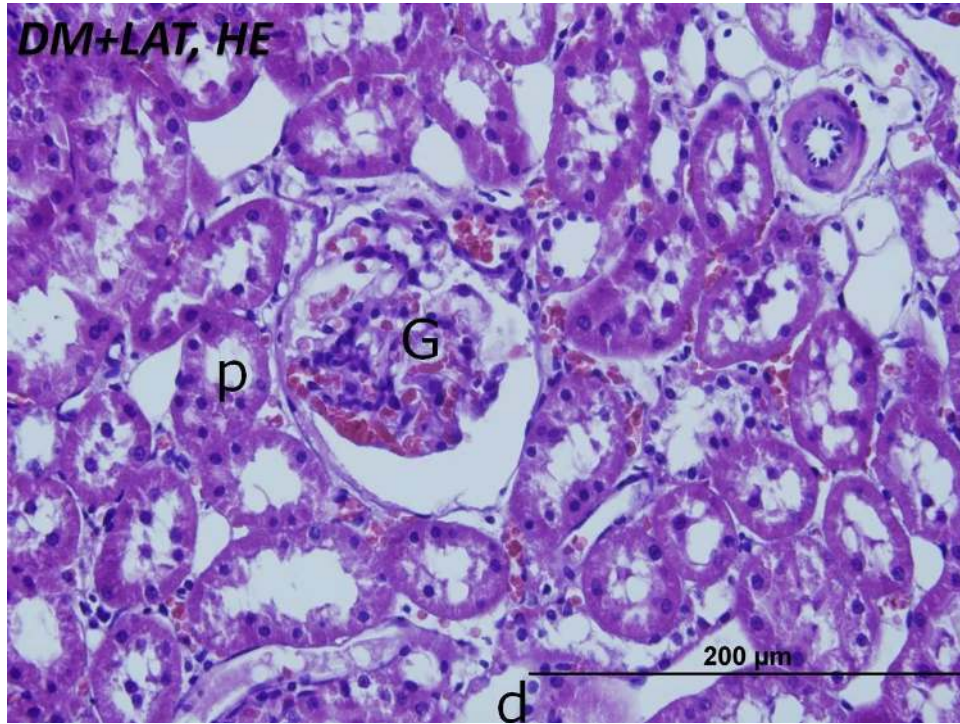
HE boyanmasında, böbreğin dıştan fibröz bir kapsül ile sarılı olduğu, içte ise korteks ve medulla ayrımının yapıldığı gözlemlendi. Kortekste gözlenen renal korpusküller bowman dışı yaprakları, idrar boşlukları ve glomerüller yumak yapıları ile normal görünümdeydi. Proksimal ve distal tübüllerin histolojik yapılarını korudukları gözlemlendi (Şekil 38, 39).

PAS boyanmasında, proksimal tübül hücrelerinin apekslerinde mikrovilluslardan oluşan fırçamsı kenar kayıplarının DM grubuna göre belirgin olarak arttığı gözlemlendi (Şekil 40).

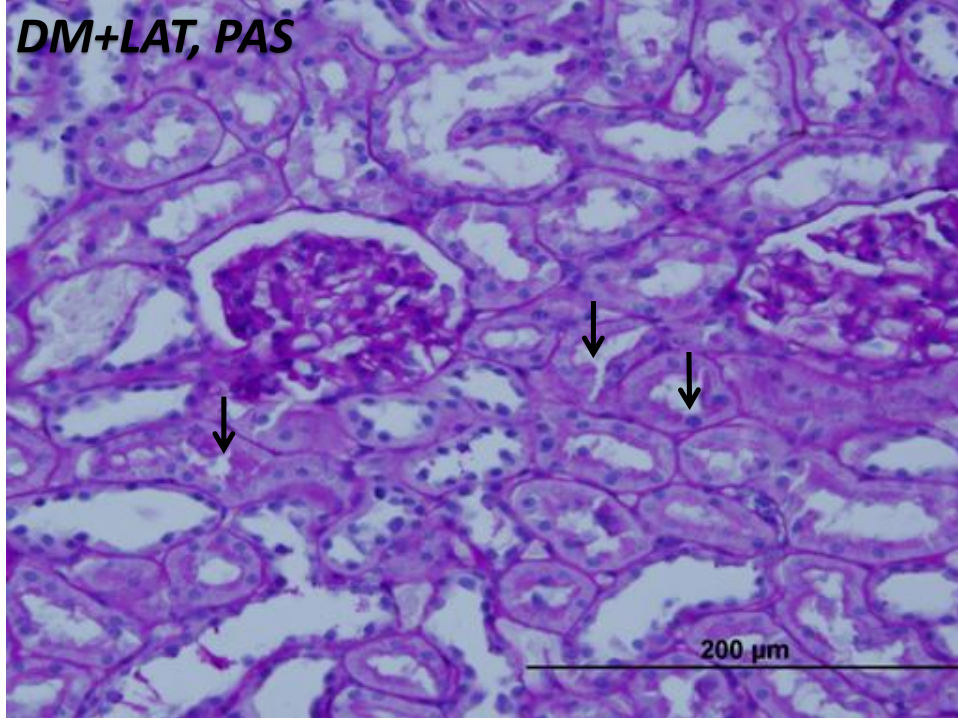
MT boyanmasında, intersitisiyel fibrozisin DM grubuna göre oldukça azalmış olduğu gözlemlendi (Şekil 41).



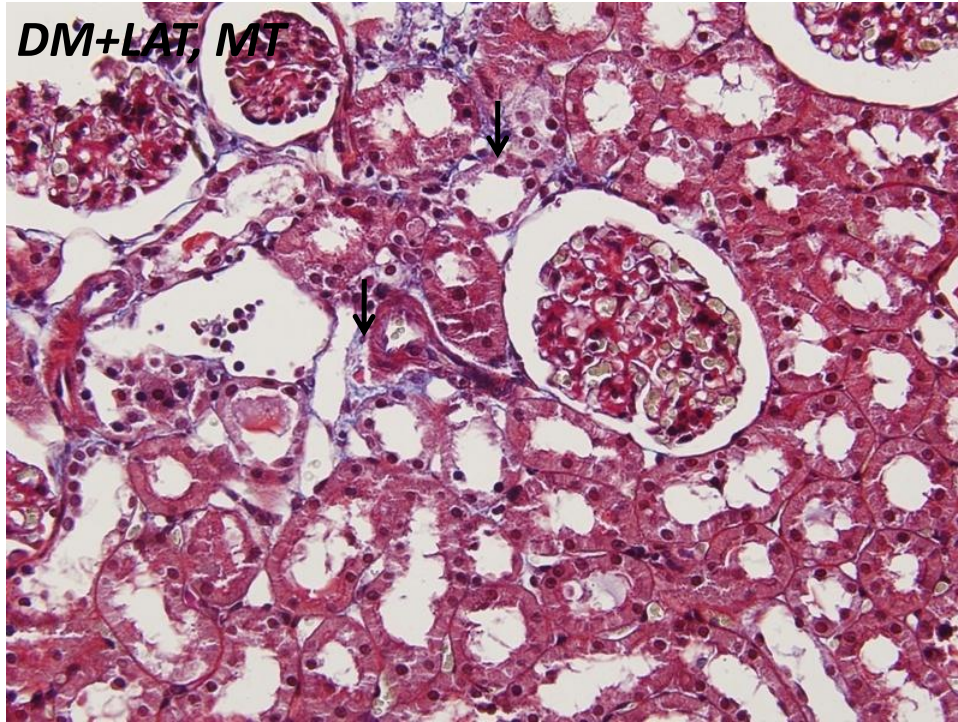
Şekil 38: DM+LAT grubu HE boyanması. **G:**Glomerül, **p:**Proksimal tübül, **d:**Distal tübül. Scale bar: 200µm.



Şekil 39: DM+LAT grubu HE boyanması. **G:**Glomerül, **p:**Proksimal tübül, **d:**Distal tübül. Scale bar: 200µm



Şekil 40: DM+LAT grubu PAS boyanması.(↓) Fırçamsı kenar. Scale bar: 200µm.



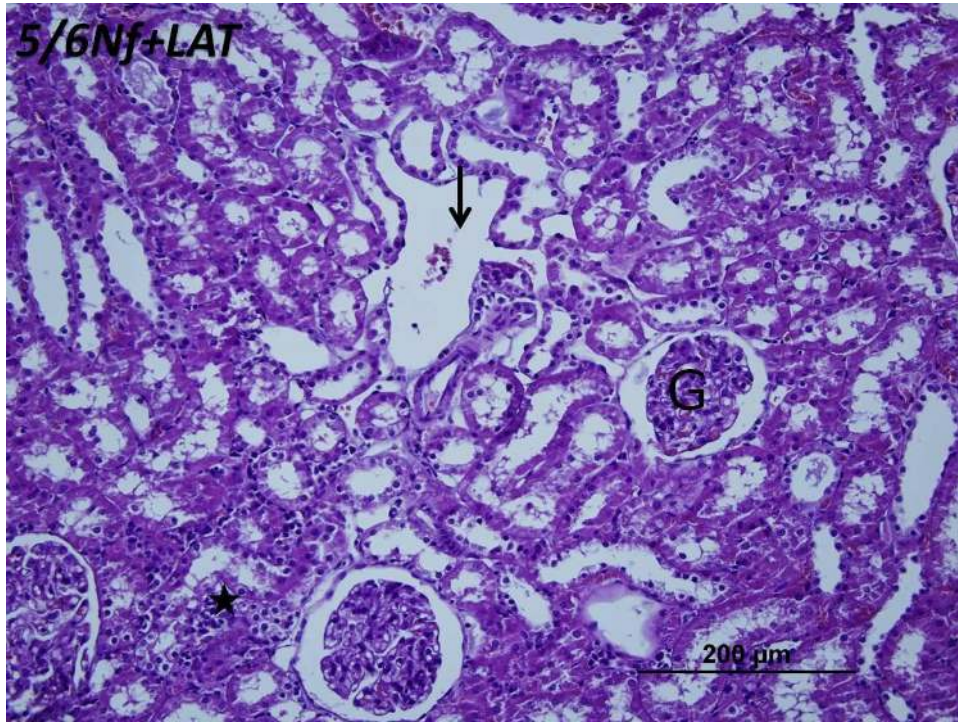
Şekil 41: DM+LAT grubu MT boyanması.(↓) İntersitisiyel fibrozisin oldukça azalmış olduğu gözlemlendi. Scale bar: 200µm.

5/6 Nf+LAT grubunda;

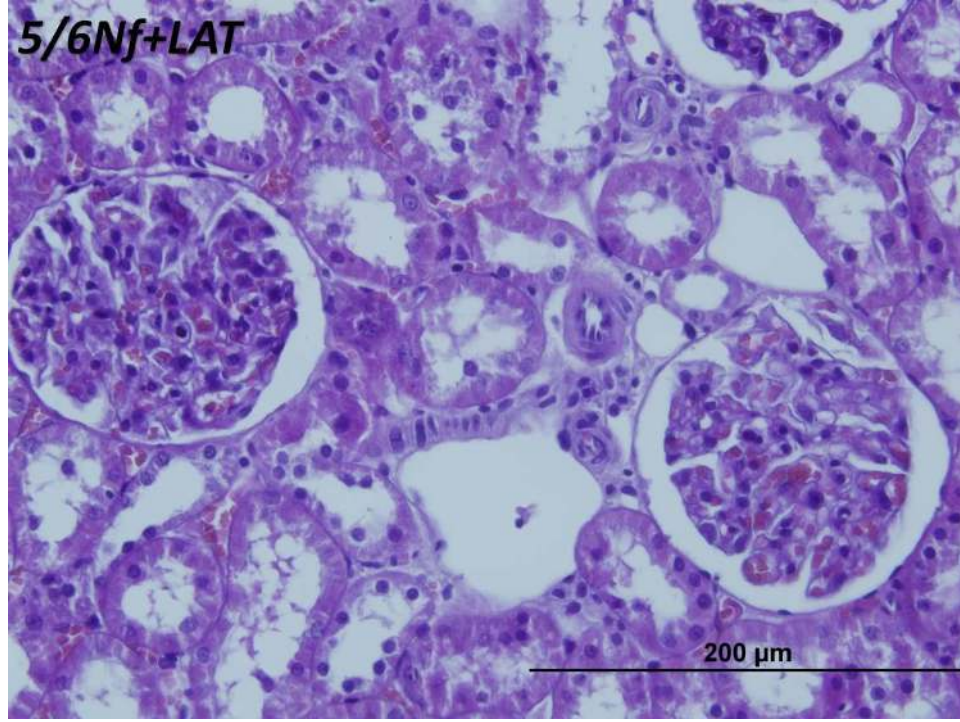
HE boyanmasında, böbreğin dıştan fibröz bir kapsül ile sarılı olduğu, içte ise korteks ve medulla ayrımının yapıldığı gözlemlendi. Kortekste gözlenen renal korpusküllerin, proksimal ve distal tübüllerin histolojik yapılarını 5/6 Nf grubuna göre korumuş oldukları gözlemlendi (Şekil 42,43).

PAS boyanmasında, proksimal tübül hücrelerinin apekslerinde mikrovilluslardan oluşan fırçamsı kenar kayıplarının 5/6 Nf grubuna göre belirgin olarak arttığı gözlemlendi (Şekil 44).

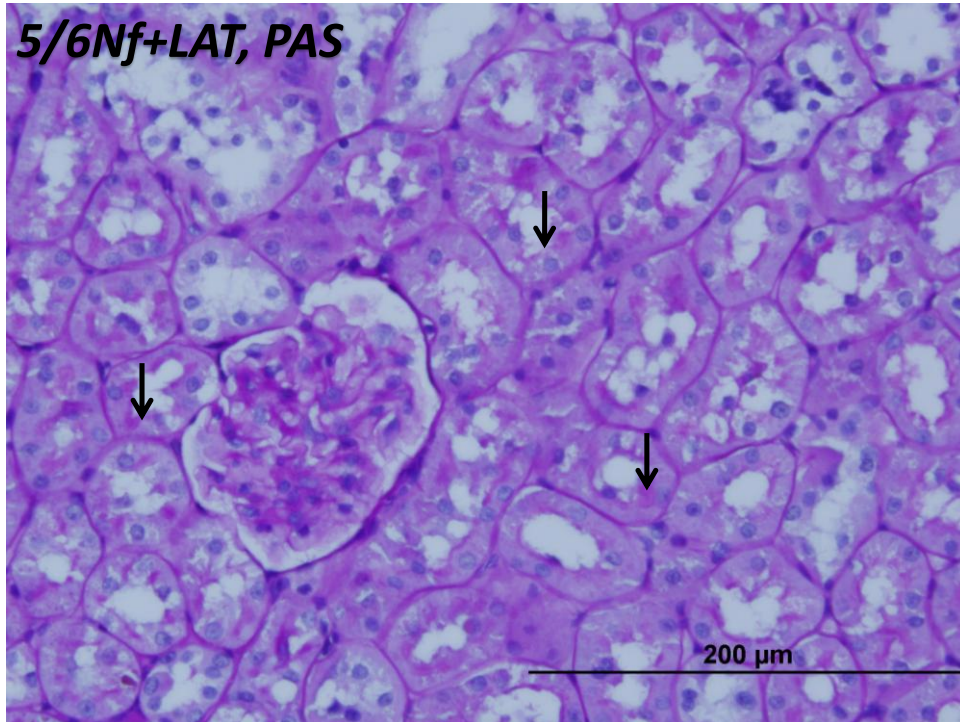
MT boyanmasında, intersitisiyel fibrozisin DM grubuna göre oldukça azalmış olduğu gözlemlendi (Şekil 45).



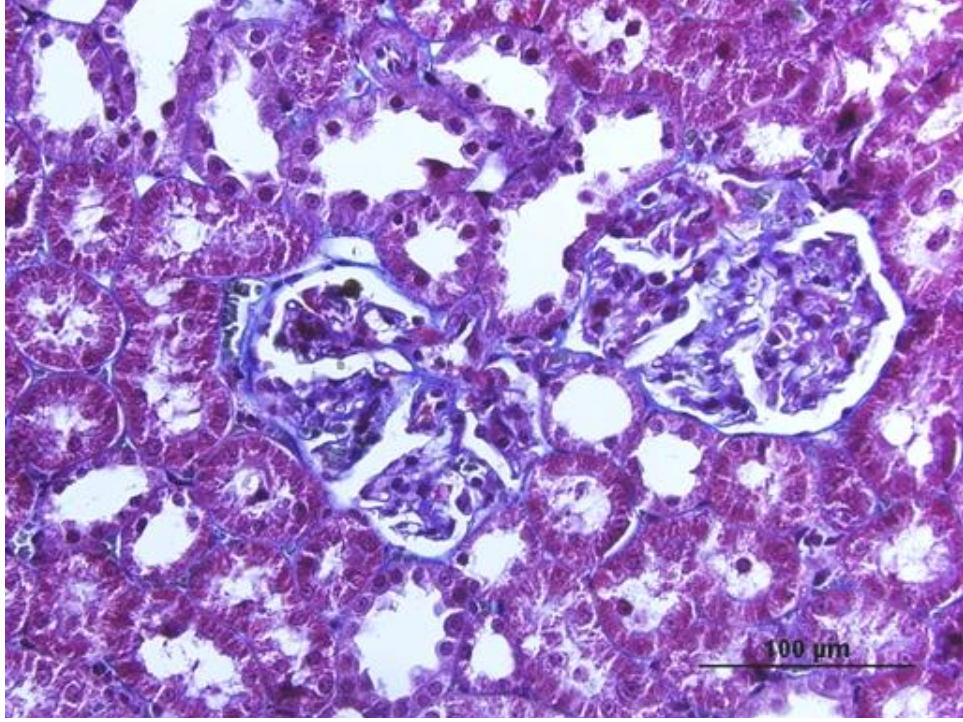
Şekil 42: 5/6Nf+LAT grubu HE boyanması. **G:**Glomerül, Scale bar: 200µm. (↓) Tübüler vakuolizasyon ve ★: Intersitisiyel fibroziste azalma gözlenmektedir.



Şekil 43: 5/6Nf+LAT grubu HE boyanması. Normal histolojik yapı gözlenmekte.



Şekil 44: 5/6Nf+LAT grubu PAS boyanması.(↓) Fırçası kenar. Scale bar: 200µm.



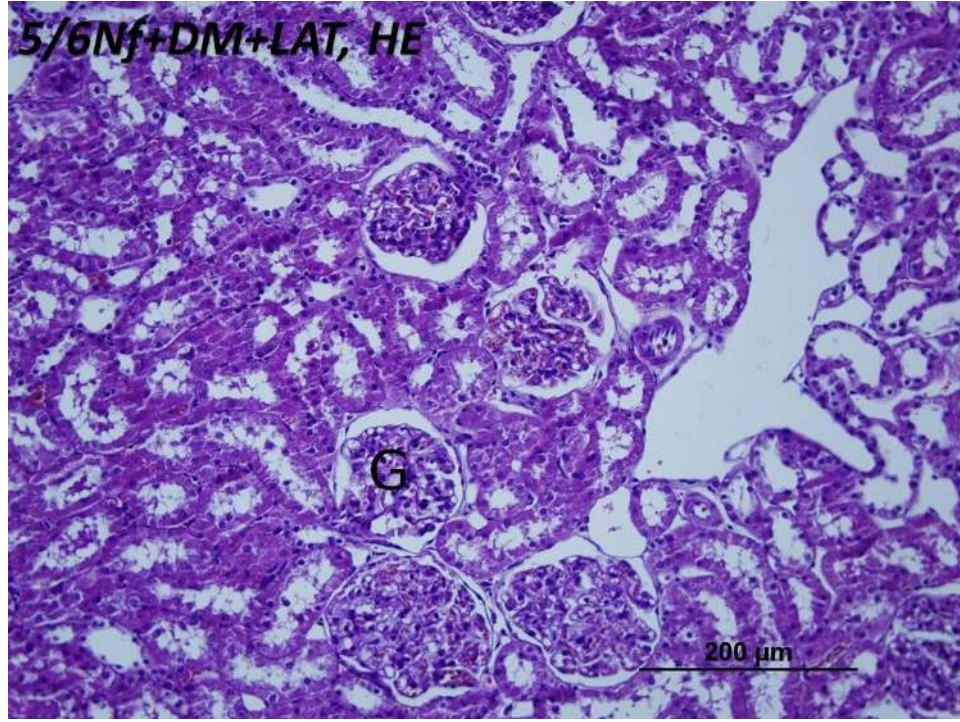
Şekil 45: 5/6Nf+LAT grubu MT boyanması. Bağ doku artışının azladığı gözlenmekte. Scale bar: 100µm

5/6 Nf+DM+LAT grubunda;

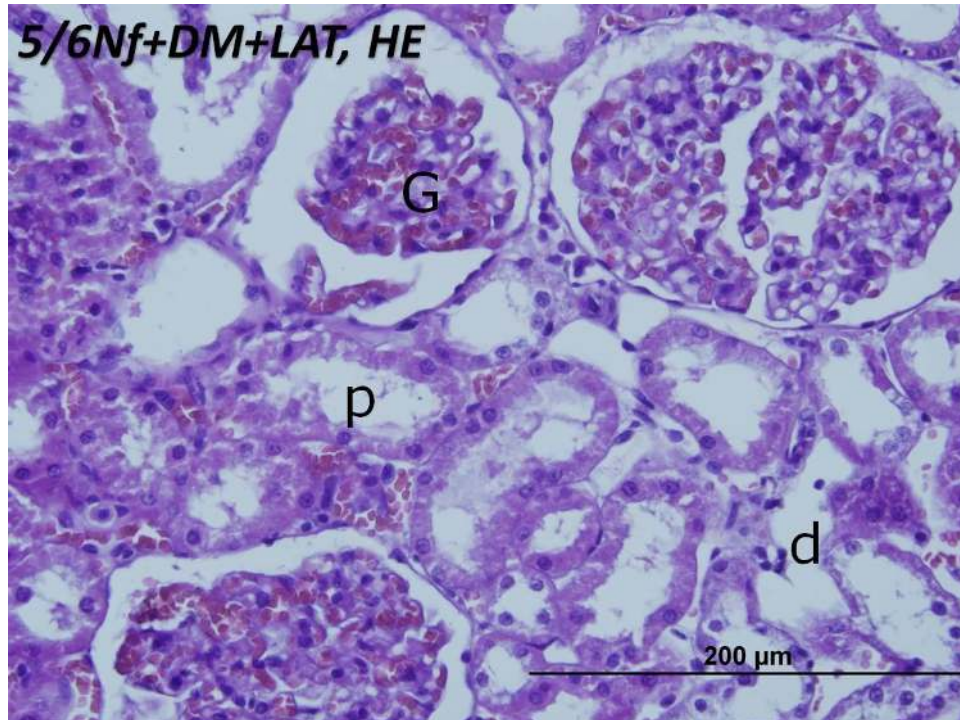
HE boyanmasında, böbreğin dıştan fibröz bir kapsül ile sarılı olduğu, içte ise korteks ve medulla ayrımının yapıldığı gözlemlendi. Kortekste gözlenen renal korpusküllerin, proksimal ve distal tübüllerin histolojik yapılarını 5/6 Nf grubuna göre korunmuş oldukları gözlemlendi (Şekil 46, 47).

PAS boyanmasında, proksimal tübül hücrelerinin apekslerinde mikrovilluslardan oluşan fırçamsı kenar kayıplarının 5/6 Nf grubuna göre belirgin olarak arttığı gözlemlendi (Şekil 48).

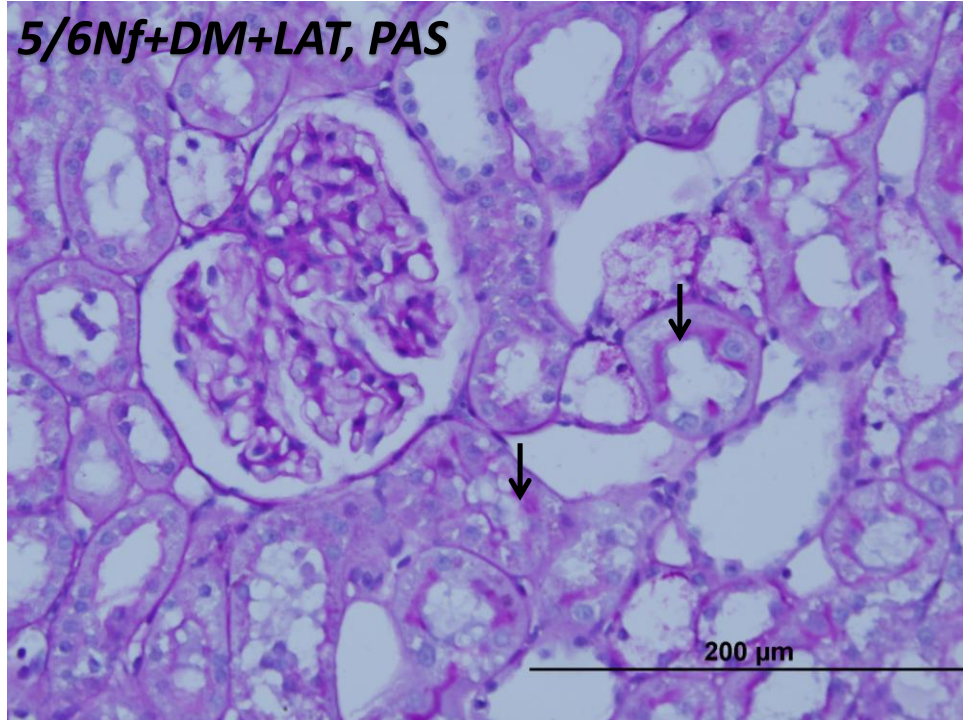
MT boyanmasında, intersitisiyel fibrozisin DM grubuna göre oldukça azalmış olduğu gözlemlendi (Şekil 49).



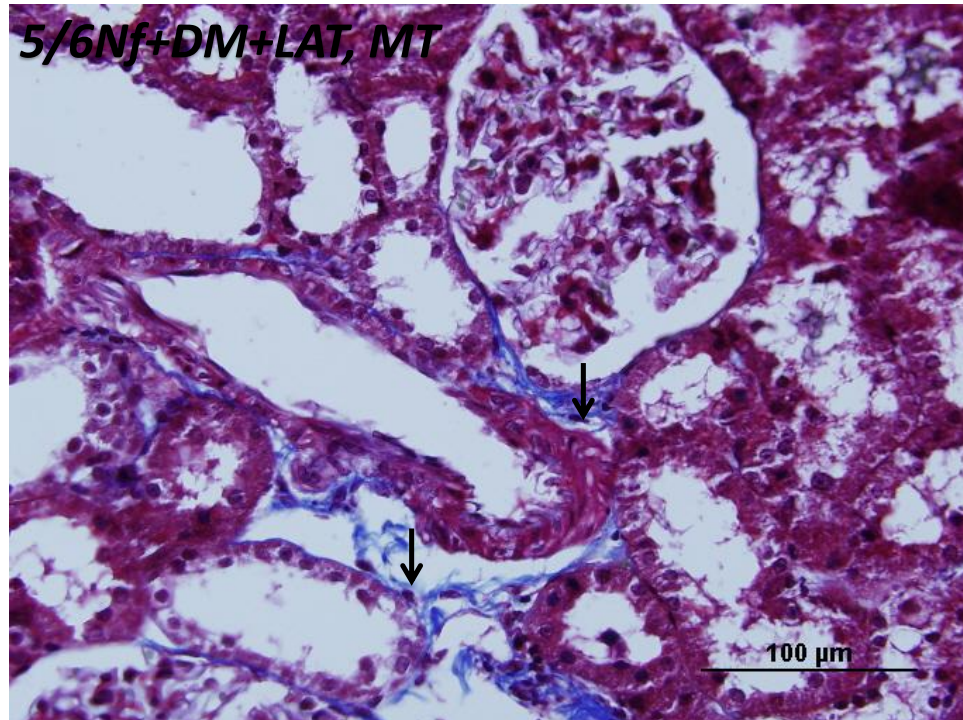
Şekil 46: 5/6Nf+DM+LAT grubu HE boyanması. **G:**Glomerül. Scale bar: 200µm



Şekil 47: 5/6Nf+DM+LAT grubu HE boyanması. **G:**Glomerül. **p:**Proksimal tübül, **d:**Distal tübül. Scale bar: 200µm



Şekil 48: 5/6Nf+DM+LAT grubu PAS boyanması.(↓) Fırçamsı kenar. Scale bar: 200µm.



Şekil 49:5/6Nf+LAT grubu MT boyanması.(↓) Fırçamsı kenar. Scale bar: 100µm

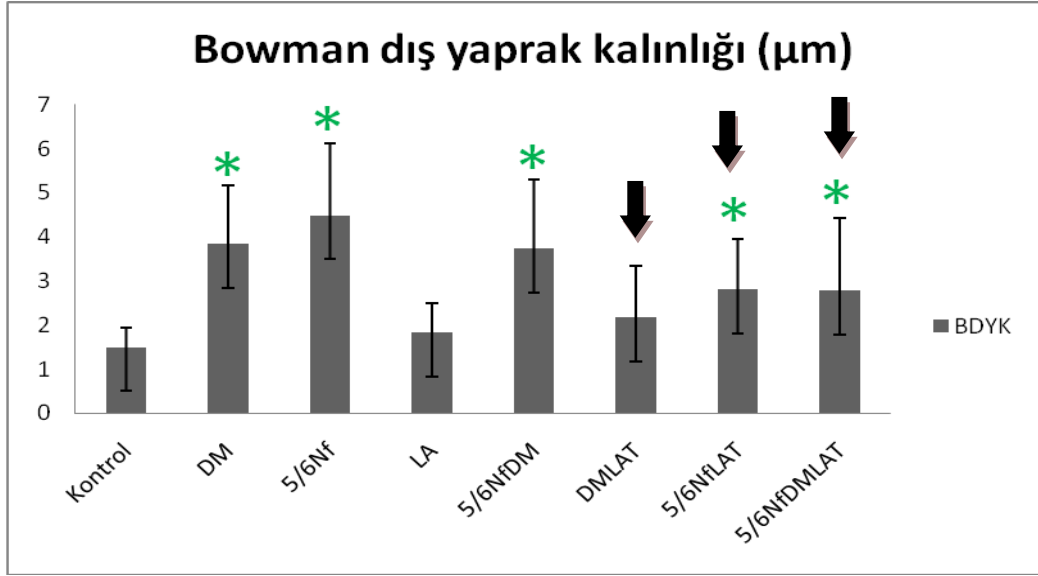
5.3 Renal hasarın histomorfometrik değerdendilmesi

Analizlerde One Way ANOVA testi ve post-hoc Bonferroni testi kullanıldı. One-Way ANOVA testi sonucunda tüm gruplar arasındaki fark belirlenip, bu gruplar arasındaki farklar post-hoc Bonferroni testi ile değerdendirildi. Grupların ölçüm değerdeleri Ort±SD olarak verildi.

5.3.1 Bowman Dış Yaprak Kalınlık Ölçümleri (µm)

Kontrol grubunda **1.50±0.45 µm**, DM grubunda **3.85± 1.31 µm**, 5/6 Nf grubunda **4.49 ±1.63 µm**, LA grubunda **1.83 ± 0.66 µm**, 5/6Nf+DM grubunda **3.73 ±1.57 µm**, DM+LAT grubunda **2.18±1.15 µm**, 5/6 Nf+LAT grubunda **2.79 ±1.64 µm**, 5/6Nf+DM+LAT **2.80 ±1.14 µm** grubunda olarak saptandı (Şekil 50).

- ❖ DM, 5/6 Nf, 5/6Nf+DM, 5/6Nf+LAT, 5/6Nf+DM+LAT gruplarının BDY kalınlıkları kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla; p=0.000, p=0.000, p=0,000, p=0,001, p=0,001). LA ve DM+LAT grupları ile kontrol grubu arasında anlamlı fark gözlenmedi (p=1.000, p=0,158).
- ❖ DM grubu ile DM+LAT grubunu karşılaştırdığımızda DM+LAT grubunun BDY kalınlığının anlamlı olarak azaldığı gözlendi (p=0,000) (Siyah ok).
- ❖ 5/6Nf grubu 5/6Nf+LAT grubunu karşılaştırdığımızda 5/6Nf+LAT grubunun BDY kalınlığının anlamlı olarak azaldığı gözlendi (p=0,000) (Siyah ok).
- ❖ 5/6Nf+DM ve 5/6Nf+DM+LAT grubunu karşılaştırdığımızda 5/6Nf+DM+LAT grubunun BDY kalınlığının anlamlı olarak azaldığı gözlendi (p=0,004) (Siyah ok).

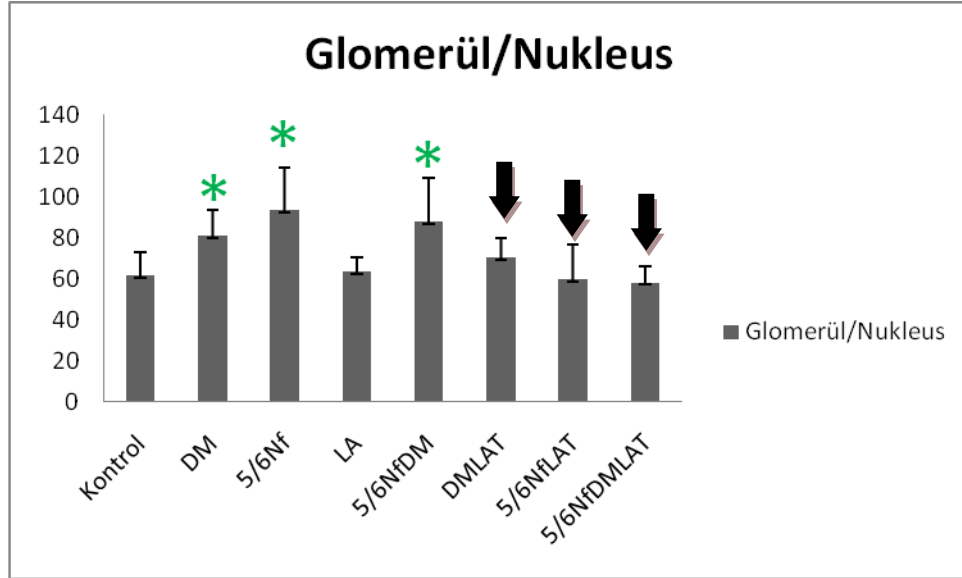


Şekil 50: Kontrol grubuna göre BDY kalınlıkları. *: Anlamli artış ↓ : Anlamli azalma

5.3.2 Glomerül başına düşen nukleus sayısı

Kontrol grubunda 61.35 ± 11.8 , DM grubunda 80.73 ± 12.7 , 5/6 Nf grubunda 93.36 ± 16.8 , LA grubunda 63.52 ± 6.88 , 5/6Nf+DM grubunda 87.78 ± 21.1 , DM+LAT grubunda 70.31 ± 9.75 , 5/6 Nf+LAT grubunda 59.5 ± 16.9 , 5/6Nf+DM+LAT grubunda 58.2 ± 7.8 olarak saptandı (Şekil 51).

- ❖ DM, 5/6 Nf, 5/6Nf+DM gruplarının glomerül başına nukleus sayısı kontrol grubuna göre anlamli olarak yüksek bulundu (sırasıyla; $p=0.000$, $p=0.000$, $p=0.000$). LA, DM+LAT, 5/6Nf+LAT ve 5/6Nf+DM+LAT grupları ile kontrol grubu arasında anlamli fark gözlenmedi ($p=1.000$, $p=1.000$, $p=1.000$, $p=0.888$).
- ❖ DM grubu ile DM+LAT grubunu karşılaştırdığımızda DM+LAT grubunun glomerül başına düşen nukleus sayısının azaldığı gözlendi ($p=0.000$) (Siyah ok).
- ❖ 5/6Nf grubu 5/6Nf+LAT grubunu karşılaştırdığımızda 5/6Nf+LAT grubunun glomerül başına düşen nukleus sayısının anlamli olarak azaldığı gözlendi ($p=0.000$) (Siyah ok).
- ❖ 5/6Nf+DM ve 5/6Nf+DM+LAT grubunu karşılaştırdığımızda 5/6Nf+DM+LAT grubunun glomerül başına düşen nukleus sayısının anlamli olarak azaldığı gözlendi ($p=0.000$) (Siyah ok).

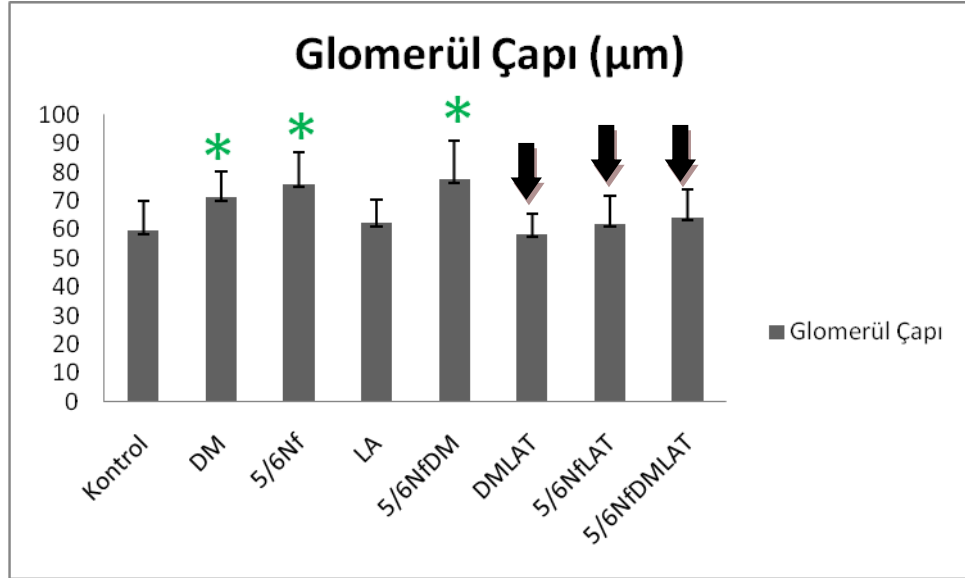


Şekil 51: Kontrol grubuna göre glomerül başına düşen nukleus sayısı. *: Anlamlı artış, ↓: Anlamlı azalma

5.3.3 Glomerül Çapı Ölçümleri (μm)

Kontrol grubunda $59.49 \pm 10.53 \mu\text{m}$, DM grubunda $71.06 \pm 9.21 \mu\text{m}$, 5/6 Nf grubunda $75.69 \pm 11.3 \mu\text{m}$, LA grubunda $62.18 \pm 8.29 \mu\text{m}$, 5/6Nf+DM grubunda $77.44 \pm 13.4 \mu\text{m}$, DM+LAT grubunda $58.21 \pm 7.23 \mu\text{m}$, 5/6 Nf+LAT grubunda $61.94 \pm 9.59 \mu\text{m}$, 5/6Nf+DM+LAT grubunda $64.02 \pm 10.09 \mu\text{m}$ olarak saptandı (Şekil 52).

- ❖ DM, 5/6 Nf, 5/6Nf+DM gruplarının glomerül çapları kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla; $p=0.000$, $p=0.000$, $p=0.000$). LA, DM+LAT, 5/6Nf+LAT ve 5/6Nf+DM+LAT grupları ile kontrol grubu arasında anlamlı fark gözlenmedi ($p=1.000$, $p=1.000$, $p=1.000$, $p=0.088$).
- ❖ DM grubu ile DM+LAT grubunu karşılaştırdığımızda DM+LAT grubunun glomerül çapının anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ($p=0.000$) (Siyah ok).
- ❖ 5/6Nf grubu 5/6Nf+LAT grubunu karşılaştırdığımızda 5/6Nf+LAT grubunun glomerül çapının anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ($p=0.000$) (Siyah ok).
- ❖ 5/6Nf+DM ve 5/6Nf+DM+LAT grubunu karşılaştırdığımızda 5/6Nf+DM+LAT grubunun glomerül çapının anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ($p=0.000$) (Siyah ok).

