



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA
TEZİ**

**DIYABETİK SIÇAN BÖBREĞİNDE
RESVERATROL'ÜN ETKİSİ**

DUYGU ALTIN

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEMMUZ 2014



DIYABETİK SIÇAN BÖBREĞİNDE RESVERATROL' ÜN ETKİSİ

Duygu ALTIN

**DOKTORA TEZİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2014

Duygu Altın tarafından hazırlanan “Diyabetik Sıçan Böbreğinde Resveratrol’ün Etkisi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OYBİRLİĞİ/OYÇOKLUĞU ile Gazi Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Çiğdem Özer

Fizyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

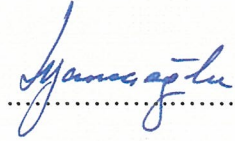
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Başkan : Prof. Dr. Lamia Pınar

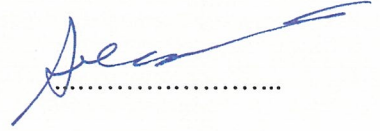
Fizyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Üye : Prof. Dr. Aydan Babül (TİK)

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Üye : Prof. Dr. Emine Koç

Fizyoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

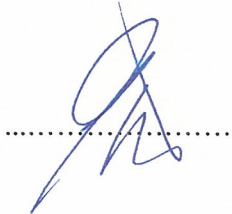
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Üye : Doç. Dr. Gülnur Take Kaplanoğlu

Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Tez Savunma Tarihi: 24/07/2014

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

Doç. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

Bildirir, aksi durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



Duygu Altın

07/07/2014

DIYABETİK SIÇAN BÖBREĞİNDE RESVERATROL' ÜN ETKİSİ

(Doktora Tezi)

Duygu ALTIN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2014

ÖZET

Resveratrol' ün (RSV) kardiyoprotektif, antikanser, antiinflamatuvar ve antioksidatif özelliklerinin olduğu ve Tip 2 diyabet hayvan modellerinde damar koruyucu etki gösterdiği ileri sürülmüştür. Ayrıca insülin benzeri etki göstererek hepatositler, adiposit ve iskelet kasına glukoz alımını teşvik etmektedir. Çalışmanın amacı, Streptozosin (STZ) ile diyabet oluşturulan sıçanlarda gelişen diyabetik nefropati (DN) üzerinde RSV' ün morfolojik, biyokimyasal ve fonksiyonel etkilerini incelemektir. Çalışmamızda 30 adet Wistar albino erkek sıçan, 4 gruba ayrıldı. 1. Kontrol, 2. RSV, 3. Diyabet, 4. Diyabet + RSV. Diyabet gruplarına tek doz 0.1M (pH: 4,5) sitrat tampon içinde çözünen STZ (65 mg/kg) intraperitoneal (i.p.) olarak enjekte edildi. Kontrol gruplarına ise i.p. tek doz sitrat tamponu uygulandı. RSV uygulaması 10 mg/kg/gün dozda, diyabetin başlamasından 2 hafta sonra, 8 hafta boyunca oral gavaj yoluyla yapıldı. Kontrollere ise 0,1 M etanol uygulandı. Sıçanlar intra muskuler (IM) Rompun+Ketamin (50+60-100mg/kg) anestezisi altında kalplerinden kan alınarak feda edildiler. Çalışma süresince sıçanlarda: Açlık kan şekeri (AKŞ) düzeyleri, diyabetin böbrek fonksiyonları üzerine olan etkileri (idrar miktarı, idrarda kimyasal analizler...) incelendi. Çalışma sonunda, böbrek vasküler yanıtlarına bakıldı. İmmünohistokimyasal olarak; TEM ile morfolojik inceleme yapılarak, proinflamatuvar sitokinler TGF- β , iNOS, eNOS, Fibronektin düzeylerine bakıldı. Yine böbrek dokusundaki oksidan (Malondialdehit/MDA), antioksidan (Glutatyon/GSH) ve ayrıca Total nitrik oksit (NOx) düzeyleri tespit edildi. Sonuçlar SPSS paket programında Kruskal Wallis ve Mann Whitney testleri kullanılarak karşılaştırıldı, $p<0.05$ değerleri anlamlı kabul edildi. Diyabetik gruplarda AKŞ, alınan sıvı ve idrar miktarında artış ($p<0.05$) kanda ALP, ALT, BUN ve kreatinin düzeylerinde yükselme ($p<0.05$), sodyum düzeyinde ise düşme tespit edildi ($p<0.05$). RSV bozulan bu parametrelerde düzelme meydana getirmede. Gerek diyabetik, gerekse tek başına RSV uygulanan grupta Anjiyotensin II (Ang II) ve Fenilefrin'nin (Phe) renal arter perfüzyon basıncını artırıcı etkilerinin kontrole göre farklı olmadığı, RSV ile tedavi edilen diyabetik grupta ise hem Ang II hem de Phe yanıtlarının azaldığı ($p<0.05$) yine aynı grupta asetilkolinin (ACh) vazodilatör yanıtlarının da azaldığı gözlemlendi ($p<0.05$). RSV uygulaması ile diyabete bağlı olarak; artan böbrek dokusu MDA düzeylerinde azalma ($p<0.01$), azalan GSH düzeylerinde ise yükselme ($p<0.01$) tespit edildi. NOx düzeylerinde herhangi bir değişiklik gözlenmedi. TEM incelemesinde: RSV uygulamasının diyabete bağlı olarak bozulan böbrek dokusunu büyük ölçüde koruduğu gözlemlendi. Diyabetin neden olduğu böbrek dejenerasyonu ile uyumlu olarak artan TGF- β , fibronektin ve iNOS immunreaktivitesinin RSV uygulamasıyla kısmen azaldığı; diyabetle birlikte azalan eNOS seviyesinin arttığı gözlemlendi.

Bilim Kodu : 1023
Anahtar Kelimeler : Resveratrol, Diyabetik Nefropati, Oksidatif Stres
Sayfa Adedi : 131
Danışman : Prof. Dr. Çiğdem ÖZER

EFFECT OF RESVERATROL ON DIABETIC RAT KIDNEY

(Ph. D. Thesis)

Duygu ALTIN

GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

July 2014

ABSTRACT

Resveratrol (RSV) has cardioprotective, anticancer, antiinflammatory, and antioxidative properties and exerts significant vasoprotective effects in animal models of Type 2 diabetes. Also have an effect of insulin-like promotes uptake of glucose to hepatocytes, adipocytes and skeletal muscle. The aim is to investigate the morphologic, biochemical and functional effects of RSV on diabetic nephropathy (DN) on streptozotocin (STZ) diabetic rats. 30 male Wistar albino rats were divided into 4 groups. Group 1. Control, Group 2. RSV, Group 3. Diabetes, Group 4. Diabetes + RSV. Intraperitoneal single dose STZ 65 mg/kg 0,1M (pH: 4,5) were injected with dissolved in citrate buffer to diabetes groups. Intraperitoneal (i.p) single dose citrate buffer were injected to control groups. Application of RSV (10/mg/kg/day dose (dissolved in 0.1M ethanol) has been started 2 weeks after diabetes formation and continued through 8 weeks by using oral gavage. The control groups were performed 0.1 M ethanol. Rats were sacrificed under intramuscular (IM) Rompun+ketamine (50+60-100mg/kg) anesthesia by taking blood from hearts. During the study: Fasting blood glucose levels, the effects of diabetes on renal function (urine output, urine chemical analysis...) were analyzed and renal vascular responses were measured. Immunohistochemically, morphological research performed by TEM, proinflammatory cytokines TGF- β , iNOS, eNOS, fibronectin levels were measured. However kidney tissue oxidant (Malondialdehit/MDA, and antioxidants (glutathione/GSH)) parameters were studied, total nitric oxide (NOx) levels were also determined. Results in SPSS, Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were compared using, $p < 0.05$ was considered significant. Fasting blood glucose, fluid intake and urine volume were determined to increase in diabetic groups ($p < 0.05$), increasement of ALP, ALT, BUN and creatinine in blood ($p < 0.05$) and diminution in sodium level ($p < 0.05$) are also identified. But, application of RSV does not have any effect on that parameters. In diabetic and RSV applied groups; Angiotension II (Ang II) and Phenilephrine (Phe) on perfussion pressure were not significant when compared with the control. However both Ang II and Phe effects were significantly decreased in diabetic group treated with RSV ($p < 0.05$). In the same group, vasodilator responses of acetylcholine (ACh) were found to significantly decrease ($p < 0.05$). By RSV treatment, diabetes induced increased kidney MDA levels were decreased ($p < 0,01$) and GSH levels were increased ($p < 0,01$) but NOx levels were not effected. Examination of TEM: application of resveratrol, diabetes-related deteriorating renal tissue was significantly preserved. Increment of TGF- β , fibronectin and iNOS immunoreactivity are partially decreased, however decreased eNOS level is increased with treatment of RSV.

Science Code : 1023

Key Words : Resveratrol, Diabetic Nephropathy, Oxidative Stress

Page Number : 131

Supervisor : Prof. Dr. Çiğdem ÖZER

TEŞEKKÜR

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı'nda ki eğitimim ve çalışmalarım süresince emeklerini, bilgilerini ve sevgilerini benden esirgemeyen, Prof. Dr. Aydan BABÜL' e, Prof. Dr. Lamia PINAR' a, Prof. Dr. Deniz ERBAŞ' a, Prof. Dr. Sibel DİNÇER' e, Prof. Dr. K. Gonca AKBULUT' a ve aynı zamanda çok kıymetli arkadaşım olan Doç. Dr. Şevin GÜNEY' e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımda emeğini benden hiç esirgemeyen, her zaman beni yüreklendiren özveriyle yönlendiren, bana ışık tutan, sevgisini ve ilgisini her an hissettiğim çok değerli hocam Prof. Dr. Çiğdem ÖZER' e sonsuz minnetlerimi sunarım.

Çalışmalarıyla bana yön veren, tecrübelerini, bilgilerini ve ilgilerini esirgmeden paylaşan Prof. Dr. Sevim ERCAN' a, Yrd. Doç. Dr. Ergin DİLEKÖZ' e, Doç. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU' na, Dr. Eser GÖKTAŞ' a ve Vet. Hek. Elif Ergüven KAYA' ya teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım boyunca, yardımlarını, emeklerini benden esirgemeyen, her konuda yanımda olan güzel arkadaşlarım Dr. Gamze TURNA' ya, Dr. Ayhan KORKMAZ' a, Araş. Gör. Dilek KUZAY' a, ve kıymetli dostum Eda Köylü ERVURAL' a sonsuz teşekkür ederim.

Yaşamımın her anında sonsuz sevgileri, emekleri ve destekleriyle yanımda olan çok değerli annem Saadet TOZCU' ya ve babam Mustafa TOZCU' ya tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Son olarak, desteğini, ilgisini, sevgisini benden bir an olsun esirgemeyen, her zaman beni yüreklendiren, her anımı paylaşan çok sevgili eşim Deniz ALTIN' a tüm kalbimle teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Diabetes Mellitus.....	5
2.1.1. Diabetes mellitus'un tanımı	5
2.1.2. Diabetes mellitus'un tarihçesi.....	5
2.1.3. Diabetes mellitus'un epidemiyolojisi.....	7
2.1.4. Diabetes mellitus'un tanısı ve tanı kriterleri.....	7
2.1.5. Diabetes mellitus'un sınıflaması.....	9
2.1.6. Diabetes mellitus'un komplikasyonları	18
2.2. Diyabetik Nefropati	21
2.2.1. Diyabetik nefropatinin epidemiyolojisi	22
2.2.2. Diyabetik nefropatinin evreleri.....	22
2.2.3. Diyabetik nefropatide patolojik değişiklikler.....	23
2.2.4. Diyabetik nefropatinin patogenezi	25
2.3. Resveratrol	32
2.3.1. Resveratrol'ün tanımı ve tarihçesi.....	32

2.3.2. Resveratrol'ün biyosentezi, emilimi, atılımı	33
2.3.3. Resveratrol'ün hücre içi sinyal iletimi	35
2.3.4. Resveratrol'ün biyolojik etkileri	36
2.3.5. Resveratrol diyabet ilişkisi.....	36
2.3.6. Resveratrol ve diyabetik nefropati ilişkisi.....	38
2.3.7. Resveratrol'ün vazodilatör etkisi ve nitrik oksit.....	39
2.4. Serbest Radikaller	41
2.4.1. Reaktif oksijen türleri.....	42
2.4.2. Reaktif nitrojen ürünleri	43
2.5. Oksidatif Stres ve Diyabetin Oksidatif Stresle İlişkisi.....	44
2.6. Antioksidan Sistemler	45
3. GEREÇ ve YÖNTEM	49
3.1. Kullanılan Denekler, Gereçler ve Maddeler	49
3.1.1. Deney hayvanları	49
3.1.2. Laboratuvar koşulları	49
3.1.3. Laboratuvar cihazları	49
3.1.4. Kullanılan kimyasal maddeler	50
3.1.5. Kullanılan kitler.....	51
3.2. Solüsyonların Hazırlanması	52
3.2.1. Sodyum sitrat tamponunun hazırlanması.....	52
3.2.2. Streptozotolin solüsyonunun hazırlanması.....	52
3.2.3. Resveratrol solüsyonunun hazırlanması	52
3.2.4. Krebs-Hanseleit solüsyonunun hazırlanması	52
3.2.5. Fenilefrin solüsyonunun hazırlanması.....	52
3.2.6. Anjiotensin II solüsyonunun hazırlanması	52
3.2.7. Asetilkolin solüsyonunun hazırlanması	53
3.3. Deney Planı.....	53

3.3.1. Deney grupları	53
3.3.2. Deney süresince yapılan ölçümler ve incelenen parametreler	55
3.3.3. Deneyin sonlandırılması.....	57
3.4. Deney Bitiminde Yapılan Ölçümler ve İncelenen Parametreler	58
3.4.1. Vasküler yanıtların alınması.....	58
3.4.2. Histolojik ve immünohistokimyasal inceleme	60
3.4.3. Dokuda yapılan biyokimyasal analizler	61
3.5. İstatistiksel Analiz Yöntemleri	63
4. BULGULAR	65
4.1. Diyabetik Bulgular	65
4.2. Histolojik Bulgular.....	76
4.2.1. İmmunohistokimyasal bulgular	76
4.2.2. Elektron mikroskopik bulgular	85
4.3. Oksidan Stres Parametre Bulguları	87
4.3.1.Doku MDA düzeyleri	87
4.3.2. Doku GSH düzeyleri	88
4.3.3. Doku NOx düzeyleri	89
4.4. Böbrek Vasküler Yanıt Bulguları.....	90
4.4.1. Fenilefrin yanıtları	90
4.4.2. Angiotensin II yanıtları.....	91
4.4.3. Asetilkolin yanıtları	92
5. TARTIŞMA.....	93
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	105
KAYNAKLAR.....	107
EKLER.....	129
Ek-1. Etik Kurul Onayı	130
ÖZGEÇMİŞ	131

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Diyabetin tanı kriterleri	7
Çizelge 2.2. Diabetes mellitus'un komplikasyonları	18
Çizelge 2.3. Tip 1 ve Tip 2 diyabetin çeşitli aşamalarında GFH 'da meydana gelen azalma	21
Çizelge 2.4. DN' de gözlenen yapısal böbrek anomalileri.....	23
Çizelge 2.5. Normal fizyolojik süreçte oluşan ROT kaynakları	43
Çizelge 2.6. Antioksidan sistemlerde yer alan moleküller	46
Çizelge 4.1. Deney süresince yapılan metabolik kafes ölçümlerinin ve uygulamaların yapıldığı haftalar	66
Çizelge 4.2. Metabolik kafes düzeneğinde yapılan ölçümlerin haftalara göre değişimi	67
Çizelge 4.3. Kanda yapılan biyokimyasal incelemelerin sayısal verileri.....	74
Çizelge 4.4. İdrar analiz verileri	75
Çizelge 4.5. Böbrek kesitlerinde korteks ve medulla bölgelerinde gruplara göre, eNOS, iNOS, TGF- β , Fibronektin antikollarının skor tablosu	76

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Tip 2 diyabette insülin sekresyonu ve insülin duyarlılığı ilişkisi.	15
Şekil 2.2. Diyabetik nefropati gelişimindeki yolaklar	26
Şekil 2.3. Poliol Yolu.....	29
Şekil 2.4. Diyabetik nefropati gelişiminde metabolik yolaklar.....	31
Şekil 2.5. trans-Resveratrol ve cis-Resveratrol'ün kimyasal yapısı	32
Şekil 2.6. Resveratrol' ün biyosentetik yolağı	34
Şekil 2.7. Resveratrol' ün olası hücre koruyucu mekanizmaları	39
Şekil 4.1. Grupların metabolik kafes gözlemlerinde, AKŞ' lerindeki değişim	68
Şekil 4.2. Grupların metabolik kafes gözlemlerinde, ağırlıklarındaki değişim	69
Şekil 4.3. Grupların metabolik kafes gözlemlerinde, alınan sıvı miktarlarındaki değişim	70
Şekil 4.4. Grupların metabolik kafes gözlemlerinde, çıkarılan idrar miktarındaki değişim	71
Şekil 4.5. Grupların metabolik kafes gözlemlerinde, tokluk kan şekeri değişimi ...	72
Şekil 4.6. Kanda yapılan biyokimyasal incelemeler	73
Şekil 4.7. Böbrek dokusu MDA düzeyleri.....	87
Şekil 4.8. Böbrek dokusu GSH düzeyleri.....	88
Şekil 4.9. Böbrek Dokusu NOx Düzeyleri	89
Şekil 4.10. Böbrek Dokusu PhE Amplitüd Yanıtları	90
Şekil 4.11. Böbrek Dokusu Ang II Amplitüd Yanıtları	91
Şekil 4.12. Böbrek Dokusu ACh Amplitüd Yanıtları	92

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Oral gavaj uygulaması.....	54
Resim 3.2. Metabolik kafes düzeneği.....	55
Resim 3.3. Kan parametrelerinin incelendiği VetSCAN analyzer cihazı	56
Resim 3.4. Toplanan idrar örnekleri ve dereceli suluklar	57
Resim 3.5. Toplanan idrar örneklerinde idrar tahlil şeritleri.....	57
Resim 3.6. Ötenazi sonrası disseksiyon işlemi.....	58
Resim 3.7. Böbreğin izole organ banyosuna asılmaya hazırlanışı	59
Resim 3.8. İzole organ banyosuna asılan böbreğe farmakolojik ajanların uygulanışı	60
Resim 4.1. Böbreğe ait örneklerde eNOS bulguları.....	78
Resim 4.2. Böbreğe ait örneklerde iNOS bulguları	80
Resim 4.3. Böbreğe ait örneklerde TGF- β bulguları	82
Resim 4.4. Böbreğe ait örneklerde Fibronektin bulguları.....	84
Resim 4.5. Diyabet grubu elektron mikroskopik inceleme.	85
Resim 4.6. Diyabet+RSV grubu elektron mikroskopik inceleme.....	86

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılan bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklama

mg	Miligram
kg	Kilogram
gr	Gram
µl	Mikrolitre
nmol	Nanomol
µmol	Mikromol
M	Molar
dl	Desilitre

Kısaltmalar

Açıklama

ADA	American Diabetes Association
AKŞ	Açlık Kan Şekeri
ALB	Albumin
ALP	Alkalen Fosfotaz
ALT	Alanin Amino Transferaz
AMY	Amilaz
ANP	Atrial Natriüretik Faktör
anti-GAD	Glutamik Asit Dekarboksilaz Antikorları
BLD	Kan
BUN	Blood Urea Nitrogen (Kan üre nitrojeni)
Ca	Kalsiyum
CAT	Katalaz
CRE	Kreatinin
DAG	Diaçil Gliserol
DM	Diabetes Mellitus
DN	Diyabetik Nefropati
eNOS	Endotiyal Nitrik Oksit Sentaz

GBM	Glomerüler Bazal Membran
GDM	Gestasyonel Diabetes Mellitus
GFH	Glomerüler Filtrasyon Hızı
GLOB	Globulin
GLU	Glukoz
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GSH	Glutasyon
HbA1c	Hemoglobin A1c
HDL	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HLA	İnsan Lökosit Antijen
ICA	Islet Cell Antibody
IDDM	İnsüline Bağımlı Diabetes Mellitus
IFG	Impaired Fasting Glucose (Bozulmuş Açlık Glukozu)
IGT	Bozulmuş Glukoz Toleransı
IL-1β	interlökin-1 β
IL-6	interlökin-6
IRS	İnsulin Reseptör Substrat
K	Potasyum
KET	Keton
LADA	Yetişkin Latent Otoimmün Diyabet
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LEU	Lökosit
MDA	Malondialdehit
MHC	Major Histokompatibilite Kompleks
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
Na	Sodyum
NF-κB	Nükleer Faktör-Kappa B
NIT	Nitrit
NO	Nitrik oksit
OGTT	Oral Glukoz Tolerans Testi
PHOS	Fosfor
PI3K	3-Fosfatidilinozitol Bağımlı Protein Kinaz
PKC	Protein Kinaz C

PRO	Protein
RAAS	Renin-Anjiyotensin-Aldosteron sistemi
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
RSV	Resveratrol
SG-DEN	İdrar yoğunluğu
SOD	Süperoksit dismutaz
STZ	Streptozotosin
TBİL	Total Biluribin
TGF-β1	Transforming Growth Factor- β 1
TKŞ	Tokluk Kan Şekeri
TNF-α	Tumor Necrosis Factor- α
TP	Total Protein
UBG	Ürobilonojen
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLDL	Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein

1. GİRİŞ

Diabetes Mellitus (DM), pankreasın insülin sekresyonunun yetersizliği ve/veya dokuların insüline cevabının bozulmasıyla ortaya çıkan, protein, karbohidrat ve yağ metabolizmasını etkileyen, son yıllarda dünyada ve ülkemizde sıklığı hızla artan, yaşam kalitesini bozan, kronik metabolik bir hastalıktır [1,2].

Günümüzde yaşam koşullarının etkisi ile giderek daha sık rastlanan ve bu nedenle tedavisi ve etki mekanizmaları hakkında pek çok araştırma yapılan diyabete ilişkin deneysel çalışmalar hayvan modellerinde yapılarak, veriler insanlardaki çalışmalara ve tedavilere ışık tutmaktadır.

Streptozotosin (STZ) deneysel olarak diyabet oluşturmada sıklıkla kullanılan bir ajandır. STZ' nin diyabetojenik etkisi pankreas β hücrelerinin tahribine dayanmaktadır. STZ, glukoz oksidasyonunu bozar [3], insülin biyosentezini ve salınımını azaltır [4], pankreas β hücrelerinde DNA' da kırılmalara sebep olur [5], aynı zamanda süperoksit, hidrojen peroksit, hidrojen radikali gibi oksijen türevlerini de aktive eder [6-8].

Diyabette protein glikasyonu ve glukoz otooksidasyonu sonucu serbest radikallerin oluşumu artar. Diyabetin kronik komplikasyonlarının etyopatogenezinde artmış oksidan stresin önemli rol oynadığı düşünülmektedir [9].

Diyabetin akut komplikasyonları arasında; diyabetik ketoasidoz, hiperosmolar koma, hipoglisemi, laktik asidoz sayılabilir. Kronik komplikasyonları ise genel olarak makro ve mikrovasküler düzeydedir. Makrovasküler komplikasyonlar arasında hipertansiyon, kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıklar ile periferik arter hastalığı yer alırken, nöropati, retinopati ve nefropati mikrovasküler komplikasyonlarını oluşturur [10].

Diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarından olan diyabetik nefropati (DN), süreklilik gösteren mikroalbuminüri, erken kan basıncı yükselmesi, glomerüler filtrasyon hızı (GFH)' nda düşme, yüksek kardiyovasküler morbidite ve mortalite riski

ile karakterize kronik bir hastalıktır [11]. DN gelişiminde hipertansiyon kritik öneme sahiptir. Glomerüler kapillerdeki yüksek basınç destek hücrelerinde mekanik strese neden olur ve kollajen gibi matriks elemanlarının sentezini uyarır.

Hem hiperglisemi hem de mekanik stres önemli bir intraselüler medyatör olan protein kinaz C (PKC) aracılığıyla sitokinleri ve büyüme faktörlerini [transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)] ve vascular endothelial growth factor (VEGF)' ü] stimüle ederek hücre içi sinyal yollarını aktive eder [12].

DM' da renal hasarın ilerleyici atrofiye neden olduğu, diğer nefropatilerden farklı olarak proteinürinin geliştiği ve GFH' nın azaldığı evrede bile, nefronda hipertrofi olduğu görülür. DN, glomerüloskleroz ve mezangial matriks artışı ile karakterizedir. Genel olarak büyüme faktörlerinin, DN gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir. TGF- β 1' in DN' de yapımı ilk ve en yüksek oranda artan büyüme faktörü olduğu saptanmıştır [13].

DN' de hiperfiltrasyon ve artmış intraglomeruler basınç gibi hemodinamik mekanizmalar renal hasarın ortaya çıkması ve ilerlemesiyle ilişkilidir [14].

Literatürde tek doz STZ enjeksiyonundan 6 hafta sonra diyabetik sıçanlarda serumda kan üre nitrojeni [blood urea nitrogen (BUN)], kreatinin, kolesterol, nitrit/nitrat konsantrasyonunun yükseldiği, böbrek ağırlığının ve idrarda protein çıkışının arttığı tespit edilmiştir [15].

Son zamanlarda sık çalışılan antioksidanlardan olan, Resveratrol (RSV) (3,4',5-trihydroxystilbene) stilbenlerin alt grubu olup; üzüm, şarap, yer fıstığı ve yaban mersininde bulunan polifenolik bir bileşiktir [16]. RSV antidiyabetik etki gösterir. Diyabetik hayvanlarda yapılan çalışmalarda RSV' ün intrasellüler glukoz transportunu insülinin bağımsız olarak uyararak anti hiperglisemik etkiler oluşturduğu [17] izole sıçan pankreas hücrelerinde insülin sekresyonunu azalttığı, pankreas β hücrelerini koruduğu belirtilmektedir [18]. Yine pankreas dokusunu koruyucu etkileri interlekin-1 β (IL-1 β), interlekin-6 (IL-6), tümör necrosis factor- α

(TNF- α) gibi stokin aktivasyonunu inhibe etmesi, nükleer faktör-kappa B (NF- κ B) ve nitrik oksit (NO) üretimini arttırması ile de ilişkilendirilmektedir [19].

STZ ile diyabet yapılan sıçanlarda 8 haftalık RSV uygulaması ile diyabete bağlı olarak artan, kan glukoz, kreatinin, trigliserit ve kolesterol değerlerinin düştüğü, idrar çıkışının azaldığı, immünohistokimyasal olarak yapılan incelemede glomerüler bazal membran kalınlığında (GBM) azalma olduğu, diyabete bağlı olarak artan glomerüler Fibronektin, kollajen IV ve TGF- β ekspresyonunun RSV tedavisi sonrası azaldığı ifade edilmektedir [20].

Şener ve ark. wistar albino sıçanlarda RSV' ün serbest radikalleri yakalama ve antioksidan etkinliği ile Glutasyon (GSH) düzeyinin korunmasını sağlayarak renal dokuyu iskemi-reperfüzyon hasarındaki oksidatif strese karşı koruduğunu göstermişlerdir [21].

Palsamy ve arkadaşları STZ diyabetik sıçanlarda 30 gün süreyle 5 mg/kg RSV uygulamasının karaciğer dokusunda diyabete bağlı olarak artan proinflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , IL-1B, IL-6) ve NO düzeyini düşürdüğü, yine lipid peroksidasyonu azalttığı buna karşılık doku GSH, Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) ve Glutasyon peroksidaz (GPx) enzim düzeylerini yükselttiğini bildirmişlerdir [22].

Literatürdeki bu bilgilerden yola çıkarak bu tez çalışmasında, STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda, önemli bir antioksidan olan RSV' ün diyabetin geç dönem komplikasyonlarından olan DN üzerine olan etkilerini morfolojik, biyokimyasal ve fonksiyonel olarak incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diabetes Mellitus

2.1.1. Diabetes mellitus'un tanımı

Diabetes eski Yunanca' da sifon anlamına gelir ve aşırı idrar yapımını anlatır. Mellitus ise yine eski Yunanca'da "bal" anlamına gelen "mel" kelimesinden geliştirilmiştir [23].

DM, vücudun hiç insülin üretmemesi, yeterli düzeyde insülin üretememesi veya insülini tam anlamıyla kullanamamasından kaynaklanan hiperglisemiye neden olan karbonhidrat, lipid ve protein metabolizma bozukluğu ile karakterize bir hastalıktır [24]. DM' da hipergliseminin karakteristik semptomları, polidipsi (sık su içme), poliüri (sık idrara çıkma), kilo kaybı, nadiren polifaji (sık acıkma) ve görmede bulanıklıktır [24,25].

DM' un etkileri uzun süreli hasar, fonksiyon bozukluğu ve çeşitli organların hasarını içerir. En ağır semptomlarında ketoasidoz veya nonketotik hiper osmolar durumlar gelişebilir ve baygınlık koma durumlarına yol açabilir, efektif bir tedavi yokluğunda ölüme bile neden olabilir. DM' un uzun dönem etkileri, potansiyel körlük beraberinde retinopatinin spesifik komplikasyonları, böbrek hasarına yol açan nefropati, ayak ülseri ve amputasyon beraberinde nöropati, Charcot joints ve seksüel disfonksiyonu da içeren otonomik disfonksiyon özelliklerinin ilerleyici gelişimini içerir [24].

