

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**WISTAR ALBINO SIÇANLARDA STREPTOZOTOCİN
İLE OLUŞTURULAN DİYABETİK NEFROPATİNİN
TEDAVİSİNDE MELATONİN, QUERCETİN VE
RESVERATROL'ÜN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Hülya ELBE
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Nigar VARDI**

MALATYA-2012

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**WISTAR ALBINO SIÇANLARDA STREPTOZOTOCİN
İLE OLUŞTURULAN DİYABETİK NEFROPATİNİN
TEDAVİSİNDE MELATONİN, QUERCETİN VE
RESVERATROL'ÜN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Hülya ELBE
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Nigar VARDI

Bu tez, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2011/63 proje numarası ile desteklenmiştir.

ONAY SAYFASI

TEŞEKKÜR

*Tezimin hazırlanmasında büyük emeği olan değerli hocam **Prof.Dr. Nigar VARDI**'ya, bilgi ve deneyimleri ile bana yardımcı olan Anabilim Dalı Başkanımız **Prof.Dr. Ali OTLU**'ya, uzmanlık eğitimim süresince mesleki bilgi ve deneyimimi arttırmamda emeği geçen değerli hocalarım; **Prof.Dr. Mukaddes EŞREFOĞLU**, **Doç.Dr. Meltem KURUŞ**, **Doç.Dr. Mehmet GÜL** 'e ve ayrıca mesleki bilgileriyle tezime katkısı bulunan değerli hocam **Prof.Dr. Saim YOLOĞLU** ve **Doç.Dr. Burhan ATEŞ**'e çok teşekkür ederim.*

*Tezimin her aşamasında desteğini gördüğüm değerli arkadaşlarım **Dr. Elif TAŞLIDERE** ve **Dr. Aslı ÇETİN**'e, deney aşamasında bana çok yardımcı olan değerli arkadaşım **Bio. Azibe YILDIZ** 'a, çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum arkadaşım **Bio. Birgül YİĞİTCAN**'a, tüm mesai arkadaşlarıma, bugünlere gelmemde bana her zaman destek olan aileme, daima yanımda olan eşime ve canım kızıma çok teşekkür ederim.*

Uzm.Dr. Hülya ELBE

Ağustos 2012, Malatya

ÖZET

Böbrek hasarının patogeneğinde, oksijen radikallerinin rol aldıkları bilinmektedir. Diyabet'in reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) oluşumunu hızlandırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı, sıçanlarda streptozotocin (STZ) ile oluşturulan diyabetin neden olduğu böbrek hasarının giderilmesinde antioksidan özellikleri bilinen melatonin, quercetin ve resveratrol'ün etkilerini karşılaştırmalı olarak incelemektir.

Bu çalışmada, İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarından temin edilen toplam 47 adet, 300-360 gram, erkek Wistar albino cinsi sıçanlar kullanıldı. Denekler rastgele seçilerek 5 gruba ayrıldı. Grup 1 (n=7): Kontrol, Grup 2 (n=10): Diyabet (STZ 45 mg/kg/tek doz/ip), Grup 3 (n=10): Diyabet + Melatonin (10 mg/kg/30 gün/ip), Grup 4 (n=10): Diyabet + Quercetin (25 mg/kg/30 gün/ip), Grup 5 (n=10): Diyabet + Resveratrol (10 mg/kg/30 gün/ip). Sıçanların deney başında, ortasında ve sonunda açlık kan glukoz değerleri ile vücut ağırlıkları ölçüldü. 30 günlük deney sonunda ketamin anestezisi altında sıçanlar sakrifiye edildi. Pankreas ve böbrek dokuları çıkartıldı. Sol böbrekler ve pankreas histolojik, sağ böbrekler biyokimyasal değerlendirmede kullanıldı. Doku örnekleri %10'luk nötral formalinde fikse edildikten sonra parafine gömüldü. 5 µm kalınlığında alınan kesitlere Hematoksilen-Eozin, Periyodik Asid Schiff, Toluidin mavisi boyama metodları ile TGF-β1 immün boyaması uygulandı ve Leica DFC 280 ışık mikroskopunda değerlendirildi.

Diyabet grubunda, kontrol grubuna göre açlık kan glikoz seviyelerinde artış ile vücut ağırlıklarında azalma saptandı. Böbrek tubullerinde ve glomerüllerinde histopatolojik değişiklikler gözlemlendi. Tubullerde epitelyal dökülme, hücre şişmesi, intrasitoplazmik vakuolizasyon, mikrovillus kaybı ve peritubuler infiltrasyon tespit edildi. Glomerüllerde kapiller bazal membran kalınlaşması ve sklerotik değişiklikler izlendi. Bu grupta TGF-β1 boyanan hücreler belirgindi. Biyokimyasal analizlerde, diyabet grubunda kontrol grubuna göre MDA seviyesi artmış, SOD ve CAT aktiviteleri azalmıştı. Diyabetik sıçanlara melatonin, quercetin ve resveratrol verilmesi böbrek hasarını önemli derecede azalttı. Bu gruplardaki açlık kan glikoz düzeyleri diyabet grubuna göre belirgin olarak azalmıştı. Tubuler ve glomerüler değişiklikler diyabet grubuna göre anlamlı derecede hafifledi. Ayrıca biyokimyasal analizlerde, diyabet

grubuna göre MDA seviyesinde azalma gözlenirken, SOD ve CAT aktivitelerinde belirgin bir artış saptandı.

Bu çalışmada, sıçanlarda diyabetin neden olduğu böbrek hasarında oksidatif stresin rol oynadığı, diğer yandan melatonin, quercetin ve resveratrol uygulamalarının oksidatif stresi azaltmada etkili olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak, uyguladığımız tüm tedavi edici ajanların diyabete bağlı olarak ortaya çıkan böbrek hasarının giderilmesinde, antioksidan savunma sistemini destekleyerek yararlı olduğu düşüncesindeyiz.

Anahtar kelimeler: Streptozotocin, melatonin, quercetin, resveratrol, diyabet, böbrek, oksidatif stres, sıçan.

ABSTRACT

Their role of oxygen radicals are known in the pathogenesis of kidney damage. The studies have shown that diabetes accelerates the formation of ROS. The aim of the present study was to examine the antioxidative effects of melatonin, quercetin and resveratrol on STZ-induced diabetic nephropathy in rats.

In this study, weighing 300-360 g 47 Wistar albino male rats which were provided from Inonu University Laboratory Animals Research Center were used. The experimental objects were divided into 5 groups randomly: Group 1: Control, Group 2: Diabetes (STZ 45 mg/kg/single dose/ip), Group 3: Diabetes + Melatonin (10 mg/kg/day/ip for 30 days), Group 4: Diabetes + Quercetin (25 mg/kg/day/ip for 30 days), Group 5: Diabetes + Resveratrol (10 mg/kg/day/ip for 30 days). Blood glucose levels and weights of all rats were measured at the beginning, at the middle and at the end of study. At the end of the 30 days experiment, rats were sacrificed under ketamine anesthesia. Pancreas and kidney tissues were removed. Left kidneys and pancreas were used for histological analysis and right kidneys were used for biochemical analysis. The tissue samples were fixed in 10% formalin and were embedded in paraffin. Sections of the tissue were cut at 5 μ m, mounted on slides, stained with Hematoxylin-eosin (H-E), Periodic acid Schiff (PAS), Toluidin blue and TGF- β 1 and assessed on Leica DFC 280 light microscopy.

In diabetic group, blood glucose levels were increased and body weights were decreased compared to the control group. Histopathological changes were observed in the kidney tubules and glomerulus. Tubules were detected that epithelial desquamation, swelling, intracytoplasmic vacuolization, loss of microvilli and peritubular infiltration in the tubules. Glomerular basement membrane thickening and sclerotic changes were observed. In this group, TGF- β 1 stained cells were evident. Biochemical analyzes; results of diabetic rats showed that MDA level was increased while SOD and CAT activities were decreased compared to the control group. Administrations of melatonin, quercetin and resveratrol were reduced the renal injury in diabetic rats. Fasting blood glucose levels of these groups were decreased significantly when compared to diabetic group. Tubular and glomerular changes were significantly reduced when compared to diabetic group. In addition, in the biochemical analyzes; SOD and CAT activities were increased while MDA level was significantly decreased when compared to the diabetic group.

In this study, oxidative stress plays a role in kidney injury caused by diabetes mellitus in rats, on the other hand administration of melatonin, quercetin and resveratrol were shown to be effective in reducing oxidative stress. As a result, we suggest that all of the therapeutic agents we administered are beneficial in the treatment of kidney damage induced by diabetes mellitus via supporting antioxidant defence system.

Key words: Streptozotocin, melatonin, quercetin, resveratrol, diabetes, kidney, oxidative stress, rat.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLolar DİZİNİ	xv
GRAFİKLER DİZİNİ	xvi
RESİMLER DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Böbrek anatomisi	2
2.2. Böbrek embriyolojisi	9
2.3. Böbrek histolojisi	15
2.4. Diabetes mellitus	24
2.5. Diyabetik nefropati	25
2.6. Streptozotocin	27
2.7. Antioksidanlar	28
2.7.1. Melatonin	28
2.7.2. Quercetin	29
2.7.3. Resveratrol	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1. Deney grupları	32
3.2. Histolojik analiz	33
3.2.1. TGF- β 1 immün boyaması	35
3.3. Biyokimyasal analiz	36
3.3.1. Açlık kan glukoz ölçümü	36
3.3.2. Doku biyokimyası	36
3.3.3. BUN ve kreatinin düzeyi	39
3.4. Vücut ve böbrek ağırlığı ölçümleri	39

3.5. İstatistiksel analiz	40
4. BULGULAR	41
4.1. Histopatolojik bulgular	41
4.1.1 Kontrol grubu	41
4.1.2. Diyabet grubu	45
4.1.3. Diyabet + Melatonin grubu	54
4.1.4. Diyabet + Quercetin grubu	58
4.1.5. Diyabet + Resveratrol grubu	63
4.2. Biyokimyasal bulgular	68
4.2.1. Kan biyokimyası	68
4.2.1.1. Açlık kan glukoz düzeyi	68
4.2.1.2. BUN düzeyi	70
4.2.1.3. Kreatinin düzeyi	70
4.2.2. Doku biyokimyası	72
4.3. Ağırlık değerleri	75
4.3.1. Vücut ağırlığı	75
4.3.2. Böbrek ağırlığı	77
5. TARTIŞMA	78
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	85
7. KAYNAKLAR	86
8. EKLER	102
9. ÖZGEÇMİŞ	103

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

STZ: Streptozotocin

NAD: Nikotinamid adenin dinükleotid

DNA: Deoksiribonükleik asit

WT 1: Wilms tümör supressör 1

GDNF: Glial kökenli nörotrofik faktör

PAX 2: Paired box gene 2

PAX 8: Paired box gene 8

RET: Rearranged during transfection

HGF: Hepatocyte growth factor

MET: Mesenchymal-epithelial transition

FGF-2: Fibroblast growth factor-2

BMP-7: Kemik morfojenik proteini-7

DAX 1: Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1

kDA: kilo dalton

PAS: Periodic acid schiff

K: Potasyum

Na: Sodyum

ATPaz: Adenozin trifosfataz

JG: Jukstaglomerüler

DM: Diabetes Mellitus

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

IDDM: İnsüline bağımlı diyabetes mellitus

NIDDM: İnsüline bağımlı olmayan diyabetes mellitus

DN: Diyabetik nefropati

GFH: Glomerüler filtrasyon hızı

SDBY: Son dönem böbrek yetmezliği

5-HT: 5-Hidroksi triptamin

AANAT: Arilalkilamin N-asetil transferaz

NAS: N-asetilserotonin

HIOMT: Hidroksi indol-O-metil transferaz

APUD: Amin precursor uptake and decarboxylation

MT 1: Melatonin reseptörü 1

MT 2: Melatonin reseptörü 2
ROS: Reaktif oksijen türleri
LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein
BUN: Kan üre azotu
NTF: Nötral tamponlanmış formalin
H-E: Hematoksilen eozin
TGF-β1: Transforming growth factor- beta1
Dk.: Dakika
PBS: Phosphate buffer saline
AEC: 3, aminoetil 9, karbazol
GSH: Redükte glutatyon
BSA: sığır serum albumini
GSSG: Glutatyon redüktaz
SOD: Süperoksit dismutaz
EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit
NADPH: β-nikotinamid adenin dinükleotid
NaN₃: Sodyum azid
Na₂CO₃: Sodyum karbonat
CuSO₄: Bakır sülfat
NaOH: Sodyum hidroksit
KH₂PO₄: Monopotasyum fosfat
K₂HPO₄: Dipotasyum fosfat
Na₂HPO₄: Sodyum fosfat dibazik
NaH₂PO₄: Sodyum fosfat
H₂O₂: Hidrojen peroksit
NaCl: Sodyum klorür
TBA: 2-tiyobarbütirik asid
TCA: Trikloroasetik asid
MDA: Malondialdehit
TNB: 5-tio-2-nitrobenzoat
CAT: Katalaz
GLUT-2: Glikoz taşıyıcısı-2
ADP: Adenozindifosfat
ATP: Adenozintrifosfat

ECM: Ekstrasellüler matriks

AMPK: Adenozin monofosfat aktive protein kinaz

AGE: İlerlemiş glikolizasyon son ürünleri (Advanced Glycation Endproducts)

NF-κB: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

mRNA: mesajcı RNA

RNA: Ribonükleik asit

nm: nanometre

gr: gram

µm: mikrometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Böbrek anatomisi

Şekil 2. Böbreğin kanlanması

Şekil 3. Böbreğin gelişim evreleri

Şekil 4. Glomerüllerin gelişimi

Şekil 5. Böbreğin lobulasyonu

Şekil 6. Nefron

Şekil 7. Glomerülün yapısı

Şekil 8. Jukstaglomerüler komplekste yer alan hücreler

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Biyokimyasal parametrelerin birimleri

Tablo 2. Histopatolojik değerlendirme sonuçları

Tablo 3. Glomeruloskleroz değerlendirme sonuçları

Tablo 4. TGF- β 1 immunopozitif boyanan tubullerin sayısı

Tablo 5. Gruplararası açlık kan glukoz değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 6. BUN ve kreatinin düzeyi yönünden grupların karşılaştırılması

Tablo 7. MDA, CAT, SOD ve tGSH yönünden grupların karşılaştırılması

Tablo 8. Gruplararası vücut ağırlık değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 9. Gruplararası böbrek ağırlık değerlerinin karşılaştırılması

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. Grupların açlık kan glukoz seviyeleri

Grafik 2. Grupların BUN seviyeleri

Grafik 3. Grupların kan kreatinin seviyeleri

Grafik 4. Grupların MDA düzeyleri

Grafik 5. Grupların CAT aktiviteleri

Grafik 6. Grupların SOD aktiviteleri

Grafik 7. Grupların tGSH düzeyleri

Grafik 8. Grupların vücut ağırlık değerleri

Grafik 9. Grupların böbrek ağırlık değerleri

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Kontrol grubu; normal görünümdeki pankreas Langerhans adacığı (oklar). H-E; X20.

Resim 2. Kontrol grubu; glomerül (yıldız) ve tubul yapıları (oklar) normal olarak izlenmekte. H-E; X20.

Resim 3. Kontrol grubu; glomerüler kapiller lümenleri (ince ok) ve tubuler bazal membranların görünümü (kalın oklar). PAS; X20.

Resim 4. Kontrol grubu; proksimal tubul apikalinde yer alan, mikrovillus yapıları görülmekte (oklar). PAS; X40.

Resim 5. Kontrol grubu; proksimal ve distal tubul hücrelerinin görünümü. Toluidin mavisi; X100.

Resim 6. Kontrol grubu; proksimal ve distal tubul epitel hücrelerinde izlenen zayıf immunopozitiflik. TGF- β 1; X40.

Resim 7. Diyabet grubu; Langerhans adacığının merkezinde iri nukleuslu hücreler görülmekte (ok). H-E; X40.

Resim 8. Diyabet grubu; glomerüler (G) ve tubuler (T) hasar izlenmekte. H-E; X20.

Resim 9. Diyabet grubu; tubul lümeninde izlenen epitelial döküntüler (oklar). H-E; X20

Resim 10. Diyabet grubu; şişmiş tubuler epitelial hücreler izlenmekte (oklar). H-E; X40.

Resim 11. Diyabet grubu; proksimal tubul epitel hücrelerinin bazalinde izlenen vakuolizasyon (oklar). H-E; X100.

Resim 12. Diyabet grubu; yaygın (yıldız) ve peritubuler (oklar) infiltrasyon alanları görülmekte. H-E; X20.

Resim 13. Diyabet grubu; proksimal tubul epitel hücrelerinin apikalinde mikrovillus kaybı görülmekte (oklar). PAS; X40.

Resim 14. Diyabet grubu; glomerüler mezengiumda PAS (+) boyanma ve kapiller lümenin izlenmediği alanlar dikkati çekmekte (yıldız). PAS; X40.

Resim 15. Diyabet grubu; kapiller bazal membranın kalınlaştığı görülmekte (oklar) PAS; X40.

Resim 16. Diyabet grubu; tubuler bazal membran kalınlaşması dikkat çekiciydi (oklar). PAS; X40.

Resim 17. Diyabet grubu; tubullerde PAS (+) boyanan ve sınırları düzenli, farklı büyüklükte vakuoller dikkati çekmekte (oklar). PAS; X40.

Resim 18. Diyabet grubu; tubul epitel hücrelerinde mavi renkte boyanan, irili ufaklı granüller görülmekte (oklar). Toluidin mavisi; X100.

Resim 19. Diyabet grubu; tubullerde (T) şiddetli immunopozitiflik izlenmekte. TGF- β 1; X20.

Resim 20. Diyabet grubu; tubuller (T) şiddetli immunopozitif boyanırken, glomerüllerde (G) zayıf boyanma görülmekte. TGF- β 1; X40.

Resim 21. Diyabet + Melatonin grubu; Langerhans adacıklarının görünümü. H-E; X40.

Resim 22. Diyabet + Melatonin grubu; hafif tubuler epitelyal dökülme ve bazı tubul hücrelerinde hidropik değişiklikler görülmekte (oklar). H-E; X20.

Resim 23. Diyabet + Melatonin grubu; tubullerin etrafındaki bazal membranın düzgün sınırlı olduğu ve proksimal tubullerde yer yer fırça kenar yapısının korunduğu görülmekte (oklar). PAS; X40.

Resim 24. Diyabet + Melatonin grubu; mavi renkte boyanan granüller seyrek olarak görülmekte (oklar). Toluidin mavisi; X100.

Resim 25. Diyabet + Melatonin grubu; tubullerde (T) zayıf boyanma izlenmekte. TGF- β 1; X40.

Resim 26. Diyabet + Quercetin grubu; Langerhans adacığının görünümü. H-E; X40.

Resim 27. Diyabet + Quercetin grubu; tubul lümeninde orta derecede epitelyal dökülme görülmekte (oklar). H-E; X20.

Resim 28. Diyabet + Quercetin grubu; bazı tubullerde izlenen şişmiş epitelyal hücreler dikkati çekmekte (oklar). H-E; X20.

Resim 29. Diyabet + Quercetin grubu. PAS; X40.

Resim 30. Diyabet + Quercetin grubu; glomerüler kapiller lümen belirgin olarak izlenmekte (oklar). PAS; X40.

Resim 31. Diyabet + Quercetin grubu; mavi boyanan granüller seyrek olarak görülmekte (ok). Toluidin mavisi; X100.

Resim 32. Diyabet + Quercetin grubu; tubullerde (T) zayıf boyanma dikkat çekmekte. TGF- β 1; X40.

Resim 33. Diyabet + Resveratrol grubu; Langerhans adacıklarındaki bazı hücrelerde vakuoller izlenmekte (ok). H-E; X40.

Resim 34. Diyabet + Resveratrol grubu; tubul epitel hücrelerinde dökülme (yıldız) ve şişme izlenmekte (oklar). H-E; X20.

Resim 35. Diyabet + Resveratrol grubu; tubul etrafındaki bazal membran düzgün sınırlıydı (oklar). PAS; X20.

Resim 36. Diyabet + Resveratrol grubu; bazı proksimal tubul hücrelerinin apikalinde mikrovillus kaybı (ince oklar) ve glomerüllerde yer yer bazal membran kalınlaşması (kalın ok) izlenmekte. PAS; X40.

Resim 37. Diyabet + Resveratrol grubu; proksimal tubul epitel sitoplazmasında mavi renkteki granüllerin görünümü (oklar). Toluidin mavisi; X100.

Resim 38. Diyabet + Resveratrol grubu; tubullerde (T) zayıf boyanma görülmekte. TGF- β 1; X40.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diyabet, insulin yokluğu veya azlığı sonucu ortaya çıkan hiperglisemiye bağılı olarak gelişen, pek çok sistemi etkileyen ciddi bir hastalıktır. Dünya nüfusunun yaklaşık %3'ü bu hastalıktan etkilenmektedir (1). Oksidatif stresin artması ve antioksidan kapasitesindeki değişimler kronik diyabet patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır (2, 3, 4). Yapılan deneysel ve klinik çalışmalara göre hipergliseminin direkt veya indirekt olarak serbest radikal oluşumunu arttırması ile oksidatif stres gelişmektedir (5, 6).

Hayvanlarda deneysel diyabet modelleri oluşturmak amacıyla en çok kullanılan kimyasal ajanlardan birisi streptozotocindir (STZ) (7, 8). STZ *Streptomyces achromogenes* tarafından üretilen bir antibiyotiktir (9). STZ, pankreasta serbest radikal temizleyicisi olan süperoksit dizmutazı inhibe eder. Serbest radikallerin birikmesi sonucu NAD^+ depleasyonu ve DNA hasarı meydana getirerek beta hücrelerini yıkıma uğrattır (7, 8).

Resveratrol üzüm, şarap, yer fıstığı ve yaban mersininde bulunan polifenolik bir bileşiktir (10). Resveratrol, koenzim Q ile yarışarak reaktif oksijen bileşiklerinin oluşumunu baskılamaktadır. Ayrıca mitokondride oluşan süperoksit radikallerini yakalar ve fenton reaksiyonu ürünleri tarafından indüklenen lipid peroksidasyonunu inhibe etmektedir (11).

Pineal bezde üretilen melatonin, hem oksijen süpürücü hem de endojen antioksidan sistemini stimüle etme özelliği ile güçlü bir antioksidan etkiye sahiptir (12, 13). Melatonin bu özellikleri ile diyabette serbest radikallere bağılı olarak gelişen böbrek hasarına karşı koruyucu olabileceğini düşündürmektedir (13).

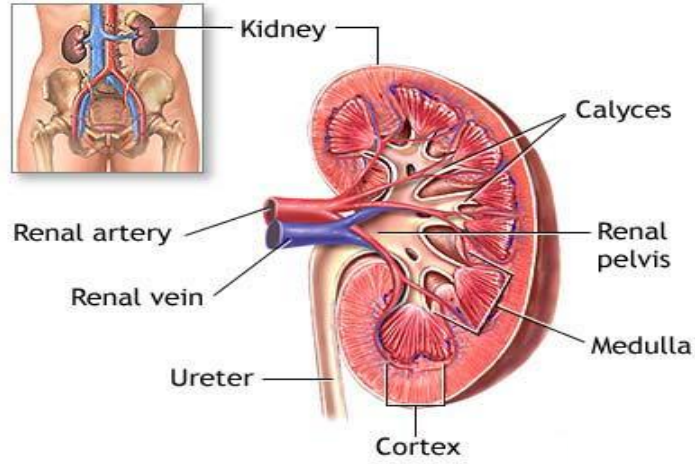
Quercetin ise, bitkilerde bulunan fenolik pigment ürünü olan bir flavonoiddir (14). Doğal bir antioksidan olan quercetin, oksidatif hasarı ve hücre ölümünü ksantin oksidaz inhibisyonu ve lipid peroksidasyonu gibi farklı mekanizmalarla engeller (9, 15). Metal iyonlarıyla birleşir, oksijen radikallerini süpürür. Quercetin'in kardiyoprotektif, antiülseratif, antiinflamatuvar, antiallerjik, antiviral ve antibakteriyel özellikleri olduğu da bilinmektedir (10).

Bu çalışmada, STZ ile oluşturulan diyabetik nefropati üzerine melatonin, quercetin ve resveratrol'ün tedavi edici etkileri histokimyasal, immunohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle incelenmeye çalışılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Böbrek Anatomisi

Böbrekler kandan idrarı süzen ve boşaltım yollarına veren bir çift organdır. Kandaki üre ve metabolik artıkların atılması ile elektrolit ve su dengesinin sağlanmasında görev alır (16, 17, 18) (Şekil 1).



Şekil 1. Böbrek Anatomisi (19).

Karın arka duvarının en üst kısmında ve columna vertebralis'in her iki yanında bulunan böbrekler (16, 17) retroperitoneal olarak yerleşmişlerdir (20, 21). Böbrekler fasulye şeklinde olup, rengi koyu kırmızı kahvedir (17, 22, 23, 24). Her bir böbrek yaklaşık 10-13 cm uzunluğunda, 5-8 cm genişliğinde ve 2,5-3 cm kalınlığındadır (25, 26, 27, 28). Böbrekler şekil ve hacim olarak benzer olmalarına rağmen sol böbrek sağ böbreğe oranla biraz daha uzun ve dardır ve orta hatta daha yakındır (16, 20). Ağırlığı erişkin erkeklerde 120-200 gr olan böbrekler kadınlarda biraz daha hafiftir (23, 29, 30).

Her iki böbrekte en dıştan fascia renalis denilen ince bir örtü ile örtülmüştür. Fascia renalis'in altında böbreği saran capsula adiposa adı verilen yağ tabakası vardır. Yağ kapsülünün de altında böbreği saran ince fibröz sağlam bir kapsül bulunur. Bu yapıya capsula fibrosa denir (17, 18, 23). Karın boşluğunun sağ üst kısmında karaciğer bulunması nedeniyle, sağ böbrek soldakine oranla biraz daha aşağıda yer alır (16, 17, 18, 20, 21, 22). Böbreklerin dış kenarları konvektir ve iç kenarları konkavdır (17, 21, 25). Konkav olan medial kenarındaki vertikal yarığa hilum renale denir (21, 22, 25). Hilum renale böbreğin içinde sinus renalis denen boşluğun girişidir (21, 23, 25). Burada böbreğe giren ve çıkan oluşumlar bulunur (17, 21, 22, 23). Hilum'daki oluşumlar

önden arkaya doğru vena (v.) renalis, arteria (a.) renalis ve pelvis renalis olarak yerleşirler (21, 25, 31). Böbreklerin ön (facies anterior) ve arka (facies posterior) olmak üzere iki yüzü, iç (margo medialis) ve dış (margo lateralis) olmak üzere iki kenarı, üst (ekstremitas superior) ve alt (ekstremitas inferior) olmak üzere iki ucu vardır (16, 17, 21).

Facies anterior: Böbreklerin ön yüzleri konveks olup, öne ve biraz da dışa doğru bakarlar (16). Bu yüzün komşuları sağ ve sol tarafta farklıdır (16, 25). Sağ böbreğin ön yüzünün yukarıda kalan küçük bir bölümü sağ böbreküstü bezi ile, bunun aşağısında kalan geniş kısım karaciğerin sağ lobu ile, alt uçtaki küçük bir kısım fleksura coli dekstra ile (20) ve iç kenarına yakın şerit şeklindeki dar bir saha da duodenum'un ikinci bölümü olan pars descendens ile komşuluk yapar (16, 17, 18, 21, 25). Sağ böbrek karaciğerden recessus hepatorenalis ile ayrılır (21). Sol böbreğin ise ön yüzünün medial kenara yakın olan bölümünün üst kısmı glandula suprarenalis sinistra ile, dış kenara yakın geniş bir alan intraperitoneal dalak ile komşuluk yapar (16, 17, 20, 21, 25).

Facies posterior: Böbreklerin, arkaya ve biraz da iç tarafa bakan yüzleri yağ dokusundan ve gevşek bağ dokusundan oluşan bir yastık içerisine oturmuş durumdadır. Böbreklerin retroperitoneal organlar olmaları nedeniyle, arka yüzlerinde periton bulunmaz (16). Her iki böbreğin arka yüzleri üstte diyafragma ve bunun aşağısında medialden laterale musculus (m.) psoas major, m. quadratus lumborum (21) ve m. transversus abdominis'in üzerine oturur (16, 20, 25, 26). Bu kaslar ile böbrekler arasında a. v. subcostalis, ilk bir veya iki a. lumbalis, nervus (n.) subcostalis, n. iliohypogastricus ve n. ilioinguinalis bulunur (16, 20, 21). Sağ böbreğin üst kutbu 12. kaburga ile, sol böbreğin üst kutbu ise 11. ve 12. kaburgalar ile komşuluk yapar (16, 17, 20).

Margo lateralis: Böbrekler karın duvarının arka dış kısmına yönelmiş olup, dışa biraz da arkaya ve yukarı bakarlar. Sol böbreğin dış kenarının üst kısmı dalak ile komşudur (16).

Margo medialis: Böbreğin iç kenarının orta kısmı konkav, her iki ucu ise konvekstir. Bu kenar mediale, biraz da öne ve aşağıya bakar. Konkav olan orta kısmında vertikal yönde hilum renale yer alır. Hilum renale'de bulunan yapıların pozisyonları önemlidir. Bunlar önden arkaya doğru v.renalis, a. renalis'in 2-3 dalı; üreter ve a. renalis'in bir dalı bulunur. Bazen üreter'in arkasında a. renalis'in bir dalı ile birlikte v. renalis'in bir dalı da bulunabilir (16). Pelvis renalis üreterlerin yassılaşmış, huni şeklindeki genişlemiş üst kısmıdır. Pelvis renalis'in tepesi üreterle devam eder.

Pelvis renalis’de iki veya üç kaliks major vardır. Her bir calyx major de iki veya üç calyx minör’e bölünür. Her bir calyx minör’e ise pyramides renalis’lerin tepesi olan papilla renalis’ler açılır (21).

Herbir böbrek üç bağ dokusu örtüsüne sahiptir (25, 32). Böbreği içten dışa doğru capsula fibrosa, capsula adiposa ve fascia renalis olmak üzere üç kılıf sarar (16, 22, 25).

Capsula fibrosa (Renal kapsül): Böbreği dıştan saran, ince, sağlam, genişleme yeteneği az, fibröz bir kılıftır (16, 25). En derinde bulunan bu tabaka düzgün sınırlıdır (22). Capsula fibrosa böbrek hilusuna geldiğinde iki yaprağa ayrılır. Bu yapraklardan birisi, böbrek hilusunda bulunan yapıların üstüne geçerek, onların adventisyası olarak devam eder. Diğer yaprak ise hilum renale’den içeri girer ve papillalar hariç olmak üzere sinus renalis’in iç yüzünü döşer. Capsula fibrosa, sağlam kollajen liflerden yapılmıştır (16). Travmalara karşı bariyer görevi görür (32) ve böbreğin şeklinin korunmasına yardımcı olur (22). Capsula fibrosa ile böbrek dokusu arasında tunica subfibrosa denilen ince bir tabaka bulunur. Düz kas lifleri de içeren tunica subfibrosa, sinus renalis’in iç yüzünü de döşer. Sinus renalis’i döşeyen bu bölümde düz kas lifleri daha fazla oranda bulunur ve özellikle papillalar etrafında yoğunlaşarak kas halkaları oluşturur. Tunica subfibrosa böbrek dokusuna sıkıca yapışmasına karşılık, capsula fibrosa’ya gevşek olarak tutunur (16).

Capsula adiposa: Capsula fibrosa’yı dıştan saran bir yağ tabakasıdır (16, 22). Bu tabaka da böbreği travmalara karşı korur ve abdominal kavite içinde böbrekleri sağlam bir şekilde yerinde tutar (22, 26). Bu yağ tabakasının kalınlığı şahsın şişmanlık durumuna bağlı olarak değişir. Ancak böbreğin ön yüzünde, diğer yüz ve kenarlarına oranla daha az miktarda bulunur (16). Böbrek hilusundan geçerek sinus renalis’e girer ve sinus renalis’deki yapılar arasında kalan boşlukları dolduran yağ dokusu ile devam eder (16, 21, 25).

Fascia renalis (Gerota fasciası): Karın duvarındaki fascia subserosa’nın capsula adiposa’yı dıştan saran bölümüne fascia renalis denir. Periton ile fascia endoabdominalis arasında bulunan fascia subserosa, böbreğin dış kenarı yakınında yoğunlaşır ve iki yaprağa ayrılır. Bu yaprakların birisi böbreğin ön, diğeri ise arka tarafından geçerek mediale doğru uzanır. Fascia prerenalis de denilen ön yaprak, medialde böbrek damarları, v. cava inferior ve aorta’nın önünden geçerek karşı tarafın aynı yaprağı ile birleşir. Fascia retrorenalis de denilen arka yaprak, ön yapraktan daha kalındır (16).

Her bir böbrek hastalık durumu hariç kolayca ayrılabilen fibröz bir kapsül tarafından örtülmüş düz ön ve arka yüze sahiptir (20). Frontal kesitlerde böbrek parankiminde hem renk hem de fonksiyon bakımından iki ayrı kısım görülür (16, 17). Açık renkli (kırmızı) olan dış kısmına korteks renalis (17), daha koyu renkli (kahverengi-kırmızı) ve çizgili görünümlü olan iç kısmına ise medulla renalis denir (16, 22, 26). Orta kısımda bulunan böbrek şeklindeki boşluğa ise sinus renalis denir. Korteks renalis nefrojen doku kökenlidir ve idrarı süzen yapılar ihtiva eder. Medulla renalis ise üreter tomurcuğundan köken alır ve toplayıcı kanallardan oluşur (16).

Medulla renalis: Böbrek kitlesinin yaklaşık 2/3'ünü kapsar (25). Medulla renalis'i, pyramis renalis (Malpighi piramitleri) denilen 8-10 adet (bazen 18-20) koni şeklindeki yapılar oluşturur (16, 17, 22, 23, 25, 30). Bu piramitlerin basis pyramidis denilen taban kısımları böbreğin dış yüzüne (16), papilla renalis denilen tepe kısımları ise sinus renalis'e yönelmiştir (16, 17, 22). Papilla renalis'lerin her birine 20-25 adet foramen papillaris açılır (17). Pyramis renalis'ler birbirlerine değmeyecek şekilde sinus renalis etrafında dizilmişlerdir. Bunların aralarında columna renalis (Bertin sütunları) denilen kortikal cevher uzantıları bulunur (16, 30). Üç boyutlu olarak düşünüldüklerinde, bir pyramis renalis'in sadece papilla renalis kısmı hariç olmak üzere, diğer yüzleri tamamen kortikal cevherle sarılıdır (16). Pyramis renalis ve etrafını saran kortikal cevher bölümüne lobus renalis denir (16, 17). Buna göre, bir böbrekte piramit sayısı kadar lobus renalis bulunur. Yeni doğanlarda böbreğin dış yüzünde bu lobların sınırlarını belirleyen sığ oluklar görülür. Daha sonra bu oluklar kaybolarak böbreğin dış yüzü düz bir görünüm alır. Kesitlerde koyu kırmızı renkte olan pyramis renalis'lerin taban kısımlarından, kortikal cevhere ait olan bu uzantılara pars radiata (Stria medullaris= Ferrein uzantıları) denir (16).

Korteks renalis: Böbrek kitlesinin yaklaşık 1/3'ünü kapsar (25). Yaklaşık 1 cm kalınlığındadır (32). Korteks renalis'te bulunan glomerüller ve toplayıcı kanallar böbrekte granüler bir görünüm oluşmasına neden olur (30). Papillaları hariç olmak üzere, pyramis renalis'lerin her tarafını saran böbrek dokusudur. Kortikal cevherin iki bölümü vardır (16). Korteksin böbrek kapsülüne yakın olan bölümüne zona eksterna denir (25). 6 mm kalınlığında olan ve böbreği bir kabuk gibi saran bu bölüm capsula fibrosa ile pyramis renalis'lerin taban kısımları arasında bulunur (16). Malpighi piramidlerine yakın olan iç bölüme ise zona interna denir (25). Sinus renalis'e kadar uzanan bu ikinci bölüm, kesitlerde pyramis renalis'ler arasında bir sütun şeklinde görülürler. Bu nedenle bunlara columna renalis (Bertin sütunları) denir (16, 17, 25).

Taze preparatlarda kortikal cevherin kabuk şeklindeki birinci bölümü incelendiğinde, medullar cevhere ait olan pars radiata ve kortikal cevhere ait olan pars convulata olmak üzere farklı iki bölümden oluştuğu görülür. Pars radiata, daha koyu renkli ve koni şeklinde sahalar olup, medullar cevherin kortikal cevher içerisine gönderdiği uzantılardır. Pars convulata ise, iki pars radiata arasında kalan daha açık renkli ve daha kompleks yapılı sahalar. Burada kandan idrarı süzen corpusculum renale'ler ve idrar kanalcıkları'nın bir kısmı bulunur. Corpusculum renale (Malpighi cisimcikleri) küçük kırmızı nokta şeklinde yapılar olarak görülürler (16).

Sinus renalis: Böbrek, her iki kenarından geçecek şekilde ön-arka yarılarına ayrıldığında, hilum renale'nin böbrek içinde bir boşlukla devam ettiği görülür. Böbrek şeklinde olan bu boşluğa sinus renalis denir (16). Bir sinus renaliste sayıları 4-14 adet arasında değişen calyx renalis minör bulunur (16, 17, 20, 22). Huni şeklindeki calyx renalis minör'ler papilla renalis'lerin çevresine yapışırlar. Bunların her birine 1-3 adet arasında değişen sayıda papilla renalis açılır. Calyx renalis minör'lerin 2-3 tanesi birleşerek calyx renalis major'u oluşturur. Bunlar da kendi aralarında birleşerek pelvis renalis'i meydana getirirler (16, 17, 20). Calyx'lerin duvarında bulunan spiral şekilli kas liflerinin kontraksiyonu sonucunda idrar aşağıya doğru iletilir (16). Huni şeklinde olan pelvis renalis birinci bel omuru hizasında üreterle birleşir (17).

Glomerulus'da süzülen idrar kanal sisteminden geçerek, papilla renalis'deki foramen papillare adı verilen deliklerden calyx'lere dökülür. Süzülmenin başladığı bu yerden sonlanma yerine kadar olan kanal sistemine tubulus renalis denir. Tubulus renalis hem köken hem de fonksiyon bakımından iki farklı bölümden oluşur (16).