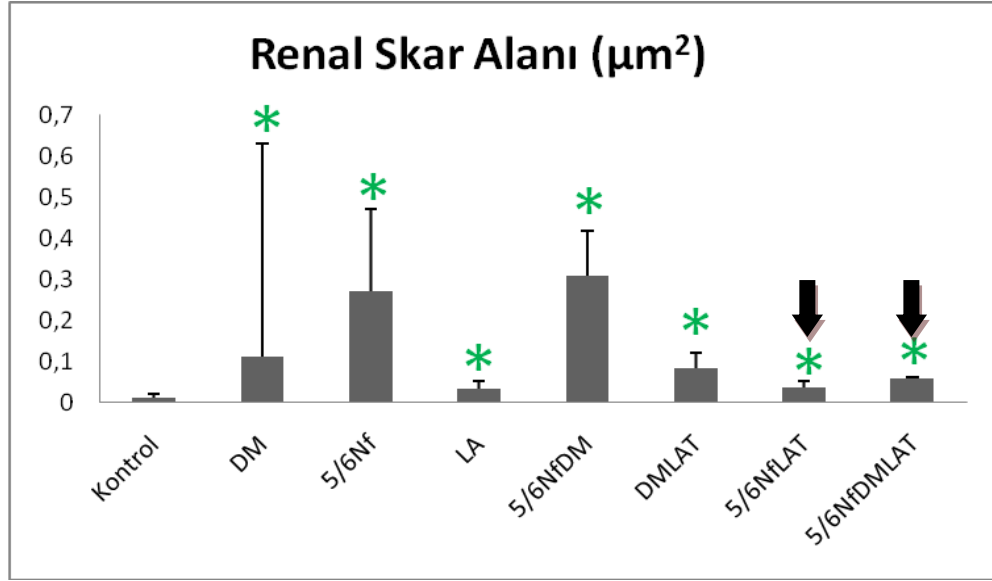


Şekil 52: Kontrol grubuna göre glomerül çapı ölçümü. *: Anlamli artış, ↓ : Anlamli azalma

5.3.4 Renal skar alanının değ erlendirilmesi (μm^2)

Kontrol grubunda $0.0104 \pm 0.01 \mu m^2$, DM grubunda $0.1111 \pm 0.52 \mu m^2$, 5/6 Nf grubunda $0.2703 \pm 0.20 \mu m^2$, LA grubunda $0.0328 \pm 0.02 \mu m^2$, 5/6Nf+DM grubunda $0.3090 \pm 0.11 \mu m^2$, DM+LAT grubunda $0.0825 \pm 0.04 \mu m^2$, 5/6 Nf+LAT grubunda $0.0364 \pm 0.01 \mu m^2$, 5/6Nf+DM+LAT grubunda $0.0594 \pm 0.02 \mu m^2$ olarak saptandı (Şekil 53).

- ❖ Tüm gruplarda renal skar alanı kontrol grubuna göre anlamli olarak artmış bulundu (sırasıyla $p=0.002$, $p=0.002$, $p=0.002$, $p=0.035$, $p=0.003$, $p=0.013$, $p=0.003$).
- ❖ DM grubu ile DM+LAT grubunu karşılaştırdığımızda anlamli farklılık gözlenmedi ($p=1.000$).
- ❖ 5/6Nf grubu 5/6Nf+LAT grubunu karşılaştırdığımızda 5/6Nf+LAT grubunda intersitisiyel fibrozis alanında anlamli azalma olduğu gözlendi ($p=0,000$) (Siyah ok).
- ❖ 5/6Nf+DM ve 5/6Nf+DM+LAT grubunu karşılaştırdığımızda 5/6Nf+DM+LAT grubunda renal skar alanında anlamli azalma olduğu gözlendi ($p=0,000$) (Siyah ok).

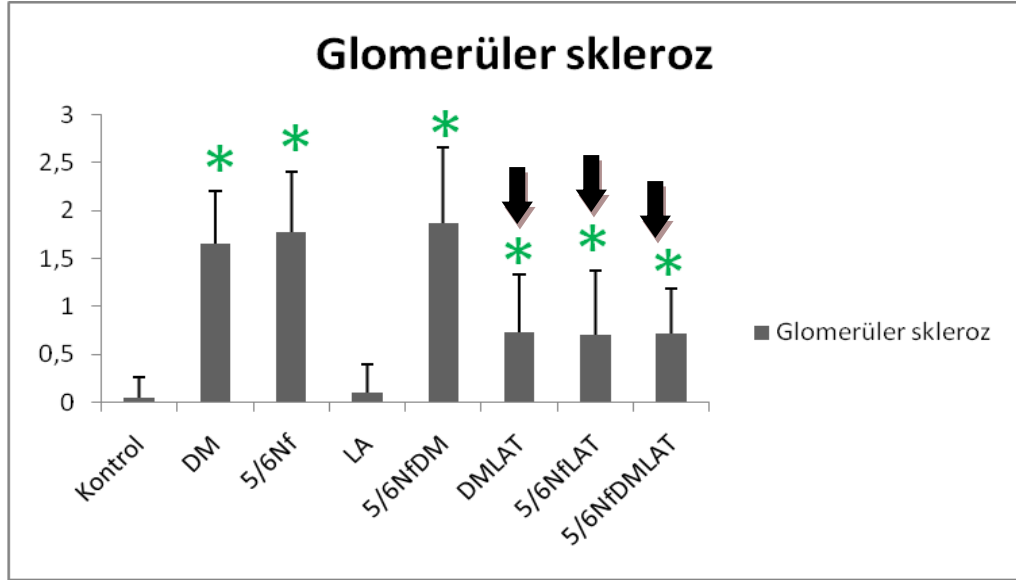


Şekil 53: Kontrol grubuna göre intersitisiyel fibrozis alanı ölçümü. *: Anlamli artiş, ↓: Anlamli azalma

5.3.5 Glomerüler Sklerozun değerlendirilmesi

Kontrol grubunda 0.05 ± 0.21 , DM grubunda 1.66 ± 0.55 , 5/6 Nf grubunda 1.77 ± 0.64 , LA grubunda 0.10 ± 0.30 , 5/6Nf+DM grubunda 1.87 ± 0.79 , DM+LAT grubunda 0.73 ± 0.60 , 5/6 Nf+LAT grubunda 0.70 ± 0.68 , 5/6Nf+DM+LAT grubunda 0.72 ± 0.47 olarak saptandı (Şekil 54).

- ❖ Tüm gruplarda glomerüler skleroz kontrol grubuna ve LA grubuna göre anlamli olarak artmış bulundu ($p=0.000$).
- ❖ DM grubu ile DM+LAT grubunu karşılaştırdığımızda anlamli olarak azalmıştı ($p=0.000$) (Siyah ok).
- ❖ 5/6Nf grubu 5/6Nf+LAT grubunu karşılaştırdığımızda 5/6Nf+LAT grubunda anlamli azalma olduğu gözlemlendi. ($p=0,000$) (Siyah ok).
- ❖ 5/6Nf+DM ve 5/6Nf+DM+LAT grubunu karşılaştırdığımızda 5/6Nf+DM+LAT grubunda anlamli azalma olduğu gözlemlendi. ($p=0,000$) (Siyah ok).



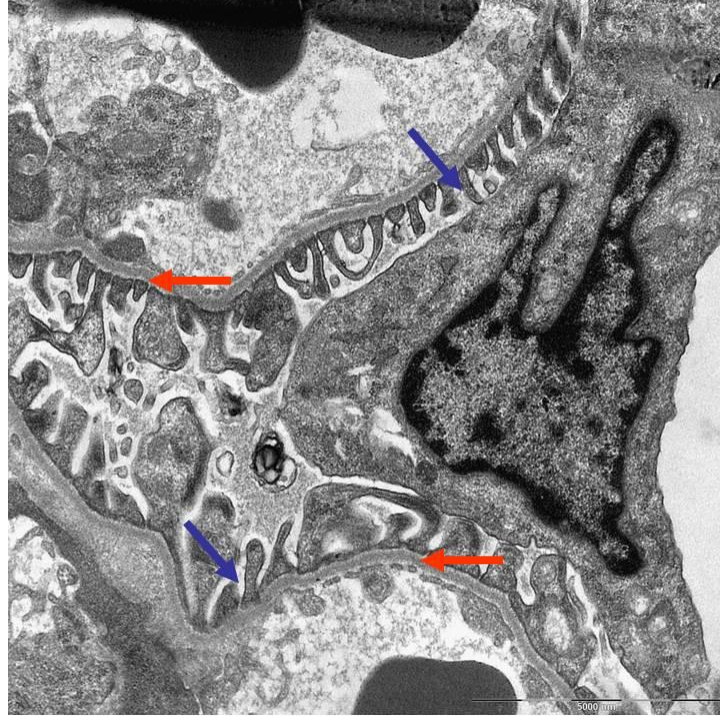
Şekil 54: Glomerüler skleroz skorlaması. *: Anlamli artış, ↓ : Anlamli azalma

5.4 Elektron Mikroskopik (Ultrastrüktürel) Bulgular

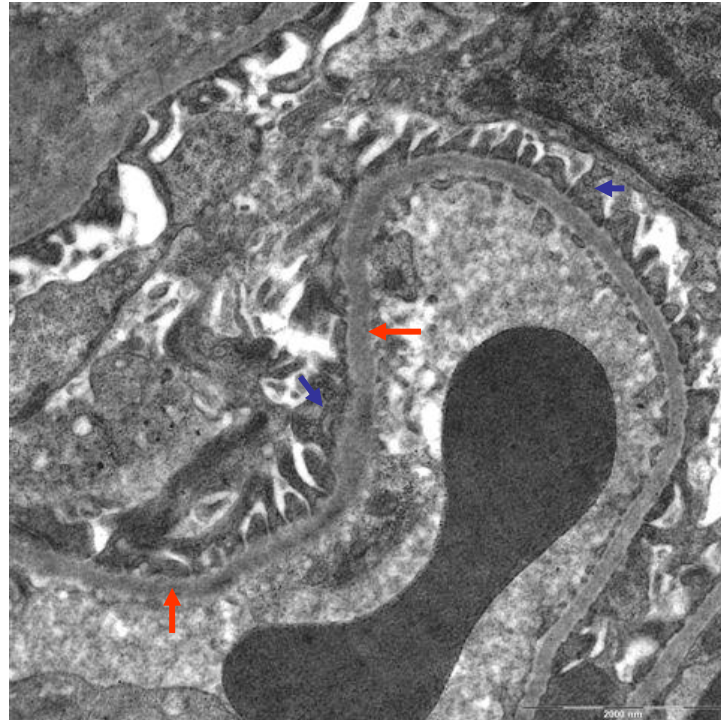
Tüm deney gruplarının yarı ince kesitleri alınıp değerlendirildi ve ardından ince kesitleri (150 nm) alınıp elektron mikroskobu ile incelendi. Glomerüllerin kapiller loop etrafındaki GBM yapıları ultrastrüktürel olarak incelendi.

Kontrol grubuna ait böbrek kesitlerinin ince yapıları incelendiğinde; normal görünümde GBM ve podosit yapıları gözlemlendi (Şekil 55, 56).

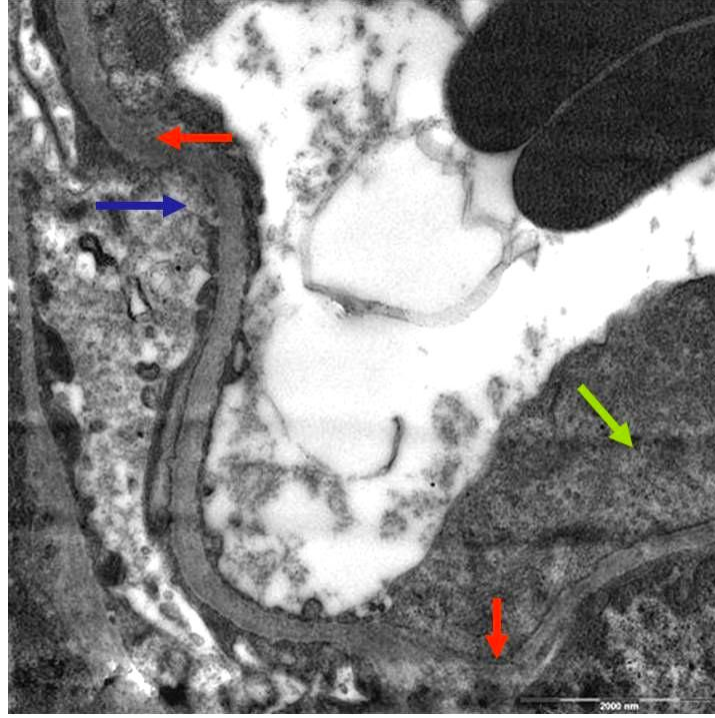
DM grubuna ait böbrek kesitlerinin ince yapıları incelendiğinde bazal membranını kontrol grubuna göre düzensiz ve kalın olduğu, bazal membranın altında subendotelial birikimler gözlemlendiği ve podosit yapılarında düzensizlik ve pedisellerin füzyonu gözlemlendi (Şekil 57, 58).



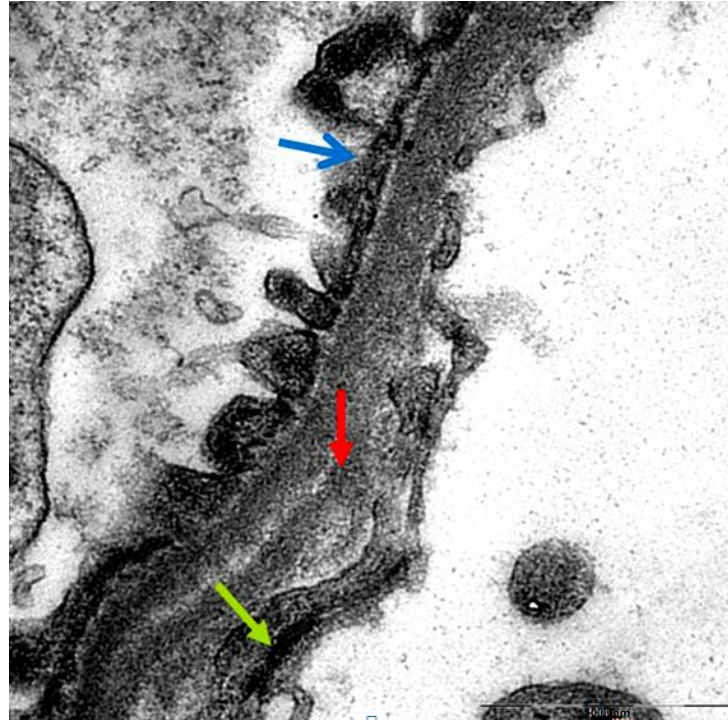
Şekil 55: Kontrol grubunun ince kesiti. GBM (kırmızı ok) ve podosit (mavi ok) yapısının düzenli olduğu gözlenmekte. Scale Bar: 5000 nm.



Şekil 56: Kontrol grubunun ince kesiti. GBM (kırmızı ok) ve podosit (mavi ok) yapısını düzenli olduğu gözlenmekte. Scale bar: 5000 nm.

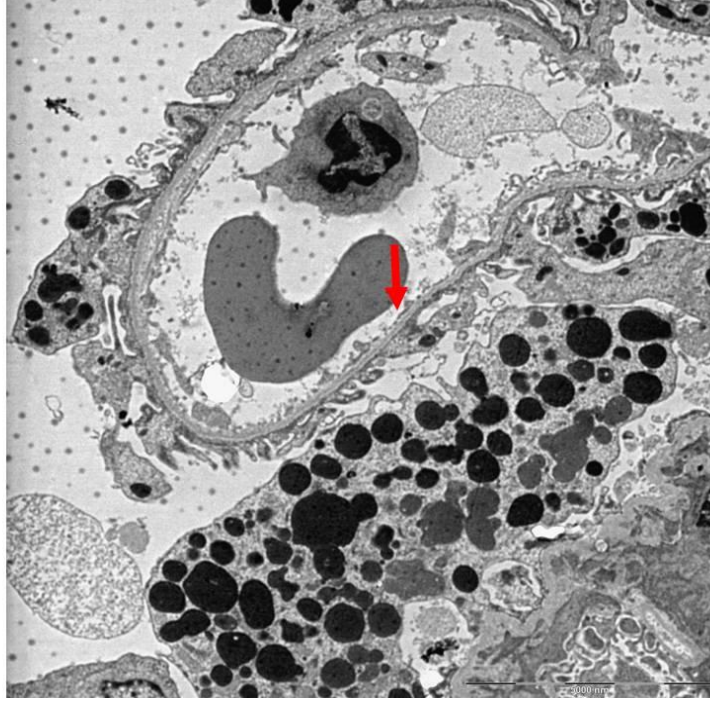


Şekil 57: DM grubu ince kesiti. Glomerüler bazal membranlarda düzensizlik (kırmızı oklar), pedisel kaybı (mavi oklar), subendoteliyal depozitler (yeşil oklar). Scale bar: 2000 nm.

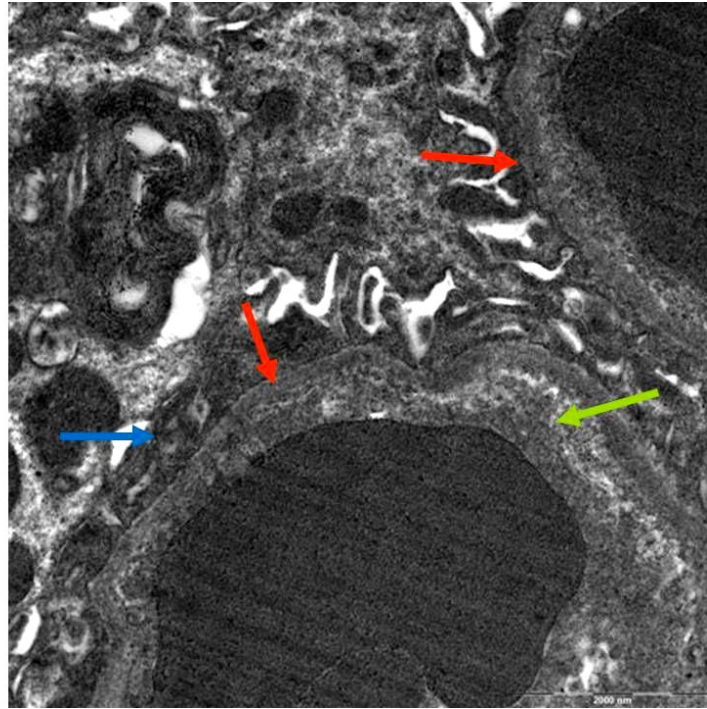


Şekil 58: DM grubu ince kesiti. Glomerüler bazal membranlarda düzensizlik (kırmızı oklar), pedisel kaybı (mavi oklar), subendoteliyal depozitler (yeşil oklar).

5/6Nf grubuna ait bazal membranların kalınlaşması ve düzensizleşmesi, pesidel ve podosit hasarları ve subendoteliyal birikintiler ve intramezengiyal matriks artışı gözlemlendi (Şekil 59,60)

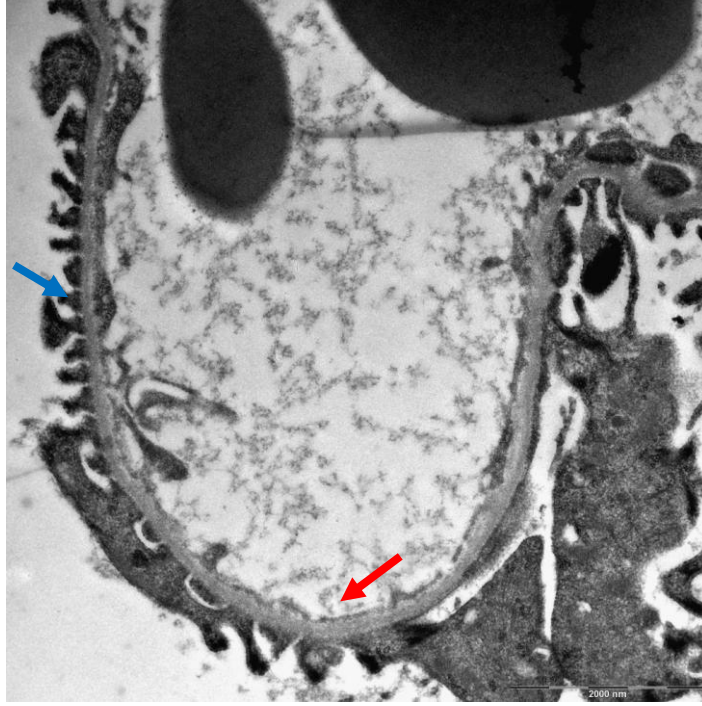


Şekil 59: 5/6 Nf grubu ince kesiti. Bazal membran düzensizlikleri (kırmızı ok). Scale bar: 5000 nm.

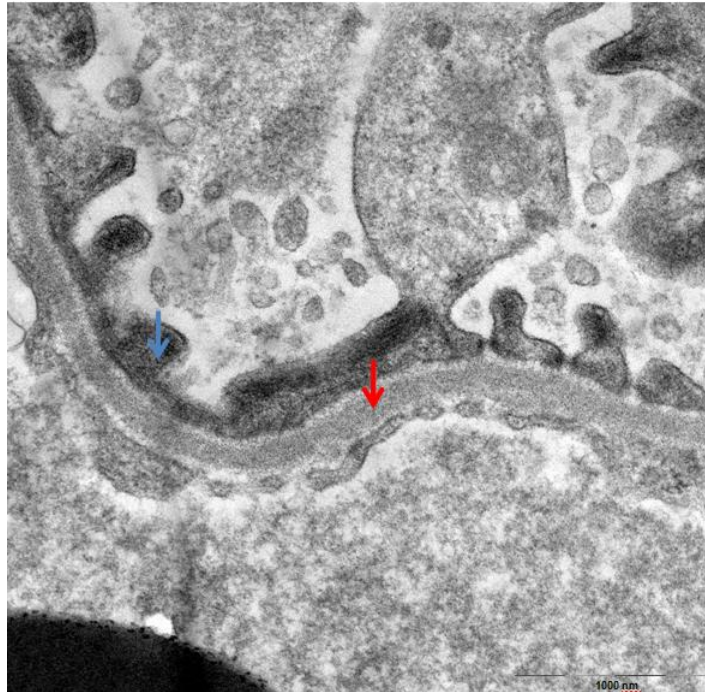


Şekil 60: 5/6 Nf grubu ince kesiti. Glomerüler bazal membranlarda düzensizlik (kırmızı oklar), pesisel kaybı (mavi oklar), subendoteliyal depozitler (yeşil oklar). Scale bar: 2000 nm.

LA grubuna ait böbrek kesitlerinin ince yapıları incelendiğinde; normal görünümde GBM ve podosit yapıları gözlemlendi (Şekil 61, 62).

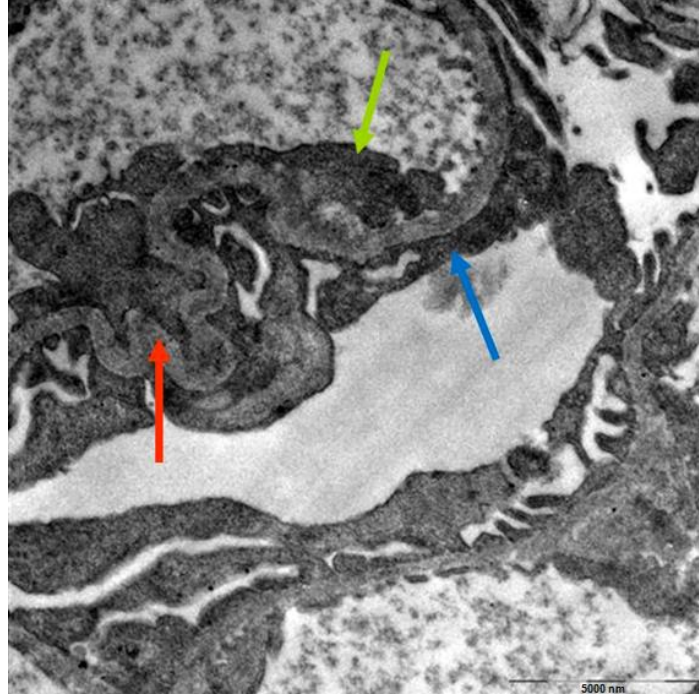


Şekil 61: LA grubu ince kesiti. GBM (kırmızı ok) ve podosit (mavi ok) yapısının düzenli olduğu gözlenmekte. Scale bar:2000 nm.

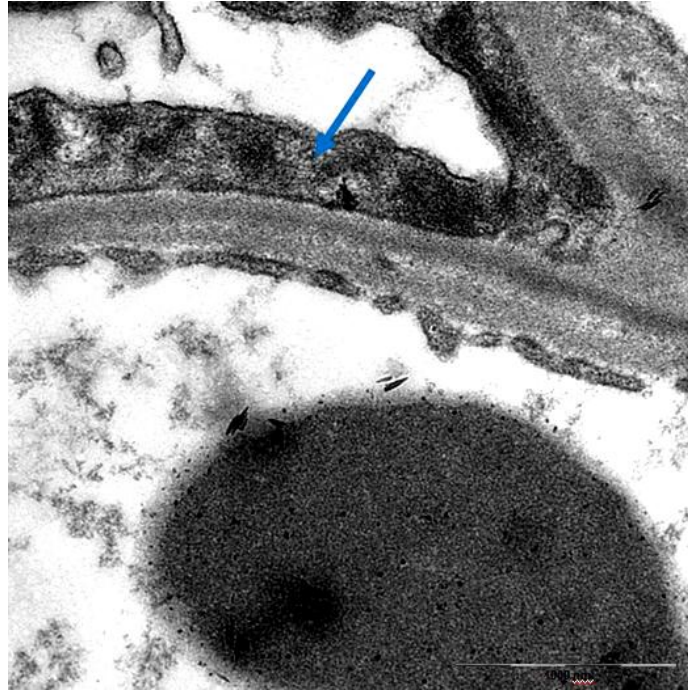


Şekil 62: LA grubunun ince kesitinde GBM (kırmızı ok) ve podosit (mavi ok) yapısını düzenli olduğu gözlenmekte. Scale bar: 1000 nm.

5/6Nf +DM grubunda, bazal membranların kalınlaşması ve düzensizleşmesi, pesidel ve podosit hasarları ve subendoteliyal birikintiler gözlemlendi (Şekil 63, 64).

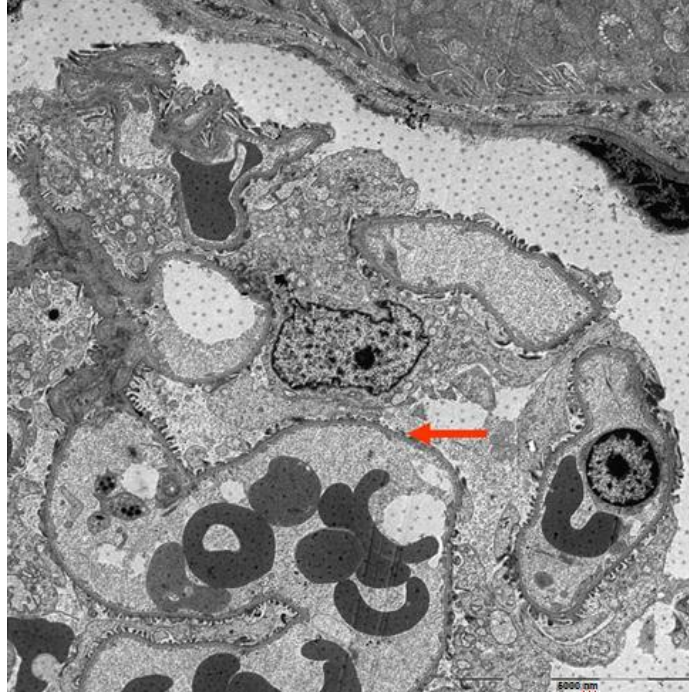


Şekil 63: 5/6 Nf+DM grubu ince kesiti. Glomerüler bazal membranlarda düzensizlik (kırmızı oklar), pedisel kaybı (mavi oklar), subendoteliyal depozitler (yeşil oklar). Scale bar: 5000 nm

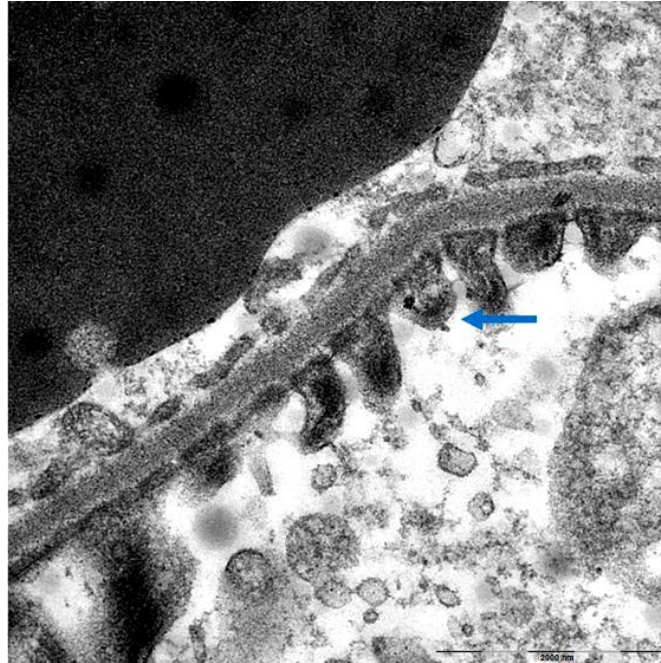


Şekil 64: 5/6 Nf+DM grubu ince kesiti. Pedisellerde füzyon gözlenmekte (mavi ok). Scale bar: 1000 nm

DM+LAT grubunda; kontrol grubuna benzer şekilde düzenli GBM ve pedisel yapısı gözlemlendi (Şekil 65, 66).

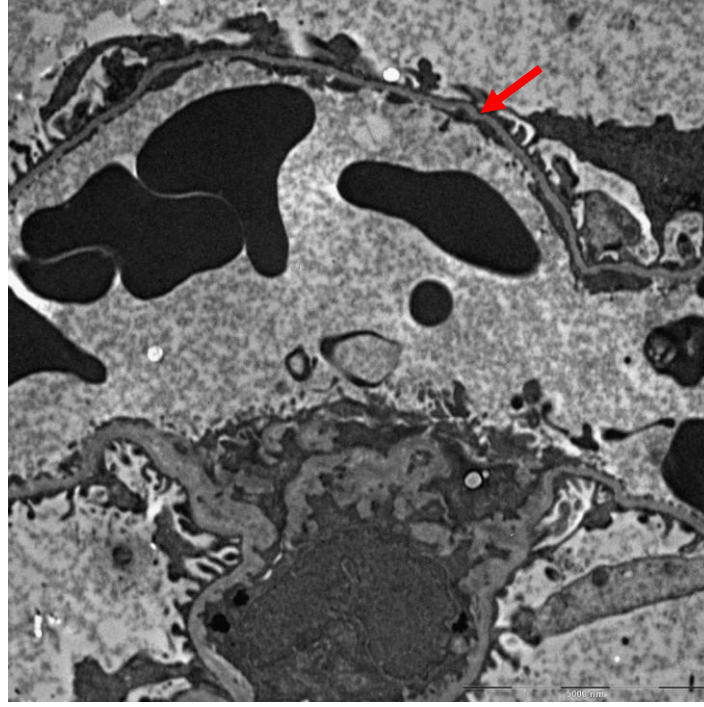


Şekil 65: DM+LAT grubu ince kesiti. Düzgün yapıya sahip GBM (kırmızı ok). Scale bar: 5000 nm

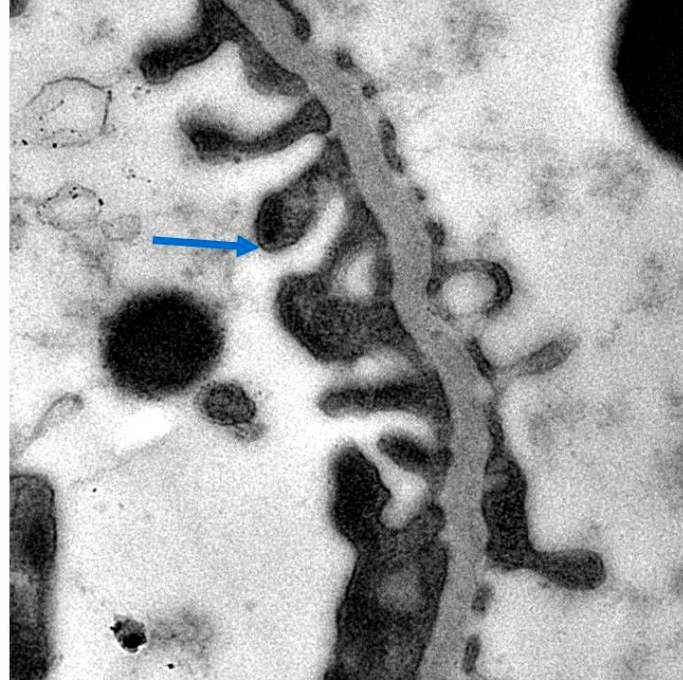


Şekil 66: DM+LAT grubu ince kesiti. Podosit yapısının düzgün olduğu gözlenmekte (mavi ok). Scale bar: 2000

5/6Nf +LAT grubunda, düzenli yapıya sahip GBM ve pedisel yapısı gözlendi (Şekil 67, 68).

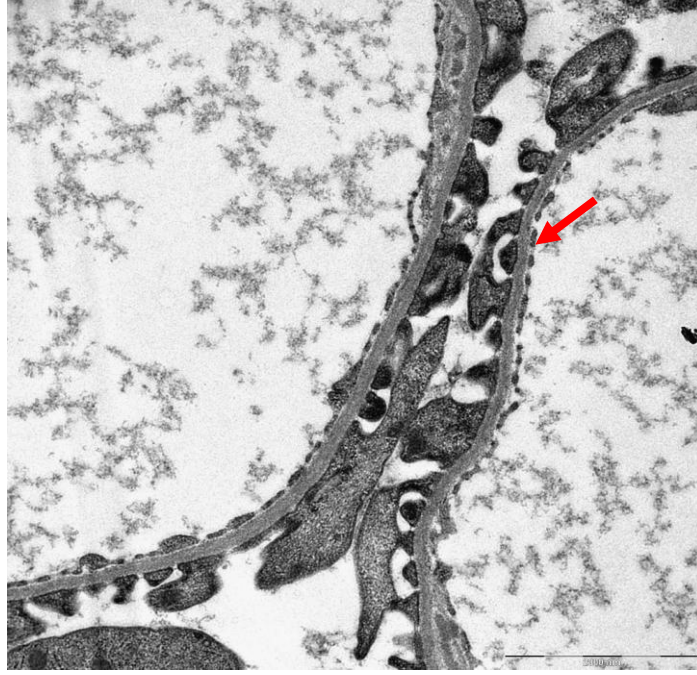


Şekil 67: 5/6 Nf+LAT grubu ince kesiti. Düzgün GBM yapısı gözlenmekte (kırmızı ok).
Scale bar: 5000 nm



Şekil 68: 5/6 Nf +LAT grubu ince kesiti. Podosit yapısının normal olduğu gözlenmekte (mavi ok).
Scale bar:

5/6Nf +DM+LAT grubunda, düzenli yapıya sahip GBM ve pedisel yapısı gözlemlendi (Şekil 69, 70)



Şekil 69: 5/6 Nf+DM+LAT grubu ince kesiti. Podosit ve GBM yapısının normal olduğu gözlenmekte (kırmızı ok).



Şekil 70: 5/6 Nf+DM+LAT grubu ince kesiti. Podosit (mavi ok) ve GBM yapısının (kırmızı ok) normal olduğu gözlenmekte.

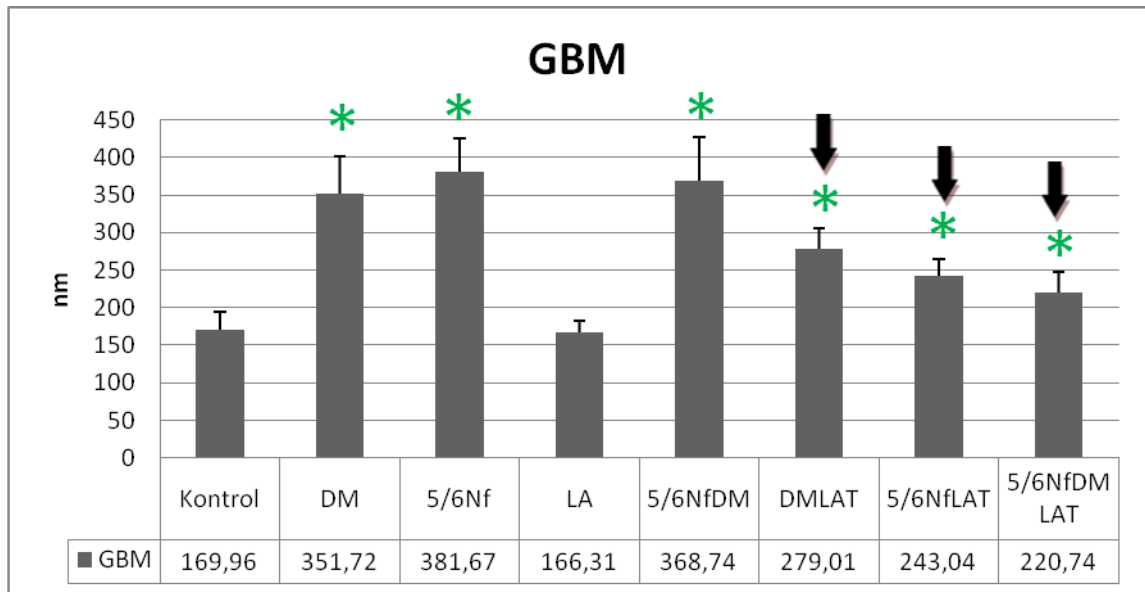
5.4.1 Elektron mikroskopik (Ultrastrüktürel) olarak GBM ve BDY Kalınlık Ölçümleri

GBM ve BDY kalınlıkları 10000 büyütmede değerlendirildi.

GBM Ölçümleri

Kontrol grubunda **169.9±23.9 nm**, DM grubunda **351.7±50.2 nm**, 5/6 Nf grubunda **381.6±43.1 nm**, LA grubunda **166.3±16.4 nm**, 5/6Nf+DM grubunda **368.7±57.9 nm**, DM+LAT grubunda **279.01±26.5 nm**, 5/6Nf+LAT grubunda **243.04±21.4 nm**, 5/6Nf+DM+LAT grubunda **220.7±27.3 nm** olarak saptandı (Şekil 71). One Way Anova non parametrik testi uygulandı. Tüm gruplar arasında anlamlı fark gözlemlendi ($p<0.05$). Post-hoc Bonferroni testi ile gruplar arası farklılıklar değerlendirildi.

- ❖ LA grubu hariç ($p=1.000$) tüm gruplarda GBM kalınlığı kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış bulundu (sırasıyla $p=0.00$ $p=0.00$, $p=0.00$, $p=0.03$).
- ❖ DM grubu ile DM+LAT grubunu karşılaştırdığımızda anlamlı farklılık azalma gözlemlendi ($p=0.001$) (Siyah ok).
- ❖ 5/6Nf grubu 5/6Nf+LAT grubunu karşılaştırdığımızda 5/6Nf+LAT grubunda intersitisiyel fibrozis alanında anlamlı azalma olduğu gözlemlendi. ($p=0,00$) (Siyah ok).
- ❖ 5/6Nf+DM ve 5/6Nf+DM+LAT grubunu karşılaştırdığımızda 5/6Nf+DM+LAT grubunda renal skar alanında anlamlı azalma olduğu gözlemlendi. ($p=0,00$) (Siyah ok).