2.1.2. Diabetes mellitus'un tarihçesi

DM' un tarihçesi çok eskilere uzanır. Milattan 1500 önce Mısır Ebers Papiruslarında fazla idrar yapılan, idrar yoluyla şeker kaybedilen bir hastalık olarak tanımlamıştır.

Diyabet terimi *Aretaeus of Cappadocia* tarafından bulunmuştur. Bu terim, *dia* yani "ayrı" ya da "boydan boya" ön eki ve *bainein* yani "yürümek" ya da "ayakta durmak" fiilinin birleştirilmesiyle oluşturulmuş *Diabainein* "bacakları ayırarak yürümek", ya da "bacakları ayırarak oturmak" anlamına gelir. Bu durumda, bu kelimedenden türetilen diabetes kelimesi ise "bacaklarını ayırarak yürüyen" ya da daha spesifik olarak

kullanıldığında “pergel gibi ya da sifon” anlamlarına gelmektedir. Diabetes kelimesinin “sifon” anlamı taşıması, aşırı derecede idrara çıkmanın eşlik ettiği bir hastalığı isimlendirmekte kullanılmasının asıl nedenidir.

1625 yılında Thomas Willis tatlı ya da bal anlamına gelen Latince *mellis* kelimesini, bu hastaların idrarlarının tatlı olduğunu belirtmek için “mellitus” şeklinde eklemiştir. 1776 yılında Matthew Dobson idrarın tatlı olmasının diyabet hastalarının kanlarındaki ya da idrarlarındaki bir tür aşırı şeker yüzünden oluştuğunu kanıtlamıştır [26]. *Aretaeus* diyabetli yaşamı; kısa, iğrenç ve acılı olarak tanımlamıştır [27].

M.S. 11. yüzyılda İbn-i Sina, diyabetin birbirinden farklı iki tipinin olduğunu belirtmiş, ilk kez diyabetik gangreni tanımlamıştır. Diyabet tanısı koyduğu hastalarını modern zamanda hala kullanımı olan idrar şeker atılımını azaltan zerdeçal, acı bakla ve çemenle tedavi etmiştir [28].

1860’ da Langerhans’ ın pankreas adacıklarını, 1875’ te Claud-Bernard’ ın diyabetin nöro-hormonal mekanizmasını, 1889’ da V. Mering ve Minkowski’ nin pankreatomiyle diyabet oluşumunu ortaya koyarak şeker hastalığının merkez organını tanımlamalarından sonra 1922’ de Charles Herbers Best ve Frederic Grant Banting pankreas ekstresi ve insülini keşfetmeleriyle hastalığının tedavisine yeni boyutlar getirmişlerdir [29].

Diyabetin böbrek üzerindeki etkilerinden ilk kez 1936 yılında, Kimmelstiel ve Wilson’ un glomerüllerde hyalen nodül oluşumunu gözlemledikleri ve bunu “*Nodular glomerulosclerosis*” olarak isimlendirdikleri çalışmalarında söz edilmiştir. 1942’ de Bell diffüz glomerüloskleroza tanımlayarak, DN patogeneğinde arteriolar lezyonların önemine işaret etmiştir. Lunbaeck nefropati ve retinopatisi olan diyabet vakalarında küçük damarlarda lezyonları gözlemlemiş ve ilk defa “diyabetik mikroanjyopati” terimini kullanmıştır [30].

2.1.3. Diabetes mellitus'un epidemiyolojisi

Küresel olarak 2010 yılı itibariyle yaklaşık olarak 285 milyon diyabet hastası olduğu ve vakalarında yaklaşık %90' nının Tip 2 diyabetli olduğu saptanmıştır [31]. Uluslararası Diyabet Federasyonu verilerine göre, dünyada 2013 yılında yaklaşık 381 milyon diyabet hastası bulunmaktadır [32]. Sıklığı hızla artmakta olup, 2030 yılında bu sayının iki katına çıkması öngörülmektedir [33]. Ülkemizde ise 2010 yılında diyabetin görülme sıklığı %7,4 iken, 2030 yılında bu oranın %9,6 olacağı öngörülmektedir [34]. Türkiye Diyabet Epidemiyoloji (TURDEP) çalışma sonuçlarına göre ülkemizde Tip 2 Diyabet oranı %7,2 olarak belirlenmiştir [35]. Fiziksel aktivite artışı, diyetle yapılacak değişiklikler ve farmakolojik tedavilerle diyabetin görülme sıklığı azaltılabilir [36].

2.1.4. Diabetes mellitus'un tanısı ve tanı kriterleri

Diyabet genellikle açlık plazma glukozu, 2 saatlik tokluk plazma glukozu değerlendirildikten sonra oral glukoz tolerans testi (OGTT) ile teşhis edilir [37]. Son zamanlarda International Expert Committee diyabetin 3. tanı kriteri olarak Hemoglobin A1c' yi (HbA1c) eklemişlerdir [38].

Çizelge 2.1. Diyabetin tanı kriterleri [37]

HbA1c $\geq 6.5\%$. Test Ulusal Glikohemoglobin Standardizasyon Programı (National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) onaylı ve standart Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) tahlil yöntemi kullanılarak laboratuvarında yapılmalıdır. *
veya
Açlık plazma glukozu ≥ 126 mg/dL (7.0 mmol/L). Açlık, en az 8 saat hiç bir kalori alımının olmaması olarak tanımlanır.*
veya
2. saat plazma glukozu ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L). OGTT süresince. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından tarif edildiği gibi su içerisinde çözülmüş 75 gr anhidroz glukoz kullanılarak bu test yapılmalıdır.*
veya
Hiperglisemik kriz veya hipergliseminin klasik semptomlarının görüldüğü bir hastada rastgele plazma glukoz ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L).
*Açık hiperglisemi yokluğunda sonuçlar tekrarlanan testlerle teyit edilmelidir.

Çizelge 2.1.' de belirtilen kriterlerden birinin bulunması durumunda diyabet tanısı konur. İlk 3 kriterden biri ile birlikte belirgin hiperglisemi semptomlarının bulunmaması durumunda bu kriterlerden biri farklı bir günde tekrarlanmalıdır [39].

Tanı kriteri olarak HbA1c

HbA1c, hemoglobin molekülünün beta zincirinin amino terminal grubuna glikoz molekülünün kimyasal olarak bağlanması sonucu , hem zincir içi hem de amino terminalindeki valin birimleri aracılığıyla glikozilasyona uğraması neticesinde oluşur [40].

HbA1c standartizasyonundaki problemler ve tanı eşik değerindeki belirsizlik nedeniyle diyabet tanısının konulmasında uzun yıllar kullanılması önerilmemiş bir kriterdir. Açlık plazma glukoz düzeyi ile diyabet tanısı almamış bazı hastalarda OGTT ile diyabet tanısı konulurken, HbA1c düzeylerinin normal olduğu saptanmıştır. Ancak son yıllarda tüm dünyadaki standartizasyon yönündeki çabalar HbA1c 'nin diyabette bir tanı kriteri olarak kullanılabilmesini ortaya koymuştur [41]. HbA1c testi NGSP ile sertifikalandırılmış DCTT göre standardize edilmiş bir yöntemle çalışılmalıdır. HbA1c açlık gerektirmediği, daha yüksek preanalitik istikrar sağladığı ve stres, hastalık gibi durumlarda da yapılabildiği için açlık plazma glukozu ve OGTT' ne göre daha önemli avantajlar sağlamaktadır [37].

HbA1c düzeyleri hastaların ırk ve etnik köken farklılıklarına göre değişiklik gösterebilir. Glikolizasyon oranları ırklara göre değişiklik gösterebilir [42]. Bazı anemi ve hemoglinopatiler varlığında HbA1c düzeylerini yorumlamak problemli. Gebelik, kan kaybı ve kan transfüzyonu gibi normal olmayan eritrosit döngüsünün olduğu durumlar veya bazı anemi durumlarında diyabet tanısı için yalnızca kan glukoz kriteri kullanılmalıdır [37].

Diabetes mellitus ve glukoz metabolizmasının diğer bozukluklarında tanı kriterleri

Standartize yöntemlerle ölçülen HbA1c seviyelerinde değerlendirme;

HbA1c $\geq 6,5$ "aşikar diyabet"

HbA1c $\geq 5,7-6,4$ “diabetes mellitus riski oldukça yüksek”

Açlık kan şekeri (AKŞ) göre glukoz homeostazı değerlendirme;

AKŞ ≥ 126 mg/dl olduğu seviyeler “aşikar diyabet”

AKŞ 100-125 mg/dl arasında olduğu seviyeler “bozulmuş açlık glukozu”

AKŞ < 100 mg/dl den düşük olduğu seviyeler “normal”

OGTT de 2. saat plazma glukozu (PG) seviyelerinde ise değerlendirme ;

PG < 140 mg/dl olduğu seviyeler “normal”

PG 40-199 mg/dl olduğu seviyeler “bozulmuş glukoz toleransı”

PG ≥ 200 mg/dl olduğu seviyeler “aşikar diyabet”

Bozulmuş açlık glukozu (IFG, impaired fasting glucose) ve bozulmuş glukoz toleransını (IGT, impaired glucose tolerance) Amerikan Diyabet Birliği (American Diabetes Association, ADA) tarafından prediyabet olarak tanımlanmaktadır [41,43].

2.1.5. Diabetes mellitus’un sınıflaması

ADA 2007 kriterlerine göre; [41,43].

I. Tip 1 diyabet (Genellikle mutlak insülin eksikliğine bağlı β hücre yıkımı vardır)

A. İmmün aracılı

B. İdiyopatik

II. Tip 2 diyabet (İnsülin direnci zemininde ilerleyici insülin sekresyon defekti ile karakterizedir.)

III. Diğer özel tip diyabetler

Beta hücresinin genetik hastalıkları

- MODY 1 (Kromozom 20, HNF-4 α)

- MODY 2 (Kromozom 7, glukokinaz)
- MODY 3 (Kromozom 12, HNF-1 α)
- MODY 4 (Kromozom 13, IPF-1)
- MODY 5 (Kromozom 17, HNF 1 β)
- MODY 6 (Kromozom 2, Neuro D1)
- Mitokondrial DNA 3243 mutasyonu
- Diğerleri

İnsülin etkisindeki genetik defektler

- Tip A insülin direnci
- Leprechaunizm
- Lipoatrofik diyabet
- Rabson-Mendenhall Sendromu

Pankreasın ekzokrin doku hastalıkları

- Pankreatit
- Travma /pankreatektomi
- Neoplazi
- Kistik Fibrozis
- Hemokromatozis
- Fibrokalkuloz Pankreatopati

Endokrinopatiler

- Akromegali
- Cushing Sendromu
- Glukagonoma
- Feokromasitoma
- Hipertiroidizm
- Somatostatinoma
- Aldosteronoma

İlaçlar ve kimyasal madde etkileri

- Vakor
- Pentamidin
- Nikotinik Asit
- Glukokortikoidler
- Tiroid Hormonu
- Diazoksit
- β -adrenerjik agonistler
- Tiazidler
- Dilantin
- Diğerleri (Post transplant diyabet)

Enfeksiyonlar

- Konjenital Rubella
- CMV
- Diğerleri (Adenovirus, Kabakulak)

İmmün mekanizmalar

- Anti-insulin reseptor antikorları
- “Stiff man” sendromu
- Diğerleri

Diğer genetik sendromları

- Down Sendromu
- Klinefelter Sendromu
- Turner Sendromu
- Wolfram Sendromu
- Friedreich ataksisi
- Huntington koresi
- Laurence-Moon-Biedl Sendromu

- Miyotonik distrofi
- Porfiriya Prader-Willi Sendromu

IV. Gestasyonel diyabet (Gebelik sırasında ortaya çıkan ve genellikle doğum sonrası düzelen diyabet)

Tip 1 diabetes mellitus

İnsüline bağımlı diabetes mellitus (IDDM) , Tip 1 diyabet, veya juvenil başlangıçlı diyabet olarak isimlendirilen diyabetin bu tipi; pankreasın β hücrelerinin otoimmün aracılı yıkımına bağlı, insülin tedavisinin ömür boyu zorunlu olduğu, aksi taktirde ketoasidoz, koma ve ölümün görülebileceği diyabet tipidir. β hücrelerinin yıkımına, genetik yatkınlık, immünolojik faktörler ve hala tam olarak tanımlanamamış çevresel faktörlerin neden olduğu düşünülmektedir [44]. β hücreleri, glukoz düzeylerini saptamada önemli rol oynar ve fizyolojik glukoz düzeylerini muhafaza etmek için insülin salgılayan glukoz sensörü olarak işlev görür [45].

ADA, etyolojik kriterleri dikkate alarak otoimmünitenin varlığına göre Tip 1 diyabeti iki alt gruba ayırmıştır.

- I. *Tip 1A:* Otoimmün diyabet. Adacık otoantikörleri pozitifdir ve insülitis tablosu görülür. Diyabetli hastaların %90 'nını oluşturur.
- II. *Tip 1B:* Otoimmünitenin olmadığı diyabet. Ağır insülin yetersizliğinin olduğu formlar olup genetik özellikleri bilinmemektedir ve diyabetli hastaların %10' unu oluşturur [46].

Tip 1 diyabet hastalarının %85-90' nında diyabetik hiperglisemi ilk tespit edildiğinde, adacık hücresi otoantikörleri (islet cell antibody, ICA), glutamik asit dekarboksilaz antikörleri (anti-GAD) ve insülin antikörlerinin bulunması (IAA), tirozin fosfataz, IA-2 β ve IA-2, β hücre harabiyetine neden olan otoimmün hasarın bulgularıdır [45,47].

Bu otoimmün süreci bir enfeksiyon özellikle viral enfeksiyonlardan koksaki B, kabakulak, konjenital rubella, ebstein barr virus, retro virüs veya çevresel bir uyarının tetiklediği düşünülmektedir. Normal glukoz toleransı hastalığının ilk

evrelerinde korunmasına rağmen β hücre yıkımı artmaya, insülin salınımı giderek düşmeye başlar [43]. β hücrelerinin yıkımı, bazı hastalarda oldukça hızlı iken bazılarında yavaştır [44]. Hızlı ilerleyen formu sıklıkla çocuklarda görülür ancak yetişkinlerde de ortaya çıkabilir [48]. Klinik tablonun glukoz intoleransından belirgin diyabet semptomlarına dönmesi ise insülin ihtiyacının arttığı enfeksiyon veya ergenlik gibi durumlarla olur. Otoimmün hasarın kalan sağlam hücreleri de yıkması mutlak insülin yokluğu ile sonlanır [43].

Tip 1 diyabetin, “Latent otoimmün diabetes in adults (LADA)” adı verilen yavaş ilerleyen, Tip 2 diyabete benzerlik gösteren, mutlak insülin yetmezliği bulunmayan fakat otoantikörlerin bulunduğu, genellikle yetişkinlerde ortaya çıkan otoimmün bir çeşidi de bulunur [49,50]. Bazı hastalarda, özellikle çocuklar ve gençlerde hastalığın ilk bulgusu ketoasidoz olarak ortaya çıkar. Hastalar zayıftır, genellikle; polidipsi, poliüri, kilo kaybı gibi semptomlar ve çok yüksek glukoz değerleri ile başvururlar. Ayrıca bu hastalar; Graves hastalığı, Hashimoto tiroiditi, pernisyöz anemi, Addison gibi diğer otoimmün hastalıklar açısından risk taşırlar [39,43,50].

Tip 1 idiyopatik diyabet, bilinen herhangi bir etiyolojiye sahip değildir. Bu hastaların bazılarında kalıcı insülinopeni ve ketoasidoz eğilimi olmasına, rağmen otoimmünitenin herhangi bir kanıtı yoktur [51]. Bilinmeyen nedenlerle β hücre kaybı ve insülin yetmezliği gelişir. Bu hastalarda ketoasidozise yatkınlık vardır [24]. Afrika ve Asya kökenli bireyler arasında hastalığın bu formu daha yaygındır [52].

Tip 1 diabetes mellitus'un genetiği

Tip 1 diyabet oluşumunda genetik faktörlerin etkisi oldukça fazladır. Tip 1 diyabet genetiğinde Major Histokompatibilite Kompleks (MHC) bölgesi önemli bir rol oynamaktadır. Son 20 yıldır MHC içerisinde birçok genin hastalıkla ilişkili baskın bir bölge olduğu bilinmektedir. MHC sınıf I, MHC sınıf II ve MHC sınıf III olarak 3 gruba ayrılır. Her sınıf özel fonksiyonlara sahip genleri içerir [45]. MHC sınıf I antijenler, İnsan Lökosit Antijen (HLA), HLA-A, HLA-B, HLA-C serileridir. MHC sınıf II antijenler HLA DR, HLA DQ, HLA DP serileridir. MHC I ve II sınıfları, Tip 1 diyabet gelişimindeki yatkınlığın % 45-60 'ından sorumlu tutulmaktadır [53,54]. MHC sınıf III kompleman sisteminin bazı bileşenleri, çözünebilir proteinler ve bunların hedef

hücre membranlarında bulunur [45]. HLA genleri, yani doku antijenleri tüm hücrelerimiz üzerinde bulunan antijenlerdir ve doku tipini belirlerler. Ayrıca Tip 1 diyabette genetik yatkınlıktan sorumludurlar. Özellikle makrofajlar, monositler, dendritik hücreler ve lenfositler üzerinde yer alırlar [55,56].

Tip 2 diabetes mellitus

DM 'un dünya genelinde en yaygın olan, prevalansı gittikçe artan ve diyabet tanısı alan bireylerin yaklaşık %90 'nını kapsayan tipidir [57,58]. Tip 2 diyabet kronik ilerleyen ve sinsi seyreden bir hastalıktır. Pek çok hastada başlangıçta çok fazla semptom gözlenmez. Hastalar genelde polidipsi, poliüri, polifaji veya iştahsızlık, halsizlik, çabuk yorulma, ağız kuruluğu gibi yakınmalardan ziyade bulanık görme, el ve ayaklarda uyuşukluk gibi kronik komplikasyon ile ilgili semptomlardan yakınırırlar. Genellikle 30 yaş üzerinde başlamakla birlikte son yıllarda obezitenin artışına bağlı olarak çocukluk ve adolesan çağlarında da Tip 2 diyabet sıklığının artış gösterdiği gözlenmektedir [41,59].

Pankreas β hücrelerinin yeterli miktarda insülin üretememeleri ile birlikte gelişen insülin direnci, Tip 2 DM 'a neden olabileceği gibi; genetik yatkınlık, düşük doğum ağırlığı, erken yaşta gebelik, ilerlemiş yaş, beslenme alışkanlıkları, obezite ve hareketsiz hayat tarzı gibi çevresel ve davranışsal faktörler de Tip 2 DM' un oluşumunda etkilidir [60].

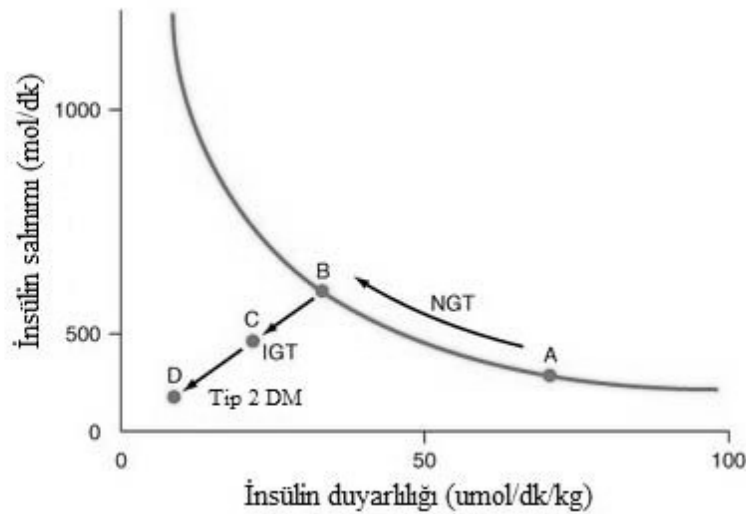
Kas, karaciğer ve yağ dokusu gibi hedef dokuların insüline olan cevabının azalması olarak tanımlanan insülin direnci, Tip 2 diyabet gelişiminin altında yatan en önemli defektlerden biri olup hastalarda en göze çarpan bulgudur. Hastaların yaklaşık %85' inde insülin direnci bulunur [61]. Bu dirence karşı β hücreleri normalden fazla insülin salgılayarak, kan glukoz düzeylerini normal aralığında tutmaya çalışır. Direncin artması insüline duyarlı dokularda glukoz kullanımının azalmasına, karaciğerden glukoneogenez ile glukoz yapımının uyarılmasına ve sonucunda hiperglisemiye neden olur. Karaciğerde glukoz üretiminin artması açlık kan glukoz düzeylerinin yükselmesine, periferik glukoz kullanımının azalması da tokluk hiperglisemisine neden olur. Yağ hücrelerindeki insülin direnci adipositlerde lipolizi uyarır, serbest yağ asitleri salınır bunun sonucu olarak da hepatositlerde lipid sentezi artar.

Dislipidemi gelişir. Yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) azalır, çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL), trigliserid yükselir [43].

Böbrekte insülinin, renal tübüler tuz ve su absorpsiyonunu kolaylaştırdığı bilinir ve bu nedenle artmış insülin, hipertansiyon gelişimine katkıda bulunabilir. Damar düz kasında artmış insülinin, reseptörü ile etkileşerek endotel proliferasyonunu arttırabileceği ve ateroskleroz gelişimi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir [61].

İnsülin direnci, insülin üretiminden reseptörlerine bağlanmasına ve daha sonra post reseptör olaylara kadar herhangi bir aşamada görülebilir [62].

Genetik komponentlere bağlı olduğu düşünülmele birlikte; obezite, yaşlanma ve hareketsiz yaşam tarzı gibi faktörlerin de, insülin direncinin gelişimine ve sonuçta Tip 2 diyabete katkıda bulunduğuna inanılmaktadır [61].



Şekil 2.1. Tip 2 diyabette insülin sekresyonu ve insülin duyarlılığı ilişkisi [63]

Tip 2 diyabet hastaları sıklıkla obez veya kiloludur (beden kitle indeksi (BKİ) > 25 kg/m²); ancak yağlı hastalar zayıf olabilir [41]. Santral tip obezite daha sık görülür. Tedavisinde, diyet, egzersiz, oral antidiyabetikler (insülin duyarlaştırıcı ilaçlar, insülin sekretogogları, alfa glukozidaz inhibitörleri) gibi çeşitli basamaklar vardır. İlk aşamada insülin tedavisi önerilmez. Hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıklar, dislipidemi ve polikistik over sendromu gibi hastalıklar eşlik edebilir [41,49].

İnsülinin salınım mekanizması

İnsülin glukoz homeostazisinin kontrolünde ve dokuların büyümesinde gelişmesinde önemli bir role sahip anahtar hormondur [64]. Pankreasta hormon yapan ve salan adacık hücreleri bulunur. Bunlara “Langerhans adacıkları” denir. Langerhans adacıklarında üç tip hücre bulunur. Bunlardan alfa (α) hücreleri glukagon hormonu, beta (β) hücreleri insülin hormonu ve gama (γ) hücreleri somatostatin hormonu sentezlerler ve salarlar [65]. İnsülin inaktif, tek zincirli öncü, preproinsülin olarak pankreatik β hücreleri tarafından salgılanır. İnsülinin salgı vezikülleri içine geçişini yönlendiren preproinsülinin amino ucunda bir sinyal dizisi bulunur. Bu sinyal dizisinin proteolitik olarak çıkarılması (uzaklaştırılması) proinsülinin oluşumu ile sonuçlanır ve proinsülin pankreatik hücrelerdeki salgı granüllerinde depolanır. Kan glikoz düzeyi veya amino asit konsantrasyonunda bir artışa yanıt olarak, proinsülin salgılanır ve özel proteazlar aracılığıyla aktif insülin haline dönüştürülür. Aktif insülin molekülü, iki disülfid bağı ile bir arada tutulan, A ve B zincirlerinden meydana gelen küçük bir proteindir [58].

İnsülinin birincil rolü glukoneogenez ve glikojenoliz ile hepatik glukoz üretimini azaltmak, bunun yanı sıra kas ve adipoz hücrelerin içine glukoz taşınmasını uyarak glukoz homeostazını kontrol etmektir. İnsülin ayrıca karaciğer ve yağ hücrelerinde lipid sentezini artırarak lipid metabolizmasını düzenler. Bununla birlikte insülin protein sentezi ve aminoasitlerin alımı için de gereklidir [66]. Normal insülin sinyali tirozin kinaz alt ailesine ait spesifik bir insülin alıcısının, aktivasyonu aracılığıyla gerçekleşir [67]. İnsülin hücre içindeki etkisini reseptörünün tirozin kinaz aktivitesi ile hem kendisini hem de başka proteinleri tirozinler üzerinden fosforillemesi yoluyla gösterir. İnsülin molekülü, reseptörün α alt ünitesine bağlanır, α alt ünitesi uyarıyı membrandan hücre içerisinde bulunan β alt birimine iletir. β alt birimlerinin tirozin kinaz aktivitesini harekete geçirir ve her bir $\alpha\beta$ monomeri, dimerdeki eşine ait β alt biriminin karboksil ucuna komşu kritik tirozin kalıntılarını fosforiller. Bu otofosforilasyon aktif bölgeyi açığa çıkartarak enzimin insulin reseptör substrat-1 (IRS-1) gibi diğer hedef proteinlerinin tirozin kalıntılarını fosforillemesine izin verir.

İnsülin reseptör ailesinin insulin sinyal iletiminde rol oynadığı bilinen 4 üyesi vardır. (IRS-1, IRS-2, IRS-3, IRS-4) IRS-1 ve IRS-2 glukoz taşınması için en önemi olan üyeleridir [68-70]. Fosforile tirozin kinazın IRS-1 ve IRS-2 'ye bağlanmasıyla 3-fosfatidilinozitol bağımlı protein kinaz (PI3K) ve hücrel yanıtlar ortaya çıkar [71]. İnsülin sinyalizasyonunda iki farklı yol vardır. Birincisi PI3K yolağı, ikincisi ise mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz yolağıdır (MAPK) [72].

Diğer özel tip diyabetler

Diyabetin bu formunun pek çoğu β hücre monogenetik defekti ile ilişkilidir. Gençlerde görülen olgunluk başlangıçlı diyabet (maturity-onset diabetes of the young, MODY), ebeveynlerden gelen genetik bir defekt sonucu gelişen nadir görülen bir hastalıktır. MODY glukokinaz eksikliği ile ilişkili olup, MODY 1 kromozom 20 ile MODY 2 kromozom 7 ve MODY 3 ise kromozom 12 ile bağlantılıdır. Genellikle normal kilolu kişilerde 25 yaş öncesi teşhis edilir. MODY bazen Tip 2 diyabetin bir formu ya da ikincil diyabet olarak sınıflandırılır, ancak sıklıkla ayrı bir durum olarak kabul edilmektedir [73].

Diyabet; insülin etkisinin genetik defektleri, pankreasın ekzokrin hastalıkları (pankreatit, travma, enfeksiyon, pankreas kanseri), glukagon, adrenalin, kortizol ve büyüme hormonu gibi insülin antagonisti hormonların aşırı üretimlerine neden olan endokrinopatiler (glukagonoma, cushing sendromu, feokromasitoma ve akromegali) sonucu gelişebilir. Ayrıca anti-insülin reseptör antikoru da insülin reseptörlerine bağlanarak diyabet gelişimine neden olabilmektedir. Bununla birlikte, bazı durumlarda, bu antikoru reseptörüne bağlandıktan sonra bir insülin agonisti olarak hareket edebilir ve böylece hipoglisemiye neden olabilir. Anti-insülin reseptörü sistemik lupus eritematozus ve diğer otoimmün hastalıkları olan hastalarda bulunur. Down sendromu, Klinefelter sendromu, Turner sendromu gibi çeşitli kromozomal anomaliler de yine diyabet gelişimine yol açabilir [74].

Gestasyonel diabetes mellitus

Gestasyonel DM (GDM), ilk olarak gebelik sırasında ortaya çıkan, değişken şiddette hiperglisemi ile sonuçlanan glukoz intoleransının olduğu metabolik bir durumdur.

Genellikle gebeliğin ilk ve ikinci trimesterinde kan glukoz düzeyleri normalken, 3. trimesterde kan glukoz düzeylerinde artış gözlenir [75]. ADA, gebe kadınların % 4'ünde yani yılda yaklaşık 135.000 kadında GDM tespit edildiğini bildirmiştir. Ancak bu oran farklı toplumlarda %1 ile %14 arasında değişmektedir [76]. GDM risk faktörleri, hormonal değişiklikler, aile öyküsü, obezite, ileri anne yaşı, glikozüri, açıklanamayan ölü doğum öyküsü, gizli şeker öyküsü, polikistik over sendromu gibi nedenlerdir. Anne için çoğunlukla hayati tehlikesi yoktur ancak GDM, hipoglisemi ve makrozomiya (büyük boy bebek) bağlı artmış neonatal mortalite ve morbidite riski ile ilişkilendirilmektedir [77]. Ayrıca hem anne hem de bebek için preeklampsi, bebeğin beklenenden erken doğması, makrozomi, bebeğin sarılık ve solunum güçlüğü gibi sorunlarla doğmasına neden olabilir [73].