Birinci bölüm (İdrar kanalcıkları): Böbreklere günde ortalama olarak 1500 lt kan gelir. Bu kandan 1-2 lt idrar süzülür (17). İdrarın süzülmesini sağlayan kanal sistemi capsula glomerularis (Bowman kapsülü) ile başlar. Bowman kapsülünün içinde glomerulus denilen damar yumağı bulunur. Glomerulus ve bunu saran Bowman kapsülüne birlikte corpusculum renale denir. Her bir böbreğin kortikal cevherinin pars convulata denilen bölümünde yaklaşık 1.250.000 adet corpusculum renale bulunur. Corpusculum renale'nin damarların girip çıktığı kutbuna polus vascularis, süzülen idrarın çıktığı kutbuna ise polus tubularis denir. Her bir Bowman kapsülünden bir adet idrar kanalcığı başlar. Bu kanallar böbrek dokusundan muhtelif kısımlarında kıvrımlar yaparak uzanır ve sonunda toplayıcı kanallara açılırlar. Seyri esnasında bir takım genişleme ve daralmalar gösteren idrar kanalcıkları birbirleriyle anastamoz yapmazlar. Bu bölüme ait kanalcıklarda, glomerulusta kandan süzülen idrarın suyu tekrar emilerek

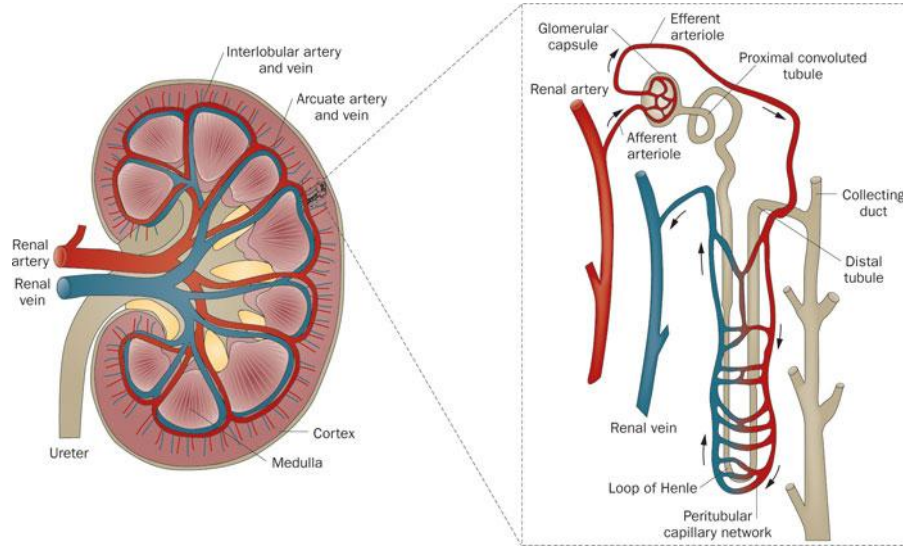
kan dolaşımına geçer (16). Her bir corpusculum renale ve buna ait idrar kanalcığı, kandan idrarı süzen bir birim oluşturur (16, 26, 30).

İkinci bölüm (Toplayıcı kanallar): Bu kanallar sadece idrarın nakli ile ilgilidirler ve idrar burada herhangi bir değişikliğe uğramaz. İdrar kanalcıkları toplayıcı kanallara açılırlar. Toplayıcı kanallar da birleşerek daha kalın toplayıcı kanalları oluşturur. Sonunda her bir papilla renalis’de bulunan ve sayıları 10-25 arasında değişen (her böbrekte toplam 116-776) deliklerle (for. papillare) calyx renalis minör’e açılırlar. Toplayıcı kanallar, böbreğin medullar cevherinde (pyramis renalis ve pars radiata) bulunurlar (16).

Böbreğin segmentleri: Böbreğin kan damarları dağılım sahasına göre 5 segmente ayrılır (16, 25, 26). Bunlardan birisi üst kutupta (segmentum superius), birisi alt kutupta (segmentum inferius), ikisi ön yüzün orta kısmında (segmentum anterius superius, segmentum anterius inferius), birisi de arka yüzün orta kısmında (segmentum posterius) bulunur (16, 25).

Böbreğin Kanlanması

A. renalis’ler her iki tarafta 1. ve 2. lumbal vertebra’lar arasındaki discus intervertebralis hizasında, a. mesenterica superior’un başlangıcının hemen altından (20, 24) dik açı ile aorta’dan çıkarlar (16, 17, 25). Ancak böbreklerin pozisyonundan dolayı, sol arter sağ arterden biraz daha yukarıda bulunur (16, 20). Sağ a.renalis soldakinden daha uzundur (20, 25). A. renalis’ler hilum renalis’e gelince böbrek segmenti sayısı kadar (genellikle 5) dala ayrılırlar. A. segmentalis denilen bu dalların çoğu, pelvis renalis’in ön tarafından geçer. Fakat bazen 1 veya 2 tanesi en arkadan geçebilir. A. segmentalis’ler sinus renalis’de tekrar dallarına ayrılarak calyx renalis minör’lerin çevresinde columna renalis’lere girerler (16). Böbrek lobları arasında uzanan bu dallara a. interlobaris denir (16, 30). A. interlobaris’ler kortikal ve medullar cevher hizasında yan tarafa kıvrılarak iki cevher arasında bir kavis şeklinde uzanırlar. A. arcuata denilen bu arterler, birbirleriyle anastomoz yapmazlar. A.arcuata’lardan dik olarak çıkan ince dallara, böbrek lobçukları arasında uzanmaları nedeniyle a. interlobularis (radyal arterler) adı verilir. A. interlobularis’lerden yan taraflara uzanan ince dallara arteriola glomerularis afferentes denir (16). Her a. interlobularis’ten 6-11 adet afferent arteriol dallanır (33). Bu arterioller capsula glomerularis’in (Bowman kapsülü) damar kutbundan girerek içeride rete capillare glomerulare denilen kılcal damar yumağını oluştururlar. Bu kılcal damar yumağı tekrar birleşerek arteriola glomerularis efferentes’i oluşturur (16, 30). (Şekil 2)



Şekil 2. Böbreğin Kanlanması (34).

Nefronların çoğu farklı bir damar yatağından beslenir. Tubullerin etrafındaki bu damarlara peritubuler veya interstisyel kapillerler denir (30). Kılcal damar yumağı v. interlobularis'e açılır. V. interlobularis de sırasıyla v. arcuata, v. interlobaris, v. segmentalis ve sonuçta v. renalis olarak v. cava inferior'a açılır. Böbrekte arteriovenöz anastomozlar vardır. Bu tür anastomozlar calyx renalis'ler civarında a. ve v. interlobularis'ler arasında, kortikal cevherin ince damarları arasında tespit edilmiştir. Bu anastomozlar sayesinde herhangi bir nedenle glomerulustan geçemeyen kanın bir kısmı veya tamamı süzülmezsizin doğrudan venöz sisteme geçebilir (16).

Böbreğin Lenf Drenajı

Lenf damarları 3 pleksus oluşturur. Bunlardan birincisi tubulus renalis'lerin çevresinde, ikincisi fascia renalis'in altında, üçüncüsü de corpus adiposum pararenale'de bulunur. Birinci pleksustaki damarlar birleşerek 3-4 ana dal oluştururlar. Hilum renale'den çıkarken diğer iki pleksus'un damarları ile birleşirler (16). Böbrekten çıkan lenf damarları v.renalis'i takip ederek aortanın yan tarafındaki nodi lymphatici lumbales (aortici laterales)'e açılırlar (16, 18, 20).

Böbreğin Sinirleri

Böbreklerin sempatik lifleri n. splanchnicus minör, n. splanchnicus imus ve truncus sympathicus'un lumbal bölümünden, parasempatik lifleri ise n. vagus'tan gelir (16). Bu lifler önce pleksus coeliacus (16, 18, 31), daha sonra a. renalis etrafındaki pleksus renalis aracılığı ile böbreğe gelirler. Bu pleksus içinde birçok ganglion bulunur. Bunlardan en büyüğü a. renalis'in başlangıç kısmının ön tarafında bulunan ganglion

(ggl.) aorticorenale'dir. Bu lifler kan damarları ile tubulus renalis'in hücrelerine giderler. Sempatikler damarları daraltarak, damardan geçen kanın miktarını azaltırlar. Böylece kandan süzülen idrarın miktarını azaltmış olurlar. Böbrek ağrısı tüm bel bölgesinde duyulur. Kolik tarzda kesici ve batıcı bir ağrı şeklindedir. Bazen nefes almamızı dahi zorlaştırır (16). Böbreğin afferent lifleri spinal korda T10, T11 ve T12'den girerler (35).

2.2. Böbrek Embriyolojisi

Üriner sistem, embriyonun arka duvarı boyunca uzanan intermediate mezodermden gelişir (36, 37, 38, 39). Horizontal planda embriyonun katlanması esnasında intermediate mezoderm servikal bölgede ventrale göç eder ve somitlerle olan bağlantısı kaybolur. Gövde bölgesinde primitif aortanın her bir kenarında mezodermin bu longitudinal kabartısına ürogenital kabartı denir (38, 40). Ürogenital kabartı, üriner ve genital sistemlerin her ikisinin kısımlara ayrılmasına sebep olur. Genital sistemi oluşturan kısma gonadal kabartı, üriner sistemi oluşturan kısma ise nefrojenik kordon denir (38, 40, 41). Nefrojenik kordon nefrotom denilen segmental olarak düzenlenmiş hücre kümelerini oluşturur (40, 41). Nefrojenik kordonun segmentasyonu embriyonun kranial sonunda belirgindir, orta kısmında az gelişmiştir, kaudal kısmında ise mevcut değildir. Nefrotomlar lateral yönde büyüyüp oval bir şekil alırken iç kısımlarında da bir lümen oluşur. Böylelikle oluşan tübüller, renal tübül adını alır ve intraembriyonik çöloma açılırlar. Yeni oluşan renal tübüller bir taraftan medial olarak intraembriyonik çöloma açılırken, lateral uçları da kaudal yönde birleşerek embriyonun her bir kenarında kloaka doğru ilerleyen longitudinal bir kanal oluşturur (40).

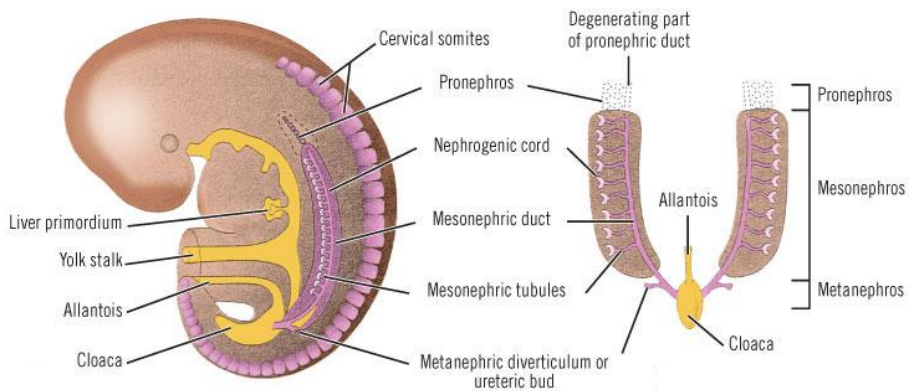
İnsanda birbiri ardınca farklı zamanlarda ve farklı yerlerde üç böbrek taslağı gelişmektedir. Bunların her biri nefrojenik kordonlardan oluşmaktadır (39, 40). Embriyonun servikal bölgesinden kaudal bölgesine inildikçe sırasıyla nefrojenik kordon, Pronefroz (ön böbrek), Mezonefroz (orta böbrek) ve Metanefroz (son böbrek) olarak farklılaşırlar (36, 37, 40, 41). Bu sistemlerden birincisi rudimenterdir ve fonksiyonel bir özelliğe sahip değildir. İkincisi intrauterin yaşamın erken döneminde kısa süre fonksiyon gösterebilir. Üçüncüsü ise kalıcı, esas böbrekleri oluşturan sistemdir (36, 38, 41). İnsanda pronefroz, gebeliğin üçüncü haftasında belirir ve dördüncü haftanın sonunda ortadan kalkar. Mezonefroz ise dördüncü haftanın sonunda farklılaşmaya başlar ve sekizinci haftada geriler. Metanefrozun farklılaşması ise beşinci haftada başlar (37). Böbreklerin erken gelişim evreleri adrenal bez ve gonadlar gibi diğer organların gelişimi için gereklidir (42).

Pronefroz: Pronefroz ilk olarak Müller tarafından 1829 yılında tanımlanmıştır (31). Pronefroz geçicidir ve fonksiyonel değildir. İnsan embriyosunda, 4. haftanın başında, pronefroz servikal bölgedeki 7–10 adet nefrotom denilen solid hücre topluluğu tarafından oluşturulur (36, 38, 40, 41). Daha sonra nefrotomlar uzayarak oval şekil alırlar ve nefrotom vezikülü meydana gelir (40). Bu veziküller uzayarak ve lümen kazanarak pronefroz tübüllerini oluştururlar (40, 41). Bu tübüller medial olarak intraembriyonik çöloma açılırken, lateral sonları birbiri ardınca birleşerek kaudal yönde uzarlar ve embriyonun her iki yanında uzunluğuna birer kanal, pronefroz kanalı'nı (Wolffian kanalının öncülü) oluştururlar. Bu kanallar kloakaya açılırlar (31, 40, 41). Daha sonra nefrotomlar regrese olmaya başlar ve böylece, 4. haftanın sonunda pronefrik sisteme ait tüm yapıların izleri kaybolur (36, 40, 41). Pronefrozdan geriye sadece Wolffian kanalı kalır (43).

Mezonefroz: Mezonefroz 4. haftada pronefrozun kaudalinde farklılaşır ve kalıcı böbrek oluşuncaya kadar geçici bir böbrek olarak fonksiyon yapar (38, 40, 41, 43, 44). Pronefrozun gerilemesi esnasında mezonefroza ait ilk boşaltım tübülleri belirmeye başlar (36, 40). Bu bölgede pronefroz oluşumunda olduğu gibi nefrotomların ortasında lümen meydana gelmesiyle nefrotom vezikülü oluşur. Bu vezikül lateral yönde süratle uzayarak S harfi şeklinde mezonefrik tübülü oluşturur. Bu tübüllerin eksternal sonu mezonefrik kanala (Wolffian kanalı) açılırlar. Mezonefrik tübüllerin medial sonları ise aortadan gelen bir arteriel dalının içine alır. Böylelikle mezonefrik tübülün medial sonunda Bowman kapsülü denilen çift tabakalı bir kapsül oluşur. Bunun içine giren arteriolde kapiller yumak oluşur. Bu şekilde çok ilkel olsa da bir böbrek cisimciği (Corpusculum renale-Malpighi cisimciği) ortaya çıkar. Mezonefrik nefrotomların karakteristik segmentasyonu mezonefrik kanalın kranial kısmında belirgindir. Kaudal kısmın da ise farklılaşmasını tamamlamadan geriler. Mezonefrik böbrekler kalıcı böbreklere benzemeyen daha basit olan glomerül ve tübülleri ihtiva ederler (40). İkinci ayın ortasında, mezonefroz orta hattın her iki yanında büyük ve oval şekilli bir organ haline gelir (36, 40, 41) ve en büyük hacmine ulaşır (43). Bu organ bir geniş mezenter vasıtasıyla posterior abdominal duvara yapışmıştır. Mezonefrozun gerilemesi 2. ayın sonu başlar (40). Mezonefrozun hemen hemen tümünün gerileyip (5/6'sı) ortadan kalkmasına karşılık longitudinal mezonefrik kanallar (Wolffian kanalı) (1/6'sı) metanefroz gelişimine katkıda bulunurlar (40, 43). Mezonefrik kanalların bundan sonraki akibeti embriyonun cinsiyetine göre farklılık gösterir (37, 40). Erkeklerde duktus deferens olarak daimi kalır (31), dişiye ise tamamıyla kaybolur (37, 40, 45). Mezonefrik

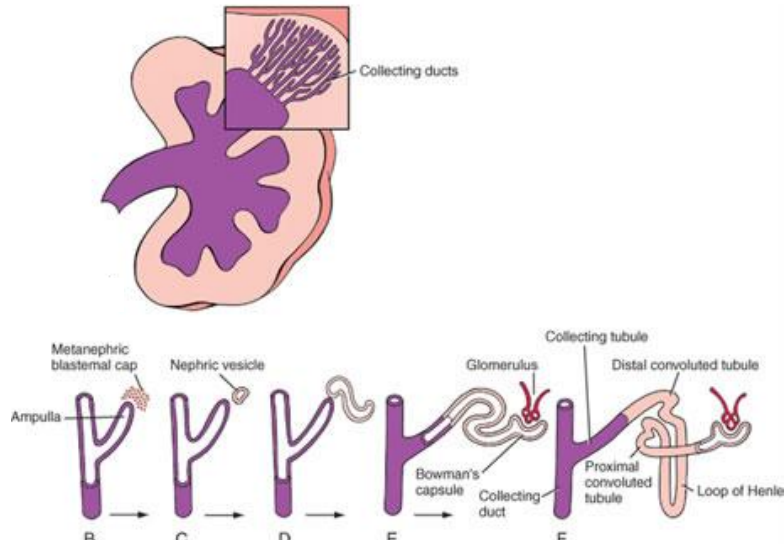
kanallar, bazen overde paraooforon, Morgagni kisti, Gartner kanalları olarak görülebilirler (45).

Metanefroz: Metanefroz'un farklılaşması 2. ayın başında (5. hafta) metanefrik mezoderm içine mezonefrik kanalın kloakaya yakın kısmından oluşan üreter tomurcuğunun girmesi ile başlar (36, 40, 41). 4 hafta sonra fonksiyonel hale gelirler (38). Üreter dalının metanefrik blastemle indüktif etkileşimi vardır. Metanefrik mezoderm hücre yüzeyindeki N-bağlı oligosakkaritler, üreter dalıyla metanefrik blastem arasındaki indüktif etkileşimden sorumludurlar. Eğer üreter dalı metanefrik blastemle temas etmezse, etkileşim ortadan kalktığından böbrekler oluşamaz ve renal agenezi meydana gelir (41). Mezonefrik kanala penetrasyonun ardından üreter tomurcuğu genişleyerek primitif renal pelvisi oluşturur ve gelecekteki major kaliksleri oluşturmak üzere kranial ve kaudal parçalara ayrılır. Kalikslerin her biri, metanefrik dokuya penetre olurken iki yeni tomurcuk oluşturur. Bu tomurcuklar 12 ve daha fazla sayıda tübül oluşturana kadar bölünmeye devam ederler. Bu sırada, periferde de 5. ayın sonuna kadar bir miktar tübül daha oluşur (36). İkinci jenerasyondaki tübüller genişleyerek, üçüncü ve dördüncü jenerasyona ait tübülleri absorbe ederek renal pelvisin minör kalikslerini oluştururlar (36, 46). Gelişimin daha sonraki evrelerinde, 5. ve takip eden jenerasyonun toplayıcı tübülleri boyca uzarlar ve minör kalikslerin tepesinde birikerek renal piramidleri meydana getirirler (36, 40, 46). Metanefrozda 26 çeşit hücre tipi ortaya çıkar. Renal mezengial apoptoz böbreğin embriyolojik gelişiminde düzenleyici rol oynamaktadır. Apoptozu ayarlayıcı sistemde meydana gelebilecek dengesizlik böbreğin doğumsal anomalilerine neden olmaktadır (27). (Şekil 3)



Şekil 3. Böbreğin gelişim evreleri (47).

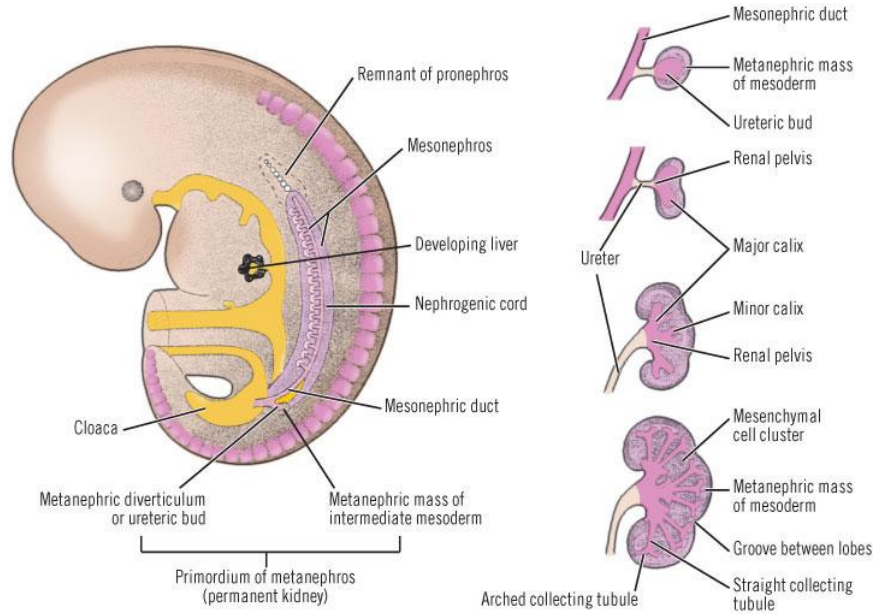
Yeni oluşan her toplayıcı tübülün distal ucu bir metanefrik doku şapkasıyla örtülür. Bu metanefrik doku şapkası içindeki hücreler, tübüllerin indükleyici etkisiyle renal vezikül olarak bilinen küçük kesecikleri oluştururlar; daha sonra bunlardan da S biçimli küçük tübüller meydana gelir. Bu tübüller glomerül adı verilen kapiller yumaklarıyla birlikte nefronları veya boşaltım birimlerini oluşturur. Her nefronun proksimal ucu, Bowman kapsülünü oluşturur. Tübülün distal ucu ise, toplayıcı kanallardan biriyle ilişki kurar (36, 40, 41). Gebeliğin 10. ve 18. haftaları arasında glomerüllerin sayıları yavaş yavaş artar, daha sonra hızla artarak, 32. haftada sayıca en yüksek değere ulaşır (38). Boşaltıcı tübüllerin uzamaya devam etmesi sonucu proksimal kıvrıntılı tübüller, henle kulpu ve distal kıvrıntılı tübüller meydana gelir (36, 40). (Şekil 4)



Şekil 4. Glomerül ve tübüllerin gelişimi (48).

Metanefroz gebeliğin ikinci yarısında fonksiyonel olur. Glomerül filtrasyonu 9. haftada başlar, ancak filtrasyon hızı doğumdan sonra artar (38, 41). İdrar amnion boşluğuna salınır ve amniotik sıvıya karışır (40, 41). Bu idrarla karışık amnion sıvısından fetus her gün birkaç litre yutar. Sıvı fetusun bağırsaklarından emilerek kan akımına karışır (41). Böylece fetal yaşam süresince metabolik artık ürünleri anneye transfer etmek için bir böbrek sistemi olarak fonksiyon yapan plesentaya girer. 3. ayda oluşan nefronlar anatomik ve histolojik olarak yetişkindeki böbreğe benzerdir ve gelişmenin bu safhasında böbrekte 1 milyon toplam nefron sayısı olsa bile idrar yapmaya başlamıştır (40).

Fetal böbrek metanefrik blastem içindeki üreter tomurcuğunun gelişiminden dolayı çok loblu görünümündedir. Bu loblanma interlobuler olukların giderek dolmasıyla fetal periodun sonuna doğru azalır, fakat loblar yenidoğan böbreklerinde hala belirgindir. Lobulasyon genellikle nefronlar büyüdükçe bebeklik esnasında gözden kaybolur. Yetişkin böbreği normalde tamamiyle düzgündür (40, 41). Mevcut nefronlar bebeklik süresince farklılaşmalarını tamamlarlar ve yetişkin oluncaya kadar büyüklükleri artar (40). Doğumla birlikte bir böbrekte 800.000-1.000.000 arası nefron bulunur (38, 41, 42). Doğumdan sonra genellikle nefron sayısı artmaz, böbrek büyüklüğünün artmasına esas olarak nefronların hipertrofisi neden olmaktadır (40). (Şekil 5)



Böbrekler başlangıçta pelvis içinde sakruma ventral yerleşmiş olup, birbirine yakın konumdadırlar (38, 40). Abdomenin büyümesi esnasında böbrekler de birbirinden uzaklaşmaya başlar ve aynı zamanda daha yukarı bir lokalizasyona yer değiştirir (36, 38, 40, 41). Böbreklerin yukarı yükselmeleri 1. ayın sonunda başlar. Fetal hayatın ilk yarısında böbrekler L1-L3 omurlar hizasındadır. Daha sonra 11. kaburga hizasına kadar yükselir. Ancak sonra yeniden inmeye başlar ve L5 omuruna kadar gelir. Bu durum memelilere özgüdür (43). Böbreğin bu yükselişi, vücudun dikleşmesi yanında lomber ve sakral bölgelerdeki büyümenin de bir sonucudur (36, 38). Metanefroz pelviste, arteriyel

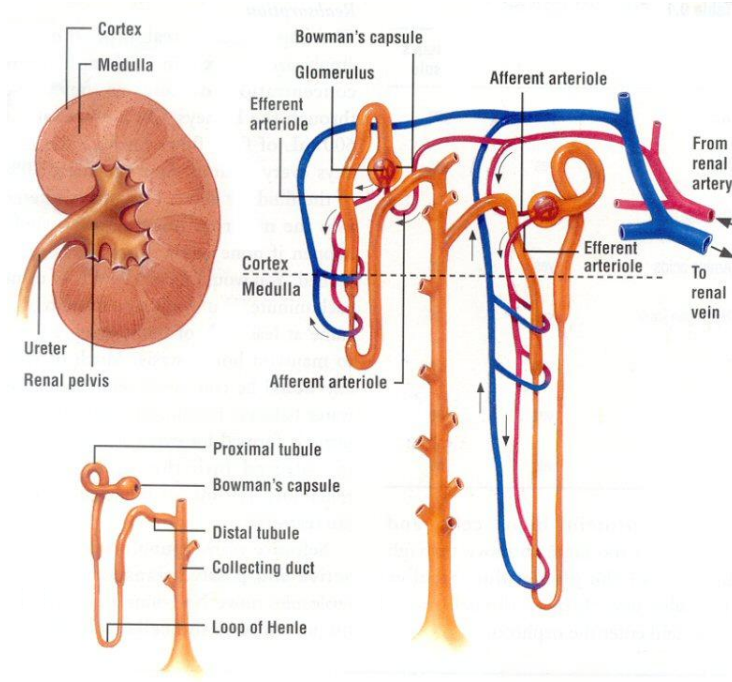
kan dolaşımını aortanın pelvik bir dalından alır. Böbreğin arteriel dolaşımı, karın boşluğundaki yükselişi sırasında da, her seferinde aortanın daha yukarı kesimlerinden ayrılan arterler yoluyla sağlanmaya devam eder. Bu süreç boyunca bir altta kalan önceki arterler genellikle dejenere olurlar (36). Böbrekler 9. haftada yetişkindeki pozisyonuna ulaşırlar (38, 40, 41). 9. haftada böbrekler böbreküstü beziyle birleşir (40, 41). Bu göç sonunda böbrekler karnın posterior duvarında ve retroperitoneal olarak yer alırlar (38, 41). Başlangıçta böbrek hilum'u ventral konumdadır fakat böbrek yukarı çıkarken hilum'un anteromedial olarak konumlanması için medial olarak 90 derece dönmesi gerekir (38, 40, 41). Bazen böbrekler yukarıya doğru çıkamazlar. Bu duruma bağlı olarak a. renalis, a. iliaca interna'dan çıkar. Sol böbrek sağ böbreğe göre daha çabuk ve kuvvetli olarak büyür. Sağ böbrek ise, soldakine göre daha yukarı çıkar. Böbrek embriyonal hayatın 2. evresinde işlevine başlar. Böylece normal koşullarda intrauterin yaşam boyunca idrar devamlı olarak amnion sıvısına verilirken, bu sıvı tekrar embriyo tarafında yutulur. Bunun sonucu olarak doğuma doğru idrar kesesi tamamen dolar ve doğumdan hemen sonra da boşalır (43). Metanefroz veya kalıcı böbrek, 12. hafta sonunda fonksiyonel hale gelir. İdrar amnion boşluğuna geçer ve amnion sıvısıyla karışır. Bu karışım fetus tarafından yutulur ve bebeğin sindirim sistemine girer. Burada emilerek kan dolaşımına geçer ve tekrar böbrekler tarafından amnion sıvısına atılır. Fetal yaşam süresince, yıkım ürünlerinin atılımını plesenta üstlenmiş olduğundan böbrekler sorumlu değildir (36).

Böbrek gelişiminin moleküler düzeni: Diğer organlarda olduğu gibi, böbrekler de epitel ile mezenşimal doku arasında gerçekleşen karşılıklı etkileşimle farklılıklar. Böbrekte bahsedilen karşılıklı etkileşim mezonefroza ayrılan üreter tomurcuğu ile metanefrik blastem mezenşimi arasındadır (36, 42). Mezenşimal dokudan salgılanan ve bir transkripsiyon faktörü olan Wilms tümör süpresör 1 (WT1), metanefrik blastemin üreter tomurcuğunun uyarısına yanıt verebilecek duruma gelmesine olanak verir (35, 36, 39, 42). WT1 aynı zamanda mezenşim dokusundan üreter tomurcuğunun büyümesini sağlayan glial kökenli nörotrofik faktör (GDNF) ve hepatosit büyüme faktörlerinin (HGF) yapımını kontrol eder (36, 42). WT-1 geninde meydana gelen mutasyonlar çeşitli renal ve gonadal malformasyonlara neden olur (39). Bir proto-onkogen olan N-myc ve transkripsiyon faktörleri olan PAX 2 ve PAX 8 metanefrik böbrek gelişiminde eksprese edilirler (35). Üreter tomurcuğu epitelinde yapılan GDNF için RET ve HGF için MET adı verilen tirozin kinaz reseptörleri epitel ve mezenşimal dokular arasındaki etkileşimi sağlayacak sinyalizasyon yollarını oluştururlar. Üreter

tomurcukları da mezenşimi fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2) ve kemik morfojenik proteini-7 (BMP-7) vasıtasıyla uyarır. Bu büyüme faktörlerinin her ikisi de bir yandan WT1 yapımının sürmesini sağlarken diğer yandan da hem apoptozisi bloke ederler, hem de metanefrik mezenşimin proliferasyonunu uyarırlar. Mezenşimal dokunun nefron oluşturmak amacıyla epitele dönüşmesinde, ekstrasellüler matriks modifikasyonu yoluyla üreter tomurcuklarının da rolü vardır. Böylece epitelyal bazal laminanın temel özelliği gereği fibronektin, kollajen 1 ve kollajen 3, laminin ve tip 4 kollajen ile değiştirilir. Bunlara ek olarak, mezenşimal dokunun yoğunlaşarak epitele dönüşmesi için gerekli olan hücre adhezyon moleküllerinden Syndecan ve E-cadherin de sentezlenir. Bütün bu süreç PAX 2 ve Wnt-4 genleri tarafından kontrol edilir (36). Ürogenital kabartının oluşumunda WT1, DAX 1 ve stereoidojenik faktör 1 genleri önemlidir (38).

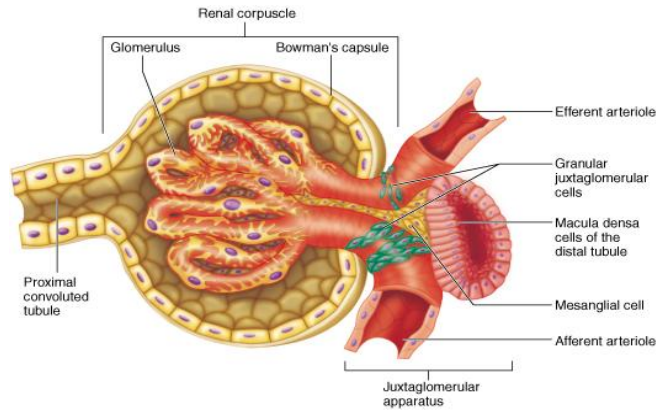
2.3. Böbrek Histolojisi

Böbrekler sıkı bağ dokusundan ince bir kapsül ile sarılan (50, 51, 52), yağ tabakası içine gömülmüş birleşik tübüler bezlerdir (50). Böbrek kapsülü iç ve dış tabaka olmak üzere iki tabakadan oluşur. Dış tabakada fibroblastlar ve kollajen lifler yer alırken, iç tabakada miyofibroblastlar bulunur (50, 52). Böbrek dışta koyu-kırmızı korteks, içte daha açık çizgili medulla ve renal sinüs içinde yer alan huni şekilli pelvis olmak üzere 3 bölüme ayrılır (50, 51, 53). İnsanda böbrek medullası 10-15 adet konik ya da piramidal şekilli yapılar olan medüller piramitlerden oluşur (50, 52, 53). Her bir medüller piramidin tabanından kortekse uzanan birbirine paralel tübül demetleri olan medüller ışınlar çıkar (53). Her böbrek ortalama 1-4 milyon nefron içerir (42, 44, 51, 52, 53, 54). Her nefron genişlemiş bir bölüm olan böbrek cisimciği, proksimal kıvrımlı tübül, henle kulpunun ince ve kalın uzantıları, distal kıvrımlı tübül ile toplayıcı tübül ve kanallardan oluşmaktadır (42, 51, 53). Nefron böbreğin fonksiyonel birimidir (42, 52, 53). (Şekil 6)



Şekil 6. Nefron (55).

Böbrek cisimcikleri: Çapları yaklaşık 200-250 μm olan oval şekilli böbrek cisimcikleri böbreğin yalnızca korteksinde bulunurlar ve nefronun başlangıç parçasını oluştururlar (50). Böbrek cisimcikleri kapiller bir yumak olan glomerülden oluşmuştur (44, 53, 54). Glomerüller, Bowman kapsülü olarak adlandırılan epitelden oluşan bir kapsülle sarılmıştır. Kapsülün içte visseral ve dışta parietal tabaka olmak üzere iki tabakası vardır (44, 50, 51, 52, 53, 54, 56). Bowman kapsülü glomerül kapillerdeki kandan süzülen filtratı alır (50, 52). (Şekil 7)



Şekil 7. Glomerülün yapısı (57).

Glomerülün kapillerlerini dış taraftan saran, Bowman kapsülünün iç visseral tabakası podosit adı verilen son derece özelleşmiş hücrelerden oluşur. Podositlerden çıkan her bir primer uzantı, pedisel olarak adlandırılan çok sayıdaki sekonder uzantılar ile glomerülün kapillerlerini sararlar (50, 51, 53, 54). Pediseller, podocalyxin (51, 54) ve podoendin adı verilen sialoproteinlerden oluşan iyi gelişmiş glikokalikse sahiptirler (51). Sekonder uzantılar, 25 nm'lik sabit bir mesafede bazal lamina ile doğrudan temas halindedirler. Ancak podositlerin hücre gövdeleri ve primer uzantıları bazal laminaya değmez (50, 53). Podositlerin sekonder uzantıları birbirleriyle aralarında 20-40 nm'lik aralık olacak şekilde kenetlenirler (27, 44, 50, 51, 53, 56). Bu aralıklar süzülme ya da filtrasyon yarıklarını oluştururlar (50, 53). Filtrasyon yarıklarının derinliği 300-500 nm'dir (44). Pediseller arasındaki filtrasyon yarıkları şerit benzeri bir filtrasyon slit membranı ile örtülüdür. Bu membran, 7-10 nm kalınlığa ve eşsiz filamentöz ağ yapısına sahiptir (50, 53). Podositlerin sitoplazmasında bunların kasılabilmesini sağlayan aktin mikrofilamanlarından oluşan demetler bulunur (27, 50, 53).

Bowman kapsülünün pariyetal tabakası ise ince bir retiküler lif tabakası ve bazal lamina ile desteklenen tek katlı yassı epitelden oluşur. Bowman kapsülünün bu iki tabakası arasında, Bowman aralığı adı verilen kapiller duvarından ve visseral tabakadan süzülen sıvının toplandığı idrar boşluğu bulunmaktadır (50, 51, 53). Bu boşluk üriner kutupta proksimal tübülün lümeni ile devam ederken, Bowman kapsülünün iki tabakası damar kutbunda birbirleriyle devam ederler (50). Her böbrek cisimciğinde, afferent arteriolün girdiği ve efferent arteriolün çıktığı bir damar kutbu ve proksimal kıvrımlı tübüllerin başladığı bir idrar kutbu bulunur (50, 51, 53, 54). Afferent arteriol renal cisimciğe girdikten sonra genellikle her biri kapillerlere bölünerek böbrek glomerülünü oluşturan iki ile beş primer dala ayrılır. İdrar kutbunda epitel, proksimal tübül için tipik olan tek katlı prizmatik ya da kübik epitele değişir (53). Glomerül kapillerleri herbiri ortalama 70-90 nm çapında çok sayıda penceresi olan incelmış endotel döşer. Pencereleler diyafram içermez, yüksek oranda geçirgendir, vücuttaki diğer pencereli kapillerlerden tipik olarak daha geniş ve düzensiz şekillidir (50, 51, 52).

Glomerül kapillerlerindeki endotel hücreleriyle, bunların dış yüzeyini örten podositler arasında kalın (~0,1 µm) bir bazal membran bulunur (50, 53). İnsanlarda glomerüler bazal membran ortalama 250-350 nm kalınlığındadır (42, 44, 50, 51, 52). Glomerüler bazal membranın kapillerlerindeki kanla idrar boşluğunu birbirinden ayıran bir süzülme engeli oluşturur. Bu bazal membran kapillerin ve podositin oluşturduğu bazal laminaların kaynaşmasından meydana gelmiştir (42, 53). Transmisyon elektron

mikroskop yardımıyla ortada 100 nm kalınlığındaki elektron yoğun bir tabaka olan lamina densa ile her iki yanda daha elektron geçirgen bir tabaka olan lamina rara (lamina rara interna ve lamina rara eksterna)'yı ayırt edebiliriz (44, 53). Elektron geçirgen olan her iki lamina rara, hücrelerin turunmasına yarayabilecek olan laminin, perlecan, agrin, heparan sülfat ve fibronektin içerir. Lamina densa ise negatif yüklü bir proteoglikan olan ve katyonik moleküllerin geçişini engelleyen heparan sülfat içeren bir matriks içinde tip IV kollajen ve lamininin oluşturduğu ağ şeklinde bir yapıdır (51, 53). Yani glomerül bazal laminası, lamina densanın fiziksel bir filtre olarak iş gördüğü, lamina raradaki anyonik bölgelerin ise elektriksel bir engel oluşturduğu seçici bir makromoleküler filtredir. 10 nm'den daha büyük partiküller bazal laminadan geçemez; molekül ağırlığı albuminin molekül ağırlığından (69 kDa) fazla olan negatif yüklü proteinler ise membrandan eser miktarda geçmektedir (53). Bazal lamina'da bulunan glikoproteinler sialik asit ihtiva eder. Sialik asit, Periodik asid schiff (PAS) reaksiyonu ile pozitif sonuç verir (27).