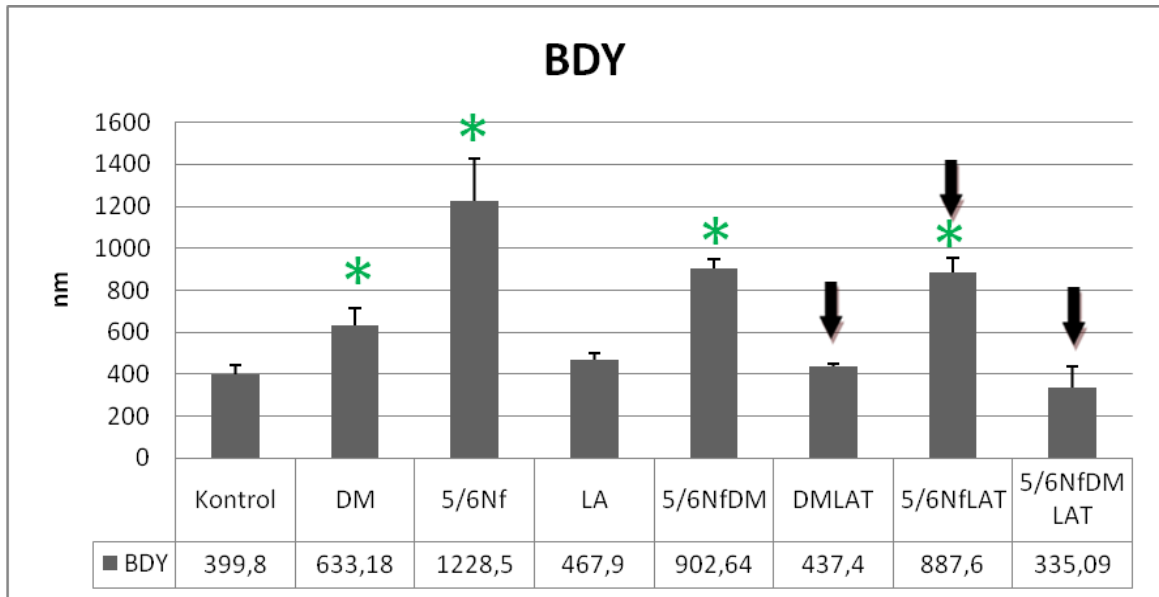


Şekil 71: GBM kalınlığı (EM) . *: Anlamlı artış ↓: Anlamlı azalma

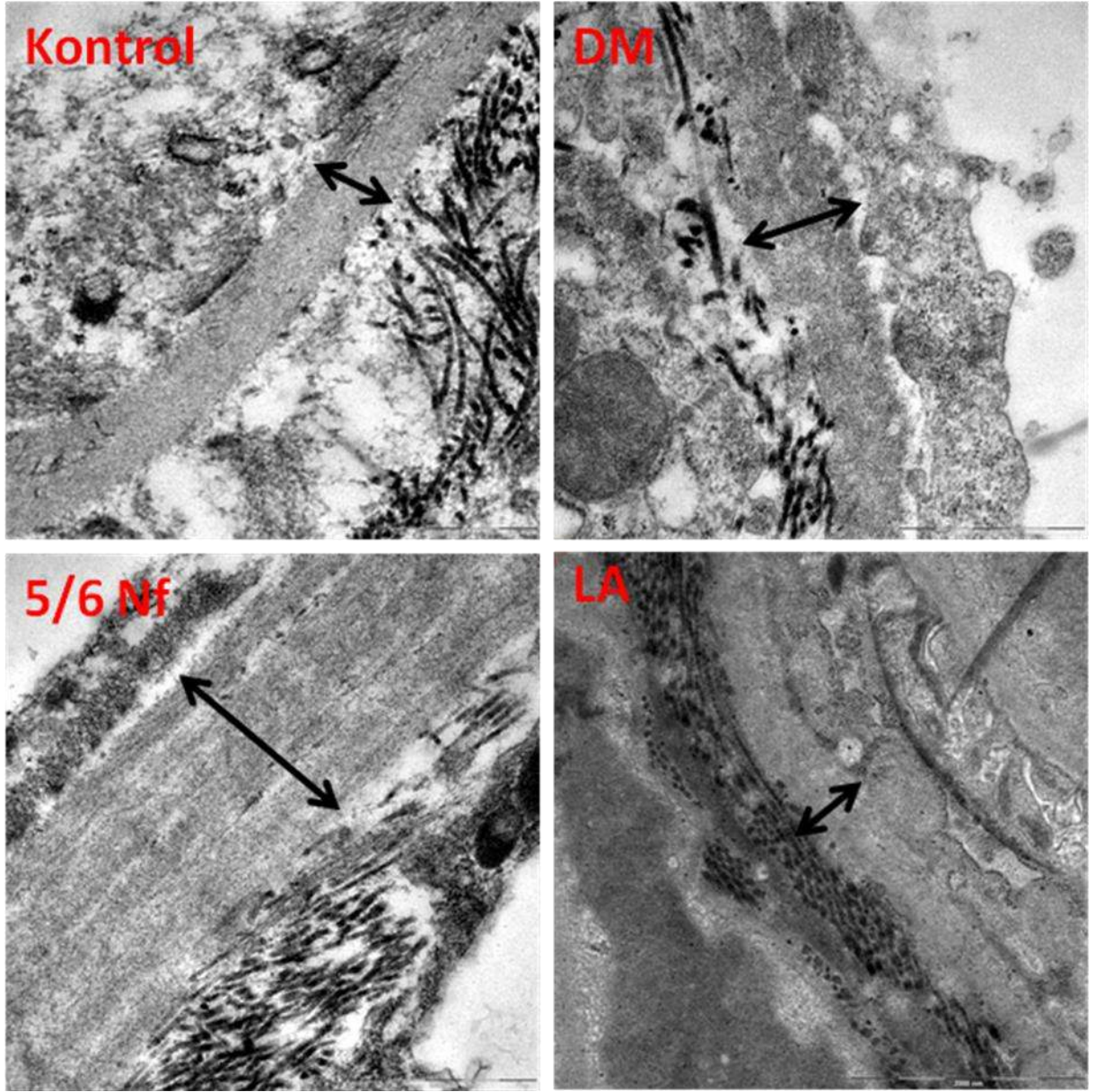
BDY Kalınlık Ölçümleri

Kontrol grubunda **399.8±40.5 nm**, DM grubunda **633.1±79.8 nm**, 5/6 Nf grubunda **1228.5±201.8 nm**, LA grubunda **467.9±31.5 nm**, 5/6Nf+DM grubunda **902.6±46.2 nm**, DM+LAT grubunda **437.4±14.6 nm**, 5/6Nf+LAT grubunda **887.6±66.1 nm**, 5/6Nf+DM+LAT grubunda **335.09±99.2 nm** olarak saptandı (Şekil 72, 73, 74). One Way Anova non parametrik testi uygulandı. Tüm gruplar arasında anlamlı fark gözlemlendi ($p<0.05$). Post-hoc Bonferroni testi ile gruplar arası farklılıklar değerlendirildi.

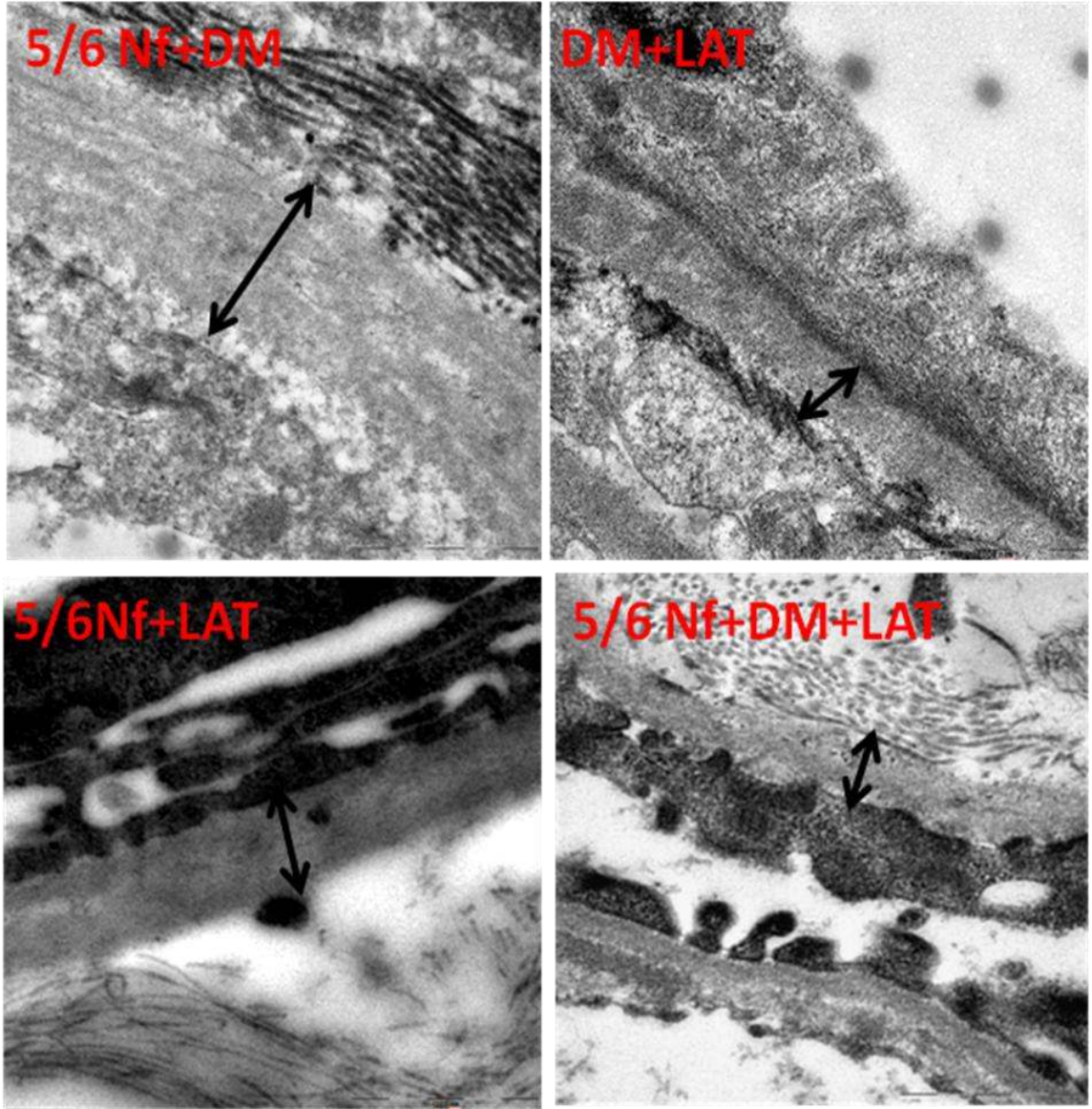
- ❖ Kontrol grubu ile DM, LA ve DM+LAT ve 5/6Nf+DM+LAT grupları arasında BDY kalınlığı anlamlı fark göstermedi ($p=1.000$).
- ❖ DM grubu ile DM+LAT grubunu karşılaştırdığımızda anlamlı azalma gözlemlendi ($p=0.02$).
- ❖ 5/6Nf grubu 5/6Nf+LAT grubunu karşılaştırdığımızda anlamlı azalma gözlemlendi ($p=0.000$).
- ❖ 5/6Nf+DM ve 5/6Nf+DM+LAT grubunu karşılaştırdığımızda 5/6Nf+DM+LAT grubunda anlamlı azalma olduğu gözlemlendi. ($p=0,00$) (Siyah ok).



Şekil 72: BDY kalınlık ölçümü (EM). *: Anlamlı artış, ↓: Anlamlı azalma



Şekil 73: BDY kalınlıklarının ultrastrüktürel görüntüleri. Kontrol, DM, 5/6Nf ve LA grupları. Oklar BDY yapılarını göstermekte. Scale bar: 1000 nm.



Şekil 74: BDY kalınlıklarının ultrastrüktürel görüntüleri. 5/6Nf+DM, DM+LAT, 5/6Nf+LAT, 5/6Nf+DM+LAT grupları. Oklar BDY yapılarını göstermekte. Scale bar: 1000 nm

5.5 İmmunohistokimyasal Bulgular

İmmunohistokimyasal boyanmalar semikuantitatif yöntemle kortekste, tübülointersitisiyel boyanma ve glomerüler boyanma olarak ayrı ayrı değerlendirildi (Şekil75-82).

Tübülointersitisiyel ve glomerüler değerlendirilmede:

- 0:** boyanma yok,
- 1:** az boyanma,
- 2:** orta boyanma,
- 3:** şiddetli boyanma olarak değerlendirildi.

AT1 İmmunohistokimyası Sonuçları:

AT1 immunohistokimyasının sonuçlarına bakıldığında ANOVA testine göre tüm gruplar arasında anlamlı fark gözlemlendi ($p<0,005$). Post-hoc Bonferroni testi değerlendirmelerinde, Kontrol, LA, DM+LAT, 5/6Nf+LAT ve 5/6Nf+DM+LAT grupları arasında tübülointersitisiyel ve glomerüler AT1 boyanmaları arasında anlamlı fark gözlemlenmedi ($p>0.00$) (Tablo 10) (Şekil 73-80).

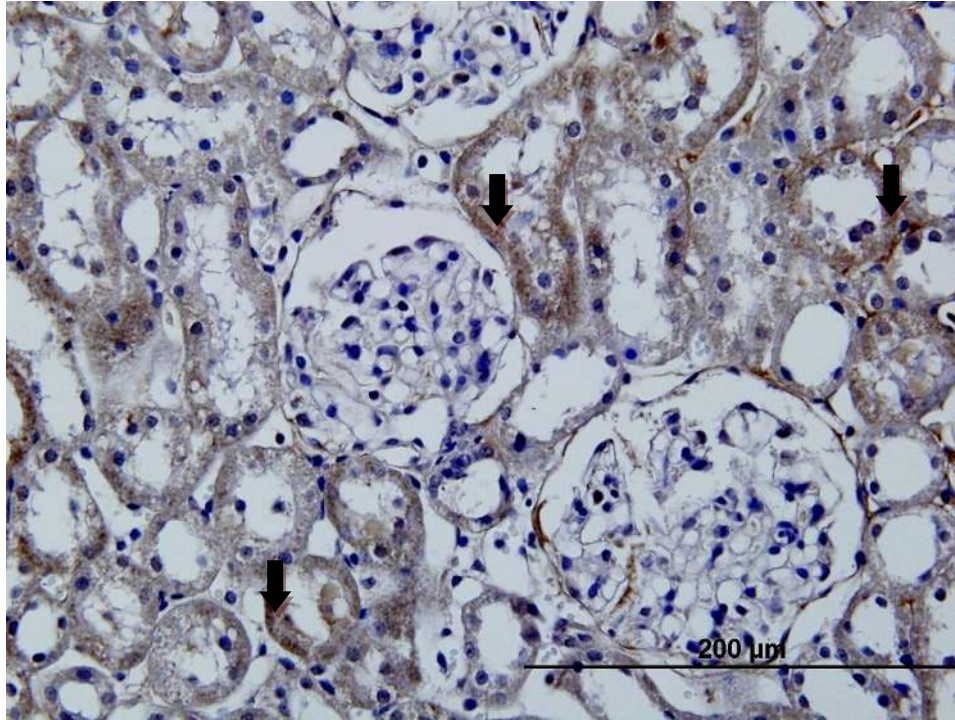
- DM, 5/6Nf ve 5/6Nf+DM grupları kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olarak gözlemlendi.
- DM grubu ve DM+LAT grubu karşılaştırıldığında DM+LAT grubu anlamlı olarak düşüktü ($p<0,05$).
- 5/6 Nf grubu ve 5/6Nf+LAT grubu karşılaştırıldığında 5/6Nf+LAT grubu anlamlı olarak düşüktü ($p<0,05$).
- 5/6 Nf+DM grubu ve 5/6Nf+DM+LAT grubu karşılaştırıldığında 5/6Nf+DM+LAT grubu anlamlı olarak düşüktü ($p<0,05$) (ANOVA, post-hoc Bonferroni testi).

Tablo 10: AT1 immunohistokimyası değerlendirilmesi

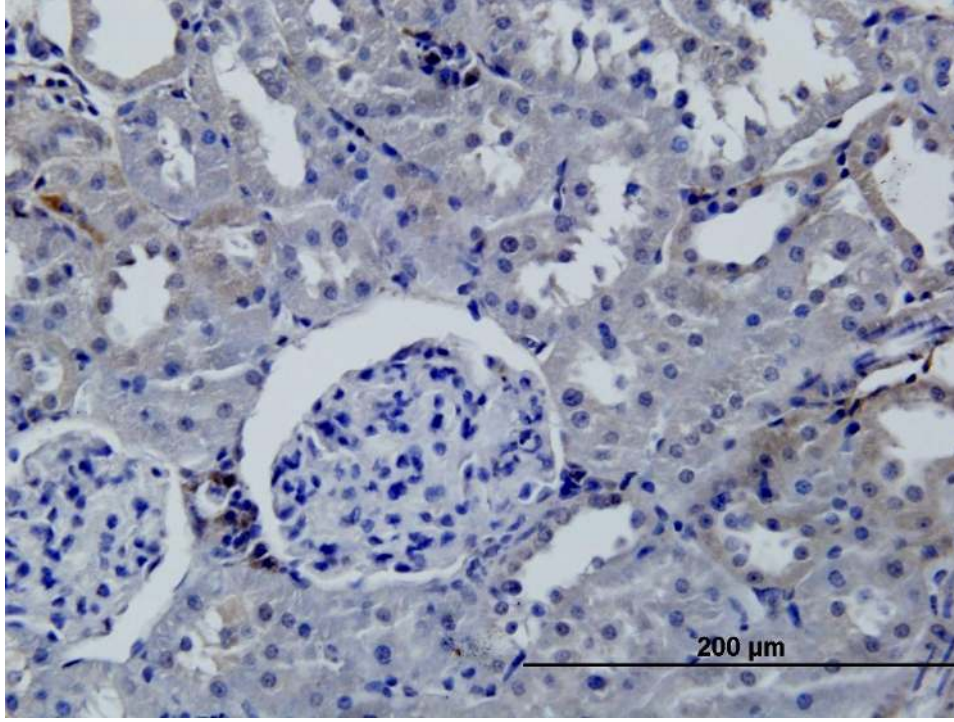
	Tübülointersitisiyel AT1	Glomerüler AT1
	Ort±SS	Ort±SS
Kontrol	1.87± 0.64	1.37± 0.51

DM	0.50± 0.54 ₺	0.16± 0.40 ₺
5/6 Nf	0.57± 0.53 ₺	0.28 ±0.48 ₺
LA	1.71± 0.48	0.57 ±0.53
5/6Nf+DM	0.71 ±0.48 ₺	0.57± 0.53 ₺
DM+LAT	1.57± 0.53 *	1.42± 0.53 *
5/6Nf+LAT	1.57± 0.53 *	1.28 ±0.75 *
5/6Nf+DM+ LAT	1.71± 0.48 *	1.14± 0.69 *

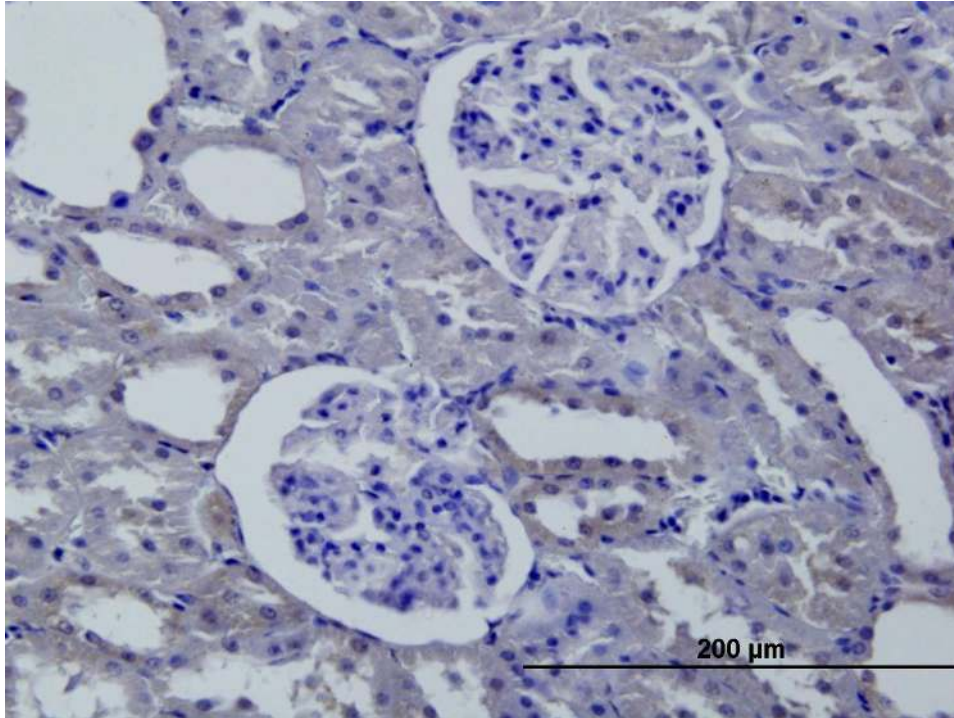
₺: Kontrol grubuna göre anlamlı azalma, *: Deneysel modellerine göre LA uygulanan gruplarda anlamlı artış.



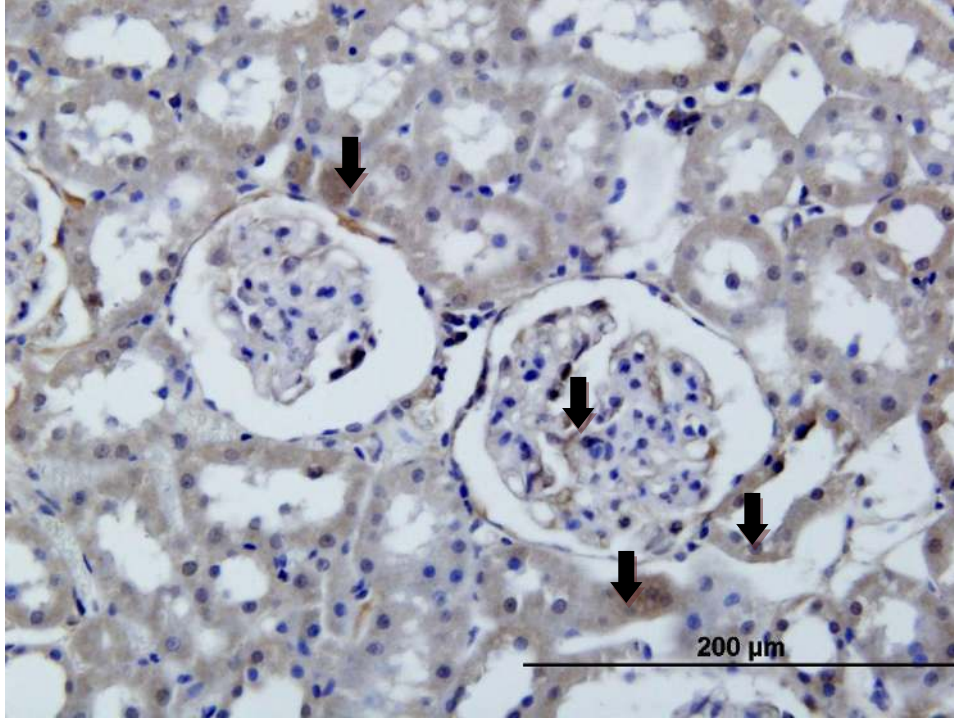
Şekil 75: Kontrol grubu AT1 immunohistokimyası : İmmun pozitif hücreler



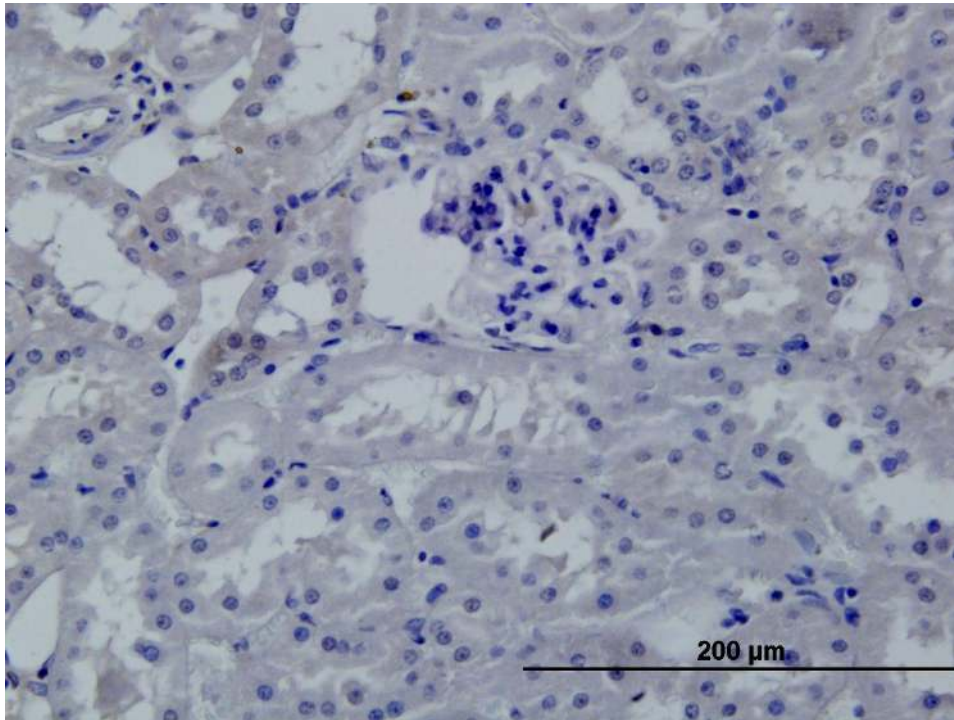
Şekil 76: DM grubu AT1 immunohistokimyası. Zayıf immun boyanma gözlemlendi.



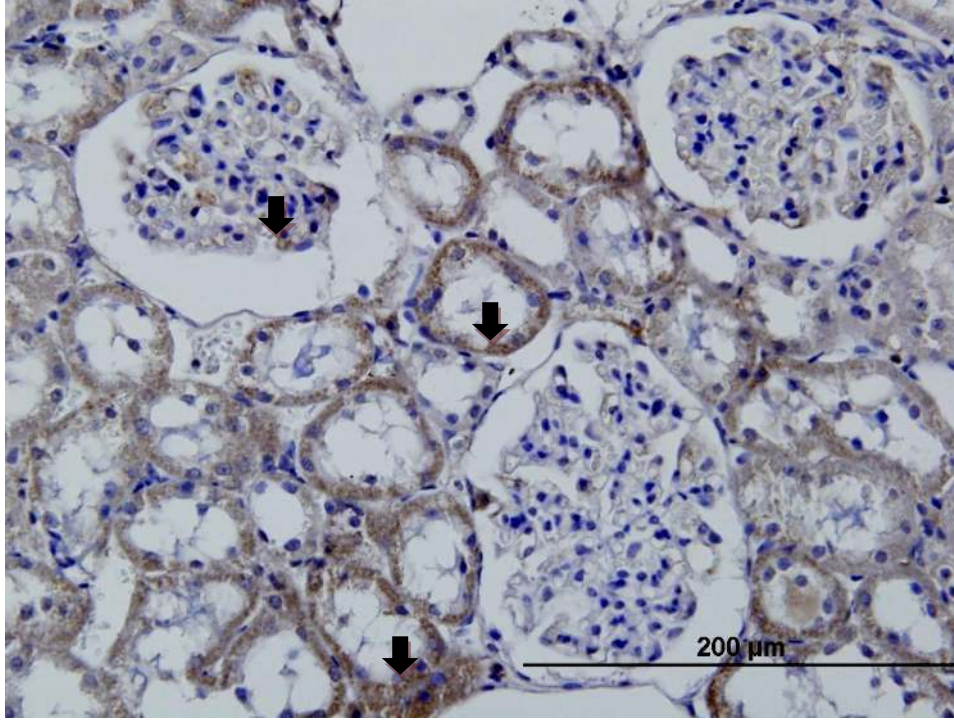
Şekil 77: 5/6Nf grubu AT1 immunohistokimyası. Zayıf immun boyanma gözlemlendi.



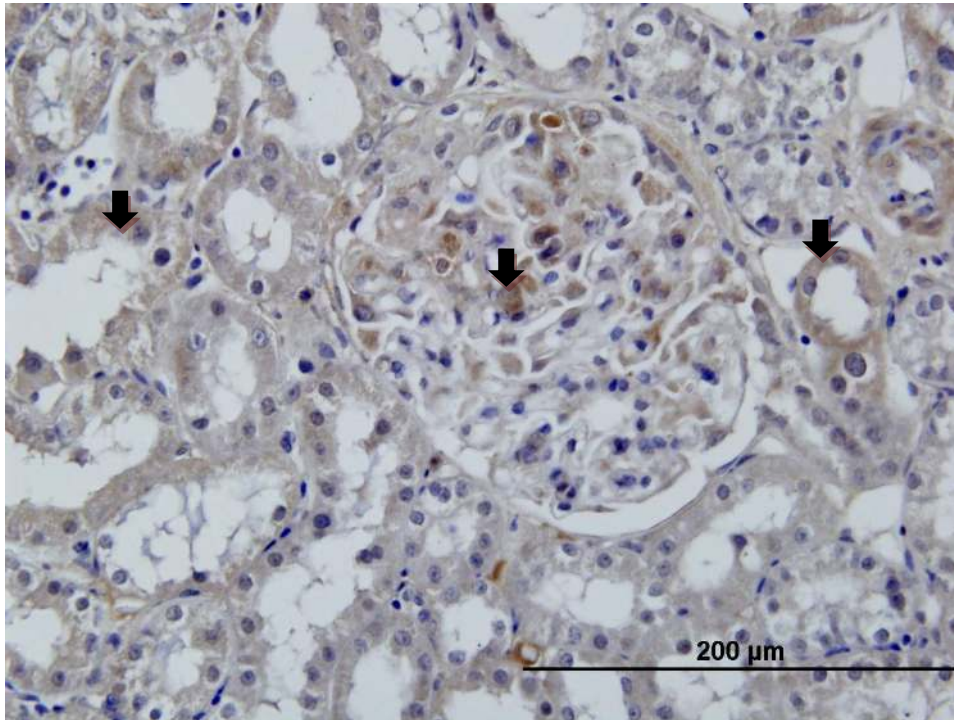
Şekil 78: LA grubu AT1 immunohistokimyası. ↓: İmmun pozitif hücreler



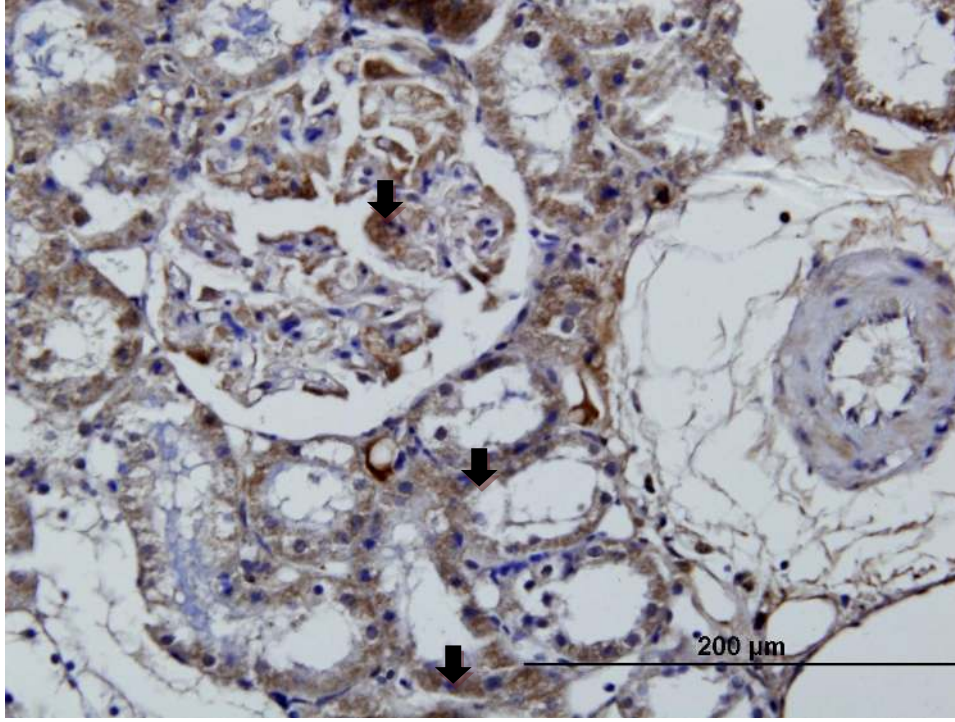
Şekil 79: 5/6Nf+DM grubu AT1 immunohistokimyası. Zayıf immün boyanma gözlemlendi.



Şekil 80: DM+LAT grubu AT1 immunohistokimyası↓: İmmun pozitif hücreler.



Şekil 81: 5/6Nf+LAT grubu AT1 immunohistokimyası↓: İmmun pozitif hücreler.



Şekil 82: 5/6Nf+DM+LAT grubu AT1 immunohistokimyası: İmmun pozitif hücreler.

VEGF İmmunohistokimyası Sonuçları:

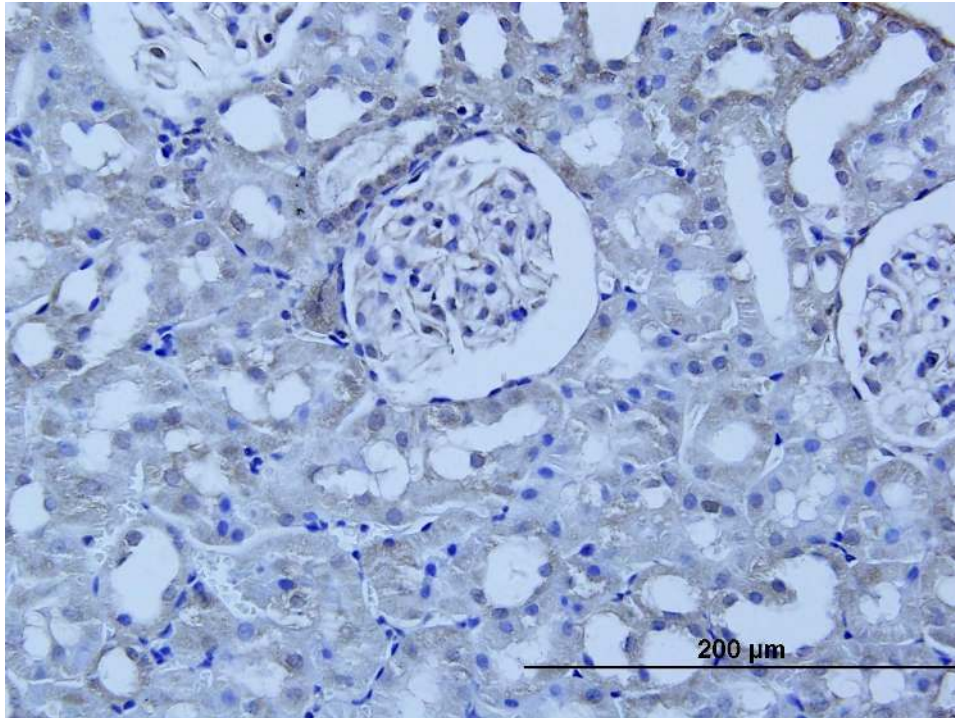
Grupların VEGF boyanmalarının ortalama ve standart sapmaları tablo 12’de özetlendi. ANOVA testine göre tüm gruplar arasında anlamlı fark gözlemlendi ($p < 0,005$) (Tablo 11) (Şekil 83-90). Bu farkın hangi gruplardan kaynaklandığını görmek için yapılan Post-hoc Bonferroni testi değerlendirmelerinde,

- Kontrol grubu ile LA, DM+LAT, 5/6Nf+LAT ve 5/6Nf+DM+LAT grupları arasında tübülointerstisiyel ve glomerüler VEGF boyanmaları arasında anlamlı fark gözlemlenmedi ($p > 0,00$). DM, 5/6Nf ve 5/6Nf+DM grupları kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olarak gözlemlendi ($p < 0,05$). DM grubu ve DM+LAT grubu karşılaştırıldığında DM+LAT grubu anlamlı olarak düşüktü ($p < 0,05$).
- 5/6 Nf grubu ve 5/6Nf+LAT grubu karşılaştırıldığında 5/6Nf+LAT grubu anlamlı olarak düşüktü ($p < 0,05$). 5/6 Nf+DM grubu ve 5/6Nf+DM+LAT grubu karşılaştırıldığında 5/6Nf+DM+LAT grubu anlamlı olarak düşüktü ($p < 0,05$) (ANOVA, post-hoc Bonferroni testi).

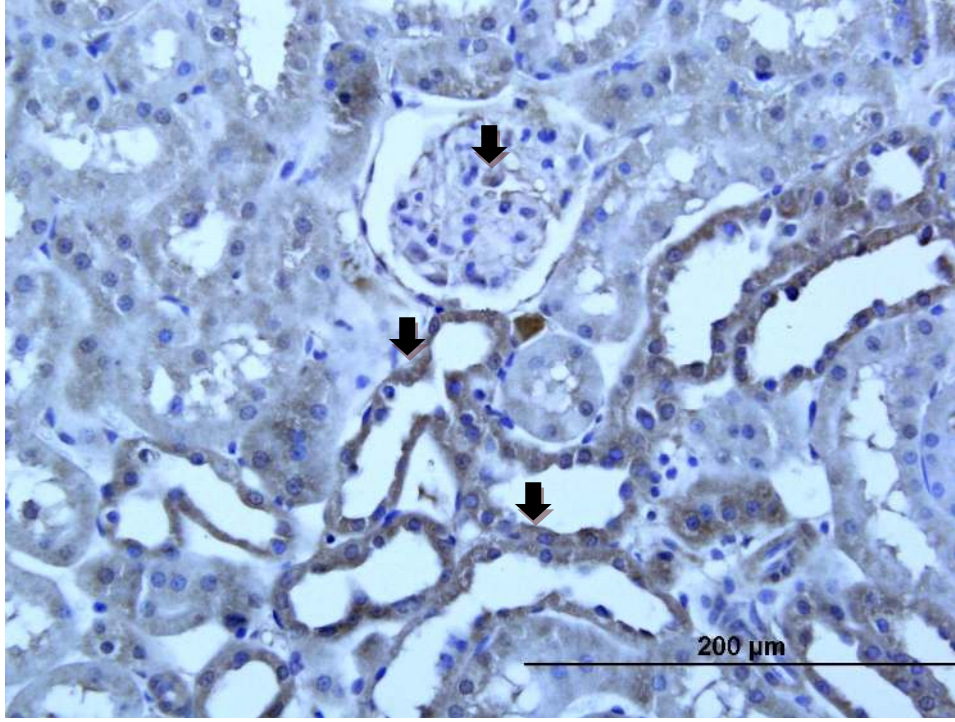
Tablo 11: VEGF immunohistokimyası değerlendirilmesi

	Tübülointersitisiyel VEGF	Glomerüler VEGF
GRUPLAR	Ort±SS	Ort±SS
Kontrol	0,87±0,35	0,50±0,53
DM	2,50±0,54 *	2,50±0,54 *
5/6 Nf	2,28±0,48 *	2,57±0,53 *
LA	0,71±0,48	0,71±0,48
5/6Nf+DM	2,57±0,53 *	2,42±0,53 *
DM+LAT	1,14±0,37 ¥	1,28±0,48 ¥
5/6Nf+LAT	1,28±0,48 ¥	1,28±0,48 ¥
5/6Nf+DM+ LAT	1,28±0,48 ¥	1,28±0,48 ¥

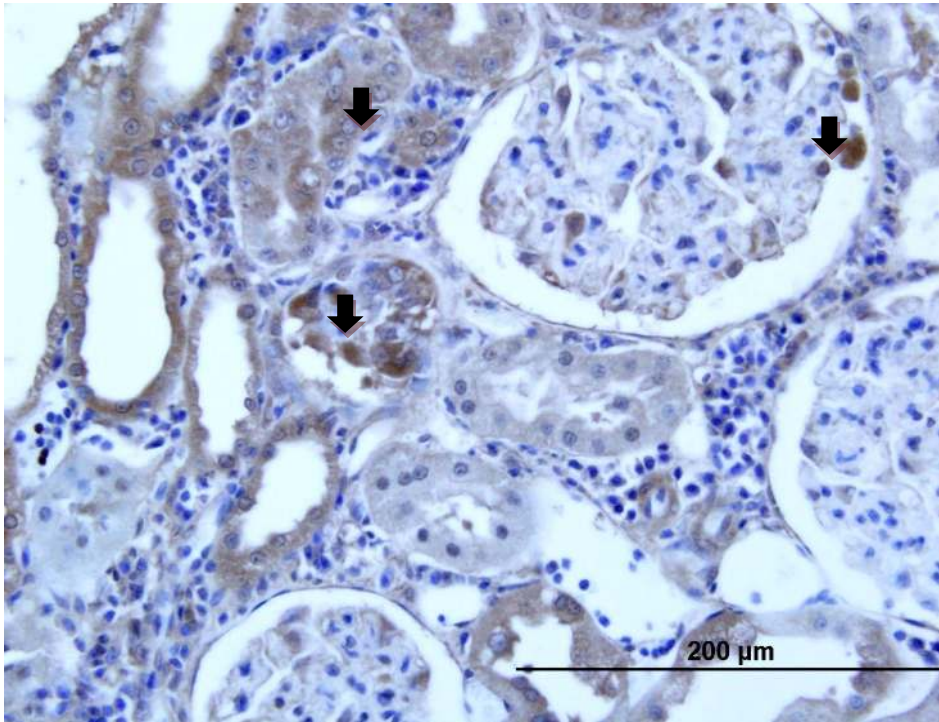
*: Kontrol grubuna göre anlamlı artış, ¥: Deneyisel modellerine göre LA uygulanan gruplarda anlamlı azalma.