2.1.6. Diabetes mellitus'un komplikasyonları

Çizelge 2.2. Diabetes mellitus'un komplikasyonları [49]

1. Akut (Metabolik) Komplikasyonlar A. Diyabetik ketoasidoz B. Hiperosmolar non-ketotik koma C. Laktik asidoz koması D. Hipoglisemik koma
2. Kronik (Dejeneratif) Komplikasyonlar A. Mikrovasküler Hastalıklar: • Diyabetik Retinopati • Diyabetik Nefropati • Diyabetik Nöropati (Simetrik Periferik Nöropati, Mononöröpati, Otonomik Nöropati) B. Makrovasküler Hastalıklar • Koroner Arter Hastalığı • Serebrovasküler Hastalıklar • Periferik Damar Hastalıkları
3. Diğer Komplikasyonlar A. Dermatolojik B. Genitoüriner bozukluklar (seksüel disfonksiyon, üropati) C. Gastrointestinal bozukluklar (gastroparezi, diyare)

Akut komplikasyonlar

Diyabetin akut komplikasyonları yaşamı tehdit edebilecek düzeyde ciddi olabilir bu nedenle zamanında müdahale oldukça önemlidir. Akut komplikasyonların sıklığı tedavi olanaklarının gelişmesi ile beraber önemli ölçüde azalmıştır ve eskisi kadar önemli bir mortalite nedeni değildir. Kronik komplikasyonların riski hipergliseminin süresine bağlı olarak artar. Tip 2 diyabet sinsi seyirli bir hastalık olduğundan hastalarda uzun bir süre herhangi bir semptom gözlenmeyebilir. Tanı aldıklarında genellikle kronik komplikasyondan bir veya bir kaç gelişmiş olabilmektedir [78].

Kronik komplikasyonlar

Makrovasküler komplikasyonlar

Arter duvarlarının daralmasına yol açan ateroskleroz, makrovasküler komplikasyonların patolojik mekanizmalarından en önemlisidir. Aterosklerozun koroner veya periferik vasküler sistemde arter duvarında kronik inflamasyon ve zedelenme sonucu olduğu düşünülmektedir. Zedelenme ve inflamasyona yanıt olarak, arterlerin endotelial duvarında, Ang II' nin teşvik ettiği düşünülen, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) birikimi gözlenir. Aynı zamanda trombosit adezyon ve agregasyonu artmış, fibrinoliz aktivitesi azalmış ve kan viskozitesi artmıştır. Bütün bunlar ateromalı hastalarda intravasküler tromboza ortam yaratan faktörlerdir [79]. Kardiyovasküler hastalıklara bağlı mortalite ve morbidite oranı diyabet hastalarında diyabet olmayan hastalara göre belirgin olarak artmıştır [80].

Mikrovasküler komplikasyonlar

Diyabetin kronik mikrovasküler komplikasyonlarından olan diyabetik retinopati, oldukça yaygın görülen bir hastalıktır. Diyabetik retinopati veya diyabetin diğer mikrovasküler komplikasyonlarının gelişme riski hipergliseminin şiddetine ve süresine bağlıdır. Hipertansiyonda ayrıca önemli bir risk faktörüdür [81]. Gelişmiş ülkelerde halen 20-74 yaş arasında önde gelen körlük nedenlerinden biri olup, diyabetli hasta grubunda sağlıklı bireylere göre körlük gelişme riski 25 kat daha fazladır [82]. Prevelansı Tip 1 diyabetiklerde yüksek, insülin kullanmayan Tip 2

diyabetiklerde ise düşüktür. Diyabetik retinopatide, kan viskozitesinde, trombosit agregasyonunda ve kapiller permabilitede artış sonucunda retinada mikrooklüzyonlar ve iskemik alanlar gelişir [83,84]. Nonproliferatif ve proliferatif olmak üzere iki evresi vardır. Nonproliferatif dönemde retinopati evresi tüm vakaların yaklaşık %90-95' ini oluştururken, preproliferatif dönemde retinopati evresi tüm vakaların yaklaşık %5-10' unu oluşturur. Bu dönemde venöz genişlemelere, retinal perisit kaybına, retinal kan akımında değişikliklerin gelişmesine ve retina içi kanamalara bağlı olarak retinal mikroanevrizmalar ve retinal iskemi gelişir. Proliferatif retinopati döneminde ise retinal hipoksiye cevap olarak neovaskülarizasyon görülmeye başlanır. Papilla ve retinada yeni damar oluşumları gözlenir. Yeni oluşan damarlar optik sinir ve makulaya yakın yerlerde oluşur, kolay rüptüre olur. Fibrozis, viterus içi kanamalar ve neticesinde retina dekolmanı görülür. Nonproliferatif retinopatili hastaların %8-10' u 10 sene içerisinde proliferative retinopatiye dönüşür [43,49,82,85].

Diyabetin kronik mikrovasküler komplikasyonlarından bir diğeri olan diyabetik nöropati, diyabete bağlı olarak gelişen periferik sinir disfonksiyonudur. Diğer mikrovasküler komplikasyonlarda olduğu gibi, diyabetik nöropati gelişme riskinde de hipergliseminin şiddeti, süresi ve bazı kişilerde genetik yatkınlık önemli rol oynamaktadır. Periferik sinir hasarında hipergliseminin doğal mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber, poliol birikimi, ileri glikasyon son ürünleri (AGEs) ve oksidatif stresle ilişkili olduğu düşünülmektedir [81].

Diyabetik periferik nöropati; duysal, fokal / multifokal ve otonomik nöropatiler dahil olmak üzere birçok farklı biçimde görülebilir [86]. En sık görülen formu özellikle alt ekstremiteleri etkileyen distal simetrik sensöryel polinöropatidir. Sıklıkla distal his kaybı ile ortaya çıkar. En sık görülen semptomlar karıncalanma, uyuşma ve özellikle geceleri artan yanmalardır. Çoğu zaman aşil refleksi baştan itibaren alınamaz, vibrasyon duyusu da erkenden kaybolabilir Otonomik nöropati kardiyovasküler, gastrointestinal, genitoüriner ve birçok metabolik sistemi bir arada etkileyebilir [43,49].

2.2. Diyabetik Nefropati

Kimmelstiel-Wilson sendromu, nodüler glomerülosklerozis, interkapiller glomerülonefrit olarak bilinen DN, 3-6 ay arayla en az iki kez doğrulanan albüminüri (>300 mg/gün veya >200 μ g/dk) ,GFH' da kalıcı ve geri dönüşümsüz azalma ve arteriyel hipertansiyon ile karakterize klinik bir sendromdur [87].

Bu sendrom ilk defa 1936 yılında İngiliz doktor Clifford Wilson ve Amerikalı doktor Paul Kimmelstiel tarafından tanımlanmıştır [88].

Çizelge 2.3. Tip 1 ve Tip 2 diyabetin çeşitli aşamalarında GFH 'da meydana gelen azalma

GLOMERÜLER FİLTRASYON HIZINDA AZALMA (ml / dak / yıl)		
	Tip 1 Diyabet	Tip 2 Diyabet
Normoalbuminüri	1,2 – 3,6	0,96
Mikroalbuminüri	1,2 – 3,6	2,4
Proteinüri	9,6 - 12	5,4 -7,2

DN, son dönem böbrek yetmezliğinin (SDBY) önemli bir nedeni olup, sıklığı giderek artan önemli bir sağlık sorunudur [89]. Diyabete bağlı gelişen morbidite ve mortalitenin başlıca nedenidir [90]. Avrupa ve Amerika'da Tip 1 DM hastaların %30-50' sinde, Tip 2 DM hastalarının %5-15' inde DN gelişir [91]. DN, diyabetin geç bir bulgusu gibi görünmekle beraber, DN' den önce fizyolojik, patolojik ve klinik belirtiler olur. Bu durum bazı araştırmacıların DN' yi aşamalar şeklinde düşünmelerine neden olmuştur [92].

Diyabet tanısı alan bir hastanın normoalbuminüriden mikroalbuminüriye, mikroalbuminüriden DN' ye, nefropatiden SDBY' liğine yıllık ilerleme hızı sırasıyla % 2.0, % 2.8 ve % 2.3 dür [93]. DN gelişimi için risk faktörleri; hiperglisemi, hipertansiyon, dislipidemi, sigara, aile öyküsü, ve renin-anjiyotensin-aldesteron aksını etkileyen gen polimorfizmi gibi genetik faktörlerdir [43]. Tip 1 ve Tip 2 diyabette böbrek lezyonlarının patolojisi benzer olmakla birlikte Tip 1 diyabette nefropatinin gelişmesinde ve ilerlemesinde hipergliseminin payı büyüktür ve genellikle hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıklar, nefropati geliştikten sonra oluşur [92].

2.2.1. Diyabetik nefropatinin epidemiyolojisi

İdrarda albuminin küçük bir miktarının varlığının, Tip 1 ve Tip 2 DM hastalarındaki böbrek hasarının gelişiminde rol oynadığı 1980' lerin başlarında gösterilmiştir. DN, Tip 1 diyabet hastalarının %30' unda ve Tip 2 diyabet hastalarının %50' sinde gözlenir. Etnik faktörler Tip 2 diyabetli hastalar arasındaki DN insidansını etkiler. Örneğin Meksikalı veya Afrikalı Amerikalılar da ve Pima yerlilerinde insidans % 40-60 iken Beyaz ırkta %10- 20 dir. Bunda genetik yatkınlık, diyet ve hipertansiyonun rol oynaması muhtemeldir [94,95].

2.2.2. Diyabetik nefropatinin evreleri

DN, Mogensen ve Christensen tarafından tanımlanan beş evreden oluşur.

Evre 1 (Hiperfiltrasyon ve hipertrofi evresi): Hastalığın başlangıcından itibaren 5 yıl içerisinde gelişir. Böbreklerin boyutu yaklaşık %20 oranında büyümüştür. Albuminüri ve kan basıncı normal aralığında iken, renal plazma akımı %10-15 oranında artmıştır. Bu dönemdeki GBM' da hafif kalınlaşma dışında önemli bir morfolojik değişiklik olmadığı ortaya konulmuştur. Normogliseminin sağlanması ile birlikte nefropati daha ileri klinik evrelere geçmeden geriler [96-99].

Evre 2 (Sessiz dönem): Klinik bulgunun olmadığı; ancak bazal membran kalınlaşması ve mezengial proliferasyon gibi morfolojik değişiklikler ile karakterize olan bu evre hastalığın başlangıcından yaklaşık 2 yıl sonra başlar. Morfolojik değişimler renal biyopsi ile gösterilebilir. GFH yavaşça azalarak normal düzeylerine döner. Bazı hastalar ömrünün sonuna kadar bu evrede kalırlar [96-99].

Evre 3 (Mikroalbuminürik evre veya başlangıç DN evresi): Glomerüler hasarın saptanabilen ilk klinik evresidir. Genellikle hastalığın başlangıcından sonra 5-10 yıl içinde oluşur. Bu dönemde GFH normaldir. Üriner albümin ekskresyonu mikroalbuminürik düzeyde, yani 30-300 mg/24saat veya 20-200 mg/dk arasındadır. Bu dönemde birçok hastada hipertansiyon sınırına varmayan progresif kan basıncı artışı gözlenir. İyi glisemik kontrol, protein kısıtlaması (<0,8 gr/kg/gün) ve antihipertansif tedavi (özellikle anjiyotensin converting enzyme (ACE) inhibitörleri ve

Anjiotensin Reseptör Blokerleri) ile üriner albümin ekskresyonu artışı azaltılarak klinik nefropatiye gidiş süresi geciktirilebilir [99].

Evre 4 (Aşık DN evresi): Kronik böbrek yetmezliğinin dönüşümsüz evresidir. İnatçı (persistan) proteinüri ($>0,5$ g/gün) ile karakterizedir. Serum kreatin düzeyi normal veya hafif artmıştır. GFH ayda 1 ml/dk kadar azalır. GFH azaldıkça, hipertansiyon gözlenir. Antihipertansif tedavi ile GFH 'daki azalma %60 azaltılabilir ve böylece üremi gelişimi geciktirilebilir. Tercih edilen antihipertansif ACE inhibitörleri ve Anjiotensin Reseptör blokerleridir. Bu evre sıklıkla ciddi retinopati, nöropati, ve periferik - koroner vaskülopati ile birlikte [96-99].

Evre 5 (Son dönem böbrek yetmezliği evresi): GFH' nda belirgin bir azalmayla karakterizedir. Proteinürinin başlangıcından itibaren 5 ile 20 sene içinde yaklaşık olarak da 7 sene içinde ortaya çıkar. Kan basıncını kontrol etmek güçleşir. Hemen hepsinde büyük damar komplikasyonları (Mönckeberg sklerozu) gelişir. Koroner vasküler hastalık en sık ölüm nedenidir. Hastaların yaklaşık% 50'sinde böbrek replasman tedavisi gerekir. (periton diyalizi, hemodiyaliz, böbrek nakli) GFH 15-20 ml/dk'nin altına indiğinde hasta renal replasman programına alınmalıdır [96-99]. DN' nin ilk aşamalarında, artan böbrek boyut ve değişen Doppler göstergeleri morfolojik hasarın erken bulguları olabilir. Proteinüri ve GFH hasarın derecesinin en iyi göstergeleridir [100].

2.2.3. Diyabetik nefropatide patolojik değişiklikler

DN, böbreğin tüm alanlarında yapısal değişikliklerin gelişimine neden olur. (Çizelge 2.4.) [101].

Çizelge 2.4. DN' de gözlenen yapısal böbrek anomalileri

- Glomerülosklerozis (Diffüz, Nodüler)
- Mezengiyal genişleme
- Glomerüler ve Tübüler bazal membran kalınlaşması
- Endotiyal köpük hücreleri podosit anomalileri
- Fibrin kap lezyonu
- Kapsüler drop lezyonu
- Armani- Ebstein hücreleri
- Tübüler atrofi
- İnterstisyel fibrozis
- İnterstisyel inflamasyon
- Aterosklerozis

Diyabetin başlangıcından itibaren yaklaşık 1-2 yıl içerisinde böbrekte yapısal değişiklikler görülmeye başlar. GBM, glomerüllerin visseral epitelinde sentezlenen kollajen benzeri bir proteindir Kas, deri ve retina bazal membranında da kalınlaşma olur [102]. GBM' da kalınlaşma, hipertansiyon ve yaşlanmayla birlikte de gelişebileceğinden belirtilen diğer bulgular olmadan DN tanısını koymak zordur. GBM kalınlaşması ekstrasellüler matriks birikimine ve tip IV kollajen, laminin ve fibronektin gibi normal ekstrasellüler komponentlerin çökmesine bağlı olarak gelişir. Negatif yüklü filtrasyon bariyeri oluşturduğu düşünülen heparan sülfat kısmının kaybı ile de GBM kompozisyonu değişir. Hiperglisemi, podositler ve GBM birleşim sürecini etkileyen integrinin ekspresyonunda değişikliklere neden olur [101].

İnsan çalışmaları podosit sayısındaki azalma takibinin proteinüri ile ilişkili olduğunu göstermektedir [103]. Vestra ve ark. Avrupalı beyaz normoalbuminürik Tip 2 DM hastalarında , glomerulus başına düşen podositlerin sayısal yoğunluğunda önemli bir azalma olduğunu göstermişlerdir [104]. Hatta her yaştan diyabetli hastalarda kısa süre içinde glomerulus başına düşen podositlerin azaldığı gözlenmiştir [105]. Podosit hasarı, glomerülosklerozun tübülointerstisiyel hasar gelişiminden önce gerçekleşir [106].

Diyabetin erken dönemlerinde filtrasyon alanında meydana gelen artışa bağlı olarak GFH 'da artış olur; ancak zamanla mezengiyal genişleme glomerüler kapillerleri sınırlar, yapılarında bozulma meydana gelir GFH düşmeye başlar [107]. Artan mezengiyum boyutları ile süperfisiyal kapillerler arasında ters bir orantı söz konusu olduğundan mezengiyum boyutları arttıkça, glomerülün filtrasyon yüzeyi azalır, diffüz glomerüloskleroz oluşur. Mezangiyal genişleme Tip IV kollajen ve fibronektin gibi ekstrasellüler matriks proteinlerinin birikimi ile başlar, hücre sel büyüme ile devam eder [28,108]. Mesangiyal genişleme, mesangiyal sklerozise doğru ilerler ayrıca bazı vakalarda nodüler glomerüloskleroz veya Kimmelstiel-Wilson nodülleri olarak isimlendirilen eozinofilik PAS (+) materyal birikimi gözlenir [109]. Eozinofilik materyal çoğunlukla Tip IV kollajenden oluşur, ama bazen çizgili kollajen ve az miktar fibronektin de mevcut olabilir [110].

Glomerüler kapiller basıncında artma (intraglomerular/ glomerüler hipertansiyon) böbrek yapısı ve fonksiyonunda, önemli değişikliklere neden olur. Glomerüler hipertansiyon; endotel, mezengiyal, podosit hasarına yol açarak tübüler lümene protein filtrasyonunun artmasına, tübülointersitisyel inflamasyon ve fibrozis gelişimine yol açar [84,90]. Hipertansiyonun devamlı olmasının mezengiyal hücrelerde mekanik gerime neden olarak, ekstraselüler matriksin aşırı üretimine, GBM filtrasyon bariyerlerinde bozulmaya neticede proteinüri ve glomeruloskleroz gelişmesine neden olduğu düşünülmektedir [97,108].

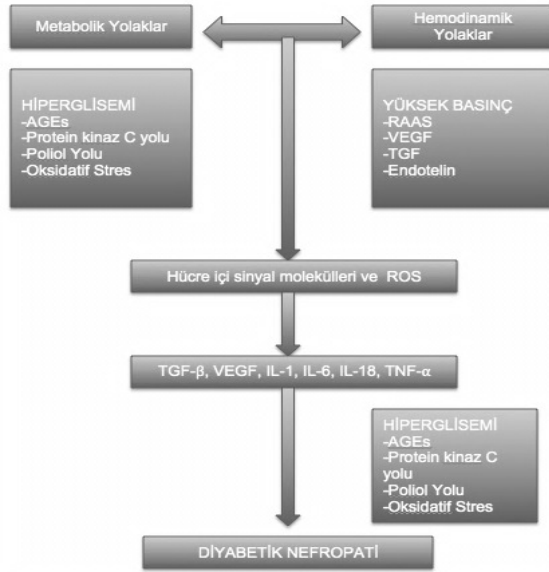
Eksüdatif lezyon ya da fibrin kap olarak bilinen hyalinotik lezyon, DN' de sık görülür. Bu lezyon endotel hücreleri arasında ve GBM' da hyalin birikimi ile karakterizedir. Bu lezyon geliştikçe kapiller lümeni tıkar. Lipid yüklü makrofajlar ve lipid damlacıkları bazen bu lezyonların içerisinde bulunabilir [110].

Elektron mikroskopik incelemelerinde, tübüler hücrelerin sitoplazmasında beta partikülleri gibi glikojenin biriktiğini gösterilmiştir. Bu hücreler normal çekirdeğe sahiptir; ancak hücre içi organelleri periferine doğru itilmiştir. Tübüler hücrelerde glikojen birikimi, artmış tübüler glikoz reabsorbsiyonunu yansıtır ve glikojen içeren bu şeffaf iri hücrelere Armanni-Ebstein hücreleri denilmektedir. Glikojenle dolu tübüler hücreleri ilk kez 1983 de Ehrlich göstermiş, Kimmelstiel ve Wilson tarafından diyabetik glomeruloskleroz keşfedilinceye kadar bu lezyon diyabetik böbrekte bilinen tek anatomo-patolojik bozukluk olarak kabul edilmiştir [111].

2.2.4. Diyabetik nefropatinin patogenezi

DN 'nin erken değişimleri olan intraglomerüler basınç artışı ve hiperfiltrasyon ilk kez 1959' da Stadler ve Schmidt tarafından tarif edilmiştir [112].

DN gelişiminde patofizyolojik mekanizmalar multifaktöriyeldir. Hiperglisemi; glomerüler hiperfiltrasyon, glomerüler ve tübüler epiteliyal hipertirofi ve mikroalbuminüri gibi yapısal ve fonksiyonel değişikliklere neden olan, GBM kalınlaşması, mezengial matriks artışı aşikar proteinüri ve sonuç olarak glomerulosklerozis ve SDBY gelişimini başlatan durumlardır [101].



Şekil 2.2. Diyabetik nefropati gelişimindeki yollar

Hemodinamik yollar

Hemodinamik değişiklikler olan hiperfiltrasyon, hiperperfüzyon DN gelişiminde anahtar rol oynar ve patolojik süreçte glisemik kontrolün zayıf olduğu erken dönemde görülür. Afferent arteriollerde, efferentlere göre daha belirgin şekilde görülen vazodilatasyon intraglomerular basınç artışına (glomerular hipertansiyona) neden olur. Hiperperfüzyon ve hiperfiltrasyonun aynı zamanda Prostanoidler, NO, atrial natriüretik faktör (ANP), VEGF, TGF- β 1, Renin-Anjiyotensin-Aldosteron sistemi (RAAS), glukagon, insülin ve özellikle Ang II ve endotelin gibi faktörlere bağlı olduğu söylenmektedir [28,101]. Bu erken hemodinamik değişiklikler, glomerüler kapillerlerden albümin kaçağını, mezengial matriksin aşırı üretimini, GBM kalınlaşmasını ve podosit hasarını kolaylaştırır [113].

Diyabetik vasküler bozukluklarda TGF- β anahtar role sahiptir. Mekanizma endotiyal nitrik oksit sentaz (eNOS) mRNA sentezinin upregülasyonu ve arginin resentezinin artması ile NO üretiminin artışıdır. Bu erken hemodinamik değişiklikler albüminin glomerül kapillerlerinden süzülmesine, aşırı mezengiyal matriks üretimine neden olur bunun yanında glomerüler podositlerin hasarlanmasını ve bazal membran kalınlaşmasını kolaylaştırır. Glomerüler hemodinamik değişimlerin neden olduğu kayma gerilimi (shear stress) ve mekanik zorlanma, sitokinler ve büyüme faktörlerinin otokrin ve / veya parakrin salınımına neden olur [114]. Hemodinamik

stres, sitokinler ve büyüme faktörlerinin lokal aktivasyonu ile DN' de yapısal değişikliklere neden olur. Proksimal tübüller veya Henle kulbunda sodyum klorür geri emiliminin artışı GFH' da artışa neden olur [115].

Glomerüler hipertansiyon ve hiperfiltrasyon DN gelişimine katkıda bulunur. Renin-Anjiyotensin blokerlerinin kullanılması böbrek fonksiyonu ve morfolojisini koruyucu etkiye sahiptir. Renin-anjiyotensin blokerleri; Ang II' nin profibrotik etkilerini, TGF- β 1 stimülasyonunu zayıflatarak antagonize eder [116]. DN' nin altında yatan bu profibrotik etki, hayvan deneyi çalışmaları ile de gösterilmiştir [117].

Prediyabetik sıçanlarda Renin-Anjiyotensin sisteminin geçici bir süre (7 hafta) bloke edilmesinin proteinüriyi azalttığı, glomerüler yapıyı düzelttiği gözlenmiştir. Buna ilaveten, ACE inhibitörü verilen nefropatili Tip 1 diyabet hastalarında TGF- β 1 serum konsantrasyonunun azaldığı gözlenmiştir [118]. Serumda ve idrarda düşük TGF- β 1 seviyeleri ile renal korunma birbiriyle korelasyon içindedir ve zaman içinde değişim gösteren GFH ile tanımlanır [119].

Metabolik yolaklar

Hiperglisemi ve ileri glikolizasyon son ürünleri

Glomerüler ve mezengiyal hücrelere etkisinden dolayı hiperglisemi, DN gelişiminde kritik bir öneme sahiptir; ancak tek başına yeterli değildir. Mezangiyal hücreler glomerüller kapiller yapıyı korumanın yanında düz kas aktivitesi ile de glomerüler filtrasyonu düzenler. Hipergliseminin, mezengiyal hücre artışı ve hipertrofisi bunun yanı sıra mezengiyal matriks üretimi [120,121] ve bazal membran kalınlaşması ve mezengiyal hücre apoptozisi [122,123] ile ilişkili olduğu yapılan in vitro çalışmalar ile gösterilmiştir. Mezengiyal genişlemenin kısmen hücre içi glukoz konsantrasyonunun artışına bağlı olduğu, bu etkinin normal kan glukoz düzeyleri sağlandığında GLUT1 ve GLUT4 gibi glukoz taşıyıcılarının ekspresyonunu artırarak hücre içine glukoz girişini arttırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [121].

Hiperglisemi DN gelişiminde tek başına bir risk faktörü değildir. Diyabetik olmayan donörlerden alınan böbrekler, diyabeti ve buna bağlı nefropatisi gelişmiş hastalara

transplante edilmiş ve glukoz kontrolünden bağımsız olarak DN geliştiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Hiperglisemi renal hasara yol açmada gerekli; ancak yeterli değildir [119].

Hipergliseminin doku hasarına nasıl yol açtığını açıklayan mekanizmalar;

- I. Proteinlerin non enzimatik glikasyonu ile oluşan ileri glikasyon son ürünleri (AGEs)
- II. Protein kinaz C aktivitesi
- III. Poliol yolu (Aldoz redüktaz yolu)
- IV. Sitokinler ve Büyüme Faktörleri
- V. Oksidatif Stres

Oksidatif stresin tüm yollarda merkezi bir rol oynadığı kabul edilmektedir [119].

I. Glikozilasyon

Doku proteinlerinin glikozilasyonu, DN ve diğer mikrovasküler komplikasyonların gelişimine katkıda bulunur. Hiperglisemi, yaşlanma sürecinde ve vasküler komplikasyonların gelişiminde önemli rol oynayan, geri dönüşümsüz olarak intraselüler ve ekstraselüler proteinlerin serbest amin kalıntılarına glukoz bağlanması ile gerçekleşen glikozilasyon mekanizması ile AGEs oluşumuna neden olur. Bu nonenzimatik süreç GBM ve diğer matriks bileşenlerini etkiler. Başlangıçta geri dönüşümlü erken glikosilasyon son ürünlerinin oluşumuna, daha ileriki dönemde geri dönüşümsüz AGEs oluşumuna neden olur [63].

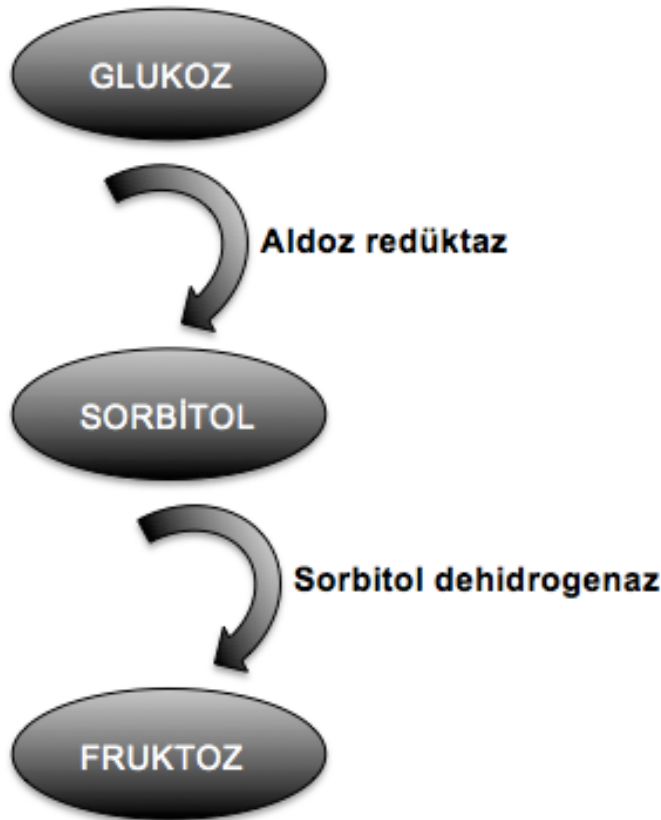
AGEs etki mekanizması üç şekilde görülür [63].

1. Yapısal proteinlerin glikosilasyonu disülfid çapraz bağ sayısını artırır. Bu da matrix oluşumunu, makromoleküllere geçirgenliği etkiler, degradasyon ve turnover bozulur
2. Reseptöre bağlanarak diyabetik böbrek etyolojisinde etkin role sahip çeşitli sitokinleri (TGF- β 1, IL 1, TNF, VEGF) aktive eder.
3. NO' in vazodilatör ve antiproliferatif etkisini inhibe ederler.

II. Protein kinaz C aktivitesi

PKC aktivasyonu, hipergliseminin neden olduğu doku hasarının başlıca araçlarının biridir, diyabetik komplikasyonlara yol açan çeşitli hücresele olayları etkilemektedir. PKC, aktivasyonu vasküler geçirgenliğin artmasına, hücre dışı matriks bileşenlerinin artmış sentezine ve reaktif oksijen türlerinin (ROT), üretiminin artmasına yol açar [87]. Hiperglisemi ile diaçil gliserol (DAG) aşırı aktiflenir ve PKC' yi uyarır. PKC aktivasyonu korunmuş tireonin ve tirozin kalıntılarının ikili fosforilasyon yoluyla hücre dışı uyaranlara yanıt olarak MAPK aktivitesini indükler. Yüksek glukoz konsantrasyonları varlığında, PKC ve MAPK' ın koaktivasyonu enzimlerin, bu iki aile bağlantılı olduğunu gösterir [119]. Vazodilatatör prostanooidlerin (prostaglandin E2, prostasiklin) salınımını artırarak glomerüler hiperfiltrasyona katkıda bulunur [49]. TGF- β 1 aktivasyonu ile mezengiyal hücrelerin ekstrasellüler matriks yapımını artırır [49,114].