Endotel hücreleri ve podosit ayaklarının yanı sıra glomerül kapillerlerinin duvarlarına tutunan mezengiyal hücreler de vardır (50, 53). Mezengiyal hücreler kasılabilen ve anjiyotensin II reseptörleri içeren hücrelerdir. Bu reseptörler etkinleştğinde, glomerüle gelen kan akımı azalır. Mezengiyal hücrelerin, kalbin atriyum hücreleri tarafından üretilen natriüretik faktöre ait reseptörleri de vardır. Bu etken damar genişleticidir ve mezengiyal hücreleri gevşeterek muhtemelen kan akımını ve süzülme için bulunan etkin yüzey alanını arttırır. Mezengiyal hücreler ayrıca glomerüle yapısal destek verirler, hücre dışı matriksi sentezlerler, endositoz gerçekleştirirler ve glomerül bazal membranı tarafından yakalanmış olan normal ve patolojik (immunkompleks) molekülleri fagositozla uzaklaştırırlar (51, 53). Damar kutbunda yer alan ancak glomerülün dışında, jukstaglomerüler aygıtın bir kısmını oluşturan glomerül dışı mezengiyal hücreler de vardır (53).

Proksimal tübüller: Kortekste kıvrıntılı seyreden proksimal tübüller, medullaya doğru ilerledikçe düzleşirler. Nefronun en uzun parçasıdır (50). Kortikal parankimin büyük bir bölümünü oluştururlar (50, 51). Proksimal tübüllerin çapı ortalama 60 µm, boyu ise 14 mm'dir (51, 54). Böbrek cisimciğinin idrar kutbunda, Bowman kapsülünün pariyetal yaprağının tek katlı yassı epiteli proksimal kıvrımlı tübüllerin kübik ya da alçak prizmatik epiteli ile devam eder. Bu kısım distal kıvrımlı tübüllerden daha uzun olduğu için korteks içindeki böbrek cisimciklerinin yanında daha sık görülür (53). Proksimal tübüller enine kesitlerde yuvarlak ve ovaldir (50). Genellikle 4-8 adet

yuvarlak çekirdek, her hücrenin merkezinde ya da tabanında yerleşim gösterir (50, 53). Proksimal kıvrımlı tübüllerin hücreleri çok sayıdaki uzanmış mitokondriyonları nedeniyle asidofilik sitoplazmaya sahiptir (50, 53). Hücrelerin tepesinde fırçamsı kenarı oluşturan mikrovillusların uzunluğu yaklaşık 1 μm 'dir. Fırçamsı kenarın bulunması nedeniyle proksimal tübüllerini oluşturan hücrelerin iç sınırları pürüzlüdür (50, 52, 53). Canlı hayvanlarda proksimal kıvrımlı tübüllerin lümeni geniştir ve bunlar tübüller dışındaki kapillerler tarafından sarılmış durumdadırlar. Histolojik kesitlerde ise fırçamsı kenar genellikle düzensizleşmiş, tübüllerin lümeni büyük oranda küçülmüş ve daralmıştır (53). Bu hücrelerin apikal sitoplazmasında, mikrovillusların tabanları arasında çok sayıda kanaliküller bulunur. Bu kanaliküller proksimal tübül hücrelerinin makromolekülleri emme yeteneğinde etkin rol oynarlar. Uç zarların içe doğru yaptığı girintiler pinositotik vezikülleri oluşturur (50, 53). Bu veziküller içinde glomerüllerden geçebilen molekül ağırlığı 70 kDa'dan düşük olan proteinler bulunur. Bu proteinlerin parçalandığı yer olan lizozomlarla pinositoz vezikülleri kaynaşırlar ve oluşan monomerler dolaşıma geri döner. Bu hücrelerin taban bölümlerinde yoğun iç girintiler ve komşu hücreler arasında yan kenetlenmeler bulunmaktadır (53). Sodyum iyonlarının aktif olarak hücre dışına atılmasından sorumlu olan Na^+/K^+ ATPaz pompası bazolateral zarlarda bulunur (51, 53, 54). Mitokondriyonlar hücrenin tabanında yoğunlaşmıştır ve hücrenin uzun eksenine paralel dizilim gösterirler. Mitokondriyonların bu şekilde yerleşimi ve hücrenin tabanında zarın yüzey alanını arttıran bu düzenleme, aktif iyon taşınmasında rol üstlenen hücrelere özgüdür. Lateral membran kenetlenmelerinin yaygınlığı nedeniyle, ışık mikroskopik olarak incelenen proksimal tübül hücreleri arasında hücre sınırları belirgin olarak seçilemez (50, 53). Böbrek cisimciğinde oluşan glomerül süzüntüsü, emilimin başladığı yer olan proksimal kıvrımlı tübüllere geçer. Proksimal kıvrımlı tübüller süzüntüdeki glikoz ve aminoasitlerin tümünü, suyun ve sodyum klorürün %85'ini ve ayrıca fosfat ve kalsiyumu emer. Glikoz, aminoasitler ve sodyum proksimal tübül hücreleri tarafından bazolateral zarları üzerinde bulunan Na^+/K^+ ATPaz etkinliğini içeren aktif bir süreç ile emilirler. Su ise ozmotik gradyanı izleyerek edilgen olarak emilir. Süzüntüdeki glikoz miktarı proksimal tübülün emme yeteneğini aştığında, idrar miktarı artar ve idrar glikoz içerir. Bütün bu etkinliklere ek olarak proksimal kıvrımlı tübüller kreatinin gibi maddeleri ve paraaminohippurik asit ve penisilin gibi vücuda yabancı olan maddeleri idrara geçirirler. Bu olay tübüller salgılama olarak tanımlanan aktif bir işlemdir. Bu maddelerin salgılanma hızlarının incelenmesi böbrek işlevinin klinik değerlendirilmesinde yararlıdır (53).

Henle kulpu: Henle kulpu, proksimal kıvrımlı tübüllere yapıca çok benzeyen kalın inen kol, ince inen kol, ince çıkan kol ve kalın çıkan koldan oluşan U şeklindeki bir yapıdır (27, 53). Kalın çıkan kol distal kıvrımlı tübüllere yapıca çok benzemektedir. Medullanın dış kısmında 60 μm olan kalın inen kol birdenbire 12 μm 'ye kadar daralarak, inen kolun ince bölümü olarak devam eder (53, 54). Nefronun bu bölümünün lümeni geniştir çünkü duvar epitelinin çekirdekleri yalnızca çok hafif şekilde lümene doğru çıkıntı yapan yassı epitel hücrelerinden oluşur (50, 53). Yassılaştırmış hücreler 1-2 μm kalınlığındadır ve lümene doğru çıkıntı yapan, mercek biçiminde, yakın aralıklı yerleşmiş çekirdekler içerirler (50, 51, 54). Sıkı bağlantıları ve desmozomları içeren hücrelerarası bağlantılar, hücre çıkıntılarını lateral olarak bağlar. Apikal yüzeylerde, eğer varsa, az sayıda, kısa, kalın mikrovilluslar vardır (50). Bütün nefronların yaklaşık yedide biri kortikomedüller sınırın yakınında bulunur, bu yüzden jukstaglomerüler nefronlar adını alırlar. Diğer nefronlara ise kortikal nefronlar denir. Bütün nefronlar süzme, emilim ve salgılama işlemlerinde rol alırlar. Ancak jukstaglomerüler nefronların medulla interstisyumunda hipertonic gradyanı sağlama konusunda özel bir önemi vardır, medulla interstisyumundaki hipertonic ortam böbreğin hipertonic idrar üretme yeteneğinin temelini oluşturur. Jukstaglomerüler nefronların henle kulpu çok uzundur ve medullanın derinliklerine kadar inerler. Bu kanallar kısa bir kalın inen kol, uzun ince ve çıkan kollar ile kalın çıkan koldan oluşmuştur. Öte yandan kortikal nefronlarda inen ince kollar çok kısadır ve çıkan ince kol bulunmaz. Henle kulpu su tutma işleminde rol oynar; sadece böbreklerinde bu tür yapılar bulunan hayvanlar hipertonic idrar üretebilir ve vücut suyunu koruyabilir. Henle kulpu, toplayıcı kanallardan geçen idrarın yoğunluğunu etkileyen medulla interstisyumundaki hipertonic gradyanı oluşturur. Henle kulpunun inen ince kısmı suya geçirgen olmasına karşın çıkan bölümün tümü su geçirmez. Medulla interstisyumunda idrarın yoğunlaşmış hale gelmesi için gereken medullar hipertonsite gradyanının sağlanması için çıkan kalın kolda NaCl aktif olarak tübülden dışarı atılır. Medüller piramitlerin uçlarındaki interstisyumun osmolaritesi kandan dört kat yüksektir (53).

Distal tübüller: Henle kulpunun çıkan kalın kolu kortekse girdikten sonra, kıvrılarak distal kıvrımlı tübülleri oluşturur (53). Bu tübül çıkan kol gibi tek katlı kübik epitelle döşelidir (50, 53). Distal tübüller, proksimal tübüllerden daha kısadırlar; kıvrımları daha az komplekstir; distal tübülleri daha küçük ve daha az eozinofilik kübik hücreler döşer; çapları daha küçüktür ve lümenleri tipik olarak proksimal tübüllerinkinden daha geniştir. Distal tübüllerde fırçamsı kenar ve apikal kanallar

bulunmaz. Ancak hücrelerde nadiren kısa ve kalın mikrovilluslar bulunabilir (50, 54). Distal tübül hücreleri proksimal tübül hücrelerine göre daha düz ve daha küçük olduğu için distal tübülde proksimal tübülde olduğundan daha fazla sayıda çekirdek görülür (53). Distal kıvrımlı tübüldeki hücreler iyon geçişinde işlev gösteren daha incelikli bazal membran girintilerine ve bunlara eşlik eden mitokondriyonlara sahiptir (50, 53, 56).

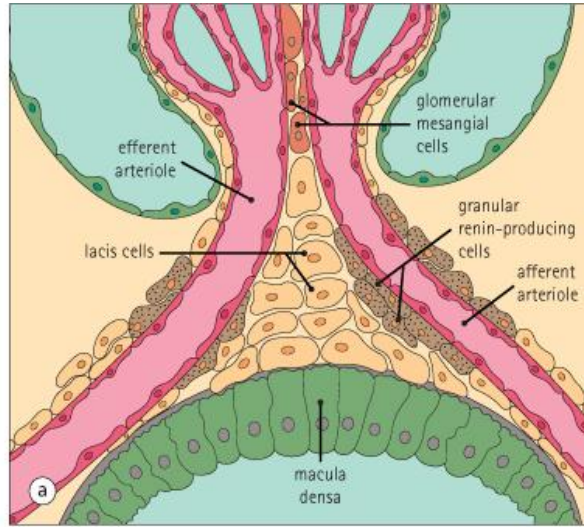
Distal kıvrımlı tübüller kortekste izledikleri yol boyunca kendi nefronlarına ait böbrek cisimciğinin damar kutbu ile temas halindedirler. Bu temas yerinde distal tübül afferent arteriol gibi farklılaşır. Distal kıvrımlı tübül hücreleri bu jukstaglomerüler bölgede genellikle prizmatik hale dönüşür ve çekirdekleri de biraraya toplanır. Çoğu hücrenin bazal bölümünde Golgi kompleksi bulunur (50, 53). Mikroskopik örneklerde çekirdeklerin yakın yerleşimi yüzünden daha koyu renkli görünen bu distal tübül segmenti *makula densa* olarak adlandırılır (50, 51, 53, 54, 56). Makula densa hücreleri tübül içi sıvıdaki klorür iyon içeriğine ve su hacmine duyarlıdır, dolaşıma renin salgısını başlatan moleküler sinyaller üretirler (50, 53). Distal kıvrımlı tübüllerde aldosteron yoğunluğu yüksek olduğunda iyon değişimi gerçekleşir; sodyum emilir, potasyum iyonları dışarı verilir. Bu düzenek vücudun toplam su ve tuz içeriğini etkiler. Distal tübül aynı zamanda tübüldeki idrara hidrojen ve amonyum iyonlarını salar. Bu etkinlik kandaki asit-baz dengesinin korunmasında çok önemlidir (51, 53).

Toplayıcı tübüller: Toplayıcı kanallar yaklaşık 20 mm uzunluğundadırlar (51). Kortikal, medüller ve papiller olmak üzere üç bölüme ayrılırlar (27, 51). Bir toplayıcı kanala ortalama 11 nefron açılır. 2500-3000 toplayıcı kanal da bir böbrek papilla'sına açılmaktadır (27). Toplayıcı kanallar medüller piramidlerin ucuna yaklaştıkça genişler. Küçük toplayıcı tübüller kübik epitelle döşelidir ve çapları ortalama 40 µm'dir. Bu tübüller medullanın derinliklerine doğru indikçe hücrelerin boyu prizmatik olana kadar uzar (50, 53). Piramidlerin ucuna yakın bölümlerde toplayıcı kanalın çapı yaklaşık 200-300 µm'ye ulaşır (50, 51, 53, 54). Enine kesitte, toplayıcı kanalların çoğunda geniş bir lümen görülür. Proksimal ve distal tübüller nispeten daha dar bir lümene sahiptirler (50). Toplayıcı kanallar, farklı işlevsel özelliklere sahip ve yapısal farklılıkları olan esas (açık) ve interkalat (koyu) hücreler olmak üzere iki tip hücre içerirler (50, 51, 52, 54). İdrarın asitleştirilmesinde daha aktif rol oynayan interkalat hücreler, esas hücrelerden daha çok organel, apikal vezikül ve bazal katlantılar içerirler (50). Bu hücrelerde yer alan apikal veziküller yaklaşık 50-200 çapındadır (51). İnterkalat hücrelerin apikal yüzeylerinde daha çok sayıda, kısa ve kalın mikrovilluslar bulunurken, esas hücreler tek

bir silyum taşıyabilirler. Her iki hücre tipinde de sıkı bağlantılar bulunur. Bazal plazma zarları ince bir bazal membran üzerine yerleşmiştir (50). Işık mikroskopu ile bakıldığında toplayıcı tübül ve kanal hücrelerinin hücrelerarası sınırları net olarak seçilebilir. Kortekste bulunan toplayıcı kanallar, her medüller ışını boşaltan birkaç küçük toplayıcı tübül aracılığı ile dik açılarla birbirine bağlanır. Medullada idrar yoğunlaştırma işleminde en önemli rolü toplayıcı kanallar oynar (53). Toplayıcı kanalların epiteli arka hipofiz tarafından salgılanan antidiüretik hormona tepki verir. Eğer su alımı sınırlı ise; antidiüretik hormon salgılanır ve toplayıcı kanalların epiteli glomerül süzüntüsünden emilip kan kapillerlerine aktarılan ve böylece vücutta tutulmuş olan suya geçirgen hale gelir. Antidiüretik hormon varlığında, lümen zarında yer alan zar içi tanecikler su emilimi için kanallar oluşturacak şekilde toplanırlar (50, 53).

Jukstaglomerüler kompleks: Böbrek cisimciğinin hemen bitişiğinde afferent arteriolün tunica media'sında, kan basıncına duyarlı değişime uğramış düz kas hücreleri bulunmaktadır. Bu hücelere jukstaglomerüler (JG) hücreler adı verilir. Bu hücrelerin sitoplazmaları salgı granülleri içerir ve renin hormonunu dolaşıma salgırlar (50, 51, 52, 53, 54, 56). Renin kan basıncının korunmasında rol oynamaktadır. Distal kıvrımlı tübüllerde bulunan makula densa, JG hücrelerin yer aldığı afferent arteriol kısmına çok yakındır; yalnızca ince bir bazal membran ile birbirlerinden ayrılırlar. Afferent arteriolün bu kısmı ile makula densa birlikte jukstaglomerüler kompleksi oluşturur (50, 51, 53, 54, 56).

Jukstaglomerüler kompleksin bir bölümünü de işlevleri iyi anlaşılamamış açık renk boyanan hücreler oluşturur. Bu hücelere ekstraglomerüler mezengial hücreler veya laci hücreleri (polkissen hücreleri) adı verilir (42, 50, 51, 53, 54). Afferent arteriolün iç elastik membranı JG hücrelerin bulunduğu bölgede kaybolur (53). Elektron mikroskopla incelendiğinde JG hücreleri eksantrik çekirdeğe, birçok mitokondriyona, bol miktarda granüler endoplazma retikulumuna, iyi gelişmiş bir Golgi kompleksine ve çapları yaklaşık 10-40 nm olan salgı granüllerine sahiptir (50, 53). Bu membranla çevrili salgı granüllerinin çoğu kez kristal gibi bir iç yapısı olan orta derecede elektron yoğun bir merkezi vardır. Renin hormonu ya da reninin prekürsörünü içerirler ve afferent arteriolün endoteline bitişik olan hücre membranına doğru yerleşmişlerdir. Bu değişmiş düz kas hücreleri kasılmaktan ziyade, hormonu üretirler ve afferent arteriolün lümenine salgırlar (50). (Şekil 8)



Şekil 8. Jukstaglomerüler komplekste yer alan hücreler (58).

İnterstisyel Doku: İdrar tübülleri ile kan ve lenf damarları arasındaki boşluğa böbrek interstisyumu adını verilir (52, 53, 54). Böbrek interstisyumu kortekste (%7) çok küçük bir alanı kaplarken, medullada (%20) bu alan artar (52, 53). Böbrek interstisyumunda fibroblastlar, makrofajlar ve interstisyel hücreler olmak üzere 3 tip hücre bulunur (51). Böbrek korteksinde bulunan interstisyel hücrelerin fibroblast-benzeri hücreler (tip 1 kortikal interstisyel hücreler) ve lenfosit-benzeri hücreler (tip 2 kortikal interstisyel hücreler) olmak üzere iki tipi vardır. Medullada yer alan interstisyel hücrelerin ise; tip 1, tip 2 ve tip 3 interstisyel hücreler olmak üzere üç tipi vardır (42, 54). Bu hücreler dışında kollajen lifleri ve esasen medullada proteoglikandan zengin, yüksek düzeyde su tutan ara madde içeren az miktarda bağ dokusu bulunur (53). Medullada yer alan interstisyel hücreler sitoplazmalarında çok sayıda lipid damlacıkları içerirler (51, 53). Bu hücreler, karaciğerde medullipin 2'ye dönüşen medullipin 1'i sentezlerler. Bu madde kan basıncını düşüren potent bir vazodilatördür (44, 51).

Kan dolaşımı: Kan damarlarından zengin olan böbrekler, kardiyak atımın ortalama %25'ini almaktadır (50). Aortanın dalı olan renal arter, böbreğe girmeden önce genellikle iki dala ayrılır (50, 53). Dallardan birisi böbreğin ön bölümüne giderken, diğeri arka kısma uzanır (53). Bu iki dal hilumda tekrar dallanarak böbrek piramitleri arasında yer alan interlobüler arterleri oluşturan dalları yapar. Kortikomedüller bileşke düzeyinde interlober arterler böbrek kapsülüne dik şekilde korteks içinde ilerler. Bu arterler, bir medüller ışın ve bitişiğindeki kortikal labirentten oluşan renal lobüllerin sınırını çizerek. Glomerül kapillerlerine kan taşıyan afferent arterioller interlobüler

arterlerden ayrılır. Kan buradaki kapillerlerden efferent arteriollere aktarılır (50, 51, 53). Arterioller, proksimal ve distal tübüleri beslemek ve düşük molekül ağırlıklı maddelerle iyonları dolaşım sistemine taşımakla sorumlu olan tübüller çevresinde, peritübüler kapiller ağı oluşturmak üzere dallanırlar. Jukstamedüller nefronlarla ilişkili olan efferent arterioller ince, uzun kapiller damarları oluştururlar (50, 53). Medullada düz bir yol izleyen ve sonra yeniden korteks-medulla sınırına doğru geriye kıvrılan bu kapiller damarlara vaza rekta (düz damarlar) adı verilir (50, 51, 53). İnen damar aralıksız tip kapiller özelliği gösterirken, çıkan damarın endoteli pencerelidir. Glomerülden süzülen kanı taşıyan bu damarlar medullayı besler ve oksijen gereksinimini karşılar. Kangal biçimindeki yapıları yüzünden bu damarlar henle kulpunun interstisyumunda oluşturduğu yüksek osmotik gradyanı ortamdaki uzaklaştırmazlar (53). Dış kortekste ve böbrek kapsülündeki kapillerler interlobüler venlere boşalan yıldızlı (stellat) venleri oluşturmak üzere birleşirler (51, 53). Kan lobüller arası venlerden arkuat venlere ve oradan da loblar arası venlere akar. Loblar arası venler böbrek venini oluşturmak üzere birleşir, buradan kan böbreği terk eder (50, 53).

2.4. Diabetes mellitus

Diabetes Mellitus (DM) insülin hormon sekresyonu veya insülin etkisinin azlığı sonucu karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluklara yol açan metabolik bir hastalıktır (59, 60, 61). Dünyada 230 milyondan fazla insanı etkilediği bildirilmektedir. (61). 2003 yılında Amerikan Diyabet Birliği tarafından belirlenen tanı kriterlerine göre; 75 gr oral glukoz tolerans testinde 2. saat glukoz değerinin ≥ 200 mg/dl olması veya poliüri, polidipsi, glukozüri, ketonüri, açıklanamayan kilo kaybı (polifajinin eşlik ettiği veya etmediği) ve bulanık görme gibi semptomların bulunması DM olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca, 10-12 saat açlıktan sonra ölçülen sabah kan glukozunun ≥ 126 mg/dl olması da tanı için yeterlidir (62, 63). Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nın 1999 yılında kabul ettiği sınıflamaya göre (64) :

Diabetes Mellitus tipleri:

Tip I (İnsüline bağımlı diyabet-1DDM): Pankreastan salgılanan endojen insülinin eksikliğine veya yokluğuna bağlı olarak gelişir (59). Genellikle β hücre yıkımı ile karakterize olup (59, 61, 62), glukagon gibi uyarılara C-peptid yanıtının alınamayışı da tam insülin yetmezliğine yol açar (59). Langerhans adacıklarında lenfosit infiltrasyonu ve ödemle karakterizedir (61). Olguların çoğuna erken yaşlarda (11-13

yaş) tanı konulur (59, 62, 64). Tip I DM'in toplumdaki sıklığı %10-15'dir (59, 60, 64). Mutlak insülin tedavisine ihtiyaç vardır (62).

Tip II diyabet (İnsüline bağımlı olmayan diyabet-NIDDM): İnsülinin periferik etkisinde ve insülinin pankreas β hücrelerinden salgılanışında bozukluklarla seyreden DM tipidir. Tip II diyabete orta ve ileri yaş erişkinlerde daha sık rastlanır. Bireyler genellikle obezdir (62, 64). Tüm diyabet vakalarının %80'ini oluşturur (60, 64). Toplumda %2-5 oranındaki sıklığı ile en sık görülen DM tipidir (59, 64).

Malnutrisyon diyabeti: Beslenme ile ilgili olan ve pankreasda kalsifikasyon ve organik bozukluklara bağlı olarak gelişen, diyet dışında bir tedavi gerektirmeyen, insülin sekresyonunun varolduğu bir DM tipidir (64).

Gestasyonel Diabetes Mellitus: Gebelik esnasında başlayan ve ilk defa gebelik esnasında tanınan değişik derecelerde karbohidrat intoleransı bulunan diyabet tipidir (62, 64). Artmış insülin direnci, insülin yapımının yetersizliği ve bu iki defektin birleşimi sonucu gestasyonel diyabet oluşur (64).

Diğer tip diyabetler: Bu grupta β hücre fonksiyonunda genetik kusurlar, insülin etkisi ile ilgili genetik kusurlar, endokrin pankreas hastalıkları, endokrinopatiler, ilaç ve kimyasallara bağlı diyabet, enfeksiyonlar, immünite aracılı diyabetin nadir formları, diyabetle ilişkili diğer genetik sendromlar sayılabilir (64).

Diyabetin Komplikasyonları

Diyabetteki önemli morfolojik değişiklikler daha çok geç sistemik komplikasyonlar ile ilişkilidir. Çünkü bu komplikasyonlar mortalite ve morbiditenin başlıca nedenleridir. Her hastada bunların ortaya çıkış zamanı, şiddeti ve etkilenen organ ya da organlar farklıdır. Diyabetin sıkı kontrol altında olduğu hastalarda komplikasyonlar geç ortaya çıkarlar. Bununla birlikte, çoğu hastada 10-15 yıl sonra arterlerde (ateroskleroz), küçük damarların bazal membranlarında (mikroangiopati), böbreklerde (diyabetik nefropati), retinada (diyabetik retinopati), sinirlerde (diyabetik nöropati) ve diğer dokularda morfolojik değişiklikler gözlenir. Bu değişiklikler diyabetin her iki tipinde de görülür (60).

2.5. Diyabetik Nefropati

Diyabetik nefropati (DN) tip 1 ve tip 2 DM'un en sık görülen (59), mikrovasküler komplikasyonudur (65, 66). DN persistan mikroalbuminüri, erken kan basıncı yükselmesi, glomerüler filtrasyon hızı (GFH)'nda düşme, yüksek kardiyovasküler morbidite ve mortalite riski ile karakterizedir (62, 66, 67, 68).

Diyabetik Nefropati gelişim evreleri: 5 evre bulunmaktadır.

Evre 1 (Hipertrofi-Hiperfiltrasyon Dönemi): Tip 1 DM'lu hastalarda diyabet tanısı konulduğunda GFH %20-40 ve böbrek plazma akımı ise %9-14 oranında artmış olarak bulunur (59, 69). İdrar protein atılımı GFH'na paralel olarak artmıştır (69), ancak mikroalbuminüri düzeyinde değildir (59). Serum kreatinini 60-100 $\mu\text{mol/l}$ 'dir (70). Bu dönemde böbrek hacmi ile hiperfiltrasyon arasında yakın ilişki vardır. Ayrıca bu dönemdeki hiperfiltrasyon ile daha sonra ortaya çıkacak olan albuminürinin şiddeti arasında, geriye dönük olarak yapılan bazı çalışmalarda yakın ilişki bulunmuştur (59). Bu evre 2 yıl kadar sürer (69).

Evre 2 (Sessiz Dönem): Tanıdan 2-3 yıl sonraki evredir (71). GFH değerlerindeki artış devam etmekte, idrarda albuminüri normal sınırlarda bulunmaktadır (59, 69, 71). Kan basıncı ise çoğu kez normaldir (59, 69, 70). Serum kreatinini 60-120 $\mu\text{mol/l}$ 'dir (70). Konvansiyonel insülin tedavisi ile bu dönem 5-15 yıl arasında sürer (59, 69). Bu dönem renal morfolojik değişikliklerin başladığı dönemdir. Glomerül bazal membranında kalınlaşma, mezengium hacminde artma izlenir (59, 65, 71).

Evre 3 (Mikroalbuminüri-Başlangıç Dönemi): Bu dönem diyabetin başlangıcından yaklaşık 6-15 yıl sonra ortaya çıkar (59, 65, 69). Bu dönemde GFH yüksek veya normal sınırlara inmiş olarak saptanabilir (59). İdrardaki albumin miktarı 20-200 mg/dk (30-300 mg/24 saat) arasındadır (59, 65, 69, 70, 71). Kan basıncı normal sınırlarda bulunmakla birlikte daha önceki değerlere göre artış gösterebilir (59, 69, 70). Serum kreatinini 80-120 $\mu\text{mol/l}$ 'dir (70). Bu dönemde önemli histolojik değişiklikler görülür. Bazal membran kalınlaşması, mezengium hacminde artış, filtrasyon yüzeyinde kalınlaşma izlenir (59, 69).

Evre 4 (Azotemik Dönem): Hastalığın başlangıcından itibaren ortalama 17. yılında bu evreye ulaşılır (69). Bu dönemde 500 mg/gün (>300 mg/gün albuminüri) ve daha fazla süregelen proteinüri bulunur (59, 65, 70, 71). Her yıl proteinüri miktarında %15-40'luk artış izlenir. Öte yandan GFH'da yıllık 10-12 ml/dk'luk geriye dönüşümsüz azalma ortaya çıkar. Çoğu hastada hipertansiyon artık sendromun bir parçası haline gelir (59). Serum kreatinini 120-400 $\mu\text{mol/l}$ 'dir (70). Morfolojik anormallik glomerulosklerozdur (71).

Evre 5 (Son Dönem Böbrek Yetmezliği-SDBY): Diabetin ilk atağından yaklaşık 20-30 yıl sonra ortaya çıkan dönemdir (65). Bu dönemde SDBY gelişmiştir (59). GFH 1-10 ml/dk'dır. Ağır hipertansiyon, üre ve kreatinin yüksekliği vardır (69). Serum kreatinini >400 $\mu\text{mol/l}$ 'dir (70). Aşık proteinüri geliştikten ortalama 7-10 yıl sonra hastalarda renal replasman tedavisi gerekli hale gelmektedir (59, 71).

2.6. Streptozotocin

Streptozotocin (STZ) nitrosourea türevi olan (72) ve deneysel diyabet oluşturmak için kullanılan geniş spektrumlu bir antibiyotiktir (73, 74, 75, 76). İlk olarak 1959 yılında *Streptomyces achromogenes*'den izole edilmiştir (72, 73, 74, 76, 77). STZ diyabetojenik özelliğinin yanı sıra onkolitik ve onkojenik bir antibiyotiktir. Moleküler ağırlığı 457 daltondur (78, 79). STZ alkilnitrozüriler olarak bilinen alkilleyici antineoplastik ilaçların bir grup üyesidir. Küçük hücreli akciğer karsinomu, lenfomalar, mukozis fungoides, multiple myelom, glioma ve malign melanom gibi tümöral oluşumların büyük bir bölümüne karşı klinik olarak etkilidir (72).

STZ'nin diyabetojenik etkisi ilk kez 1963 yılında Rakieten tarafından bildirilmiş olup daha sonraki yıllarda deneysel Tip 1 ve Tip 2 diyabet çalışmalarında sıkça kullanılmıştır (78, 79). STZ pankreatik β hücreleri üzerine toksik etkisi sayesinde insülin yetersizliğine yol açarak hiperglisemiye neden olmaktadır (72, 74, 80, 81, 82).

Hipergliseminin derecesi ve süresi, ilacın dozuna ve deney hayvanının türüne bağlıdır. Kedi, köpek, sıçan ve farede 50 mg/kg doz diyabet oluşturma için yeterli iken tavşanda 300 mg/kg ve hamsterde 175 mg/kg gereklidir. Glikoz metabolizmasına olan etkisi Wistar sıçanlarda denenmiş olup, STZ uygulamasını takiben ilk 24 saat içerisinde kan şekeri, serum insülin ve glukagon düzeylerinin "pentafazik" bir değişim göstererek kalıcı hiperglisemi'nin oluştuğu gösterilmiştir. STZ dozu, artırılarak 4-5 gün süreyle tekrarlandığında otoimmün diyabete benzeyen diyabet modeli gelişir (78, 83). Tek ve yoğun dozda kullanılan STZ, β hücrelerinde oluşan tam hasarla insüline bağımlı diyabet oluşturur. Yetişkin sıçanlara STZ uygulaması Tip 1 DM (İnsüline bağımlı) geliştirirken, yenidoğan sıçan yavrularına STZ uygulaması Tip II DM geliştirir. Yetişkin sıçanlarda STZ'nin diyabetojenik dozunun tek enjeksiyonu beta hücrelerini yıkarken, subdiyabetojenik çoklu doz kullanımı belirgin lenfosit infiltrasyonuna neden olur (84).

STZ'nin ayrıca böbrek veya hepatik doku üzerine toksik etkisi de bulunmaktadır. Böbrek dokusunda proksimal tübüller üzerine toksik etkisi ile hasar oluşturduğu ve proteinüriye neden olduğu bildirilmiştir (80). Diyabetojenik ve antibiyotik özelliklerinin yanı sıra STZ genotoksiktir; mikrobiyal mutagenез, programsız DNA sentezi, mikronukleus, kromozomal düzensizlikler ve kardeş kromatid değişimleri çalışmalarında bu özelliği kanıtlanmıştır (72).

2.7. Antioksidanlar

2.7.1. Melatonin

Triptofan metabolizmasının ürünü olan melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) bir indolamindir (85, 86) ve pinealositlerde sentezlenir (87, 88, 89, 90). Melatonin'in varlığı 1958 yılında dermatolog Lerner tarafından sıgır pineal bezinde tespit edilmiştir (91, 92). Melatonin'in bir antioksidan olduğu, literatürde ilk kez 1991 yılında İanas ve ark. tarafından öne sürülmüş ve daha sonra yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla desteklenmiştir (91).

Melatoninin molekül ağırlığı 232 g/mol'dür (93). Dolaşımdan hücre içine alınan triptofan, triptofan 5-hidroksilaz enzimi tarafından 5-hidroksitriptofana, bu ise aromatik amino asit dekarboksilaz (dopa dekarboksilaz) aracılığıyla 5-hidroksitriptamine (5-HT, serotonin) dönüştürülür. Serotonin, arilalkilamin N-asetiltransferaz (AANAT) ile N-asetilserotonine (NAS) ve son olarak N-asetilserotonin hidroksiindol-O-metiltransferaz (HIOMT) enzimi tarafından melatonine (5-metoksi-N-asetiltriptamin) dönüştürülür (87, 94). Pineal bezde melatonin yapılması ve salıverilmesi karanlık ile uyarılır, ışık ile baskılanır. Melatonin sentezinde önemli rol oynayan AANAT ve HIOMT enzim aktiviteleri gece daha yüksektir. Gün ışığının bulunduğu saatlerde retina fotoreseptör hücreleri hiperpolarizedir ve retinahipotalamik-pineal sistem sessizdir, bu dönemde çok az melatonin salgılanır. İnsanlarda melatonin salgılaması 20:00-23:00 arasında başlar, gecenin ortasında (01:00 ile 05:00 arasında) doruk düzeyine ulaşır, daha sonra gecenin ikinci yarısında melatonin düzeyi giderek azalır (87).

Serum melatonin düzeyi yaşa göre değişir (87). Yenidoğanda kan melatonin düzeyi düşüktür. Üçüncü aydan sonra melatonin düzeyi ritmik özelliğini kazanır (87, 91). Melatonin anne sütüne geçer. En yüksek melatonin düzeyi yaşamın üç ile beşinci yılları arasında saptanır (87). Yaşlılıkta gece melatonin salınımı azalır (87, 91). Gençlerde ortalama gündüz ve gece doruk değerleri 10 ve 60 pg/ml'dir. Bireyler arasında melatonin düzeyleri çok farklılık gösterir. Bu nedenle maksimal gece doruk melatonin düzeyi 30-200 pg/ml arasında değişir. Cinsiyetin melatonin salınımı üzerine etkisi yoktur (87).

Melatonin yüksek lipofilik (95) ve hidrofilik özelliğe sahiptir (87, 93). Eksojen olarak verildiğinde vücutta depolanmadan, hızlı bir şekilde kan-beyin bariyerini geçer (87, 95). Kolaylıkla kan-beyin bariyerini ve plasentayı geçebilen melatonin için, bilinen hiçbir morfofizyolojik bariyerin olmaması, melatoninin tüm intraselüler komponentlere rahatlıkla ulaşabilmesini sağlamaktadır. Böylece melatonin, hücre zarını, organelleri ve

çekirdeği etkin bir şekilde serbest radikal hasarından koruyabilmektedir (87, 91). Ayrıca diğer antioksidanların aksine, çok yüksek dozlarda (300 mg/gün) ve 5 yıl gibi uzun süre kullanımda bile, melatonin toksik bir etki göstermemektedir (91).

Melatonin büyük ölçüde karaciğerde hidroksilasyonla (6-hidroksimelatonin) hızla metabolize olur ve sülfürik ya da glukuronik asit ile konjuge olduktan sonra idrarla atılır. Melatoninin idrardaki başlıca metaboliti 6-sülfatoksimelatonin'dir ve idrardaki düzeyi serum melatonin düzeyi ile yakın ilişkilidir. Ayrıca melatonin böbreklerde de metabolize olur. Melatonin sentezinde öncü madde olan NAS aynı zamanda bir melatonin metabolitidir. Pineal bez melatonin yapımından sorumlu tek organ değildir. Diffuz nöroendokrin sistem içinde kabul edilen APUD (amin prekürsör uptake ve dekarboksilasyon) hücrelerinde melatonin sentez edildiği gösterilmiştir (87). Bu hücreler retina, lakrimal bezler, beynin diğer bölgeleri ile bronş, karaciğer, böbrek, adrenal bezler, gastrointestinal sistem (88, 89), timus, plasenta, over, testis ve endometriumda yer alır (87, 96, 97). Ayrıca mast hücresi, lökosit ve naturel killer hücrelerinde de melatonin sentezlenmektedir (87).

İnsanda iki melatonin reseptörü bulunur: MT1 (Mell_a) ve MT2 (Mell_b) (87, 92). Bu reseptörler ve bağlayıcı bölgelerin farklı dağılımları bireysel fizyolojik fonksiyonları etkiler (87). Melatoninin ritmik özelliğe sahip termoregülasyon, enerji metabolizması, sirkadiyen ritm, üreme ve uyku kontrolü gibi birçok biyolojik fonksiyon üzerine etkilir (87, 96, 98).

2.7.2. Quercetin

Flavonoidler bitkilerde yaygın bulunan bir bileşiktir. Antiinflamatuvar, antiallerjik, antiviral, antibakteriyel ve antitümoral aktivite gibi çeşitli klinik özellikleri tanımlanmıştır (9, 99, 100, 101). Flavonoidler aromatik hidroksil gruplarının varlığı sebebiyle güçlü antioksidan özelliklere sahiptir. Reaktif oksijen ve nitrojen türlerini yakalar ve peroksidasyon reaksiyonlarını inhibe eder (101).

Quercetin (3, 3', 4', 5, 7-pentahidroksiflavon) polifenolik flavonoid bileşiklerinin geniş bir sınıfına aittir (9, 102, 103). Quercetin sıklıkla R-4 hidroksil grubunun hidrojenin bir dissarid ile yer değiştirdiği glikozidler şeklinde bulunur. Genellikle aglikon olarak tanımlanır (103). Yarı ömrü α fazı için 8.8 dakika, β fazı için 2.4 saattir. %98 oranında proteinlere bağlı olarak taşınır. Plazma seviyesi 20-40 dakikada çok azalır, 54 dakikada tespit edilemeyecek seviyeye düşer (104).