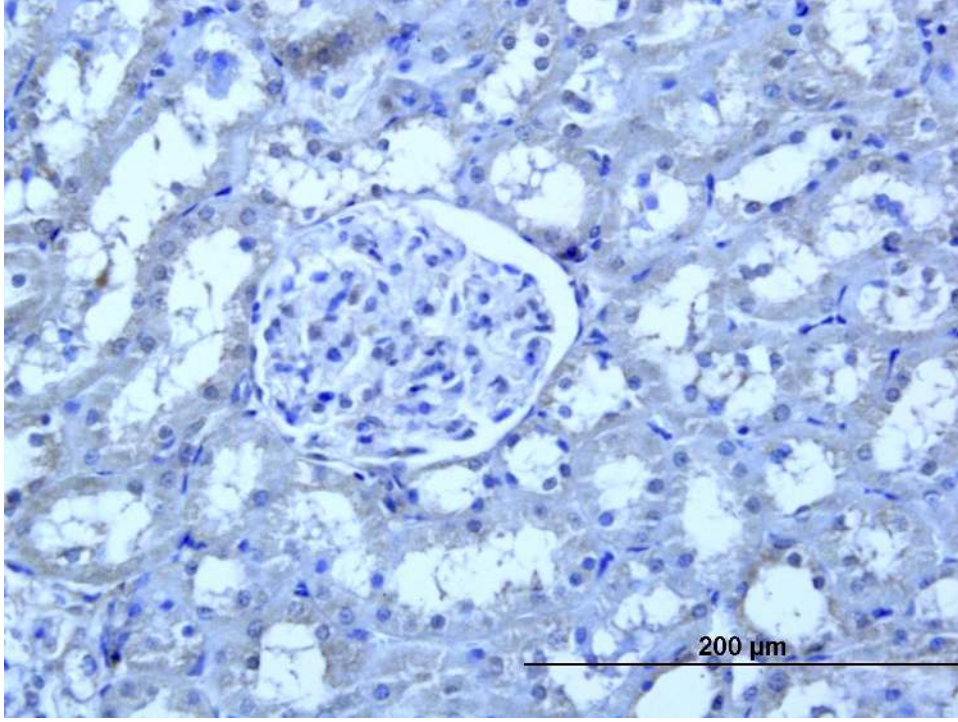
Şekil 83: Kontrol grubu VEGF immunohistokimyası. Zayıf immun boyanma gözlemlendi.



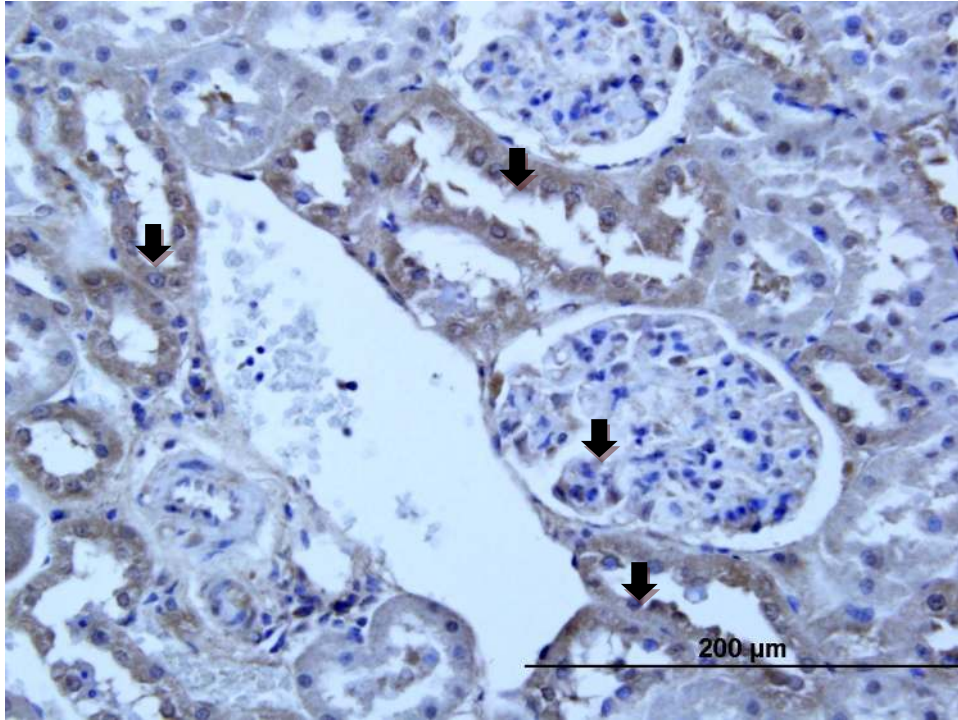
Şekil 84: DM grubu VEGF immunohistokimyası. : İmmun pozitif hücreler.



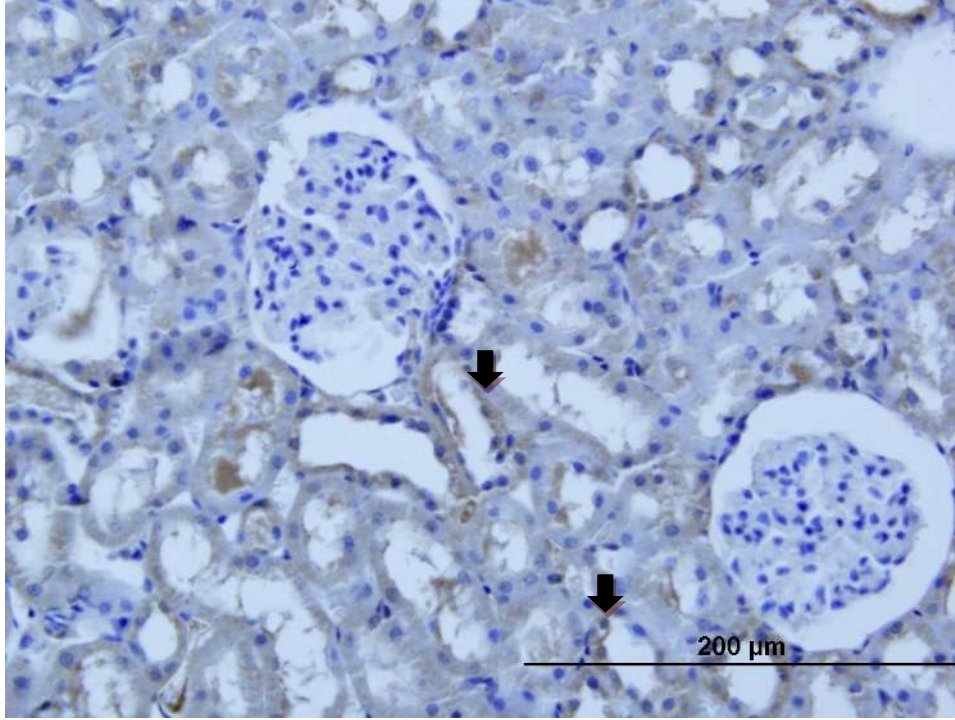
Şekil 85: 5/6Nf grubu VEGF immunohistokimyası. : İmmun pozitif hücreler.



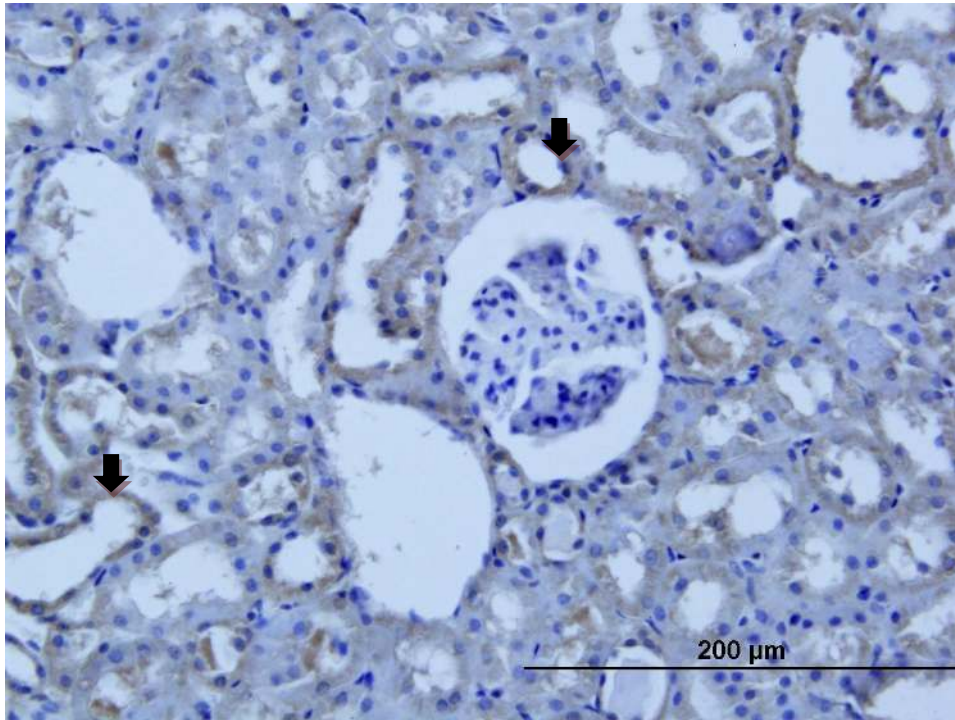
Şekil 86: LA grubu VEGF immunohistokimyası. Zayıf immun boyanma gözlemlendi.



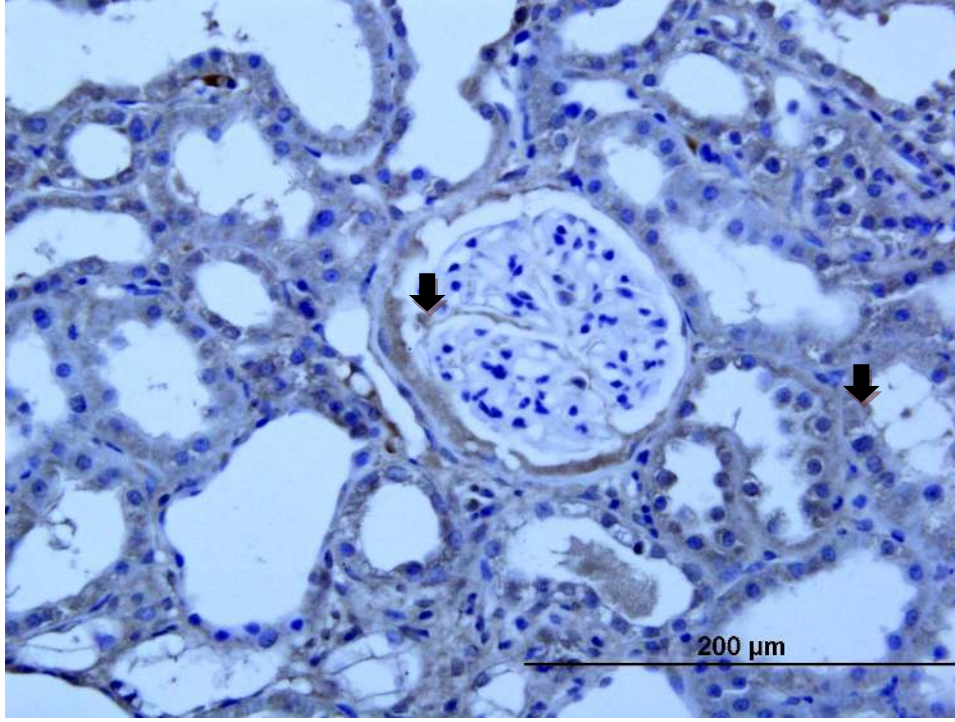
Şekil 87: 5/6 Nf+DM grubu VEGF immunohistokimyası. İmmun pozitif hücreler.



Şekil 88: DM+LAT grubu VEGF immunohistokimyası  :İmmun pozitif hücreler



Şekil 89: 5/6Nf+LAT grubu VEGF immunohistokimya  : İmmun pozitif hücreler



Şekil 90: 5/6Nf+DM+LAT grubu VEGF immunohistokimyası: İmmun pozitif hücreler

ET-1 İmmunohistokimyası Sonuçları:

ET-1 immunohistokimyasının sonuçlarına bakıldığında ANOVA testine göre tüm gruplar arasında anlamlı fark gözlemlendi ($p < 0,005$). Post-hoc Bonferroni testi değerlendirmelerinde, Kontrol grubu ile LA, DM+LAT, 5/6Nf+LAT ve 5/6Nf+DM+LAT grupları arasında tübülointerstisiyel ve glomerüler ET-1 boyanmaları arasında anlamlı fark gözlenmedi ($p > 0,00$) (Tablo 12) (Şekil 91-98).

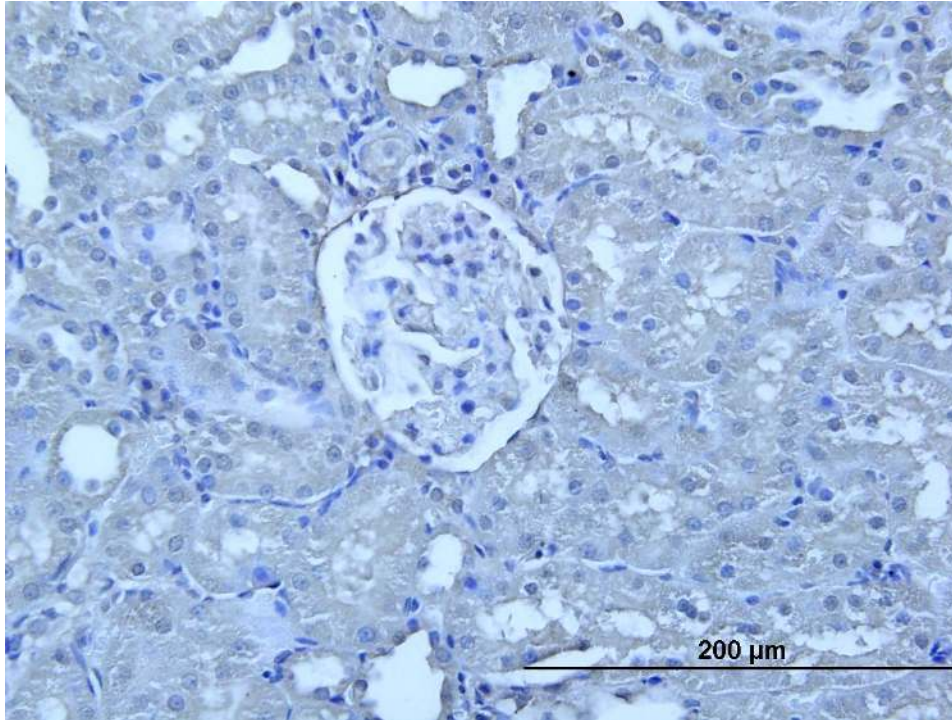
- DM, 5/6Nf ve 5/6Nf+DM grupları kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olarak gözlemlendi.
- DM grubu ve DM+LAT grubu karşılaştırıldığında DM+LAT grubu anlamlı olarak düşüktü ($p < 0,05$).
- 5/6 Nf grubu ve 5/6Nf+LAT grubu karşılaştırıldığında 5/6Nf+LAT grubu anlamlı olarak düşüktü ($p < 0,05$).

- 5/6 Nf+DM grubu ve 5/6Nf+DM+LAT grubu karşılaştırıldığında 5/6Nf+DM+LAT grubu anlamlı olarak düşüktü ($p<0,05$) (ANOVA, post-hoc Bonferroni testi).

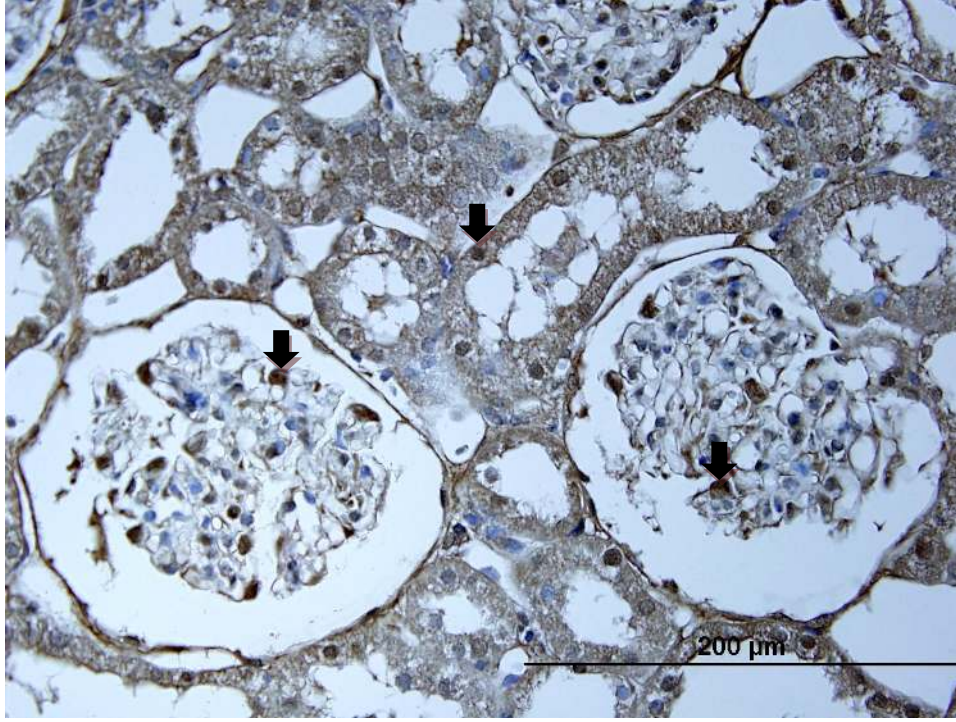
Tablo 12: ET-1 immunohistokimyası değerlendirilmesi

	Tübülointersitisiyel ET-1	Glomerüler ET-1
	Ort±SS	Ort±SS
Kontrol	0,50±0,53	0,62 ±0,51
DM	2,50±0,54 *	2,33 ±0,51 *
5/6 Nf	2,14±0,37 *	2,42 ±0,53 *
LA	0,42±0,53	0,71 ±0,48
5/6Nf+DM	2,42±0,53 *	2,28 ±0,48 *
DM+LAT	1,28±0,48 ¥	1,28 ±0,48 ¥
5/6Nf+LAT	1,28±0,75 ¥	1,42 ±0,53 ¥
5/6Nf+DM+ LAT	1,42±0,53 ¥	1,28±0,48 ¥

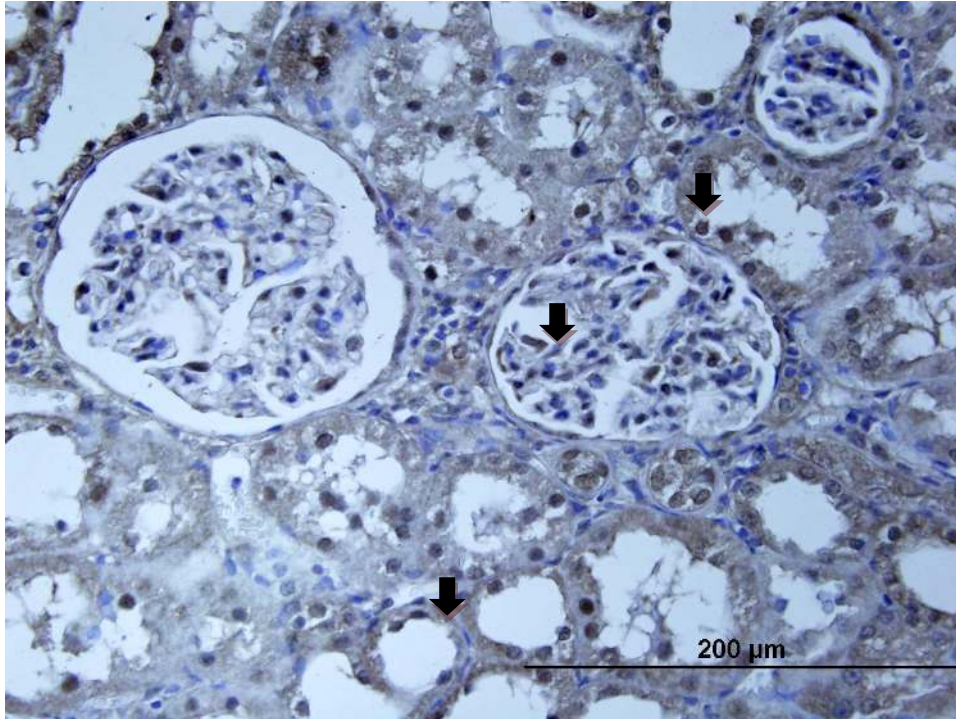
*: Kontrol grubuna göre anlamlı artış, ¥: Deneysel modellerine göre LA uygulanan gruplarda anlamlı azalma.



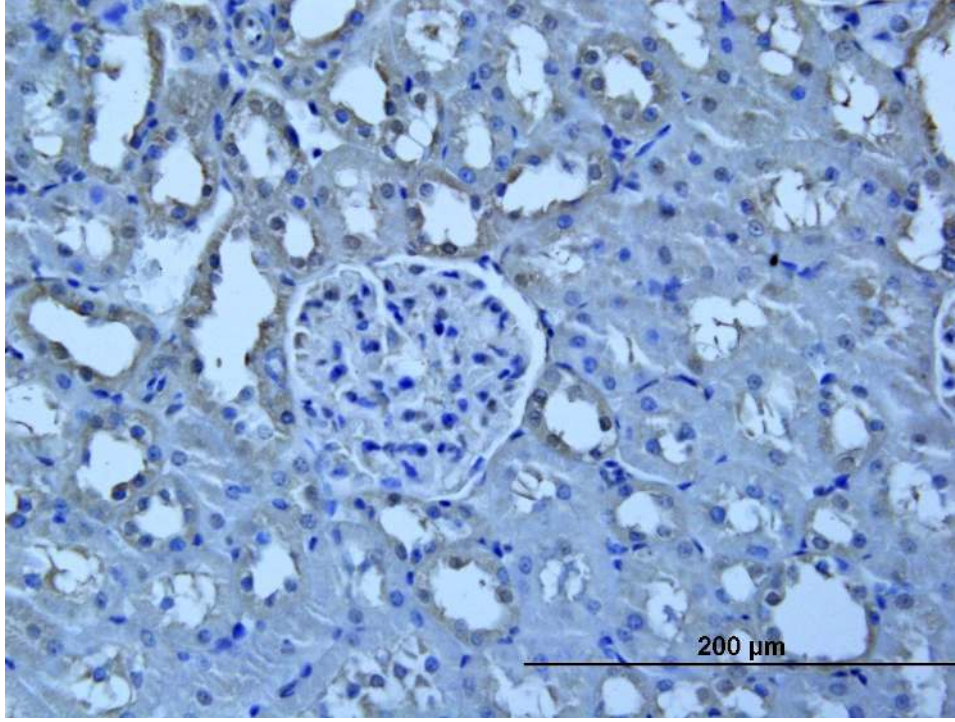
Şekil 91: Kontrol grubu ET-1 immunohistokimyası. Zayıf immun boyanma gözlemlendi.



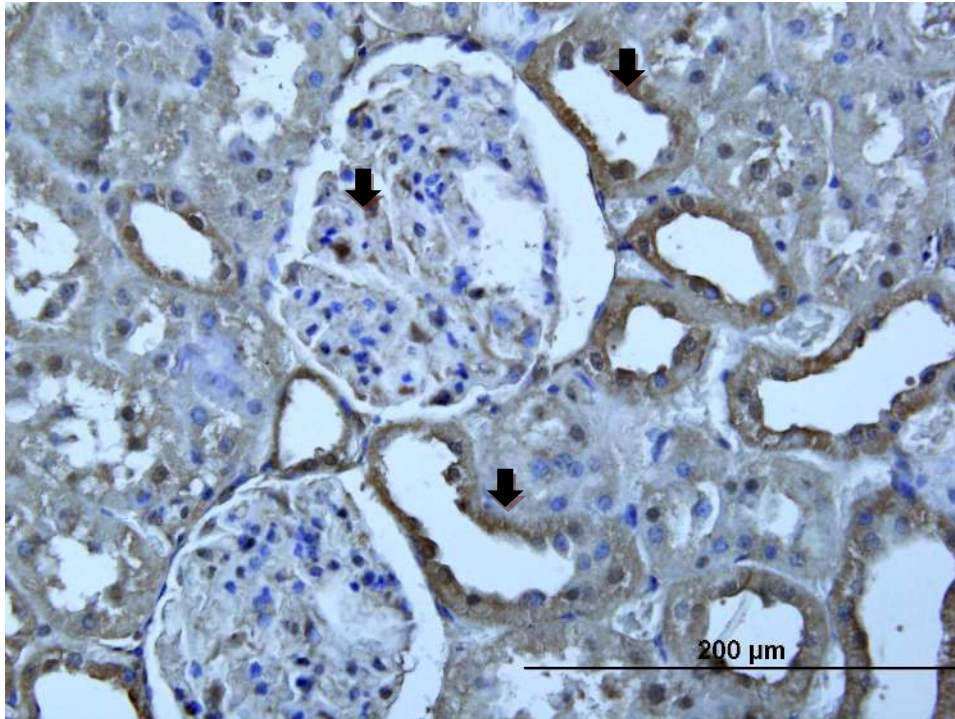
Şekil 92: DM grubu ET-1 immunohistokimyası.↓: İmmun pozitif hücreler.



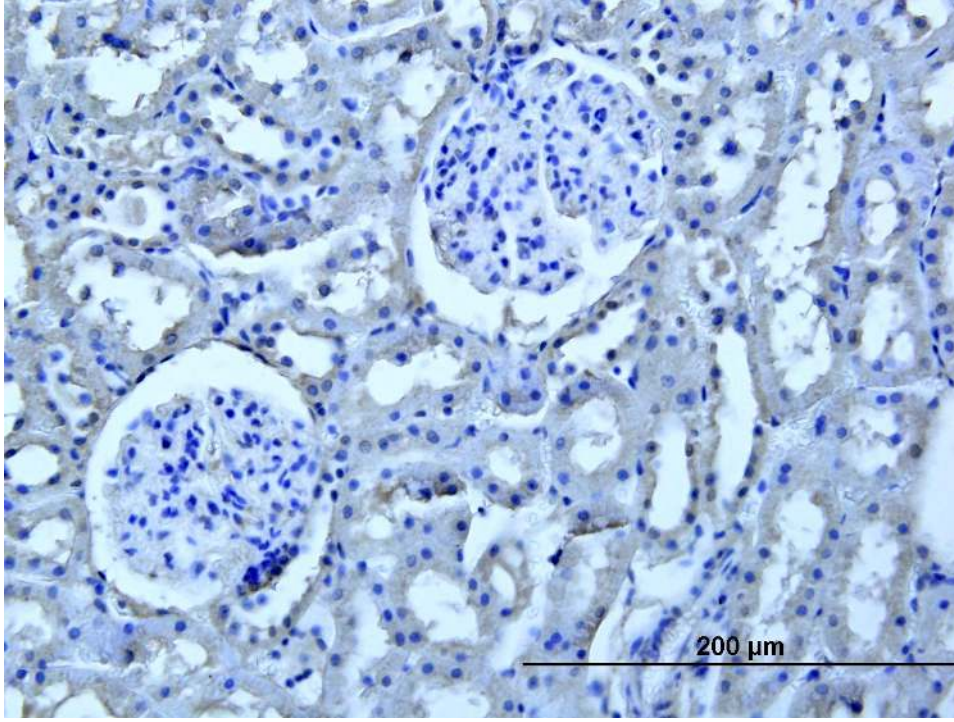
Şekil 93: 5/6Nf grubu ET-1 immunohistokimyası.↓: İmmun pozitif hücreler.



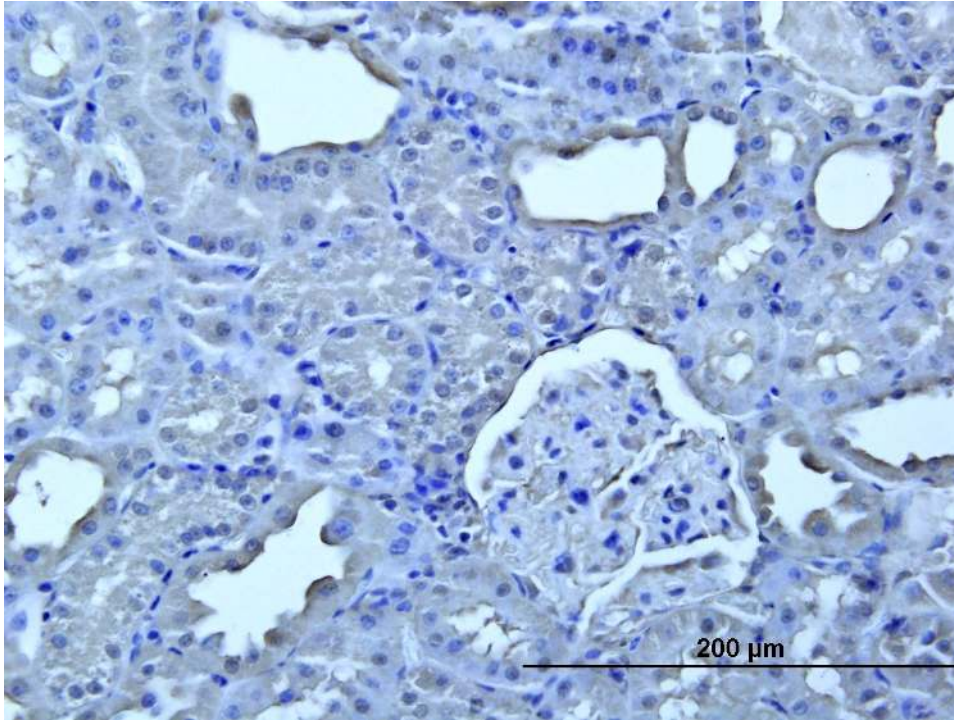
Şekil 94: LA grubu ET-1 immunohistokimyası. Zayıf immün boyanma gözlemlendi.



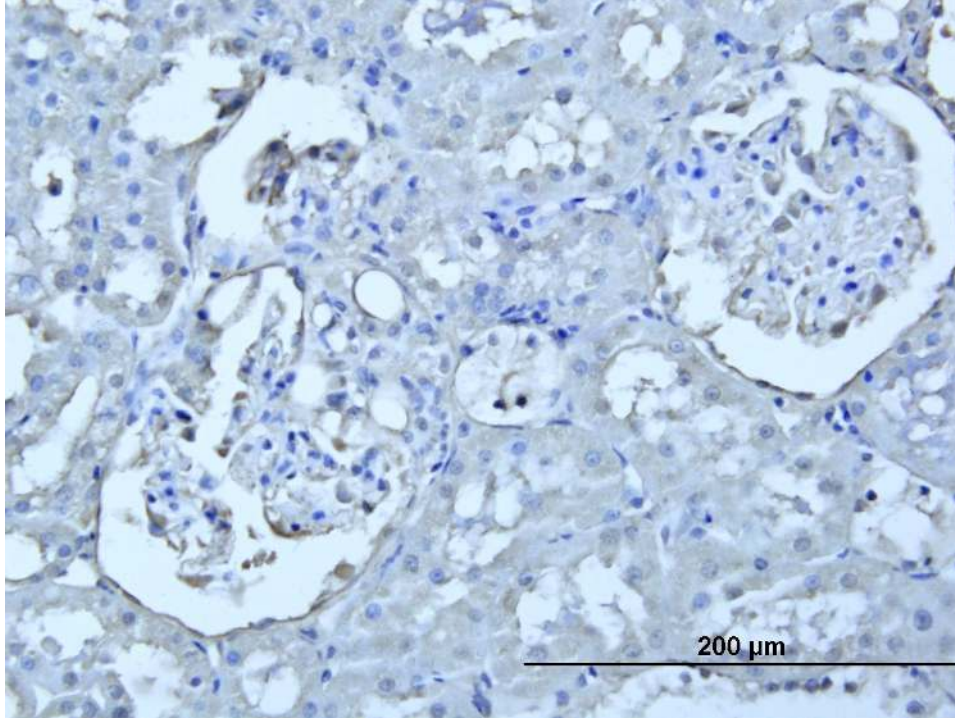
Şekil 95: 5/6Nf+DM grubu ET-1 immunohistokimyası. İmmün pozitif hücreler.



Şekil 96: DM+LAT grubu ET-1 immunohistokimyası. Zayıf immun boyanma gözlemlendi.



Şekil 97: 5/6Nf+LAT grubu ET-1 immunohistokimyası. Zayıf immun boyanma gözlemlendi.



Şekil 98: 5/6 Nf+DM+LAT grubu ET-1 immunohistokimyası. Zayıf immun boyanma gözlemlendi.

Kaspaz-3 İmmunohistokimyası sonuçları

Kaspaz-3 immunohistokimyası tübül epitelinde her denekte rasgele 5 alandaki pozitif hücre sayısı ve her denekte 50 glomerüldeki pozitif hücreler sayılarak değerlendirildi.

Kaspaz-3 immunhistokimyası sonuçlarına bakıldığında ANOVA testine göre tüm gruplar arasında anlamlı fark gözlemlendi ($p < 0,005$). Post-hoc Bonferroni testi değerlendirmelerinde, Kontrol grubu ile LA grupları arasında anlamlı fark gözlenmezken, diğer tüm gruplar kontrol grubuna göre anlamlı olarak tübülointerstisiyel ve glomerüler kaspaz-3 boyanmaları açısından artmıştı ($p > 0.00$) (Tablo 13) (Şekil 99-106).

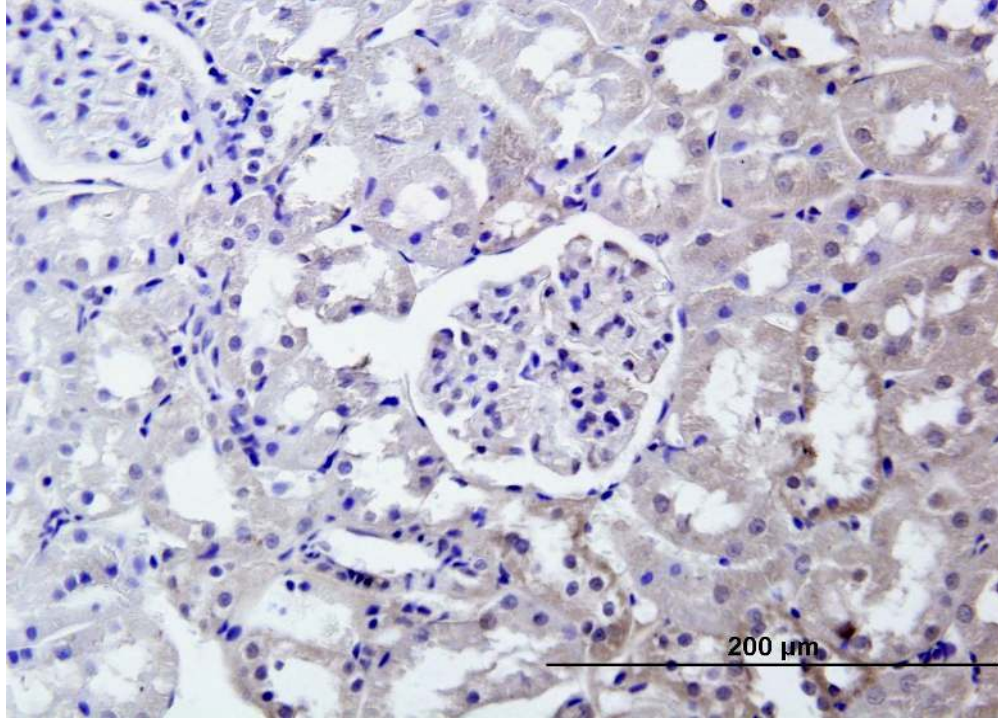
- DM, 5/6Nf ve 5/6Nf+DM grupları kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olarak gözlemlendi.
- DM grubu ve DM+LAT grubu karşılaştırıldığında DM+LAT grubu anlamlı olarak düşüktü ($p=0.00$).

- 5/6 Nf grubu ve 5/6Nf+LAT grubu karşılaştırıldığında 5/6Nf+LAT grubu anlamlı olarak düşüktü (p=0.00).
- 5/6 Nf+DM grubu ve 5/6Nf+DM+LAT grubu karşılaştırıldığında 5/6Nf+DM+LAT grubu anlamlı olarak düşüktü (p=0.00) (ANOVA, post-hoc Bonferroni testi).