III. Poliol yolu (Aldoz redüktaz yolu)



Şekil 2.3. Poliol Yolu

Aldoz redüktaz ile, glukozun sorbitole dönüştürülmesi ve daha sonra sorbitol dehidrogenaz ile fruktoza dönüştürülmesi poliol yolunda meydana gelmektedir [101].

Dolaşımda glikozun artması aldoz redüktazın artmasına, böylece dokularda sorbitol birikimine neden olur [49]. Glomerüler ve tübüler hücrelerde sorbitolün artması, Na-K-ATPaz aktivitesini azaltarak osmoregülasyonun bozulması neticesinde hücre şişmesine ve non-enzimatik glukozillenmeye daha uygun olan fruktozun, artmasına yol açar ve doku hasarına neden olur. Ayrıca sorbitolün artışıyla NADPH azalır ve glutatyon metabolizması bozularak, serbest oksijen radikalleri artar. Bunun sonucunda vasküler hasar artar ve NO vazodilatör yanıtı azalır [124]. Bu teori insanlarda aldoz redüktaz inhibitörleri kullanılarak test edilmiş, ancak retinopati, nöropati veya nefropati klinik sonuçlanım noktalarında faydalı etki gösterilememiştir [125].

IV. Sitokinler ve büyüme faktörleri

Çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler, kemokinler ve vazoaktif ajanların DN' de yapısal değişikliklerle ilişkili olduğu gösterilmiştir. IGF, DN' de yaygın ve en erken üzerinde çalışılan büyüme faktörleri arasındadır ama kesin rolü halen belirsizdir. Hipergliseminin renal IGF-I proteininin erken ve geçici bir artışına hipergliseminin neden olduğu çok çeşitli hayvan modellerinde gösterilmiştir [101].

TGF- β , DN' de mezangiyal matriks genişlemesine ve böbrek hipertrofisine neden olan profibrotik bir büyüme faktörüdür. TGF- β ' nın yüksek seviyeleri STZ ile oluşturulmuş diyabetik sıçanların glomerüllerinde ölçülmüştür [126]. TGF- β izoformlarını ve reseptörlerini kodlayan mRNAlar tüm glomerüler hücre tiplerinde ve proksimal tübülüslerinde bulunur. İn vivo ortamda glomerül endotelial ve mesangiyal hücrelerinden ekstrasellüler matriks yapımını uyarır [49].

VEGF' nin aşırı ekspresyonu vasküler endotel geçirgenliğini, endotel hücre proliferasyonunu ve göçünü, transendotelial elektrik direncini azaltır, ve matriks-bozucu proteazın etkinliğini artırarak diyabetik renal hastalıklara neden olur. VEGF' nin aşırı ekspresyonu, GBM kalınlaşmasına katkıda bulunan kollajen zincirlerinin

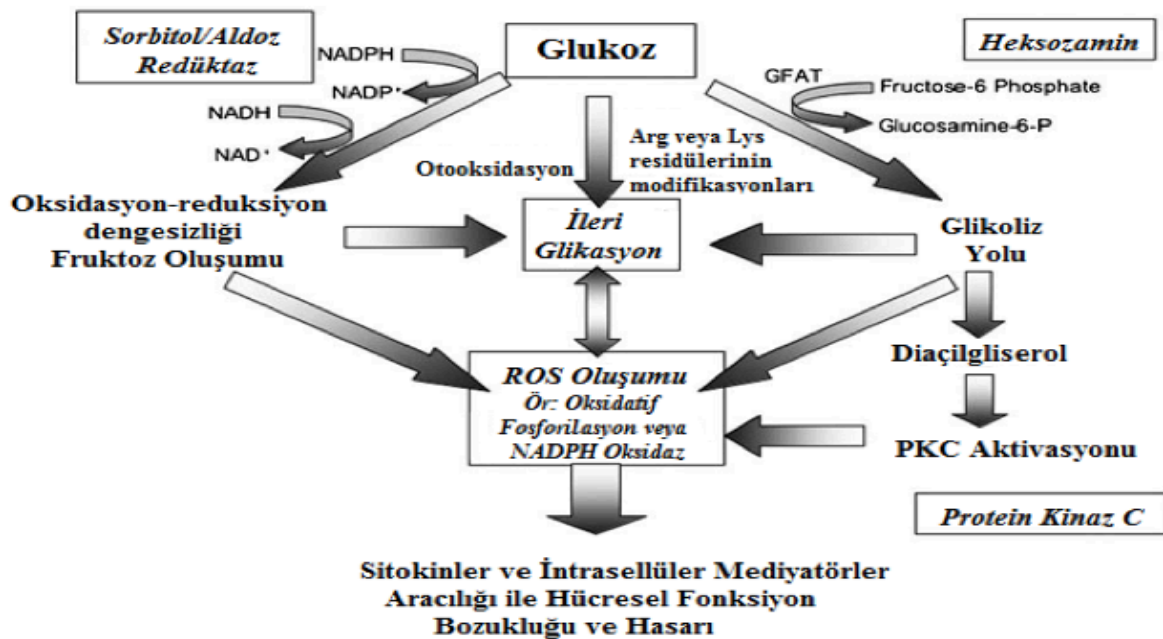
üretimini artırır [127,128].

V. Oksidatif Stres

Hiperglisemi diyabetik komplikasyonların öncüsü gibi görünmekle birlikte, patofizyolojik sürecin bütün komplikasyonlarda etkili olup olmadığı halen tam olarak bilinmemektedir [125].

DN gelişiminde diyabetik komplikasyonların yanı sıra oksidatif ve glikooksidatif (karbonil) stresin katkısının varlığı üzerine AGEs artışı gibi birçok bulgu vardır. AGEs ekstrasellüler proteinlerin glikozilasyonu yolu ya da glikozun intrasellüler metabolizasyon yolu esnasında meydana gelir ve böylelikle reaktif dikarbonil prekürsörleri oluşur [129,130]. AGEs oluşuktan sonra, reseptör bağımlı yollarla ROT hücresel oluşumunu artırarak oksidatif strese katkıda bulunurlar [131].

Deneyisel diyabette, renal kortekste MDA (lipid peroksidasyonu markeri) artışı, glomerülde 8-OHdG (nükleik asit oksidasyonu artışı gösteren indeks) artışı, renal kortekste GSH azalması ve glomerülde ROT 'ların artmış üretimi, NADPH oksidaz ve Hem-oksijenaz-1 aktiviteleri artışı, renal oksidatif stresin artmasının kanıtı olarak gösterilmiştir [132,133].



Şekil 2.4. Diyabetik nefropati gelişiminde metabolik yollar

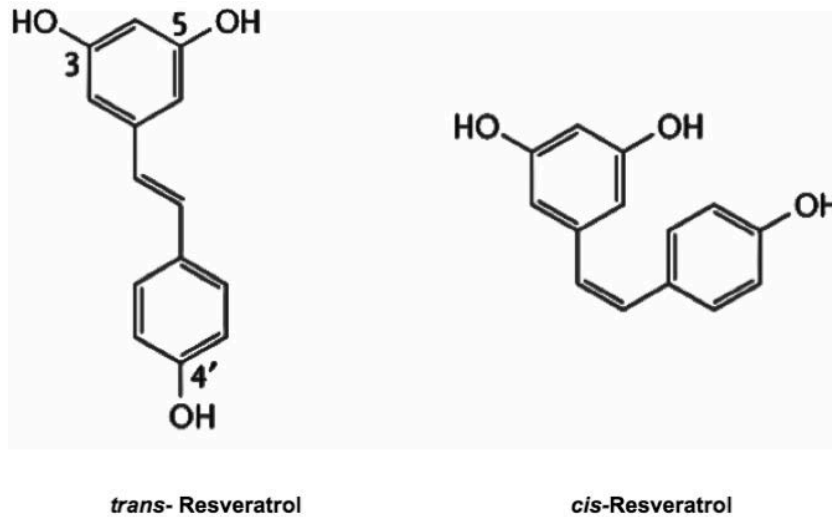
2.3. Resveratrol

2.3.1. Resveratrol'ün tanımı ve tarihçesi

RSV, (3,4',5-Trihydroxy-trans-stilbene), üzüm, kırmızı şarap, yer fıstığı, asma yaprağı, keçi boynuzu, böğürtlén ve yaban mersininde bulunan fitoaleksín özelliği gösteren stilben grubu bir bileşiktir [134,135].

Phytoalexin yunanca bir terim olup, “phyton” bitki; “alexein” koruyucu anlamına gelmektedir. Bulunduğu çeşitli bitkileri, büyüme gelişme aşamalarının herhangi bir evresinde soğuk hava koşulları, ultraviyole ışınları, yaralanma, bakteri-mantar enfeksiyonları gibi stres durumlarıyla karşılaştıklarında koruma amaçlı bir özelliğinin olmasının yanı sıra, son yıllarda antifungal, antimikrobiyal, antitümöral gibi etkileriyle insanlarda da koruyucu etkiler ortaya koyduğu anlaşılmıştır [135].

RSV, cis ve trans olmak üzere iki izomere sahip, yağda çözünebilen bir bileşiktir. Biyolojik aktiviteleri açısından değerlendirildiğinde, *trans* izomerlerinin *cis* izomerlerine göre daha yüksek aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir. ultraviyole ışığı varlığında, *trans*-resveratrol cis-resveratrole dönüşmektedir [136,137].



Şekil 2.5. *trans*-Resveratrol ve *cis*-Resveratrol'ün kimyasal yapısı

RSV ilk olarak 1940 yılında beyaz karacaotu (*Veratrum grandiflorum*) köklerinden izole edilmiştir. Daha sonra 1963 yılında, Çin ve Japon tıbbında kullanılan “Ko-ko-

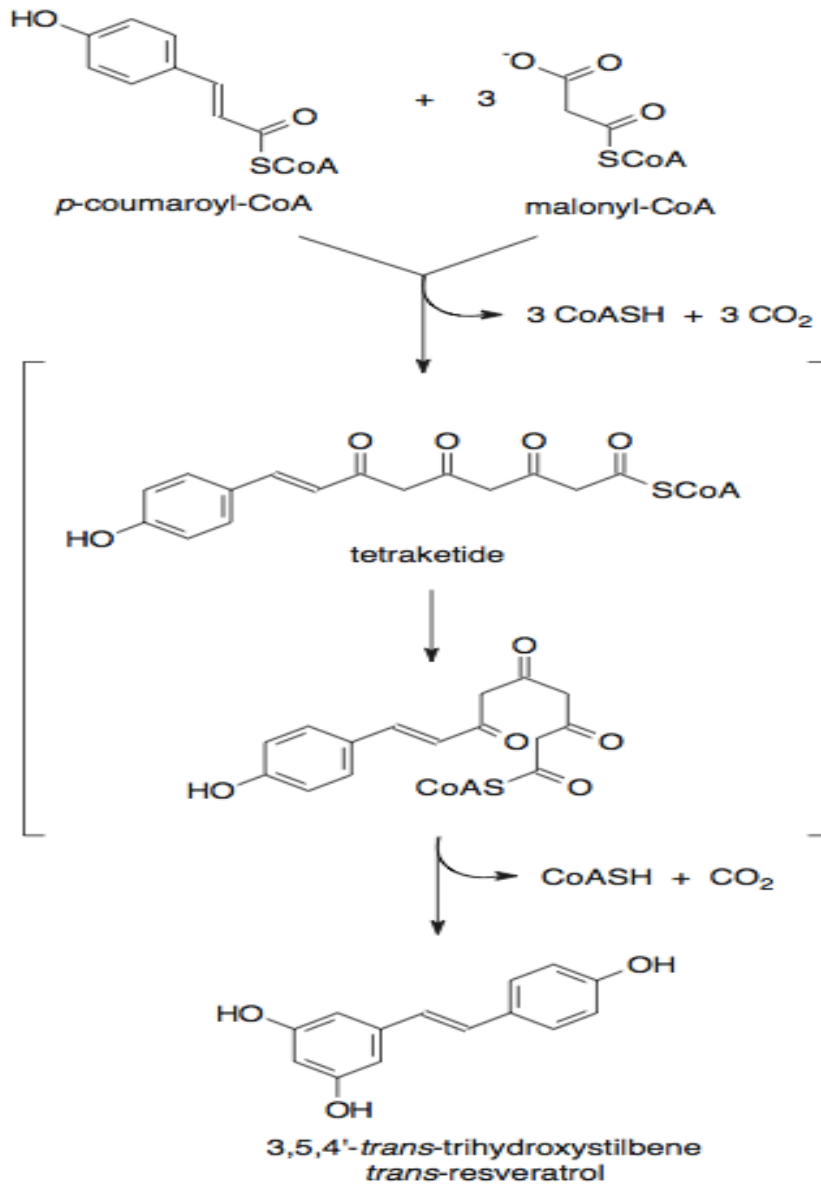
jon” olarak bilinen, *Polygonum cuspidatum* bitkisinin köklerinden; [138] insandaki mantar hastalıklarının, iltihabi hastalıkların, hipertansif hastalıkların, alerjik hastalıkların ve lipid metabolizması hastalıklarının tedavisinde kullanılmak üzere izole edilmiştir [139]. 1976’ da Langcake ve Pryce adlı araştırmacılar tarafından, üzüm yaprakları (*Vitis vinifera*) ve üzüm tanelerinde saptanmıştır. [140,141]. RSV’ ün şarapta bulunduğunu ise ilk kez Siemann ve Creasy adlı araştırmacılar göstermişlerdir [142].

RSV’ ün en yüksek oranda kırmızı ve siyah üzümde bulunduğu gösterilmiştir. Kırmızı şarap içinde de bulunan RSV’ ün vazodilatör, antihiperlipidemik, antienflamatuvar, antiagregan, östrojen agonisti ya da antagonisti özelliklere sahip olduğu anlaşılmıştır [143]. Ayrıca, RSV’ ün kırmızı şarapta yüksek oranda bulunmasından yola çıkan araştırmacılar doymuş yağ oranı yüksek bir diyetle rağmen, Fransa’da koroner kalp hastalıklarından ölüm oranının düşük olmasını, ılımlı şarap tüketimine dayandırmışlar ve bu fenomeni “Fransız Paradoksu” olarak adlandırmışlardır [135,144].

Jang ve ark.na göre günlük 375 ml kırmızı şarap tüketimi, araşidonik asit metabolizmasını düzenlemektedir [145].

2.3.2. Resveratrol’ün biyosentezi, Emilimi, atılımı

RSV’ ün biyosentezi stilben sentaz enziminin katalizlediği, *p*-kumarol-CoA’nın *p*-kumarol kalıntısı ile malonil-CoA’ dan 3 adet C₂ alt ünitesinin dekarboksilasyonu ile kondensasyonu sonucu oluşur. Daha ileri reaksiyonları RSV’ ün bifenolik halkasının 3. pozisyonunda glikozil yada sülfat kalıntıları ile konjuge olmasıdır [146].



Şekil 2.6. Resveratrol' ün biyosentetik yolağı

RSV' ün emilimi ve taşınımı ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Perfüze izole sıçan bağırsağında *in vitro* yapılan bir çalışmada RSV' ün büyük kısmının jejunumdan az kısmının ise ileumdan emildiğı gösterilmiştir [147]. Bazolateral tarafa transport edilen RSV' ün çoğı, 15-30 dk içerisinde en yüksek plazma seviyelerine ulaşarak kalp ve karaciğer dokusu tarafından yüksek oranda tutulur ve yarı ömrü 1,5 saat olan glukronoid ve sülfat formlarına konjuge edilir [148-151]. Sıçanlara uygulanan RSV' ün plazmada ve böbrekte 60 dk'da, karaciğerde 30 dk' da, kalpte 120 dk' da maksimum derişime ulaştığı saptanmıştır [134].

Perfüze izole sıçan bağırsağının incelendiği bir çalışmada RSV' ün biyoyararlanımının %20 olduğu gösterilmiştir [152]. Sıçan ve farelere RSV' ün oral uygulanması sonrası dokulardaki dağılımını inceleyen bir başka çalışmada en yüksek tutulumun karaciğerde olduğu gösterilmiştir [153]. Yapılan bir insan çalışmasında da RSV' ün, insan kolon karsinoma Caco-2 hücre dizisinde yüksek oranda biriktiği, en yüksek tutulumun karaciğerde olduğu gösterilmiştir [148].

RSV' ün atılım zamanı plazmada bulunan konsantrasyonuna bağlıdır. Hayvan modelinde yapılan çalışmada, RSV' ün renal atılımının, alımından hemen sonraki saatler içinde başlayıp ve sonraki 12-24 saat boyunca arttığı gösterilmiştir. RSV böbrekte kendi doğal formunda bulunurken, idrarda bileşiğin çoğunluğunun konjuge formda olduğu gösterilmiştir [153].

2.3.3. Resveratrol'ün hücre içi sinyal iletimi

RSV mitogen ile aktive olan protein kinaz (MAPK) kaskadını harekete geçirebilir. MAPK' ların yolun aşağısına doğru hedefleri, mitojenik pro-enflamatuar enzimler ve nükleer transkripsiyon faktörleridir. RSV farklı düzeylerde rol oynayabilir. RSV PKC fosforilasyonunu inhibe ederek yolun yukarısına doğru rol oynayabilir. RSV, MAPK kaskadını etkinleştiren diğer kinazları, fosfoinozitol 3-kinaz (PI3K) fosforilasyonunu ve protein kinaz B' nin (Akt/PKB) fosforilasyonunu inhibe eder. Bu olaylar ile RSV, vasküler düz kas hücrelerinde p70^{S6K}'nin fosforilasyonunu azaltır. RSV, ERK1/2/JNK/p38'in tirozin fosforilasyonunu ve vasküler hücrelerde nükleusa geçişini inhibe ederek MAPK kaskadını aşağıya doğru baskılar.

Fosforilasyonun ve sitoplazmadan nükleusa geçişin inhibisyonu vazokonstriksiyon, anjiyogenez, çoğalma ve farklılaşma ile ilgili genlerin ifadenmesini azaltmaktadır. Okside LDL (oxLDL), ROS ve PKC gibi birçok uyaran, nükleer faktör κ B (NF- κ B) yolunu harekete geçirme potansiyeline sahiptir. NF- κ B sitoplazmada inhibitör κ B (I κ B) ile birlikte iken inaktif kompleks olarak bulunur. Uyarana yanıt olarak I κ B kinaz kompleksinin katalitik alt birimi I κ B α 'nın iki serin amino asidini fosforiller. Bu fosforilasyon 26S proteozom tarafından I κ B'nin ubiquitine bağlı yıkımını tetikler. Aktive p50/p65 kompleksinin daha sonra nükleusa geçişi gerçekleşir. p50/p65 kompleksi NF- κ B spesifik κ B DNA motiflerine bağlanır ve siklooksijenaz, sitokin gibi

hedef genlerin transkripsiyonunu düzenler. RSV p65'in fosforilasyonunu ve transaktivasyonunu IKK, PKC gibi kinazları inhibe ederek baskılar [154].

2.3.4. Resveratrol'ün biyolojik etkileri

RSV son yıllarda üzerinde çokça çalışılan organizmada pek çok biyolojik etkileri olan bir moleküldür. RSV serbest radikallerin sebep olduğu hücre zararlanmalarını, lipid peroksidasyonu ve buna bağlı hücre ölümlerini triaçilgliserol düzeyini düşürerek [145] önlemektedir [155]. C vitamininden 20, E vitamininden ise 50 kat daha fazla etkili bir antioksidan olarak immün sistemi güçlendirir [156]. Kardiyoprotektif etkileri de vardır. Akut ve kronik kardiyak hasar modellerinde miyokardiyal iskemi reperfüzyon hasarının şiddetini azalttığı gösterilmiştir [157].

Koroner kalp hastalıklarına karşı koruyucu etkisinin özellikle LDL' nin oksidasyonuna karşı koruma yoluyla veya trombosit agregasyonunu azaltıcı etkisine bağlı olabileceği ileri sürülmektedir [158]. Damarlarda NO sentezini artırmakta ve damarların genişlemesine yardımcı olup kan akımını rahatlatmaktadır [159]. Antitümoral aktiviteye sahiptir. Kanserin başlangıç, gelişme ve ilerleme aşamalarında etki göstererek insanda görülebilecek ağız, deri, kolon, böbrek, karaciğer, prostat ve meme kanseri gibi kanser çeşitlerinde azalma sağladığı bildirilmiştir [160]. RSV' ün, NO miktarını artırıp lipid peroksidasyonunu inhibe ederek aynı zamanda böbrek hücrelerini de koruyucu etkisinin olduğu bildirilmiştir. Ayrıca nefrotoksik ilaçlarla glomerülonefrit oluşturulmuş sıçanlarda RSV' ün yüksek düzeyde koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir [161-163].

2.3.5. Resveratrol diyabet ilişkisi

RSV' ün antidiyabetik etkilerini insülin sinyal yolağı üzerinden gösterdiği düşünülmektedir. İnsülin reseptörü ile kenetlenen RSV, IRS-1 ve IRS-2 fosforilasyonuna neden olur. IRS-1 ve IRS-2 fosforile olduktan sonra iki farklı yolak üzerinden etki gösterir. Bunlardan birincisi, fosforile olan IRS-1 ve IRS 2' nin, PI3K fosforilasyonuna neden olarak eNOS ekspresyonunu artırması, diğeri ise, MAPK aktivasyonu sağlayarak Endotelin 1 (ET₁) salınımına neden olmasıdır [164]. Serin ile fosforile olan IRS-1 ve IRS-2, insülin reseptör tirozin kinaz aktivitesini inhibe

ederek bunun altındaki sinyalizasyonu bozar. RSV' ün, IRS-1 ve IRS-2 düzeylerine etki etmeden, insülin sinyal yolağı inhibitörü IRS-1,2/serin-treoinin fosforilasyonunu azaltarak insülin duyarlılığını arttırmaktadır [165]. RSV insülin ile artan IRS protein komplekslerini düzenlemesiyle de insülin duyarlılığını artırır [166]. RSV ve insülin etkilerinin incelendiğı bir çalışmada, RSV' ün PI3K, MAPK ve PKB inhibisyonu yaptığı IRS-1 IRS-2 düzeylerini arttırdığı belirtilmiştir [166-168].

RSV, diyabeti önlemede önemli bir rol oynar ve bir takım diyabetik komplikasyonları hafifletir. İnsülin reseptörünü aktive ederek, PI3K yolağı üzerinden, pankreas β hücrelerinde glukoz taşıyıcılarından biri olan GLUT4' ün fosforilasyonuna neden olduğu, aktif GLUT4' ün hücre içine glukoz alımını sağlayarak, plazma glukoz düzeyini azalttığı ileri sürülmüştür [164].

Yapılan bir çalışmada izole sıçan pankreas hücrelerinde insülin sekresyonunu azalttığı, pankreas β hücrelerini koruduğı belirtilmektedir [18]. Yine pankreas dokusunu koruyucu etkileri IL-1 β , IL-6, TNF- α gibi stokin aktivasyonunu inhibe etmesi, NF- κ B ve NO üretimini arttırması ile de ilişkilendirilmektedir [19].

STZ ile diyabet yapılan sıçanlarda 8 haftalık RSV uygulaması ile diyabete bağı olarak artan, kan glukoz, kreatinin, trigliserit ve kolesterol değerlerinin düştüğü, idrar çıkışının azaldığı, immünohistokimyasal olarak yapılan incelemede GBM kalınlığında azalma olduğu, diyabete bağı olarak artan glomerüler Fibronektin, kollajen IV ve TGF- β ekspresyonunun azaldığı ifade edilmektedir [20].

Sener ve ark. wistar albino sıçanlarda RSV' ün serbest radikalleri yakalama ve antioksidan etkinliği ile GSH düzeyinin korunmasını sağlayarak renal dokuyu iskemi-reperfüzyon hasarındaki oksidatif strese karşı koruduğunu göstermişlerdir [21].

Palsamy ve arkadaşları STZ diyabetik sıçanlarda 30 gün süreyle 5 mg/kg RSV uygulamasının karaciğer dokusunda diyabete bağı olarak artan proinflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , IL-1, IL-6) ve NO' in düzeyini düşürdüğü, yine lipid peroksidasyonu azalttığı buna karşılık doku GSH, SOD, CAT ve GPx enzim düzeylerini yükselttiğini bildirmişlerdir [22].

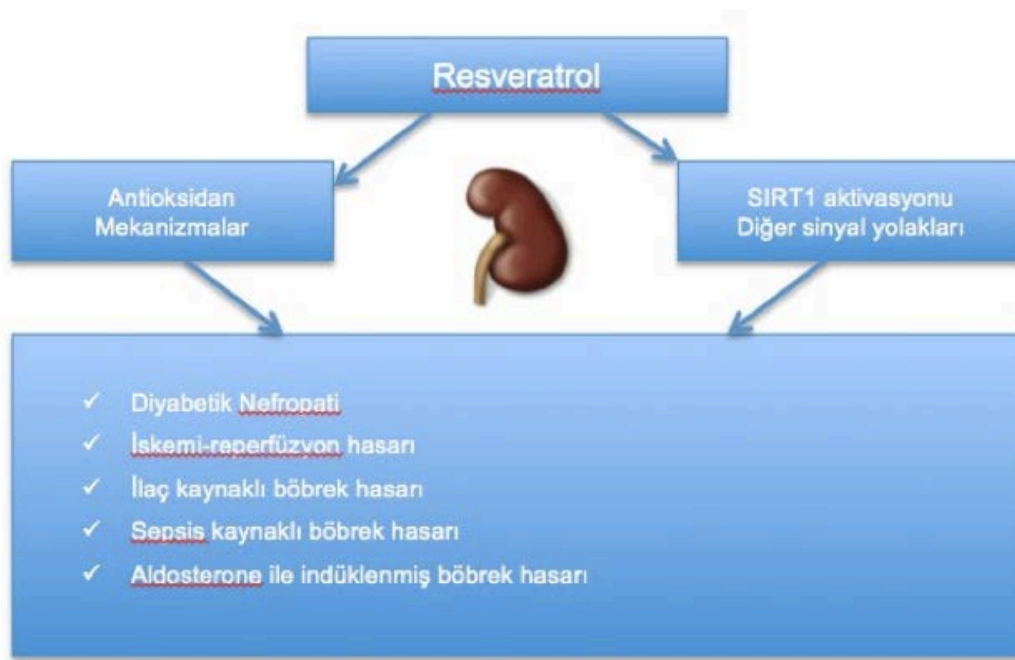
2.3.6. Resveratrol ve diyabetik nefropati ilişkisi

Diyabetin en önemli mikrovasküler komplikasyonlarından biri olan DN, son dönem böbrek yetmezliğinin de en sık görülen nedenidir. Oksidatif stres DN de dahil olmak üzere diyabetik vasküler komplikasyonların patogeneğinde önemli rol oynar. Yapılan çalışmalar, RSV' ün radikal süpürücü veya antioksidan enzim modülasyonu sayesinde, Tip1 ve Tip 2 diyabetli pek çok hayvan modelinde DN' yi iyileştirebileceğini göstermiştir [169].

RSV' ün DN' de protein ve/veya sinyal iletimi üzerine spesifik etkileri (Sirtuin1 (SIRT1), adenosin monofosfat aktive kinaz (AMPK), fosfatidilinozitol-3 kinaz (PI3K) / Akt ve JNK / NF- κ B gibi) ve güçlü antioksidan kapasitesi kapsamlı in vivo ve in vitro olarak araştırılmıştır [171-173]

Bu veriler ışığında, RSV' ün DN' de hücre koruyucu etkisinin antioksidan aktivitesi, SIRT1 aktivasyonu AMPK modülasyonu, JNK/NF- κ B/NADPH aktivasyonu gibi sinyal iletim mekanizmaları aracılığıyla olduğu düşünülmektedir. RSV, önemli bir SIRT1 aktivatörüdür. SIRT1 bir çok substratın deasetilasyonu ile, oksidatif stres, inflamasyon, apoptoz, stres direnci, mitokondriyal biyogenez, otofaji, lipid ve glukoz metabolizmasının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Yapılan pek çok çalışma, RSV' ün SIRT1 aktivasyonu yoluyla diyabet, nörodejeneratif bozukluklar, kognitif bozukluklar, kanser, böbrek hastalıkları ve kalp-damar hastalığı gibi birçok hastalığın önlenmesinde ve tedavisinde etkili olduğunu göstermiştir [174].

Hücre sel enerji homeostazının bir regülatörü olan, Adenosin monofosfat-aktive protein kinazın (AMPK), son yıllarda DN' de önemli bir rol oynadığı belirlenmiştir. AMPK' nın azalmış fosforilasyonunun hiperglisemi ilişkili böbrek genişlemesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Daha ileri çalışmalar AMPK aktivitesinin baskılanmasının oksidatif stress [175] ve inflamatuvar yanıt [176] ile bağlantılı olduğu yönündedir. AMPK faaliyetlerinin geri dönmesi oksidatif hasarı ve inflamasyonu iyileştirebilir [177]. Bu nedenle, diyabetten etkilenen renal fonksiyon bozukluğunu hafifletmek için AMPK sinyal iletiminin modülasyonu sağlanmalıdır [178].



Şekil 2.7. Resveratrol' ün olası hücre koruyucu mekanizmaları

Zhang ve ark.larının yaptığı bir çalışmada, diyabetik böbrekte RSV'ün mezengiyal hücre proliferasyonunu ve fibronektin ekspresyonunu JNK ve NF-κB aktivasyonu aracılığı ile inhibe ettiği ve NADPH oksidaz aktivitesini ve ROT üretimini arttırdığı gösterilmiştir [179].