Quercetin insan diyetinde major bioflavonoiddir. Hesaplanan günlük alımı 25 mg'dır (103). Yiyeceklerin quercetin içeriğiyle ilgili bilgiler sınırlıdır. Fakat elde

bulunan veriler quercetin'in meyvelerde oranının 2-250 mg/kg, sebzelerde 0-100 mg/kg olduğunu ve özellikle soğanda 200-600 mg/kg gibi yüksek değerlerde olduğunu göstermektedir (105).

Quercetin'in başlangıçta β -glikozid dizisinin kolonik mikrofajlar tarafından parçalanmasını takiben ince bağırsaktan emildiği düşünülmüştür. Hollman ve ark. insan vücudunun quercetin'i emebileceği fakat emiliminin glukoz konjugasyonu ile geliştirildiği sonucuna varmışlardır (105). Yağda çözünebilen quercetin, radikalleri yakalar, lipid hasarını önler ve lipid hidroperoksit ve tiobarbitürik asit reaktif madde üretimini azaltır (106). Quercetin gibi flavonoidler Vit C ve Vit E'den daha etkili antioksidanlardır. Quercetin'in; hücre proliferasyonunun bastırılması, LDL oksidasyonunun korunması, platelet agregasyonunun engellenmesi, apoptosisin indüklenmesi gibi çeşitli aktiviteleri vardır (107). Quercetin muhtemelen belirlenen ilk tirozin kinaz inhibitörüdür ve ayrıca gastrik kanser hücreleri ve insan lökemik T hücrelerinde hücre siklusunun durmasına neden olduğu bildirilmiştir (108). Quercetin'in serbest radikallerle ilgili etki mekanizmaları çeşitlidir. Quercetin hidroksil radikali, peroksil ve süperoksit anyona karşı diğer flavonoidlere kıyasla en yüksek seviyede antiradikal özellik sergiler (109). Quercetin, ksantin oksidaz aracılığıyla süperoksit anyon üretimini inhibe eder (110), singlet oksijen ve hidroksil radikallerini temizler (111).

2.7.3. Resveratrol

Resveratrolün ilk kez 1976 yılında Langcake ve Pryce adlı araştırmacılar tarafından asmada (*Vitis Vinifera*) keşfedilmiştir. İlk kez 1992 yılında Siemann ve Creasy adlı araştırmacılar resveratrolü şarapta tespit etmişlerdir (112). Japonya'da "Kojoto" olarak bilinen ve doğal bir ilaç olan *Polygonum Cuspidatum* köklerinde de resveratrol tespit edilmiştir (112, 113). Resveratrol'ün şarap dışında üzüm, dut, çam, yer fıstığı, çay gibi 70'ten fazla bitki türünde bulunduğu gösterilmiştir. Asıl kaynağı *Vitis Vinifera*, *Labrusca* ve *Mucadine* üzümüdür (114, 115, 116, 117).

Yapılan son çalışmalarda resveratrol'ün bitkilerce patojenlere karşı bir savunma mekanizması olarak sentezlendiği gösterilmiştir (113, 114, 115, 116, 117). Resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) stilbenlerin alt grubu olan polifenolik bir bileşiktir (118, 119, 120, 121). Molekül ağırlığı 228.25 g/mol'dür (113). Resveratrol'ün UV-spektral özelliklerine göre cis ve trans izomerleri mevcuttur (113, 115). Üzüm ekstraktlarında cis formu bulunmamaktadır. Trans-resveratrol ışıktan korunduğu sürece sabit kalır (115).

Resveratrol fenilalanin'den başlayarak bir dizi reaksiyon sonucu sentezlenmektedir. İlk basamakta fenilalanin ammonia liyaz enziminin deaminasyon işlemi ile sinnamik asite dönüşür. Sinnamik asit 4-hidroksilaz ve p-hidroksilasyon reaksiyonları ile 4-Coumaric aside dönüşür. Bu asit 4-Coumaratla CoA ester'i meydana getirir. 4-Coumaril CoA, 3-Malonil CoA ünitesi ve stilben sentaz enzimi ile resveratrol oluşturur (115, 122).

Resveratrol bitkiler tarafından strese yanıt olarak üretilir ve normalde fazla miktarda üretilmez. Resveratrol'ün büyük kısmı jejunumdan, az kısmı ileumdan emilir. Tüm perfüze edilen resveratrolün ve konjugatlarının yalnızca %6'sı barsak epitelini geçmektedir (118). Trans-resveratroler insanlar tarafından oral olarak alındığında emilimleri yüksek olmasına karşın hızlı şekilde metabolize edilmesi ve atılmasından dolayı biyoyararlanımı düşüktür. Sağlıklı bireyler tarafından alındığında plazmadaki maksimum pik aralığa 30-60 dakikada ulaşır (123). Maksimum pike ulaştıktan sonra 2 µm/l düzeyinde seyrederek. Özellikle kalp, karaciğer ve böbrekte aşırı miktarda birikir (124, 125). Daha çok glukozit resveratrol (piceid) içeren üzüm suyunun biyoyararlanımının trans-resveratrole göre daha düşük olabileceği ileri sürülmüştür (125).

Resveratrol'ün yapılan araştırmalar sonucunda organizmaya fitoöstrojenik, antifungal (126), antioksidan (119, 121, 126), antiviral (113), pro-apoptotik (121), antiinflatuar (119), nöroprotektif (127), hepatoprotektif (128), anti-kanser, antiplatelet ve kardiyoprotektif etkileri saptanmıştır (119, 126). Resveratrol sıçan karaciğerinde lipid sentezini azaltır, sıçan lökositlerinde eikonosidlerin sentezini inhibe eder ve araşidonik asit metabolizması ile bağlantılıdır. Ayrıca platelet aktivasyonunu ve bazı protein kinazların aktivitesini inhibe eder. İnsan polimorfonükleer lökositler'nde üretilen reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı güçlü inhibitör etki gösterir ve LDL oksidasyonunu önlemede Vit E'den çok daha güçlü bir antioksidandır (129, 130).

Resveratrol *in vivo* olarak güçlü bir antioksidandır. Resveratrol'ün doğal antioksidan rolü üç farklı antioksidan mekanizma ile açıklanmaktadır. Bunlardan biri, koenzim Q ile yarışmak ve ROS oluşum yerinde oksidatif zincir kompleksini azaltmaktır. Diğerleri, mitokondride oluşan süperoksit radikalini yakalamak, sonuncusu ise fenton reaksiyonu ürünleri tarafından indüklenen lipid peroksidasyonunun inhibisyonudur (118).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Birimi'nden temin edilen, canlı ağırlığı ortalama 300–360 gr olan 3 aylık 47 adet erkek Wistar albino sıçan kullanıldı. Sıçanlar 30 gün süresince sıcaklığın 21°C ve nemin %55-60 olduğu, havalandırması olan bir ortamda, 12 saat aydınlık (08:00–20:00) 12 saat karanlık, gün ışığı ritmindeki odada bırakıldılar. Özel kafesler içinde standart pellet yem ile beslendiler ve çeşme suyu aldılar. Çalışmamız için İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulundan onay alındı (Etik kurul no: 2011/63). Rastgele seçilen denekler kontrol grubu 7, diyabet grupları 10'ar sıçan içeren 5 gruba ayrıldı. Deney süresince diyabet grubundan 3, diyabet+melatonin grubundan 3, diyabet+quercetin grubundan 3 ve diyabet+resveratrol grubundan 3 hayvan diyabet oluşturmak üzere verilen STZ uygulamasını takip eden 2-3 gün içinde telef oldu.

3.1. Deney grupları

1. **Kontrol grubu:** Bu gruptaki hayvanlara tedavi gruplarına çözücü olarak verilen miktarda 1 ml % 4'lük etanol intraperitoneal (ip) yolla uygulandı. Bu grup 30 gün süreyle tedavisiz etanol grubu olarak takip edildi (n=7).

2. **Diyabet grubu:** Bu gruptaki hayvanlara serum fizyolojik içinde eritilmiş streptozotocin (STZ, Sigma, St. Louis, MO) 45 mg/kg ip olarak tek doz uygulandı (131, 132). Bu grup 30 gün süreyle tedavisiz STZ-diyabetik grup olarak takip edildi (n=7).

3. **Diyabet + Melatonin grubu:** Bu gruptaki hayvanlara diyabet oluşturulduktan sonra 30 gün süreyle 10 mg/kg/gün melatonin (Apollo Scientific Limited, kod: BIM0105) 1 ml % 4'lük etanol içinde çözülerek ip yolla uygulandı (n=7).

4. **Diyabet + Quercetin grubu:** Bu gruptaki hayvanlara diyabet oluşturulduktan sonra 30 gün süreyle 25 mg/kg/gün quercetin (Alfa Aesar, Lot no: 10159068) 1 ml %4'lük etanol içinde çözülerek ip yolla uygulandı (n=7).

5. **Diyabet + Resveratrol grubu:** Bu gruptaki hayvanlara diyabet oluşturulduktan sonra 30 gün süreyle 10 mg/kg/gün resveratrol (Molekula, product no:M57735199) 1 ml % 4'lük etanol içinde çözülerek ip yolla uygulandı (n=7).

Tüm uygulamalar her gün 16:00-16:30 saatleri arasında 30 gün süreyle yapıldı.

Sıçanlar diyabet oluşturulmadan 12 saat önce aç bırakıldılar. Ertesi gün deneklerin ağırlıkları tartıldı. Sıçanların kuyruk veninden alınan kandan, glukometre yardımıyla kan glukoz düzeyleri ölçüldü. STZ uygulamasından sonra deneklere pellet yem ve su verilmeye başlandı. STZ uygulamasından 72 saat sonra (12 saatlik açlığı takiben) sıçanların kuyruk veninden alınan kandan glukometre yardımıyla kan glukoz

düzeyleri ölçüldü. Kan glukoz düzeyi 270 mg/dl'yi geçen sıçanlar diyabetik olarak kabul edildi. Kan glukoz düzeyi ölçümünden sonra sıçanlara pellet yem ve su verilmeye başlandı. Aynı gün ağırlıkları da ölçülen sıçanların saat 16.00'da tedavilerine başlandı. Deney süresince sıçanların hidrasyonu sık sık kontrol edildi. Ayrıca deneyin 15. ve 30. gününde de 12 saatlik açlığı takiben, sıçanların kan glukoz düzeyi ve ağırlıkları ölçüldü.

Sıçanlar ketamin (50 mg/kg) anestezisinden sonra sakrifiye edilerek, orta hat kesisiyle karın boşluğuna girildi. Her sıçanın kalbinden kan biyokimyası için ortalama 8 ml kan alındı. Alınan kanlar deney tüpüne aktarıldıktan sonra santrifüj makinasında 5000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serumlar BUN ve kreatinin ölçümleri için eppendorflara alındıktan sonra soğutucuya konuldu. Histolojik ve biyokimyasal analizler için pankreas ve böbrek dokuları çıkartıldı. Serum fizyolojik ile yıkanan böbreklerin ağırlıkları ölçüldü. Pankreas ile sol böbrekler histolojik değerlendirme için alındı. Sağ böbrekler biyokimyasal değerlendirilmede kullanılmak üzere paketlenildi ve soğutucuya konuldu.

3.2. Histolojik analiz

Dokular fikse olması için %10'luk nötral tamponlanmış formaline (NTF) konuldu. Örnekler daha sonra 3-4 mm'lik daha küçük parçalara ayrılıp, plastik doku takip kasetlerine konularak NTF'de 24 saat süre ile fikse edildi. Fiksasyon işleminin bitmesini takiben parçalar 24 saat boyunca akan çeşme suyunda yıkandılar. Daha sonra yükselen dereceli alkollerde (%70, %80, %96, %100) dehidrate edilerek, ksilende şeffaflaştırılıp parafine gömüldüler. Parafin bloklardan Leica RM 2145 marka mikrotom yardımıyla 5 µm'lik kesitler ışık mikroskopik ve immunohistokimyasal yöntemler için jelatin kaplı lamlara alındı. Hazırlanan bu lamalar dokunun lama adezyonunu artırmak için 37°C'lik etüvde 2 saat bekletildi. Kesitlere genel histolojik yapıyı gözlemlemek amacıyla Hematoksilen-Eozin (H-E), glikojen içeriğini ve bazal membran yapısını incelemek için Periyodik Asid Schiff (PAS) ve lizozomları ayırt etmek amacıyla Toluidin mavisi boyama yöntemleri uygulandı. Ayrıca TGF-β1 immünohistokimyasal boyama yöntemi kullanıldı. Preparatlar Leica DFC 280 ışık mikroskobu ve Leica Q Win görüntü analiz sistemi (Leica Microscope Imaging Solution Ltd, Cambridge, UK) ile incelenerek skorlandı, fotoğrafları çekildi.

Kesitlere uygulanan boyaların prosedürleri (133):

Hematoksilen-Eozin Boyama

Ksilen-----5 dk.+ 5 dk. + 5 dk.

Absolü Alkol-----3 dk.

Alkol 96 °-----3 dk.
Alkol 80 °-----3 dk.
Alkol 70 ° -----3 dk.
Distile su -----5-10 sn çalkalanır
Hematoksilen -----12-13dk.
Çeşme suyu -----25 dk.
Eozin -----2 dk.
Alkol 96 ° -----3 dk. + 3 dk.
Absolü Alkol -----3 dk. + 3 dk. + 3 dk
Ksilen -----5 dk. + 5 dk. + 5 dk.
Kesitler Kanada balsamı ile kapatıldı.

PAS Boyama

Kesitler ksilen ve alkol serilerinden geçirildikten sonra;
Çeşme suyu ----- 2 dk.
Distile su ----- 2 dk.
Periyodik ----- 5 dk.
Distile su -----2 dk.
Schieff -----15 dk.
Çeşme suyu -----10 dk.
Alkol 96 ° -----3 dk. + 3 dk.
Absolü Alkol -----3 dk. + 3 dk. + 3 dk
Ksilen -----5 dk. + 5 dk. + 5 dk.
Kesitler Kanada balsamı ile kapatıldı.

Toluidin Blue Boyama

Kesitler ksilen ve alkol serilerinden geçirildikten sonra;
Distile su-----5 dk.
Toluidin Blue-----4 dk.
Çeşme suyu-----5 dk.
Alkol 96 ° -----3 dk. + 3 dk
Absolü Alkol -----3 dk. + 3 dk. + 3 dk
Ksilen-----5 dk. + 5 dk. + 5 dk.
Kesitler Kanada balsamı ile kapatıldı.

Histopatolojik Değerlendirme: Renal hasar, tubuler ve glomerüler değişikliklerin derecesi ve yaygınlığına göre semikantitatif olarak belirlendi. Buna göre tubuler hasar; tubuler epitel hücrelerinde hidropik değişiklikler (hücre şişmesi ve vakuolizasyon), deskuamasyon, mikrovillus kaybı ve peritubuler infiltrasyon yönünden incelendi. Glomerüler hasar ise; glomerül büzüşmesi ve PAS (+) materyalin artmasıyla karakterize glomeruloskleroz derecesine göre değerlendirildi.

Tubuler hasar için her kesitten X20'lik büyütmede 10 alan incelendi. Hasarın şiddetine göre; 0 (değişiklik yok), 1 (hafif), 2 (orta) ve 3 (ağır) olarak skorlandı. Glomerüler hasar için; X40'lık büyütmede 20 glomerül değerlendirildi. Her glomerül, skleroz derecesine göre; 0-3 arasında skorlandı. 0: normal glomerül, 1: glomerülün $\leq$ %25'ini kaplayan skleroz, 2: glomerülün %25-%50'ini kaplayan skleroz ve 3: glomerülün $\geq$ % 75'ini kaplayan skleroz olarak derecelendirildi (134).

3.2.1. TGF- β 1 immün boyaması

TGF- β 1 antikoru (Santa Cruz Biotechnology, sc-146, Lot no: C0211) kullanılarak immunohistokimyasal boyama yapıldı. Tubuler ve glomerüler TGF- β 1 immunoreaksiyonu, Leica DFC 280 marka ışık mikroskopunda semikantitatif olarak incelendi. Tubuler boyanma yoğunluğunu saptamak için; her kesitten X20'lik büyütmede 100 tubul sayıldı. Sayılan tubuller (0; boyanma yok, 1; zayıf boyanma, 2; şiddetli boyanma) olarak skorlandı ve istatistiksel olarak analizi yapıldı. Bu metod Fujisawa (135) ve Arıkan'dan (136) modifiye edilmiştir.

İmmünohistokimya Boyama Prosedürü:

TGF- β 1 antikoru kullanılarak parafin kesitlere uygulanan Streptavidin-Biotin-Peroksidaz yöntemi boyama işlem sırası:

1. Kesitler 60°C'de 1 saat etüvde deparafinize edildi. Kesitlerde 15 dakika bekletilen kesitler daha sonra inen alkol serilerinden (%100 - %70) geçirilip, distile suya alındı.
2. Distile suda 5-10 dakika bekletilen kesitler, antijen retrieval aşaması için hazırlandı.
3. Kaynayan sitrat tamponu içine alınan kesitler, 7 dakika sitrat ile muamele edildi. Kesitler tampon içinden çıkarılmadan soğumaya bırakıldı.
4. Soğuyan kesitler önce distile su ile, daha sonra fosfat buffer solusyon (PBS) ile 1-2 dakika yıkandı.
5. Yıkama işleminden sonra doku kesitlerinin sınırları hidrofobik kalem (pappen) ile çizildi ve kesitler platforma dizildi.

6. Kesitlere hidrojen peroksit (peroxide block) damlatılarak 10 dakika beklendi. Ortamın sıcak olması için kaynamış su platforma kondu ve kapağı kapatıldı. Ardından hidrojen peroksit silkelenerek kesitler PBS ile 3 kez 5 dakika yıkandı.

7. Kesitlerin yüzeyine protein block damlatıldı ve 5 dakika bekletildi. Ardından kesitler çok iyi silkelenerek protein block uzaklaştırıldı. Kesitler yıkanmadan diğer aşamaya geçildi.

8. Kesitlere TGF- β 1 antikoru damlatılarak 2 saat bekletildi. Daha sonra PBS ile 3 kez 5 dakika yıkandı.

9. Sekonder antikor ile 10 dakika muamele edildikten sonra, PBS ile 3 kez 5 dakika yıkandı.

10. Streptavidin-Peroksidaz kompleksinde 10 dakika muamele edildi. Daha sonra PBS ile 3 kez 5 dakika yıkandı.

11. Substrat-kromojen (AEC; 3, aminoetil 9, karbazol) solüsyonu ile 3-5 dakika inkübe edildi (*Renk reaksiyonu gözlenene kadar*).

12. PBS ile 3 kez 5 dakika yıkandı.

13. Distile suda çalkalandı.

14. Kesitlere Mayer's hematoksilen boyası yapıldı (1 dakika).

15. Çeşme suyunda yıkandı.

16. Distile suda yıkandı.

17. Kesitler yıkama işleminden sonra su bazlı kapatma maddesi ile kapatıldı.

3.3. Biyokimyasal analiz

3.3.1. Açlık kan glukoz ölçümü

Deneysel çalışmaya ait gruplar oluşturulduktan sonra deneyin başlangıç günü, 1. günü, 15. günü ve 30. günlerinde tüm gruplar 12 saat öncesinden aç bırakıldı. Ertesi sabah kuyruk veninden alınan kan ile glukoz düzeyi ölçümleri glukometre (Accu-Check Active cihazı, ROCHE, Germany) aracılığıyla glikostiksler (Accu-Check Active Glucose test stripi, ROCHE, Germany) kullanılarak yapıldı.

3.3.2. Doku biyokimyası

Kimyasal malzemeler

Bu çalışmada, sitokrom-c, ksantin, ksantin oksidaz, redükte glutatyon (GSH), sığır serum albumin (BSA), glutatyon redüktaz (GSSG), süperoksit dismutaz (SOD), etilen diamintetraasetik asid (EDTA), folin fenol reagent, redükte β -nikotinamid adenin dinükleotid (NADPH), sodyum azid (NaN_3), Na_2CO_3 , CuSO_4 , Na, K-tartarat, NaOH,

KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , H_2O_2 , HCl , NaCl , 2-tiyobarbütirik asid (TBA), trikloroasetik asid (TCA) (Merck) kullanılmıştır.

Dokuların homojenizasyonu

Böbrek dokusu 1/5 w/v oranında PBS tamponu (pH 7,4) eklenerek buz izolasyonu altında IKA-Werke T25 homojenizatörü ile tüm doku parçalanıncaya kadar homojenize edildi. Elde edilen homojenattan 1 mL MDA ölçümü için ayrıldı. Kalan homojenatlar, Sonics VCX130 sonifikatörde 30 saniyelik aralıklarla 4 defa 15 saniye sonifiye edildi. Sonifiye işlemlerinin ardından 10.000 g' de +4 °C' de 10 dakika Nüve NF 800R mikrosantrifüj aletiyle santrifüj işlemi yapıldı. Böylece enzim aktiviteleri ve protein tayinin yapılacağı süpernatant elde edildi. Süpernatant örnekleri ölçüm işlemleri yapılmıncaya kadar -70 °C de derin dondurucuda saklandı.

Enzim Aktivite Tayinleri

Katalaz (CAT) aktivitesi

Katalaz enziminin aktivite tayini Luck yöntemine (137) göre yapıldı.

Gerekli çözeltiler:

1/15 M konsantrasyonda Na, K-fosfat tamponu (Na_2HPO_4 - KH_2PO_4) pH: 7

Derişik H_2O_2 çözeltisi

Yöntem:

Katalaz ölçümünde kullanılmak üzere spektrofotometrede 240 nm'de absorbans 0,7-0,9 oluncaya kadar Na-K-fosfat tampon çözeltisine derişik (% 35 'lik) H_2O_2 ilave edildi. Numunelerin katalaz içeriğini belirlemek için hazırlanan bu karışımdan 1000 µl alınıp küvete kondu ve üzerine çalışma aralığına bağılı olarak 30 µl başlayarak gittikçe artan konsantrasyonlarda süpernatant eklendi ve bir kez karıştırılıp Shimadzu 1601-UV visible spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda 30 sn süreyle H_2O_2 nin ($\epsilon = 0,0396 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$) absorbans değışimi okundu. Okunan bu optik dansite farkından mL'deki enzim ünite sayısı hesaplandı.

Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi

Süperoksit radikallerinin dismutasyonunda görev alan SOD enziminin aktivite tayini McCord ve Fridovich yöntemine (138) göre yapıldı. Yöntemin esası ksantin-ksantin oksidaz sisteminde üretilen süperoksit radikallerinin sitokrom-C'yi indirgemesinin SOD tarafından inhibisyonu temeline dayanır. Süperoksit dismutaz çeşitli yollarla ortaya çıkan süperoksit ($\text{O}_2^{\cdot-}$) radikalinin hidrojen peroksit (H_2O_2) dismutasyonu reaksiyonunu katalizler. SOD enzim aktivitesi ksantin – ksantin oksidaz

(XO) sistemi ile üretilen $O_2^{\cdot-}$ radikallerinin sitokrom c okside etmesi sonucu oluşan renk değişimi 550 nm’de takip edilerek belirlendi. Bu reaksiyona dayanan optik dansitedeki azalmadan yararlanarak SOD tarafından reaksiyonun % inhibisyonu belirlendi. Bu reaksiyonu % 50 inhibe eden örneklerdeki SOD miktarı 1 Unite (U) olarak kabul edildi ve sonuçlar U/mg protein olarak verildi.

$$\text{Enzimin \% inhibisyonu} = (\text{Absk} \ddot{u} \text{r} \ddot{u} \text{v} - \text{Absnum}) / \text{Abs k} \ddot{u} \text{r} \ddot{u} \text{v} \times 100.$$

Gerekli çözeltiler:

A çözeltisi:

5 μ mol ksantin 0.001 N NaOH‘daki çözeltisi: 10 hacim

2 μ mol sitokrom-C’nin 50 mM pH 7.8 ve 0.1 mM EDTA içeren fosfat tamponundaki çözeltisi: 100 hacim

A çözeltisi belirtilen hacim oranlarında karıştırılarak hazırlanır. Bu çözelti +4 °C ‘de 3 gün kararlıdır.

B Çözeltisi: Ksantin oksidazın 0.1 mM EDTA’daki çözeltisi 0.2U/mL. B çözeltisi deneyden önce taze olarak hazırlanır.

Yöntem:

- 1) 3 mL’lik spektrofotometre küvetine 2.9 mL A çözeltisi eklendi.
- 2) 50 μ L örnek ilave edildi.
- 3) Tepkime 50 μ L B çözeltisinin eklenmesiyle başlatıldı.
- 4) Daha sonra Shimadzu UV- 1601-UV visible spektrofotometrede 550 nm deki absorbans değişimi (1dk.) okundu.
- 5) Kır okuması yapılırken örnek yerine 50 μ L bidestile su eklendi.
- 6) Örneklerin % inhibisyon değeri hesaplandı.

Lipit peroksidasyonunun belirlenmesi

Serbest radikal saldırıları sonucu hücre membranında bulunan lipidlerin peroksidasyonu, son ürün olan malondialdehit (MDA) miktarının Beuge yöntemine (139) göre belirlenmesiyle bulundu.

Gerekli çözeltiler:

% 15 ‘lik TCA çözeltisi : 1 hacim

% 0.375 ‘lik TBA çözeltisi : 1 hacim

0.25 N ‘lik HCl çözeltisi : 1 hacim

Yukarıdaki üç çözeltinin hassas bir şekilde hazırlanıp belirtilen hacim oranlarında karıştırılmasıyla bir solüsyon hazırlandı.

Yöntem:

- 1- 10 mL' lik santifüj tüpleri alındı ve bütün tüplere hazırlanan solüsyondan 4 mL konuldu.
- 2- Kör tüpleri hariç tutularak örnek tüplerine 1 mL homojenat konuldu.
- 3- Bir kez şiddetli bir şekilde karıştırıldı.
- 4- Kaynar suda (95- 100 °C 'de) 15 dakika bekletildi.
- 5- Daha sonra tüpler soğutuldu ve 3500 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi.
- 6- Elde edilen süpernatanın Shimadzu 1601 UV-VIS spektrofotometresinde 535 nm'deki MDA-TBA kompleksi 'nin ($\epsilon : 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) absorpsiyonu okunarak malondialdehit miktarı hesaplandı.

Toplam Glutasyon (tGSH) seviyesi

5-tio-2-nitrobenzoat (TNB) oluşumu, 412 nm' de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Ekstrakt içindeki GSH miktarı, ticari bir GSH standart olarak kullanılarak, nmol/mg protein cinsinden belirlendi (139).

Ölçülen tüm biyokimyasal parametrelerin birimleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Biyokimyasal parametrelerin birimleri.

Parametre	SOD	CAT	tGSH	MDA
Birim	U/mg prot.	U/mg prot.	nmol/mg prot.	nmol/mg prot.

3.3.3. BUN ve kreatinin düzeyi

Serum BUN ve kreatinin düzeyleri kinetik çalışmayla belirlendi. Çalışmada Abbott firmasının Architect c 1600 model cihazı kullanıldı.

3.4. Vücut ve böbrek ağırlığı ölçümleri

Hayvanların vücut ağırlık ölçümleri çalışmanın başlangıç günü, 1. günü, 15. günü ve 30. günlerinde tartılarak saptandı. Çalışma sonunda ketamin anestezisi altındaki hayvanların sol böbrekleri çıkarıldı. Serum fizyolojik ile yıkanan böbreklerin ağırlık ölçümleri yapıldı.

3.5. İstatistiksel analiz

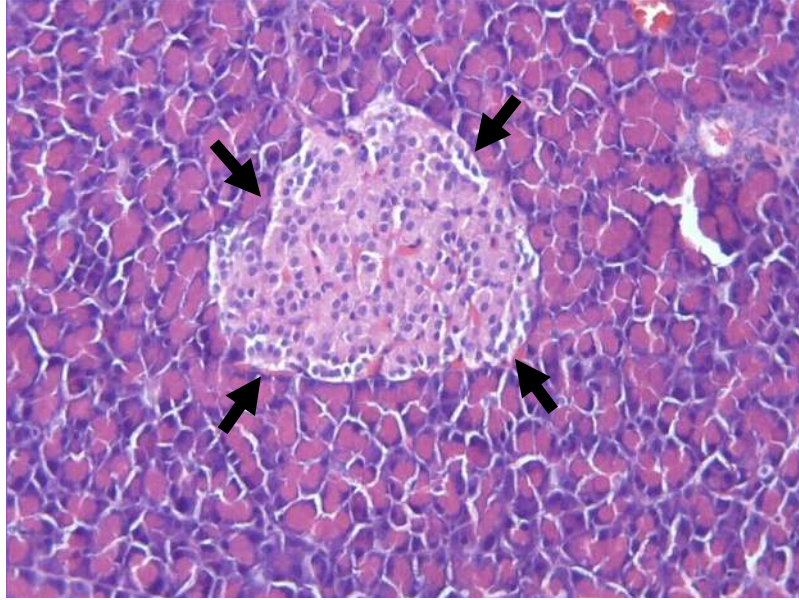
İstatistiksel analizler SPSS (SPSS for Windows version 13.0) ve MedCalc (2007, Belçika) istatistiksel yazılım programları ile yapıldı. Tüm sonuçlar aritmetik ortalama $\pm$ standart hata ($\bar{X} \pm SE$) olarak ifade edildi. Tüm gruptaki ölçülebilir değişkenlerin (MDA, CAT, SOD, tGSH, kan glukozu, BUN, kreatinin, vücut ağırlığı, böbrek ağırlığı) Shapiro Wilk normallik testine göre normal dağılım göstermediği saptandı ($p > 0.05$). Bu nedenle istatistiksel değerlendirmede parametrik olmayan testlerden Kruskal Wallis varyans analizi tüm değişkenler yönünden grupların genel karşılaştırılmasında kullanılırken, grupların ikili karşılaştırılmasında ise Connover testi kullanıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Histopatolojik bulgular

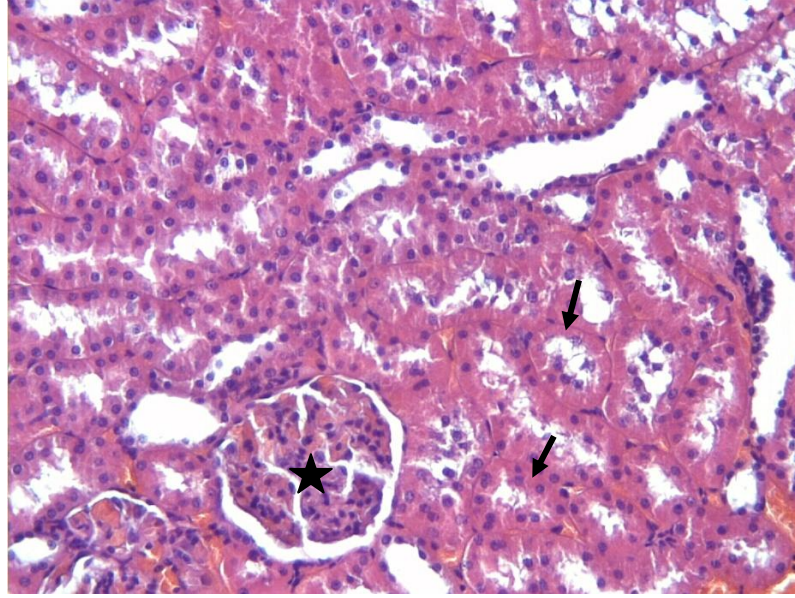
4.1.1. Kontrol grubu

H-E boyama metodu uygulanan kesitlere ait pankreas dokularında Langerhans adacıkları ekzokrin asinuslar içerisinde dağılmış yuvarlak ya da oval şekilleri ile dikkat çekti. Langerhans adacıklarını oluşturan hücreler normal histolojik görünümde izlendi (Resim 1).



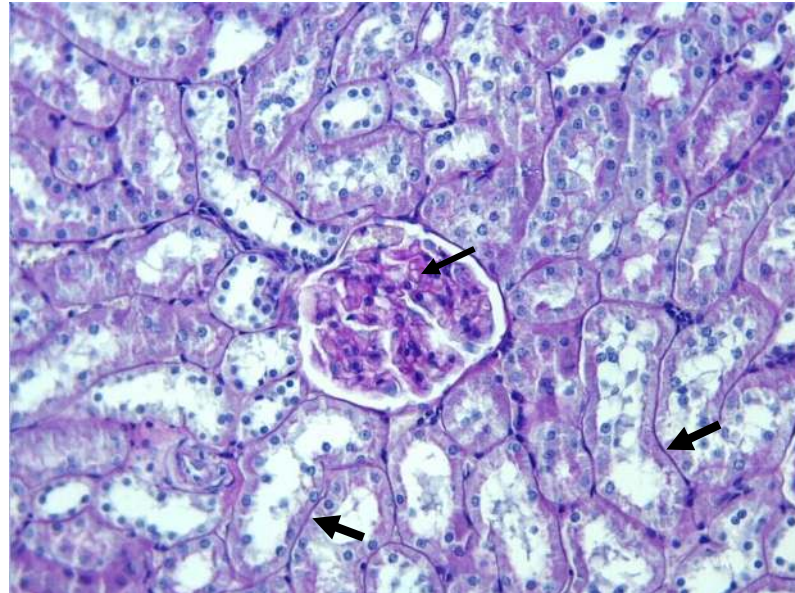
Resim 1. Kontrol grubu; normal görünümdeki pankreas Langerhans adacığı (oklar). H-E; X20.

Bu boyama metoduyla incelenen böbrek kesitlerinde kortekste yer alan glomerül ve tubul yapıları normal histolojik yapıda gözlemlendi (Resim 2).



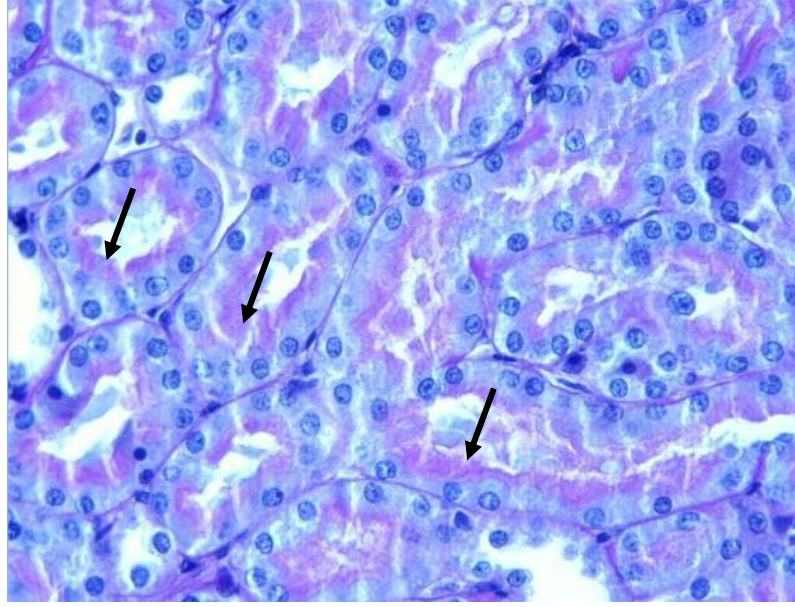
Resim 2. Kontrol grubu; glomerül (yıldız) ve tubul yapıları (oklar) normal olarak izlenmekte. H-E; X20.

PAS boyama metodu uygulanan kesitlerde glomerüler kapiller ve tubuler bazal membranların düzenli yapıda olduğu görüldü (Resim 3).



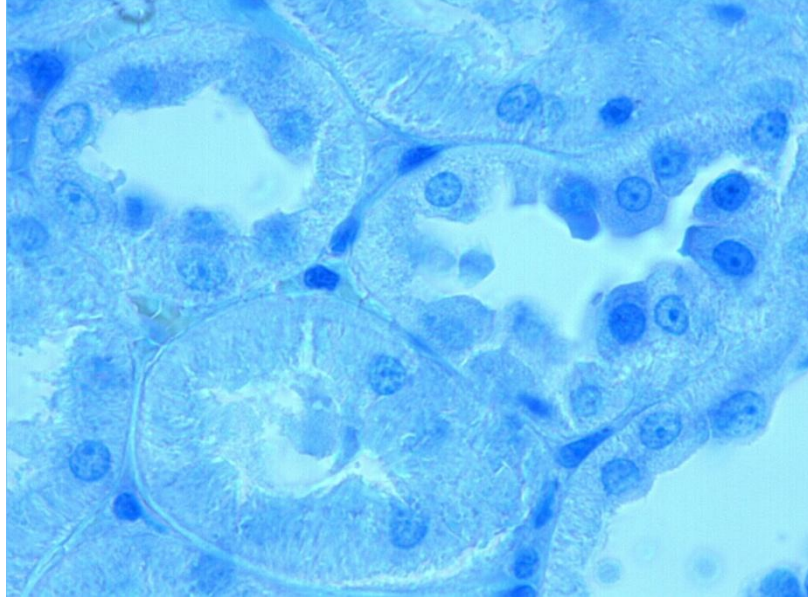
Resim 3. Kontrol grubu; glomerüler kapiller lümenleri (ince ok) ve tubuler bazal membranların görünümü (kalın oklar). PAS; X20.

Proksimal tubul epitel hücrelerinin apikal yüzeylerinde PAS (+) boyanan mikrovillus yapıları belirgin olarak gözlemlendi (Resim 4).



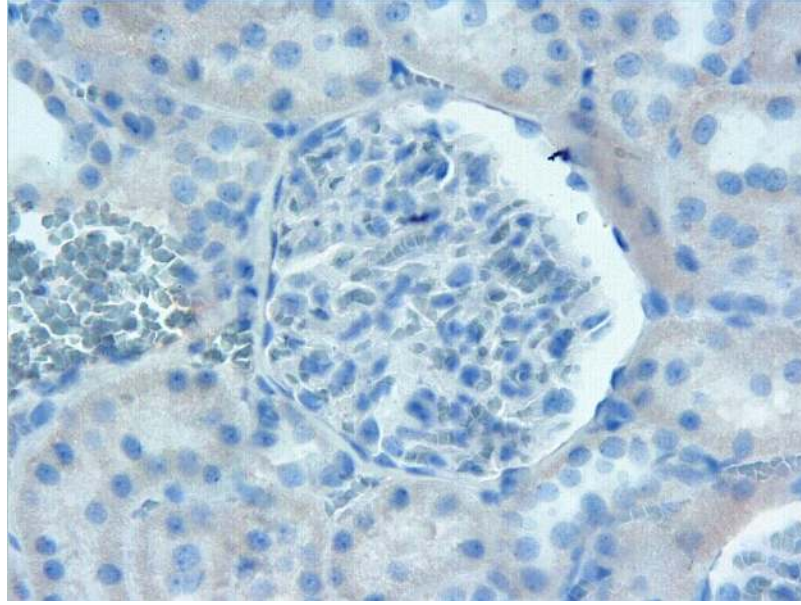
Resim 4. Kontrol grubu; proksimal tubul apikalinde yer alan, mikrovillus yapıları görülmekte (oklar). PAS; X40.