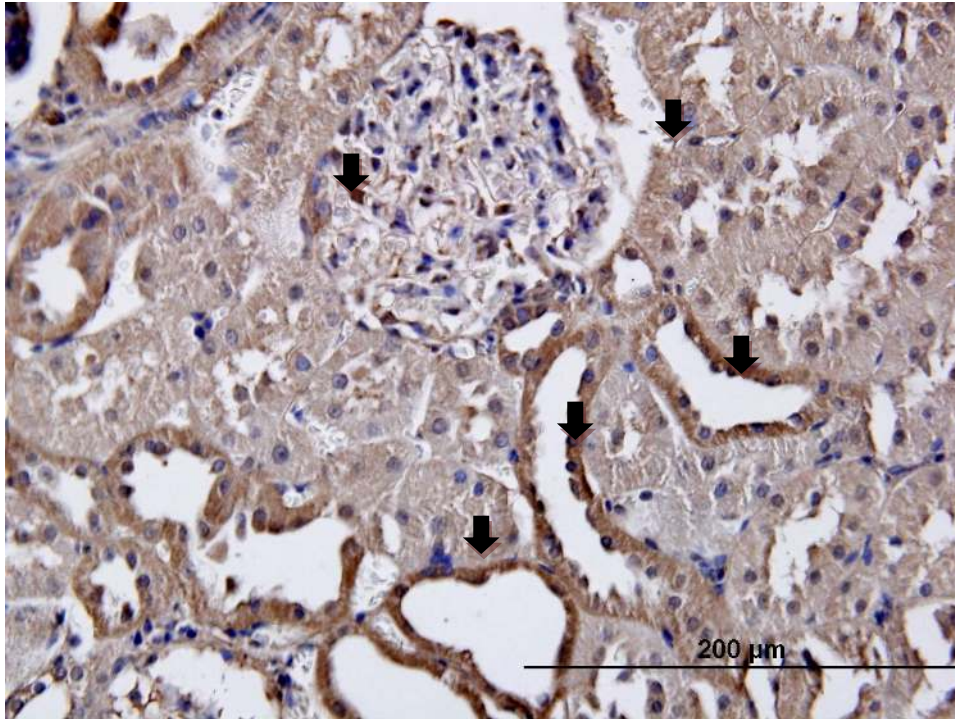
Tablo 13: Kaspaz-3 immunohistokimyası değerlendirilmesi

	Tübülointersitisiyel Kaspaz-3	Glomerüler Kaspaz-3
	Ort±SS	Ort±SS
Kontrol	8.5±2.31	7.85 ±2.69
DM	22.2±4.08 *	14.4 ±2.69 *
5/6 Nf	25.3±3.96 *	12.8 ±2.02 *
LA	10.7±2.21	8.6 ±6.55
5/6Nf+DM	21.3±7.27*	13.8 ±2.21 *
DM+LAT	15.6±4.01 ¥	11.1±3.13 ¥
5/6Nf+LAT	13.9±1.77 ¥	10.68 ±3.05 ¥
5/6Nf+DM+ LAT	14.8±3.87 ¥	10.3±2.58 ¥

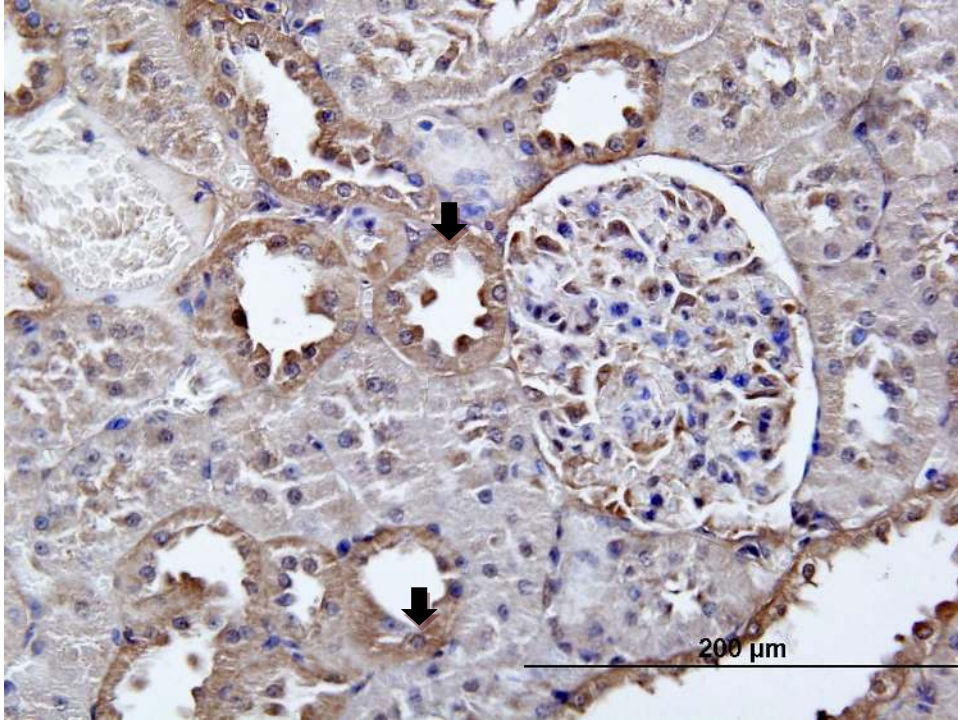
*: Kontrol grubuna göre anlamlı artış, ¥: Deneysel modellerine göre LA uygulanan gruplarda anlamlı azalma



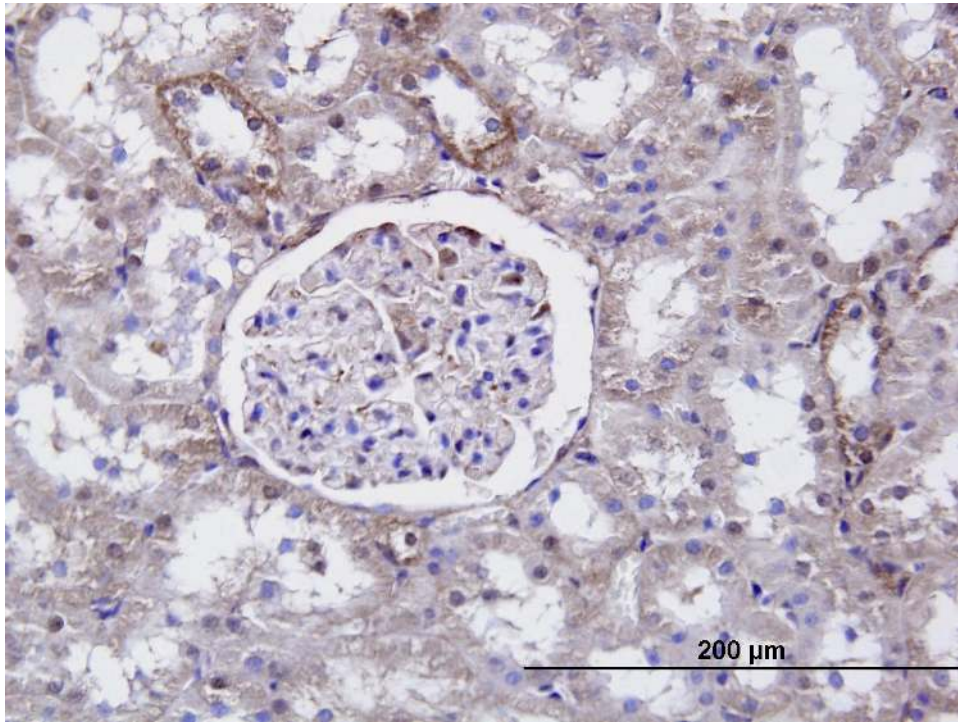
Şekil 99: Kontrol grubu Kazpaz-3 immunohistokimyası. Zayıf immün boyanma gözlemlendi.



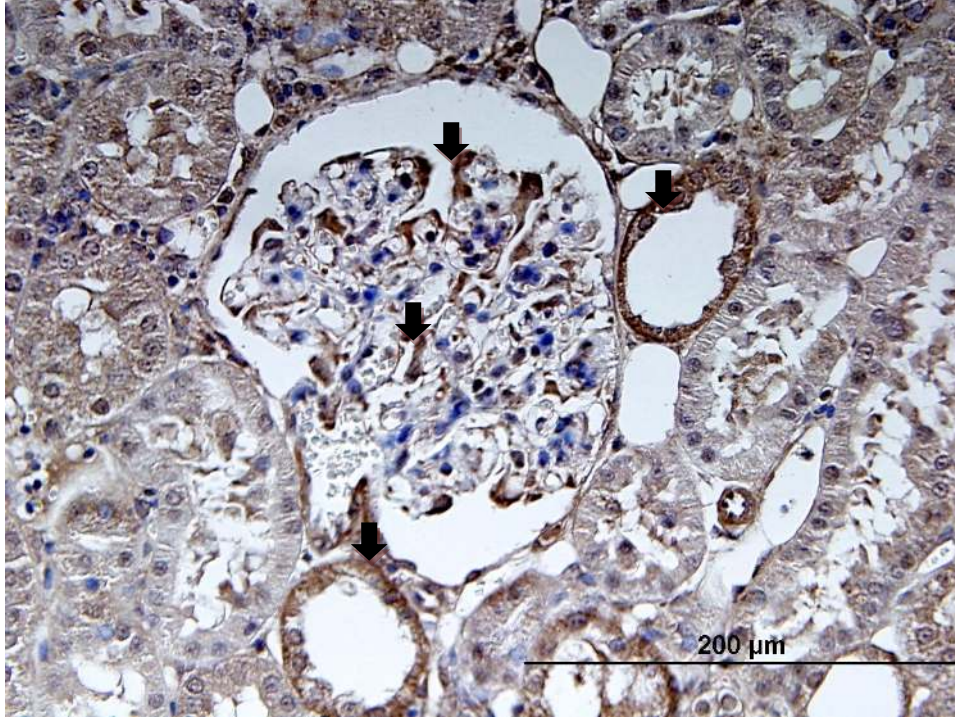
Şekil 100: DM grubu Kazpaz-3 immunohistokimyası. : İmmün pozitif hücreler.



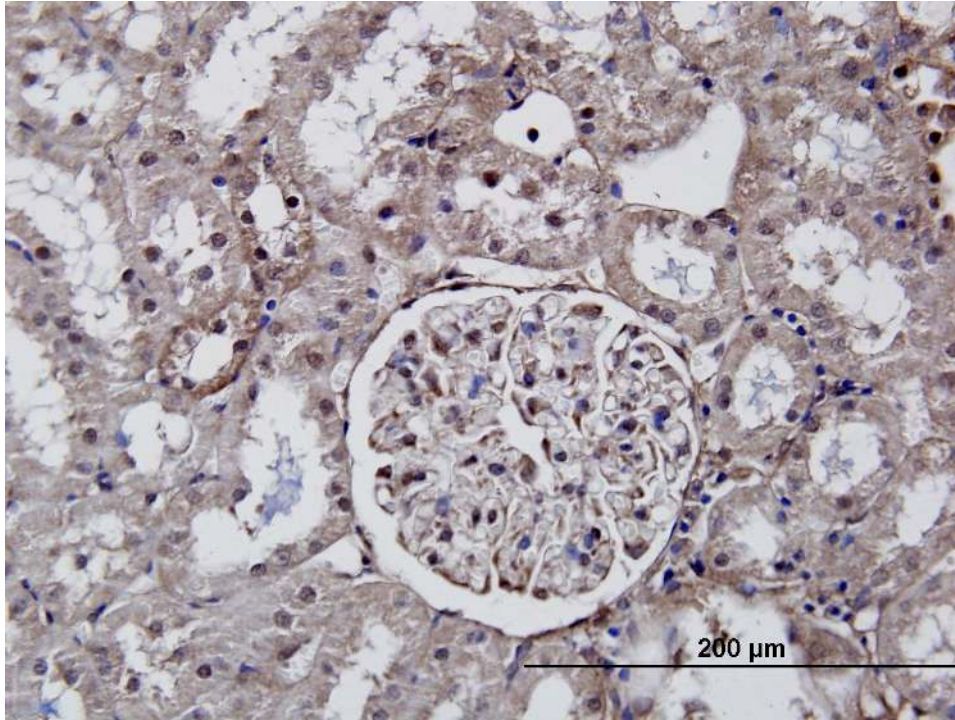
Şekil 101: 5/6Nf grubu Kazpaz-3 immunohistokimyası↓ : İmmun pozitif hücreler



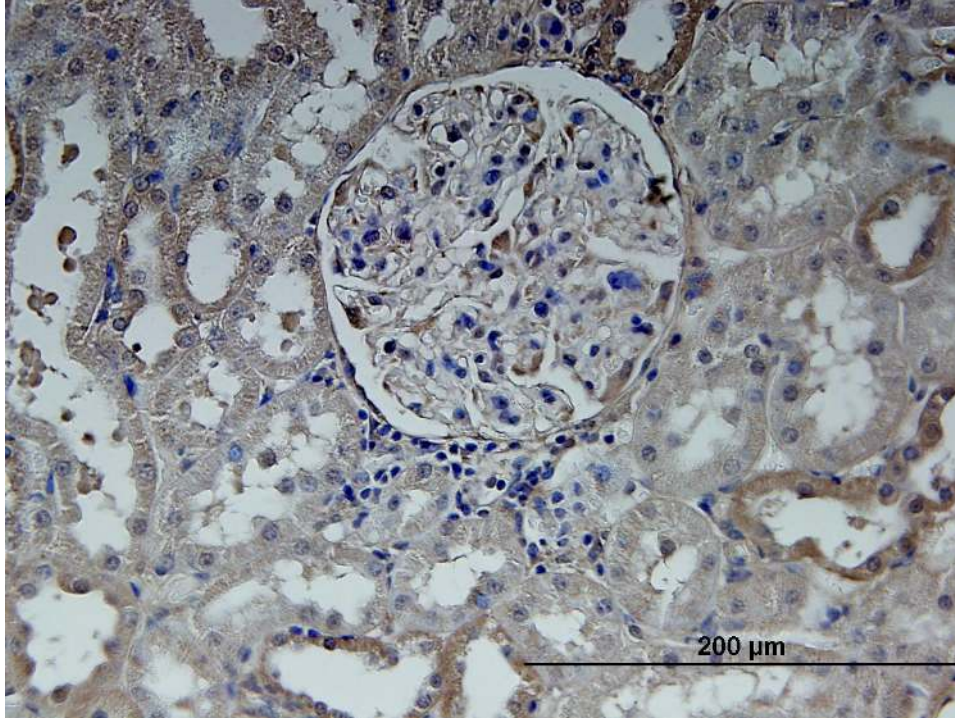
Şekil 102: LA grubu Kazpaz-3 immunohistokimyası. Zayıf immün boyanma gözlemlendi.



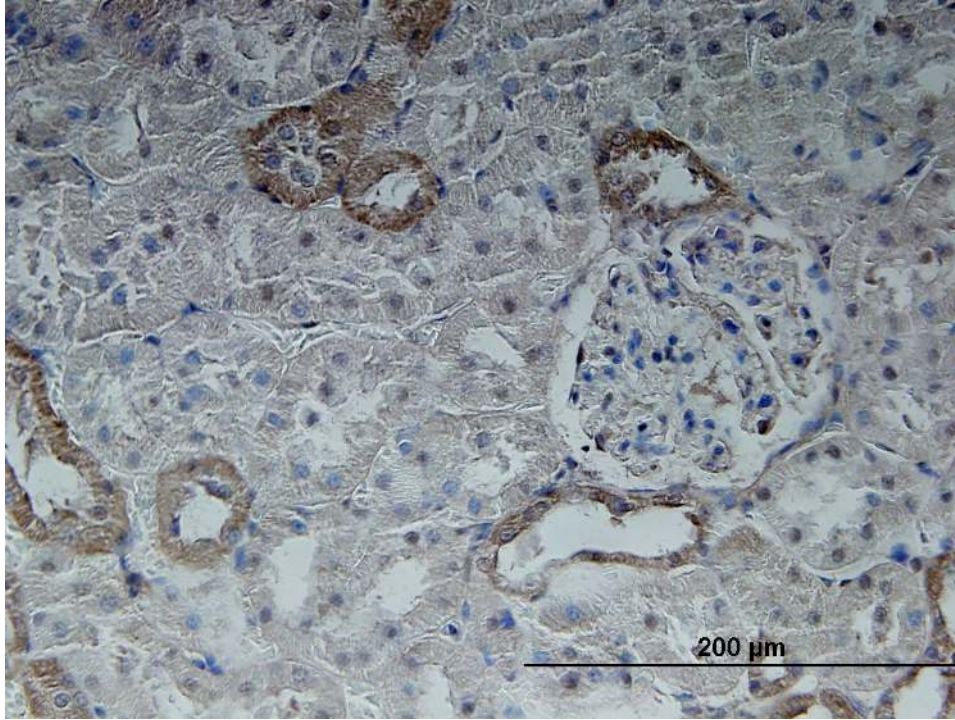
Şekil 103: 5/6Nf+DM grubu Kazpaz-3 immunohistokimyası. İmmun pozitif hücreler.



Şekil 104: DM+LAT grubu Kazpaz-3 immunohistokimyası. Zayıf immün boyanma gözlemlendi.



Şekil 105: 5/6Nf+LAT grubu Kazpaz-3 immunohistokimyası. Azalmış immun boyanma gözlemlendi.



Şekil 106: 5/6 Nf+DM+LAT grubu Kazpaz-3 immunohistokimyası. Azalmış immun boyanma gözlemlendi.

5.6 Biyokimyasal Bulgular

5.6.1 Serum BUN düzeyleri

Deneyin başlangıç ve bitiş tarihlerinde ölçülen BUN değerleri arasındaki farklar Wilcoxon sıralı işaretler testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. $p < 0,05$ den küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Başlangıç BUN düzeylerine bakıldığında grupların ortalamaları; Kontrol grubunda 20.5 ± 1.09 , DM grubunda 20.5 ± 2.01 , 5/6 Nf grubunda 18.7 ± 1.62 , LA grubunda 20.8 ± 1.34 , ve 5/6Nf+DM grubunda 20.3 ± 1.17 , DMLAT grubunda 21.1 ± 2.53 , 5/6 NfLAT grubunda 20.6 ± 1.98 , 5/6NfDMLAT grubunda 19.3 ± 1.56 olarak saptandı.

Deney sonu BUN düzeylerine bakıldığında grupların ortalamaları; Kontrol grubunda 18.8 ± 1.9 DM grubunda 120.0 ± 11.2 , 5/6 Nf grubunda 107.4 ± 14.3 , LA grubunda 22.0 ± 5.14 , ve 5/6Nf+DM grubunda 113.0 ± 18.4 , DMLAT grubunda 51.6 ± 4.1 , 5/6 NfLAT grubunda 39.7 ± 6.7 , 5/6NfDMLAT grubunda 44.8 ± 15.4 olarak saptandı (Şekil 105).

Kontrol grubunun başlangıç ve deney sonu BUN düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p=0.144$).

DM grubunun başlangıç ve deney sonu BUN düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi ($p=0.043$).

5/6Nf grubunun başlangıç ve deney sonu BUN düzeyleri karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi ($p=0.043$).

LA grubunun başlangıç ve son BUN düzeyleri karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi ($p=0.50$).

5/6Nf+DM grubunun başlangıç ve deney sonu BUN düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi ($p=0.043$).

DM+LAT grubunun başlangıç ve deney sonu BUN düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi ($p=0.03$).

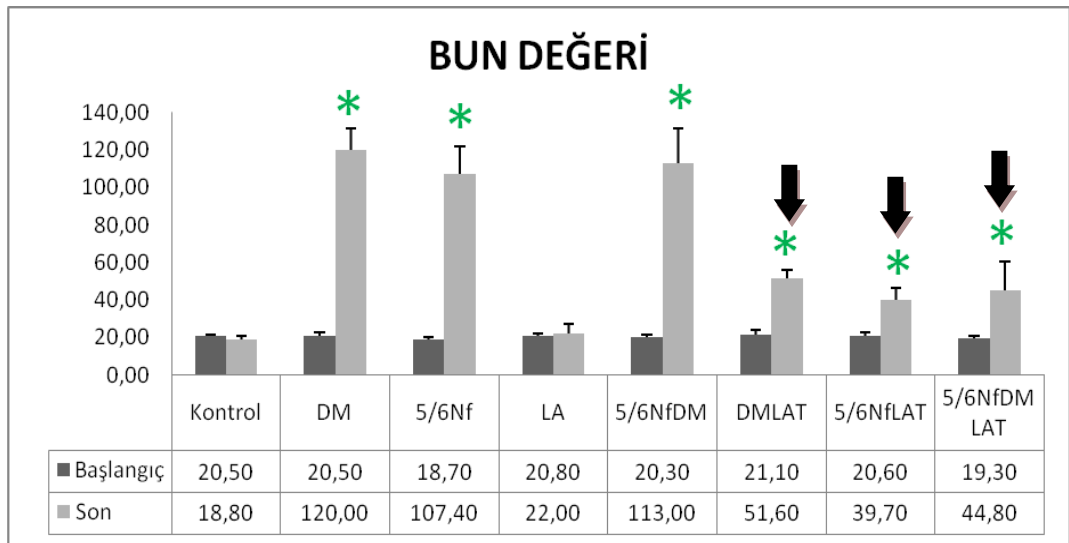
5/6Nf+LAT grubunun başlangıç ve deney sonu BUN düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi ($p=0.018$).

5/6Nf+DM+LAT grubunun başlangıç ve deney sonu BUN düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi ($p=0.042$).

- Deney başlangıcında tüm gruplar arasında anlamlı fark gözlemlenmedi.

Deney sonundaki BUN düzeyleri karşılaştırıldığında;

- ❖ Kontrol ve LA grupları arasında anlamlı fark gözlemlenmezken ($p=1.000$), diğer tüm bu gruplar bu iki gruba göre anlamlı olarak artmıştı ($p<0.005$).
- ❖ DM grubu ile DM+LAT grubunu karşılaştırdığımızda DMLAT grubunda anlamlı azalma gözlemlendi ($p=0.000$).
- ❖ 5/6Nf grubu 5/6Nf+LAT grubunu karşılaştırdığımızda 5/6Nf+LAT grubunda anlamlı azalma olduğu gözlemlendi ($p=0,000$).
- ❖ 5/6Nf+DM ve 5/6Nf+DM+LAT grubunu karşılaştırdığımızda 5/6Nf+DM+LAT grubunda anlamlı azalma olduğu gözlemlendi ($p=0,000$).



Şekil 107: Deney başlangıcı ve sonu serum BUN değeri ölçümleri. *: Anlamlı olarak artış gösterilme. $p<0.005$. Bağımsız gruplarda tek yönlü varyans analizi (Anova) uygulandı. ↓ :Anlamlı azalma

5.6.2 Serum kreatinin düzeyleri

Deneyin başlangıç ve bitiş tarihlerinde ölçülen serum kreatinin değerleri arasındaki farklar Wilcoxon sıralı işaretler testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. $p < 0,05$ den küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Başlangıç serum kreatinin düzeylerine bakıldığında grupların ortalamaları; Kontrol grubunda 0.51 ± 0.18 DM grubunda 0.50 ± 0.18 , 5/6 Nf grubunda 0.49 ± 0.17 , LA grubunda 0.50 ± 0.02 , ve 5/6Nf+DM grubunda 0.50 ± 0.02 , DMLAT grubunda 0.50 ± 0.03 , 5/6 NfLAT grubunda 0.50 ± 0.03 , 5/6NfDMLAT grubunda 0.49 ± 0.02 olarak saptandı.

Deney sonu serum kreatinin düzeylerine bakıldığında grupların ortalamaları; Kontrol grubunda 0.48 ± 0.05 , DM grubunda 0.84 ± 0.1 , 5/6 Nf grubunda 0.92 ± 0.1 , LA grubunda 0.53 ± 0.02 , ve 5/6Nf+DM grubunda 0.98 ± 0.06 , DMLAT grubunda 0.51 ± 0.06 , 5/6 NfLAT grubunda 0.76 ± 0.08 , 5/6NfDMLAT grubunda 0.61 ± 0.05 olarak saptandı (Şekil 106).

Kontrol grubunun başlangıç ve deney sonu serum kreatinin düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p=0,27$).

DM grubunun başlangıç ve deney sonu serum kreatinin düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi ($p=0,043$).

5/6Nf grubunun başlangıç ve deney sonu serum kreatinin düzeyleri karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi ($p=0,043$).

LA grubunun başlangıç ve deney sonu serum kreatinin düzeyleri karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi ($p=0,102$).

5/6Nf+DM grubunun başlangıç ve deney sonu serum kreatinin düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı anlamlı artış gözlemlendi ($p=0.043$).

DM+LAT grubunun başlangıç ve son serum kreatinin düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi ($p=1.00$).

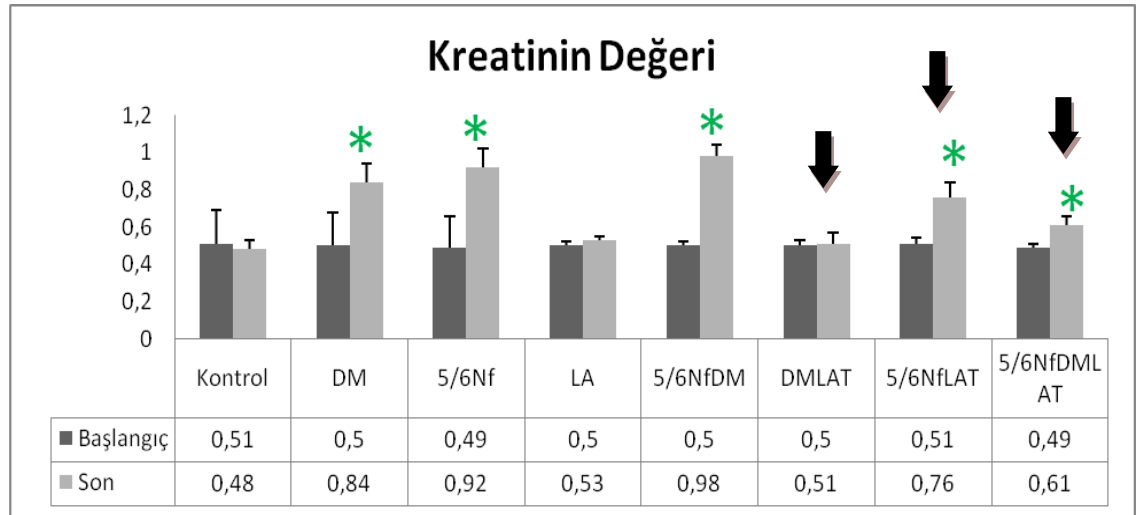
5/6Nf+LAT grubunun başlangıç ve deney sonu BUN düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı anlamlı anlamlı artış gözlemlendi ($p=0.018$).

5/6Nf+DM+LAT grubunun başlangıç ve deney sonu BUN düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi ($p=0,042$).

Deney başlangıcında tüm gruplar arasında anlamlı fark gözlemlenmedi.

Deney sonundaki Kreatinin düzeyleri karşılaştırıldığında;

- ❖ Kontrol, LA, DMLAT, 5/6Nf+DM+LAT grupları arasında anlamlı fark gözlemlenmezken ($p=1.000$).
- ❖ DM grubu ile DM+LAT grubunu karşılaştırdığımızda DMLAT grubunda anlamlı azalma gözlemlendi ($p=0.000$).
- ❖ 5/6Nf grubu 5/6Nf+LAT grubunu karşılaştırdığımızda 5/6Nf+LAT grubunda anlamlı azalma olduğu gözlemlendi ($p=0,010$).
- ❖ 5/6Nf+DM ve 5/6Nf+DM+LAT grubunu karşılaştırdığımızda 5/6Nf+DM+LAT grubunda anlamlı azalma olduğu gözlemlendi ($p=0,000$).

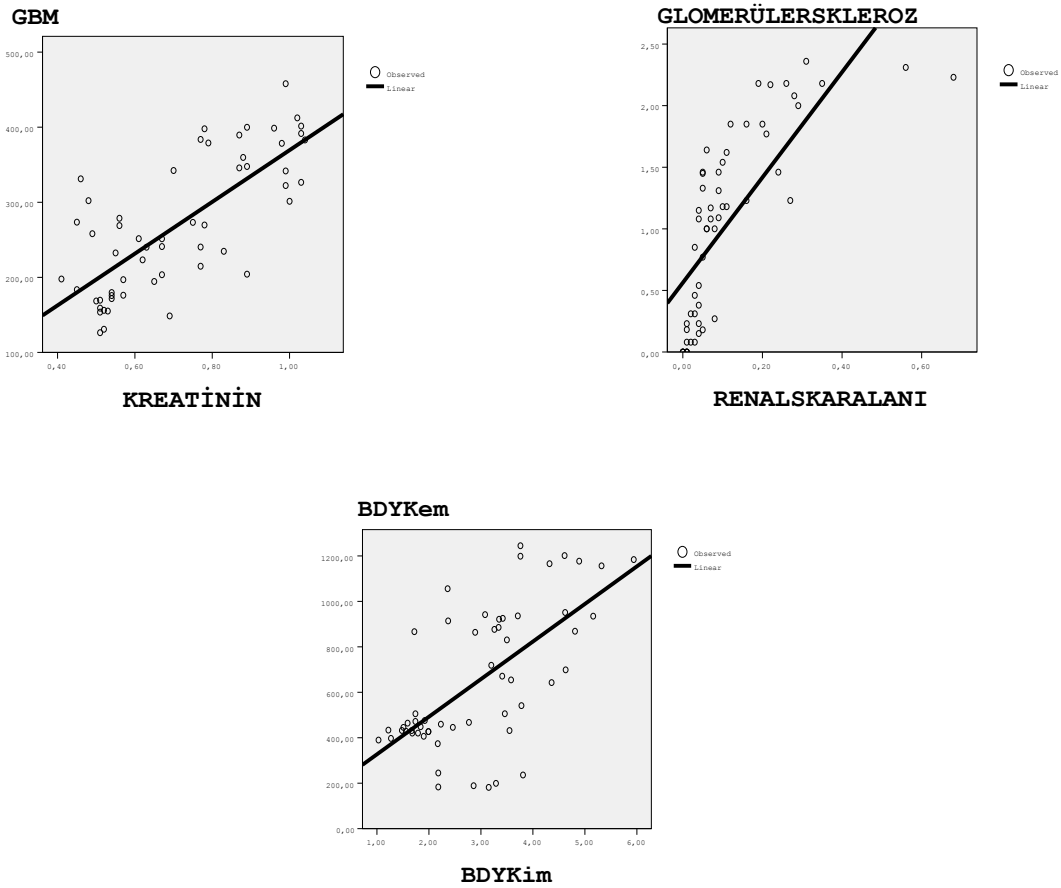


Şekil 108: Deney sonu serum kreatinin ölçümleri. *: Anlamlı olarak artış $p<0.005$. Bağımsız gruplarda tek yönlü varyans analizi (Anova) uygulandı. ↓:Anlamlı azalma

5.7 Korelasyon Analizleri

Deneyler sonunda elde edilen histomorfometrik, elektron mikroskopik ve biyokimyasal parametrelerin birbirleri ile korelasyonlarını değerlendirmek amacıyla ‘Spearman’ korelasyon analizleri uygulandı.

- Serum kreatinin ve GBM kalınlığının ultrastürüktürel ölçümleri arasında güçlü bir ilişki vardı ve bu ilişki anlamlıydı ($R=0.70$, $p<0.001$) (Şekil 109).
- Histomorfometrik olarak glomerülerskleroz ve renal skar alanı ölçümleri arasında güçlü bir ilişki vardı ve bu ilişki anlamlıydı ($R=0.90$, $p<0.001$) (Şekil 109).
- Bowman dış yaprağı kalınlığının ultrastrüktürel ve ışık mikroskopik ölçümleri arasında güçlü bir ilişki vardır ve bu ilişki anlamlıydı ($R=0.90$, $p<0.001$) arasında güçlü bir ilişki vardı ve bu ilişki anlamlıydı ($R=0.90$, $p<0.001$) (Şekil 109).



Şekil 109: Korelasyon Değerleri. GBM: Glomerüler bazal membran, BDYem: Bowman dış yaprağının elektron mikroskopik ölçümü, BDYım: Bowman dış yaprağının ışık mikroskopik ölçümü.

6 **TARTIŞMA**

Diabetes Mellitus, Hipertansiyon, Deneysel Model ve Parametreler

Diabetes Mellitus birçok mikrovasküler ve makrovasküler hastalıklar ile birlikte seyreden ve bunlara bağlı gelişebilen erken ölüm riski ile ilişkili bir hastalıktır. Hipertansiyon ise mikrovasküler ve makrovasküler hastalıklar için bilinen bir risk faktörü olup diyabeti olan bireylerde oldukça sık gözlenen bir durumdur. Normal popülasyona göre diyabetli bireylerde iki kat daha yaygındır (118). Hipertansif diyabetiklerde normal popülasyona göre 6 kat artmış stroke riski ile birlikte retinopati ve nefropati gibi komplikasyonların gelişim ve progresyonunda önemli artış olduğu gösterilmiştir.

Diyabetik nefropatinin patogeneğinde kronik hiperglisemi gözlenmektedir ve bu durum çeşitli faktörlerin etkileşimi (büyüme faktörleri, AT II, endotelin (ET), ileri glikasyon ürünlerinde artış (İGÜ), renal mikrosirkülasyonda hemodinamik değişiklikler (glomerüller hiperfiltrasyon, glomerüller kapiller basınçta artış), glomerüllerde yapısal değişiklikler (ekstrasellüler matrikste artış, bazal membran kalınlaşması, mezenjiyal genişleme, fibrozis) ile ilişkilidir (15,17). Benzer bulguların hipertansiyon ile birlikte artış gösterdiği ve renal hasarın progresyonunu arttırdığı düşünülmektedir.

Diyabetteki hipertansiyonun patogenezi kompleks ve multifaktoriyel olup tam olarak tanımlanmamıştır. Hipertansiyon prevalansı ve ilerleme süreleri tip 1 ve tip 2 diyabeti olanlar arasında farklılıklar göstermektedir. Tip 1 diyabet hastalarında klinik kan basınçları hastalığın ilk 10-15 yılında normal seyretilmektedir. Ancak burada hasta popülasyonunun genç olması da önemli bir faktördür. O nedenle tip 1 diyabetin seyrinde hipertansiyon gözlenmesi genellikle nefropati gelişiminin bir belirteçidir. Bunun aksine tip 2 diyabette hipertansiyon sıklıkla tanı anında mevcuttur. Tip 2 diyabette nefropati gelişimi, kan basıncında meydana gelen daha sonraki artışlar ile ilişkilidir (119).

Hipertansiyonun böbrek üzerine etkisi ile ilgili çeşitli görüşler mevcuttur. Hipertansif renal hasar sistemik kan basıncı yükünün etkisiyle başlayan veya hızlanan renal harabiyet olarak tanımlanmaktadır (120). Hipertansif renal hasara duyarlılık ise daha düşük kan basıncında renal harabiyetin oluşması ya da benzer yüksek kan basıncı değerlerinde daha fazla hasar gelişmesi olarak ifade edilir. Arteriyel hipertansiyon sonucunda renal vasküler direnç ve filtrasyon fraksiyonu artar ve renal kan akımı normal kalır. Preglomerüller arteriyol

ve arterlerde daralma ve glomerüler kan akımında düşüş ve buna bağlı gelişen glomerüler iskei sonucunda böbrek yetmezliğı gelişir. Diğer bir görüşe göre ise glomerüllerdeki sistemik basınç artışı hipertansif renal hasar gelişimine yol açmaktadır. Deneysel çalışmalar hipertansif renal hasarın şiddetinin hipertansiyonun renal mikrovasküler sisteme yansması ile doğru orantılı olduğunu göstermiştir (121).

Esansiyel hipertansiyonda renal otheregölasyon sağlanmaktadır ve malign hipertansiyon gelişmedikçe genellikle renal hasar oluşmamaktadır. Renal kitlenin miktarının azaldığı durumlarda ve diyabet varlığında hipertansif renal hasar patofizyolojisi farklı seyretmektedir. Preglomerüler vasküler dilatasyon ve bozulmuş renal otheregölasyon sistemik kan basıncı yükünün büyük oranda renal mikrovasküler yatağı yansmasına neden olmaktadır. Bu nedenle, hasar vasküler yapıdan daha fazla glomerüler düzeyde gerçekleşmektedir (122). Hipertansiyonun tek başına böbrek hasarı üzerine etkileri tartışmalı iken, diyabetik nefropati ve hipertansiyonun birlikte gözleendiğı ratlarda glomerüloskleroz gelişimi artış göstermiştir. (123).

Deneysel çalışmalara bakıldığında, cerrahi (pankreasın çıkarılması) genetik (knoc-out genler oluşturulması) ya da biyokimyasal uygulamalar (STZ, alloksan enjeksiyonu) ile diyabet oluşturulmaktadır. Hipertansiyon modellerinde ise genellikle spontan hipertansif ratlar tercih edilmektedir. Bunlar dışında, hipertansif modeller arasında aortanın daraltılması, renal kitlenin azaltılması, renal arter ya da venlerin klipslenmesi gibi modeller kullanılmaktadır. Diyabet ve hipertansiyonun birlikte uygulandığı modellerde de spontan hipertansif ratlar tercih edilmektedir ve bu deneklere STZ uygulanmaktadır. Souza ve ark.ları spontan hipertansif ratlara 50 mg/kg STZ modeli oluşturmuş ve renal kortekste GLUT-1'in ekspresyonunu incelemişlerdir (124). Diğer bir çalışmada AII bağımlı hipertansiyona neden olan ren-2 transgenik farelere 70 mg/kg STZ ile diyabet oluşturulmuş ve renal hasar incelenmiştir (125). Yapılan klinik bir çalışmada, tip II diyabeti olan ve olmayan hipertansif bireylerde renal arter stenozu değerlendirilmiştir (126). Biz de yaptığımız araştırmada cerrahi yolla 5/6 nefrektomi uygulamasının ardından STZ ile diyabet oluşturduk. Bu model literatürde bulunmamaktadır ve bu iki modelin birlikte uygulanması ile elde ettiğimiz verilerin literatüre katkısı olacağını düşünmekteyiz.

Deneysel çalışmalarda diyabet ve hipertansiyon modellerinin böbrek üzerine etkileri incelenirken, böbrekte oluşan hasarlar, deneklerin ağırlık değişimleri, kan glikozu, kan basıncı

değişimi gibi deneysel parametreler ve biyokimyasal olarak böbrek fonksiyon testleri ile desteklenmektedir. Bizim çalışmamızda da bu öğeler böbrek hasarını değerlendirmek ve histolojik bulguları desteklemek amacıyla kullanılmıştır. Literatür incelendiğinde, Obrosova ve ark.ları, Melhem ve ark.ları ve Tylicki ve ark.ları STZ diyabetik ratlarda kontrol grubuna göre ağırlık kaybı gözlemişlerdir (127-129). Souza ve ark.ları ise spontan hipertansif ratlarda STZ ile diyabet oluşturmuşlar ve 45. gün sonunda ağırlık kaybı olduğunu gözlemişlerdir (124). Cao ve ark.ları subtotal nefrektomi uyguladıkları ratlarda 4 hafta sonunda ağırlık artışı gözlemişlerdir (130). Bizim çalışmamızda da kontrol grubu ve LA uygulanan grupta deney sonunda anlamlı ağırlık artışı gözlenirken, diğer gruplarda deney sonunda anlamlı ağırlık kaybı olduğu gözlemlendi.

Obrosova ve ark.ları ile Melhem ve ark.ları bizim çalışmamıza benzer şekilde STZ ile diyabet oluşturdukları ratlarda deney sonunda kan şekerinde anlamlı olarak artış gözlemişlerdir (127, 128).

Benigni ve ark.ları ile Cao ve ark.ları 5/6 nefrektomi modelinde kontrol grubuna göre artmış kan basıncı gözlemişlerdir (62, 130). Biz de çalışmamızda deney sonunda karotis arterden kan basınçlarını ölçüldü. Nefrektomi uygulanarak deneysel hipertansiyon oluşturulan gruplarda (5/6Nf, 5/6Nf+DM, 5/6Nf+LAT 5/6Nf+DM+LAT) diğer gruplara göre anlamlı kan basıncı artışı gözlemlendi.

Bu verilerin sonucunda, diyabet, hipertansiyon ve iki modelin birlikte oluşturulduğu deney gruplarımızda, deney başı ve deney sonu ağırlık, kan şekeri ölçümü ve kan basıncı ölçümleri literatür ile uyumlu sonuçlar vermiştir. Bu parametrelerdeki değişimler ile deneysel modellerimiz doğrulanmıştır.

Işık Mikroskopik Bulgular

Çalışmamızda deneysel olarak STZ ile diyabet modeli ve 5/6 nefrektomi ile hipertansiyon modellerini ayrı ayrı ve birlikte oluşturduktan sonra bu gruplarda böbrek üzerinde LA'nın tedavi edici etkisini değerlendirdik. Bu değerlendirmeyi yaparken tüm gruplarda böbreğin histolojik yapısını koruyup korumadığını gözlemek amacıyla rutin HE, renal korpuskülün bowman dış yaprağındaki ve tübüllerin bazal membranlıklarındaki değişimleri gözlemek amacıyla PAS boyası, bağ doku farklılıklarını ve interstisiyel fibrozisi değerlendirmek amacıyla Masson Trikrom boyaması yapıldı. Bunun yanı sıra deneysel

modellerin böbrek üzerinde oluşturmuş olduğu hasarlar semikantitatif olarak skorlanarak değerlendirildi ve histomorfometrik ölçümler yapıldı. Renal hasarın değerlendirilmesinde Güray ve ark.larının uyguladığı yöntemle böbrekte 5 standart alan belirlendi. Bu alanlardan 15'er görüntü elde ederek bowman dış yaprak kalınlığı, glomerül başına düşen çekirdek sayısı, glomerül çapı, ve renal skar alanı ve glomerüler sklerozu değerlendirildi (108).