Chen ve ark.larının yaptıkları bir çalışmada da, RSV' ün diyabet ile indüklenen glomerular hipertrofiyi ve idrar albumin çıkışını iyileştirdiği, glomerular fibronektin, kollajen IV ve TGF ekspresyonunu azalttığı, GBM kalınlaşmasını azalttığı, gösterilmiştir [20].

2.3.7. Resveratrol'ün vazodilatatör etkisi ve nitrik oksit

NO son yıllarda tanınan, birçok biyolojik olayda önemli rolü olan, çok kısa yarı ömürlü bir serbest radikaldir. Son derece toksik ve renksiz bir gaz olan NO serbest radikal yapısında olduğu için yarı ömrü çok kısadır. Oksijensiz ortamda stabildir ve yağda çözünürlüğü oldukça yüksek bir moleküldür [180].

Düşük konsantrasyonlarda toksik olmayan NO, damar tonusunun ayarlanması, endotel bağımlı vazodilatasyon, düz kas hücre proliferasyonu ve trombosit adhezyonu inhibisyonu, demir metabolizmasının kontrolü, transkripsiyon faktör

aktivasyonu, mide-bağırsak, uterus ve kalp tonusunun düzenlenmesi, penis ereksiyonu, immunité gibi pek çok fizyolojik olayda görev alır [181,182].

NO endotelde Nitrik oksit sentaz (NOS) enziminin katalizlediği mekanizma ile, L-Arginin'den sentezlenir. Bu reaksiyon sonucunda L-Sitrülin ve NO meydana gelir. Bu sentez esnasında enzim dışında, oksijen Fad, FMN ve BH4 kofaktörlerine ihtiyaç duyulur [183]. NOS enziminin 3 izofromu bulunur. Bunlar nöronal NOS (nNOS), indüklenebilir NOS (iNOS) ve endotelial NOS (eNOS) olarak gruplandırılır [15].

Damar endotelinden salınan NO' in etkisi, damar düz kas hücelerinde guanilat siklazın aktivasyonu ile başlar. Hücre içi siklik guanozin mono fosfat (cGMP) konsantrasyonunun artması ve düz kasların gevşemesi ile sonlanır [184]. NO endotel yüzeyinde bulunan adezyon moleküllerinin ekspresyonunu baskılayarak endotel bütünlüğünün koorunmasına katkıda bulunur [185]. Polifenolik bir bileşik olan RSV' ün, NO salımına etkisi üzerine; NOS aktivitesinin uyarılması ve bazal şartlarda NO salımının korunması olmak üzere iki mekanizma vardır [186].

Konsantrasyona bağımlı olarak insan umbilikal ven endotel hücre kültüründe *trans*-resveratrolün 72 saat inkübasyonu sonrasında, eNOS mRNA ekspresyonunun ve NO üretiminin arttığı ve en güçlü eNOS mRNA uyarıcı olduğu gösterilmiştir [187].

Erkek ve dişi sıçanların (14-16 haftalık) aortalarında yapılan bir çalışmada 50 mg/l dozunda RSV, 21 gün boyunca içirilmiştir. Erkek ve dişi sıçanların aortalarında, uzun süreli RSV uygulamasının eNOS mRNA ve protein ekspresyonunu arttırdığı, NO oluşumunu arttırdığı ve endotel fonksiyonunu iyileştirdiği bulunmuştur [188].

Wallerath ve ark. larının yaptığı bir çalışmada, insan umbilikal ven endotel hücreleri 1-100 µg/L RSV ile, 12 ile 72 saat süresince inkübasyon sonrası eNOS protein miktarının ve eNOS aktivitesinin uygulanan RSV konsantrasyonuna bağılı olarak arttığı gösterilmiştir [189].

Tip 2 diyabetik farelerde 4 hafta boyunca 20 mg/kg/gün dozda verilen RSV' ün artmış olan TNF α , mRNA ve protein düzeyini düşürdüğü, azalmış eNOS fosforilasyonunu arttırdığı, kontrol grubu üzerinde etkisinin olmadığı belirtilmiştir.

eNOS fosforilasyonundaki artış, NO biyovarlığındaki artış ile yakından ilgilidir. Diyabetik farelerde RSV' ün NO salımını arttırdığı bulunmuştur [190].

Sprague–Dawley sıçanlara mide gavajı yoluyla 7 gün boyunca 2,5 mg/kg RSV uygulanan bir çalışmada, 7 günün sonunda sıçanların kalbi, Langendorf perfüzyon sistemine asılarak, iskemi reperfüzyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Çalışma bitiminde Western Blot analizi yapılmış ve iNOS, eNOS, VEGF protein düzeylerinin, RSV uygulanan sıçanların kalbinde anlamlı ölçüde arttığı gösterilmiştir. iNOS protein düzeyinin, RSV alımından 24 sonra, eNOS protein düzeyinin ise 5 gün sonra arttığı gösterilmiştir [191].

2.4. Serbest Radikaller

En dış yörüngelerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve bağımsız olarak varlığını sürdürebilen moleküller serbest radikaller olarak tanımlanır [192,193]. Kısa ömürlü olmalarına rağmen, kararsız yapıları nedeniyle çok aktif yapıda olan serbest radikaller tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliğine sahiptirler. Serbest radikaller organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında oluştuğu gibi, çeşitli dış etkenlerin etkisiyle de oluşmaktadır [194].

Oksijen (O_2) ortamda sürekli bulunan ve elektrofilik ataklara en yatkın olan moleküldür. O_2 ve onun minör metabolitleri olan hidrojen peroksit (H_2O_2), $OH^\bullet$ ve singlet oksijen ($^1O_2$) canlı sistemler için genellikle toksiktir. Bu ürünler ve oksidatif stres sonucunda oluşan çeşitli serbest radikaller kısaca ROT olarak adlandırılır [193,195].

Serbest radikaller hücrelerin, protein, lipid, karbohidrat metabolizmalarına, DNA gibi önemli bileşiklerine etki ederek yapılarında bozulma meydana getirirler [196]. Lipid molekülleri serbest radikallerin hasarına karşı en hassas biyomoleküllerdir. Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif olarak yıkımları lipid peroksidasyonu olarak bilinmektedir. Lipid peroksidasyonu kendini devam ettiren bir zincir reaksiyonu şeklinde ilerler, oldukça zararlıdır. Lipid peroksitleri (LOOH) yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde

metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda MDA meydana gelir. MDA kanda ve idrarda ortaya çıkar, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmamakla beraber lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenle biyolojik materyalde MDA ölçülmesi lipid peroksit seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır. Nonenzimatik lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve ürettiği reaktif aldehyitlerle, indirekt olarak diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece doku hasarına ve birçok hastalığa neden olur [197].

2.4.1. Reaktif oksijen türleri

Aerobik organizmanın yaşamı için kaçınılmaz olan oksijen ortamda sürekli var olan ve elektrofilik ataklara oldukça yatkın bir moleküldür [198]. Oksijen ve onun minör metabolitleri olan $O_2^{\bullet}$, hidrojen peroksit (H_2O_2), $OH^{\bullet}$ ve singlet oksijen ($^1O_2$) canlı sistemler için genellikle toksiktir ve biyolojik sistemlerde bulunan en önemli ROT' dir. [195]. ROT, organizmada genellikle normal fizyolojik olaylar sırasında oluşur [199].

Çizelge 2.5. Normal fizyolojik süreçte oluşan ROT kaynakları [199]

1. Solunum Mitokondriyal elektron transportu Hekzos monofosfat şantı
2. Ksenobiyotiklerin metabolizması Mikrozomal elektron transportu (sitokrom P450 ve b5) ve karışık oksidaz fonksiyonu Peroksidatif oksidasyon (MPO, prostoglandin H sentezi)
3. Doğal uyarılarla fagositik hücrelerin aktivasyonu Periferal kan PMN'ler, bazofiller ve monositler Doku makrofajları Kupffer hücreleri (karaciğer) Klara hücreleri (akciğer)
4. Biosentez ve biyolojik parçalanma süreçleri Araşidonik asit metabolizması Yağ asit CoA oksidaz D-amino oksidaz L- α hidroksi asit oksidaz Ürat oksidaz Tirozin peroksidaz

2.4.2. Reaktif nitrojen ürünleri

NO, biyolojik sistemlerde üretilen çok yönlü, inorganik bir serbest radikaldir [200]. NO radikali, yüksek organizmalarda L-arjinin'in terminal guanidonitrojen atomlarından birinin oksidasyonu ile oluşur. Bu reaksiyon NOS enzimiyle katalizlenir. Oluşan NO içinde bulunduğu mikro çevreye göre nitrosonyum katyonu (NO^+), nitroksil anyonu (NO^-) ya da O_2 ile reaksiyona girerek oksidatif hasarda rol oynayan peroksinitrit (ONOO^-) gibi çeşitli reaktif nitrojen ürünlerine (RNÜ) dönüşebilir [201]. Bazı fizyolojik hallerde ara form olan S-nitroso- sistein ya da S-nitroso-glutatyon durumunda bulunabilir [202].

NO, NOS enzimlerinin kataliziyle vücutta pek çok yerde sentezlenebilir. Tanımlanmış NOS'lar:

1. Tip İnörönal (nNOS) 2. Tip II indüklenebilir (iNOS) 3. Tip III endotelyal (eNOS)

NOS' ın üç tipi de moleküler oksijen ve L-arjinini substrat olarak kullanırken, NADPH, Flavin adenin nükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN) ve tetrahidro biopterin (BH₄)' i kofaktör olarak kullanır [203].

NO düşük konsantrasyonda vasküler tonusun kontrolü, nörotransmisyon, öğrenme ve hafıza gibi fizyolojik süreçlerde görev yaparken, yüksek konsantrasyonda savunma amacı ile sitotoksin gibi rol oynar [204].

2.5. Oksidatif Stres ve Diyabetin Oksidatif Stresle İlişkisi

Doğal bir süreç olan oksidatif stres, oksijene ihtiyaç duyan tüm canlı organizmalarda çeşitli basamaklarda oluşur. Oksidatif stresi kontrol altında tutan özel mekanizmalar vardır. Bu kontrol mekanizmalarının yetersizliği durumunda, herhangi bir nedenle oksidan üretiminde artma ve antioksidan savunma sistemlerinde yetersizlik sebebiyle aradaki dengenin antioksidan savunma sisteminin aleyhine bozulması neticesinde dokularda oksidatif hasar meydana gelmektedir [205,206].

Organizmalarda oksidatif hasara neden olan ROT üretimi endojen ve ekzojen kaynaklı olabilmektedir. Hava kirletici gazlar, doğal zararlı gazlar, patojenik bakteriler, alkol, sigara kullanımı, iyonize ve non-iyonize radyasyon ilaçları ekzojen kaynaklar arasında yer almaktadır. Mitokondriyal elektron taşıma sistemi, redoks döngüsü, endoplazmik retikulum, fagositik hücreler, ksantin oksidaz, NADPH oksidaz gibi oksidan enzimler ise endojen kaynaklar arasında yer almaktadır [197,207,208].

Artmış serbest oksijen radikalleri, kardiyolojik hastalıklar, nörolojik hastalıklar, diyabet, romatolojik hastalıklar, astım, kanser, yaşlanma gibi bir çok sürecin patogeneğinde yer almaktadır [209-211]. Hipergliseminin, glukozun otooksidasyonunu, protein glikolizasyonunu ve lipid peroksidasyonunu indüklediği, ayrıca artan glukoz ile birlikte çeşitli yolların aktive olduğu ve ROT oluşumuna katkıda bulunduğu bilinmektedir [212,213].

Diyabette ROT' rinin rolü 1980' li yıllardan beri geniş çapta tartışılan bir konudur [7]. Diyabet ve diyabetle gelişen komplikasyonların patogenizinde oksidatif stresin önemli bir rolü vardır [197].

β hücrelerinin antioksidatif kapasiteleri düşük olduğu için, oksidatif değişikliklere oldukça hassastırlar. STZ 'nin metabolizasyonu sırasında üretilen toksik ara ürünlerin langerhans adacıklarında deformasyona ve diyabetin patogenizinde rol oynadıklarına ilişkin pek çok çalışma bildirilmiştir [214].

Diyabetteki vasküler komplikasyonlarda görülen endotel fonksiyon bozukluklarından endoteldeki NO üretiminin azalması sorumlu tutulmaktadır. Bu azalmaya da ileti aksamaması, substrat L-arginin yetmezliği veya nitrik oksid sentazın kofaktörlerindeki azalma neden olabilir. Ancak diyabetteki azalmış endotel bağımlı vazodilatasyona NO üretiminin azalması mı, yoksa oksidatif stresin mi neden olduğu tartışmalıdır [215].

DN ve oksidatif stres ilişkisi ele alındığında Dronavalli ve ark çalışmaları konuya ışık tutmaktadır. Genellikle nefron içinde metabolik aktivite, çok sayıda antioksidan enzim ve serbest radikal süpürücü sistemle dengelenen büyük miktarda ROT üretir. ROT hücre zarı lipidlerinin peroksidasyonu, proteinlerin oksidasyonu, renal vazokonstriksiyon ve DNA hasarı dahil olmak üzere birçok olumsuz biyolojik etkiye aracılık eder. Glukoz metabolizmasının PKC aktivasyonu, ve AGEs oluşumu gibi alternatif zararlı yollar aracılığıyla, hiperglisemi ortamında kısmen ROT ile bağlı olduğu görünmektedir. ROT' un neden olduğu DNA hasarı belirteçlerinin konsantrasyonları şiddetli nefropati (yani proteinüri karşı mikroalbuminüri) hastalarında daha yüksektir [119].

2.6. Antioksidan Sistemler

Aerobik organizmalar serbest radikallerin zararlı etkilerinden enzim sistemleri ve serbest radikal tutucuları gibi savunma mekanizmaları tarafından korunurlar. Bu mekanizmalar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinirler. Antioksidanlar endojen veya ekzojen kökenli olabilirler [199,214]

Antioksidanlar oksidanları, 4 farklı mekanizma ile etkisiz hale getirirler [215].

1. Oksidanları zayıf bir moleküle çevirme şeklinde olan Scavenging (temizleme) etkisi, enzimler tarafından yapılır.
2. Oksidanlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirme şeklinde olan Quencher (baskılama) etkisi, vitaminler ve flavonoidler tarafından yapılır.
3. Onarma etkisi
4. Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engelleyen ağır metaller şeklinde olan Zincir koparma etkisi hemoglobin, seruloplazmin ve E vitamini tarafından yapılır.

Çizelge 2.6. Antioksidan sistemlerde yer alan moleküller [199]

1.Antioksidan Enzimler — Süperoksit Dismutaz — Katalaz — GSH – peroksidaz — GSH – redüktaz — GSH – S-transferazlar
2.Antioksidan proteinler — Seruloplazmin — Transferrin — Laktoferrin — Albumin — Haptogloblin
3.Düşük moleküler ağırlıklı antioksidan maddeler — GSH,NAD(P)H — α- Tokoferol — Askorbat,ürat — β-Karoten
5.Okside proteini parçalayan enzimler — Makroproteinazlar

GSH, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreyi oksidatif strese karşı koruyan en önemli antioksidanlardan biridir [216-218]. GSH' ın yaklaşık %90'ı karaciğerde sentezlenmektedir [219]. GSH, proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutar ve oksidasyondan korur, böylelikle fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. GSH karaciğeri, eritrositleri, lökositleri ve göz lensini oksidatif strese karşı korumada hayati öneme sahiptir [220]. GSH bağımlı antioksidan sistem Gp-x ve glutatyon redüktaz olarak iki enzim içerir. Bu sistem GSH' nun okside ve redükte formlarını içeren bir döngü ile çalışır [221]. GSH bağımlı sistem, hücre içindeki hidroperoksitleri indirgeyen temel mekanizmadır [222]. Gp-x, H_2O_2 'yi suya indirger. Aynı zamanda lipid hidroperoksitlerini daha az reaktif olan hidroksi yağ asitlerine metabolize edebilir. Dolayısıyla membranları lipid peroksidasyonuna karşı korur [223,224].

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenen 01/2011-75 kodlu bu çalışmanın in vivo deneyleri G.Ü.ET-11.086 kod numaralı Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul İzni ile Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi' nde (GÜDAM) ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim dalı laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.1. Kullanılan Denekler, Gereçler ve Maddeler

3.1.1. Deney hayvanları

Laboratuvar şartlarına uygun olmaları, kolay uyum göstermeleri, kısa sürede ve fazla sayıda yavru vermeleri, üretimlerinin kolay ve ucuz olması sebebiyle çalışma için sıçan tercih edildi. Çalışmada, GÜDAM 'dan temin edilen ağırlıkları 250 - 300 gr arasında değişen 30 adet erişkin, erkek Wistar albino sıçan kullanıldı.

3.1.2. Laboratuvar koşulları

Sıçanların barındırılmaları ve bakımları da yine GÜDAM' da yapıldı. Sıçanların her biri ayrı kafeslerde, 12 saat aydınlık karanlık siklusunda, 24 ± 2 °C 'lik ortamda standart sıçan yemi ve musluk suyu kullanılarak serbest olarak beslendi. Bulundukları ortamın nisbi nem oranı % 30-45 arasında tutuldu. Sıçanların polikarbonattan yapılmış kafeslerde, altlarında talaş olacak şekilde barınmaları sağlandı. Her gün kafes temizliği yapıp, talaşların yenilenmesi sağlanarak kafes altının kuru kalması sağlandı.

3.1.3. Laboratuvar cihazları

- Spektrofotometre (UV-1208, Shimadzu)
- Sonikatör (Sonics, ABD)
- Soğutmalı santrifüj (MPW - 350)
- Elektronik tartı (Sartorius basic)
- Su banyosu (Guft DBS 12734)

- Vorteks (Nüve NM 110-02488)
- Mikropipet (10-100 Transferpette 01 Z 2517, 100-1000 Genex Beta CR 59389)
- Mikropipet (1-10 Transferpette 01 Z 2517, 100-1000 Genex Beta CR 59389)
- ELx 800 Bioelisa Reader
- Mikrotom (Leica SM 2000, Germany)
- pH metre (Eutech instruments serial number 327401, Singapore)
- Accu-Check Go Glukometre (Roche)
- Accu-Check Go glukoz ölçüm stripleri (Roche)
- Derin dondurucu -80 C (Sanyo, Japan)
- VetScan® Comphrensive Diagnostic Profile (Abaxis, Union City CA)
- VetScan® Analyzer (Abaxis, Union City CA)
- Siemens Multistix 10 SG idrar tahlili şeritleri (Siemens, Türkiye)
- Mp30B-CE (Biopac Systems Inc. Santa Barbara California)
- İzole Ogan Banyosu
- Metabolik Kafes
- Steril Enjektör (2ml) (Ayset, Türkiye)
- Steril Enjektör (5ml) (Hayat, Türkiye)
- Steril Enjektör (10ml) (Hayat, Türkiye)
- 0.2-0.5-1.5-2 µl Lik ependorf tüpler
- 0.2-0.5-1.5-2 µl Lik ışık geçirmeyen(kahverengi) ependorf tüpler
- Azot tankı (İnternational cryogenics Inc. IC 10 R)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- Etüv (Nüve, Türkiye)
- Cerrahi Malzemeler
- Leica DM 4000 (Leica, Weetlar, Germany)
- Büyüteç

3.1.4. Kullanılan kimyasal maddeler

- Streptozotozin (STZ) (Sigma, ABD)
- Resveratrol (RSV) (Sigma, ABD)
- Sodyum Sitrat (Sigma, ABD)

- TGF- β (sc-146, Lot: F2512, Santa Cruz Biotechnology, California, USA)
- Fibronectin (sc: 1887, Lot: E0707, Santa Cruz Biotechnology, California, USA)
- iNOS (RB-9242, Lot: 9242P1204CE, Neomarkers, Fremont, USA)
- eNOS (RB-9279, Lot: 9279P1108T, Neomarkers, Fremont, USA)
- Hidrojen peroksit blok (Cat: TA-125-HP, Lot: 23941, Thermo, Fremont, USA)
- Hematoksilen (Cat:008011, Lot: 73232285B, Invitrogen, Camarillo, USA)
- Triklorasetik asit (TCA, Sigma T-9759)
- Bütilhidroksitoluen (BHT, Sigma B-1378)
- Tiyobarbitürik asit (TBA, Sigma T- 5500)
- Di tiyobis nitro benzoik asit (DTNB, Sigma D-8130)
- Vanadium (III) Klorid (VCl_3) (Merck)
- Sülfanilamid
- Etanol (Kimetsan, Türkiye)
- NEDD (N-(1-Naphetyl) ethylenediamide dihydrochloride)
- TCA (Merck)
- TBA (Merck)
- BHT (Merck)
- Asetilkolin (ACh)
- Anjiotensin II (Ang II)
- Fenilefrin (Phe)

3.1.5. Kullanılan kitler

- Histostain Plus Broad Spectrum (HRP) Kit (Ref:859043, Lot: 1018708A, Invitrogen, USA)
- HRP Kit (Cat: TA-125-HL, Lot: RHL-120705, Thermo, Fremont, USA)

3.2. Solüsyonların Hazırlanması

3.2.1. Sodyum sitrat tamponunun hazırlanması

Sodyum sitrat dihidrattan ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ = 294,1 gr/mol) hassas terazide 2,94 gr tartılarak, distile su ile 100 ml' ye tamamlandı. 1 N HCl damla damla ilave edilerek pH' sı 4,5 olacak şekilde ayarlandı.

3.2.2. Streptozotzin solüsyonunun hazırlanması

Hazırlanan 0,1 M'lık sodyum sitrat tamponunun içerisinde 65 mg/ 1 ml olacak şekilde STZ çözündürülerek solüsyon taze hazırlandı.

3.2.3. Resveratrol solüsyonunun hazırlanması

Hassas terazide 20 mg RSV tartılarak 2 ml %96 'lık 0,1 M etanol içerisinde çözündürülerek taze hazırlandı. RSV 'ün ışıktan etkilenecek bozulmasını önlemek için, ışık geçirmeyen kahverengi falcon tüpleri kullanıldı.

3.2.4. Krebs-Hanseleit solüsyonunun hazırlanması

NaCl 118,30, KCl 4,70, KH_2PO_4 1,22, MgSO_4 1,20, CaCl_2 2,50, NaHCO_3 25,00, Glukoz 11,10 (mM) içermekte olup, pH 7,42'e ayarlandı.

3.2.5. Fenilefrin solüsyonunun hazırlanması

Phe' in stok solüsyonundan, konantrasyonu 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M olacak şekilde distile su ile dilüe edilerek, taze hazırlandı.

3.2.6. Anjiotensin II solüsyonunun hazırlanması

Ang II' in stok solüsyonundan, konantrasyonu 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} M olacak şekilde distile su ile dilüe edilerek, taze hazırlandı.

3.2.7. Asetilkolin solüsyonunun hazırlanması

ACh' nin stok solüsyonundan, konstantrasyonu 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M olacak şekilde distile su ile dilüe edilerek, taze hazırlandı.

3.3. Deney Planı

Çalışma sırasında ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen 30 adet erişkin, erkek Wistar albino sıçan kullanıldı. Çalışmaya başlamadan önce tüm sıçanlar 8 saat açlığı takiben tartıldı, kuyruk venlerinden kan alınıp AKŞ tayin edildi.

Çalışma 10 haftalık bir periyod planlaması çerçevesinde yapıldı. Deney öncesinde sıçanlar, 2 hafta süreyle GÜDAM 'da deneysel herhangi bir uygulama yapılmadan, normal sıçan yemi ve musluk suyu ile beslendi, ortama alışmaları sağlandı. 2 haftalık adaptasyon süresinden sonra sıçanlar 4 gruba ayrıldı.

3.3.1. Deney grupları

Grup 1: Kontrol (K) Grubu (n=6)

Grup 2: Resveratrol (RSV) Grubu (n=8)

Grup 3: Diyabet (D) Grubu (n=8)

Grup 4: Diyabet + Resveratrol (D+RSV) Grubu (n=8)

Grup 1: Kontrol grubu: Bu grupta bulunan sıçanlara 2 haftalık adaptasyon süresinin bitiminde tek doz i.p. 1 ml STZ çözücüsü [0.1 M (pH:4.5) soğuk sitrat tamponu] enjeksiyonu yapıldı. 8 hafta boyunca her gün sıçanların ağırlıklarına göre RSV çözücüsü olan % 96' lık 0,1 M etanol, oral gavaj yöntemi ile yutturuldu.

Grup 2: Resveratrol grubu: Bu grupta bulunan sıçanlara 2 haftalık adaptasyon süresinin bitiminde tek doz, i.p. 1 ml STZ çözücüsü [0.1 M (pH:4.5) soğuk sitrat tamponu] enjeksiyonu yapıldı. 8 hafta boyunca sıçanlara ağırlıklarına göre % 96' lık 0,1 M etanol içinde çözünmüş RSV, 10 mg/kg/gün dozunda, oral gavaj yöntemi ile yutturuldu.

Grup 3: Diyabet grubu: Bu grupta bulunan sıçanlara 2 haftalık adaptasyon süresinin bitiminde i.p. tek doz, 65 mg/kg [225] STZ enjeksiyonu yapıldı. Diyabet oluşumdan 2 hafta sonra, 8 hafta boyunca her gün, sıçanların ağırlıklarına göre RSV çözücüsü olan % 96' lık 0,1 M etanol, oral gavaj yöntemi ile yutturuldu.

Grup 4: Diyabet + Resveratrol grubu: Bu grupta bulunan sıçanlara 2 haftalık adaptasyon süresinin bitiminde tek doz, i.p. 65 mg/kg [225] STZ enjeksiyonu yapıldı. Diyabet oluşumdan 2 hafta sonra, 8 hafta boyunca sıçanlara ağırlıklarına göre % 96' lık 0,1 M etanol içinde çözünmüş RSV, 10 mg/kg/gün dozunda, oral gavaj yöntemi ile yutturuldu.

Diyabet oluşumunun kontrolü: STZ uygulamasından 72 saat sonra tüm gruptaki deneklerin AKŞ' leri ölçülerek, kaydedildi. Kan şekerinin normal aralığı 90-100 mg/dl kabul edilerek, AKŞ' i 250 mg/dl 'nin üzerinde olan değerler diyabet olarak kabul edildi ve bu denekler çalışmanın diyabet gruplarına dahil edildi. Diyabet oluşumundan sonra 2 hafta süreyle denekler belirli aralıklarla kan şekeri takibine alındı. Yaklaşık 2 haftalık bu süreçte diyabetin stabilizasyonu sağlandı.



Resim 3.1. Oral gavaj uygulaması

3.3.2. Deney süresince yapılan ölçümler ve incelenen parametreler

- Beden ağırlığının tespiti (Çalışmanın başında, sonunda ve çalışma süresince haftada bir kere)
- AKŞ tespiti (Çalışmanın başında, sonunda ve çalışma süresince haftada bir kere)
- Alınan ve çıkarılan sıvı miktarları tespiti (Bütün gruptaki hayvanlar AKŞ bakıldıktan bir gün sonra metabolik kafese yerleştirildi. Metabolik kafeste kaldıkları 24 saat boyunca aldıkları su ve çıkardıkları idrar miktarı gözlemlendi, ölçümleri alınıp kaydedildi. Bu ölçümler çalışma süresince 5 defa tekrarlandı.



Resim 3.2. Metabolik kafes düzeneği

Kanda ve idrarda renal fonksiyonların değerlendirilebilmesine yardımcı olması açısından;

Kanda: Sıçanların kuyruk veninden 100 µl kan alınarak; glukoz, total kolesterol, albümin, kan üre nitrojen, kalsiyum, kreatinin, globülin, potasyum, sodyum, total protein düzeylerine Compherensive Diagnostic Rotor ile GÜDAM' da bulunan VETSCAN ANALYZER cihazı kullanılarak bakıldı. (alışmanın başında, ortasında ve sonunda olmak üzere toplam 3 defa)



Resim 3.3. Kan parametrelerinin incelendiği VetSCAN analyzer cihazı

İdrarda: Glukoz, keton, nitrit/nitrat, lökosit, bilirubin, albümin, kreatinin düzeyleri Siemens Multistix 10 SG idrar tahlili şeritleriyle analiz edildi (alışmanın başında ve sonunda olmak üzere toplam 2 defa)



Resim 3.4. Toplanan idrar örnekleri ve dereceli suluklar



Resim 3.5. Toplanan idrar örneklerinde idrar tahlil şeritleri

3.3.3. Deneyin sonlandırılması

Her grupta son oral gavaj uygulamasından 24 saat sonra sıçanlar tartılarak vücut ağırlıkları kaydedildi. Sıçanların kuyruk venlerinden alınan 100 μ l kan alındı ve Compherensive Diagnostic Rotor ile GÜDAM' da bulunan VETSCAN ANALYZER cihazı kullanılarak biyokimyasal parametrelerin ölçümleri yapıldı. Denekler, IM Rompun+Ketamin (50+60-100 mg/kg) anestezisi altında kalplerinden kan alınarak feda edildiler. Ötenazi işlemi tamamlandıktan hemen sonra sol böbrek renal arteri sağlam kalacak şekilde izole organ banyosuna asılıp kasılma gevşeme yanıtları

takibi için izole edildi. Sağ böbrek dokusu histopatolojik incelemeler için çıkartıldı, ayrılıp formaline alındı.