Toluidin mavisi boyama metodu uygulanan preparatlarda, proksimal tubulde lizozomal yapılara çok nadir olarak rastlandı (Resim 5).



Resim 5. Kontrol grubu; proksimal ve distal tubul hücrelerinin görünümü. Toluidin mavisi; X100.

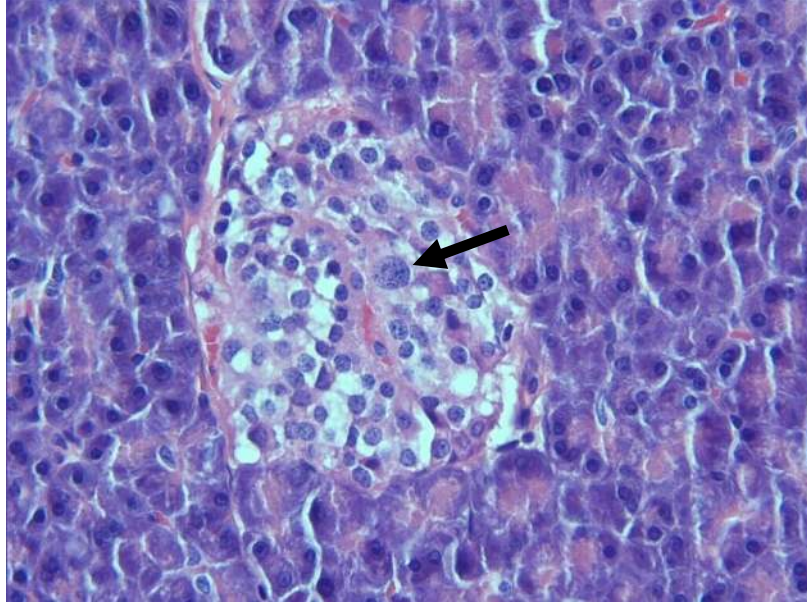
TGF- β 1 immun boyama metodu uygulanan kesitlerde, tubuler hücrelerin sitoplazmaları zayıf olarak boyandı. Glomerüllerde ise boyanma izlenmedi (Resim 6). Bu grupta boyanmayan tubul sayısı 79.00 ± 4.04 , zayıf boyanan tubul sayısı 19.42 ± 3.43 ve kuvvetli boyanan tubul sayısı 1.57 ± 1.26 olarak hesaplandı.



Resim 6. Kontrol grubu; proksimal ve distal tubul epitel hücrelerinde izlenen zayıf immunopozitiflik. TGF- β 1; X40.

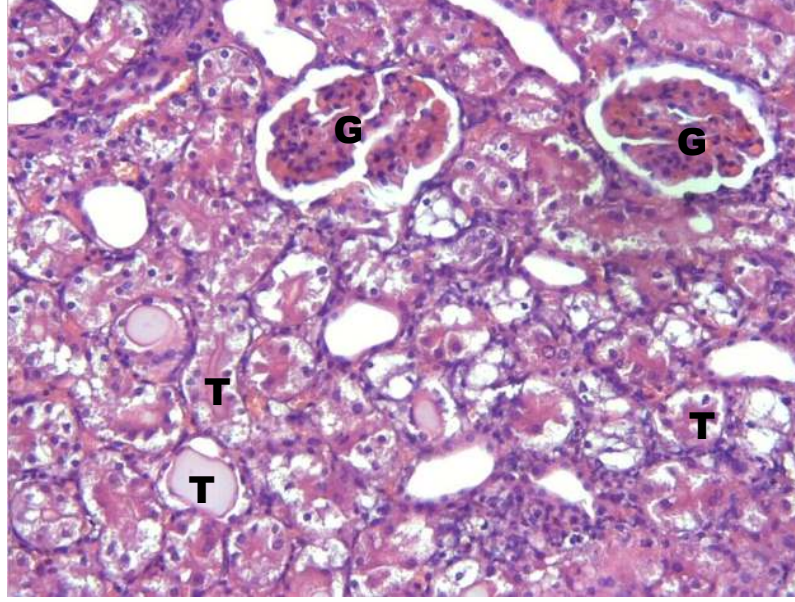
4.1.2. Diyabet grubu

Bu grupta incelenen pankreas kesitlerinde, Langerhans adacıkları kontrol grubuna göre küçük, sınırları düzensiz olarak izlendi. Ayrıca adacığın merkezinde yer alan bazı hücrelerin nukleusları irileşmiş, bazılarının ise sitoplazmaları büzüşmüş ve eozinofilik olarak boyanmıştı (Resim 7).



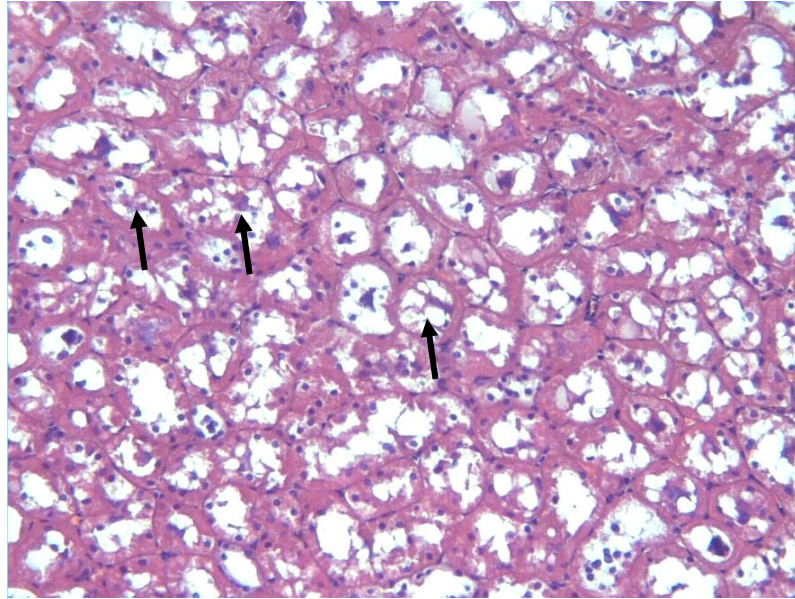
Resim 7. Diyabet grubu; Langerhans adacığının merkezinde iri nukleuslu hücre görülmekte (ok). H-E; X40.

H-E boyama metoduyla incelenen preparatlarda, glomerüller ve tubuler değişiklikler gözlemlendi (Resim 8).

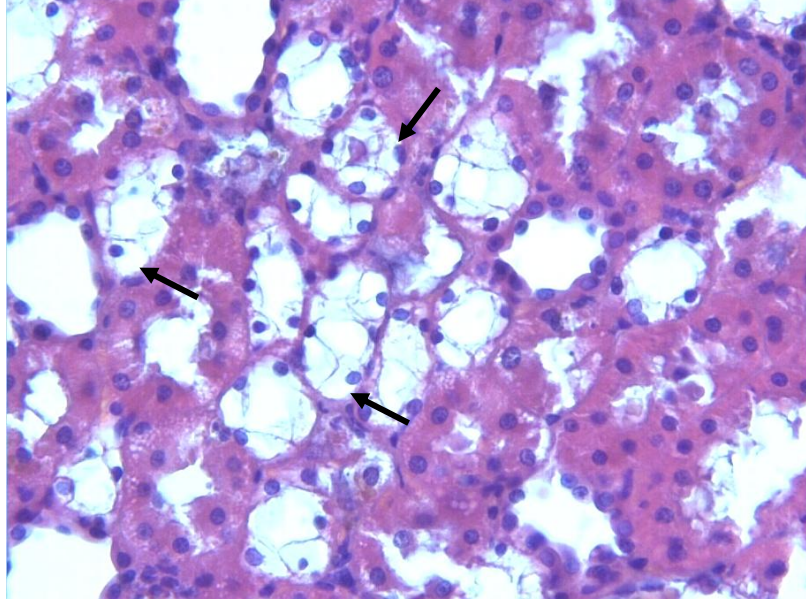


**Resim 8. Diyabet grubu; glomerüller (G) ve tubuler (T) hasar izlenmekte.
H-E; X20.**

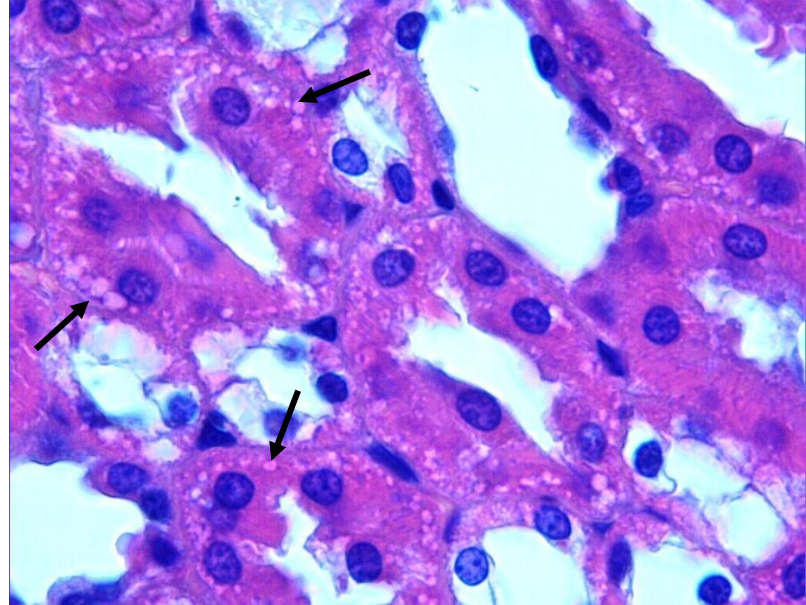
Tubullerde gözlenen değişiklikler epitelyal dökülme (Resim 9), hücre şişmesi, ve intrasitoplazmik vakuolizasyon olarak saptandı (Resim 10, 11).



**Resim 9. Diyabet grubu; tubul lümeninde izlenen epitelyal döküntüler (oklar).
H-E; X20**

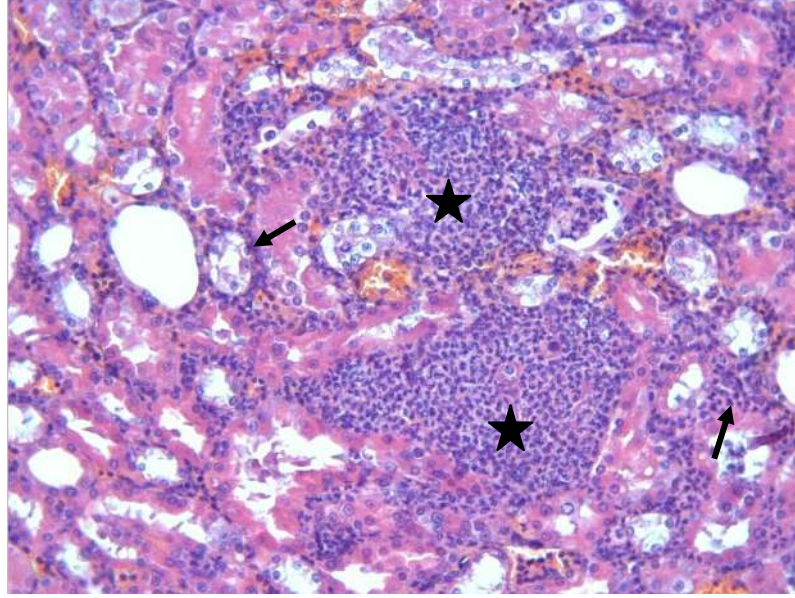


**Resim 10. Diyabet grubu; şişmiş tubuler epitelyal hücreler izlenmekte (oklar).
H-E; X40.**



**Resim 11. Diyabet grubu; proksimal tubul epitel hücrelerinin bazalinde izlenen
vakuolizasyon (oklar). H-E; X100.**

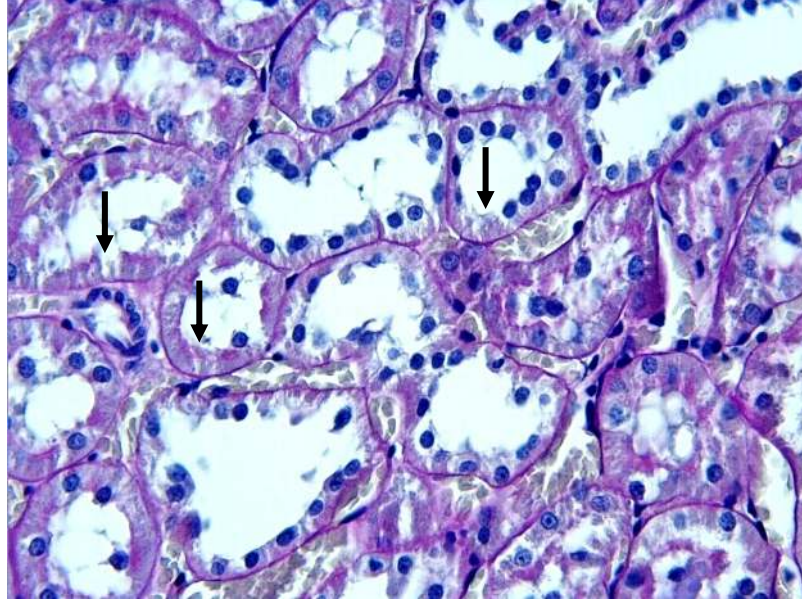
Ayrıca yer yer tubullerin etrafındaki bağ dokuda infiltrasyon alanlarına rastlandı (Resim 12).



Resim 12. Diyabet grubu; yaygın (yıldız) ve peritubuler (oklar) infiltrasyon alanları görülmekte. H-E; X20.

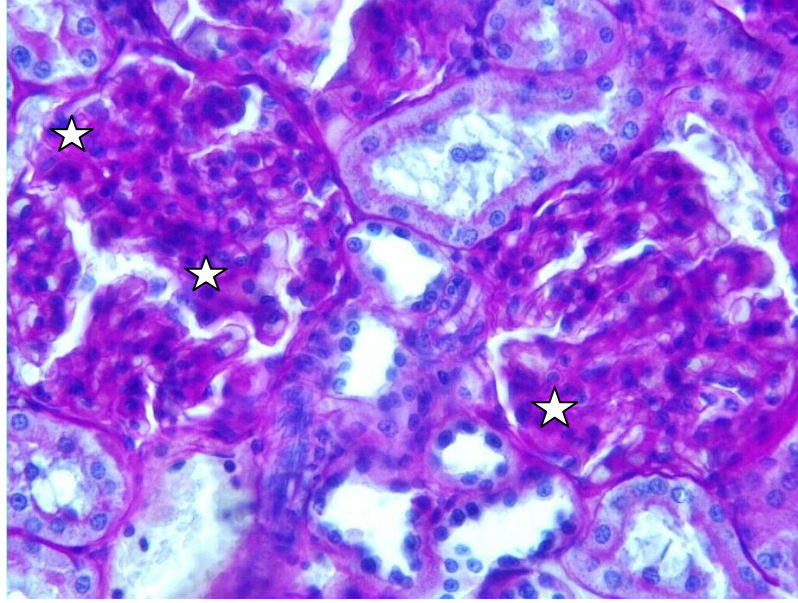
Bu grupta, histopatolojik hasar skoru 5.85 ± 0.34 olarak tespit edildi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında histopatolojik hasar yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı ($p=0.0003$).

PAS boyama metodu uygulanan kesitlerde izlenen en dikkat çekici değişiklikler, özellikle proksimal tubul epitel hücrelerindeki mikrovillus kaybı (Resim 13) ve glomerüllerdeki sklerozdu.



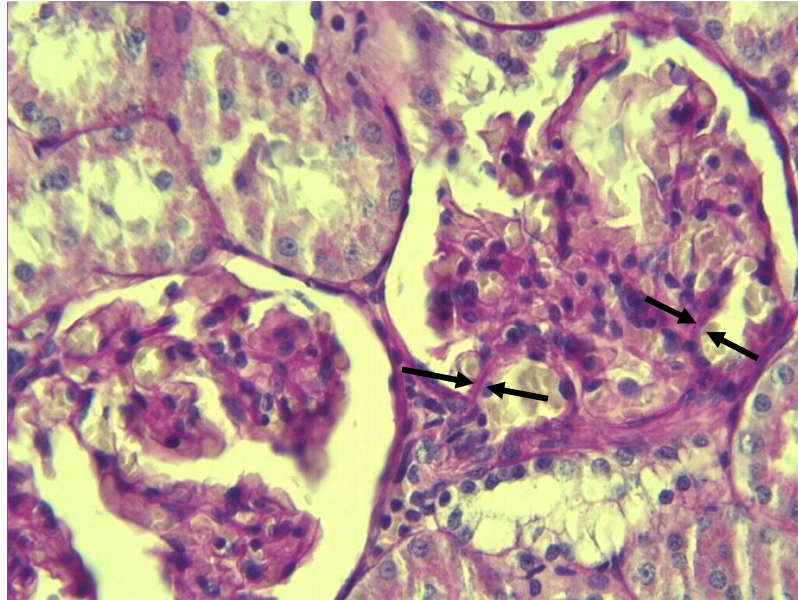
Resim 13. Diyabet grubu; proksimal tubul epitel hücrelerinin apikalinde mikrovillus kaybı görülmekte (oklar). PAS; X40.

Glomerüler mezengiumun kontrollere göre PAS (+) olarak daha yoğun boyandığı görüldü. Ayrıca kapiller lümenin yer yer izlenmemesi dikkat çekiciydi (Resim 14). Bu grupta şiddetli sklerotik değişiklikler gösteren glomerül sayısı 10.85 ± 0.55 olarak tespit edildi. Sklerotik değişiklikler göstermeyen glomerül gözlenmedi.



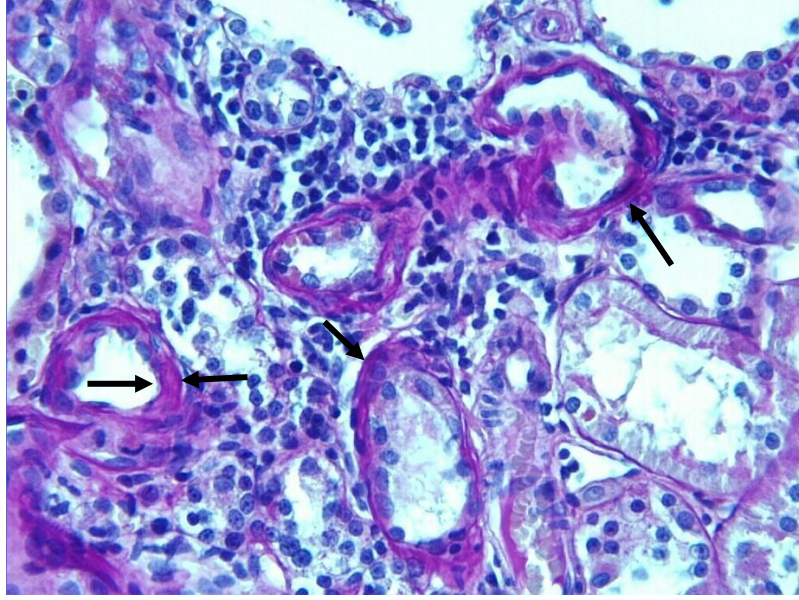
Resim 14. Diyabet grubu; glomerüler mezengiumda PAS (+) boyanma ve kapiller lümenin izlenmediği alanlar dikkati çekmekte (yıldız). PAS; X40.

Glomerüllerde izlenen diğer bir bulgu ise; kapiller bazal membranın kalınlaşmasıydı (Resim 15).



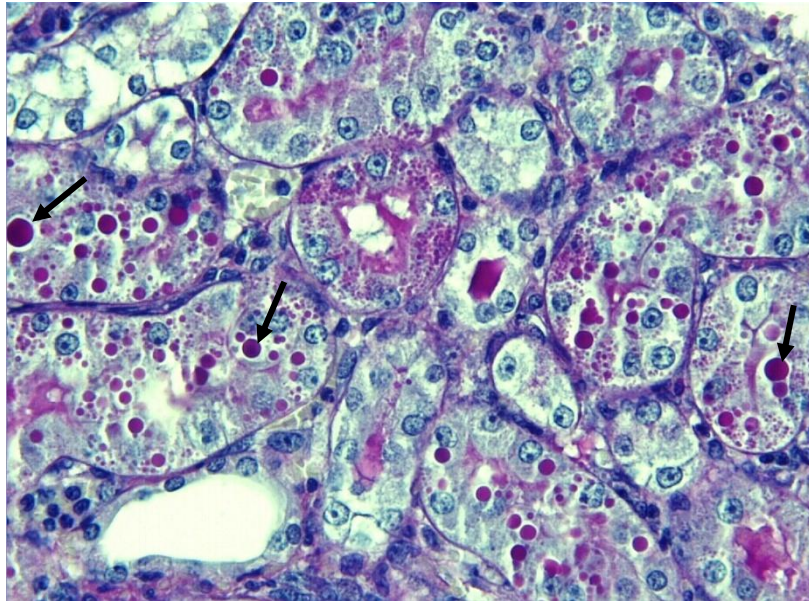
Resim 15. Diyabet grubu; kapiller bazal membranın kalınlaştığı görülmekte (oklar) PAS; X40.

Bu boyama metodunda, tubuler bazal membranların yer yer kalınlaştığı ve düzenli yapılarının bozulduğu gözlemlendi (Resim 16).



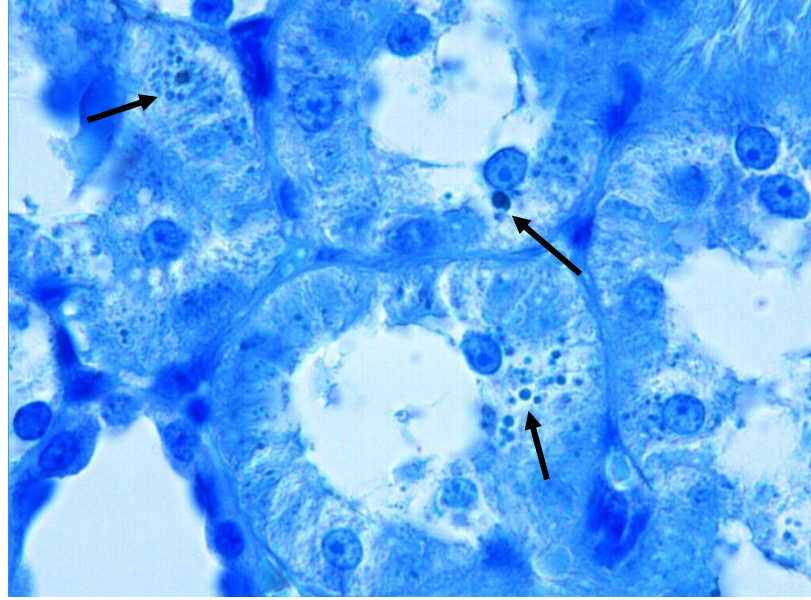
Resim 16. Diyabet grubu; tubuler bazal membran kalınlaşması dikkat çekiciydi (oklar). PAS; X40.

Ayrıca etkilenmiş tubullerde epitel hücrelerinin sitoplazmasında PAS (+) boyanan, farklı büyüklükte, sınırları düzenli vakuoller görüldü (Resim 17).



Resim 17. Diyabet grubu; tubullerde PAS (+) boyanan ve sınırları düzenli, farklı büyüklükte vakuoller dikkati çekmekte (oklar). PAS; X40.

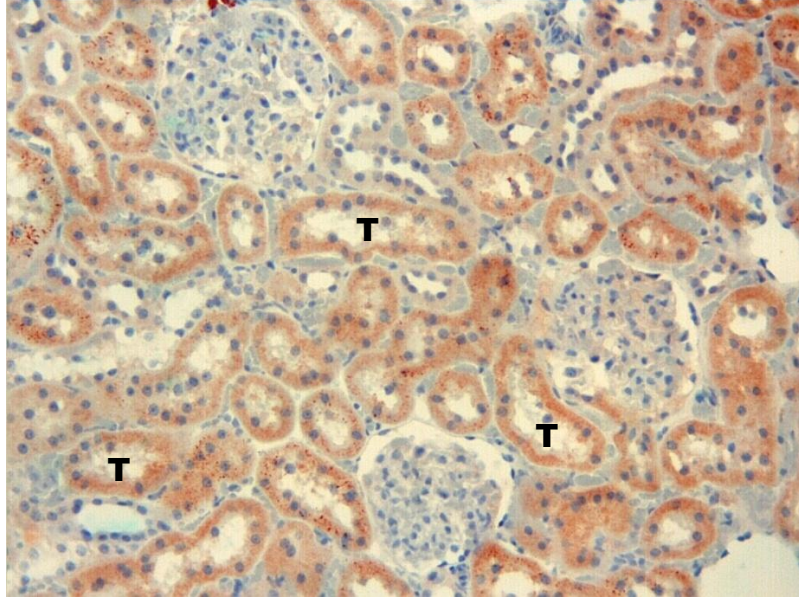
Toluidin mavisi boyama metodu uygulanan kesitlerde, proksimal tubul epitel hücrelerinin sitoplazmasında irili ufaklı, granüler görünümde yapılar izlendi (Resim 18).



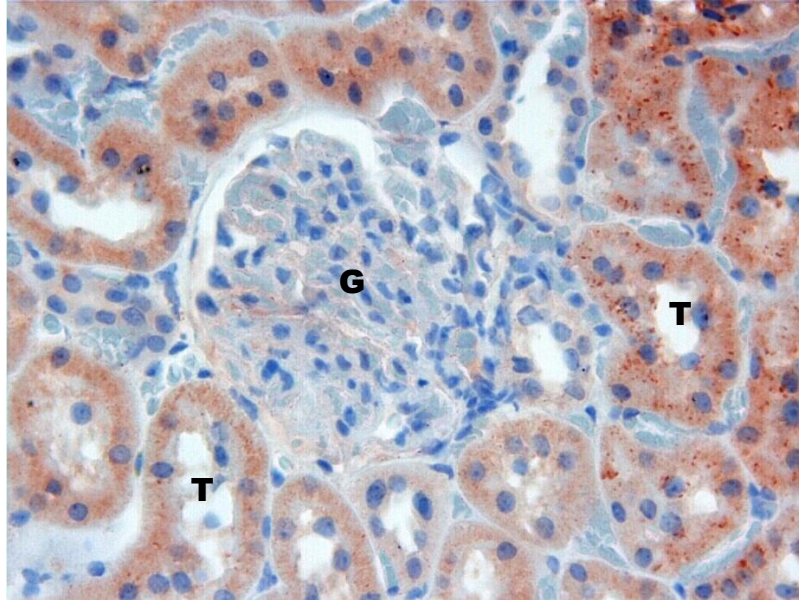
Resim 18. Diyabet grubu; tubul epitel hücrelerinde mavi renkte boyanan, irili ufaklı granüller görülmekte (oklar). Toluidin mavisi; X100.

TGF- β 1 immun boyama metodu ile boyanan kesitlerde, tubuller şiddetli pozitif olarak boyanırken, glomerüller zayıf olarak boyandı (Resim 19, 20).

Bu grupta boyanmayan tubul sayısı 26.14 ± 5.22 , zayıf boyanan tubul sayısı 36.57 ± 5.02 ve şiddetli boyanan tubul sayısı 37.28 ± 4.28 olarak tespit edildi. Boyanmayan tubul sayısı, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalırken ($p=0.0002$), şiddetli boyanan tubul sayısında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı ($p=0.0001$).



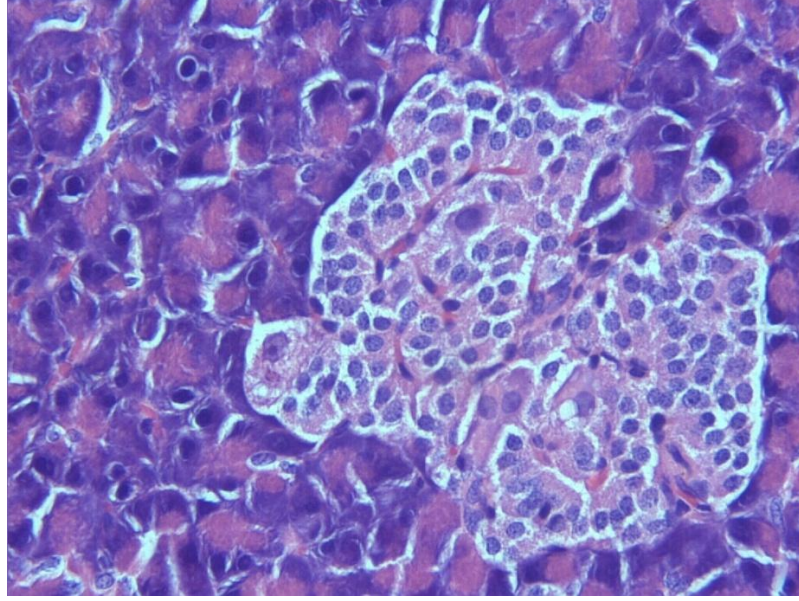
Resim 19. Diyabet grubu; tubullerde (T) şiddetli immunopozitiflik izlenmekte. TGF- β 1; X20.



Resim 20. Diyabet grubu; tubuller (T) şiddetli immunopozitif boyanırken, glomerüllerde (G) zayıf boyanma görülmekte. TGF- β 1; X40.

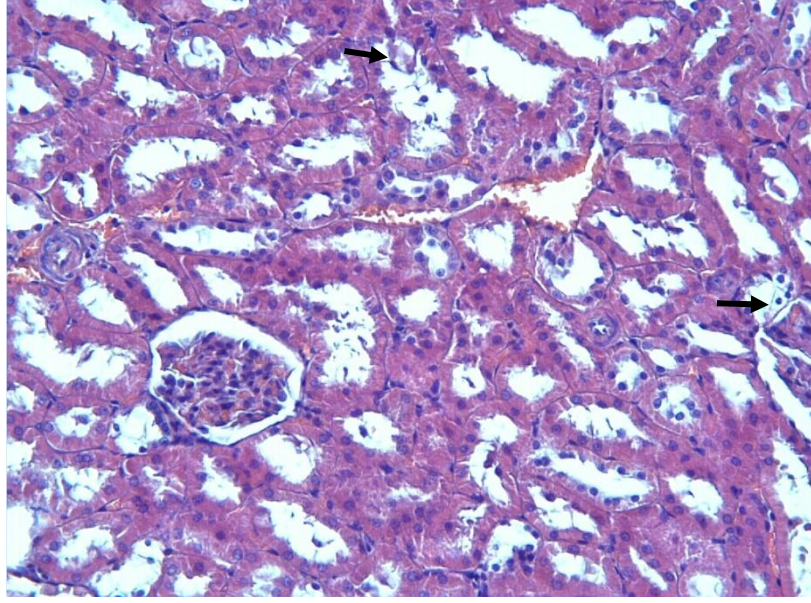
4.1.3. Diyabet + Melatonin grubu

Langerhans adacıklarının boyutları diyabet grubuna göre daha büyük ve düzgün sınırlıydı (Resim 21).



Resim 21. Diyabet + Melatonin grubu; Langerhans adacıklarının görünümü. H-E; X40.

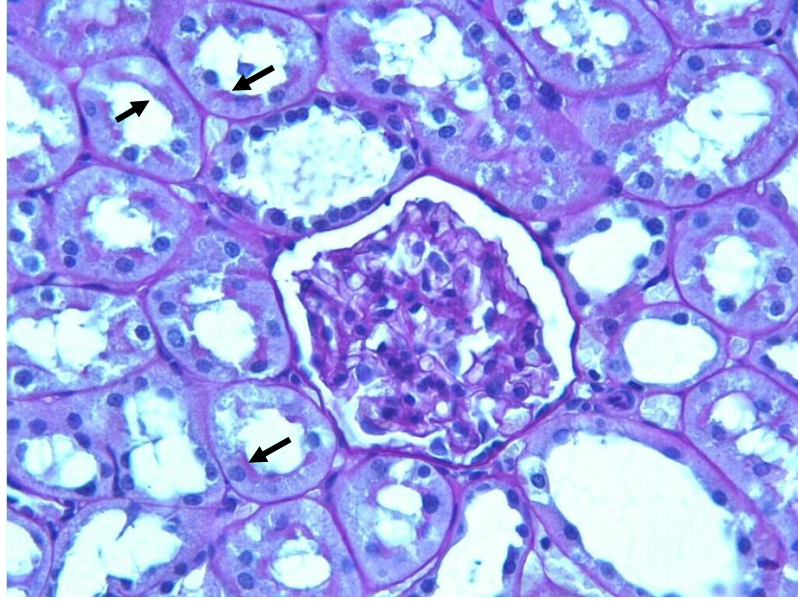
H-E boyama metodu uygulanan kesitlerde, hafif tubuler epitelyal döküntü ve bazı tubul hücrelerinde izlenen hidropik değişiklikler dışında böbrek dokusu normal histolojik görünümdeydi (Resim 22).



Resim 22. Diyabet + Melatonin grubu; hafif tubuler epitelyal dökülme ve bazı tubul hücrelerinde hidropik değişiklikler görülmekte (oklar). H-E; X20.

Bu grupta peritubuler inflamasyona rastlanmadı. Histopatolojik değişikliklerin diyabet grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görüldü ($p=0.0003$). Histopatolojik hasar skoru 3.71 ± 0.52 olarak bulundu. Diyabet grupları içinde en düşük histopatolojik hasar skoru bu grupta saptandı.

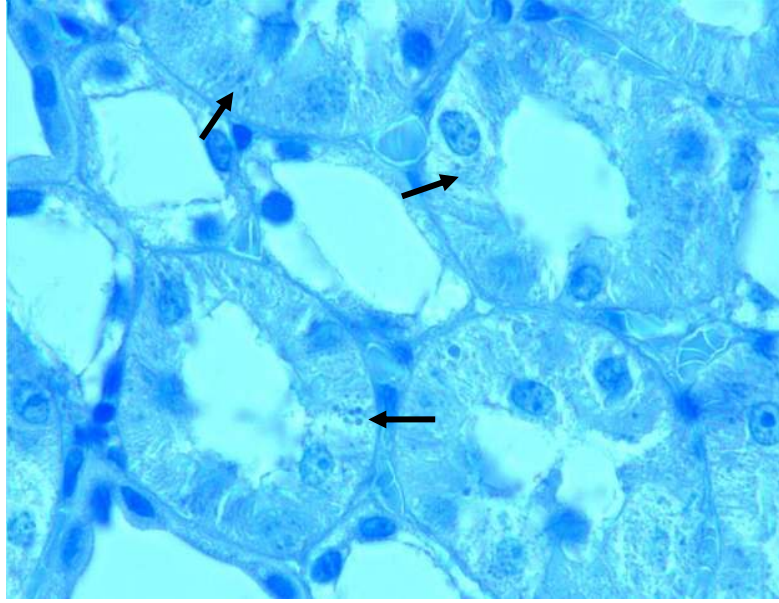
PAS boyama metodu uygulanan kesitlerde; tubullerin etrafındaki bazal membran düzgün sınırlı ve proksimal tubullerde fırça kenar yer yer sağlam olarak izlendi. Glomerüler kapiller bazal membranlarda diyabet grubundakine benzer şekilde belirgin bir kalınlaşma gözlenmedi (Resim 23).



Resim 23. Diyabet + Melatonin grubu; tubullerin etrafındaki bazal membranın düzgün sınırlı olduğu ve proksimal tubullerde yer yer fırça kenar yapısının korunduğu görülmekte (oklar). PAS; X40.

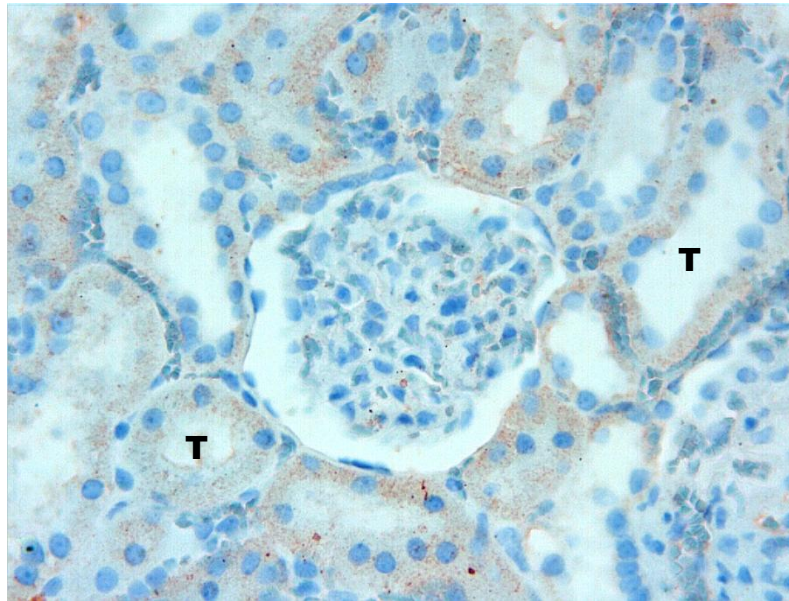
Bu grupta hafif ve orta derecede sklerotik değişiklik gösteren glomerüller izlenirken, şiddetli skleroz bulgularına sahip glomerüller görülmedi. Glomerüloskleroz bulgularına sahip toplam glomerül sayısı 15.42 ± 1.21 olarak tespit edildi. Bu gruptaki toplam sklerotik glomerül sayısı diyabet grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldı ($p=0.0066$).

Toluidin mavisi boyama metodu uygulanan kesitlerde, proksimal tubul epitel hücrelerinin sitoplazmasında mavi renkte boyanan granüller diyabet grubuna göre seyrek olarak izlendi (Resim 24).



Resim 24. Diyabet + Melatonin grubu; mavi renkte boyanan granüller seyrek olarak görülmekte (oklar). Toluidin mavisi; X100.