Literatüre bakıldığında benzer çalışmalarda, Pablo ve ark.ları nefrektomi modeli uyguladıkları çalışmalarında kronik böbrek hasarını inflamatuvar infiltrasyon, fibrozis ve vasküler lezyonlar açısından incelemişlerdir. Tübülointersitisiyel hasarı Masson's trikrom boyası ile değerlendirmişler ve nefrektomi grubunda sham grubuna göre anlamlı artış gözlemişlerdir (131). Cao ve ark.ları 5/6 nefrektomi ile oluşturdukları remnant böbrek modelinde tübülointersitisiyel ve glomerüler hasarı semikantitatif yöntemle değerlendirmişler ve nefrektomi grubunda bu değerlerde anlamlı artış gözlemişlerdir (130). Kang ve ark.ları (2001) 5/6 nefrektomi modelinde glomerüler skleroz ve tübülointersitisiyel hasarın 8. haftada anlamlı olarak arttığını göstermişlerdir (132). Hattori ve ark.ları 5/6 nefrektomi oluşturdukları ratlarda PAS boyası ile glomerüler hücreleri saymışlardır. Nefrektomi sonrası 7. ve 14. günlerde anlamlı artış gözlemişlerdir. Bu artış 56. güne kadar devam etmiş ancak daha sonra 96. güne kadar gerileyerek devam etmiştir (133). Bhatti ve ark.ları da STZ diyabetik ratlarda semikantitatif yöntemle glomerüler skleroz ve tübülointersitisiyel fibrozis indeksi yapmışlar ve diyabetik grupta kontrol grubuna göre bu değerlerin arttığını bulmuşlardır (134). Biz de çalışmamızda, kontrol ve lipoik asit uygulanan gruplarda böbrek yapısının korunduğunu gözlerken, diyabet ve nefrektomi uygulanan modellerde böbreğin parankima hasarının arttığını gözledik. Lipoik asidin tedavi edici etkisinin incelendiği gruplarda ise böbrek dokusunda tübüler, glomerüler ve intersitisiyel hasarların azaldığı ve lipoik asidin tedavi edici etkisinin olduğu gözledik.

Literatürdeki bilgiler ve bizim sonuçlarımızın ışığında renal hasarın değerlendirilmesinde histomorfometrik değerlendirmeleri tek tek değil bir arada göz önüne alarak değerlendirmenin daha doğru olacağını düşünmekteyiz.

Ultrastrüktürel Bulgular

İnsan biyopsilerinin patolojik incelemelerinde, ışık mikroskopik bulgular ultrastrüktürel bulgular ile desteklenmektedir. Shore ve ark.'ı renal patolojiyi ultrastrüktürel düzeyde inceledikleri çalışmalarında, DM'li böbreğin glomerüler bazal membranında ve mezengiyal matrisinde artış ve bir miktar da foot proses efasmanı gözlemlendiği bildirilmiştir (135). Aunapuu ve ark.larının 2003 yılında yaptıkları çalışmada 5/6 Nf uygulanan ratlarda ultrastrüktürel değişiklikleri incelemişlerdir. Benzer şekilde hücresel hipertrofi, foot proses efasmanı, glomerüler kapiller loop dilatasyonu, endotelial hücrelerde ve bazal membranda yapısal anormallikler olarak tanımlanmıştır (136). Biz de, böbrek dokusundaki hasar için histomorfometrik incelemelere ek olarak glomerül bazal membran ve bowman dış yaprağındaki değişiklikleri ultrastrüktürel düzeyde inceledik. Diyabet, 5/6 nefrektomi ve 5/6 nefrektomi ile diyabetin birlikte uygulandığı gruplarda literatür ile benzer şekilde bazal membranın düzensiz ve kalın olduğu, bazal membranın altında subendotelial birikimler gözlemlendiği ve podosit yapılarında düzensizlik olduğunu belirledik. Literatürdeki verilere ek olarak ilk kez bowman dış yaprak kalınlığını elektron mikroskopik ölçümünü yaptık. Deneysel modellerin uygulandığı gruplarda GBM kalınlığı ile paralel şekilde artış gösterdiği ve lipoik asidin tedavi edici etkisinin uygulandığı gruplarda ise kalınlığının azaldığını gözlemledik. Bowman dış yaprak kalınlığındaki artışın, histomorfometrik bulgularda elde ettiğimiz intersitisiyel fibrozis ve birlikte gelişen bağ doku artışında olduğu gibi, kollagen artışı nedeniyle olabileceğini düşündük. Bowman dış yaprağındaki bu yapısal farklılaşmanın böbreğin işlevlerindeki rolünü ve etkilerini belirlemek amacıyla, artışa neden olan mekanizmaların ileri çalışmalar ile açıklanması gerektiğini düşünmekteyiz.

Lipoik Asidin Diabetes Mellitus ve Hipertansiyonda Tedavi Edici/Koruyucu Etkisi

Diyabetik komplikasyonların en belirgin özelliklerinden biri artmış oksidatif stres ve azalmış antioksidan savunma mekanizmasının varlığıdır. Diyabetin erken ve geç dönemlerinde artmış oksidatif stres nedeniyle renal korteksteki glomerüllerde, tübülo-intertisyumda ve vasküler yapılarda ekstrasellüler matriks artışı, glomerüler filtrasyon oranlarında artış, glomerüloskleroz ve tübülo-intersitisiyel fibrozis ile proteinüride artış gözlenir. Diyabetik nefropati gelişiminin kontrol edilebilmesi ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesindeki yollardan biri antioksidan kullanımıdır. LA'nın antioksidan olarak koruyucu/tedavi edici etkisi, iskemi/reperfüzyon hasarı, diyabet, HIV enfeksiyonları ve

nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalık grubunda, lensde, retinada, periferik sinirde ve böbrekte dokularında gösterilmiştir (127, 137).

Diyabet başta karbonhidrat metabolizması olmak üzere, lipid ve protein metabolizmasındaki bozukluklar ile seyreden endokrin ve metabolizma hastalığıdır. Hiperglisemiye yol açan birçok faktörle birlikte diyabette oksidatif stres oluşmaktadır. Lipid hidroksiperoksitler, konjuge dienler, tiyobarbitürik asit gibi reaktif maddelerin artışı ile E ve C vitamini, SOD, glutatyon peroksidaz, katalaz gibi antioksidan parametrelerin azalması, diyabette oksidatif stresin önemli rolü olduğunu göstermektedir (138, 139). Mitokondri, endoplazmik retikulum membranları ve plazmada bulunan lipidler reaktif oksijen türlerinin esas hedeflerini oluşturmaktadır. Mitokondiyal ROS birikimi kadar endotelial hücrelerde de ROS birikimi gözlenmiştir. Bu durumun albuminuri gelişimini de içeren diyabetin endotelial disfonksiyonunun gelişiminde önemli rol oynayabileceği düşünülmüştür. Mitokondriyal ROS üretimi, ayrıca diyabetik böbrek hastalığının diğer faktörlerinin oluşumunda örneğin GBM kalınlaşması, mezengial matriks genişlemesi, tübüler disfonksiyonda da rol almaktadır (138, 139).

Klinik çalışmalarda 600 mg LA günde x1, x2 ve ya x3 kez alındığında plazma lipid peroksitlerinde, nöropatik semptomlarında azalma ve tip II diyabetiklerde insülin duyarlılığında artış gözlenmiştir. Maritim ve ark.ları, 90 mg/kg STZ ile diyabet oluşturmuşlar ve kontrol; kontrol+10 mgLA, kontrol+50mg LA, diyabetik kontrol ve diyabet+10 mg LA gruplarına 14 gün süre ile LA uygulamışlardır. Deney sonunda akciğer, kalp ve böbrek dokularında süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GSH), glutatyon redüktaz (GSSG) aktivitelerini incelemişlerdir. Sonuçta lipoik asitin serbest radikalleri süpürerek lipid peroksidasyonunu azaltarak oksidatif hasarı önleyici etkisini göstermişlerdir (137).

Obrosova ve ark.ları Maritim ve ark.larına benzer şekilde erkek wistar ratlarda 55 mg/kg STZ ile diyabet oluşturmuşlar ve 3 hafta süre 100mg/kg lipoik asidin etkisini incelemişlerdir. Deney sonunda renal kortekste SOD, katalaz, MDA, GSH, GSSG, GSHT gibi oksidatif stres belirteçlerini incelemişlerdir. Lipoik asit kullanılan grupta glutatyon biyosentezinin stimule olduğu, NADP oksidaz ürünlerinin de inhibe olduğu ve lipoik asidin diyabetik nefropati üzerinde iyileştirici etkisi olduğu göstermişlerdir (127).

Melhem ve ark.ları 2002 yılında yaptıkları çalışmada insülinle tedavi edilmeyen STZ diyabetik hayvan modellerinde günlük LA uygulanması ile glomerüler hasarı erken dönemde önlenmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında bu hayvanlarda GSH tükenmesi ve renal kortekste malondialdehit birikimi ile ilişkili olarak üriner albumin salgısında artış, renal yetmezlik, glomerüler mezengiyal matriks artışı, glomerül dejenerasyonuna neden olan fibrozis ve skar oluşumu olarak bilinen glomerülosklerozis gelişmiştir. LA'nın gözlenen bu değişimleri önlemiş ya da iyileştirmiş olduğunu saptamışlardır. Bu etkisini sadece glisemik kontrol ile değil antioksidan etkisi ile yaptığını düşünmüşlerdir (128).

Bhatti ve ark.ları yaptıkları çalışmada kontrol ve diyabet gruplarında lipoik asidin etkisini değerlendirmişlerdir. Çalışmalarında biyokimyasal ölçümler, glomerüloskleroz indeksi ve tübülointersiyel fibrozis indeksi gibi histomofrometrik ölçümler antioksidan ölçümleri ve immunhistokimyasal yöntem ile böbreği değerlendirmişlerdir. Lipoik asit ile tedavi edilen grupta glomerüloskleroz indeksinin ve tübülointersiyel fibrozis indeksinin azaldığı ve diğer biyokimyasal bulgular ile birlikte lipoik asidin böbrekte koruyucu etki gösterdiğini gözlemişlerdir (129).

Bir çalışmada, LA'nın erken diyabetik glomerüler hasarı vitamin C ve E'nin yüksek dozlarından da fazla koruduğu gözlenmiştir Bu çalışmada, 30 mg/kg LA'nın 2 ay süreyle uygulanmasının diyabetik ratlarda üriner albumin atılımını, glomerüler volüm ve glomerüler TGF- β ve kollajen $\alpha 1$ seviyelerindeki artışı azalttığı gözlenmiştir (140).

Yapılan başka bir çalışmada glikoz transportunun artışına yol açan insulin-sinyal yolağının, LA'nın yüksek konsantrasyonları ile aktive edilebildiği düşünülmüştür. R(+)- α -lipoik asit (LA'nın bir formu), hedef hücrelerdeki lipid, tirozin ve serin kinazları doğrudan aktive ederek dokulara glikoz alımını uyardığı gözlenmiştir (141).

Bizim çalışmamızda STZ ile diyabet oluşturulan ratlarda LA'nın tedavi edici etkisi değerlendirildiğinde literatür ile uyumlu şekilde DM grubunda kontrol ve LA grubuna göre bowman dış yaprak kalınlığı, glomerül başına düşen nükleus, glomerül çapı, intersitisiyel fibrozis, glomerüler sklerozda artış, mezengiyal matriks artışı ve renal fibroziste artış göstermiştir. DM+LAT grubunda bu değerlerin, DM grubuna göre anlamlı olarak azaldıkları gözlemlendi.

Hipertansiyon ve proteinüri böbrek hastalıklarının progresyonunda gözlenen major bileşenlerdir. Renal hasarın sonucunda glomerüler ve sistemik hipertansiyon, permeabilite, ve proteinüri gelişir. Bu durum nefron kaybı ile devam eder (142). Bu patofizyolojik süreçte renal hasarı indirmek/önlemek için çeşitli tedavi yaklaşımları geliştirilmiştir. Diüretikler, alfa ve beta blokörlerin kullanımı, kalsiyum kanal blokörleri ve ACE inhibitörleri gibi tedavilerin kullanılmasının yanısıra son dönemlerde yaygın olarak antioksidan kullanımı ile hipertansiyonun hedef organ hasarının önlenmesine ya da indirgenmesine çalışılmaktadır. Esansiyel hipertansif bireylerde antioksidan konsantrasyonunun düştüğü ve SOD aktivitesinin azaldığı, platelet ve nötrofillerde oksijen jenerasyonlarının arttığı ve NO ürünlerinde azalma olduğu bildirilmiştir (143). Son dönemlerde antioksidanlar ile tedavide spontan hipertansif ratlarda ROS ürünlerinde azalma ve kan basıncında düşme gözlenmiştir (142, 143). Vasdev ve ark.ları yaptıkları çalışmalarında spontan hipertansif ratlarda kan basıncını düşürdüğü gözlenmiştir (144). Vasdev ve ark.ları diğer çalışmalarında Dahl tuz duyarlı (DSS) ratları düşük tuz verilen, normal tuz verilen ve normal tuz+lipoik asit verilen gruplara ayırmışlar ve karaciğer, böbrek, kalp ve aorta dokularında biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler yapmışlardır. DSS ratlarda doku aldehit konjugatlarında, sitozolik kalsiyumda ve kan basıncında artış gözlenirken, lipoik asit diyeti verilen gruplarında, bu parametrelerde düşüş gözlenmiştir (143). Sonuç olarak, lipoik asidin aldehit konjugatları ve sitozolik kalsiyumu azaltarak kan basıncını düşürdüğünü ve vasküler hasarı önlediğini ileri sürmüşlerdir (143).

Midaoui ve ark.ları çalışmalarında glikoz diyeti ile beslenen Sprague-dawley ratlara diyetle 500 mg/kg lipoik asiti 3 hafta süre ile vermişlerdir. Bazal aortik oksijen üretimini ve antioksidan rezervini ölçmüşlerdir. Deneyin sonunda kronik glikoz ile beslenmenin insulin bağımlı olmayan diyabetle sonuçlandığını, bu süreçte artmış insulin ve kan basıncı değerleri oluştuğunu gözlemişlerdir. Kronik glikoz uygulaması sonucunda sistolik arteriyel kan basıncında artışla birlikte aortik bazal oksijen üretiminde artış ve GPx plazma düzeyinde azalma, lipoik asit diyeti uygulanan tedavi edici grupta arteriyel basınçta ve aortik bazal oksijen üretiminde düşüş, GPx'in plazma düzeyinde artış gözlenmiştir (105).

Bizim çalışmamızda, STZ ile 5/6 nefrektomi modeli uygulanan grupta bowman dış yaprak kalınlığı, glomerül başına düşen nükleus, glomerül çapı, intersitisiyel fibrozis, glomerüler sklerozda artış, mezegiyal matriks artışı ve renal fibrozisle artış gözlenirken, LA'nın tedavi edici etkisinin değerlendirildiği 5/6Nf grubunda DM grubu ile benzer şekilde

böbreğin değerlendirildiği morfolojik ve immunhistokimyasal parametrelerde kontrol grubuna yakın ve anlamlı değerler elde edildi.

Diyabet ve hipertansiyonun birlikte oluşturulduğu 5/6Nf+DM grubunda da morfolojik kriterlerin DM ve 5/6Nf gruplarının benzer özellikler gösterdiği, 5/6Nf+DM+LAT grubunda LA'nın böbrek yapısını korumaya yardımcı olduğu gözlemlendi.

Diabetes Mellitus, Hipertansiyon ve AT1 İlişkisi

Diyabetik nefropatinin başlangıcında tübüler epitel hücrelerinde ve glomerüllerde hipertrofi, bazal membranlarda kalınlaşma ve renal kan akımı ve glomerüler hiperfiltrasyonda artış gözlenir. Bu durum glomerüloskleroza ilerleten mikroalbuminüri ile eşlik eder, glomerüler mezengiyumda ekstrasellüler matriks proteinleri birikirken, tübulointersitisiyel fibrozis oluşur ve glomerüler filtrasyon oranında artış gözlenir (145). Diyabette, dolaşımdaki RAS baskılanırken, böbrek dokusundaki RAS sistemi aktive olur. Hiperglisemi sonucu indüklenen oksidatif stres, endotelial hasar, vazokonstriksiyon, trombozis, inflamasyon sonucunda dokuda AII artar. AII'nin etkileri plazma membranında bulunan AT1 ve AT2 reseptör alt tipleri aracılığı ile gerçekleşir. Diyabetin erken dönemlerinde AT1 reseptörleri upregüle olurken, AT2 reseptörleri downregüle olur. İnsülin direnci AT1 reseptörlerinin upregülasyonu ve NAD(P)H oksidaz'ın aktivasyonu ile gerçekleşen endotelial dokudaki serbest radikallerin artışıyla ilişkilidir. Dokudaki hasarı önlemek için uygulanan tedavilerden AT1 reseptör blokörleri ile tedavide oksidaz aktivitesi normale indirgenmekte ve endotelial fonksiyon korunmaya çalışılmaktadır (146).

Zimpelmann ve ark.ları STZ indüklü diyabetik ratlar ve STZ indüklü insülin implant tedavisi uyguladıkları ratlarda erken dönemde (2 hafta sonra), jukstaglomerüler hücrelerde ve proksimal tübül hücrelerinde renin mRNA ve protein ekspresyonunu, radyoimmun yöntemi ile plazma ve böbrekte AII seviyelerini ve western blot analizi ile kortikal proksimal tübüllerde AT1 reseptörünü incelemişlerdir. Plazma ve böbrek AII seviyelerinin STZ diyabetik grupta arttığı gözlenmiştir. AT1 reseptörünün protein ekspresyonunun STZ diyabetik grupta tüm kortikal ve proksimal tübüllerde azaldığını göstermişlerdir. Tübüler AT1 üretiminin lokal AII sentezi ile ilişkili olabileceğini düşünmüşlerdir (145).

Mezzano ve ark.ları diyabetik nefropatili hastalardan aldıkları böbrek örneklerinde tübül hücrelerde ve intersitisiyel hücrelerde AII'nin arttığını, AT1'in ise aynı hücrelerde azaldığını göstermişlerdir (147).

Hsieh ve ark.ları ise ekstrasellüler glikozun kültür proksimal tübül hücrelerinde, reaktif oksijen türlerini kullanarak AII gen ekspresyonunu stimule ettiği bildirilmiştir. Bu çalışmada antioksidan kullanarak ROS ürünleri üretiminin baskılanmasının glikoz indüklü anjiyotensin üretimini önleyebileceğini ya da azaltılabileceğini böylece diyabetik nefropatinin önlenebileceğini düşündürmüşlerdir (148). Başka bir çalışmada ise yüksek yağ diyeti ve düşük doz (30 mg/kg) STZ ile diyabet oluşturulan ratlarda 12-lipoksigenazın (12-LO) etkisi ve AT1 ile ilişkileri değerlendirilmiştir. Hiperglisemi ile dislipideminin birlikte oluşturulduğu modelde tedavi almayan grubun kan glikoz konsantrasyonu, albuminuri ve glomerüler hipertrofi, böbrek/vücut ağırlığı oranları glomerüler p27 ekspresyonları ile birlikte AT1'in de in vitro ve vivo olarak arttığını belirlemişlerdir (149).

Biz de bu literatür ile uyumlu şekilde kontrol grubunda artmış tübulointersitisiyel ve glomerüler AT1 immunhistokimyası gözlerken, STZ ile diyabet oluşturulan gruplarımızda (DM, 5/6Nf+DM) tübulointersitisiyel ve glomerüler AT1'in immunhistokimyasal olarak azaldığını gözlemledik. LA'nın tedavi edici etkisinin değerlendirildiği DM+LAT ve 5/6Nf+DM+LAT grubunda AT1 immunohistokimyasının tübül ve glomerüllerde arttığını ve kontrol grubuna benzer immunpozitif boyanma gösterdiğini bulduk.

RAS sistemi kan basıncının düzenlenmesinde ve hücre dışı sıvı hacminin korunmasında önemli rol oynar. AII'nin glomerüllerin efferent arteriyolları üzerine olan vazokonstrüktör etkisi, afferent arteriyol üzerine olan vazokonstrüktör etkisinden daha belirgin olduğu için renin-anjiyotensin aldosteron sisteminin uyarılması, intraglomerüler basıncı arttırıcı etki gösterir. İntraglomerüler basıncın artışı hem kapiller hasara yol açması, hem de proteinüriyi arttırması açısından sakıncalıdır. Proteinüri sonucunda tübül epitel hücrelerinden proinflamatuvar sitokinlerin sentez ve salınması uyarılır ve intersitisiyel inflamasyon ve fibroze yol açar. Böbrek mezengiyal hücrelerinde de hipertrofi ve hiperplaziye yol açarak hücre dışı matriks birikimini artırır (51).

Cao ve ark.ları subtotal nefrektomi oluşturdıkları ratlarda, ilerleyen böbrek hasarında AII reseptörleri AT1 ve AT2'yi renal salınımlarını in vitro otorafyografi ve immunhistokimyasal olarak değerlendirmişlerdir. Sonuçta remnant böbrek modelinde AT1 gen ekspresyonunun kontrol grubuna göre düşmüş olduğunu, immunhistokimyasal olarak da AT1 reseptör proteininin glomerüllerde azalırken, tübülointertisyumda artmış olduğunu gözlemişlerdir (130).

Biz de nefrektomi modeli uyguladığımız 5/6Nf grubunda AT1'in immunhistokimyasal olarak tübulointersitisiyel alan ve glomerüllerde kontrol grubuna göre azaldığını gözledik. LA'nın tedavi edici etkisinin değerlendirildiği 5/6Nf+LAT grubunda AT1 immunhistokimyasının tübül ve glomerüllerde arttığını ve kontrol grubuna yaklaştığını gözledik.

Bizim sonuçlarımızla benzer şekilde, Wang ve ark.ları yaptıkları çalışmada Sprague-Dawley ratları 3 gruba ayırmışlardır. Birinci grup 2K1C hipertansiyon oluşturulan ve sham opere edilen kontrol grubu, ikinci grup 2K1W hipertansiyon oluşturulan grup ve sham opere edilen kontrol grubu, üçüncü grup da AII indüklü hipertansiyon oluşturulan grup olmak üzere üç grup oluşturmuşlardır. Her üç grupta da sistolik kan basıncı ölçümlerinin kontrol gruplarına göre artmış olduğu gözlenmiş ve böbreklerinde AT1a ve AT2 alt tip reseptörlerinin dağılımlarının western blot yöntemi ile protein ekspresyonlarını ve immunhistokimyasal olarak böbrek dokusundaki dağılımlarını incelenmişlerdir. Sonuçta frozen kesitlerde, normal rat böbreklerinde AT1a reseptörünün glomerül, proksimal tübül ve toplayıcı tübüllerde yoğun immunreaktivite gösterdiğini gözlemişlerdir. Ayrıca makula densa hücrelerinde ve interlobüler arterlerde de yoğun immun pozitif boyanma olduğu gözlenmişlerdir. Hipertansiyon oluşturulan diğer gruplarda kontrol grubuna göre AT1a reseptörlerinin çok daha az yoğun olduğu bulunmuştur (151).

Sonuçta diyabet ve nefrektominin ayrı ayrı ve birlikte uygulandığı gruplarda AT1 reseptörlerinin azaldığını ve tedavi edilen gruplarda arttığını gözlemlemiş olduk.

Diabetes Mellitus, Hipertansiyon ve VEGF ilişkisi

Diabetes Mellitus PKC aktivasyonu, sitokin ve büyüme faktörlerinin aktivasyonu, renin anjiyotensin sisteminin aktivasyonu ve bunun sonucunda renal VEGF ürünlerinin artışı gibi birçok patolojik durum ile birlikte gözlenir. Cooper ve ark.ları, VEGF mRNA ve protein

düzeyini diyabetik ratlarda glomerüllerde, distal ve toplayıcı tübüllerde kontrol grubuna göre artmış olarak bulmuşlardır (152). Braun ve ark.ları spontan diyabetik ratlarda hastalığın başlarında böbrek dokusunda VEGF protein ve mRNA seviyelerinin arttığını göstermişlerdir (153). Hiperglisemi VEGF ilişkisine bakıldığında, Hoshi ve Kim hipergliseminin VEGF gen ve protein ekspresyonunu PKC aracılığı ile farklı hücrelerde uyardığı, VEGF m-RNA ve protein ekspresyonunu böbreğin tübüloepitelyal ve glomerüler hücrelerinde yüksek glikoz seviyelerine maruz kaldıktan sonra arttırdığını göstermişlerdir (154, 155). PKC inhibisyonunun ise hiperglisemi ile artan VEGF üretimini inhibe ettiği bildirilmiştir (156). Ayrıca Bello-Reuss ve ark.ları diyabetik böbrekte hipergliseminin yanı sıra diyabetik dokuda zamanla biriken İGÜ'lerin de VEGF ekspresyonunu artırdığını bildirmişlerdir (157). Kamba ve ark.ları podositlerde VEGF üretiminin azaltılmasını sağlayan genetik manipülasyonlu farelerde, glomerüler kapillerlerde endotelial fenestrasyon kaybı, glomerüler endotelial hücrelerde proliferasyon, podosit kaybı ve proteinüri olduğunu gözlemişlerdir (158). Bu çalışmalar VEGF'in podosit fonksiyonu ve glomerüler filtrasyondaki rolünü ortaya koymaktadır.

Nakawaga ve ark.ları 2009 yılında diyabetik nefropatide anormal anjiyogenezi anlattıkları çalışmalarında neovaskülarizasyonun glomerüler hipertrofi ve diyabetik nefropati ile ilişkili olduğunu söylemişlerdir. Ayrıca elektron mikroskopik bulgulara da glomerüler hipertrofinin, kapiller okluzyon, fibrinoid lezyonlar, tübülointersitisiyel hasar ve üriner albumin atılımı ile ilgili olduğunu bildirmişlerdir (159). Diyabetin erken safhasında endotelial hücre proliferasyonunun arttığını, apoptozun ise inhibe olduğunu ve ayrıca VEGF aktivitesinin orta hasarlı glomerüllerin endotelinde arttığını ancak şiddetli hasar gören glomerüllerde azaldığını bildirmişlerdir (159). Hu ve ark.ları benzer bulguları tip II DM'li insanlarda da göstermiştir (160). Cha ve ark.ları, diyabetik böbreklerde glomerüler endotel üzerinde VEGF reseptörlerinin de artış olduğunu göstermişlerdir (161). Ancak ileri aşamadaki DM'lerde, şiddetli glomerüloskleroz gözlenmesi durumunda VEGF'in azaldığı ve bu azalmanın podosit kaybı ile ilişkili olduğu düşünülmüştür (162).

Bizim çalışmamızda bu çalışmalar ile paralellik göstermiş ve glomerüler ve tübüler VEGF artışında benzer sonuçlar ortaya koymuştur. Podosit kökenli VEGF'in proteinürinin düzenlenmesinde rol aldığına ilişkin kanıtlar vardır. STZ diyabetik rat ya da tip II *db/db* farelerle yapılan çalışmalarda (her iki modelde de VEGF'in aşırı ekspresyonu gözlenir) anti

VEGF antikoru ile tedavi edildiğinde albuminüride anlamlı düzelme gözlenmiştir (163). Bu mekanizma üzerinde hala çalışılmaya devam edilmektedir. Ancak VEGF'in plazma nitrik oksit akışında artış ve vazodilatasyona neden olduğu endotelial hücreler arasındaki bağlantıları açtığı ve endotelial pencerelenmeyi devam ettirdiği düşünülmektedir (164). Anjiyogenezis organ gelişimi, doku hasarında ve hastalıklarda önemli role sahiptir. Yeni kan damarların oluşumundaki basamaklardan biri vasküler permeabilitenin artmasıdır. VEGF vasküler fenestrasyon ve tight junctionların düzenlenmesi yoluyla anjiyogenezde görev alır ancak artmış permeabilite mikrovasküler hastalıklar ve organ patolojilerine yol açan patolojik anjiyogenezle de ilişkilidir (165, 166).

Hipertansiyon ve glomerüler disfonksiyon nedeniyle oluşan proteinüri sistemik VEGF'in blokajı ve sistemik VEGF'in inhibisyonu için en sık gözlenen nedenler arasındadır (167). Ayrıca kollateral damar gelişimi ve yara iyileşmesinin bozulması da hipertansiyon ve proteinüri kadar diyabetli popülasyonda VEGF aktivitesinin düşmesine neden olmaktadır (168). Nefrektomi modelinin sonuçları genellikle vasküler yapılarda değerlendirilmiştir. Kelly ve ark.ları subtotal nefrektomi oluşturdukları ratlarda, 12 hafta süre ACE inhibitörü perindopril kullanmışlar ve RECA-1 ile antikoru glomerüler kapiller endotelial hücre dansitesini ve in situ hibridizasyon tekniği ile VEGF miktarını ölçmüşlerdir. Glomerüloskleroz skorlamalarında nefrektomi grubunda 3.5 olarak saptanırken kontrol grubunda 0.1 olarak belirlenmiştir. Dansitometrik analizler sonucunda renal VEGF salınımı subtotal nefrektomili ratlarda kontrol ve tedavi grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. Glomerüloskleroz ile VEGF mRNA miktarını korele ettiklerinde ters orantılı bulmuşlardır (169). Bu çalışma Kamba ve ark.larının yaptığı çalışmayı desteklemektedir (158).

Progresif intersisitiyel fibrozis peritübüler kapiller kaybı ve renal hasarın ilerlemesini sağlayan kronik iskemi ve hipoksi ile sonuçlanır. Deneysel çalışmalarda artmış apoptozis ve azalmış kapiller tamiri ile gözlenmektedir. Azalmış kapiller tamiri endotelial hücre proliferasyonunun bozulması ile karakterizedir. VEGF renal hasarın gelişmesinde rol alan çok önemli proanjiyogenik büyüme faktörlerinden biridir. Renal VEGF salınımının yaş artışıyla ve remnant böbrek modellerinde böbrek hasarı ile birlikte azaldığı gösterilmiştir. Şiddetli fibrozis durumlarında ve peritübüler kapiller yoğunluğun azaldığı durumlarda VEGF'in azaldığı düşünülmektedir. Kang ve ark.ları VEGF tedavisinin remnant böbrek

modelinde endotelial proliferasyon, kapiller yoğunluğunun devamı, interstisiyel fibrozisin azalması ve renal fonksiyonların stabilizasyonunu sağladığını göstermişlerdir (139).

Vasküler değerlendirmeler sonucunda tübüler VEGF değerlendirmesi yapan Kanellis ve ark.ları ise endotelial olmayan hücrelerde (NRK-52E; normal rat böbreğinden elde edilen hücre serileri) tübüler epitel hücrelerinde VEGF-1 ve 2 reseptörlerinin varlığını RNA izolasyonu, nortern blotting, immunohistokimya ve western blotting gibi yöntemler ile saptamışlardır (170).

Misra ve ark.ları 2010 yılında domuzlara uyguladıkları nefrektomi modelinde 24, 37, 42 ve 84. günlerde western blotting yöntemi ile VEGFA, MMP-1 ve MIF protein analizlerini yapmışlardır. VEGFA miktarının 24. günde 1.35 ± 0.22 , 37. günde 1.98 ± 0.05 değeri ile artış gösterdiğini, 42. günde 1.09 ± 0.24 a düştüğünü ve 84. günde 0.8 ± 0.02 'ye düştüğünü göstermişlerdir ve VEGFA ve diğer moleküllerin remnant böbrek modelinde arttığını bildirmişlerdir (171).

Çalışmamızda glomerül çapı, glomerül başına düşen nükleus sayısı, intersitisiyel fibrozis gibi morfolojik kriterlerin DM, 5/6Nf ve 5/6Nf+DM gruplarında artmış olması renal hasar mekanizmasının hızla devam ettiğini düşündürmektedir. Buna karşın glomerüloskleroz değeri, nefrektomili gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış bulunmuştur. Ancak, deneysel modellerin uygulandığı gruplarda skleroz skorlamasının orta şiddette olduğu, tübüllerde ise anlamlı fark bulunmadığı gözlenmiştir.

Nefrektomi uygulanan 5/6Nf grubunda kontrol ve LA grubuna göre VEGF ekspresyonunun arttığını, 5/6Nf+LAT grubunda ise 5/6Nf grubuna göre azaldığını gözledik. 5/6Nf+DM grubunda da kontrol grubuna göre tübüler ve glomerüler VEGF artışı olduğunu, 5/6Nf+DM+LAT grubunda 5/6Nf+DM grubuna göre azaldığını belirledik.

Bunun nedeninin subtotal nefrektomili ratlarda 8 hafta süresinde böbreğin glomerül ve tübüllerinde hasar mekanizmasının devam ediyor olması olarak değerlendirdik. Tübül ve glomerüllerde inflamatuvar maddeler kadar vazoaktif anjiyogenetik maddelerin de böbreğin koruma mekanizması olarak artış gösterdiği düşünüldü.

Biz çalışmamızda artmış fibrozis ve glomerüler genişlemenin VEGF ekspresyonu ile ilgili olabileceğini düşündük.

Bu sonuçlar bize diyabet ve hipertansiyon gibi mikrovasküler ve makrovasküler patolojileri içeren renal hastalıklarda, VEGF'in böbrek hasarının progresyonu üzerinde önemli rolü olduğunu düşündürdü. LA'nın da renal hasarın ilerlemesini önleyici önemli rolü olabileceğini göstermiş olduk.

Diabetes Mellitus, Hipertansiyon ve ET-1 İlişkisi

Son yıllarda ET-1'in renal fonksiyonlar kadar renal hastalıklar üzerine de etkileri tartışılmaktadır. ET-1 böbrekte renal damarlarda ve nefron segmentlerinde otokrin ve parakrin olarak aynı zamanda renal hemodinamiklerin ve tübüler su ve sodyum geri emiliminin düzenlenmesinde rol alır. ET-1 sistemindeki değişiklikler, sonuçta renal ve kardiyovasküler hastalıklara (endothelial disfonksiyon, hipertansiyon gibi) neden olmaktadır (172).

Diyabette oluşan oksidatif stress nedeniyle makrofajlar üzerindeki AGE reseptörleri olan RAGE' ler AGE'ler ile etkileşir ve NF-kB aktive olur ve mitogen-aktive protein (MAP) kinaz sinyal yolu aktive olur. NF-kB yolu endotelin-1, doku faktörü, thrombomodulindeki artış ve proinflamatuvar sitokinler (TNF-alfa, IL-6 ve IL-1Alfa) aracılığı ile düzenlenir (173). Diyabetik nefropatide ET-1, mezangiyal hücre proliferasyonunu ve ekstrasellüler matriks üretimini indükleyen bir molekül olarak bilinmektedir. Diyabetik glomerüllerde mRNA seviyeleri artmış olarak gözlenmiştir.

Sorakin ve Kohan ET-1'in mezangiyal hücrelerde diyabetik nefropatide hiperglisemi nedeniyle artış gösterdiğini bildirmişlerdir (174). Hung ve ark.ları diyabetik böbrekte ET-1'in ROS ürünlerini düzenlemedeki rolünü araştırmışlardır. İn vitro çalışmak için rat glomerüllerini izole edip radioimmün yöntemiyle ET-1 düzeylerine ve spektrofotometre ile süperoksit seviyesine bakmışlardır. Kontrol grubuna göre süperoksit ve ET-1 değerlerinde paralel bir artış gözlemişlerdir. Kontrol grubunda, glikoz konsantrasyonunun in vitro olarak diyabet grubuna göre yüksek olarak bulmaları insülinin ET-1 üretimini baskıladığı sonucuna varmışlardır. Ayrıca, in vivo olarak süperoksit dismutaz ve katalaz vermişler ve diyabet oluşumundan 1 hafta ve 1 ay sonra bazal ET-1 değerlerinin rat glomerülünde artış gösterdiğini gözlemişlerdir. Sonuçta endojen ya da eksojen ROS'un ET-1 üretimini arttırdığını ve insulin eksikliği ya da hipergliseminin bu duruma neden olabileceğini düşünmüşlerdir (175).

Bizim alıamımızda da benzer şekilde STZ diyabetik ratlarda ET-1 seviyelerinin immunhistokimyasal olarak glomerüllerde ve túbül epitelinde arttığını gözledik. LA'nın tedavi edici etkisinin araştırıldığı gruplarda ise ET-1 seviyelerinin azaldığını gözledik.

Endotelin plazma seviyelerinin, esansiyel hipertansiyonun varlığı ya da şiddeti ile bir ilişkisi bulunmamaktadır (176). ET-1'in düşük dozlarda sistemik olarak uygulanmasında kan basıncında bir miktar artış gözlenmiştir (177). Deneysel modellerde ET1'in uzun süreli infüzyonunda stroke ve renal hasar meydana geldiği gözlenmiştir (178)

Endotel fonksiyonları ve hipertansiyonla ilişkisini değerlendirildiği bir derleme çalışmasında ET-1'in öneminden bahsedilmiştir. ET-1'in endotelden baskın olarak sentezlendiğini, damar düz kasındaki ET_A reseptörüne bağlanarak vazokonstrüksiyon ve hücre büyümesine neden olduğunu, ET_B reseptörleri ise NO salınımı yoluyla vazodilatasyona yol açtığını bildirmişlerdir. Hipertansiyonda endotel disfonksiyonu sonucunda hemodinamik strese cevap olarak üretilen ve vazodilatasyona neden olan NO salınımı azalırken anjiyotensin dönüştürücü enzim ve güçlü bir vazokonstrüktör olan ET1 yapımı artmaktadır. Vasküler dokuda ACE birikimi sonucunda yüksek konsantrasyona ulaşan AII, adezyon molekülleri ve sitokinlerin artmasına neden olmaktadır. Matriks ve vasküler hasarlar başlamakta ve sonuçta endotel disfonksiyonu ve vasküler rezistansa neden olarak hipertansif mekanizmanın gelişmesine yol açmaktadır (179).

İn vitro modellerde, ET-1'in anjiyotensin I'in, anjiyotensin II'ye dönüşümünü indükleyerek epinefrin ve aldosteronun sentezini stimule ettiği, ve bu şekilde ET-1 ile renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminin sinerjistik etkisi ile vazokontrüksiyona yardımcı olduğu gözlenmiştir (180). Endotelin sisteminin disregülasyonu sonucunda hipertansiyonun çoklu organ hasarınının (örneğin, ilerleyici renal hastalıklar, serebrovasküler hastalık, ateroskleroz ve kardiyak hastalıklar) oluşmasına katkıda bulunduğu düşünülmüştür

Sorakin ve Kohan hipertansiyonda ET-1'in mezangiyal hücrelerde arttığını bildirmişlerdir (174). Lariviere ve Lebel ET-1 in renal fonksiyonlarını değerlendirdikleri derleme çalışmalarında, renal yetmezlik ve glomerüler skleroz gösteren derecesiyle üriner ET-1 atılımı arasında paralellik olduğunu bildirmişlerdir. ET-1 kadar öncül maddesi olan preproET-1'in de renal hasarın gelişimi ile paralel olarak proksimal túbül epitelinde ve glomerüler hücrelerde arttığı gözlenmiştir. Transgenik farelerde de ET-1'in aşırı salınımının

vasküler hipertrofi, interstisiyel fibrozis ve glomerüloskleroza artış gösterdiğini söylemişlerdir (172).

Bu çalışmalar ile paralel şekilde bizim çalışmamızda da nefrektomi ile hipertansiyon oluşturulan ratlarda ET-1'in tübüler ve glomerüler olarak artış gösterdiğini ve LA ile tedavi edilen gruplarda ET-1 seviyelerinin azaldığını gösterdik.