Resim 3.6. Ötenazi sonrası disseksiyon işlemi

3.4. Deney Bitiminde Yapılan Ölçümler ve İncelenen Parametreler

3.4.1. Vasküler yanıtların alınması

İzole perfüze sıçan böbreğinde nefropati gelişmesini takiben fonksiyonel açıdan meydana gelen değişiklikleri incelemek için sol böbrek, renal arteri sağlam kalacak şekilde izole edilip Krebs Hanseleit solüsyonu ile perfüze edilerek, %95 O₂ ve %5 CO₂ karışımı ile gazlandırılan izole organ banyosuna asıldıktan sonra ortalama 40 dk stabilizasyon süresini takiben bolus tarzda Phe sırasıyla 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ M dozlarda ve her doz arası ortalama 15 dk stabilizasyon süresi beklenerek kasılma yanıtları incelendi. Ardından yaklaşık 20 dakikalık stabilizasyon süresini takiben Ang II sırasıyla 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷ M ve her doz arası ortalama 15 dakika stabilizasyon süresi beklenerek kasılma yanıtları incelendi. Ardından nihai konsantrasyon 10⁻⁶ M olacak şekilde 200 cc Krebs Hanseleit solüsyonu içerisine 20 µl 10⁻² M Phe ilave edildi ve perfüzyon basıncının yükselmesi beklenildi. Yükselme kademeli şekilde devam ederken plato fazının gözlemlendiği anda ACh) sırasıyla 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ M dozlarda ve

her doz arası ortalama 15 dakika stabilizasyon süresi beklenerek kasılma ve gevşeme yanıtları incelendi.



Resim 3.7. Böbreğin izole organ banyosuna asılmaya hazırlanışı



Resim 3.8. İzole organ banyosuna asılan böbreğe farmakolojik ajanların uygulanışı

3.4.2. Histolojik ve immünohistokimyasal inceleme

Transmission elektron mikroskopik (TEM) yöntem

1mm³ lük parçalara bölünen doku örnekleri 0,1M fosfat tamponlu %2,5'lik gluteraldehitte (pH 7,4) 2 saat tespit edildi. Tespit süresi bitiminde tampon ile 3 kez yıkanan dokular 1 saat %1'lik osmiyum tetraoksit'e etkin bırakılarak post fiksasyonları yapıldı. Süre bitiminde dereceli alkol serilerinden geçirilen dokuların dehidrate olmaları sağlandı. Son olarak propilen oksit'e etkin bırakılan dokular Araldit CY212 kit ile hazırlanan gömme materyali ile blok haline getirildi. 56°C'lık etüvde 48 saat polimerize edilen bloklardan yarı-ince kesitler alınarak toluidin blue ile boyandı ve ışık mikroskopta incelendi. İşaretlenen bölgelerden alınan ince

kesitler uranil asetat – kurşun sitrat ile boyanarak Zeiss EVO 010 transmission ataçmanlı scanning elektron mikroskopta (STEM) değerlendirildi.

İmmünohistokimyasal yöntem

Doku örnekleri %10' luk nötral formalinde tespit edildi ve alışılmış ışık mikroskop takibinden geçirilerek parafin bloklar hazırlandı. Polilizinli camlar üzerine alınan kesitlere indirekt immünohistokimyasal yöntemlerden avidin-biyotin peroksidaz immün boyama yöntemi uygulandı. Primer antikor olarak anti-TGF- β , anti-iNOS, anti-eNOS, anti-fibronektin, kullanıldı. Kromojen olarak AEC ve DAB, zemin boyası olarak ise hematoksilen tercih edildi. Elde edilen preparatlar Leica DM4000 bilgisayar donanımlı fotoışık mikroskopta değerlendirildi. Her bir antikor için, tüm gruplara ait skor tabloları böbrek kesitlerinde korteks ve medulla, için hazırlandı. Her bir camda X400 büyültmede rastgele beş alan seçilerek tutulumların yoğunluğu semi kantitatif olarak 0 (-, tutulum yok), 1 (+, zayıf immünreaktivite), 2 (++ , orta düzeyde immünreaktivite), 3 (+++, kuvvetli düzeyde immünreaktivite) şeklinde skorlandı.

3.4.3. Dokuda yapılan biyokimyasal analizler

Feda edilen deneklerin böbrek dokuları paketlenerek sıvı nitrojende dondurulup analizi yapılınca kadar – 80°C de saklandı.

Dokuda TBARS tayin yöntemi

Dokuda MDA düzeyleri tiyobarbitürik asit reaktif madde oluşumu yöntemiyle çalışıldı [226].

Kullanılan Solüsyonlar:

- %10'luk TCA
- %1'lik BHT (%95'lik alkol içinde)
- %0.67'lik TBA

Böbrek doku örnekleri tartıldı. Sonikatör ile soğuk TCA (1 gr doku + 9 ml %10'luk

TCA) içinde buzlu ortamda homojenize edildi. Daha sonra homojenat 15 dk süre ile 4000 rpm'de, +4 °C de santrifüj edildi ve süpernatant alınarak 4000 rpm'de 8 dk tekrar santrifüj edildi. Örnekten 750 µl alınarak üzerine 750 µl %67'lik TBA ve 10 µl %1' lik BHT eklendi. Vorteksle iyice karıştırılarak kaynayan su banyosunda 15 dk bekletildi ve daha sonra oda ısısına kadar soğutularak 4000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant alınarak numunelerin optik dansitesi spektrofotometrede 535 nm'de, köre karşı okundu. Lipid peroksit seviyeleri $1,56 \times 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ katsayısı ile çarpılarak MDA ekivalanı nmol olarak gr doku başına hesaplandı.

Dokuda GSH tayin yöntemi

Dokuda GSH tayini için modifiye Ellman yöntemi kullanıldı [227].

Kullanılan solüsyonlar:

- 0,3 M NaH_2PO_4
- DTNB (0,4 mg / ml %1'lik sodyum sitrat)

Böbrek doku örnekleri TBARS yöntemindeki gibi sonikatör ile homojenize edilip santrifüj edildikten sonra 2 hacim süpernatant, 8 hacim NaH_2PO_4 ve 1 hacim DTNB çözeltisi ile karıştırıldı. Oda ısısında 5-10 dk bekletildikten sonra karışımın absorbansı spektrofotometrede köre karşı 412 nm dalga boyunda ölçüldü. GSH düzeyleri $13,600 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ katsayısı kullanılarak µmol/gr doku olarak ifade edildi.

Dokuda NOx tayin yöntemi

Dokuda NO' nun temsilcisi olarak nitrit+nitrat (NOx) düzeylerinin tayininde modifiye Griess yöntemi kullanıldı [228]. Standart olarak deiyonize su ile hazırlanmış sodyum nitratın 0-50 µM dilüsyonları kullanıldı.

Numunelerin hazırlanması

Doku örneklerini pH 7,4 olan fosfat tamponu ile 5:1 (w/v) oranında homojenize edildi. Homojenat +4°C de 3000x g de 20 dk santrifüj edilerek süpernatant ayrıldı. 0,5 ml

süpernatant alınarak üzerine 250 µl 0,3 N NaOH ilave edildi. Oda ısısında 5 dk inhibisyonuna bırakıldı. Üstüne 250 mikrolitre %10'luk ZnSO₄ ilave edildi. Vortekslenen karışım +4°C de 3000g de 5 dk santrifüj edildi. Üst fazın tamamı ayrılarak +4°C de 14000 rpm de 5 dk daha santrifüj edildi.

Ölçümün yapılışı

Doku örneklerinin deproteinizasyon ve çöktürme işlemlerinden sonra elde edilen üst fazlarından NO_x tayini için 0,1 ml alınarak her bir örnekten çift tekrar olacak şekilde 96 çukurlu ELISA plağına yerleştirildi. Eş hacimde standart solüsyonları da ayrı çukurlara yerleştirildi. Standart solüsyonlar ve numunelerin üzerine 1 birim VaCl₃ (400 mg VaCl₃ tartılır, 1 molar HCl çözeltisi ile 50 ml'ye tamamlanarak karıştırılır.) 0,05 ml sülfanilamid ve ardından 0,05 ml NEDD eklendi. Plak 37 °C de 30 dk etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ELISA okuyucusunda 540 nm dalga boyunda ölçüldü.

3.5. İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Deneyler sonucunda elde edilen veriler SPSS 15.0 istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. Sıçanların çalışma süresince ağırlık değişimleri, kan glukoz değerlerindeki değişimler, aldıkları ve kaybettikleri sıvı miktarı değişimleri, belirli periyotlarda yapılan biyokimyasal analizlerin değerlendirmeleri Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U nonparametrik testleriyle karşılaştırıldı. Anlamlılık değeri p<0,05 olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Diyabetik Bulgular

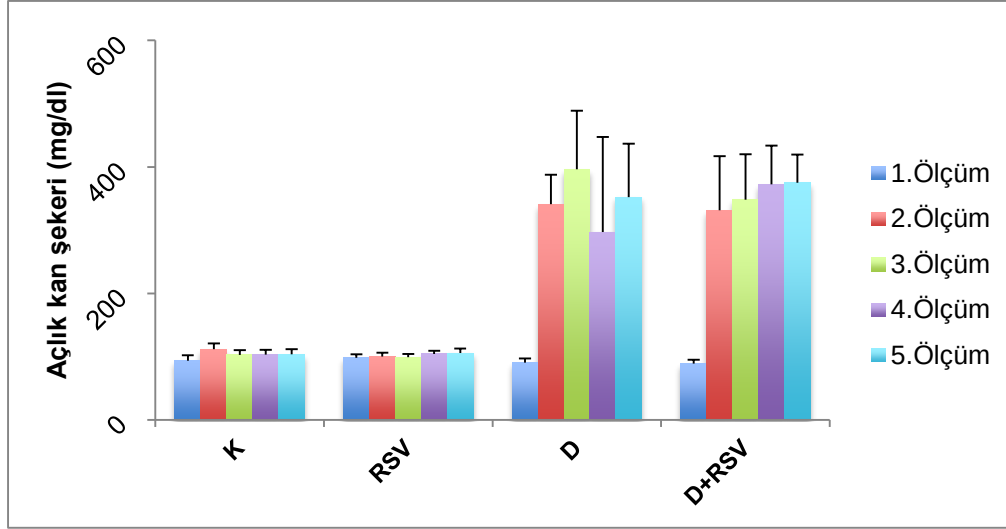
Çalışmada ağırlıkları 250 - 300 g arasında değişen 30 adet erişkin, erkek Wistar albino sıçan kullanıldı. Kontrol grubunda 6, diğer gruplarda 8 adet olacak şekilde sıçanlar gruplandırıldı. STZ uygulamasından 72 saat sonra tüm gruplardaki sıçanların ağırlıkları tartılarak ve AKŞ 'leri ölçülerek, kaydedildi. Kan şekerinin normal aralığı 90-100 mg/dl kabul edilerek, AKŞ'i 250 mg/dl 'nin üzerinde olan değerler diyabet olarak kabul edildi ve çalışmanın diyabet gruplarına dahil edildi. Çalışma başından sonuna kadar deneklerin; ağırlıkları, AKŞ' leri, TKŞ' leri haftada bir ölçülerek takip edildi. Bununla birlikte, çalışma süresince toplam 5 defa olmak üzere ve uygulamaların kritik dönemlerine gelen haftalar göz önüne alınarak denekler metabolik kafese konuldu. Metabolik kafeste kaldıkları 24 saat boyunca aldıkları su ve çıkardıkları idrar miktarı gözlendi, ölçümleri alınıp kaydedildi. Yapılan metabolik kafes ölçümlerinin çalışmanın hangi haftasına denk geldiği ve o haftalarda yapılan uygulamalar Çizelge 4.1. de belirtildi. Her bir grubun metabolik kafeste kaldıkları süre boyunca kaydedilen ağırlıkları, AKŞ' leri, TKŞ' leri aldıkları sıvı miktarları ve çıkardıkları idrar miktarlarının ortalamaları aritmetik olarak hesaplandı grafik üzerinde gösterildi.

Çizelge 4.1. Deney süresince yapılan metabolik kafes ölçümlerinin ve uygulamaların yapıldığı haftalar

ÖLÇÜMLER HAFTALAR	1.ÖLÇÜM 0.HAFTA	1. ve 2. HAFTA	2.ÖLÇÜM 3.HAFTA BAŞI	3.ÖLÇÜM 5.HAFTA SONU	4.ÖLÇÜM 7.HAFTA SONU	5. ÖLÇÜM 10. HAFTA SONU
GRUPLAR						
KONTROL (K)	DENEKLERE HERHANGİ BİR UYGULAMA YAPILMADI	1. ölçüm yapıldıktan sonra STZ çözücüsü enjeksiyonu yapıldı ve 2 hafta beklenildi.	Ölçümden sonra etanol yutturulmaya başlandı.	3 hafta etanol yutturulması sonu	5 hafta etanol yutturulması sonu	8 hafta etanol yutturulması sonu
RESVERATROL (RSV)			Ölçümden sonra RSV yutturulmaya başlandı.	3 hafta RSV yutturulması sonu	5 hafta RSV yutturulması sonu	8 hafta RSV yutturulması sonu
DİYABET (D)		1.ölçüm yapıldıktan sonra STZ enjeksiyonu yapıldı,	STZ sonrası 3. haftanın başı Herhangi bir uygulama yok	STZ sonrası 5. haftanın sonu Herhangi bir uygulama yok	STZ sonrası 7. haftanın sonu Herhangi bir uygulama yok	STZ sonrası 10. haftanın sonu Herhangi bir uygulama yok
DİYABET+RESVERATROL (D+RSV)		diyabetin oluşumu ve stabilizasyonu için 2 hafta beklenildi.	STZ sonrası 3. haftanın başı Ölçümden sonra RSV yutturulmaya başlandı.	STZ sonrası 5. haftanın sonu 3 hafta RSV yutturulması sonu	STZ sonrası 7. haftanın sonu 5 hafta RSV yutturulması sonu	STZ sonrası 10. haftanın sonu 8 hafta RSV yutturulması sonu

Çizelge 4.2. Metabolik kafes düzeneğinde yapılan ölçümlerin haftalara göre değişimi

GRUPLAR	ÖLÇÜMLER	AKŞ (ORT±SD)	ALINAN SIVI (ORT±SD)	ÇIKARILAN İDRAR (ORT±SD)	AĞIRLIK (ORT±SD)	TKŞ (ORT±SD)
KONTROL (K)	1	93,3 ± 8,71	25 ± 8,94	22,6 ± 7,14	272 ± 17,58	98,6 ± 5,98
	2	111,6 ± 9,22	25,5 ± 7,31	21,6 ± 5,85	282 ± 23,9	123 ± 5,86
	3	102,6 ± 7,76	24,8 ± 7,8	22,6 ± 5,92	291 ± 27,35	123,6 ± 4,92
	4	103,3 ± 7,25	25,6 ± 5,31	17,5 ± 3,88	297,2 ± 27,35	125,5 ± 3,14
	5	103,8 ± 7,75	25,8 ± 7,35	17 ± 2,82	303,3 ± 29,45	125,5 ± 3,72
RESVERATROL (RSV)	1	98,1 ± 5,33	31,8 ± 9,65	16 ± 6,41	298,6 ± 7,46	118 ± 8,10
	2	100,2 ± 6,15	31,2 ± 12,74	16 ± 4	300,3 ± 9,60	116,5 ± 6,48
	3	99,1 ± 5,19	34,8 ± 12,75	16,1 ± 5,84	317,1 ± 12,08	112,2 ± 6,01
	4	104,2 ± 5,20	39,3 ± 14,64	18,5 ± 5,29	330,6 ± 18,13	113,7 ± 5,47
	5	105,5 ± 7,44	37,8 ± 13,17	19,8 ± 4,85	332,5 ± 14,3	110,3 ± 5,92
DİYABET (D)	1	90,6 ± 6,53	21,5 ± 4,27	17,6 ± 4,27	262,3 ± 23,83	114,5 ± 3,44
	2	340,8 ± 46,57	68,3 ± 12,11	48,8 ± 16,12	222,5 ± 23,82	383 ± 58,67
	3	396,3 ± 92,43	60 ± 8,94	44,1 ± 13,57	206,6 ± 31,68	439,8 ± 140,2
	4	297,1 ± 150,5	67,5 ± 8,80	58,3 ± 8,16	225,3 ± 26,96	441,8 ± 145,7
	5	352 ± 84,64	63,3 ± 9,83	57,5 ± 9,35	249 ± 24,62	513,5 ± 11,7
DİYABET+RESVERATROL (D+RSV)	1	88,8 ± 6,24	27,8 ± 15,86	14,7 ± 3,53	189,5 ± 4,86	105 ± 7,59
	2	331,6 ± 85,49	61,7 ± 7,14	54,2 ± 3,88	229 ± 28,4	548,2 ± 44,97
	3	348 ± 71,78	103,7 ± 17,67	80,7 ± 12,82	240,7 ± 35,17	487,1 ± 54,92
	4	372,3 ± 61,15	97,5 ± 13,88	79,5 ± 11,08	246,3 ± 35,8	475,7 ± 48,07
	5	374,7 ± 45,02	89,3 ± 10,83	69,5 ± 4	252,6 ± 32,13	484,1 ± 41,1



Şekil 4.1. Grupların metabolik kafes gözlemlerinde, AKŞ' lerindeki değişim

Değerler ort ± SD olarak verildi.

K: Kontrol Grubu, D: Diyabet Grubu, D+RSV: Diyabet+RSV Grubu, RSV: RSV Grubu

1.Ölçüm: Gruplar arasında anlamlı bir fark yoktur.

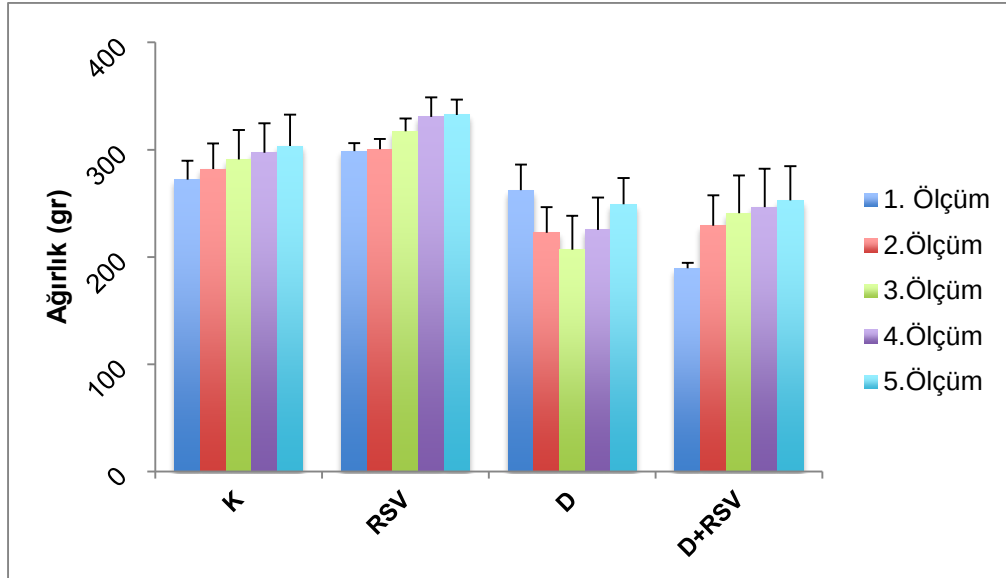
2.Ölçüm: **p<0,001**: RSV/D+RSV; **p<0,01**: K/D, D/RSV, K/D+RSV

3.Ölçüm: **p<0,001**: RSV/D+RSV; **p<0,01**: K/D, D/RSV, K/D+RSV

4.Ölçüm: **p<0,001**: RSV/D+RSV; **p<0,01**: K/D, D/RSV, K/D+RSV; **p<0,05**: D/D+RSV

5.Ölçüm: **p<0,001**: RSV/D+RSV; **p<0,01**: K/D, D/RSV, K/D+RSV

Kontrol ve RSV gruplarındaki deneklerin AKŞ düzeylerinde beklenildiği üzere 8 hafta boyunca herhangi bir değişim gözlenmedi. Diyabet ve Diyabet+RSV grubunda ise kontrollerine göre AKŞ düzeyleri STZ uygulaması sonrası yükseldi. Diyabet+RSV grubunda AKŞ düzeylerinde 3. ölçüm Diyabet grubunun AKŞ düzeylerine göre bir düşüş gözlenirse de, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Diyabet+RSV grubunda AKŞ 4. ölçümünde diyabet grubuna göre gözlenen artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Ancak sıçanlar feda edilmeden yapılan son ölçümde (5.ölçüm) Diyabet ve Diyabet+RSV grupları arasında AKŞ' leri açısından anlamlı bir fark tespit edilmedi. Bu sonuçlar RSV uygulamasının diyabete bağlı yükselen AKŞ değerlerinde düşme yapmadığını gösterdi.



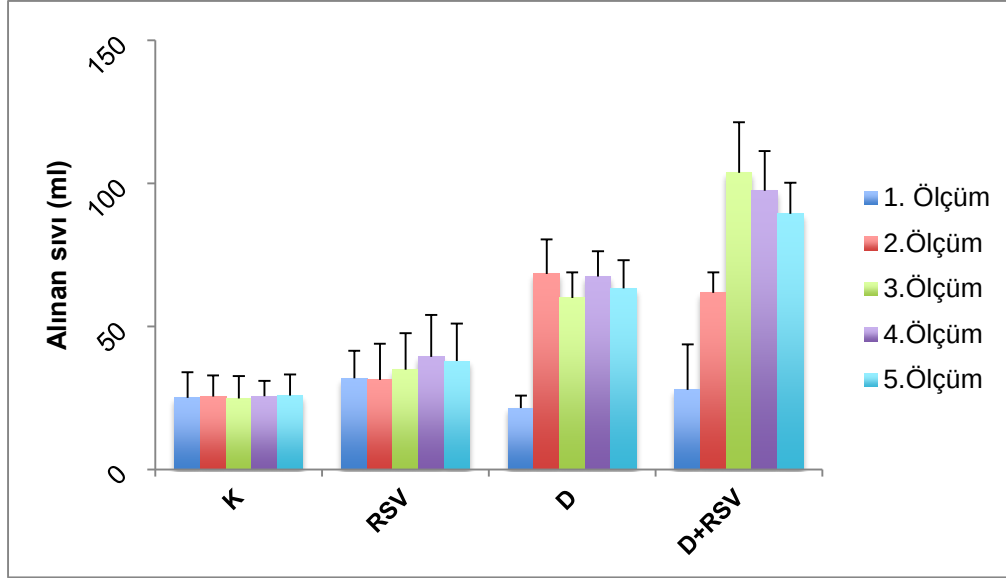
Şekil 4.2. Grupların metabolik kafes gözlemlerinde, ağırlıklarındaki değişim

Değerler ort $\pm$ SD olarak verildi.

K: Kontrol Grubu, D: Diyabet Grubu, D+RSV: Diyabet+RSV Grubu, RSV: RSV Grubu

- 1.Ölçüm: Gruplar arasında anlamlı bir fark yoktur.
- 2.Ölçüm: **p<0,001**: RSV/D+RSV; **p<0,01**: K/D, D/RSV, K/D+RSV
- 3.Ölçüm: **p<0,001**: RSV/D+RSV; **p<0,01**: K/D, D/RSV **p<0,05**: K/D+RSV
- 4.Ölçüm: **p<0,001**: RSV/D+RSV; **p<0,01**: K/D, D/RSV **p<0,05**: K/D+RSV
- 5.Ölçüm: **p<0,001**: RSV/D+RSV; **p<0,01**: D/RSV **p<0,05**: K/D, K/D+RSV

Çalışma başlangıcından itibaren, Diyabet ile Diyabet+RSV gruplarındaki deneklerin kontrollerine göre beden ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi. Ancak her iki gruba ait deneklerin beden ağırlıkları arasında çalışmanın her hangi bir döneminde anlamlı bir fark tespit edilmedi. Kontrol ve RSV gruplarındaki denekler arasında da beden ağırlığı yönünden anlamlı bir fark yokken Diyabet ve Diyabet+ RSV grubu ile karşılaştırıldığında çalışma boyunca ağırlıklarında artış gözlemlendi ($p<0,05$).



Şekil 4.3. Grupların metabolik kafes gözlemlerinde, alınan sıvı miktarlarındaki değişim

Değerler ort $\pm$ SD olarak verildi.

K: Kontrol Grubu, D: Diyabet Grubu, D+RSV: Diyabet+RSV Grubu, RSV: RSV Grubu

1.Ölçüm: Gruplar arasında anlamlı bir fark yoktur.

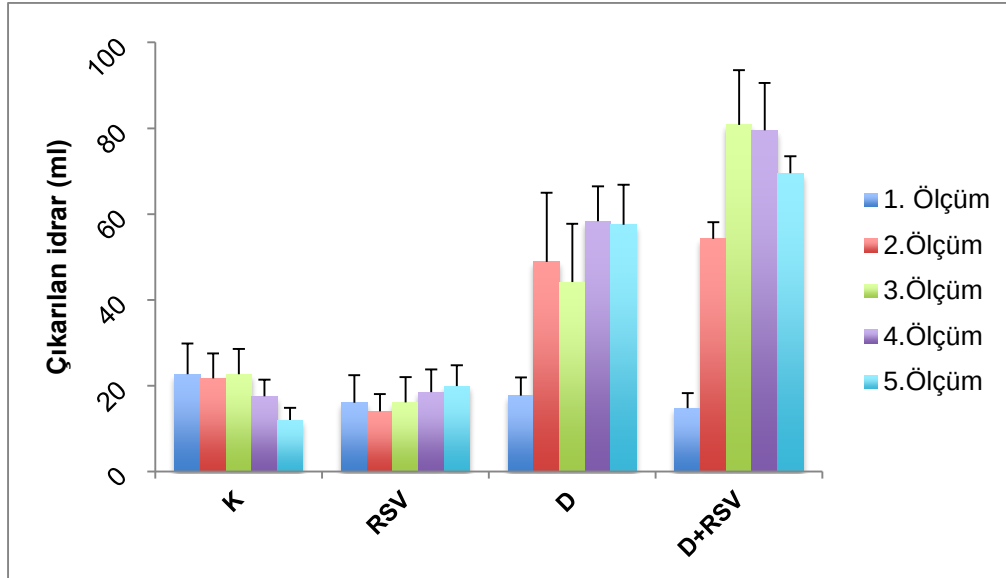
2.Ölçüm: **p<0,001**: RSV/D+RSV; **p<0,01**: K/D, D/RSV, K/D+RSV

3.Ölçüm: **p<0,001**: RSV/D+RSV; **p<0,01**: K/D, D/RSV, K/D+RSV, D/D+RSV

4.Ölçüm: **p<0,001**: RSV/D+RSV; **p<0,01**: K/D, D/RSV, K/D+RSV, D/D+RSV

5.Ölçüm: **p<0,001**: RSV/D+RSV; **p<0,01**: K/D, D/RSV, K/D+RSV, D/D+RSV

Çalışmanın başlangıcından sonuna kadar Kontrol grubu ile RSV grubunda bulunan deneklerin sıvı alımlarında beklenildiği gibi istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Diyabet ile Diyabet+RSV gruplarında kontrollerine göre deneklerin sıvı alımlarında, diyabetin bulgularından biri olan polidipsiyi destekler nitelikte istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi. Diyabet+RSV grubunda 3., 4., ve 5. ölçümlerde Diyabet grubuna göre deneklerin sıvı alımında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi. Sonuçlarımız RSV uygulamasının diyabete bağlı artan sıvı alımında azalma yapmadığını gösterdi.



Şekil 4.4. Grupların metabolik kafes gözlemlerinde, çıkarılan idrar miktarındaki değişim

Değerler ort $\pm$ SD olarak verildi.

K: Kontrol Grubu, D: Diyabet Grubu, D+RSV: Diyabet+RSV Grubu, RSV: RSV Grubu

1.Ölçüm: Gruplar arasında anlamlı bir fark yoktur.

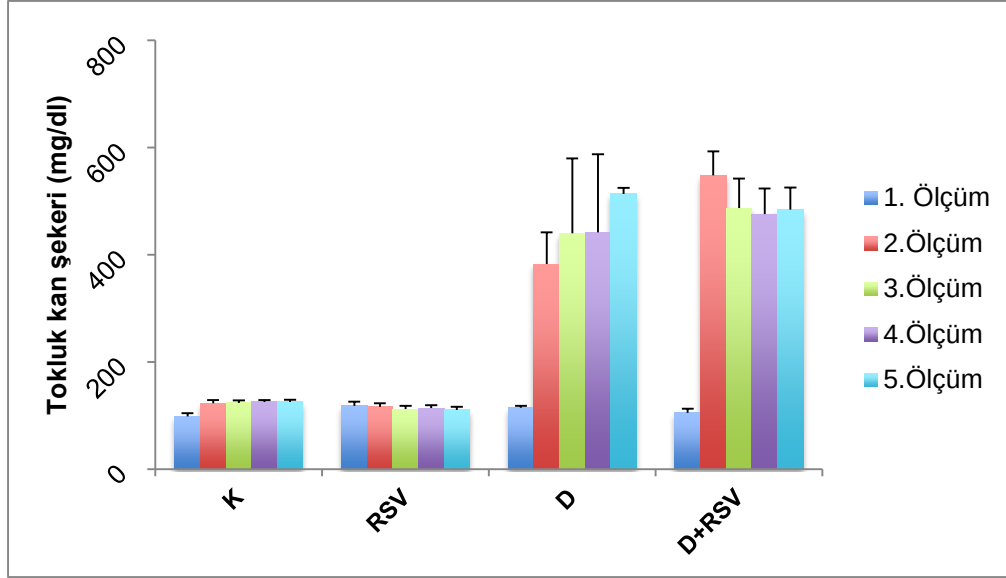
2.Ölçüm: **$p<0,001$** : R/D+RSV; **$p<0,01$** : K/D+RSV, D/RSV; **$p<0,05$** : K/D

3.Ölçüm: **$p<0,001$** : R/D+RSV; **$p<0,01$** : K/D+RSV, D/RSV, D/D+RSV; **$p<0,05$** : K/D

4.Ölçüm: **$p<0,001$** : R/D+RSV; **$p<0,01$** : K/D, K/D+RSV, D/RSV, D/D+RSV

5.Ölçüm: **$p<0,001$** : R/D+RSV; **$p<0,01$** : K/D, K/D+RSV, D/RSV, D/D+RSV

Çalışma boyunca Kontrol grubu ile RSV grubunda bulunan deneklerin çıkardıkları idrar miktarlarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. kontrolleri ile karşılaştırıldığında Diyabet ile Diyabet+RSV gruplarındaki deneklerin çıkardıkları idrar miktarı diyabetin bulgularından biri olan poliüriyi destekler nitelikte anlamlı olarak artmıştır. En yüksek değerler D+RSV grubundaki 3., 4. ve 5. ölçümlerde kaydedildi. Bu sonuçlar RSV uygulamasının diyabete bağlı olarak artan idrar miktarında düzelme yapmadığını gösterdi.