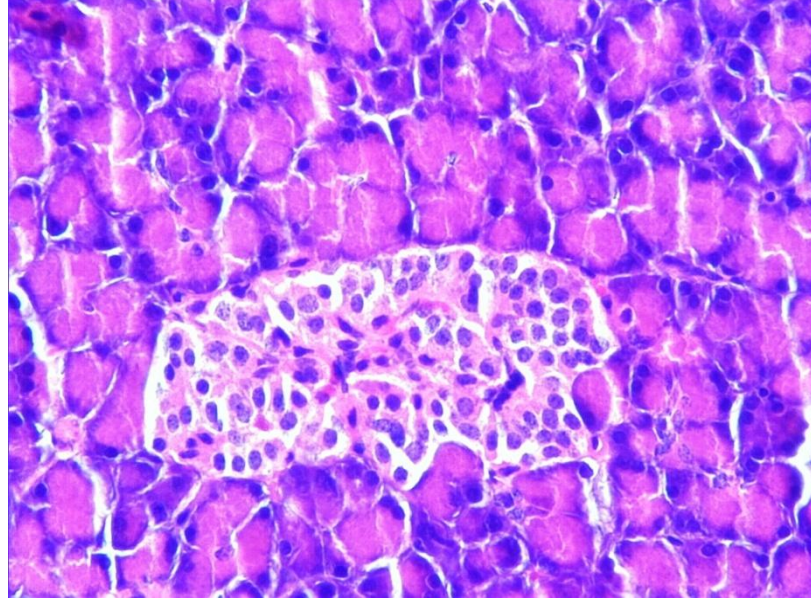
TGF- β 1 immun boyama metodu uygulanan kesitlerde, diyabet grubuna göre zayıf boyanan tubul sayısı istatistiksel olarak anlamlı derecede artarken ($p=0.0003$), şiddetli boyanan tubul sayısında ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi ($p=0.0001$) (Resim 25). Kesitlerde boyanmayan tubul sayısı 38.28 ± 4.92 , zayıf boyanan tubul sayısı 50.00 ± 4.34 ve kuvvetli boyanan tubul sayısı 11.71 ± 1.10 olarak tespit edildi.



Resim 25. Diyabet + Melatonin grubu; tubullerde (T) zayıf boyanma izlenmekte. TGF- β 1; X40.

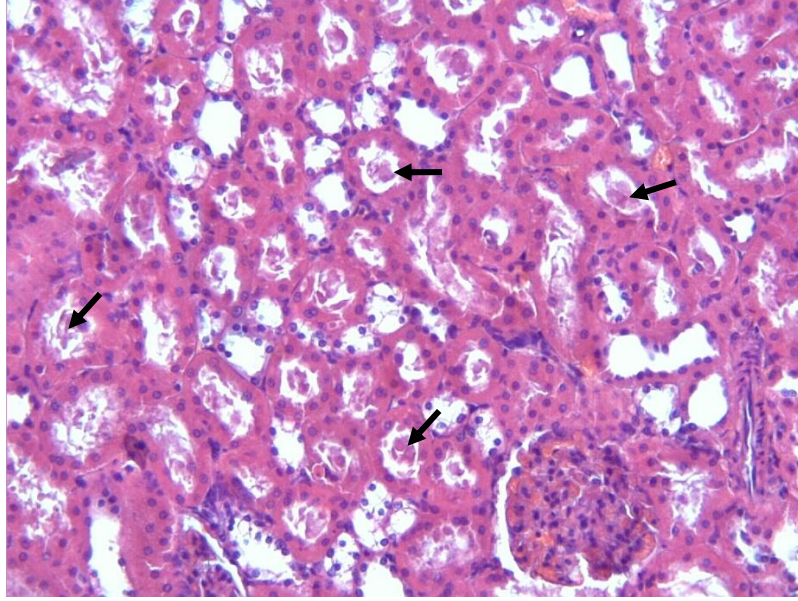
4.1.4. Diyabet + Quercetin grubu

Langerhans adacıklarında, diyabet grubunda izlenen dev nukleuslu hücelere rastlanmadı (Resim 26).

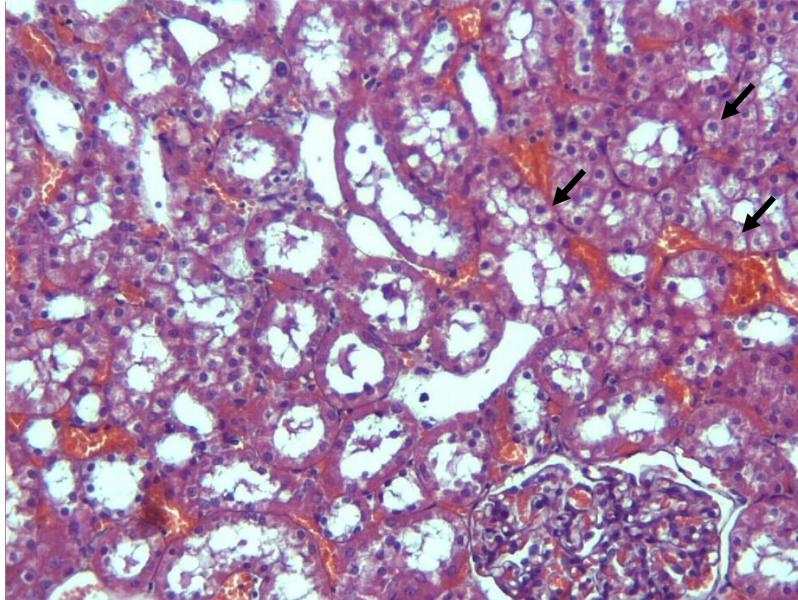


Resim 26. Diyabet + Quercetin grubu; Langerhans adacığının görünümü. H-E; X40.

H-E boyama metodu uygulanan kesitlerde; dikkati çeken en önemli bulgu tubul lümeninde izlenen epitel hücelerine ait sitoplazmik döküntüler (Resim 27) ve şişmiş proksimal tubul epitel hücreleriydi (Resim 28).



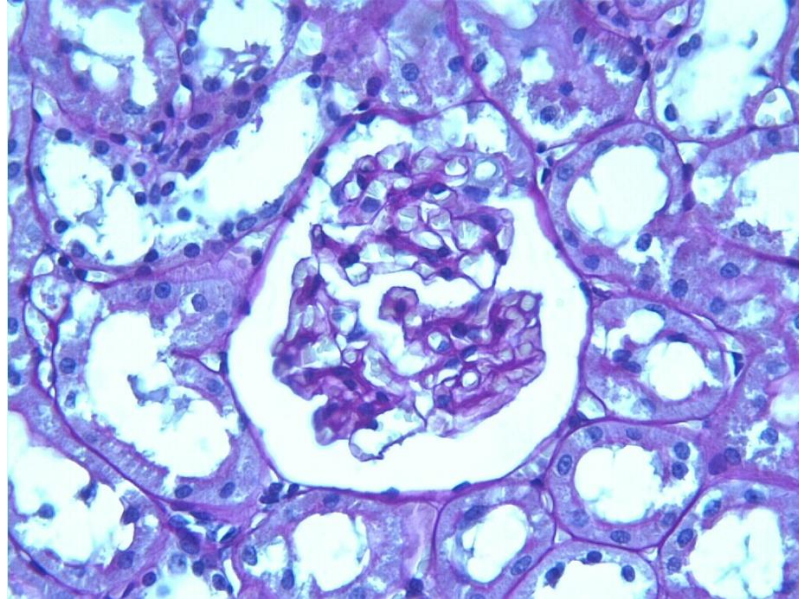
Resim 27. Diyabet + Quercetin grubu; tubul lümeninde orta derecede epitelyal dökülme görülmekte (oklar). H-E; X20.



Resim 28. Diyabet +Quercetin grubu; bazı tubullerde izlenen şişmiş epitelyal hücreler dikkati çekmekte (oklar). H-E; X20.

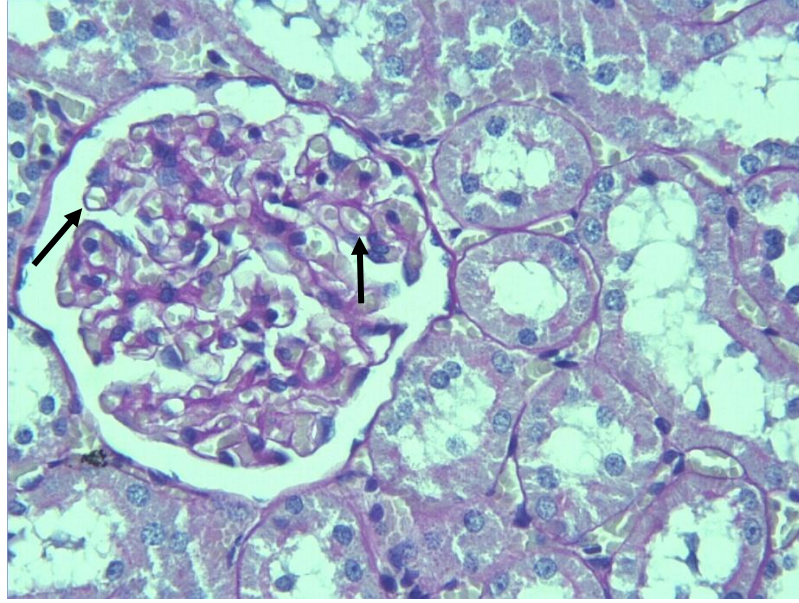
Histopatolojik değişiklikler diyabet grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldı ($p=0.0003$). Diğer yandan diyabet + melatonin grubu ile karşılaştırıldığında histopatolojik skor açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$). Histopatolojik hasar skoru bu grupta 4.28 ± 0.35 olarak tespit edildi.

PAS boyama metodu uygulanan kesitlerde, glomerüllerin ve tubullerin histolojik görünümü diyabet + melatonin grubuna benzerdi (Resim 29).



Resim 29. Diyabet + Quercetin grubu. PAS; X40.

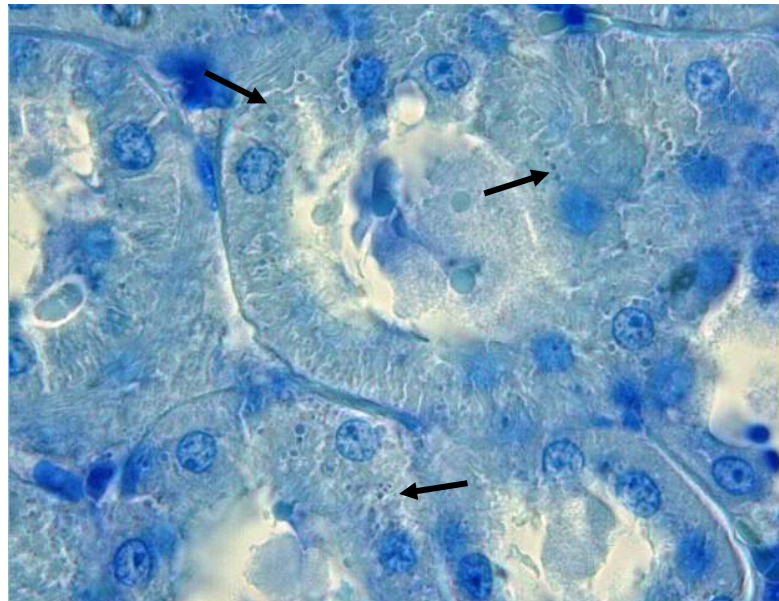
Glomerüllerin çoğunda glomerüler kapiller lümenleri belirgin olarak izlendi (Resim 30).



Resim 30. Diyabet + Quercetin grubu; glomerüler kapiller lümen belirgin olarak izlenmekte (oklar). PAS; X40.

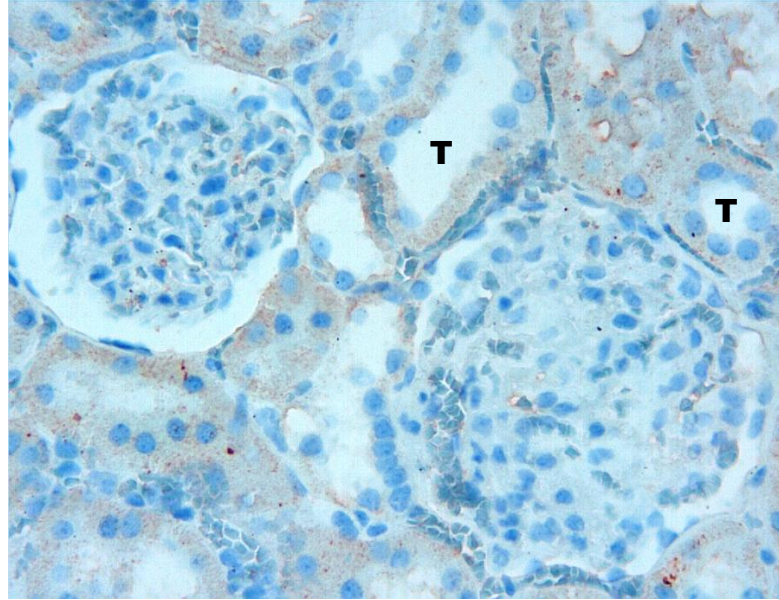
Glomerüloskleroz bulgularına sahip toplam glomerül sayısı 17.28 ± 1.20 olarak tespit edildi. Glomerülosklerozun derecesi diyabet grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalırken ($p=0.0066$), diyabet + melatonin grubu ile karşılaştırıldığında ise aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsızdı ($p>0.05$).

Toluidin mavisi boyama metodu uygulanan kesitlerde, mavi renkte boyanan granüler yapılar diyabet grubuna göre daha seyrek dağılımda izlendi (Resim 31).



Resim 31. Diyabet + Quercetin grubu; mavi boyanan granüller seyrek olarak görülmekte (ok). Toluidin mavisi; X100.

TGF- β 1 immün boyama metodu uygulanan kesitlerde, tubüller zayıf immunopozitif reaksiyon gösterdi (Resim 32).

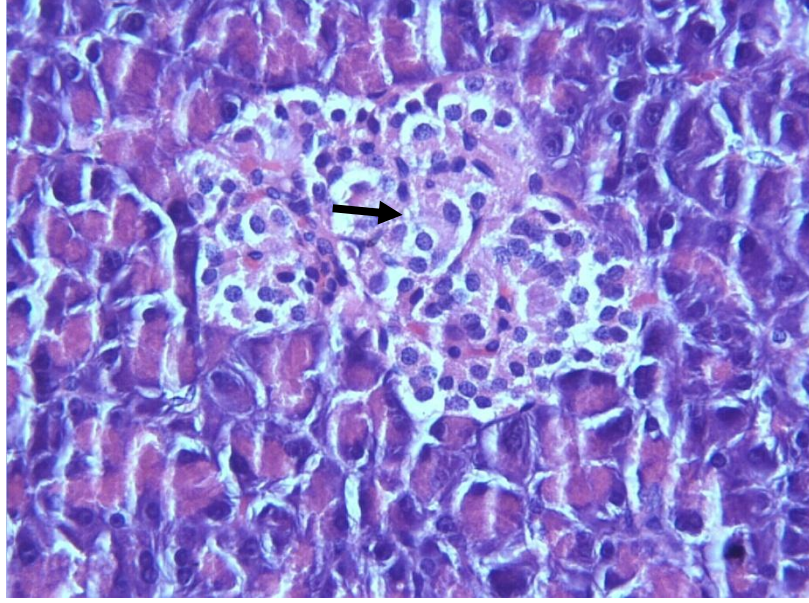


Resim 32. Diyabet + Quercetin grubu; tubüllerde (T) zayıf boyanma dikkat çekmekte. TGF- β 1; X40.

Şiddetli boyanan tubul sayısı açısından diyabet grubu ile karşılaştırıldığında, bu grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede bir azalma saptandı ($p=0.0001$). Diyabet + melatonin grubu ile karşılaştırıldığında ise aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$). TGF- β 1 antikoru ile boyanmayan tubul sayısı 26.14 ± 6.36 , zayıf boyanan tubul sayısı 58.14 ± 4.12 ve şiddetli boyanan tubul sayısı 15.71 ± 1.78 olarak hesaplandı.

4.1.5. Diyabet + Resveratrol grubu

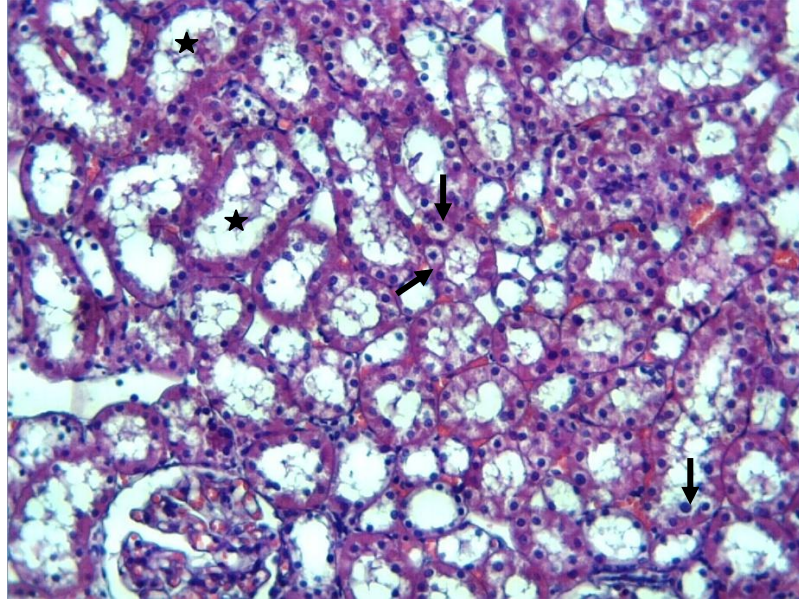
Langerhans adacıklarını oluşturan hücrelerin sitoplazması içinde irili ufaklı vakuoller mevcuttu (Resim 33).



Resim 33. Diyabet + Resveratrol grubu; Langerhans adacıklarındaki bazı hücrelerde vakuoller izlenmekte (ok). H-E; X40.

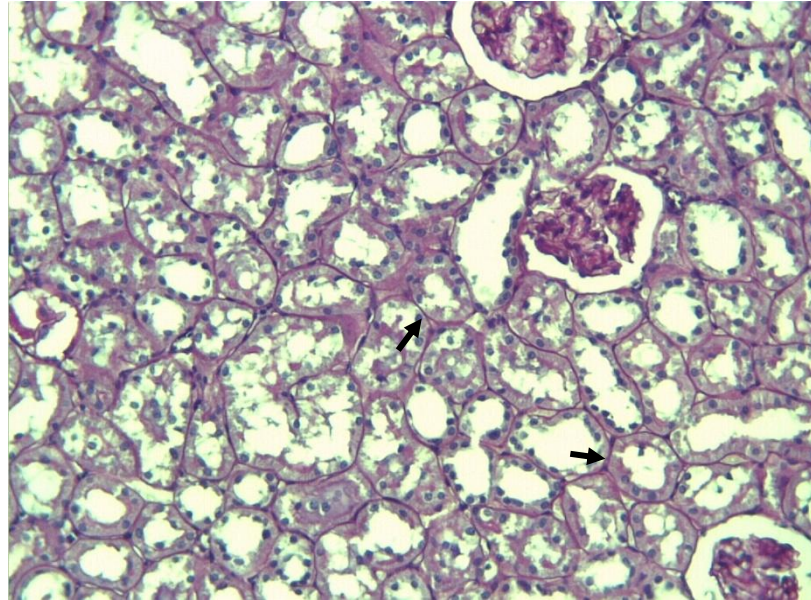
H-E boyama metodu uygulanan kesitlerde, bazı proksimal tubul epitel hücrelerinde dökülme, bazılarında da hidropik değişiklikleri gösteren hücre şişmesi ve soluklaşması izlendi (Resim 34).

Histopatolojik değişikliklerin diyabet grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görüldü ($p=0.0003$). Tedavi uygulanan diyabet grupları içerisinde en yüksek histopatolojik skor (4.42 ± 0.52) bu grupta tespit edilmesine rağmen, melatonin ve quercetin tedavi grupları ile karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).



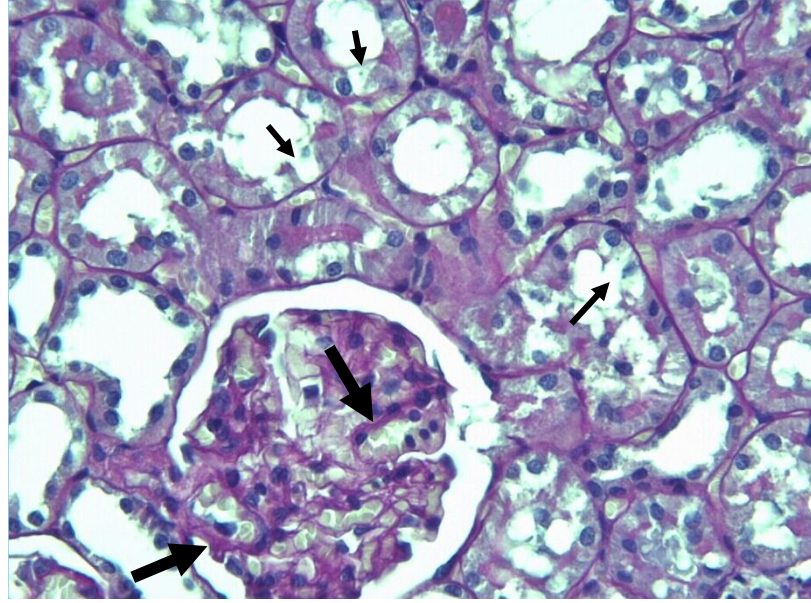
Resim 34. Diyabet + Resveratrol grubu; tubul epitel hücrelerinde dökülme (yıldız) ve şişme izlenmekte (oklar). H-E; X20.

PAS boyama metodu uygulanan kesitlerde; tubul etrafında bazal membran yapıları düzgün sınırlıydı (Resim 35).



Resim 35. Diyabet + Resveratrol grubu; tubul etrafındaki bazal membran düzgün sınırlıydı (oklar). PAS; X20.

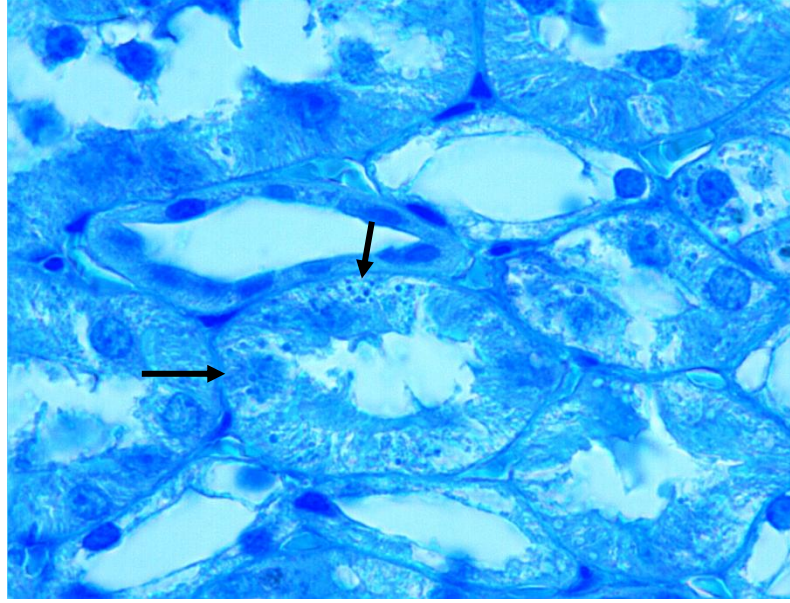
Proksimal tubul epitel hücrelerinde, apikal plazma membranlarının dökülmesine bağlı bazı tubullerde mikrovillus kaybı izlendi. Glomerüllerde ise; en belirgin bulgu diyabet grubunda görülen kapiller bazal membran kalınlaşmasının yer yer devam etmesiydi (Resim 36).



Resim 36. Diyabet + Resveratrol grubu; bazı proksimal tubul hücrelerinin apikalinde mikrovillus kaybı (ince oklar) ve glomerüllerde yer yer bazal membran kalınlaşması (kalın ok) izlenmekte. PAS; X40.

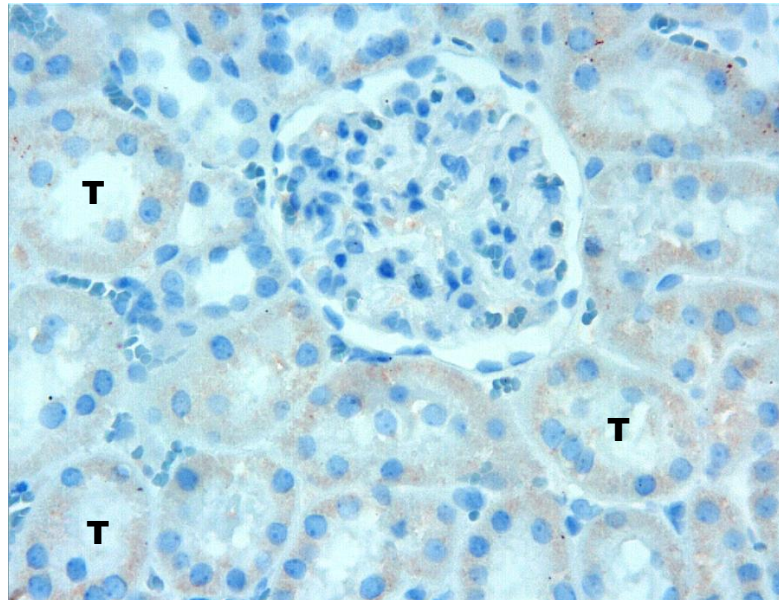
Glomerüloskleroz bulgularına sahip toplam glomerül sayısı 15.00 ± 0.30 olarak tespit edildi. Glomerülosklerozun derecesi diyabet grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldı ($p=0.0066$). Bu grup ile diyabet + melatonin ve diyabet + quercetin grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

Toluidin mavisi boyama metodu uygulanan kesitlerde, proksimal tubul epitel sitoplazmasında izlenen ve mavi renkte boyanan granüler yapıların görünümü diyabet + quercetin benzerdi (Resim 37).



Resim 37. Diyabet + Resveratrol grubu; proksimal tubul epitel sitoplazmasında mavi renkteki granüllerin görünümü (oklar). Toluidin mavisi; X100.

TGF- β 1 immün boyama metodu uygulanan kesitlerde, boyanmayan tubul sayısı 47.14 ± 2.13 , zayıf boyanan tubul sayısı 39.42 ± 2.64 ve şiddetli boyanan tubul sayısı 14.85 ± 2.12 olarak tespit edildi (Resim 38).



Resim 38. Diyabet + Resveratrol grubu; tubullerde (T) zayıf boyanma görülmekte. TGF- β 1; X40.

Tüm gruplara ait toplam histopatolojik hasar skoru tablo 2’de, TGF- β 1 immunopozitiflik skorlaması tablo 3’de ve glomeruloskleroz skorlaması tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 2. Histopatolojik değerlendirme sonuçları

Gruplar (n=7)	Skor ($\bar{X} \pm SE$)
Grup 1: Kontrol	2.00 $\pm$ 0.00
Grup 2: DM	5.85 $\pm$ 0.34
Grup 3: DM + Melatonin	3.71 $\pm$ 0.52
Grup 4: DM + Quercetin	4.28 $\pm$ 0.35
Grup 5: DM + Resveratrol	4.42 $\pm$ 0.52

Tablo 3. TGF- β 1 immunopozitif boyanan tubullerin sayısı

Gruplar (n=7)	0 (Yok) ($\bar{X} \pm SE$)	1 (Zayıf) ($\bar{X} \pm SE$)	2 (Şiddetli) ($\bar{X} \pm SE$)
Grup 1: Kontrol	79.00 $\pm$ 4.04	19.42 $\pm$ 3.43	1.57 $\pm$ 1.26
Grup 2: DM	26.14 $\pm$ 5.22	36.57 $\pm$ 5.02	37.28 $\pm$ 4.28
Grup 3: DM + Melatonin	38.28 $\pm$ 4.92	50.00 $\pm$ 4.34	11.71 $\pm$ 1.10
Grup 4: DM + Quercetin	26.14 $\pm$ 6.36	58.14 $\pm$ 4.12	15.71 $\pm$ 1.78
Grup 5: DM + Resveratrol	47.14 $\pm$ 2.13	39.42 $\pm$ 2.64	14.85 $\pm$ 2.12

Tablo 4. Glomeruloskleroz değerlendirme sonuçları

Gruplar (n=7)	0 (Yok) ($\bar{X} \pm SE$)	1 (Hafif) ($\bar{X} \pm SE$)	2 (Orta) ($\bar{X} \pm SE$)	3 (Şiddetli) ($\bar{X} \pm SE$)	Toplam ($\bar{X} \pm SE$)
Grup 1: Kontrol	3.57 $\pm$ 1.02	13.00 $\pm$ 0.81	3.28 $\pm$ 0.52	0.14 $\pm$ 0.14	16.42 $\pm$ 1.02
Grup 2: DM	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	9.14 $\pm$ 0.55	10.85 $\pm$ 0.55	20.00 $\pm$ 0.00
Grup 3: DM + Melatonin	4.57 $\pm$ 1.21	10.14 $\pm$ 1.10	5.28 $\pm$ 2.02	0.00 $\pm$ 0.00	15.42 $\pm$ 1.21
Grup 4: DM + Quercetin	2.71 $\pm$ 1.20	11.28 $\pm$ 1.08	4.85 $\pm$ 0.63	1.14 $\pm$ 0.55	17.28 $\pm$ 1.20
Grup 5: DM + Resveratrol	5.00 $\pm$ 0.30	10.00 $\pm$ 0.65	4.71 $\pm$ 0.60	0.28 $\pm$ 0.28	15.00 $\pm$ 0.30

4.2. Biyokimyasal bulgular

4.2.1. Kan biyokimyası

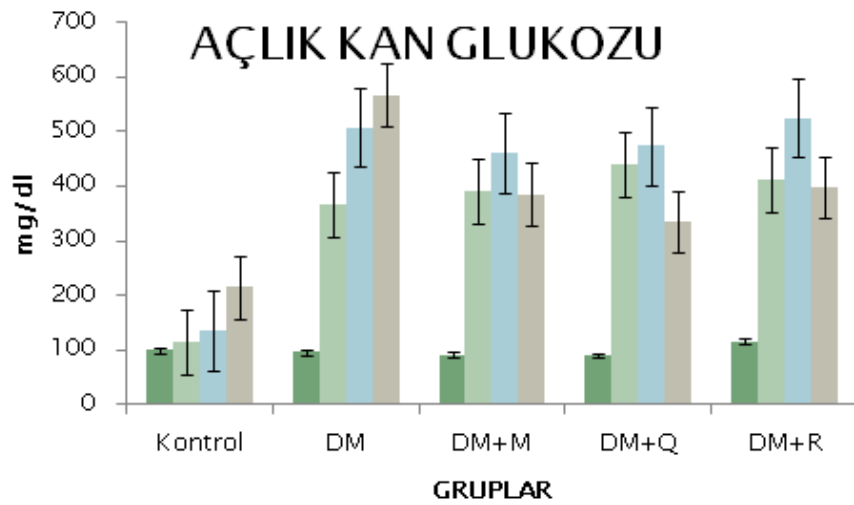
4.2.1.1. Açlık kan glukoz düzeyi (mg/dl)

STZ uygulamasından önce tüm gruplara ait kan glukoz değerleri 94.85 ± 2.93 mg/dl ile 115.71 ± 1.42 mg/dl arasında tespit edildi. STZ uygulaması ile diyabet oluşturulan grupların, 72 saat sonra ölçülen açlık kan glukoz düzeyleri, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttı ($p=0.0001$). Kontrol grubunun 1. gündeki kan glukoz düzeyi 113.14 ± 3.38 mg/dl iken; diyabet grubunun 365.71 ± 10.05 mg/dl olarak ölçüldü. 1. gündeki ortalama kan glukoz değerleri melatonin uygulanan grupta 392.42 ± 17.65 mg/dl, quercetin uygulanan grupta 440.57 ± 30.15 mg/dl ve resveratrol uygulanan grupta 411.14 ± 21.87 mg/dl olarak saptandı. Grupların 15. gündeki kan glukoz düzeyleri karşılaştırıldığında; diyabetik gruba (507.42 ± 75.51 mg/dl) oranla melatonin tedavisi alan grupta (461.28 ± 14.71 mg/dl) istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma tespit edildi ($p=0.0015$). Diyabet grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p>0.05$). Grupların 30. gündeki açlık kan glukoz düzeyleri; diyabet grubunda 568.00 ± 12.93 mg/dl, diyabet + melatonin grubunda 385.71 ± 30.67 mg/dl, diyabet + quercetin grubunda 335.42 ± 9.27 mg/dl ve diyabet + resveratrol grubunda 398.85 ± 24.91 mg/dl olarak ölçüldü. Diyabetik grup ile karşılaştırıldığında tüm tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma saptandı ($p=0.0001$). (Tablo 5) (Grafik 1)

Tablo 5. Gruplararası açlık kan glukoz değerlerinin karşılaştırılması (mg/dl)

Gruplar (n=7)	0.GÜN ($\bar{X} \pm SE$)	1. GÜN ($\bar{X} \pm SE$)	15. GÜN ($\bar{X} \pm SE$)	30. GÜN ($\bar{X} \pm SE$)	1.-30. Günler Arası Fark ($\bar{X} \pm SE$)
Kontrol	94.85 $\pm$ 2.93	113.14 $\pm$ 3.38	135.14 $\pm$ 5.03	214.85 $\pm$ 8.62	120.00 $\pm$ 8.94
DM	95.71 $\pm$ 2.88	365.71 $\pm$ 10.05	507.42 $\pm$ 75.51	568.00 $\pm$ 12.93	472.28 $\pm$ 14.86
DM + Melatonin	90.42 $\pm$ 2.10	392.42 $\pm$ 17.65	461.28 $\pm$ 14.71	385.71 $\pm$ 30.67	295.28 $\pm$ 31.84
DM + Quercetin	89.71 $\pm$ 2.80	440.57 $\pm$ 30.15	473.85 $\pm$ 29.84	335.42 $\pm$ 9.27	245.71 $\pm$ 11.37
DM + Resveratrol	115.71 $\pm$ 1.42	411.14 $\pm$ 21.87	525.71 $\pm$ 19.50	398.85 $\pm$ 24.91	283.14 $\pm$ 25.27

Grafik 1. Grupların açlık kan glukoz seviyeleri



4.2.1.2. BUN düzeyi (mg/dl)

Kontrol grubunun ortalama BUN düzeyi 20.14 ± 0.59 mg/dl iken; diyabet grubunda 42.85 ± 3.12 mg/dl, diyabet + melatonin grubunda 29.28 ± 3.50 mg/dl, diyabet + quercetin grubunda 33.71 ± 2.74 mg/dl ve diyabet + resveratrol grubunda 22.42 ± 2.26 mg/dl olarak ölçüldü. Diyabet grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ($p=0.0001$). Diyabet grubu ile tedavi grupları karşılaştırıldığında; diyabet + melatonin ve diyabet + resveratrol gruplarında istatistiksel olarak anlamlı azalma bir tespit edilirken ($p=0.0001$), diyabet + quercetin grubu ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$). (Tablo 6) (Grafik 2)

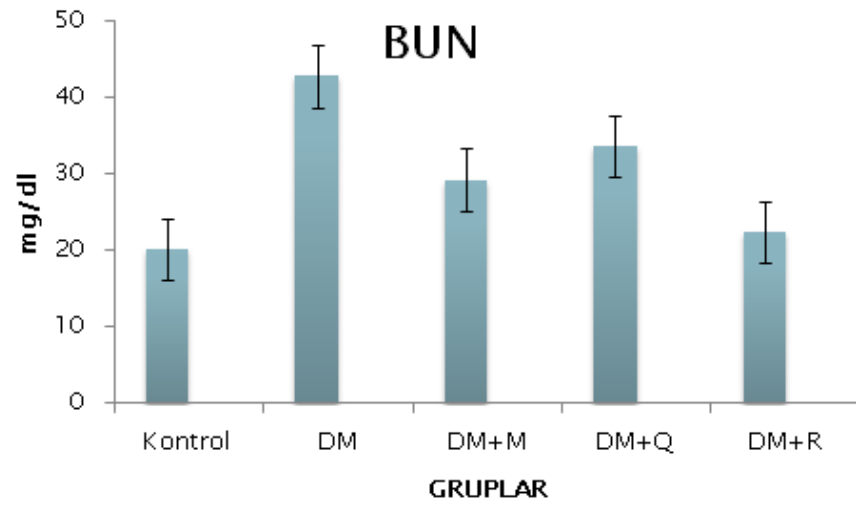
4.2.1.3. Kreatinin düzeyi (mg/dl)

Kontrol grubunun ortalama kan kreatinin düzeyi 0.42 ± 0.02 mg/dl iken; diyabet grubunda 0.48 ± 0.02 mg/dl, diyabet + melatonin grubunda 0.30 ± 0.02 mg/dl, diyabet + quercetin grubunda 0.52 ± 0.03 mg/dl ve diyabet + resveratrol grubunda 0.30 ± 0.04 mg/dl olarak ölçüldü. Kreatinin düzeyi açısından diyabet grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p>0.05$). (Tablo 6) (Grafik 3)

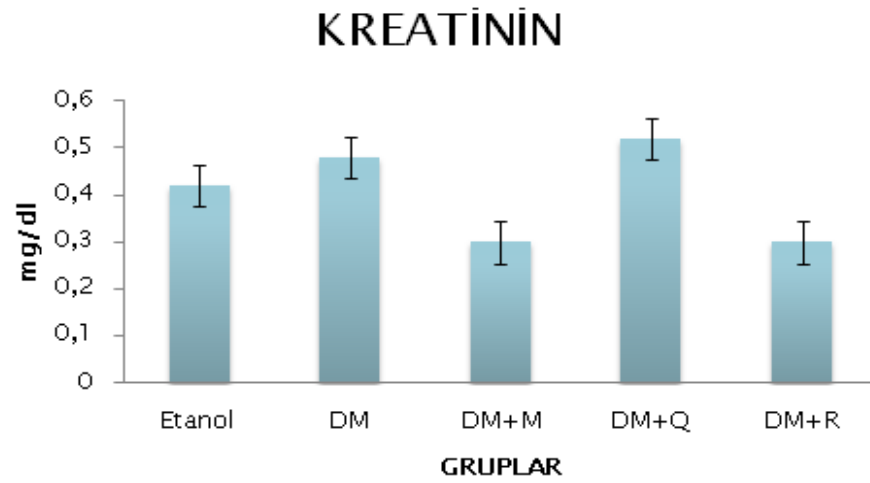
Tablo 6. BUN ve kreatinin yönünden grupların karşılaştırılması (mg/dl)

Gruplar (n=7)	BUN ($\bar{X} \pm SE$)	Kreatinin ($\bar{X} \pm SE$)
Grup 1: Kontrol	20.14 ± 0.59	0.42 ± 0.02
Grup 2: DM	42.85 ± 3.12	0.48 ± 0.02
Grup 3: DM + Melatonin	29.28 ± 3.50	0.30 ± 0.02
Grup 4: DM + Quercetin	33.71 ± 2.74	0.52 ± 0.03
Grup 5: DM + Resveratrol	22.42 ± 2.26	0.30 ± 0.04

Grafik 2. Grupların BUN seviyeleri



Grafik 3. Grupların kan kreatinin seviyeleri



4.2.2. Doku biyokimyası

Kontrol grubunun ortalama doku MDA seviyesi 224.30 ± 12.08 nmol/mg iken, diyabet grubunda MDA seviyesi 300.21 ± 17.09 nmol/mg, diyabet + melatonin grubunda 161.85 ± 8.15 nmol/mg, diyabet + quercetin grubunda 137.31 ± 7.56 nmol/mg ve diyabet + resveratrol grubunda 150.72 ± 8.54 nmol/mg olarak ölçüldü. MDA seviyesi diyabet grubunda kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış olarak bulundu ($p=0.0001$). Diğer yandan tedavi gruplarında MDA seviyesi, diyabet grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştı ($p=0.0001$). Tedavi grupları içerisinde en düşük MDA seviyesi diyabet + quercetin grubunda gözlemlendi.