Sonuç olarak ET-1 in böbrek üzerinde pro-inflamatuvar, hipertrofik ve pro-fibrotik özellikleri olduğunu düşündük. Diyabet ve hipertansiyon gibi hastalıklarda endotelinin bloke edilmesinin kan basıncı, inflamasyon, fibrosis gibi etkileri önleyebileceğini düşündük.

Diabetes Mellitus, Hipertansiyon ve Kaspaz-3 İlişkisi

Apoptozis normal doku organogenezi ve doku turnoverında gereksiz ve zararlı hücrelerin ortadan kaldırılmasında ve dokunun homeostazının sağlanmasında rol alan önemli bir mekanizmadır. Apoptozis Latince 'apo=ayrı' ve 'ptosis=düşen' kelimelerinin birleşiminden oluşan sonbaharda yaprakların düşmesi anlamında kullanılan bir terimdir. Nekrozis mekanizması ile bazı fizyolojik özellikleri benzerlik gösterirken özellikle hücrenin ölüm yoluna girdikten sonraki geri dönüşsüz aşaması apoptoziste nekrotik hücrelerden farklılıklar gösterir.

Apoptozisin belirleyici morfolojik özellik özellikleri en basit olarak HE ve PAS boyamaları ile histolojik kesitlerde belirlenebilmektedir. HE boyamalarında apoptotik cisimler koyu mavi nüklear fragmentler ve kondanse yapılar olarak, sitoplazma ise eozinofilik olarak gözlenir. Apoptotik hücreler genellikle tek tek hücreler halinde bulunsalar da, bazıları birbirlerine yapışık halde gözlenebilirler ve bu hücrelerin çevrelerinde nötrofil infiltrasyonu gibi akut inflamatuvar hücre toplulukları gözlenebilir. Epitelial ya da endotelial hücre hatlarında apoptotik hücreler lümene doğru çıkıntılar yaparlar. Bu noktada basit morfolojik özellikler nekrotik hücreler ile karışabilir ve daha ayırıcı özelliklere ihtiyaç duyulur. TEM'de bu özellikler tanımlanabilmektedir. Hücrelerde genellikle kondanse ve kresenterik çekirdek kromatini gözlenir ve apoptotik cisimciklerin membran integritesi korunur. Makrofaj hücreleri ya da komşu hücrelerin lizozomları tarafından apoptotik cisimciklerin degradasyonları ve fagositozları gözlenir. Mikroskobik hücre görüntülerinin yanı sıra biyokimyasal ve moleküler özellikleri ile apoptotik hücrelerin tanımlanmaları mümkündür ve histolojik görüntüler bu yöntemler ile desteklenmelidir. En sık kullanılan biyokimyasal

yöntemlerden biri internukleozomal DNA fragmentasyonlarının gösterilmesidir ve 1990'ların başında Klenow tarafından DNA polimeraz yöntemi ile DNA fragmentasyonları in situ olarak işaretlenmiş, ardından enzimatik bir yöntem olan terminal deoksiribonükleotidil transferaz (TdT)-aracılı deoksiüridin trifosfat (dUTP) nick and labelling yani günümüzde TUNEL yöntemi olarak bilinen yöntem kullanılmıştır. Böbrekte de bu yöntem çok sık olarak kullanılmaktadır. Ancak apoptotik morfoloji göstermeyen hücreler de TUNEL pozitif hücreler olarak boyanabilmektedir. Çünkü nekrozisin erken safhalarında da DNA fragmentasyonları gözlenebilmektedir. Örneğin iskemi-reperfüzyon hasarı sonrasında çok yüksek TUNEL pozitif hücre sayısına rastlanabilmekte, ancak bu hücrelerin bir çoğunda DNA daha sonra tamir edilmektedir (132).

Son dönemlerde hücrelerde apoptozisin belirlenmesinde in situ olarak aktive olmuş kaspazların belirlenmesi kullanılmaktadır. Kaspazlar sistein proteaz ailesine aittirler ve birçok memeli türünde hücrelerde inaktif prekürsör proteinler olarak bulunurlar. Kaspazlar aktive olmadan önce hücrelerde çok sayıda protein aktive hale gelir ve ardından apoptozisin morfolojik değişiklikleri başlar. İn situ olarak yarıklanmış aktif kaspaz-3 hücrede öldürücü (executioner) kaspaz olarak bulunur ve histolojik işaretlemelede özellikle tercih edilir çünkü bu aşamada artık hücre geri dönüşü olmayan bir hücre ölüm mekanizmasına girmiştir (132).

Menini ve ark.ları STZ diyabetik ratlarda 7. Gün, 2, 4 ve 6. aylardaki podosit hücre apoptozisini değerlendirmişlerdir. 7. gün ve 2. ayda gözardı edilebilir bir artış gözlenirken, 4. ve 6. ayda aktif kaspaz 3'ün glomerüllerde arttığını gözlemişlerdir. Glomerüler skleroz indeksi 2. ayda da diyabetik grupta artmışken, 4. ve 6. ayda kontrole göre anlamlı artış daha da belirgindi. Glomerül başına düşen nükleus sayısı ise 6. ayda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştı (182). Sustzak ve ark.ları ise bu çalışmanın aksine STZ diyabetik ratlarda 4. haftada glomerüllerde TUNEL pozitif hücrelerin anlamlı artış gösterdiğini, Mishra ve ark.ları db/db fare modelinde 8. Haftada değil 16. haftada TUNEL ve kaspaz-3 pozitif hücrelerin mezengiyal hücrelerde artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Menini ve ark.ları diğer araştırmacıların aksine podosit apoptozisinin deneysel diyabetin erken dönemlerinde değil proteinüri ile birlikte podosit proteinlerinin de kaybolmaya başladığı son dönemde ortaya çıktığını söylemişlerdir (183). Bamri-Ezzine ve ark.ları STZ diyabeti ratlarda kaspaz-3 ün tübüler hücrelerde arttığını, Murata ve ark.ları glomerüler hücre apoptozisinin arttığını ve Pesce ve ark.ları da STZ diyabetik ratlarda 6. ayda TUNEL pozitif hücrelerin arttığını bildirmişlerdir (184, 185,186).

Sato ve ark.ları STZ indüklü diyabetik ratlarda tübüler epitel hücrelerinde ve normal böbrek epitel hücrelerinde in vitro hücre kültür hattında yüksek glikozun apoptoz üzerine etkilerini incelemişlerdir. Kaspaz aktivasyonu 8. Haftada kontrol grubundan 1.5 kat yüksek bulunurken, 12. haftada 2.1 kat artmış bulmuşlardır. Aynı şekilde proksimal ve distal tübül epitellerinde TUNEL pozitif hücre sayısını 16. haftada ve 24. haftada anlamlı olarak artmış bulmuşlardır (187). Tüm bu çalışmalarda glomerül ve tübüllerde apoptotik hücre artışının tübüler atrofi ve glomerüler skleroz gelişimi ile ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır. Bizim sonuçlarımızda da kaspaz-3 ün 8 hafta sonunda DM grubunda arttığını gözlemledik. 8. haftada deneysel olarak kronik diyabet oluştuğunu düşündüğümüzde, literatür ile benzer şekilde nefrotik hasar mekanizmasının artış gösterdiği dönemde apoptotik hücrelerin de artış göstermesi histomorfometrik bulgular ile uyumluluk göstermiştir. Renal hasar sürecinde proliferasyon ve apoptozisin de bir denge içerisinde olduğunu düşündürdü.

Hipertansiyonun böbrek üzerindeki etkilerine baktığımızda, hipertansiyon oluşunca oksidatif stress gelişir ve bunun da sonucunda NF-kB aktive olur, adezyon moleküllerinin salınımı ile birlikte lökosit infiltrasyonu gelişir. Bunların ardından heat şok proteinlerinin salınımı indüklenir ve hücrelerin apoptozisi gerçekleşir (142).

Dlamini ve ark.ları 2004 yılında yazdıkları apoptozin moleküler mekanizması ve genetik özellikleri ile ilgili yazıda apoptozis ve renal hasar üzerindeki etkilerini tartışmıştır. Glomerülonefritis, akut ve kronik renal yetmezlik, diyabetik nefropati gibi hastalıkların hem deneysel modellerinde hem de klinik bulgularında renal hasar gelişiminde apoptozun önemli rolü olduğu ve subtotal nefrektomili hayvan modellerinde renal fibrozisin ilerlemesi ile birlikte apoptozis oranında artış gözlemlendiği bildirilmiştir (188).

5/6 Nf modeli ile kronik renal yetmezlik oluşturulan wistar ratlarda 7, 15, 30, 60, 90 ve 120. günlerde renal doku TUNEL yöntemiyle ve elektron mikroskopik olarak incelenmiştir. Glomerüllerde, tübüler hücrelerde ve intersitisiyel hücrelerde apoptotik hücre sayısında zamanla ve glomerüler hasar artışı ile paralel bir artış gözlenmiştir. Bu sonuçlar renal hasarın ilerlemesinde apoptozisin önemli rolü olduğunu düşündürmüştür (189).

Renal hasarın erken safhasında renal büyüme hücrelerin hipertrofik ve hiperplazik hale gelmesiyle gerçekleşir (190). İleri safhalarda ise fibroz dokunun artışı ile tübüler ve glomerüler hücreler geriler ve tübulointersitisel hasar ve glomerüllerde skleroz gelişir.

Genellikle proliferasyon ve apoptoz bir denge içerisinde gerçekleşir. 5/6 Nf sonrasında hemodinamik değişikliklere cevap olarak hücrel hipertrofi ve proliferatif süreçte artış gözlemlendiği gösterilmiştir (191).

Soto ve ark.ları wistar kyota ratlara ve spontan hipertansif ratlara subtotal nefrektomi uygulamış ve bu gruplara hipertansiyonu kontrol eden ajanların ayrı ayrı ve birlikte uygulandığı gruplar oluşturulmuş ve apoptotik oranlar ile lokalizasyonları değerlendirilmiştir. TUNEL boyanmasında spontan hipertansif ve subtotal nefrektominin birlikte uygulandığı grupta en fazla pozitif hücre gözlenirken lokalizasyonları da en fazla tübulointersitisiyal hücrelerde olmak üzere, daha az glomerüllerde ve bowman dış yaprağında gözlenmiştir. Hipertansiyonu kontrol eden ajanların kullanılması ile TUNEL pozitif hücre oranının azaldığı gözlenmiştir (192). Kitamura ve ark.ları 5/6 nefrektomi modelinde glomerüler endotelial hücrelerde apoptozisi değerlendirmiş. Bu hücrelerin kayıplarının glomerüloskleroz gelişiminde rol alabileceğini ileri sürmüşlerdir (193). Weissgarten ve ark.ları 30 adet Sprague-dawley ratın 6 tanesine sham grubu olarak nefrektomi uygulamışlar. Kalan 24 tanesine tek taraflı sol nefrektomi uygulayıp ve cerrahi uygulamadan 30 dk sonra ve 24 saat sonra böbreklerden mezengiyal hücre kültürü elde etmişlerdir. Kontralateral nefrektominin endojen AII yoluyla kalan böbrekte mezengiyal hücrelerde proliferasyon ve apoptozisi stimuli ettiğini düşünmüşlerdir (194).

Mino ve ark.ları subtotal nefrektomi uyguladıkları immatür ratlarda düşük ve yüksek protein alımını incelemişlerdir. Proksimal ve distal tübüllerde TUNEL pozitif hücre yüzdesini değerlendirmişlerdir. 4. haftadan 8. haftaya kadar artan bir TUNEL pozitif hücre artışı gözlemişlerdir (195). Hattori ve ark.ları 5/6 nefrektomi oluşturdukları ratlarda glomerüllerde 7, 14, 56 ve 96. günlerde TUNEL pozitif hücre sayısını ve Bax antikorunu değerlendirmişlerdir. TUNEL pozitif hücre sayısı 7. günden 96. güne kadar düzensiz bir artış göstermiş, Bax ise bifazik bir dağılım göstererek 1-14. günlerde artmış daha sonra azalmış ve 96. günde en yüksek düzeyine ulaşmıştır (133). Bizim sonuçlarımızda da nefrektomi ile nefrektomi ve diyabetin birlikte oluşturulduğu gruplarda 8. haftada apoptotik hücrelerin kontrol grubuna göre artmış olduğu gözlemlendi. DM grubunda da benzer sonuçlar gözlenmesi 8 haftalık süreç sonunda renal hasarın olduğu aktif dönemde olduğunu düşündürdü. Bu süreçte apoptotik ve proliferatif süreçlerin bir arada süregeldiğini düşündürdü. LA uygulanan

gruplarda ise apoptozis oranının kontrol grubuna yakın seyretmesi LA'nın deneysel modellerle birlikte başlanması koruyucu etki oluşturduğunu düşündürdü.

Biyokimyasal Değerlendirme

Renal hasar klinik ve deneysel çalışmalarda biyokimyasal olarak serum ya da idrar BUN ve kreatinin testleri ile desteklenmektedir. Literatüre bakıldığında, Bhatti ve ark.ları ile Melhem ve ark.ları STZ ile diyabet oluşturdukları ratlarda plazma kreatinin seviyelerini deney süresi sonunda artmış olarak buldular (134-128). Kang ve ark.ları 5/6 nefrektomi modelinde BUN değerinin 8. haftada anlamlı olarak arttığını göstermişlerdir (132). Thomas ve ark.ları 5/6 Nf modeli ile kronik böbrek yetmezliği oluşturulan wistar ratlarda deney başlangıcından itibaren 7, 15, 30, 60, 90 ve 120. günlerde serum kreatinin ve ürin protein değerleri incelendiğinde 7. günden 120. güne kadar her iki parametrenin de artış gösterdiği gözlenmiştir (189). Benighi ve ark.larının yaptığı çalışmada da benzer şekilde 5/6 nefrektomi uygulanan ratlarda 45. günde serum kreatinin değerlerinin artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Cao ve ark.ları da benzer şekilde subtotal nefrektomi uyguladıkları ratlarda deney süresinin sonunda plazma kreatinin değerinin arttığını göstermişlerdir (62, 130). Bizim çalışmamız da literatür ile benzer sonuçlar vermiştir. Deney sonunda böbrek fonksiyon testlerini değerlendirmek için serum BUN ve kreatinin değerlerini incelediğimizde, diyabet ve nefrektomi modellerinin uygulandığı gruplarda bu değerlerin artış gösterdiği LA uygulanan gruplarda ise bu değerlerin kontrol grubuna daha yakın değerlerde olduğu gözlemlendi. Biyokimyasal parametrelerimiz aynı zamanda histomorfometrik değerlerle de uyumluydu.

7 **SONUÇ VE ÖNERİLER**

- STZ ile diyabet oluşturulan, 5/6 Nefrektomi uygulanan ve 5/6 Nefrektomi ve diyabetin birlikte oluşturulduğu deneysel modellerde, ağırlık kaybının olduğu, bu modellere özgü karakteristikler olan, STZ gruplarında plazma glikoz seviyelerinin arttığı ve nefrektomi gruplarında kan basıncının arttığı gözlemlendi.
- Histomofrometrik incelemeler sonucunda STZ diyabetik ratlarda ve nefrektomi uygulanan gruplarda kontrol gruplarına göre oldukça fazla renal hasar gözlemlendiği ve hipertansiyon ve diyabetin birlikte oluşturulduğu gruplarda renal hasarın progresyonunun ilerlediği belirlendi.
- Tübüler ve glomerüler AT1 azalması ile VEGF ve ET1 artışının tübülointersitisiyel ve glomerüler hipertrofi ile ilişkili olabileceği düşünüldü.
- LA'nın hipertansiyon ve diyabet oluşturulan ratlarda tedavi edici etkisinin olduğu ve böbrek hasarının ilerlemesini durdurduğu saptandı.

- 1- Sungur C, Akpolat T. Böbreklerin Temel Fonksiyonları ve Düzenlenmesi. In: Akpolat T, Utaş C, Süleymanlar G. Editors. Nefroloji El Kitabı. 4. Baskı İstanbul Nobel Tıp Kitabevi. 2007. p.1-251.
- 2- Şahinoğlu K. Kliniğe Yönelik Anatomi. 1. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2007; p. 279-289.
- 3- Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology. Second Edition. Pennsylvania, W.B. Saunders Company, 2001;435-460.
- 4- İçten N. Üriner Sistem. In: Gökmen FG, ed. Sistematik Anatomi, 3 baskı. İzmir Güven Kitabevi, 2003; p. 531-546.
- 5- Kierszenbaum AL. Üreme sistemi In: Demir R, ed. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. 1. Baskı. Ankara, Palme Yayıncılık, 2006; p.365-390.
- 6- Netter FH. Atlas of Human Anatomy. 4. Edition. W.B. Saunders Company, 2009; 330-345.
- 7- Ecder T. Böbrek Fizyopatolojisi. 1. Baskı İstanbul, Medikal Yayıncılık, 2008; 1-20.
- 8- Ross MH, Pawlina W. Histology A Text and Atlas. 5th Edition. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2006; p. 647-684.
- 9- Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Basic Histology. Eleventh Edition. USA, The McGraw-Hill Companies, 2005; 359-77.
- 10- Pavelka M, Roth J. Functional Ultrastructure. Atlas of tissue biology and pathology. 2nd edition. Springer, 2010; 262-272.
- 11- Demirgören S. Vander İnsan Fizyolojisi, 10. Baskı, İzmir Güven Kitabevi, 2010; p. 525-573.
- 12- Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology. 11st edition. WB Saunders Company, 2008,350-78.
- 13- İzbirak CD, Patofizyoloji Renkli Atlası, 1. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2005; 92-132.
- 14- Bağrıaçık N, Diabetes Mellitus: Tanımı, Tarihçesi, Sınıflaması ve Sıklığı, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Diyabetes Mellitus Sempozyumu, 9-18, 1997, İstanbul

- 15- Araz M, Diabetes Mellitus. In: Sağlıker Y,Ed. İç Hastalıkları Prensipleri, 4. Baskı. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2004; p. 2109-2123.
- 16- Cecil Tuzcu M, Cecil Essentials of Medicine Türkçesi. 1. Baskı, İstanbul Nobel Tıp Kitabevi, 2000;533-545.
- 17- Masharani U. Diabetes Mellitus&Hypoglisemia. In:Mcphee SJ, Papadakis MA editors. Current Medical Diagnosis&Treatment. Forty-Eighth Editions. Newyork, McGraw Hill Medical. 2009. p.1053-94.
- 18- Türkiye’de Nefroloji-Diyaliz ve Transplantasyon, Registry 2005. Türk Nefroloji DerneğiYayınları. İstanbul, Art Ofset, 2006;5-7.
- 19- Orhan Y. Diabetes Mellitus. Sencer E (Editör). Endokrinoloji, metabolizma ve beslenme hastalıkları. 1. baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2001;246-51.
- 20- Altıparmak MR, Apaydın S. Diyabetik nefropati. Yenigün M (Editör). Her yönüyle Diabetes Mellitus. 2.baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2001;383-99.
- 21- Earle KA, Porter KK, Ostberg J, Yudkin JS. Variation in the progression of diabetic nephropathy according to racial origin. Nephrol Dial Transplant 2001;16:286-90
- 22- Parving HH, Tarnow L, Rossing P. Genetics of diabetic nephropathy. J Am Soc Nephrol 1996;7:2509-17
- 23- Kurt M, Atmaca A, Gürlek A. Diyabetik nefropati. Hacettepe Tıp Dergisi 2004; 35:12-17
- 24- Suzuki D, Miyata T, Saotome N, Horie K, Inagi R, Yasuda Y, et al. Immunohistochemical evidence for an increased oxidative stress and carbonyl modification of proteins in diabetic glomerular lesions. J Am Soc Nephrol 1999;10:822-32.
- 25- Forbes JM, Soulis T, Thallas V, Panagiotopoulos S, Long DM, Vasan S, et al. Renoprotective effects of a novel inhibitor of advanced glycation. Diabetologia 2001;44:108-14.
- 26- Lehmann R, Schleicher ED. Molecular mechanism of diabetic nephropathy. Clinica Chimica Acta 2000;297:135-144.
- 27- Ishii H, Tada H, Isogai S. An aldose reductase inhibitor prevents glucose-induced increase in transforming growth factor-beta and protein kinase C activity in cultured mesangial cells. Diabetologia 1998;41:362-4

- 28- Leehey DJ, Singh AK, Alavi N, Singh R. Role of angiotensin II in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2000;58:93-8
- 29- Campbell DJ. Circulating and tissue angiotensin systems. *J Clin Invest* 1987;78:1-5
- 30- Makino N, Sügano M, Otsuka S, Hata T. Molecular mechanism of angiotensin II type I and type II receptors in cardiac hypertrophy of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1997;30:796-802.
- 31- Unger T, Culman J, Gohlke P. Angiotensin II receptor blockade and end-organ protection: pharmacological rationale and evidence. *J Hypertens* 1998;16:3-9.
- 32- Duncan JA, Scholey JW, Miller JA. Angiotensin II type 1-receptor genepolymorphisms in humans: physiology and patophysiology of the genotypes. *Curr. Opin Nephrol Hypertens* 2001;10:111-6.
- 33- Williams B. The renin-angiotensin system and pathogenesis of diabetic nephropathy. Mogensen CE (Ed.). In: *Diabetic Nephropathy in Type 2 Diyabetes*. 1st edition. London, Science Press, 2002;57-70.
- 34- Li JH, Huang XR, Zhu H, Johnson R, Lan H. Role of TGF B signaling in extracellular matrix production under high glucose conditions. *Kidney Int* 2003;63:2010-6.
- 35- Twigg SM, Chen MM, Joly AH, Chakrapani SD, Tsubaki J, Kim HS, et al. Advancedglycosylation end products up-regulate connective tissue growth factor (insulin-like growth factor-binding protein-related protein 2) in human fibroblasts: a potential mechanism for expansion of extracellular matrix in Diabetes Mellitus. *Endocrinology* 2001;142:1760-9.
- 36- Oldfield MD, Cooper ME. The biochemistry and pathophysiology of renal lesions in type 2 diyabetes. In: Mogensen CE Editor. *Diabetic Nephropathy in Type 2 Diyabetes*. 1st edition. London, Science Press, 2002. p.41-56.
- 37- Fröde TS, Medeiros YS. Animal models to drugs with potential antidiabetic activity. *Journal of Ethnopharmacology* 2008;115:173-83.
- 38- Öntürk H, Özbek H. Deneysel diyabet oluşturulması ve kan şeker seviyesinin ölçülmesi. *Genel Tıp Derg* 2007;17:231-26.
- 39- Nolan CR, Schrier RW. Kidney in hypertension. In: Schrier RW editor. *Renal and Electrolyte Disorders*. 6th edition. Lippincott Williams&Wilkins, 2005. p.272-324

- 40- Burt VL,Whelton P,Roccella EJ,Brown C,Cutler JA,Higgins M,HoraN MJ,Labarthe D. Prevalance of hypertension in the US adult population.Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey,1988-1991.Hypertension 1995;25:303-304.
- 41- Sansoy V,Soydan İ, Tokgözoğlu L, Adalet K. TEKHARF, oniki yıllık izleme deneyimine göre Türk erişkinlerinde kalp sağlığı. İstanbul Türkiye,2003.
- 42- JNC 7 report. JAMA. 2003 May 21;289(19):2560-72
- 43- Sutters M. Systemic Hypertension. In: Mcphee SJ, Papadakis MA. Current Medical and Diagnosis&Treatment. Forty eighth edition NY.2009.p.377-403.
- 44- Robertson JIS. Renin and the patophysiology of renovascular hypertension. In: Robertson JIS, Nicholls MG editors. The Renin-Angiotensin Sistem. Gower Medica Publishing London.1993. p.1-34
- 45- Agarwal M, Lynn K L, Richads A M,Nicholls M G.Hyponatremic-hypertensive syndrome. With renal ischemia. An under-rocognzed.Hypertension 1999;33: 1020-24.
- 46- Ferranini E,Natali A, Capaldo Bet al. İnsulin resistance hyperinsulinemia and blood pressure. Hypertension 1997; 30:1144-49.
- 47- Badyal DK, Lata H, Dadhich AP. Animal models of hypertension and effects of drugs. Indian Journal of Pharmacology. 2003; 35: 349-62.
- 48- Lerman LO, Chade AR, Sıca V, Napoli C. Animal models of hypertension:An overwiev. J Lab Clin Med. 2005;146:160-73.
- 49- Parlakpınar H, Yanılmaz M, Ağlamış S, Acet A. Kardiyovasküler sistem ve anjiyotensin II tip 2 reseptörü (AT₂). İnönü Üniversitesi Tıp Fak Dergisi. 2004;11(1):49-52.
- 50- Gören B, Fen T. Anjiyotensin reseptör antagonistleri. T Klin J Cardiol. 2003;16:425-32.
- 51- Ecder T. Renin inhibisyonu ve böbrek. Türk Kardiyol Dern Arş.2009;37:28-31.
- 52- Tischer E, Gospodarowicz D, Mitchell R, Silva M, Schilling J, Lau K, Crisp T, Fiddes JC, Abraham JA. Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet-derived growth factor gene family. Biochem Biophys Res Commun. 1989;165(3):1198-206

- 53- Simon M, Grone J, Jöhren O, Kullmer J. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in human renal ontogenesis and in adult kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 1995;268: 240-50.
- 54- Wirostko B , Wong TY, Simo R. Vascular endothelial growth factor and diabetic complications. *Progress in Retinal and Eye Research* 2008; 27:608–621.
- 55- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB Journal* 1999;13:9-22.
- 56- Poltorak Z, Cohen T, Sivan R. et al. VEGF₁₄₅ a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J. Biol Chem* 1997; 272:7151-58.
- 57- Schrijvers BF, Flyvbjerg A, DE Vriese A. role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal pathophysiology. *Kidney International* 2004; 65: 2003-17.
- 58- Joukov V, Kumar V, Sorsa T, Arighi, et al. A recombinant mutant vascular endothelial growth factor-C that has lost vascular endothelial growth factor receptor-2 binding, activation, and vascular permeability activities *J Biol Chem* 1998; 273:6599–6602.
- 59- Khimji A, Rockey DC. Endothelin-Biology and disease. *Cell Signal* 2010; 22(11):1615-25.
- 60- Malek AM, Zhang J, Jiang J, Alper SL, Izumo S. Endothelin-1 gene suppression by shear stress: pharmacological evaluation of the role of tyrosine kinase, intracellular calcium, cytoskeleton, and mechanosensitive channels, *J Mol Cell Cardiol* 1999;31: 387–399.
- 61- Emori T, Hirata Y, Imai T, Ohta K, Cellular mechanism of thrombin on endothelin-1 biosynthesis and release in bovine endothelial cell. *Biochem Pharmacol* 1992;44(12):2409-11.
- 62- Benıgnı A, Perico N, Gasparı F, Zoja C. Increased renal endothelin production in rats with reduced renal mass *Am J Physiol* 1991;29: 331-39.
- 63- Cilaker S, Vatansever HS, Özbilgin MK. Programlı hücre ölümü apoptosis. *Ç.Ü. Sağlık Bilimleri Dergisi* 2006;22:43-49.
- 64- Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R., Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer* 1972; 26:239-257.

- 65- Thornberry NA and Lazebnik Y. Caspases: Enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316.
- 66- Earnshaw WC, Martins LM and Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 383-424.
- 67- Yuan J, Shaham S, Ledoux S, et al. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 1993; 75: 641-652
- 68- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; 87: 171-172.
- 69- Arama E, Agapite J and Steller H. Caspase activity and a specific cytochrome C are required for sperm differentiation in *Drosophila*. *Dev Cell* 2003; 4: 687-697.
- 70- Güçer D, Tınaztepe D. Böbrek hastalıklarında apoptozisin rolü. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2001; 32(2): 160-68.
- 71- Leigh GH. Nomenclature of inorganic chemistry. Blackwell Scientific, 1990; Oxford.
- 72- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. New York. Oxford Science Publications. 2000; 160-165
- 73- Tamer L, Polat G, Eskandari G. Serbest radikaller. *Mersin Üniv.Tıp Fakültesi Dergisi*. 2000;1:52-58.
- 74- Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya, Mimoza Yayınları, 1. Baskı. 1995;1-84.
- 75- Aybey B, Tufan H, Ergenekon G. Serbest radikaller. *Türkdern*. 1996;30: 116-122.
- 76- Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*. 1993;49:481-493.
- 77- Bulkley GB. Free radicals and other reactive oxygen metabolites: Clinical relevance and the therapeutic efficacy of antioxidant therapy. *Surgery* 1993;113: 479-483.
- 78- Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994;74: 139-162.
- 79- Ryter SW, Tyrrell RM. Singlet molecular oxygen: a possible effector of eukaryotic gene expression. *Free Radic Biol Med* 1998;24: 1520-1534.

- 80- Winterbourn CC, Kettle AJ. Radical-radical reactions of superoxide: a potential route to toxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003;305: 729-736
- 81- Mc Cann SM. The nitric oxide hypothesis of brain aging. *Experimental Gerontology* 1997, 32:431-440.
- 82- Notarajan V. Oxidants and signal transduction in vascular endothelium. *J Lab Clin Med.* 1995;125: 26-37
- 83- Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies JM. Biochemistry and pathology of radical mediated protein oxidation. *Biochem J.* 1997;324: 1-18.
- 84- Lledias F, Rangel P, Hansberg W. Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J Biol Chem.* 1998;273: 10630-10637.
- 85- Sorg O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *C R Biologies.* 2004; 327: 649-662.
- 86- Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 2004;44: 275-295
- 87- Erden M. Serbest radikaller. *Türkiye Klinik Tıp Bilimleri Dergisi.* 1992;12: 201-207.
- 88- Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover and effector action in biological systems. *The Journal of Lipid Research.* 1998;39: 1529-1542
- 89- Toussaint O, Remacle J, Dierick JF. From the Hayflick mosaic to the mosaics of ageing. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2002, 34: 1415-1429
- 90- Reiter RJ. Aging and oxygen toxicity: relation to changes in melatonin. *Age.* 1997, 20:201-213
- 91- Schiller HJ, Reilly PM, Bulkley GB. Tissue perfusion in critical illnesses. Antioxidant therapy. *Crit Care Med* 1993; 21: 92-102.
- 92- Alpha-lipoic acid. *Alternative Medicine Review* 2006;11:232-37.
- 93- Snell EE, Strong FM, Peterson WH. Growth factors for bacteria. VI. Fractionation and properties of an accessory factor for lactic acid bacteria. *Biochem J* 1937;31:1789.
- 94- Reed LJ, Gunsalus IC, Schnakenberg GHF, Soper QF et al. Isolation, characterization and structure of α -lipoic acid. *Jacs* 1953;75:1267-77.

- 95- Teichert J, Kern J, Tritschler HJ, Ulrich H et al. Investigations on pharmacokinetics of alpha-lipoic acid in healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 1998;36:625-28.
- 96- Carreau JP. Biosynthesis of lipoic acid via unsaturated fatty acids. *Methods Enzymol* 1979;62:152-158.
- 97- Reed LJ, Debusk BG, Gunsalus IJ, Hornberger CS. Crystalline α -lipoic acid: A catalytic agent associated with pyruvate dehydrogenase. *Science.* 1951;114:93-94.
- 98- Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med* 1995;19:227-250.
- 99- Sudesh V, Linda, L, Pawan S. Nutrition and hypertension. *Nutrition Research* 2002;22;111-23.
- 100- Singh HP, Bowman RH. Effect of DL-alpha-lipoic acid on the citrate concentration and phosphofructokinase activity of perfused hearts from normal and diabetic rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1970;41:555-61.
- 101- Bilska A, Wodek L. Lipoic acid—the drug of the future? *Pharmacological Reports* 2005;57:570-577.
- 102- Heller B, Burkhart V, Lampeter E, Kolb H. Antioxidant therapy for the prevention of type 1 diabetes. *Adv Pharm* 1997;38:629-638.
- 103- Packer L, Kraemer K, Rimbach G. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition*, 2001;17(10):888-95.
- 104- Nourooz Zadeh J, Rahimi A, Tajaddini-Sarmadi J, Tritschler HJ, Rosen P, Halliwell B, Betteridge DJ. Relationship between plasma measures of oxidative stress and metabolic control in NIDDM. *Diabetologia* 1997;40:647-53.
- 105- Midaoui AE, de Champlain J. Prevention of hypertension, insulin resistance and oxidative stress by α -lipoic acid. *Hypertension* 2002; 39:303-7.
- 106- Wollin SD, Jones PH. α -lipoic acid and cardiovascular disease. *J Nutrition.* 2003;133:3327-30.
- 107- E. Guneli, K. Tugyan, H. Ozturk, M. Gumustekin, S. Cilaker , N. Uysal. Effect of Melatonin on Testicular Damage in Streptozotocin-Induced Diabetes Rats. *Eur Surg Res* 2008; 26: 354-360.

- 108- Guray, S. Sarioglu, M. Turkmen, O. Yilmaz, H. Ellidokuz, A. Gelal, H. Islekkel, A. Coker, and E. O zer. Cyclosporine A Toxicity in Association With Reduced Renal Mass. *M. Transplantation Proceedings* 2003; 35:3128–33.
- 109- Ufuk Cakatay, Refik Kayali Ali Riza Kiziler , Birsen Aydemir. Postmitotic tissue selenium and manganese levels in alpha-lipoic acid-supplemented aged rats. *Chemico-Biological Interactions* 2008;171: 306–311.
- 110- Ersin Bal, Nergis Murat, Ömer Demir, Burak Cem Soner, Ertan Can, Sedef Gidener, Adil Esen. Restraint stress impairs erectile responses in rats. *Tohoku J Exp Med* 2009 ;217: 239-242.
- 111- Newbold KM, Howie AJ, Girling AJ, Kizaki T, Bryan RL, Carey MP. A simple method for assessment of glomerular size and its use in the study of kidneys in acromegaly and compensatory renal enlargement. *J Pathol* 1989;158(2):139-146,
- 112- Howie AJ, Ferreira MAS, Adu D. Prognostic value of simple measurement of chronic damage in renal biopsy specimens. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16: 1163-1169.
- 113- Newbold KM, Howie AJ, Koram A, Adu D, Michael J. Assessment of glomerular size in renal biopsies including minimal change nephropathy and single kidneys. *J Pathol*, 1990;160(3):255-258.
- 114- Bertani T, Ferrazzi P, Schieppati A, Ruggerenti P, Gamba A, Parenzan L, Mecca G, Perico N, Imberti O, Remuzzi A, Remuzzi G. Nature and extent of glomerular injury induced by cyclosporine in heart transplant patients. *Kidney Int* 1991; 40: 243-250.
- 115- Abell L et al. *Standard Methods in Clinical Chemistry* 1958;26:2.
- 116- Trinder P. *Ann Clin Biochem*. Tietz NW, ed. *Clinical Guide to Laboratory Tests*, 3rd ed. 1995:610-611.
- 117- Harris N, Galpchian V, Rifai N. Three routine methods for measuring high-desity lipoprotein cholesterol compared with Reference method. *Clin Chem* 1996;42:738-743).
- 118- Nithiyananthan R, Dodson PM. Non-pharmacological strategies for blood pressure control in diabetic subjects. In: BryanWilliams ed. *Hypertension in diyabetes*. First Edition, London, Newyork, Martin Dunitz, 2003, p.267-84.

- 119- Williams B. Epidemiology and pathogenesis of hypertension in people with Diabetes Mellitus. In: BryanWilliams ed. Hypertension in diyabetes. First Edition, London, Newyork, Martin Dunitz. 2003 p.3-24.
- 120- Bleyer AJ, Appel RG. Risk factor associated with hypertesive nephrosclerosis. Nephron 1999; 82:193-8.
- 121- Sezer S, Külah E, Özdemir FN. Hipertansiyonun renal komplikasyonlar ve böbrek hastalığının progresyonundaki rolü. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi. 2003, 12:67-73
- 122- Jenette J C, Olson J L, Schwartz MM, Silva FG (ed). Heptinstall's pathology of the kidney. 5th edition. Philadelphia. Lippincott-Raven 1998;2:943-1002.
- 123- Taal M W, Brenner B M. Evolving strategies for renoprotection: non-diabetic chronic renal disease. Current Opinion in Nephrology and Hypertension 2001;10:523-531.
- 124- Souza MS, Machado UF, Okamoto M, Bertoluci MC et al. Reduced cortical renal GLUT1 expression induced by angiotensin-converting enzyme inhibition in diabetic spontaneously hypertensive rats. Braz J Med Biol Res 2008;41(11): 960-68.
- 125- Hajsadeghi S, Fereshtehnejad SM, Pourshirmohammadi-Sabzevari M, Khamseh ME, Noohi F. Renal Artery Stenosis in Hypertensive Patients with or without Type 2 Diyabetes: A Comparative Magnetic Resonance Angiography Study. Arch Iranian Med 2009; 12 (3): 250-255
- 126- Hartner A, Cordasic N, Klanke B, Wittmann M, Et al. Renal injury in streptozotocin-diabetic Ren2-transgenic rats is mainly dependent on hypertension, not on diyabetes. Am J Physiol Renal Physiol 2007; 292:20-27.
- 127- Obrosova IG, Fathallah L, Liu E, Nourooz-Zadeh J. Early oxıdative stress in the diabetic kidney: effect of dl- α -lipoic acid. Free Radical Biology & Medicine, 2003; 34:186–95.
- 128- Melhem MF, Craven PA, Liachenko J, Derubertis FR. α -Lipoic Acid Attenuates Hyperglycemia and Prevents Glomerular Mesangial Matrix Expansion in Diyabetes. J Am Soc Nephrol 2002; 13:108–16.
- 129- Tylicki L, Rutkowski B, Hörl WH. Antioxidants: A Possible Role in Kidney Protection. Kidney Blood Press Res 2003;26:303–314.

- 130- Cao Z, Bonnet F, Candido R, Nesteroff SP, Burns WC, Kawachi H, Shimizu F, Carey RM, Gasparo M, Cooper ME. Angiotensin type 2 receptor antagonism confers renal protection in a rat model of progressive renal injury J Am Soc Nephrol 2002;13: 1773-87.
- 131- Eguíluz Lumbreras P, Hernández AP, Gómez Zancajo VR, Zorzo OH, et al. Nephrectomy in polycystic kidney disease before transplantation. Archivos Espanoles de Urologia. 2010;63:403-09
- 132- Kang DH, Joly AH, Oh SE, Hugo C et al. Impaired Angiogenesis in the Remnant Kidney Model: I.Potential Role of Vascular Endothelial Growth Factor and Thrombospondin-1. J Am Soc Nephrol 2001;12:1434-47.
- 133- Hattori T, Shindo S, Kawamura H. Apoptosis and expression of Bax protein and Fas antigen in glomeruli of a remnant-kidney model. Nephron 1998;79(2):186-91.
- 134- Bhatti F, Mankhey RW, Asico L, Quinn MT et al. Mechanisms of antioxidant and pro-oxidant effects of α -lipoic acid in the diabetic and nondiabetic kidney. Kidney International. 2005;67:1371–1380.
- 135- Shore I, Moss J. Electronmicroscopy in diagnostic renal pathology Current Diagnostic Pathology 2002;8:207-215.
- 136- Aunapuu M, Pechter Ü, Arend A, Suuroja T et al. Ultrastructural changes in the remnant kidney (after 5/6 nephrectomy) glomerulus after losartan and atenolol treatment. Medicina 2003;39:10;975-79.
- 137- Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Effects of α -lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. Journal of Nutritional Biochemistry. 2003;14: 288–294.
- 138- Memişoğulları R. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. Düzce Tıp Fakültesi Dergisi 2005; 3: 30-39.
- 139- Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry - Turk J Biochem] 2006;31 (2);51–56.
- 140- Özkan Y, Yılmaz Ö, Öztürk A, Erşan Y. Effects of triple antioxidant combination (vitamin E, vitamin C and α -lipoic acid) with insulin on lipid and cholesterol levels and fatty acid composition of brain tissue in experimental diabetic and non-diabetic rats. Cell Biology International. 2005;29: 754-760.