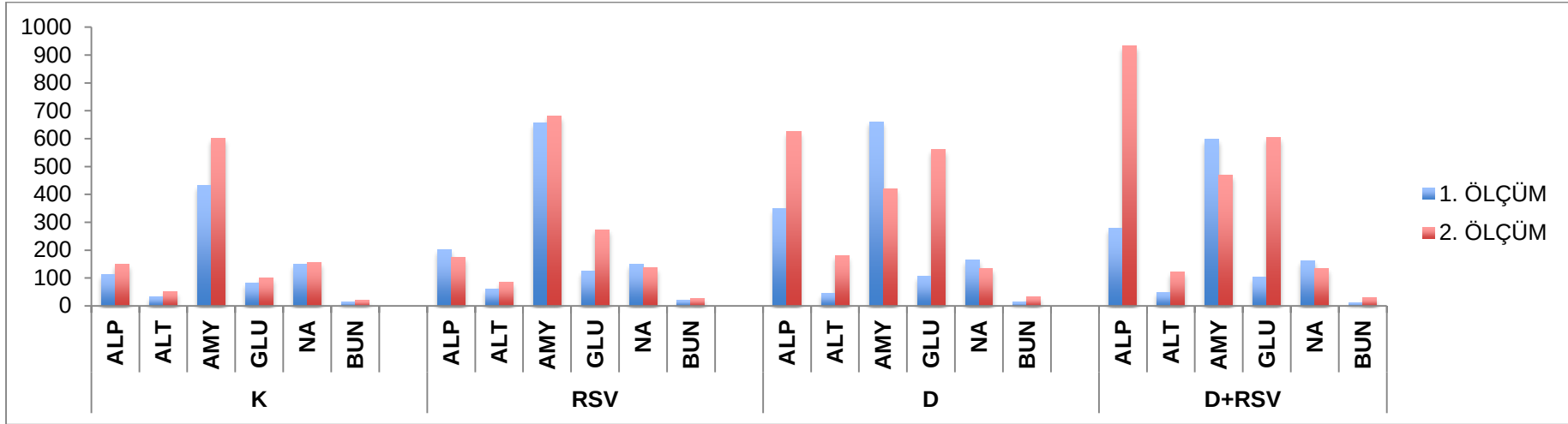
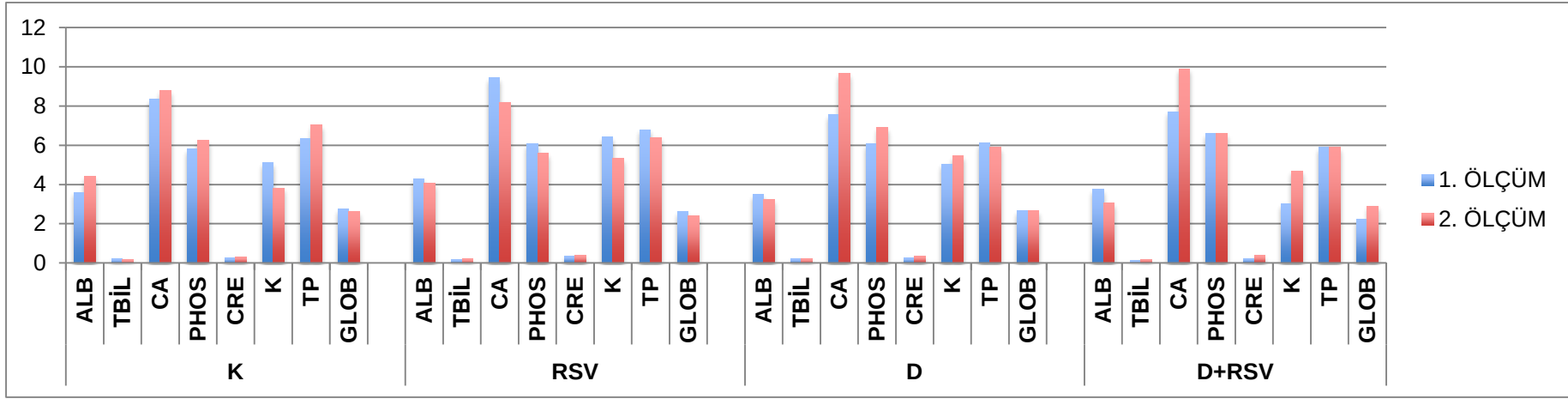
Şekil 4.5. Grupların metabolik kafes gözlemlerinde, tokluk kan şekeri değişimi

Değerler ort $\pm$ SD olarak verildi.

K: Kontrol Grubu, D: Diyabet Grubu, D+RSV: Diyabet+RSV Grubu, RSV: RSV Grubu

- 1.Ölçüm: Gruplar arasında anlamlı bir fark yoktur.
- 2.Ölçüm: **p<0,001**: R/D+RSV; **p<0,01**: K/D, D/RSV, K/D+RSV
- 3.Ölçüm: **p<0,001**: R/D+RSV; **p<0,01**: K/D, D/RSV, K/D+RSV
- 4.Ölçüm: **p<0,001**: R/D+RSV; **p<0,01**: K/D, D/RSV, K/D+RSV
- 5.Ölçüm: **p<0,001**: R/D+RSV; **p<0,01**: K/D, D/RSV, K/D+RSV

Kontrol ve RSV gruplarındaki deneklerin TKŞ düzeylerinde beklenildiği üzere 8 hafta boyunca herhangi anlamlı bir değişim gözlenmedi. Diyabet ve Diyabet+ RSV grubunda TKŞ düzeylerinde STZ uygulaması sonrası ve takip eden süre boyunca anlamlı bir artış gözlemlendi. Diyabet+RSV grubunda 2. ölçümde TKŞ düzeylerinde Diyabet grubunun TKŞ düzeylerine göre bir artış gözlenirse de, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. RSV uygulamasının diyabete bağlı yükselen TKŞ değerlerinde anlamlı bir değişiklik yapmadığı tespit edildi.



Şekil 4.6. Kanda yapılan biyokimyasal incelemeler

Çizelge 4.3. Kanda yapılan biyokimyasal incelemelerin sayısal verileri

74

GRUPLAR	ÖLÇÜMLER	ALB	ALP	ALT	AMY	TBİL	BUN	CA	PHOS	CRE	GLU	NA	K	TP	GLOB
K	1	3,6±1,0 2	113,3±30, 3	33,6±1,1	431±109, 3	0,2±0	13,6±2, 5	8,3±0,8 5	5,8±0,2	0,26±0, 05	82,6±4,04	150±6,5	5,1±0,2 5	6,3±0,4 9	2,7±0,9
	2	4,4±0,6 5	148,6±32, 6	51±5,19	602,3±57, 6	0,16±0, 05	21±3,6	8,8±0,8	6,2±0,9	0,3±0,1	99,6±13,5 7	154,6±6,6 5	3,8±3,3 2	7,0±0,3 7	2,6±0,3 7
RSV	1	4,3±0,1 8	201±29	59,7±7,93	656±77,9	0,17±0, 05	21,25±2 ,7	9,45±0, 6	6,07±0, 33	0,35±0, 05	124,2±13, 8	148,7±3,7	6,4±0,7	6,8±0,1 5	2,6±0,9
	2	4±0,19	172,7±97	85±54	681±89,2	0,2±0	27,2±2, 62	8,2±2,8 2	5,6±0,4	0,4±0,0 5	273,7±72, 4	137,7±6,6	5,3±2,1 6	6,4±0,1 7	2,4±0,1 5
D	1	3,5±1,1 3	350±148, 2	45,5±5,44	661,2±12 7	0,2±0,0 8	12,25±1 ,5	7,5±0,8 6	6,±0,63	0,2±0,0 57	105,7±13	164,2±6,6 5	5,05±0, 63	6,1±0,6 2	2,6±0,5 5
	2	3,2±0,3 5	627±369	179,7±14 1,4	421,2±16 2	0,2±0,0 8	31,5±10 ,3	9,6±0,5	6,9±1,5	0,3±0,1	562±113	133,5±0,5	5,4±1,3 1	5,9±0,5 2	2,6±0,4 4
D+RSV	1	3,7±0,8 6	279±122, 2	49±18	597±126, 2	0,12±0, 1	10,8±3, 03	7,72±2, 27	6,6±1,4 8	0,22±0, 04	102±25,6	162,2±15, 2	3±2,9	5,9±1,2 7	2,22±0, 4
	2	3±0,9	933±443	121,6±50, 1	468±88,5	0,18±0, 04	28,8±2, 38	9,9±0,4	6,6±0,5 7	0,38±0, 1	605±93,7	134,4±1,6 6	4,7±0,7	5,9±1,1 8	2,9±1,9 3

K: Kontrol Grubu, D: Diyabet Grubu, D+RSV: Diyabet+RSV Grubu, RSV: RSV Grubu

GLU için, $p<0,05$: K/D, K/D+RSV, D/RSV; **ALB** için, $p<0,05$: K/D, K/D+RSV, D/RSV

ALP için, $p<0,05$: K/D, D/RSV, K/D+RSV; **ALT** için, $p<0,05$: K/D, D/RSV

BUN için, $p<0,05$: K/D, D/RSV

Kan biyokimyası incelemelerinde kronik diyabete bağlı olarak deneklerde ALP, ALT, böbrek fonksiyonlarındaki bozulmaya bağlı olarak BUN ve kreatinin düzeylerinde yükselme, sodyum düzeyinde ise düşme tespit edildi. RSV uygulaması ile bozulan bu parametrelerde düzelme tespit edilemedi.

Çizelge 4.4. İdrar analiz verileri

İDRAR STRİBİ ÖLÇÜM	LEU	NIT	UBG-URO	PRO	pH	BLD-SNG	SG-DEN	KET-CET	BİL	GLU
K	NEGATİF	NEGATİF	NORMAL	NEGATİF	7,8	NEGATİF	1,008	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
RSV	NEGATİF	NEGATİF	NORMAL	NEGATİF	7,25	NEGATİF	1,02	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
D	NEGATİF	NEGATİF	NORMAL	+	6,75	NEGATİF	1,01	NEGATİF	NEGATİF	++++
D+RSV	NEGATİF	NEGATİF	NORMAL	+	6,8	NEGATİF	1,02	NEGATİF	NEGATİF	++++

K: Kontrol Grubu, D: Diyabet Grubu, D+RSV: Diyabet+RSV Grubu, RSV: RSV Grubu

Çalışmanın başında ve sonunda Siemens Multistix 10 SG idrar tahlili şeritleri ile yapmış olduğumuz idrar analizinde Diyabetik gruplarda, Diyabetik nihai bulgularından idrarda glukoz ve idrarda protein varlığını gözlemledik ; RSV tedavisinin bu bulgular üzerine olumlu bir etkisinin olmadığını gördük. Çizelgede çalışmanın sonundaki ölçüm sonuçları verilmiştir.

4.2. Histolojik Bulgular

4.2.1. İmmunohistokimyasal bulgular

İmmunohistokimyasal verileri değerlendirmek için yapılan skorlamada, -: tutulum olmadığını +: zayıf immünreaktivitenin olduğunu, ++: orta düzeyde immünreaktivitenin olduğunu, +++: kuvvetli düzeyde immünreaktivitenin olduğunu göstermektedir. (/) önündeki ve arkasındaki değerler iki değer arasında değişen tutulumu ifade etmektedir. Çizelge 4.5

Çizelge 4.5. Böbrek kesitlerinde korteks ve medulla bölgelerinde gruplara göre, eNOS, iNOS, TGF- β , Fibronektin antikorlarının skor tablosu

BÖBREK	e-NOS		i-NOS		TGF-β		FIBRONECTIN	
	KORTEKS	MEDULLA	KORTEKS	MEDULLA	KORTEKS	MEDULLA	KORTEKS	MEDULLA
KONTROL	+++	+++	-/+	+	-/+	+	+	+
RESVERATROL	++/+++	+++	+/+++	+	-/+	+	+	+
DİYABET	+	+/+++	+++	+++	++/+++	++/+++	++/+++	++
DİYABET+ RESVERATROL	+/+++	++	++/+++	++/+++	++	++	+/+++	+/+++

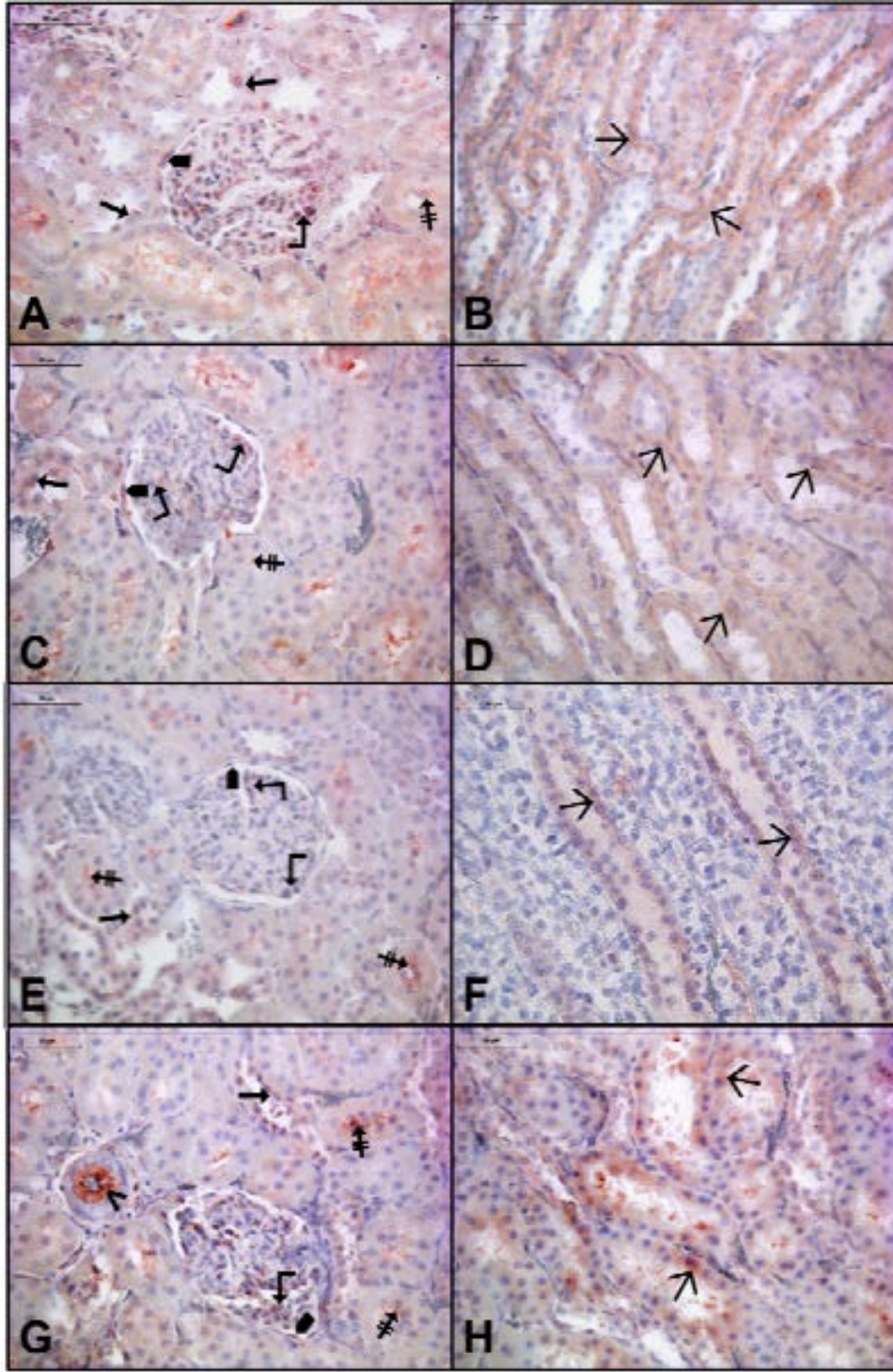
eNOS Bulguları

Kontrol grubunda yapılan değerlendirmelerde eNOS tutulumunun korteks ve medulla düzeyinde olduğu belirlendi. Glomerüllerde ortadan kuvvetliye değişen tutulum görüldü. Podositlerdeki ekspresyonun sitoplazmik düzeyde olduğu ayırt edildi. Benzer şekilde Bowman kapsülünün paryetal yaprağında da tepkime belirlendi. Proksimal ve distal tübüllerde ortadan kuvvetliye değişen tutulum izlendi (Resim 4.1.A). Meduller toplama kanallarında da sitoplazmik immün tutulum ilgiyi çekti (Resim 4.1.B).

RSV grubunda yapılan incelemelerde, yer yer bazı glomerüllerde eNOS immünreaktivitesinin kontrole karşın azaldığı saptandı. Bu bölgelerdeki tutulum genelde orta dereceliydi. Bowman kapsülünün paryetal yaprağındaki ekspresyon bu grupta da izlendi. Proksimal ve distal tübüllerdeki boyanma ise kontrole benzerdi (Resim 4.1.C). Meduller toplama kanallarında ise tutulum yoğunluğunun bazı bölgelerde kontrole karşın göreceli olarak azaldığı saptandı (Resim 4.1.D).

Diyabet grubunda yapılan değerlendirmelerde korteks bölgesindeki dejenere tübüller dikkati çekti. eNOS immünreaktivitesinin önceki iki gruba karşın belirgin olarak azaldığı ayırt edilmekle birlikte bazı podositlerde orta dereceli tutulumun sürdüğü görüldü. Bowman kapsülünün paryetal yaprağında tutulum son derece azdı. (Resim 4.1.E). Meduller toplama kanallarında da korteks bölgesine benzer olarak eNOS ekspresyonunun ilk iki gruba karşın belirgin olarak azaldığı izlendi (Resim 4.1.F).

Diyabet+RSV grubunda yapılan değerlendirmelerde eNOS tutulumunun özellikle glomerüler düzeyde diyabet grubuna karşın arttığı saptandı. Bowman kapsülünün paryetal yaprağındaki tutulum da diyabet grubuna karşın artmıştı. Bu grupta bazı damarlarda saptanan eNOS immünreaktivitesi de dikkati çekti. Proksimal ve distal tübüllerdeki boyanma diyabet grubuna benzerdi (Resim 4.1.G). Medulla bölgesindeki tutulum da diyabet grubuna karşın artmıştı ve yer yer bazı bölgelerde kuvvetli eNOS immünreaktivitesi ilgiyi çekti (Resim 4.1.H).



Resim 4.1. Böbreğe ait örneklerde eNOS bulguları

Kontrol grubu Korteks (A) ve medulla (B), RSV grubu korteks (C) ve medulla (D), diyabet grubu korteks (E) ve medulla (F), Diyabet+RSV grubu korteks (G) ve medulla (H) bölgesindeki e-NOS immünohistokimyasal boyamaları izleniyor. !: Glomerül, ": Bowman kapsülünün paryetal yaprağı, #: Proksimal tübül, \$: Distal tübül, !: Toplayıcı kanallar, >: Damar (İmmünperoksidaz-HematoksilenX400).

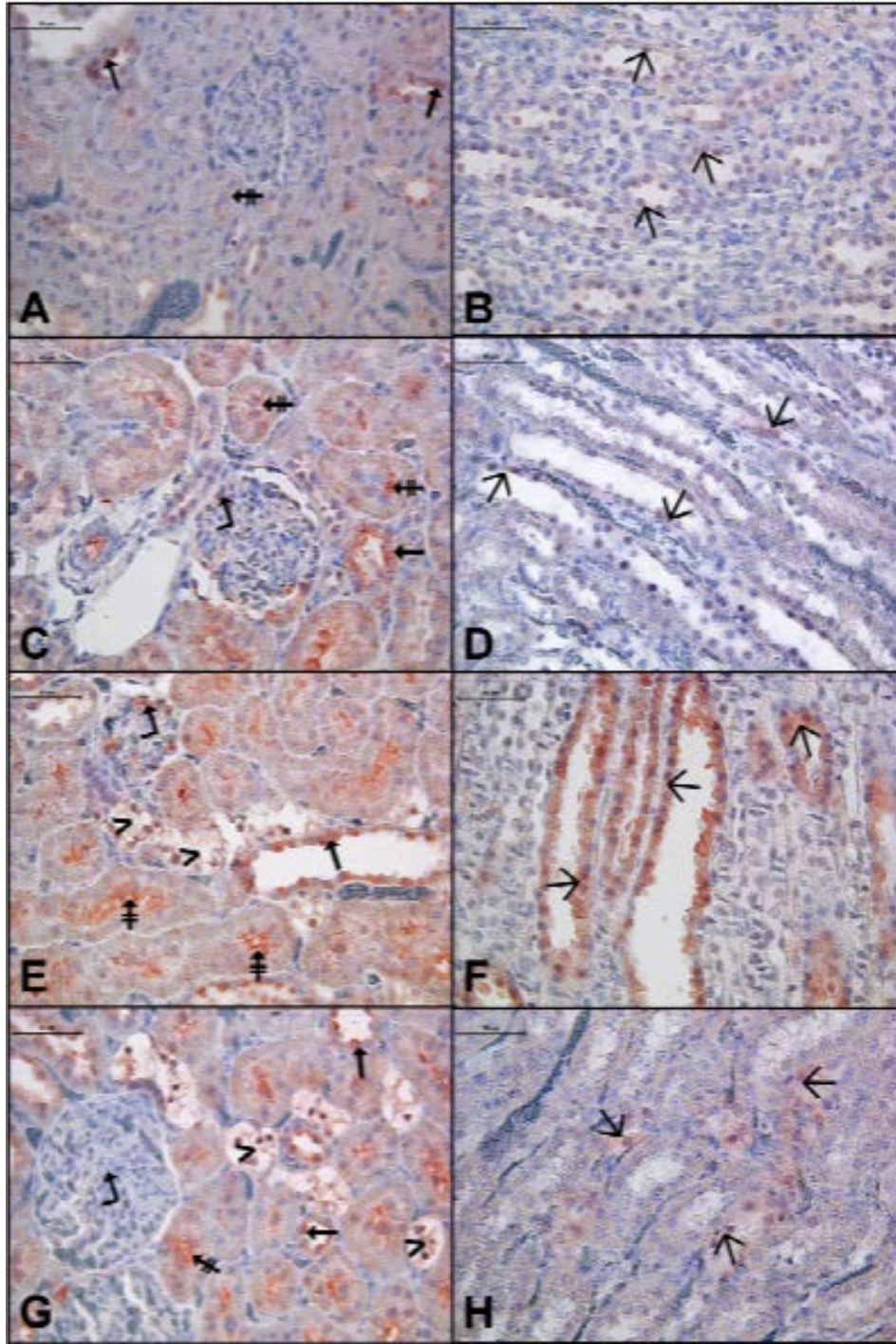
iNOS Bulguları

Kontrol grubunda yapılan değerlendirmelerde iNOS tutulumunun korteks ve meduller düzeyde olduğu belirlendi. Glomerüllerde immünreaktivite saptanmadı. Proksimal ve distal tübüllerde minimal düzeyde tutulum izlendi (Resim 4.2.B). Medullada bazı toplama kanallarında zayıftan ortaya değişen iNOS immün tutulumu ayırt edildi (Resim 4.2.B).

Resveratrol grubunda yapılan incelemelerde, iNOS tutulumunun böbrek tübüllerine ek olarak minimal düzeyde glomerüllerde de olduğu saptandı. Proksimal tübüllerde ekspresyonun kontrole karşın arttığı dikkati çekti. Bazı distal tübüllerde de kontrole karşın artmış iNOS immünreaktivitesi saptandı (Resim 4.2.C). Medulla bölgesindeki tutulum kontrole benzerdi (Resim 4.2.D).

Diyabet grubunda yapılan değerlendirmelerde korteks bölgesinde sklerotik değişikliklere bağlı olarak küçülmüş glomerüller ve dejenere distal tübüller dikkati çekti. iNOS immünreaktivitesinin, proksimal tübüllerde arttığı, dejenere distal tübül ve böbrek glomerüllerinde zayıf düzeyde olduğu görüldü (Resim 4.2.E). Medullada yapılan incelemelerde toplama kanalı iNOS tutulumunun dramatik şekilde arttığı ve tüm hücrelerde yaygın sitoplazmik immünreaktivitenin varlığı dikkati çekti (Resim 4.2.F).

Diyabet+RSV grubunda korteks bölgesinde yapılan değerlendirmelerde iNOS tutulumunun diyabet grubuna eşdeğer olduğu belirlendi. Bu grupta da diyabet grubuna benzer olarak dejenere tübüllerin varlıklarını sürdürdüğü görüldü. Hem proksimal hem de distal tübüllerde i-NOS immünreaktivitesi saptandı (Resim 4.2.G). Medulla toplama kanallarında ise tutulumun diyabet grubuna karşın azaldığı ilgiyi çekti (Resim 4.2.H).



Resim 4.2. Böbreğe ait örneklerde iNOS bulguları

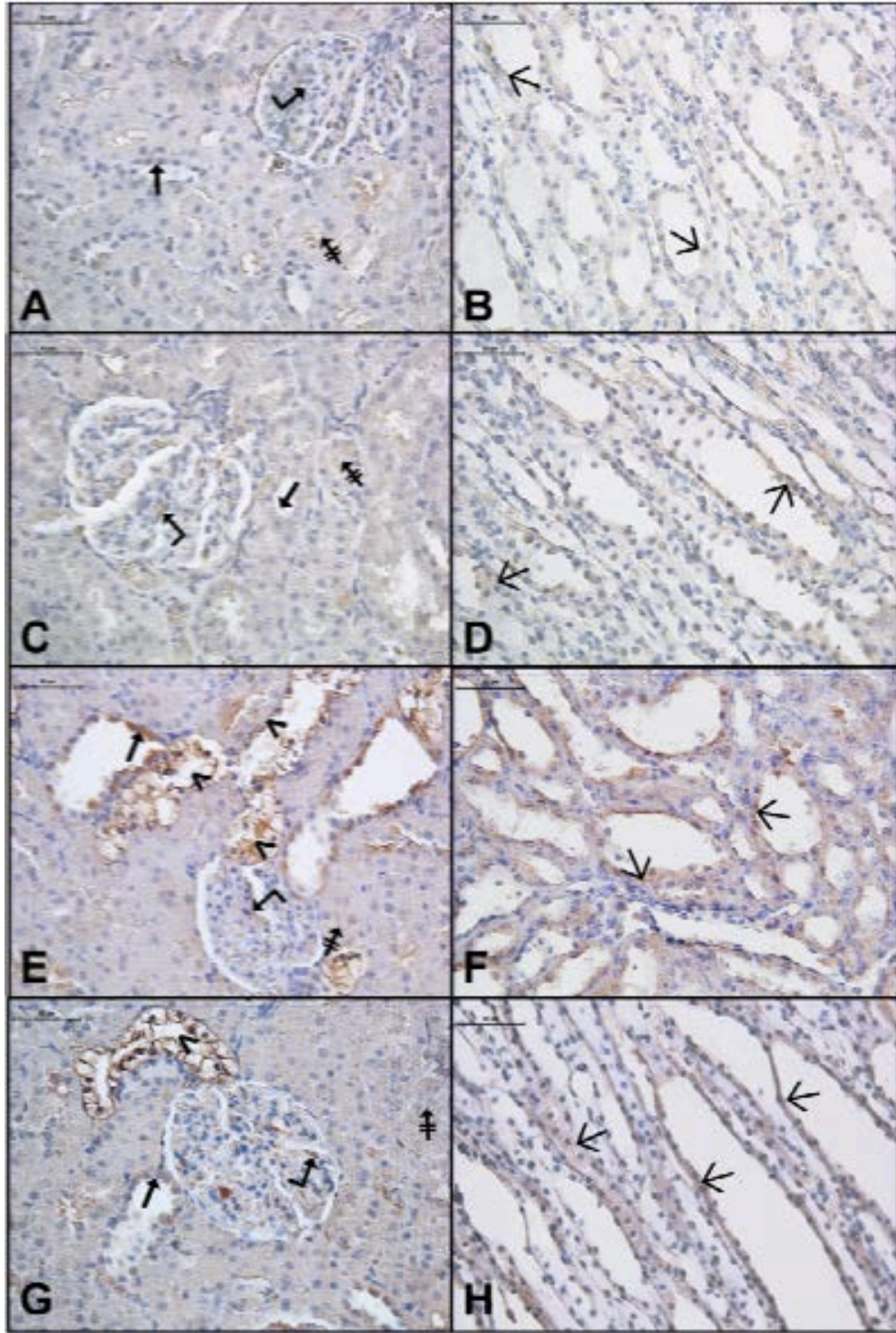
Kontrol grubu korteks (A) ve medulla (B), Resveratrol grubu korteks (C) ve medulla (D), diyabet grubu korteks (E) ve medulla (F), diyabet+Resveratrol grubu korteks (G) ve medulla (H) bölgesindeki i-NOS immünohistokimyasal boyamaları izleniyor. !: Glomerul, #: Proksimal tübül, \$: Distal tübül, !: Toplayıcı kanallar, >: Dejenere tübüller (İmmünperoksidaz- HematoksilenX400)

TGF- β Bulguları

Tüm gruplarda yapılan değerlendirmelerde, TGF- β immünreaktivitesinin korteks ve meduller düzeyde olduğu belirlendi. Kontrol ve RSV grubunda korteks bölgesindeki tutulumların birbirine eşdeğer olduğu görüldü. Her iki grupta da özellikle glomerüllerde son derece zayıf TGF- β ekspresyonu saptandı (Resim 4.3.A, Resim 4.3.C). Medulla bölgesinde de tutulumun birbirine benzer olduğu görülmekle birlikte, RSV grubunda kontrole karşı yer yer kuvvetli boyanma olduğu ilgiyi çekti (Resim 4.3.B, Resim 4.3.D).