Kontrol grubunun ortalama doku CAT aktivitesi 80.69 ± 3.90 U/mg iken; diyabet grubunda 46.31 ± 3.50 U/mg, diyabet + melatonin grubunda 58.04 ± 3.35 U/mg, diyabet + quercetin grubunda 63.95 ± 3.84 U/mg ve diyabet + resveratrol grubunda 62.58 ± 4.25 U/mg olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, diyabet grubunun CAT aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görüldü ($p=0.0009$). Tedavi uygulanan gruplarda diyabet grubuna göre CAT aktivitesi yönünden belirgin bir artış izlenirken ($p=0.0009$), tedavi uygulanan grupların birbirleriyle arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

Kontrol grubunun ortalama doku SOD aktivitesi 13.64 ± 0.53 U/mg iken, diyabet grubunun aktivitesi 8.81 ± 0.40 U/mg, diyabet + melatonin grubunda 11.83 ± 0.43 U/mg, diyabet + quercetin grubunda 11.46 ± 0.72 U/mg ve diyabet + resveratrol grubunda 8.43 ± 0.66 U/mg olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, diyabet grubunun SOD aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görüldü ($p=0.0001$). Diyabet grubu ile tedavi grupları karşılaştırıldığında, diyabet + resveratrol grubu dışındaki diğer tedavi gruplarında SOD aktivitesi yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi ($p=0.0001$).

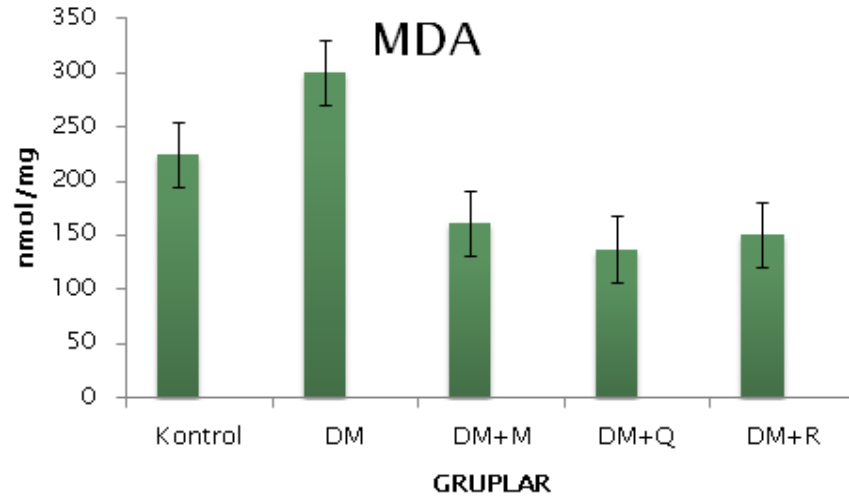
Kontrol grubunun ortalama doku tGSH seviyesi 4.25 ± 0.11 nmol/mg iken, diyabet grubunda 4.79 ± 0.46 nmol/mg, diyabet + melatonin grubunda 5.25 ± 0.44 nmol/mg, diyabet + quercetin grubunda 5.22 ± 0.35 nmol/mg ve diyabet + resveratrol grubunda 5.27 ± 0.29 nmol/mg olarak ölçüldü. Gruplar arasında doku tGSH seviyeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.0562$).

Tüm grupların doku MDA ve tGSH seviyeleri ile CAT ve SOD aktiviteleri Tablo 7’de ve Grafik 4, 5, 6 ve 7’de gösterilmiştir.

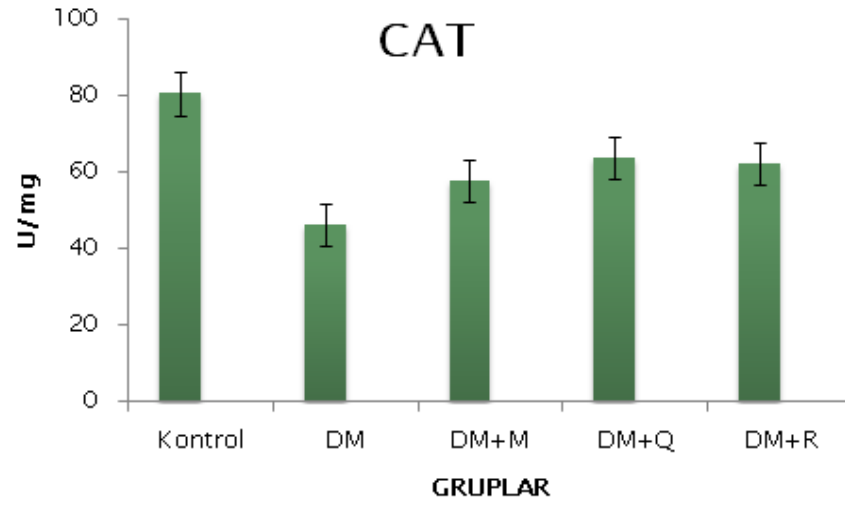
Tablo 7. MDA, CAT, SOD ve tGSH yönünden grupların karşılaştırılması

Gruplar (n=7)	MDA (nmol/mg) ($\bar{X} \pm SE$)	CAT (U/mg) ($\bar{X} \pm SE$)	SOD (U/mg) ($\bar{X} \pm SE$)	tGSH (nmol/mg) ($\bar{X} \pm SE$)
Grup 1: Kontrol	224.30 $\pm$ 12.08	80.69 $\pm$ 3.90	13.64 $\pm$ 0.53	4.25 $\pm$ 0.11
Grup 2: DM	300.21 $\pm$ 17.09	46.31 $\pm$ 3.50	8.81 $\pm$ 0.40	4.79 $\pm$ 0.46
Grup 3: DM + Melatonin	161.85 $\pm$ 8.15	58.04 $\pm$ 3.35	11.83 $\pm$ 0.43	5.25 $\pm$ 0.44
Grup 4: DM + Quercetin	137.31 $\pm$ 7.56	63.95 $\pm$ 3.84	11.46 $\pm$ 0.72	5.22 $\pm$ 0.35
Grup 5: DM + Resveratrol	150.72 $\pm$ 8.54	62.58 $\pm$ 4.25	8.43 $\pm$ 0.66	5.27 $\pm$ 0.29

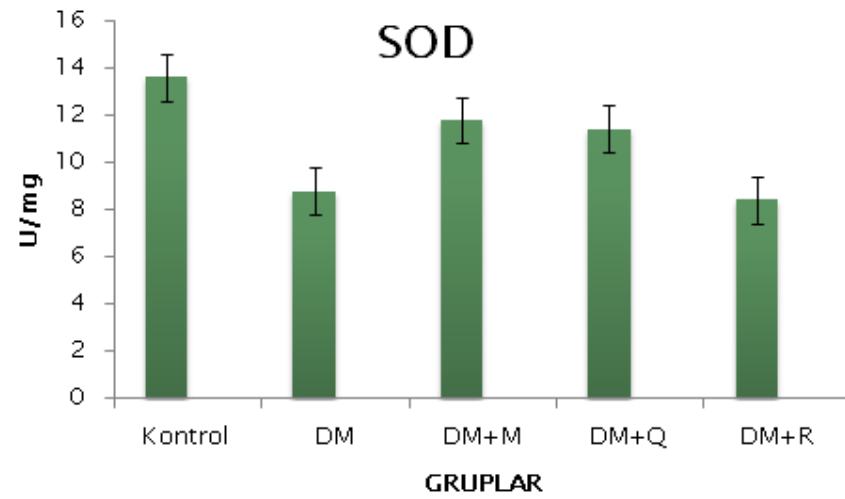
Grafik 4. Grupların MDA düzeyleri



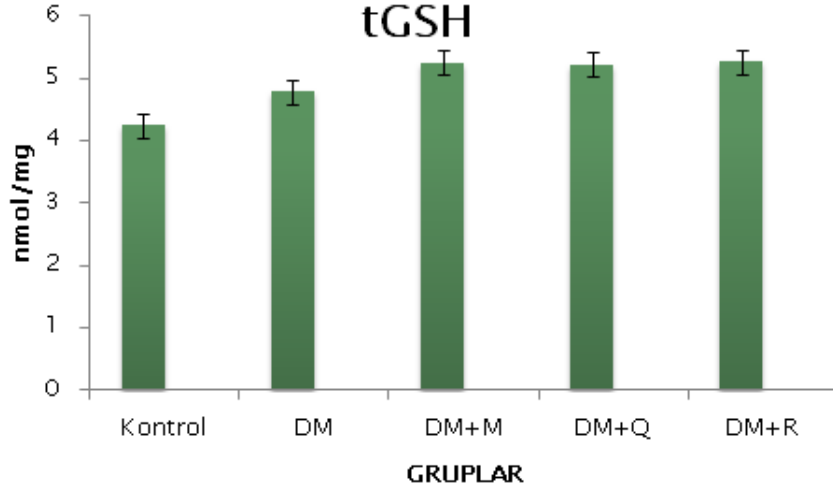
Grafik 5. Grupların CAT aktiviteleri



Grafik 6. Grupların SOD aktiviteleri



Grafik 7. Grupların tGSH düzeyleri



4.3. Ağırlık değerleri

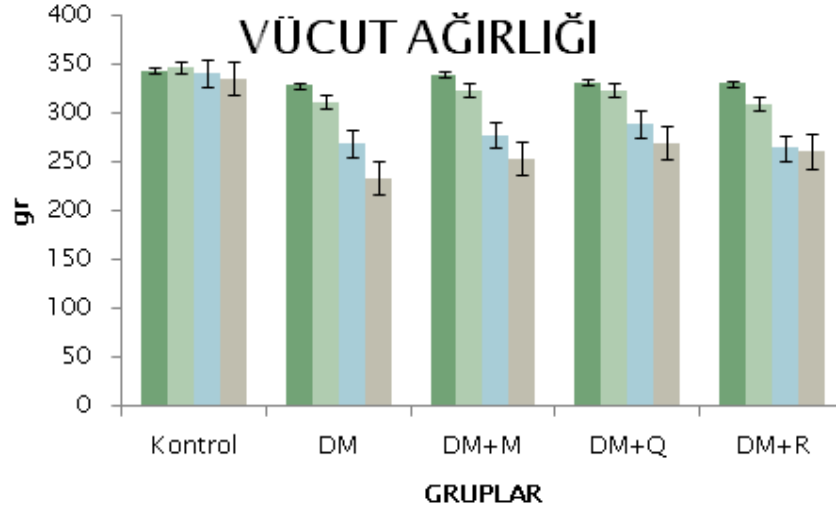
4.3.1. Vücut ağırlığı (gr)

Deneyin 0. ve 1. günündeki vücut ağırlık ölçümleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark yokken, deneyin 15. günündeki vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında, kontrol grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı derecede azalma saptandı ($p=0.007$). Ancak diyabetik grup ve tedavi grupları arasında anlamlı fark bulunmadı. Deneyin 30. günündeki vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında, kontrol grubu ile diğer gruplar arasında ve diyabet grubu ile quercetin ve resveratrol tedavisi alan gruplar arasında anlamlı fark tespit edildi ($p=0.0013$) (Tablo 8) (Grafik 8)

Tablo 8. Gruplararası vücut ağırlık değerlerinin karşılaştırılması

Gruplar (n=7)	0. GÜN (gr) ($\bar{X} \pm SE$)	1. GÜN (gr) ($\bar{X} \pm SE$)	15. GÜN (gr) ($\bar{X} \pm SE$)	30. GÜN (gr) ($\bar{X} \pm SE$)	1.-30. Günler Arası Fark ($\bar{X} \pm SE$)
Kontrol	344.00±8.89	347.85±8.71	341.42±11.16	336.57±11.77	-7.42±16.65
DM	329.42±2.37	312.14±8.06	270.14±5.19	234.42±6.09	-95.00±7.66
DM + Melatonin	340.42±6.90	324.57±7.60	278.57±4.53	254.14±4.86	-86.28±11.17
DM + Quercetin	332.71±6.20	324.42±5.51	289.57±13.90	270.57±13.55	-62.14±9.52
DM + Resveratrol	331.28±5.13	310.57±16.11	264.71±12.61	261.85±9.22	-69.42±10.26

Grafik 8. Grupların vücut ağırlık değerleri



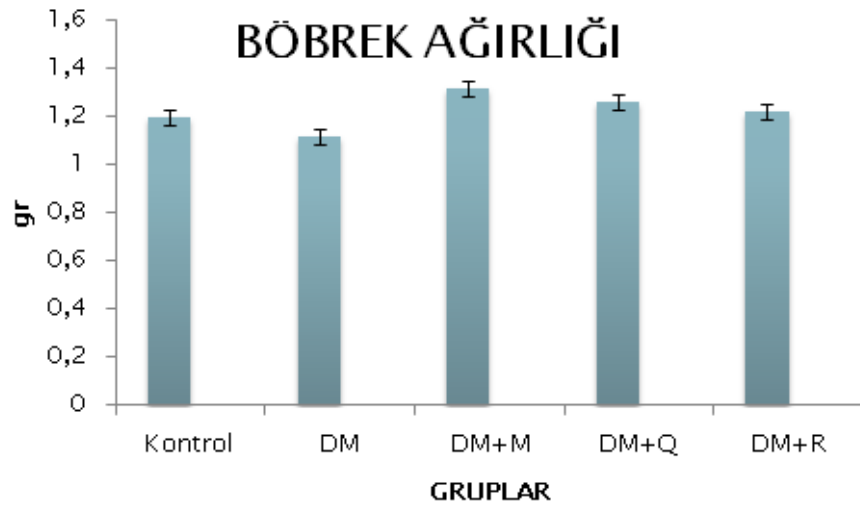
4.3.2. Böbrek ağırlığı (gr)

Gruplar böbrek ağırlıkları açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.062$). Sıçanların böbrek ağırlıkları Tablo 9'da gösterilmiştir.

Tablo 9. Gruplararası böbrek ağırlık değerlerinin karşılaştırılması

Gruplar (n=7)	Böbrek Ağırlığı (gr) ($\bar{X} \pm SE$)
Grup 1: Kontrol	1.20 $\pm$ 0.04
Grup 2: DM	1.12 $\pm$ 0.04
Grup 3: DM + Melatonin	1.32 $\pm$ 0.02
Grup 4: DM + Quercetin	1.26 $\pm$ 0.05
Grup 5: DM + Resveratrol	1.22 $\pm$ 0.13

Grafik 9. Grupların böbrek ağırlık değerleri



5. TARTIŞMA

Diabetes Mellitus (DM) insülin hormon sekresyonu veya insülin etkisinin azlığı sonucu karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluklara yol açan metabolik bir hastalıktır (59, 60, 61). DM'un en sık görülen mikrovasküler komplikasyonu diyabetik nefropatidir (59). Diyabete bağlı görülen nefropatinin patogeneğinde büyüme faktörleri, genetik faktörler, metabolik ve hemodinamik faktörlerin yanısıra (65, 66), artmış oksidatif stresin önemli rol oynadığı bilinmektedir (5). Bu çalışmada; deneysel diyabet oluşturulan sıçanların böbreklerinde meydana gelen hasar üzerine antioksidan özellikleri bilinen melatonin, quercetin ve resveratrol'un tedavi edici etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Diyabete bağlı komplikasyonların tanı ve tedavisindeki yaklaşımların belirlenmesi amacıyla deneysel diyabet modelleri kullanılmaktadır (80). Tip 1 deneysel diyabet modelleri, pankreatik β hücrelerine toksik etkisi olan ajanların verilmesi ile oluşturulmaktadır. Bu amaçla en sık kullanılan kimyasallar alloxan ve STZ'dir. Sıçanlarda deneysel diyabet oluşturmak amacıyla tek doz 40-60 mg/kg STZ intraperitoneal olarak yapılmaktadır (8, 80, 141, 142). Çalışmamızda, *Streptomyces achromogenes*'den izole edilen bir antibiyotik olan STZ'yi tek doz 45 mg/kg olarak kullandık. STZ'nin beta hücrelerinde oluşturduğu hasar sonucu kalıcı bir hiperglisemi gelişmektedir (143). Yaptığımız bu çalışmada, STZ enjeksiyonu uygulanan sıçanlarda, deneyin 3. gününden deneyin sonuna kadar hiperglisemi tablosu izlendi.

STZ, β hücrelerine glikoz taşıyıcısı-2 (GLUT-2) vasıtasıyla girerek, metil-etil gruplarının DNA iskeletindeki fosfatlara bağlanması sonucu DNA alkilasyonuna neden olur (77, 118). Oluşan bu DNA hasarı ADP-ribozilasyonunun aktivasyonuna neden olarak, poly ADP-ribozilasyonu hücrel NAD ve ATP yıkımına yol açar. Yükselmiş ATP defosforilasyonu, ksantin oksidaz için substrat vererek süperoksit radikallerinin ($O^{\cdot}$) oluşumuna yol açar. Oluşan süperoksit radikalleri SOD ile H_2O_2 'ye dönüşerek hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalleri meydana gelir (77). Sonuç olarak; STZ'nin diyabetojenik etkisini β hücrelerinde reaktif oksijen radikallerinin üretimine neden olarak gösterdiği bilinmektedir. Nitekim antioksidan uygulamasının STZ'nin neden olduğu hiperglisemiye azalttığı gözlenmiştir (144-148). Biz de çalışmamızda diyabetik sıçanlara antioksidan özelliği bilinen melatonin, quercetin ve resveratrol tedavilerini uyguladık. Deneyin sonunda tedavi gruplarının kan glikoz değerlerinin diyabet grubuna göre anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi. Bu bulgu diyabetik sıçanlara melatonin (131, 149, 150), quercetin (100, 101, 151, 152) ve resveratrol (127, 129, 153)

gibi antioksidanların verilmesi ile kan glikoz değerlerinin düştüğünü bildiren diğer çalışmalar ile uyumludur.

Kısa ve uzun süreli deneysel diyabet çalışmalarında, diyabetik sıçanların vücut ağırlık düzeylerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma olduğu bildirilmiştir (106, 131, 135, 145, 147, 152, 154-161). Bu çalışmada da diyabet grubundaki sıçanların, kontrol grubundaki sıçanlara göre belirgin oranda kilo kaybettiğini tespit ettik. Diğer yandan Güneli ve ark. (162) ve Andallu ve ark. (163) ise serbest radikal süpürücü özellikteki doğal ya da kimyasal ajanların, diyabetik sıçanlarda kilo kaybını önlediğini bildirmişlerdir. Biz de çalışmamızda antioksidan tedavisi verilen diyabetik sıçanların, tedavisiz diyabetik sıçanlara göre daha az miktarda kilo kaybettiğini tespit ettik. Yapılan çalışmalara göre; diyabetik sıçanlarda izlenen vücut ağırlık kaybı hiperglisemik duruma bağlı olarak oluşan doku proteinlerinin aşırı yıkımı sonucu meydana gelen kas kaybına bağlanmıştır (163). Antioksidan tedavisi ile vücut ağırlık kaybındaki azalmanın diyabet grubuna göre daha az miktarda gerçekleşmesi, muhtemelen hipergliseminin kontrol altına alınması ve bu şekilde yıkımın azalması nedeniyle olabilir.

Deneysel diyabet modelleri kullanılarak yapılan çalışmalarda, böbrek ağırlıkları açısından elde edilen bilgiler birbiri ile uyumlu değildir. Coldiron ve ark. (106) diyabette böbrek ağırlıklarında azalma rapor ederken, Garman ve ark. (145) ise belirgin bir artış bildirilmiştir. Teoh ve ark. (164) ise diyabette böbrek ağırlıkları açısından kontrol grubuna göre belirgin bir fark olmadığını tespit etmiştir. Bu çalışmada gruplar arasında böbrek ağırlıkları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi.

Diyabetik nefropatideki histopatolojik hasar böbreğin tamamında görülmekle birlikte, en karakteristik değişiklikler glomerüllerde meydana gelmektedir (165). Kapiller bazal membran kalınlaşması, diffüz ve nodüler glomeruloskleroz izlenen en belirgin glomerüler lezyonlardır. Diffüz glomeruloskleroz, mezengial hücre proliferasyonu ile birlikte mezangial matrikste diffüz artış ile karakterizedir (60, 62, 67, 166). Çalışmamızda, diyabetik grubun PAS boyaması yapılan böbrek dokuları incelendiğinde, birçok glomerülde diffüz mezengial matriks artışı ve kapiller bazal membran kalınlaşması ile karakterize sklerotik glomerüllere ve tubuler bazal kalınlaşmalarına rastladık. Eddy ve ark. (167), diyabetik böbrek hastalıklarının patolojisinde glomerüler ve tubuler bazal membran kalınlaşmasının birbiri ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. In vitro çalışmalar yüksek glukoz konsantrasyonuna maruz

birakılan glomeruler mezengial ve tubuler epitel hücrelerinde, proteoglikan, decorin, fibronektin, tip-4 kollajen ve laminin gibi ekstrasellüler matriks (ECM) proteinlerinin sentezini arttıran TGF- β ekspresyonunu göstermiştir. Üstelik eksprese olan TGF- β , kollajenaz üretimini inhibe eder ve dokuda metalloproteinaz inhibitörlerinin üretimini arttırır. Böylece TGF- β her iki yoldan ECM'in degradasyonunu önleyerek diyabetik glomerül ve tubul bazal membranlarında ECM proteinlerinin birikimine neden olmaktadır (168). Çalışmamızda, tubul bazal membranlarındaki kalınlaşma dışında tubul epitel hücrelerinde mikrovillus kaybı, tubul lümeninde epitelyal döküntüler, peritubuler inflamasyon, tubul epitel hücrelerinde şişme ve glikojenik vakuoller tespit ettik. Vardı ve ark. (131, 144), Tunçdemir ve ark. (169, 170), Doğan ve ark. (171) ve yapılan diğer çalışmalarda (155, 157, 161, 172-175), bizim gözlemlediğimiz histopatolojik değişikliklere benzer bulgular rapor etmişlerdir. Diğer yandan çalışmamızda melatonin, quercetin ve resveratrol verilen tedavi gruplarında glomerüller ve tubuler değişiklikler diyabetik gruba göre hafiflemiş olarak izlendi. Resveratrolün STZ'nin neden olduğu diyabetik nefropati üzerindeki iyileştirici etkileri, bu maddenin hipoglisemik, antioksidatif, antiinflamatuvar ve adenosin monofosfat aktive protein kinaz (AMPK) düzenleyici özelliklerine bağlanmıştır. (AMPK, son yıllarda diyabetik nefropati üzerinde önemli bir rol oynadığı düşünülen hücresel enerji homeostazisini düzenleyen bir moleküldür) (153). Chang ve ark. (153) diyabetik sıçanlara uyguladıkları resveratrol tedavisinin hiperglisemi ve renal disfonksiyonu belirgin derecede düzelttiğini bildirmiştir. Quercetin, oksijen ve hidroksil radikallerini süpürmesi ve ksantin oksidaz aracılığıyla süperoksit radikallerini inhibe etme özellikleriyle güçlü bir antioksidandır (101, 110, 111). Mahesh ve ark. (151) ve Edremitlioğlu ve ark. (176) diyabete bağlı oluşan oksidatif stresin quercetin ile önlendiğini rapor etmişlerdir. Quercetin verilmesi ile görülen iyileştirici etkiler, oksidatif stresin azalması ve pankreatik beta hücre bütünlüğünün korunmasına bağlanmıştır. Vessal ve ark. (101) ise quercetin pankreastaki Langerhans adacıklarının sayısında artışa neden olduğunu bildirmiştir. Böylece insülin salınımında da belirgin artış meydana gelmekte ve plazma glikoz düzeyi quercetin tedavisiyle bir miktar azalmaktadır. Pineal bezin temel sekresyon ürünü olan melatonin serbest radikalleri süpürmesi ve antioksidan enzimleri stimüle etmesi ile güçlü bir antioksidandır. Cam ve ark. (177), STZ ile oluşturulan diyabetik rat modelinde kronik melatonin uygulamasının renal hasarı azalttığını bildirmiştir. Böbrek gibi glikoz girişi insüline bağımlı olmayan dokularda, kan-glikoz konsantrasyonu yükseldiğinde normalde aktif olmayan aldoz redüktaz yolu işlerlik

kazanarak, sorbitol oluşumuna neden olur. Sorbitol plazma membranından diffüze olamadığından, hücre içinde birikir ve hücre membran bütünlüğünü bozar. Ayrıca osmotik etki yaparak hücrenin su alıp şişmesine neden olur. Hücrenin şişmesi de morfolojik ve fonksiyonel yapı değişikliklerini de beraberinde getirir (178). Melatonin diyabetle ortaya çıkan hidropik değişiklikleri önlemesi, onun hücre membranını stabilize etme ve yüksek lipofilikliği sayesinde hücrenin tüm komponentlerini hasardan koruyabilme özelliği ile ilgili olabilir.

Çalışmamızda dikkat çekici diğer bir bulgu; toluidin mavisi ile boyanmış kesitlerde, tubul hücrelerinde intrastoplazmik olarak yer alan farklı irilikte taneciklerin izlenmesiydi. Yakan ve ark. (179) ve Vardı ve ark. (144), diyabetik sıçanlara ait kesitlerde gözledikleri bu iri, globüler ve heterojen yoğunluktaki yapıların lizozomlar olabileceğini düşünmüşlerdir. Ayrıca uzamış hiperglisemiye bağlı, fazla miktardaki glikojenin eliminasyonuna yönelik sayılarının artmış olabileceğini rapor etmişlerdir. Diğer yandan plazmada glikoz seviyesinin yükselmesi, protein ve peptidlerin glikozilasyonuna yol açarak, ilerlemiş glikozilasyon son ürünlerine dönüşür. Gugliucci ve ark. (178), glomerüller tarafından filtre edilen AGE peptidlerinin, proksimal tubullerde endolizozomal sistem tarafından metabolize edildiğini bildirmiştir. Bu şekilde AGE peptidleri ile yüklenen tubuler lizozomların yoğunlukları artmış olabilir. Ayrıca; Osicka ve ark. (180) diyabette sülfataz, Teschner ve ark. (181) da katepsin ve metalloproteinaz gibi renal lizozomal enzim aktivitelerinin önemli derecede azaldığını bildirmişlerdir. Diyabette hem AGE peptidlerinin proksimal tubullerden endositozu, hem de lizozomal aktivitenin düşmesi alınan materyallerin lizozomlar içinde birikip, yoğunluklarının artmasına neden olmuş olabilir.

Çalışmamızda, glomerül ve tubullerdeki TGF- β 1 immunreaktivitesi araştırıldı. TGF- β , böbreğin farklı hücre tiplerinde üretilen, mezangiyal ve epitelyal hücrelerden ECM sentezini uyaran önemli bir büyüme faktörüdür (182-185). Ayrıca TGF- β , metalloproteinaz gibi degradasyonu katalize eden enzimleri inhibe ederek, ECM komponentlerinin depolanmasını ve sentezini arttırmaktadır. Aynı zamanda da matriks yıkımını azaltarak ECM birikimini uyarmaktadır (186, 187). Bu çalışmada, diyabetik gruba ait böbrek kesitlerinde proksimal tubullerde TGF- β 1 immunpozitifliği şiddetli olarak gözlenirken, glomerüllerde zayıf boyandı. Rocco ve ark. (188), yüksek glukoz konsantrasyonunun proksimal tubul epitel hücrelerinde TGF- β ekspresyonunu arttırdığını bildirmiştir. Diğer bir çalışmada (185), akut fazdaki diyabetik sıçanlarda glomerül ve tubullerde zayıf immunpozitiflik izlenirken, kronik fazda arttığı tespit

edilmiştir. Diyabette TGF- β sentezinin artışında ROS'lerinin anahtar rol oynadığı bilinmektedir (143, 166, 189). Nitekim ROS, NF-kB aracılığıyla büyüme faktörleri ve TGF- β gibi sitokinlerin uyarılmasına yol açmaktadır (190, 191).

Çalışmamızda diyabetik sıçanlara melatonin, quercetin ve resveratrol verilmesi proksimal tubullerdeki TGF- β 1 boyanma şiddetini azalttı. Ha ve ark. (192), deneysel diyabet oluşturulan sıçanların böbrek dokusunda, kontrollere göre 1.4 kat artan TGF- β mRNA seviyesinin, melatonin ile etkili şekilde azaldığını bildirmişlerdir. Diğer bir çalışmada (193) antioksidan özelliği bilinen vitamin E' nin diyabetik sıçanlarda TGF- β artışını önleyerek, glomerüler filtrasyonu düzelttiği rapor edilmiştir. Studer ve ark. (194), yüksek glikoza cevap olarak artan TGF- β sentezinin, vitamin E ve taurin gibi antioksidanlarla süprese edilmesinde, bu antioksidanların hücrelerdeki oksidan seviyesini düşürmesi ve oksidasyondan kaynaklanan reaktif protein sülfidrillerinden korumasının rolü olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, sıçanların böbrek fonksiyonları BUN ve kreatinin ölçümleri ile değerlendirildi. BUN ve kreatinin, böbreklerden atılan metabolik artık ürünlerdir. Böbrek hastalıklarında, protein yıkımının göstergesi olan üre ile kas yıkımın göstergesi olan kreatininin kandaki seviyeleri artmaktadır (195). Lu ve ark. (146), diyabette BUN ve kreatinin düzeylerinin arttığını bildirmiştir. Diğer yandan, Choi ve ark. (157), serum kreatinin ve BUN düzeyinin diyabet gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstermediğini rapor etmiştir. Bu çalışmada, diyabet grubunda BUN düzeyinin kontrole göre arttığını ancak, serum kreatinin düzeyinde anlamlı bir artış olmadığı tespit edildi. Deneysel diyabet modellerinde bozulan böbrek fonksiyonlarının antioksidan ajanların verilmesi ile düzeldiği birçok çalışmada bildirilmiştir (146, 148). Abo-Salem ve ark. (148), antioksidan özelliği bilinen propolis ekstraktlarını farklı dozlarda diyabetik sıçanlara uygulamış ve diyabetle birlikte artan serum BUN ve kreatinin düzeylerinde doza bağımlı olarak önemli bir azalma olduğunu rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da melatonin, quercetin ve resveratrol verilen gruplarda BUN düzeyinin diyabet grubuna göre azaldığı gözlemlendi.

Bu çalışmada, antioksidan değişiklikleri değerlendirmek için böbrek dokusundaki SOD ve CAT aktiviteleri ile MDA ve tGSH seviyeleri ölçüldü. Diyabet grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MDA içeriğinin arttığı, SOD ve CAT aktivitelerinin azaldığı gözlemlendi. Benzer sonuçlar, Obrosova ve ark. (156) ve Kataya ve ark. (196) tarafından da bildirilmiştir. Hipergliseminin; glikolizisin artması, intrasellüler sorbitol (polyol) yolunun aktivasyonu, glikoz oto-oksidasyonu ve non-enzimatik

glikolizasyon gibi 4 farklı yolla serbest radikal oluşumunu arttırdığı bilinmektedir. Glikoz, reaktif ketoaldehit ve süperoksit radikallerine okside olur. Süperoksit anyonları SOD ve H_2O_2 'ye dönüşür. Eğer CAT veya Glutasyon peroksidaz (GPx) ile parçalanmazsa reaktif hidroksil radikallerinin oluşumuna yol açar. Hücrede ROR'un kontrolü, enzimatik (SOD, CAT)) antioksidanlardan oluşan savunma sistemi tarafından düzenlenir. Aşırı miktarda ortaya çıkan serbest radikaller hücresel proteinlere ve nükleik asitlere bağlanarak zarar verir (197). Ayrıca membrandaki düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) lipid peroksidasyonunu artırır. MDA dokularda lipid peroksidasyonunu göstermek için kullanılan en yaygın parametredir. MDA seviyelerinde yükselme, serbest radikaller tarafından oluşturulan hücre membran hasarını göstermektedir. MDA seviyesinde yükselme ile SOD ve CAT aktivitelerinde azalma oksidatif stresin artması anlamına gelmektedir (198).

Çalışmamızda melatonin, quercetin ve resveratrol uygulamalarının, lipid peroksidasyonunu düşürüp, SOD ve CAT aktivilerini yükselterek diyabetin neden olduğu oksidatif stresi belirgin olarak önlediği gözlemlendi. Melatoninin önemli fonksiyonlarından biri; oksijen metabolizması sonucu oluşan serbest radikalleri süpürerek, membran proteinleri ve DNA'yı serbest radikallerin sebep olduğu hasara karşı korumaktır. Bu nedenle melatoninin diyabet gibi serbest radikal ile ilişkili hastalıklarda önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir (199). Cam ve ark. (177), STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlarda melatonin tedavisinin böbrek dokusunda lipid peroksidasyonunu düşürdüğü ve böylece diyabetik nefropatinin özellikleri olarak bilinen glomerüler bazal membran kalınlaşması ve mezengial matriks artışını inhibe ettiğini bildirmiştir.

Flavonoid ailesinin bir üyesi olan quercetin, aromatik hidroksil gruplarının varlığı sebebiyle güçlü antioksidan özelliklere sahiptir. Reaktif oksijen ve nitrojen türlerini yakalar ve peroksidasyon reaksiyonlarını inhibe eder (101). Ayrıca ksantin oksidaz aracılığıyla süperoksit anyon üretimini engeller (110). Edremitlioğlu ve ark. (176), deneysel diyabet modeli oluşturdukları sıçanlarda quercetin tedavisinin lipid peroksidasyonu göstergesi olan MDA'yı düşürdüğü, antioksidan enzim kapasitesini arttırdığı ve böylece oksidatif hasarı önemli ölçüde düşürdüğünü bildirmişlerdir.

Antioksidan özelliği bilinen resveratrol ise, hem süperoksit hem de hidroksil radikallerini yakalar ve antioksidanların hücre içi konsantrasyonlarının sürdürülmesini sağlar (118). Lu-jia ve ark. (200), resveratrolün diyabetik sıçanların böbrek korteksinde

belirgin olarak MDA içeriğini azalttığı, SOD aktivitesini ise arttırdığını rapor etmişlerdir.

Melatonin, quercetin ve resveratrol verilmesiyle, nefropati gibi diyabetik komplikasyonların hafiflemesinde, bu ajanların ortak özelliği olan serbest radikal oluşumu ve lipid peroksidasyonunu engellemesi ve antioksidan enzim kapasitesi üzerindeki olumlu etkilerinin rolü olduğunu düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmanın sonucunda, STZ ile oluşturulan deneysel diyabetik nefropatinin, sıçan böbrek tubullerinde dökülmeye, tubul hücrelerinde şişmeye, peritubuler infiltrasyona ve glomerullerde skleroza neden olduğu gözlemlendi. Ayrıca biyokimyasal analizlerde, MDA seviyesinde artış ve SOD ve CAT aktivelerinde azalma saptandı.

Diğer yandan, antioksidan özellikleri bilinen melatonin, quercetin ve resveratrolün diyabetin neden böbrek hasarını azalttığı gözlemlendi. Bu antioksidan ajanlar birbirleriyle karşılaştırıldığında; melatonin histolojik yapının korunmasında, quercetin açlık kan glukoz seviyesi ve MDA düzeyinin azalmasında, resveratrol ise böbrek fonksiyonlarının düzelmesinde daha etkili bulunmuştur.

Sonuç olarak bu çalışma, kronik melatonin, quercetin ve resveratrol uygulamalarının, STZ ile oluşturulan diyabetin neden olduğu böbrek hasarını hafiflettiğini göstermektedir. Serbest radikal süpürücü olan melatonin, quercetin ve resveratrolün, diyabetik komplikasyonları önlemede antioksidan özelliğinin etkili olabileceğini ve yeni tedavi protokolleri oluşturulurken bu ajanlardan da yararlanılabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Crawford JM, Cotran RS. The Pancreas. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T. Eds. Pathologic Basis of Disease. USA: WB. Saunders Company. 1999;913-20.
2. Baynes JW, Thorpe SR. Role of Oxidative Stress in Diabetic Complications: A New Perspective on An Old Paradigm. Diabetes 1999;48:1-9.
3. Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV. Protein Glycation and Oxidative Stress in Diabetes Mellitus and Ageing. Free Radic Biol Med 1991;10:339-52.
4. Armagan A, Uz E, Yilmaz HR, Soyupek S, Oksay T, Ozcelik N. Effects of Melatonin on Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Testis. Asian J Androl 2006;8(5):595-600.
5. Liptakova A, Carsky J, Ulicna O, Vancova O, Bazek P et al. Influence of β -Resorcylic Acid Aminoguanidine on Selected Metabolic Parameters and Antioxidant Status of Rats with Diabetes Mellitus. Physiol Res 2002;51:277-84.
6. Agardh CD, Stenram U, Torffvitt O, Agardh E. Effects of Inhibition of Glycation and Oxidative Stress on the Development of Diabetic Nephropathy in Rats. Journal of Diabetes and Its Complications 2002;16:395-400.
7. Ritz E, Rychlik I. Nephropathy in Type 2 Diabetes. Oxford Press, Oxford. 1999;45-6.
8. Maiti R, Janav D, Das UK. Antidiabetic Effect of Aqueous Extract of Seed of Tamarindus Indica in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. J Ethnopharm. 2004;92:85-91
9. Adewole SO, Caxton-Martins EA, Ojewole JAO. Protective Effect of Quercetin on The Morphology of Pancreatic Beta-Cells of Streptozotocin-Treated Diabetic Rats. Afr. J Trad CAM , 2007;4(1):64-74.
10. Li Y, Cao Z, Zhu H. Upregulation of Endogenous Antioxidants and Phase 2 Enzymes by the Red Wine Polyphenol, Resveratrol in Cultured Aortic Smooth Muscle Cells Leads to Cytoprotection Against Oxidative and Electrophilic Stress. Pharmacol Res. 2006;53:6-15.
11. de la Lastra CA, Villegas I. Resveratrol as an Antioxidant and Pro-oxidant Agent: Mechanisms and Clinical Implications. Biochem Soc Trans 2007;35:1156-60.