- 141- Yaworsky K, Somwar R, Ramlal T, Tritschler HJ et al. Engagement of the insulin –sensitive pathway in the stimulation of glucose transport by alpha-lipoic acid in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetologia*. 2000;43:294-303.
- 142- Cohuet G, Struijker-Boudier H. Mechanisms of target organ damage caused by hypertension:Therapeutic potential. *Pharmacology & Therapeutics* 2006;111:81-98.
- 143- Vasdev S, Gill V, Parai S, Gadag V. Dietary lipoic acid supplementation attenuates hypertension in Dahl salt sensitive rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2005;275: 135-141.
- 144- Vasdev S, Ford,CA, Parai S, Longerich L, et al. Dietary alpha-lipoic acid supplementation lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2000; 18: 567– 73.
- 145- Zimpelmann J, Kumar D, Levine DZ, Wehbi G. Early Diabetes Mellitus stimulates proximal tubule renin mRNA expression in the rat. *Kidney International*. 2000; 2320-30.
- 146- Giacchetti G, Sechi LA, Rilli S, Carey RM. The renin–angiotensin–aldosterone system, glucose metabolism and diabetes. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*. 2005; 16: 120-26.
- 147- Mezzano S, Droguett A, Burgos ME, Ardiles LG et al. Renin-angiotensin system activation and interstitial inflammation in human diabetic nephropathy. *Kidney International*, 2003;64: 64-70.
- 148- Hsieh TJ, Zhang SL, Filep JG, Tang SS et al. High Glucose Stimulates Angiotensinogen Gene Expression via Reactive Oxygen Species Generation in Rat Kidney Proximal Tubular Cells. *Endocrinology* 2002;143(8):2975-85.
- 149- Xu ZG, Miao LN, Cui YC, Jia Y. Angiotensin II type 1 receptor expression is increased via 12-lipoxygenase in high glucose stimulated glomerular cells and type 2 diabetic glomeruli *Nephrol Dial Transplant* 2008; 1-19.
- 150- Sadjadi J, Kramer GL, Yu C, Welborn MB et al. Angiotensin Converting Enzyme-Independent Angiotensin II Production by Chymase is Up-regulated in the Ischemic Kidney in Renovascular Hypertension. *Journal of Surgical Research* 2005; 127:65–69.

- 151- Wang ZQ, Millatt LJ, Heiderstadt NT, Siragy HM. Differential Regulation of Renal Angiotensin Subtype AT1A and AT2 Receptor Protein in Rats With Angiotensin-Dependent Hypertension. *Hypertension* 1999;33:96-101.
- 152- Cooper M, Vranes D, Youssef S, Stacker SA, Cox AJ et al. Increased renal expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 in experimental diabetes. *Diabetes*.1999; 48: 2229–39.
- 153- Braun L, Kardon T, Reisz-Porszasz Z, Banhegy G et al. The regulation of the induction of vascular endothelial growth factor at the onset of diabetes in spontaneously diabetic rats. *Life Sciences* 2001;69:2533-42.
- 154- Hoshi S, Nomato K, Kuromatsu J et al. High glucose induced VEGF expression via PKC and ERK in glomerular podocytes *Biochem Biophys Res commun* 2002; 290:177-184.
- 155- Kim BS, Chen J, Weinstein T, Noiri E et al. VEGF expression in hypoxia and hypoxia and hyperglycemia Reciprocal effect on branching angiogenesis in epithelial-endothelial co-cultures. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:2027-36.
- 156- Cha DR, Kim NH, Yoon JW, Jo SK, Cho WY et al. Role of vascular endothelial growth factor in diabetic nephropathy. *Kidney International*. 2000; 58:104-12
- 157- Bello-Reuss E, Holubec K, Rajarman S et al. Angiogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 2001;60:37-45.
- 158- Kamba T, McDonald DM. Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer. *Br. J. Cancer* 2007;96,1788-95.
- 159- Nakagawa T, Kosugi T, Haneda M, Rivard C et al. Abnormal Angiogenesis in Diabetic Nephropathy. *DIYABETES*, 2009, 58: 1471-79.
- 160- Hu KB, Liu ZH, Zhou H, Li LS. Upregulation of VEGF and VEGF receptor in glomeruli associated with marked proteinuria and endothelial damage in patients with type 2 diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:A0627.
- 161- Cha DR, Kang YS, Han SY, et al. Vascular endothelial growth factor is increased during early stage of diabetic nephropathy in type II diabetic rats. *J Endocrinol* 2004;183:183–194.
- 162- Shulman K, Rosen S, Tognazzi K, Manseau EJ, Brown LF. Expression of vascular permeability factor (VPF/VEGF) is altered in many glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol* 1996;7: 661-66.

- 163- Vriese AS, Tilton RG, Elger M, et al. Antibodies against vascular endothelial growth factor improve early renal dysfunction in experimental diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2001;12: 993-1000.
- 164- Suarez S, Ballmer-Hofer K. VEGF transiently disrupts gap junctional communication in endothelial cells. *J Cell Sci* 2001;114:1229–1235.
- 165- Akhavan MA, Larsen H, Paleolog E. Circulating endothelial progenitor cells as a link between synovial vascularity and cardiovascular mortality in rheumatoid arthritis. *Scand. J Rheumatol* 2007;36:83–90.
- 166- Simo R, Lecube A, Segura RM, Garcia AJ, Hernandez C. Free insulin growth factor-I and vascular endothelial growth factor in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 2002; 134:376-82.
- 167- Zhu X, Wu S, Dahut WL, Parikh CR. Risks of proteinuria and hypertension with bevacizumab, an antibody against vascular endothelial growth factor: systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis*.2007; 49:186-193
- 168- Simo R, Hernandez C. Intravitreal anti-VEGF for diabetic retinopathy: hopes and fears for a new therapeutic strategy. *Diabetologia* 2008;51;1574-80.
- 169- Kelly D, Hepper C, Wu LL, Cox AJ, et al. Vascular endothelial growth factor expression and glomerular endothelial cell loss in the remnant kidney model *Nephrol Dial Transplant* 2003;18: 1286-92
- 170- Kanellis J, Fraser S, Katerelos, Power DA. Vascular endothelial growth factor is a survival factor for renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;278:905-15.
- 171- Misra S, Khamal D, Misra KD, Glockner JF. Vascular Endothelial Growth Factor-A, Matrix Metalloproteinase-1, and Macrophage Migration Inhibition Factor Changes in the Porcine Remnant Kidney Model: Evaluation by Magnetic Resonance Imaging. *J Vasc Interv Radiol* 2010; 21:1071–1077
- 172- Lariviere R, Lebel M. Endothelin-1 in chronic renal failure and hypertension. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*2003; 81: 607–21.
- 173- Ahmed N. Advanced glycation endproducts role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2005;67: 3–21
- 174- Sorokin A, Kohan DE. Physiology and pathology of endothelin-1 in renal mesangium. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285:579-589.

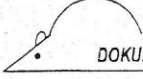
- 175- Chen HC, Guh JH, Shin SJ, Tsai JH. Reactive oxygen species enhances endothelin-1 production of diabetic rat glomeruli in vitro and in vivo. *J Lab Clin Med* 2000;309-15.
- 176- Saito Y, Nakao K, Mukoyama M, Imura H, et al. Increased plasma endothelin levels in patients with essential hypertension. *N Engl J Med*.1990;322:(3);205.
- 177- Vierhapper H, Wagner O, Nowotny P, Waldhausl W. Effect of endothelin-1 in man. *Circulation*1990;81:(4); 1415.
- 178- Rubinstein I. Prolonged Anti-Hypertensive Effects of Oral Sitaxsentan, a Selective ET_A Endothelin Receptor Antagonist, in Spontaneously Hypertensive Hamsters *Cardiovasc. Drugs Ther.* 2006;20:(5)- 387.
- 179- Kırkpantur A, Altun B. Endotel disfonksiyonu ve hipertansiyon. *Türk J Cardiol* 2006;9:55-61.
- 180- Rossi GP, Sacchetto A, Cesari M, Pessina AC. Interactions between endothelin-1 and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Cardiovasc. Res.* 1999;43:(2)-300.
- 181- Gobe G. Identification of Apoptosis in Kidney Tissue Sections. *Methods in Molecular Biology* 2009; 466: 175-92.
- 182- Menini S, Iacobini C, Oddi G, Ricci C, et al. Increased glomerular cell (podocyte) apoptosis in rats with streptozotocin-induced Diabetes Mellitus: role in the development of diabetic glomerular disease. *Diabetologia* 2007;50:2591-99
- 183- Sustzak K. Diabetic Nephropathy: A frontier for personalized medicine. *J Am Soc Nephrol* 17: 361-367.
- 184- Ezzine BS, Ao ZJ, Londono I, et al. Apoptosis of tubular epithelial cells in glycogen nephrosis during diabetes. *Lab Invest* 2003;83:1069-80.
- 185- Murata I, Takemura G, Asano K, et al. Apoptotic cell loss following cell proliferation in renal glomeruli of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats, a model of human type 2 diabetes. *Am J Nephrol* 2002;22:587-595.
- 186- Pesce C, Menini S, Pricci F, Favre A, et al: Glomerular cell replication and cell loss through apoptosis in experimental Diabetes Mellitus. *Nephron.* 2002;90:484–488.
- 187- Sato Y, Feng GG, Huang L, Fan JH et al. Enhanced expression of naofen in kidney of streptozotocin induced diabetic rats: possible correlation to apoptosis of tubular epithelial cells. *Clin Exp Nephrol* 2010;14:205–212

- 188- Dlamini R, Mbita Z, Zungu M. Genealogy, expression, and molecular mechanisms in apoptosis. *Pharmacology & Therapeutics* 2004; 101(1):1-15
- 189- Thomas GL, Yang B, Wagner BE, Savill J, El Nahas AM. Cellular apoptosis and proliferation in experimental renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant.* 1998;13(9):2216-26.
- 190- Weson LG. Compensatory renal growth and other growth responses of kidney. *Nephron* 51:149–184, 1989
- 191- Kliem V, Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A *et al*: Mechanisms involved in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis in 5/6-nephrectomized rats. *Kidney Int.* 1996;49:666-78.
- 192- Soto K, Gómez-Garre D, Largo R, Gallego-Delgado J. Tight blood pressure control decreases apoptosis during renal damage. *Kidney International*, 2004;65 :811–822
- 193- Kitamura H, Shimizu A, Masuda Y, Ishizaki M, Sugisaki Y, Yamanaka N. Apoptosis in glomerular endothelial cells during the development of glomerulosclerosis in the remnant-kidney model. *Exp Nephrol.* 1998;6(4):328-36.
- 194- Weissgarten J, Berman S, Efrati S, Rapoport M, Cohn M, Modai D, Averbukh Z. Apoptosis and proliferation of mesangial cells isolated from kidneys undergoing compensatory growth following contralateral nephrectomy: role of the renin-angiotensin system. *Med Sci Monit.* 2007;13(1):16-23
- 195- Mino M, Nakamura J, Nakamuta N, Moriaka N, et al. Effects of low protein intake on the development of the remaining kidney in subtotally nephrectomized immature rats: apoptosis and epidermal growth factor. *J Vet Med Sci.* 2007;69(3):247-52.

9 **EKLER**

9.1 **EK 1 : Tezin Etik Kurul Rapor Örneği**

1

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DENEY HAYVANI ARASTIRMALARI ETİK KURULU**

35340, İnciraltı, İzmir-232 2777777-2254
<http://tip.deu.edu.tr/etik/denevetik/>

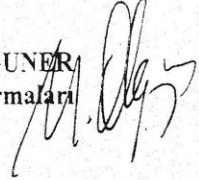
Sayı : 77
Tarih : 16/09/2005
Toplantı No : 05/14/91
Toplantı Tarihi : 16/09/2005

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr.Zişan Buldan'ın sorumlu olduğu “Deneyssel olarak hipertansiyon ve diabet oluşturulmuş ratlarda glömerüler değişikliklerin elektronmikroskopik ve immünhistokimyasal olarak incelenmesi” isimli 91 Prt. No’lu projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Bilgilerinizi arz ederim.

Doç. Dr. Mustafa OLGUNER
Deney Hayvanı Araştırmaları
Etik Kurulu Başkanı



9.2 EK 2: Arbis Özgeçmiş Formu

ÖZGEÇMİŞ

Araştırma Görevlisi

SERAP CİLAKEK MİÇİLİ

TC Kimlik No / Pasaport No:	55207100190
Doğum Yılı:	1979
Yazışma Adresi :	Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji ABD. İnciraltı - 35340 İzmir/Türkiye
Telefon :	0232-4124567
Faks :	0232-2590541
e-posta :	cilaker6@yahoo.com , serap.cilaker@deu.edu.tr

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Celal Bayar Üniversitesi	SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ	HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ	Yüksek Lisans	2005

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	TEMEL TIP BİLİMLERİ	Araştırma Görevlisi	2011-
Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	SAĞLIK BİLİMLERİ ENS.	Araştırma Görevlisi	2005-2011
Celal Bayar Üniversitesi	Türkiye	Manisa	SAĞLIK BİLİMLERİ ENS.	Araştırma Görevlisi	2004-2005

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Overler ve Fallop Tüpleri , Beyin (Santral Sinir Sistemi), Böbrek ve Üreterler, Anatmik Embryoloji, Sitoloji, Histoloji, Üreme Sistemi.

PROJE DENEYİMİ

Proje Adı	Kurum	Bütçe	Tarih	Görev	Proje Türü
Rho-Kinaz İnhibitörü Y-27632'nin, İntestinal İskemi-Reperfüzyon Hasarındaki Etkisinin Biyokimyasal ve Histopatolojik Olarak İncelenmesi.		17861	01.02.2007-01.02.2008	Araştırmacı/Uzman	Ulusal
Vorhabenbeschreibung, Fhprofund - Antragg. Remature Rupture Of Membranes Prediction	Aachen University, Applied Science.	260000	01.03.2007-31.12.2009	Araştırmacı/Uzman	Uluslararası

Test (Prompt).					
Deneysel Olarak Hipertansiyon Ve Diyabet Oluşurulmuş Ratlarda Glomerüler Değişikliklerin Elektronmikroskopik Ve İmmunohistokimyasal Olarak İncelenmesi	Dokuz Eylül Üniversitesi	976000	01.10.2005-01.05.2011	Yürütücü	Ulusal

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı	47
-------------------------------------	----

ÖDÜLLER

Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
Poster Bildirisi Birincilik Ödülü.	8. ULUSAL JİNEKOLOJİ VE OBSTETRİK KONGRESİ	2010
Poster Bildirisi Özel Mansiyon Ödülü.	12. JİNEKOLOJİK ONKOLOJİ KONGRESİ	2010
Sözlü Sunu Ödülü Birincilik Ödülü.	17. ULUSAL NEONATOLOJİ KONGRESİ (UNEKO-17)	2009
VII. Ulusal Dermatoloji Kongresi, En iyi sözel bildiri ödülü	TÜRK DERMATOLOJİ DERNEĞİ	2006
8. Toraks Derneği Kongresi, Poster 2. lik ödülü	TORAKS DERNEĞİ	2005

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Karaman M, Fırıncı F, Cilaker Mıcılı S , Uysal P, Tuğyan K, Yılmaz O, Uzuner N, Karaman Ö "Anti-İnflammatory Effects Of Curcumin İn A Murine Model Of Chronic Asthma" (Ref. AI-D-11-00016R1) Has Been Accepted For İts Publication İn Allergologia Et Immunopathologia 2011, In pres
Baykara B, Tekmen I, Cilaker Mıcılı S , Sönmez Ü, Erbil G, Özoğul C, Özbal S, "Karaciğer İskemireperfüzyon Hasarında Karnozinin Proflaksi Ve Sağaltım Etkileri", Türkiye Klinikleri J Med Sci 201030(6):1896-905, 30/6/1896-905/2010
Serap Cilaker Mıcılı , Seda Vatansever, Kemal Ozbılgin. The Role Of Proteins İn Apoptosis Of Somatic And Germ Cells İn The Mouse Ovary. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 16 (2): 225-231, 2010
Candan Özoğul, Serap Cilaker Mıcılı , Basak Baykara, Cetin Pekçetin, Alper Bağrıyanık, Soner Atmaca, Erdener Özer. Maternal Hypothyroidism And Its Role İn The Plasenta: A Morphometric And İmmunohistochemical Study. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi. 2010:30,3-
Kumral A, Yesilirmak Dc, Aykan S, Genc S, Tugyan K, Cilaker S , Akhisaroglu M, Aksu I, Sutcuoglu S, Yilmaz O, Duman N, Ozkan H. Protective Effects Of Methylxanthines On Hypoxia-Induced Apoptotic Neurodegeneration And Long-Term Cognitive Functions İn The Developing Rat Brain. Neonatology. 2010 Feb 1298(2):128-136.
Kurul Sh, Yiş U, Kumral A, Tuğyan K, Cilaker S , Kolatan E, Yilmaz O, Genç S. Protective Effects Of Topiramate Against Hyperoxic Brain İnjury İn The Developing Brain. Neuropediatrics. 2009 Feb40(1):22-7.
Ermertcan At, Inan S, Ozturkcan S, Bilac C, Cilaker S . Comparison Of The Effects Of Collagenase And Extract Of Centella Asiatica İn An Experimental Model Of Wound Healing: An İmmunohistochemical And Histopathological Study. Wound Repair Regen. 2008 Sep-Oct16(5):674-81.
Yiş U, Kurul Sh, Kumral A, Tuğyan K, Cilaker S , Yilmaz O, Genç S, Genç K. Effect Of Erythropoietin On Oxygen-İnduced Brain İnjury İn The Newborn Rat. Neurosci Lett. 2008 Dec 31448(3):245-9.
Guneli E, Tugyan K, Ozturk H, Gumustekin M, Cilaker S , Uysal N. Effect Of Melatonin On Testicular Damage İn Streptozotocin-İnduced Diyabetes Rats. Eur Surg Res. 200840(4):354-60.

Epub 2008 Feb 26
Didem Cemile Yesilirmak, Abdullah Kumral, Kazim Tugyan, Serap Cilaker , Huseyin Baskin, Osman Yilmaz, Nuray Duman And Hasan Ozkan. Effects Of Activated Protein C On Neonatal Hypoxic İschemic Brain İnjury. Brain Res. 1210, 2008, 56-62
Uluç Yiş, Semra Hız Kurul, Abdullah Kumral, Serap Cilaker , Kazım Tuğyan, Şermin Genç And Osman Yılmaz. Hyperoxic Exposure Leads To Cell Death İn The Developing Brain. Brain And Development, October 2008 (Vol. 30, Issue 9, Pages 556-562)
Topcu I, Vatansever S, Var A, Cavus Z, Cilaker S , Sakarya M. The Effect Of Misoprostol, A Prostaglandin E1 Analog, On Apoptosis İn İschemia-Reperfusion-İnduced İntestinal İnjury. Acta Histochem. 2007: 109(4):322-9
Yesim Bulbul Baytur, Kemal Ozbilgin, Serap Cilaker , Selman Lacin, Ozgur Kurtul, Semra Oruc And Faik Mumtaz Koyuncu. A Comparative Study Of The Effect Of Raloxifene And Gosereline On Uterine Leiomyoma Volume Changes And Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, Bcl-2 And P53 Expression İmmunohistochemically İn Premenopausal Women. 2007:135 (1): 94-103
Gok S, Vatansever S, Vural K, Sekuri C, Izanli A, Tezcan A, Cilaker S . The Role Of Atp Sensitive K(+) Channels And Of Nitric Oxide Synthase On Myocardial İschemia/Reperfusion-İnduced Apoptosis. Acta Histochem. 2006: 108 95-104.
Hasan Aydede, Yamac Erhan, Ozer Ikgul, Serap Cilaker , Aslan Sakarya, Seda Vatansever. Effect Of Portal Vein Occlusion On The Pancreas:An Experimental Model. World J Surg 2006:30: 112-117
Nuran Ekerbicer, Sevinc Inan, Figen Tarakci, Serap Cilaker , Mustafa Ozbek. Histophysiological Effects Of Fluid Resuscitation On Heart, Lung And Brain Tissues İn Rats With Hypovolemi Acta Histochemica. 2006: 108(5):373-83
H. Mavioğlu, I Tuglu, C. Temiz, K Ozbilgin, S. Cilaker , D. Selçuki, M. Selçuki. Clinical And Histological Changes Of Intrathecally Administered Gadopentate Dimeglumine (Gd-Dtpa) İn Normal Rats, Rivista Di Neuroradiologia, 2005:18521-28
Karaer O, H. S. Vatansever, S. Oruc, K. Ozbilgin, S. Cilaker , M. F. Koyuncu. The Aromatase Inhibitor, Anastrozole, Is Associated With Favorable Embryo Development And Implantation Markers İn Mice Ovarian Stimulation Cycles. Fertilty & Sterility, 2005: 83/6, 1797-1806.
Kara E, A.Var, S.Vatansever, S.Cilaker , Y.Kaya, T.Coşkun. The Effects Of Rofecoxibe, A

Selective Cyclooxygenase-2 İnhibitor, On Endothelial Dysfunction, Lipid Peroxidation And Hepatocyte Morphology İn Rats With Sepsis-İnduced Liver İnjury. Curr Ther Res Clin Exp. 2004 65(3):278-291.

DİĞER DERGİLERDE YAYINLANAN MAKALELER

Reel B, **Cilaker Mıcılı S**, Ergur BU. Discoidin Domain Receptors (Ddrs) As Novel Collagen Receptors And Their Importance. Uludag University School Of Medicine Journal 2010 (İn Press).

Serap Cilaker Mıcılı, Candan Özoğul. Diyabette Kök Hücreler. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 21,2,2007: 109-117

Serap Cilaker, H. Seda Vatansever, M. Kemal Özbilgin. Programlı Hücre Ölümü Apoptosis. Ç.Ü. Sağlık Bilimleri Dergisi. Derleme Yazısı .2006,22:43-49

HAKEMLİ KONFERANS/SEMPOZYUMLARIN BİLDİRİ KİTAPLARINDA YER ALAN YAYINLAR

Mostafa Ashrafi Osalu, **Serap Cilaker Mıcili**, Firouz Ghaderi Pakdel, Somayyeh Naderi Youssef Haghighi Moghaddam, Nazain Zolfaghari, Ulker Sonmez. The Curriculum Of Phd Degree Of Medical Anatomical Science In Tarbiat Modarres University (Iran) 6th ORPHEUS (Organisation For Phd Education İn Biomedicine And Health Sciences İn The European System) Conference, April27th 30th, 2011

Serap Cilaker Mıcili, Mostafa Ashrafi Osalu, Ulker Sonmez , Bekir Ugur Ergür , Guven Erbil, Kazim Tugyan, Işıl Tekmen, Cetin Pekcetin, Seda Ozbal, Alper Bağrıyanık. Phd Program In Department Of Histology And Embryology In The Dokuz Eylul University (Turkey). 6th ORPHEUS (Organisation For Phd Education İn Biomedicine And Health Sciences İn The European System) Conference, April27th 30th, 2011

Gumustekin M, Arici A, **Cilaker S**, Arslan F, Karaman M, Guneli E, Tekmen I, "The role of Rac1 GTPase on cardiovascular dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats.", International Conference on Prehypertension& Cardio Metabolic Syndrome, AVUSTURYA, Şubat 2011,

Uluslararası Hakemli organizasyon
Karaman M, Fırıncı F, Cilaker Mıcılı S , Uysal P, Tuğyan K, Yılmaz O, Uzuner N, Karaman Ö,"Kronikastım modeli oluşturulmuş farelerde Curcuma Longa (Zerdeçal)'nın akciğer histolojisi üzerine etkisi", 54.Milli Pediatri Kongresi, ANTALYA , Ekim 2010
Cilaker Mıcılı S , Ergür BU, Özoğul C. 5/6 nefrektomi uygulanan ratlarda lipoik asidin koruyucu etkisi ve DDR-1 ile DDR-2 antikorlarının immunohistokimyasal olarak dağılımları. X. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi (Uluslararası katılımlı).17-20 Mayıs.2010 Çeşme/İZMİR
Güvenal T, Tamay AG, Mıcılı S , Koltan SO, Koyuncu FM, Özoğul C. “Over epitelinde tubal ligasyon sonrası oluşan apoptotik değişikliklerin ratlarda incelenmesi” 12. Jinekolojik Onkoloji Kongresi, Antalya, 2010
Tamay AG, Guvenal T, Mıcılı S , Yıldırım Y, Koltan SO Özoğul C, Koyuncu FM.Gonadotropin ve Gonadotropin Serbestleştirici Hormon Antagonistinin Over Morfolojisi Üzerine Etkisi; 8. Ulusal Jinekoloji ve Obstetrik Kongresi, 2010
Tamay AG, Guvenal T, Mıcılı S , Yıldırım Y, Özoğul C, Koyuncu FM, Koltan SO. Deneysel Rat Modelinde Gonadotropin Serbestleştirici Hormon Agonist ve Antagonistlerinin Postoperatif Adezyonları Önlemedeki Etkinliği. 8. Ulusal Jinekoloji ve Obstetrik Kongresi, 2010
T Güvenal, A Göker Tamay, S Cilaker Mıcılı , Y Yıldırım, S Oruc Koltan, C Ozogul, FM Koyuncu. Effect of Gonadotropin and GNRH Antagonist on Morphology Apoptosis and Expression of P53 in Ovarian Tissue of Rats. 13th Biennial Meeting of the International Gynecological Cancer Society (IGCS 2010).
N Lawrenz, M Valter, H Oflaz, S Cilaker Mıcılı , P Mallmann, GM Artmann, A Temiz Artmann. Biomarker for prognosis of premature birth. A biomedical approach. 8th International Conference on Cell &Stem Cell Engineering. June 11-12, 2010, Trinity College Dublin, Ireland.
Baykara B, Cilaker Mıcılı S , Tugyan k, Tekmen I, Bağrıyanık H, Sönmez Ü, Sönmez A, Özbal S. The protective effects of carnosine in alcohol induced hepatic injury in rats. Cell&Tissue Biology Research Vol 1, No1 Abstracts of II. International Liver Symposium-2009 ISPARTA
Nazlı Karagöz, Soner Atmaca, Ziya Denek, Serap Cilaker Mıcılı , Müge Kiray, Bekir Uğur Ergür. Protective Effect of Lycopene against Toxic Damage on Liver Caused by Methyl-Parathion. Vol 1, No 1S (2009). Cell&Tissue Biology Research Vol 1, No1 Abstracts of II. International Liver Symposium-2009 ISPARTA
Ertener Ö. Cilaker Mıcılı S , Özogul C. Özer E. Çöliak hastalığında enterosit apoptozu: patogenetik

önemi nedir?. Türk Patoloji Dergisi. Cilt 25, Ekim 2009, supplement.

Serap Cilaker Mıcılı, Candan Özoğul, Markus Valter, Aysegül Temiz Artmann. Erken Membran Rüptürü ve Fetal zarların Histolojik Özellikleri. 19. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi. 22-25 Haziran 2009 Trabzon.

Serap Cilaker Mıcılı, Candan Özoğul, Osman Yılmaz, Bekir Uğur Ergür, Hande Topel. Deneysel hipertansiyon+Diyabet Modelinin Böbrekteki Etkileri. 19. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi. 22-25 Haziran 2009 Trabzon.

Baykara B, **Cilaker Mıcılı S**, Sönmez Ü, Tuğyan K, Tekmen I, Özbal S, Sönmez A,"the effect of acute alcohol toxicity on cerebellum and protectiveeffect of carnosine in rats", Cell&Tissue Biology Research, Turkish Histology and Embriyology Association. Volume1/2008 Supplement 20-23 May 2008 ADANA

Baykara B, **Cilaker S**, Tuğyan K, Tekmen I, Özbal S, Sönmez Ü, Sönmez A,"the effects of carnosine on heart injury in chronic alcohol given rats", Cell&Tissue Biology Research, Turkish Histology and Embriyology Association. Volume1/2008 Supplement 20-23 May 2008 ADANA

Baykara B, **Cilaker S**, Özoğul C, Tekmen I, Yener N, Sönmez Ü, Oktay G, Tuğyan K, Sönmez A,"kronik alkol kullanımında karnozinin böbrekteki etkileri",9. ulusal histoloji embriyoloji kongresi, ADANA, Mayıs 2008, Hakemli organizasyon

Baykara B, **Cilaker S**, Tekmen I, Sönmez Ü, Sönmez A, Tuğyan K, Özbal S,"the effects of antioxidant carnosine on lung caused by chronic alcohol application Cell&Tissue Biology Research, Turkish Histology and Embriyology Association. Volume1/2008 Supplement 20-23 May 2008 ADANA

Özoğul C, **Cilaker S**, Baykara B, Pekçetin Ç, Bağrıyanık A, Atmaca S., Özer E,"maternal hypothyroidism and its role in the placenta: a morphometric and immunohistochemical study", Cell&Tissue Biology Research, Turkish Histology and Embriyology Association. Volume1/2008 Supplement 20-23 May 2008 ADANA

Mıcılı SC, Çakarto M, Özogul C, Baykara B, Pekçetin Ç, Uslu T,"Alternations of collagen in the maternal placenta with pre-eclampsia".Cell&Tissue Biology Research, Turkish Histology and Embriyology Association. Volume1/2008 Supplement 20-23 May 2008 ADANA

Kumral A, Yeşilırmak DC, Aykan S, Akhisaroğlu M, Tuğyan K, Genç Ş, **Mıcılı S**, Sütçüoğlu S, Yılmaz O, Duman N, Özkan H,"Prematüre apnesinde metilksantinlerin akut döneminde beyin hasarı ve uzun dönemde kognitif fonksiyonlar üzerine olan etkisinin araştırılması",15.Ulusal

Neonatoloji Kongresi, ANTALYA, Nisan 2007, Hakemli organizasyon
Yeşilırmak DC, Kumral A, Tuğyan K, Baskın H, Mıcılı S , Yılmaz O, Duman N, Özkan H,"Yenidoğan hipoksik iskemik ensefalopati modelinde aktive protein C tedavisinin etkinliğinin araştırılması",15.Ulusal Neonatoloji Kongresi, ANTALYA, Nisan 2007, Hakemli organizasyon
Basak Baykara, Serap Cilaker , Isıl Tekmen, Ülker sönmez, Bekir Ugur Ergür, Kazım Tugyan, Ataç Sönmez. Akut alkol toksisitesinin böbrek üzerine etkilerine karþý karnozinin etkisi", 18. Ulusal elektron mikroskopi kongresi, ESKİSEHIR, Agustos 2007.
Basak Baykara, Serap Cilaker , Kazım Tugyan, Ülker Sönmez, Ataç Sönmez, sıl Tekmen, Candan Özogul. Ratlarda akut alkol kullanımının kalpte olusturdugu hasara karsı karnozinin etkisi. 18. Ulusal elektron mikroskopi kongresi, ESKİSEHIR, Agustos 2007.
Basak Baykara, Serap Cilaker , Isıl Tekmen, Ataç Sönmez, Alper Bağrıyanık, Ülker Sönmez, Kazım Tugyan. Antioksidan karnozinin akut alkol kullanýmýna baðlýoluþan akciğer hasarı üzerine etkisi. 18. Ulusal elektron mikroskopi kongresi, ESKİŞEHİR, Agustos 2007.
U. Yis, S.H. Kurul, A. Kumral, S. Cilaker , K. Tugyan, S. Genc, O. Yilmaz. NNP08 Hyperoxia causes cell death in the prefrontal cortex of the developing brain
S.H. Kurul, U. Yis, A. Kumral, S. Cilaker , K. Tugyan, S. Genc and O. Yilmaz. NNP07 Hyperoxia causes cell death in the hippocampus of the developing brain European Journal of Paediatric Neurology Volume 11, Supplement 1, September 2007, Page 52 Abstracts and Program of the Seventh European Paediatric Neurology Society, EPNS Congress
B Baykara, I Tekmen, Ü Sönmez, G Erbil, S Özbal, S Cilaker , C Özoğul. Karaciğer iskemi reperfüzyon hasarında karnozinin profilaktik ve sağaltım uygulamasının apoptoz üzerine etkileri. VIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 27-30 Haziran 2006, Malatya
B Baykara, I Tekmen, Ü Sönmez, G Erbil, S Özbal, S Cilaker , C Özoğul. Ratlarda karaciğer iskemi reperfüzyon hasarında karnozinin profilaktik ve sağaltım uygulamasının ultrastüktürel olarak değerlendirilmesi, VIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 27-30 Haziran 2006, Malatya
Y Bardakçı, C Özoğul, S Cilaker , S Kılıç, D Erdoğan, İ Yetkin, E Özer. Hashimoto tiroiditli gebe plasentalarında apoptosis. VIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 27-30 Haziran 2006, Malatya
B Baykara, I Tekmen, Ü Sönmez, G Erbil, S Özbal, S Cilaker , C Özoğul. Total karaciğer iskemi

reperfüzyonunda oluşan pankreas hasarına karşı karnozinin profilaktik ve sağaltım uygulamasının etkilerinin immunohistokimyasal ve ultrastrüktürel incelenmesi. VIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 27-30 Haziran 2006, Malatya

S Cilaker, S Vatansever, K Özbilgin. Regulation of apoptosis may control both zona pellucida and bax gene in granulosa cells before and after ovulation. 13th World Congress on In Vitro Fertilization Assisted Reproduction & Genetics, IVF-307, May 26-29, Istanbul, Turkey, 2005.

S Vatansever, **S Cilaker**, K Özbilgin. Expressions of p-21, c-Myc and caspase-8 in mouse oocytes and preimplantation embryos. 13th World Congress on In Vitro Fertilization Assisted Reproduction & Genetics, IVF-306, May 26-29, Istanbul, Turkey, 2005

Vatansever HS, Sayhan S, Ozbilgin K, Dicle N, Inan S, **Cilaker S**. Increased proportion of apoptosis to cell proliferation correlates with placental insufficiency in the developing human lung. 4th Asian-Pasific International Congress of Anatomists, 7-10 September 2005, Kuşadası-Turkey

Vatansever HS, Kose C, Ilkgul O, **Cilaker S**, Aydede H, Bengmark S. The effects of preatreatment with probiotic bacteria on expression of NOS and apoptosis in peritonitis-induced acute lung injury of rats. 4th Asian-Pasific International Congress of Anatomists, 7-10 September 2005, Kuşadası-Turkey

Dicle N, Vatansever HS, Sayhan C, **S Cilaker**, Ozbilgin K. Visualization of apoptosis and related proteins in fetal human thymus affected by insufficiency of placenta. 4th Asian-Pasific International Congress of Anatomists, 7-10 September 2005, Kuşadası-Turkey

Cilaker S, Ozbilgin K, Kose C, Vatansever HS. The effects of growth factors during follicular development in mouse'. 4th Asian-Pasific International Congress of Anatomists, 7-10 September 2005, Kuşadası-Turkey

Ekerbiçer N, Inan S, Tarakcı F, **Cilaker S**. The histo-physiological effects of intraarterial dbcamp on heart tissue in left vagotomized rats. 4th Asian-Pasific International Congress of Anatomists, 7-10 September 2005, Kuşadası-Turkey

Tuglu I, **Cilaker S**, Hayrettaş C, Varol T. Histologic changes and protective effects of ischemic preconditioning on retinal damage of global ischemia-reperfusion injury in rats. 4th Asian-Pasific International Congress of Anatomists, 7-10 September 2005, Kuşadası-Turkey

Ozbilgin K, Vatansever HS, **Cilaker S**, Kose C. Expression of Bcl-2 and p53 in fragmented early preimplantation stage of mouse embryos. 4th Asian-Pasific International Congress of Anatomists, 7-10 September 2005, Kuşadası-Turkey

Ekerbiçer Nuran, Inan Sevinç, Tarakçı Figen, **Cilaker Serap**, Ozbek Mustafa. Immunolocalizations of VEGF, VEGFR-2 and Fibronectin on lung tissues after acute hemorrhage in rats. Chinese Journal of Pathophysiology, Supplement 22(13)1-544, 2006.

Ekerbiçer N., S. Inan, F. Tarakçı, M. Özbek, **S Cilaker** "The histo-physiological effects of fluid resuscitation on brain, heart and lung tissues in rats with hypovolemia " Advances in Molecular Medicine, supplement, April 16-19, İstanbul, Turkey, volume1, 2005

HS Vatansever, Ö Karaer, **S Cilaker**, K Özbilgin, S Oruç, F Koyuncu. İmplantasyon penceresi döneminde aromataz inhibitörünün endometrial kabuldeki yeri. VII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, P-71 , Mersin, S-161, 2004.

H Aydede, HS Vatansever, S Cilaker, Ö İlkül, Y Erhan. Deneysel Portal Ven oklüzyonunun sıçan pankreas dokusu üzerine etkileri. VII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, P-68, Mersin, 2004.

Hasan Aydede, Yamaç Erhan, Seda Vatansever, **Serap Cilaker**, Özer İlkül. Deneysel portal ven oklüzyonunun rat pankreas dokusu üzerine etkileri. Ulusal Cerrahi kongresi, 26-30 Mayıs 2004, Belek Antalya.

Karaer Ö, HS Vatansever, S Oruç, K Özbilgin, **S Cilaker**, FM Koyuncu. Implantation In Aromatase Inhibitor Added Induction Cycles. 2004, ESHRE, Germany.

Levent Sepit, Ayşın Şakar, Seda Vatansever, **Serap Cilaker**, Arzu Yorgancıoğlu. Effects of recombinant human activated protein c on inflammation and nitric oxide synthase in sepsis. European Respiratory Society Annual Congress September 2005, Copenhagen Denmark.

Candan Ozogul, **Serap Cilaker**, Basak Baykara, Cetin Pekcetin, Alper Bagriyanik, Soner Atmaca, Erdener Ozer. Maternal hypothyroidism and its role in the placenta: a morphometric and immunohistochemical study. XIII International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, 23rd-27th August 2008 Medical University of Gdansk, Poland.

A.T. Ermertcan, S. Inan, S. Öztürkcan, C. Bilaç, **S. Cilaker**. Abstracts of the 14th Congress of the European Academy of Dermatology and Venereology. Comparison of the effects of collagenase and extract of centella asiatica in an experimental model of wound healing: an immunohistochemical and histopathological study. Volume19, Supplement 2, October 2005.

Karaer Ö, HS Vatansever, S Oruç, K Özbilgin, **S Cilaker**, FM Koyuncu. Implantation In Aromatase Inhibitor Added Induction Cycles. 2004, ESHRE, Germany.

Oruç, S. Vatansever, Ö. Karaer, A. Göker, **S. Cilaker**, G. Giray, " Angiogenesis in Human Endometrium with Intrauterine Device", v. Türk Alman jinekoloji Derneği ve II. Reproductive Medicine Tartışmalı konular ve çözümler ortak kongresi, mayıs 2003 Antalya, Hakemli organizasyon

Vatansever S, G Güçlü, A Arslan, P Atilla, G Giray, **S Cilaker**, S Müftüoğlu, " Antifungal ilaç tedavisinin iç kulak yapısına ve apoptozis üzerine etkisi. Uluslar Arası Katılımlı, 16. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi. P35, İzmir, S-3, 2003

G Güçlü, A Aslan, S Vatansever, P Atilla, G Giray, **S Cilaker**, S Müftüoğlu. Antifungal ilaçların ototoksik yan etkilerinin histolojik olarak incelenmesi. XXVII. Türk Ulusal Otolarengoloji ve Baş Boyun Cerrahisi Kongresi, 4-9 Ekim 2003, Antalya

DİĞER YAYINLAR

Kitap Yazarlıkları

Genel Histoloji Ders Notları (Sağlık Yüksekokulları İçin), Manisa, Ekim, 2003. Yazarlar: Kemal Özbilgin, Sevinç İnan, Seda Vatansever, İbrahim Tuğlu, **Serap Cilaker**.

Candan Özoğul, **Serap Cilaker Mıcılı**, Basak Baykara, Cetin Pekçetin, Alper Bağrıyanık, Soner Atmaca, Erdener Özer. Maternal Hypothyroidism And Its Role In The Placenta: A Morphometric And Immunohistochemical Study"Hypothyroidism / Book 1", Isbn 978-953-307-758-1. **Book Editor:** Drahomira Springer
Kitapta Chapter, Basımda . Kabul Tarihi 30.Nisan. 2011