12. Tan D-X, Reiter RJ, Manchester KC et al. Chemical and Physical Properties and Potential Mechanism: Melatonin as a Broad Spectrum Antioxidant and Free Radical Scavenger. *Curr Top Med Chem* 2002;2(2):181-97.
13. Vijayalaxmi TCR, Reiter RJ, Herman TS. Melatonin: From Basic Research to Cancer Treatment Clinics. *J of Cli Onco* 2002;20(10):2575- 601.
14. Afanas'ev IB, Dorozhko AI, Brodskii AV, Kostyuk VA, Potapovitch AI. Chelating and Free Radical Scavenging Mechanisms of Inhibitory Action of Rutin and Quercetin in Lipid Peroxidation. *Biochem Pharmacol* 1989;38:1763-9.
15. Candlish JK, Das NP. Antioxidants in Food and Chronic Degenerative Diseases. *Biomed Environ Sci* 1996;9:117-23.
16. Arıncı K. Anatomi; 1. Cilt. Güneş Kitabevi. 2001;311-5.
17. Unur E, Ülger H, Ekinci N. Anatomi. Medical Kitabevi, Kayseri. 2005,162-4.
18. Parkın I, Logan BM, Mc Carthy MJ. Core Anatomy Illustrated. Hodder Arnold Hodder Headline Group. 2007; 98.
19. University of Maryland Medical Center. A.D.A.M Medical Images. (Erişim tarihi: 28.05.2012). <http://www.umm.edu/imagepages/1101.html>
20. Drake RL, Vagl W, Mitchell AWM. (ed) Yıldırım M. Gray's Anatomi. Güneş Kitabevi. 2007; 320-4.
21. Moore KL, Dalley AF. (ed) Şahinoğlu K. Kliniğe Yönelik Anatomi, 4. Baskı. Nobel Tıp Kitabevi. 2007;279-82, 286-8.
22. Tortora GJ, Derrickson B. Principles Of Anatomy and Physiology, 12. Edition. John Wiley&Sons. 2009;1020-2.
23. Schrier RW. Diseases of the Kidney and Urinary Tract, Volume 1, 8. Edition. Lippincott Williams and Wilkins. 2007; 2.
24. Deshmukh SR, Wong NWK. The Renal System Explained. Nottingham University Press. 2009; 43-7, 49-50.
25. Yıldırım M. Topografik Anatomi. 2004;258-62.
26. Sinnatamby CS. Last's Anatomy Regional and Appilied, 11. Edition. Elsevier Limited. 2006;293-5.
27. Erek E. Erek Nefroloji, 5. Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri. 2005;31.
28. Hasslacher C, Böhm S. Diabetes and the Kidney. Wiley. 2004;5.
29. Guyton AC, Hall JE. (ed) Çavuşoğlu H, Yeğen BÇ, Aydın Z, Alican İ. Tıbbi Fizyoloji, 11. Basım. Nobel Kitabevi. 2007;308-9.

30. Fogo AB, Cohen AH, Jennette JC, Bruijn JA, Colvin RB. Fundamentals of Renal Pathology. Springer. 2006;1-8.
31. Vize PD, Woolf AS, Bard JBL. The Kidney from Normal Development Congenital Disease. Elsevier Science. 2003;149-54.
32. Saladin: Human Anatomy, 4.maintenance. McGraw Hill Companies. 2004;709-10.
33. Haschek WM, Wallig MA, Rousseaux C. Fundamentals of Toxicologic Pathology, 2. Edition. Elsevier Inc. 2010; 262-4.
34. Mimura I, Nangaku M. The Suffocating Kidney: Tubulointerstitial Hypoxia in End-Stage Renal Disease. Nature Reviews Nephrology 2010;6:667-78. (Erişim tarihi:28.05.2012)http://www.nature.com/nrneph/journal/v6/n11/fig_tab/nrneph.2010.124_F2.html.
35. O'Callaghan CA, Brenner BM. The Kidney at a Glance. Blackwell science Ltd. 2000;13.
36. Sadler TW. Çeviri: Başaklar AC. Langman's Medikal Embriyoloji; 9. Baskı. Palme Yayıncılık. 2005;313-25.
37. Kayalı H, Şatıroğlu G, Taşyürekli M. İnsan Embriyoloji; 6. Baskı. Evrim Basım-Yayım-Dağıtım. 1989;196-205.
38. Moore KL, Persaud TVN. Çeviri Editörleri: Dalçık H, Yıldırım M. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi; 8. Baskıdan çeviri. Nobel Tıp Kitabevleri. 2009;244-50.
39. Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH. Larsen's Human Embryology; 4. Edition. Churchill Livingstone. 2009;483-95.
40. Seçkin İ, Ertürkoğlu AŞ, Taşyürekli M, Arda O, Alkan F, Oktar H. Embriyoloji Ders Kitabı. İstanbul Üniversitesi Yayınları. 2008;215-20.
41. Şeftalioğlu A. Genel/Özel İnsan Embriyolojisi; 3.Baskı. Tıp/Teknik Yayıncılık. 1998;328-36.
42. Brenner BM. Brenner&Rector's The Kidney. Volume 1; 8. Edition. Saunderson-Elsevier. 2008;3-7,19-21.
43. Petorak İ. Medikal Embriyoloji; 2. Baskı. Beta Basım-Yayım-Dağıtım. 1986;212-9.
44. Massary SG, Glassock RJ. Massary&Glassock's Textbook of Nephrology. Volume 1; 3. Edition. Williams&Wilkins, 1995;3-10.

45. Peterson RO, Sesterhenn IA, Davis CJ. Urologic Pathology; 3. Edition. Lippincott Williams&Wilkins. 2009;1.
46. Smith CPW, Williams PL, Treadgold S. Basic Human Embryology; 3. Edition, Pitman. 1984;94.
47. Embryogenesis of the Kidney and Ureters. McGraw-Hill's Access Surgery, Fig. 23-2, Modified from Moore KL, Persaud TVN. The Developing Human. Clinically Oriented Embryology (6th ed). Philadelphia: WB Saunders 1998; with permission. (Erişim tarihi: 28.05.2012)
[http://hasustorm.com/books/English/Mcgraw.Hill.Surgical.Anatomy.J.Skandala.kis.\(2004\).Ww.chm/Chapter%2023_%20Kidneys%20and%20Ureters.html](http://hasustorm.com/books/English/Mcgraw.Hill.Surgical.Anatomy.J.Skandala.kis.(2004).Ww.chm/Chapter%2023_%20Kidneys%20and%20Ureters.html)
48. Embryology Learning Resources. Duke University Medical School, Urogenital Development. (Erişim tarihi: 28.05.2012).
<http://www.duke.edu/web/anatomy/embryology/urogenital/urogenital.html>
49. Interactive Biology. Embryology of the Kidney. (Erişim tarihi: 28.05.2012).
<http://www.interactive-biology.com/3695/embryology-of-the-kidney/>
50. Ovalle WK, Nahirney PC, (ed) Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P. Netter's Essential Histology. Güneş Tıp Kitabevleri. 2009;354-370.
51. Gartner LP, Hiatt TL. Color Textbook of Histology, 3. Edition. Saunders Elsevier. 2007;437-459.
52. Ross MH, Pawlina W. Histology A Text and Atlas, 5. Edition. Lippincott Williams and Wilkins. 648-667.
53. Junqueira LC, Carneiro J, (ed) Solakoğlu S, Aytekin Y. Temel Histoloji. Nobel Tıp Kitabevleri. 2009;373-88.
54. Fawcett DW. Bloom and Fawcett A Textbook of Histology, 11. Edition. W. B. Saunders Company. 1986;755-83.
55. Caplan GM. Urinary System. Owensboro Community and Technical Collage. (Erişim tarihi: 28.05.2012)
<http://legacy.owensboro.kctcs.edu/gcaplan/anat2/notes/APIINotes3%20urinary%20system.html>
56. Bacon RL, Niles NR. Medical Histology. Springer-Verlag. 1983;296-310.
57. Caplan GM. Urinary System. Owensboro Community and Technical Collage. (Erişim tarihi: 28.05.2012)
<http://legacy.owensboro.kctcs.edu/gcaplan/anat2/notes/APIINotes3%20urinary%20system.html>

58. Steinbachs J. (Erişim tarihi: 28.05.2012)
<https://steinbachs.org/display/chronicles/Other+Kidney+Features>.
59. Yenigün M, Altuntař Y. Her Yönüyle Diabetes Mellitus; 2. Baskı. 2001;51, 54-61, 383-9.
60. Kumar V, Cotran R, Robbins S. Çeviri Editörü: Çevikbaş U. Robbins Basic Pathology; 7. Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri. 2003;641-52.
61. Rodrigo R. Oxidative Stress and Antioxidants: Their Role in Human Disease. Nova Biomedical Books. 2009;194-201.
62. Scobie IN. Atlas of Diabetes Mellitus; 3. Edition. Informa Healthcare. 2007;1-10, 70-1.
63. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 2003;1: 5-20.
64. Kuzuya T, Nakagawa S, Satoh J, Kanazawa Y, Iwamoto Y, Kobayashi M ve ark. Report of the Committee on the Classification and Diagnostic Criteria of Diabetes Mellitus. Diabetes and Its Complications 2001;15: 203-10.
65. Sperling MA. Type 1 Diabetes: Etiology and Treatment. Humana Press 2003; 409-21.
66. Holt RIG, Cockram C, Flyvbjerg A, Goldstein BJ. Textbook of Diabetes; 4. Edition. Wiley-Blackwell. 2010;599-603.
67. Shaw KM, Cummings MH. Diabetes Chronic Complications; 2. Edition. Wiley. 2005;21-2, 34.
68. Parving HH, Tarnow L, Rossing P. Genetics of Diabetic Nephropathy. J Am Soc Nephrol 1996;7:2509-17.
69. İliçin G, Biberoğlu K, Süleymanlar G, Ünal S. İç hastalıkları, 2. Cilt. Güneş Kitabevi. 2003;2323-6.
70. Watkins PJ. ABC of Diabetes; 5. Edition. 2003;66.
71. Arık N. Nefroloji; 1. Baskı. 104-105.
72. Bolzan AD, Bianchi MS. Genotoxicity of Streptozotocin. Mutation Research 2002;512:121-34.
73. Rakićen N, Rakićen ML, Nadkarni MV. Studies on the Diabetogenic Action of Streptozotocin. Cancer Chemother Rep 1963;29:91-8.

74. Tatsuki R, Satoh K, Yamamoto A, Hoshi K, Ichihara K. Lipid Peroxidation in the Pancreas and Other Organs in Streptozotocin Diabetic Rats. *Jpn J Pharmacol* 1997;75:267-73.
75. Kanter M. Protective Effects of Thymoquinone on β -cell Damage In Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Tıp Araştırmaları Dergisi* 2009;7(2):64-70.
76. Yazdanparast R, Ardestani A, Jamshidi S. Experimental Diabetes Treated with *Achillea santolina*: Effect on Pancreatic Oxidative Parameters. *Journal of Ethnopharmacology* 2007;112:13–8.
77. Szkudelski T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in Beta Cells of the Rat Pancreas. *Physiol Res* 2001;50:536-46.
78. Büyükdevrim S. Diabetes Mellitus. İstanbul Üniversitesi Basımevi ve Film Merkezi, 1989; 187-209.
79. Öcal T, Altuğ T, Erseven G, Çöloğlu S, Büyükdevrim S. Farklı Dozlarda STZ Uygulamasının Çeşitli Organlarda Ortaya Çıkarttığı Histolojik Değişiklikler. *Diabet Yıllığı* 1984;2:93-100.
80. Kahn R, Weir GC. Use of Animal Models in the Study of Diabetes. Ed; Karasık A, Hattari M. *Joslin's Diabetes*, 13th Edition. Lea and Febiger, London, 1996;282-350.
81. Kanter M, Coskun O, Korkmaz A, Oter S. Effects of *Nigella sativa* on Oxidative Stress and β -Cell Damage in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *The Anatomical Record Part A* 2004;279:685–91.
82. Coskun O, Ocakcı A, Bayraktaroglu T, Kanter M. Exercise Training Prevents and Protects Streptozotocin-Induced Oxidative Stress and β -Cell Damage in Rat Pancreas, *Tohoku J. Exp. Med* 2004;203:145-54.
83. Carney SL, Wong NLM, Dirks JH. Acute Effects of Streptozotocin Diabetes on Rat Renal Function. *J Lab Clin Med* 1979;93:950-60.
84. Kim BM, Han YM, Shin YJ, Min BH, Park IS. Clusterin Expression During Regeneration of Pancreatic Islet Cells in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Diabetologia* 2001;44(12):2192-202.
85. Reiter RJ. Interactions of the Pineal Hormone Melatonin with Oxygen-Centered Free Radicals: A Brief Review. *Braz J Med Biol Res* 1993;26:1141-55.

86. Poeggeler B, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD.,Manchester LC. Melatonin, Hydroxyl Radical-Mediated Oxidative Damage, and Aging: A hypothesis. *J Pineal Res* 1993;14:151-68.
87. Altun A, Vardar A, Altun BU. Melatonin ve Kardiyovasküler Sistem. *Ana Kar Der* 2001;1:283-8.
88. Mesenge C, Margail I, Verrecchia C, Allix M, Boulou RG and Plotkine M. Protective Effect of Melatonin in a Model of Traumatic Brain Injury in Mice. *J. Pineal Res* 1998;25:41-6.
89. Kaptanoglu E, Tuncel M, Palaoglu S, Konan A, Demirpence E, and Kilin K. Comparison of the Effects of Melatonin and Methylprednisolone in Experimental Spinal Cord Injury. *J. Neurosurg* 2000;93:77-84.
90. Gilgun-Sherki Y, Rosenbaum Z, Melamed E, Offen D. Antioxidant Therapy in Acute Nervous System Injury: Current State. *Pharmacol Rev* 2002;54:271-84.
91. Yazıcı C, Köse K. Melatonin: Karanlığın Antioksidan Gücü. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2004;13(2):56-65.
92. Reiter RJ, Tan D-X, Terron MP, Flores LJ and Czarnocki Z. Melatonin and Its Metabolites: New Findings Regarding Their Production and Their Radical Scavenging Actions. *Acta Biochimica Polonica* 2007;1-9.
93. Reiter RJ. Oxidative Damage in the Central Nervous System: Protection by Melatonin. *Progress in Neurobiology* 1998;56:359-84.
94. Özgüner F, Özçankaya R, Delibaş N, Koyu A, Çalışkan S. Melatonin ve Klinik Önemi. *SDÜ Tıp Fak Derg* 1995;2(4):1-6.
95. Abdel-Wahab MH, Abd-Allah AR. Possible Protective Effect of Melatonin and/or Desferrioxamine Against Streptozotocin Induced Hyperglycaemia in Mice. *Pharmacol Res* 2000;41(5): 533-7.
96. Nishida S. Metabolic Effects of Melatonin on Oxidative Stress and Diabetes Mellitus. *Endocrine* 2005;27(2):131-5.
97. Shiu SYW. Changes in Tissue Melatonin Levels Following Cold Exposure in Rats, Hamsters and Pigeons. *Journal of the Hong Kong Medical Association* 1986;38(2).
98. Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Maestroni GJM, Esquifino AI, Hardeland R, Cardinali DP. Role of Melatonin in Neurodegenerative Diseases. *Neurotoxicity Research* 2005;7(4):293-318.

99. Kanter M, Altan MF, Donmez S, Ocakci A and Kartal ME. The Effects of Quercetin on Bone Minerals, Biomechanical Behavior, and Structure in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Cell Biochem Funct* 2007;25:747–52.
100. Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S. Quercetin a Flavonoid Antioxidant Prevents and Protects Streptozotocin-Induced Oxidative Stress and β -cell Damage in Rat Pancreas. *Pharmacological Research* 2005;51:117–23.
101. Vessal M, Hemmati M, Vasei M. Antidiabetic Effects of Quercetin in Streptozocin-Induced Diabetic Rats. *Comparative Biochemistry and Physiology* 2003;135:357–64.
102. Dias AS, Porawski M, Alonso M, Marroni N, Collado PS, Gonzalez-Gallego J. Quercetin Decreases Oxidative Stress, NF- κ B Activation, and iNOS Overexpression in Liver of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J. Nutr* 2005;135:2299–304.
103. Lamson DW, Brignall MS. Antioxidants and Cancer III: Quercetin. *Altern Med Rev* 2000;5(3):196-208.
104. Gugler R, Leschik M, Dengler HJ. Disposition of Quercetin in Man After Single Oral and Intravenous Doses. *Eur J Clin Pharmacol* 1975;9:229-34.
105. Prior RL. Fruits and Vegetables in the Prevention of Cellular Oxidative Damage. *Am J Clin Nutr* 2003;78:570-8.
106. Coldiron AD, Sanders RA, Watkins JB. Effects of Combined Quercetin and Coenzyme Q10 Treatment on Oxidative Stress in Normal and Diabetic Rats. *J Biochem Molecular Toxicology* 2002;16(4).
107. Chow J, Shen S, Huan SK, Lin H, Chen Y. Quercetin, but not Rutin and Quercitrin, Prevention of H₂O₂-Induced Apoptosis via Antioxidan Activity and Heme Oxygenase 1 Gene Expression in Macrophages. *Biochemical Pharmacology* 2005;69:1839-51.
108. Ferry DR, Smith A, Malkhandi J, et al. Phase I Clinical Trial of the Flavonoid Quercetin: Pharmacokinetics and Evidence for in vivo Tyrosine Kinase Inhibition. *Clinical Cancer Research* 1996;2:659-68.
109. Casagrande R, Georgetti SR, Jabar JR, Santas AC, Fonseca MJV. Evaluation of Functional Stability of Quercetin as a Raw Material and in Different Topical formulations by its Antilipoperoxidative Activity. *AAPS Pharm Sci Tech* 2006;7(1).

110. Moskaug JQ, Carlsen H, Myhrstad M, Blomhoff R. Molecular Imaging of the Biological Effects of Quercetin and Quercetin-Rich Foods. Mechanisms of ageing and development 2004;125:315-24.
111. Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. Flavonoid as Antioxidant: Determination of Radical Scavenging Efficiencies. Method in Enzymology 1990;186:343-55.
112. Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Wine as a Biological Fluid: History, Production, and Role in Disease Prevention. J Clin Lab Anal 1997;11(5):287-313.
113. Aggarwal BA, Shishodia S. Resveratrol in Health and Disease. Taylor & Francis Group. 2006;9, 18, 22-3.
114. Acar C, Jebara VA, Portoghese M, Beyssen B, Pagny JY, Grare P et al. Revival of the Radial Artery for Coronary Artery Bypass Grafting. Ann Thorac Surg 1992;54(4):652-9.
115. Fremont L. Biological Effects of Resveratrol. Life Sci 2000;66(8):663-73.
116. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW et al. Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes. Science 1997;275(5297):218-20.
117. Schoppner A, Kindl H. Purification and Properties of a Stilbene Synthase from Induced Cell Suspension Cultures of Peanut. J Biol Chem 1984;259(11):6806-11.
118. Sayın O, Arslan N, Güner G. Resveratrol ve Kardiyovasküler Sistem. Türk Biyokimya Dergisi 2008;33(3):117-21.
119. Szkudelski T. Resveratrol-Induced Inhibition of Insulin Secretion from Rat Pancreatic Islets: Evidence for Pivotal Role of Metabolic Disturbances. Am J Physiol Endocrinol 2007;293:901-7.
120. Cao Y, Fu Z-D, Wang F, Liu H-Y, Han R. Anti-Angiogenic Activity of Resveratrol, a Natural Compound from Medicinal Plants. Journal of Asian Natural Products Research 2005;7(3):205-13.
121. Yar AS, Menevse S, Alp E, Helvacioğlu F, Take G. The Effects of Resveratrol on Cyclooxygenase-1 and Cyclooxygenase-2 mRNA and Protein Levels in Diabetic Rat Kidneys. Mol Biol Rep 2010;37:2323-31.
122. Celotti E, Ferrarini R, Zironi R, Conte LS. Resveratrol Content of Some Wines Obtained from Dried Valpolicella Grapes: Recioto and Amarone. J Chromatogr A 1996;12(1-2):47-52.

123. Walle T, Hsieh F, Delegge MH, Oatis JE, Walle UK. High Absorption but Very Low Bioavailability of Oral Resveratrol in Humans. *Drug Metab Dispos* 2004;32(12):1377-82.
124. Goldberg DM, Yan J, Soleas GJ. Absorption of Three Wine-Related Polyphenols in Three Different Matrices by Healthy Subjects. *Clin Biochem* 2003;36(1):79-87.
125. Meng X, Maliakal P, Lu H, Lee MJ, Yang CS. Urinary and Plasma Levels of Resveratrol and Quercetin in Humans, Mice, and Rats After Ingestion of Pure Compounds and Grape juice. *J Agric Food Chem* 2004;52(4):935-42.
126. Yu C, Shin YG, Chow A, Li Y, Kosmeder JW, Lee YS et al. Human, Rat, and Mouse Metabolism of Resveratrol. *Pharmaceutical Research* 2002;19(12).
127. Shankar S, Singh G, Srivastava RK. Chemoprevention by Resveratrol: Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential. *Frontiers in Bioscience* 2007;12:4839-54.
128. Ji L, Lu L, Yu L, Du G. Antihyperglycemic Effect of Resveratrol and its Immune Modulation. *Modern Pharmaceutical Research* 2009;2(4).
129. Su H-C, Hung L-M, Chen J-K. Resveratrol a Red Wine Antioxidant Possesses an Insulin-Like Effect in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Am J Physiol Endocrinol* 2006;290:1339-46.
130. Hung L-M, Chen J-K, Huang S-S, Lee R-S, Su M-J. Cardioprotective Effect of Resveratrol, a Natural Antioxidant Derived from Grapes. *Cardiovascular Research* 2000;47:549-55.
131. Vardı N, Iraz M, Öztürk F, Uçar M, Gül M, Eşrefoğlu M, Otlı A. Deneysel Diyabetin Sıçan Böbreklerinde Meydana Getirdiği Histolojik Değişiklikler Üzerine Melatoninin İyileştirici Etkileri. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2005;12(3)145-52.
132. Murali B, Umrani DN, Goyal RK. Effect of Chronic Treatment with Losartan on Streptozotocin-Induced Renal Dysfunction Molecular and Cellular Biochemistry 2003;249:85-90.
133. Bancroft JD, Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*; 3. Edition. Churchill Livingstone. 1990;109, 133, 191.
134. Fujihara CK, Malherios DMAC, Zatz R, Noronha IL. Mycophenolate Mofetil Attenuates Renal Injury in the Rat Remnant Kidney. *Kidney Int* 1998;54:1510-19.

135. Fujisawa G, Okada K, Muto S, Fujita N, Itabashi N, Kusano E, and Ishibashi S. Spironolactone Prevents Early Renal Injury in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Kidney International* 2004;66:1493-502.
136. Arıkan H, Koc M, Cakalagaoglu F, Tuglular S, Ozener E and Akoglu E. Histopathological Changes and Tumour Necrosis Factor-A, Transforming Growth Factor-B and Tenascin Expression in Patients with Primary Type I Membranoproliferative Glomerulonephritis in Remission. *Nephrology* 2009;14: 219-26.
137. Luck H. *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie Academic Press. New York. 1963;885-8.
138. McCord JM, Fridovich I. Superoxide Dismutase: An Enzymatic Function for Erythrocyte (Hemoglobin). *The Journal of Biological Chemistry* 1969;244:6049-55.
139. Buege AJ, Aust SD. Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods Enzymol* 1978;52:302-10.
140. Theodorou P, Akerboom M, Sies H. Assay of Glutathione, Glutathione Disulfide and Glutathione Mixed Disulfides in Biological Samples. *Methods Enzymol* 1981;77:373- 83.
141. Usta MF, Bivalacqua TJ, Köksal IT, Toptaş B. The Protective Effect of Aminoguanidine on Erectile Function in Diabetic Rats is not Related to the Timing of Treatment. *BJU International* 2004;94:429-32.
142. Khaki A, Fathiazad F, Nouri M. Beneficial Effects of Quercetin on Sperm Parameters in Streptozotocin-Induced Diabetic Male Rats. *Phytother Res* 2010;10:1-7.
143. Nishikawa T, Edelstein D, Brownlee M. The Missing Link: A Single Unifying Mechanism for Diabetic Complications. *Kidney Int* 2000;77:26-30.
144. Vardı N, Iraz M, Gül M, Öztürk F, Uçar M, Otlı A. Diyabetin Neden Olduğu Histolojik Değişiklikler Üzerine Aminoguanidinin İyileştirici Etkileri. *Türkiye Klinikleri* 2006;26:599-06.
145. Garman JH, Mulroney S, Manigrasso M, Flynn E, Maric C. Omega-3 Fatty Acid Rich Diet Prevents Diabetic Renal Disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009;296: 306-16.

146. Lu Q, Yin X-X, Wang J-Y, Gao Y-Y, Pan Y-M. Effects of Ginkgo Biloba on Prevention of Development of Experimental Diabetic Nephropathy in Rats. *Acta Pharmacol Sin* 2007;28:818-28.
147. Han S-Y, So G-A, Jee Y-H et. al. Effect of Retinoic Acid in Experimental Diabetic Nephropathy. *Immunology and Cell Biology* 2004;82:568-76.
148. Abo-Salem OM, El-Edel RH, Harisa GEI et al. Experimental Diabetic Nephropathy Can Be Prevented By Propolis: Effect on Metabolic Disturbances and Renal Oxidative Parameters. *Pak J Pharm Sci* 2009;22:205-10.
149. Baydas G, Canatan H, Turkoglu A. Comparative Analysis of the Protective Effects Melatonin and Vitamin E on Streptozocin-Induced Diabetes Mellitus. *J. Pineal Res* 2002;32:225-30.
150. Anwar MM, Meki AMA. Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: Effects of Garlic Oil and Melatonin. *Comparative Biochemistry and Physiology* 2003;135:539-47.
151. Mahesh T, Menon VP. Quercetin Allievates Oxidative Stress in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Phytother Res* 2004;18:123-7.
152. Shetty AK, Rashmi R, Rajan MGR, Sambaiah K, Salimath PV. Antidiabetic Influence of Quercetin in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Nutrition Research* 2004;24:373-81.
153. Chang C-C, Chang C-Y, Wu Y-T et al. Resveratrol Retards Progression of Diabetic Nephropathy Through Modulations of Oxidative Stress, Proinflammatory Cytokines, and AMP-activated Protein Kinase. *Journal of Biomedical Science* 2011;18:47.
154. D'avila-Esqueda ME, Mart'nez-Morales F. Pentoxifylline Diminishes the Oxidative Damage to Renal Tissue Induced by Streptozotocin in the Rat. *Experimental Diab Res* 2004;5:245-51.
155. Singh J, Budhiraja S, Lal H, Arora BR. Renoprotection by Telmisartan versus Benazepril in Streptozotocin Induced Diabetic Nephropathy. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics* 2006;5:135-9.
156. Obrosova IG, Fathallah L, Liu E, Nourooz-Zadeh J. Early Oxidative Stress In The Diabetic Kidney: Effect Of DL-alfa-Lipoic Acid. *Free Radical Biology & Medicine* 2003;34:186-195.
157. Choi YE, Ahn SK, Lee WT et al. Soybeans Ameliolate Diabetic Nephropathy in Rats. *eCAM* 2008;1-8.

158. Vural H, Sabuncu T, Arslan SO, Aksoy N. Melatonin Inhibits Lipid Peroxidation and Stimulates the Antioxidant Status of Diabetic Rats. *Journal of Pineal Research* 2001;31:193-8.
159. Bhatti F, Mankhey RW, Asico L, Quinn MT, Welch WJ, Maric C. Mechanisms of Antioxidant and Pro-Oxidant Effects Of A-Lipoic Acid in the Diabetic and Nondiabetic Kidney. *Kidney International* 2005;67:1371-80.
160. Sato S,T, Yamate J, Hori Y, Hatai A et al. Protective Effect of Polyphenol-Containing Azuki Bean (*Vigna angularis*) Seed Coats on the Renal Cortex in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2005;16:547-53.
161. Tuncdemir M, Ozturk M. Deneysel Diyabetik Nefropatide İrbesartan'ın Apoptoz Üzerine Koruyucu Etkileri. *Cerrahpaşa Tıp Derg* 2009;40:15-22.
162. Guneli E, Tugyan K, Ozturk H, Gumustekin M, Cilaker S, Uysal N. Effect of Melatonin on Testicular Damage in Streptozotocin-Induced Diabetes Rats. *Eur Surg Res* 2008;78:479-484.
163. Andallu B, Varadacharyulu NC. Antioxidant Role of Mulberry (*Morus indica* L. Cv. Anantha) Leaves in Streptozotocin-Diabetic Rats. *Clinica Chimica Acta* 2003;338:3-10.
164. Teoh SL, Latiff AA, Das S. Histological Changes in the Kidneys of Experimental Diabetic Rats Fed with Momordica Charantia (bitter gourd) extract. *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 2010;51(1):91-5.
165. Osterby R, Asplund J, Bangstad HJ et al. Neovascularization at the vascular pole region in diabetic glomerulopathy. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:348-52.
166. Poretsky L. *Principles of Diabetes Mellitus*; 2. Edition. Springer. 2010;347-51.
167. Eddy AA. Experimental Insights into The Tubulointerstitial Disease Accompanying Primary Glomerular Lesions. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:2494-2508.
168. Shankland SJ, Scholey JW. Expression of Transforming Growth Factor- β 1 During Diabetic Renal Hypertrophy. *Kidney Int* 1994;46:430-42.
169. Tuncdemir M, Ozturk M. The Effects of ACE Inhibitor and Angiotensin Receptor Blocker on Clusterin and Apoptosis in The Kidney Tissue of Streptozotocin-Diabetic Rats. *J Mol Hist* 2008;39:605-16.
170. Tuncdemir M, Ozturk M. The Effects of Angiotensin-II Receptor Blockers on Podocyte Damage and Glomerular Apoptosis in A Rat Model of Experimental

- Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy. *Acta Histochemica* 2011;113: 826-832.
171. Doğan MM, Dönder E, Kuloğlu T, Dabak DÖ. Deneysel Diyabetin sıçan Böbrek Dokusunda Meydana Getirdiği Değişiklikler Üzerine Enalapril ve Losartan'ın Etkilerinin incelenmesi. *Fırat Tıp Dergisi* 2011;16(2):46-50.
172. Ren X-J, Guan G-J, Liu G et al. Effect of Activin A on Tubulointerstitial Fibrosis in Diabetic Nephropathy. *Nephrology* 2009;14:311-20.
173. Kanter M. Protective Effects of Thymoquinone on Streptozotocin-Induced Diabetic nephropathy. *J Mol Hist* 2009;40:107-115.
174. Li X, Cui X, Sun X, Li X et al. Magniferin Prevents Diabetic Nephropathy Progression in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Phytother Res* 2009.
175. Liu D-X, Liu X-M, Su Y, Zhang X-J. Renal Expression of Proto-oncogene Ets-1 on Matrix Remodeling in Experimental Diabetic Nephropathy. *Acta Histochemica* 2010.
176. Edremitlioğlu M, Andiç MF, Korkut O. Quercetin, A Powerful Antioxidant Bioflavonoid, Prevents Oxidative Damage in Different Tissues of Long-Term Diabetic Rats. *Balkan Med J* 2012;29:49-55.
177. Cam M, Yavuz Ö, Guven A et al. Protective Effects of Chronic Melatonin Treatment Against Renal Injury in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Pineal Res* 2003;35:212-20.
178. Gugliucci A. Glycation As The Glucose Link to Diabetic Complication. *JAOA* 2000;100(10):621-34.
179. Yakan B, Eşrefoğlu M. Deneysel Diyabetes Mellitusda Böbreklerin İnce Yapısı ve Selenyumun Düzeltici Etkileri. *Türkiye Klinikleri* 1995;15:255-9.
180. Osicka TM, Kiriazis Z, Pratt LM, Jerums G, Comper WD. Ramipril and Aminoguanidine Restore Lysosomal Processing in Streptozotocin Diabetic Rats. *Diabetologia* 2001;44:230-6.
181. Teschner M, Schaefer RM, Svarnas A et al. Decreased Proteinase Activity in Isolated Glomeruli of Streptozotocin Diabetic Rats. *Am J Nephrol* 1989;9:464-9.
182. Van Det NF, Verhagen NA, Tamsma JT, Berden JH, Bruijn JA, Daha MR et al. Regulation of Glomerular Epithelial Cell Production of Fibronectin and Transforming Growth Factor- β by High Glucose, not by Angiotensin II. *Diabetes* 1997;46:834-40.

183. Brees DK, Ikegaya N, Kerteler M, Noble NA, Border WA. Deficiency of the TGF- β Antagonist, Decorin, Precedes Matrix Deposition in Experimental Glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 1994;5:801-7.
184. Branton MH, Kopp JB. TGF- β and Fibrosis. *Microbes and Infection* 1999;1:1349-65.
185. Hill C, Flyvbjerg A et al. The Renal Expression of Transforming Growth Factor- β Isoforms and Their Receptors in Acute and Chronic Experimental Diabetes in Rats. *Endocrinology* 2000;141:1196-1208.
186. Abboud HE. Growth Factors in Glomerulonephritis. *Kidney Int* 1993;43:252-67.
187. Imai E. Phenotypic Change of the Mesangial Cells Induced by Overexpression of the TGF- β in in vivo Glomerulus. *J Am Soc Nephrol* 1994;5:782-7.
188. Rocco MV, Chen Y, Goldfarb S, Ziyadeh FN. Elevated Glucose Stimulates TGF- β Gene Expression and Bioactivity in proximal Tubule. *Kidney International* 1992;41:107-14.
189. Liu R-M, Pravia KAG. Oxidative Stress and Glutathione in TGF- β -Mediated Fibrogenesis. *Free Radical Biology & Medicine* 2010;48:1-15.
190. Reckelhoff JF, Tygart VL, Mitias MM, Walcott JL. STZ-Induced Diabetes Results in Decreased Activity of Glomerular Cathepsin and Metalloproteinase in Rat. *Diabetes* 1993;42:1425-32.
191. Reckelhoff JF, Tygart VL, Rascusen LC, Dzielak DJ. Glomerular Metalloprotease Activity in Streptozotocin-Treated Rats and in Spontaneously Diabetic Rats (BB/DP). *Life Sci* 1994;55:941-50.
192. Ha H, Yu M-R, Kim KH. Melatonin and Taurine Reduce Early Glomerulopathy in Diabetic Rats. *Free Radical Biology & Medicine* 1999;26:944-50.
193. Craven PA, Derubertis FR, Kagan VE et al. Effects of Supplementation with Vitamin C or E on Albuminuria, Glomerular TGF- β , and Glomerular Size in Diabetes. *J Am Soc Nephrol* 1997;8:1405-14.
194. Studer RK, Craven PA, Derubertis FR. Antioxidant Inhibition of protein Kinase C-Signaled Increases in Transforming Growth Factor-Beta in Mesengial Cells. *Met Clin Exp* 1997;46:918-25.
195. Dabla PK. Renal Function in Diabetic Nephropathy. *World J Diabetes* 2010;1(2):48-56.

196. Kataya HAH, Hamza AA. Red Cabbage (*Brassica oleracea*) Ameliorates Diabetic Nephropathy in Rats. *eCAM* 2008;5(3):281-7.
197. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, Oxidative Stress and Antioxidants: A Review. *J Biochem Molecular Toxicology* 2003;17:24-38.
198. Kaplowitz N. Mechanism of Liver Cell Injury. *J Hepatol* 2000;32:39-47.
199. Maritim AC, Moore BH, Sanders RA, Watkins JB. Effects of Melatonin on Oxidative Stress in Streptozocin-Induced Diabetic Rats. *Int J Toxicol* 1999;18:161-6.
200. Lu-Jia Z, Li-Jing Z. Effect of Resveratrol on Oxidative Stress in Kidneys of Diabetic Rats. *International Conference on Human Health and Biomedical Engineering* 2011.

EKLER

EK 1. Etik Kurul Onay Formu



İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 03-12-2010
Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya
Araştırma Protokol no.su : 2010/70
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü : sıçan
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soyu : Wistar albino
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : ☐ E ☐ D ☒ Farketmez
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 47 adet
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı : 3 Aylık/180-220 gr

Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Mukaddes EŞREFOĞLU'nun yürüttüğü olduğu "Wistar albino sıçanlarda streptozotocin ile oluşturulan diyabetik nefropatinin tedavisinde resveratrol, melatonin ve quercetin'in etkilerinin araştırılması" isimli 2010/70 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

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

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

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Hülya ELBE

Doğum Yeri: Samsun

Doğum Yılı: 01.06.1979

Eğitim ve Akademik Bilgiler

Uzmanlık 2009-halen : İnönü Üniveristesi, Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Lisans 1996-2002 : Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi

Lise 1993-1996 : Balıkesir Muharrem Hasbi Lisesi
Fen Bilimleri Bölümü Mezunu

Mesleki Bilgiler

Eylül 2002-Ağustos2003 : Şırnak AÇS/AP Merkezi, Pratisyen Hekim.

Eylül 2003-Haziran 2004 : Samsun Kavak Merkez Sağlık Ocağı, Pratisyen Hekim.

Temmuz 2004-Haziran 2005 : Şırnak 1 No'lu Merkez Sağlık Ocağı, Pratisyen Hekim.

Temmuz 2005-Ağustos 2009 : Muğla 2 No'lu Merkez Sağlık Ocağı, Pratisyen Hekim.

Eylül 2009-halen : İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji
Anabilim Dalı, Malatya, Araştırma Görevlisi.