Diyabet grubu değerlendirildiğinde ise, hem korteks hem de medulla bölgesinde önceki iki gruba karşı TGF- β tutulumunun arttığı ayırt edildi. Yine glomerüllerde yer yer yoğun sitoplazmik tutulum ilgiyi çekti. Bazı dejenere tübüllerde de ortadan kuvvetliye değişen immünreaktivite saptandı (Resim 4.3.E). Medulla bölgesinde de tutulum son derece yaygındı. Bu bölgede kuvvetli sitoplazmik tutulum gösteren hücreler ayırt edildi (Resim 4.3.F).

Diyabet+RSV grubunda yapılan incelemelerde, TGF- β ekspresyonun korteks bölgesinde diyabet grubuna karşı belirgin azaldığı görülmekle birlikte, glomerüllerde orta dereceli TGF- β tutulumu saptandı. Bu grupta da bir önceki gruba benzer olarak dejenere tübüllerde belirgin TGF- β ekspresyonu ayırt edildi (Resim 4.3.G). Medulla bölgesinde ise yer yer kuvvetli sitoplazmik tutulum gösteren hücreler ilgiyi çekti (Resim 4.3.F).



Resim 4.3. Böbreğe ait örneklerde TGF- β bulguları

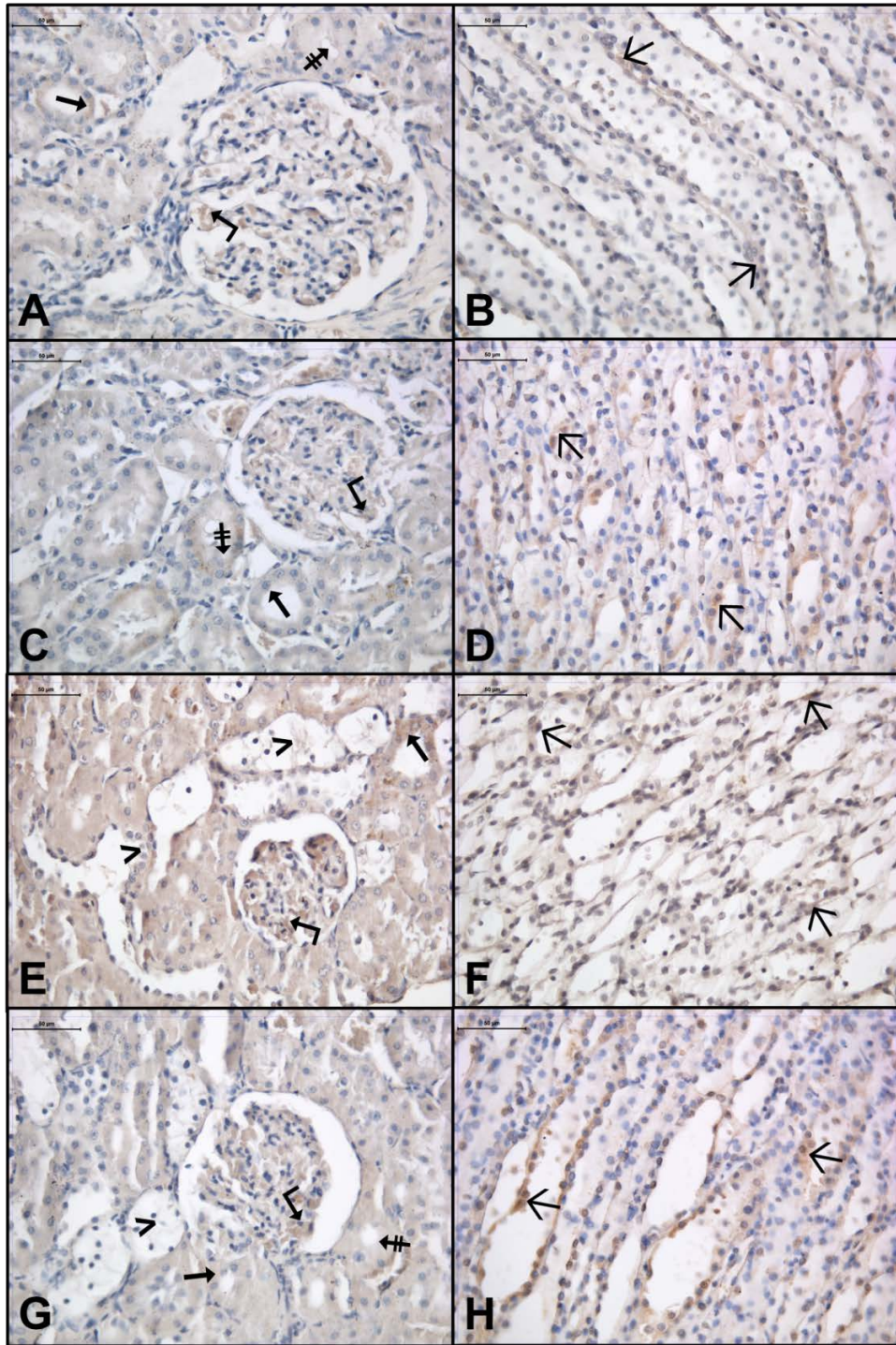
Kontrol grubu korteks (A) ve medulla (B), Resveratrol grubu korteks (C) ve medulla (D), diyabet grubu korteks (E) ve medulla (F), diyabet+Resveratrol grubu korteks (G) ve medulla (H) bölgesindeki TGF- β immünohistokimyasal boyamaları izleniyor. I: Glomerul, #: Proksimal tübül, \$: Distal tübül, !: Medulla bölgesi, >: Dejenere tübüller (İmmünperoksidaz- HematoksilenX400).

Fibronectin Bulguları

Tüm gruplarda yapılan değerlendirmelerde, fibronectin immünreaktivitesinin TGF- β ' ya benzer olarak korteks ve meduller düzeyde olduğu belirlendi. Kontrol ve RSV grubu karşılaştırıldığında, korteks bölgesindeki tutulumların birbirine eşdeğer olduğu görüldü. Hem kontrol hem de RSV grubunda glomerüllerde zayıf TGF- β ekspresyonu saptandı (Resim.4.4.A, Resim.4.4.C). Medulla bölgesinde yapılan incelemelerde her iki grupta tutulumun benzer olduğu görüldü. Resveratrol grubunda kontrole karşın yer yer kuvvetli immün pozitiflik gösteren hücreler ilgiyi çekti (Resim.4.4.B, Resim.4.4.D).

Diyabet grubu değerlendirildiğinde ise, hem korteks hem de medulla bölgesinde önceki iki gruba karşın fibronectin tutulumunun arttığı belirlendi. Yine glomerüllerde yer yer yoğun sitoplazmik tutulum ilgiyi çekti. Bu grupta izlenen dejenere tübüllerde belirgin immünreaktivite ayırt edilmedi (Resim.4.4.E). Medulla bölgesinde ise doku genelinde yaygın sitoplazmik tutulum dikkati çekti (Resim.4.4.F).

Diyabet+RSV grubunda yapılan incelemelerde, korteks bölgesindeki fibronectin tutulumunun diyabet grubuna karşın belirgin azaldığı görüldü. Glomerüllerde orta dereceli fibronectin immünreaktivitesi saptandı (Resim.4.4.G). Medulla bölgesinde ise yer yer kuvvetli sitoplazmik tutulum gösteren hücreler ilgiyi çekti (Resim.4.4.F).

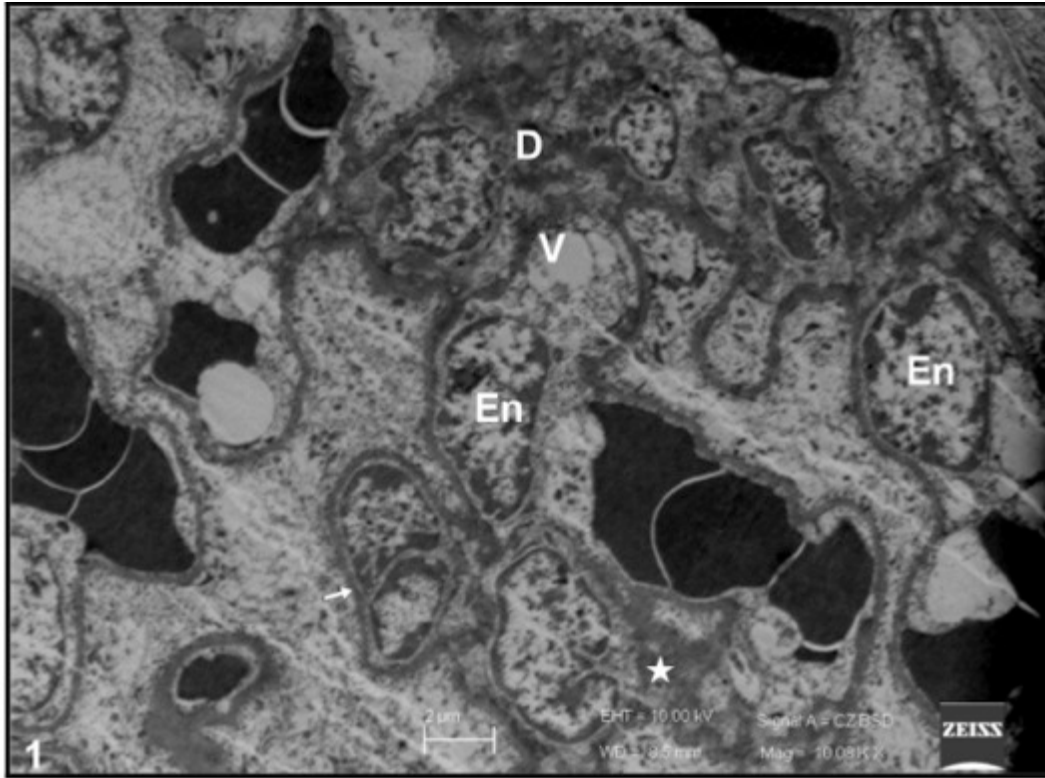


Resim 4.4. Böbreğe ait örneklerde Fibronektin bulguları

Kontrol grubu korteks (A) ve medulla (B), Resveratrol grubu korteks (C) ve medulla (D), diyabet grubu korteks (E) ve medulla (F), diyabet+Resveratrol grubu korteks (G) ve medulla (H) bölgesindeki fibronectin immünohistokimyasal boyamaları izleniyor. ↪: Glomerul, ➡: Distal tübül, ⚡: Proksimal tübül, ➔: Medulla bölgesi, >: Dejenere tübüller (İmmünperoksidaz-HematoksilenX400).

4.2.2. Elektron mikroskopik bulgular

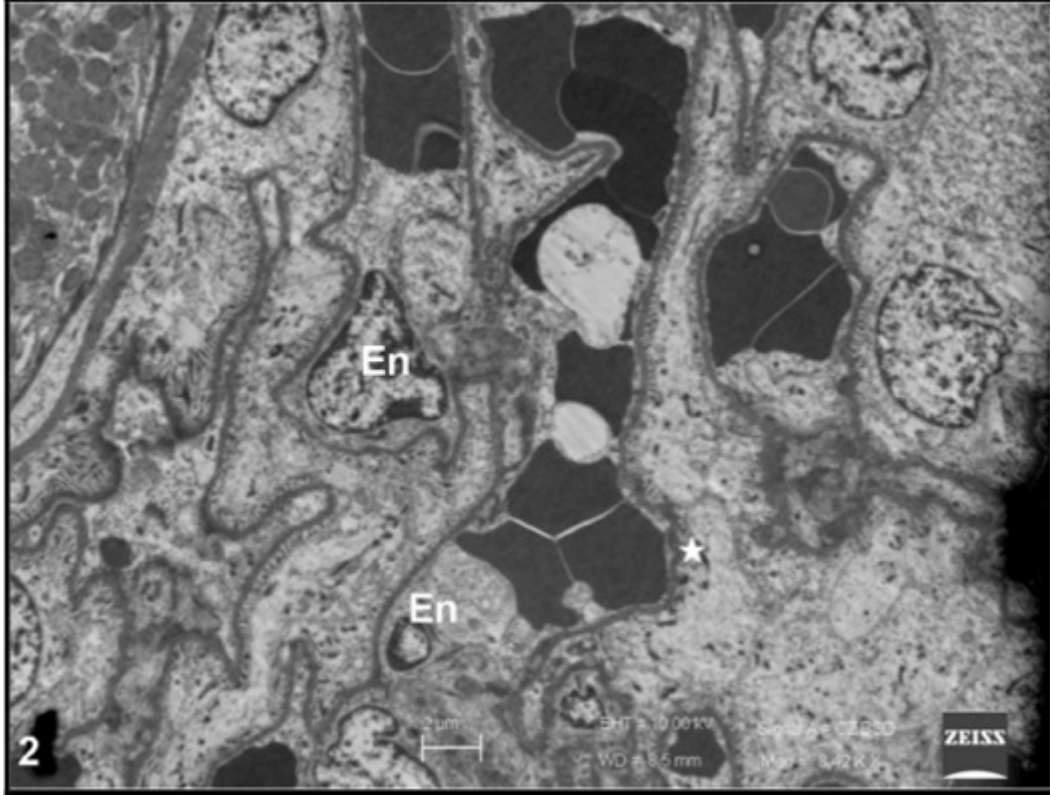
Yapılan elektron mikroskopik incelemelerde GBM, mezengiyum, kapiller endotel hücreleri ile podosit pediselleri değerlendirildi. Kontrol ve RSV uygulanan gruplarda tüm yapılar normal görünümde izlendi. Diyabet grubunda ise yer yer GBM' de kıvrıntılı seyir ve düzensiz kalınlaşmalar saptandı. Mezengial matrikste elektron yoğun deposit birikimi dikkati çekti. Çoğu alanda podosit pedisellerinde silinme gözlemlendi. Kapiller endotel hücreleri değerlendirildiğinde ise, hücrelerin hiperplaziye uğradıkları ayrıca hipertrofik görünüme sahip oldukları görüldü. Bazı endotel hücrelerinde iri vakuollerin şekillendiği belirlendi.



Resim 4.5.Diyabet grubu elektron mikroskopik inceleme.

En: kapiller endotel hücresi, V: vakuol, D: mezengiyumda elektron yoğun depositler, *: GBM'de silinmiş podosit pediselleri, *: kıvrıntılı seyir gösteren GBM (Uranil asetat – Kurşun sitrat X 10000).

Diyabet + RSV grubunda incelenen tüm alanlarda belirtilen yapıların büyük oranda korunduğu ilgiyi çekti. Endotel hücreleri normal yapıda olup, az sayıdaki hücrede vakuoller izlendi. Podosit pedisellerinde silinme gözlenmedi. Ancak GBM’ deki kıvrıntılı seyirin bazı alanlarda halen varlığını koruduğu saptandı. Mezengiyum normal yapıda olup, elektron yoğun depositler görülmedi.

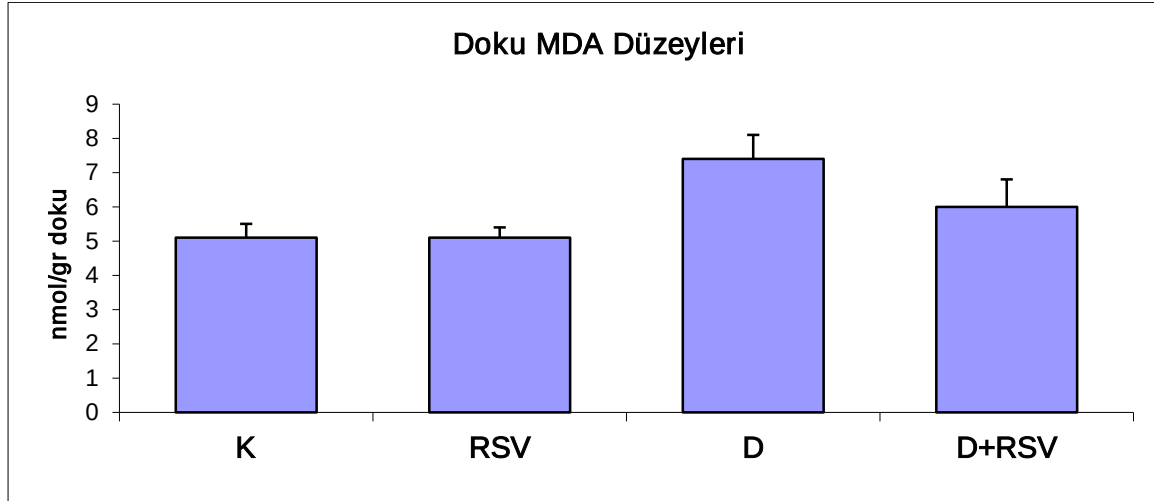


Resim 4.6. Diyabet+RSV grubu elektron mikroskopik inceleme.

En: doku genelinde normal yapıları ile izlenen kapiller endotel hücreleri, *: yer yer kıvrıntılı seyir gösteren GBM, %: podosit pediselleri (Uranil asetat – Kurşun sitrat X 10000)

4.3. Oksidan Stres Parametre Bulguları

4.3.1.Doku MDA düzeyleri



Şekil 4.7. Böbrek dokusu MDA düzeyleri

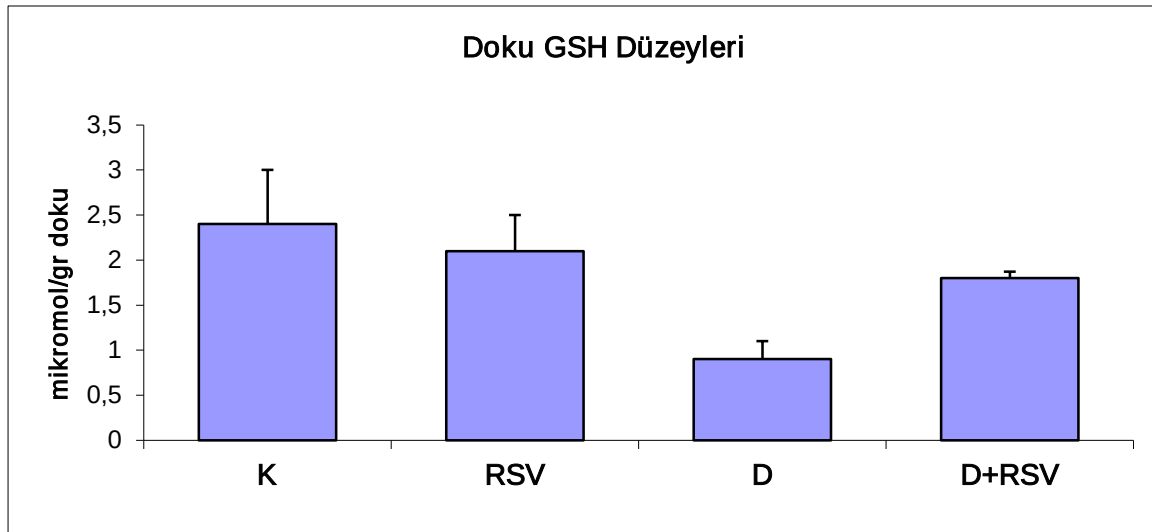
Değerler ort $\pm$ SD olarak verildi.

K: Kontrol Grubu, D: Diyabet Grubu, D+RSV: Diyabet+RSV Grubu, RSV: RSV Grubu

$p < 0,01$: D/D+R $p < 0,001$: K/D, D/R, K/D+R

Kontrol ile RSV grubu arasında doku MDA düzeyleri açısından bir fark tespit edilmezken, diyabetik hayvanlarda böbrek dokusu MDA düzeyleri kontrollerine göre anlamlı yüksek bulundu. Bununla birlikte diyabetik hayvanlarda RSV uygulamasının doku MDA düzeylerini RSV uygulaması yapılmayan diyabetik hayvanlara göre düşürdüğü tespit edildi.

4.3.2. Doku GSH düzeyleri



Şekil 4.8. Böbrek dokusu GSH düzeyleri

Değerler ort $\pm$ SD olarak verildi.

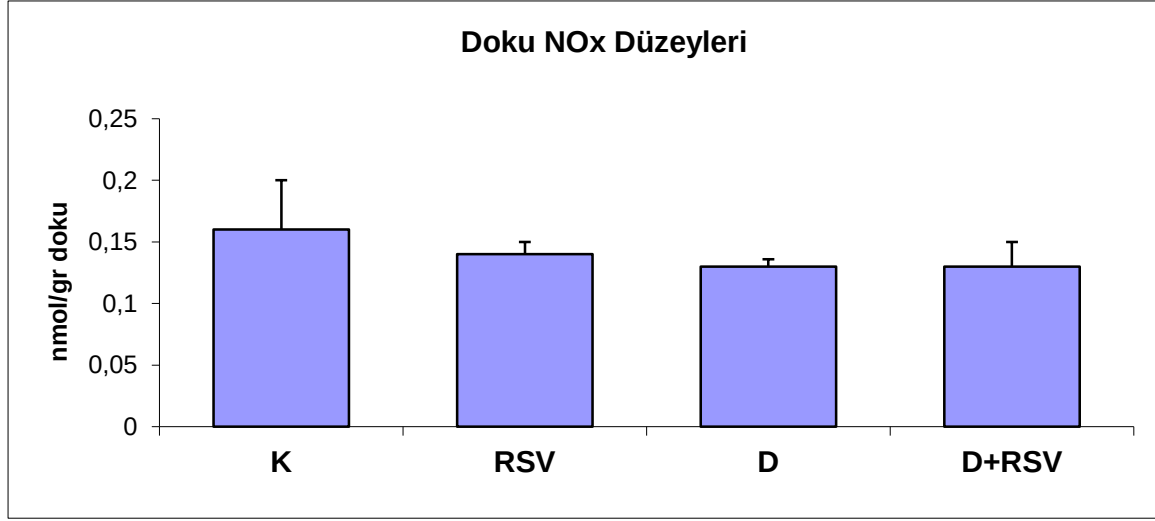
K: Kontrol Grubu, D: Diyabet Grubu, D+RSV: Diyabet+RSV Grubu, RSV: RSV Grubu

$p < 0,01$: K/D+R, D/D+R

$p < 0,001$: K/D, D/R

GSH düzeyleri açısından Kontrol ile RSV grubu arasında bir fark tespit edilmezken, diyabetik hayvanlarda böbrek dokusu GSH düzeyleri kontrollerine göre anlamlı olarak düşük bulundu. Bununla birlikte diyabetik hayvanlarda RSV uygulamasının doku GSH düzeylerini uygulama yapılmayan diyabetik hayvanlara göre anlamlı olarak yükselttiği tespit edildi.

4.3.3. Doku NOx düzeyleri



Şekil 4.9. Böbrek Dokusu NOx Düzeyleri

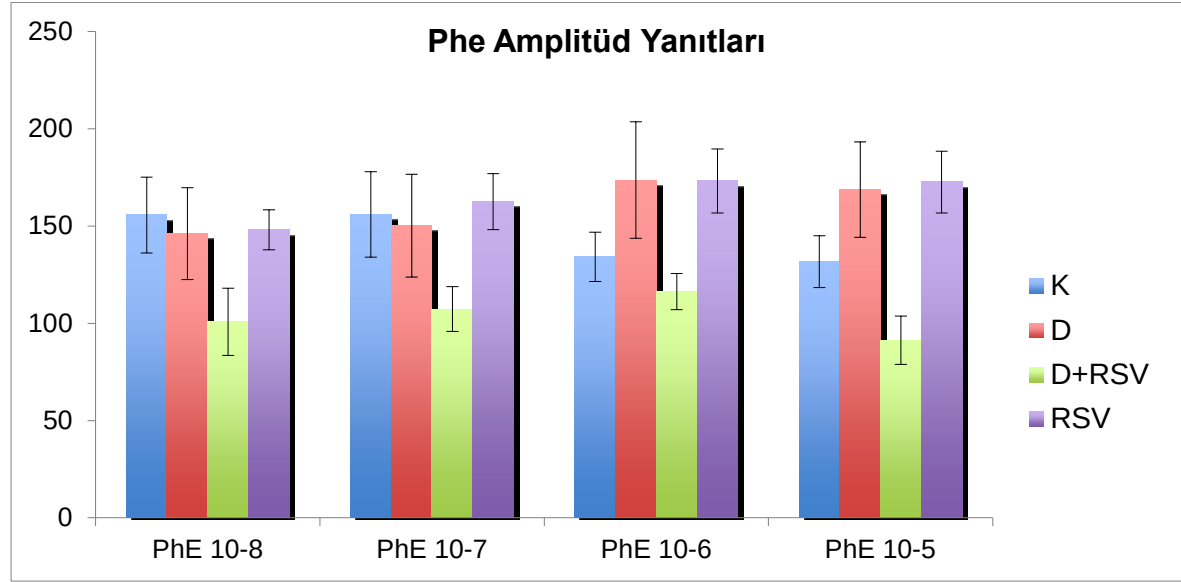
Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verildi.

K: Kontrol Grubu, D: Diyabet Grubu, D+RSV: Diyabet+RSV Grubu, RSV: RSV Grubu

Gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı.

4.4. Böbrek Vasküler Yanıt Bulguları

4.4.1. Fenilefrin yanıtları

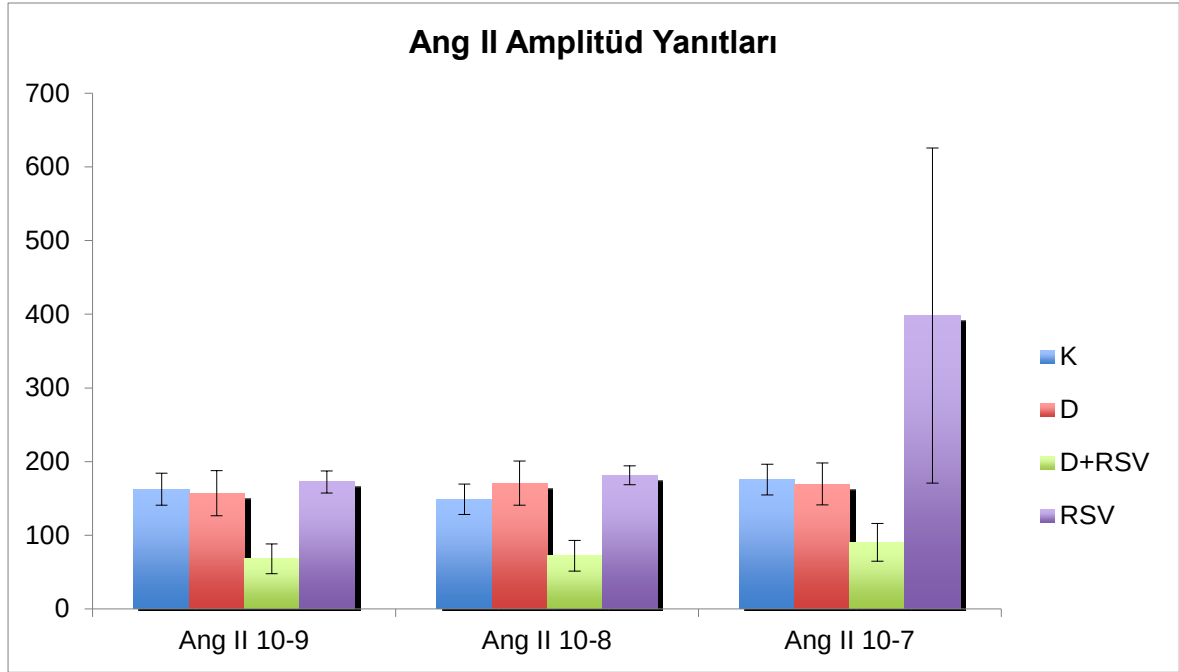


Şekil 4.10. Böbrek Dokusu PhE Amplitüd Yanıtları

K: Kontrol Grubu, D: Diyabet Grubu, D+RSV: Diyabet+RSV Grubu, RSV: RSV Grubu

Kontrol grubu ile RSV grubu arasında anlamlı bir değişiklik gözlenmezken, Diyabet grubunda Phe 10^{-6} ve 10^{-5} dozlarında Kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlemlendi. Diyabet+RSV grubunda ise Phe 'nin tüm dozlarında kontrollerine göre kasılma yanıtlarında anlamlı bir azalma tespit edildi.

4.4.2. Angiotensin II yanıtları

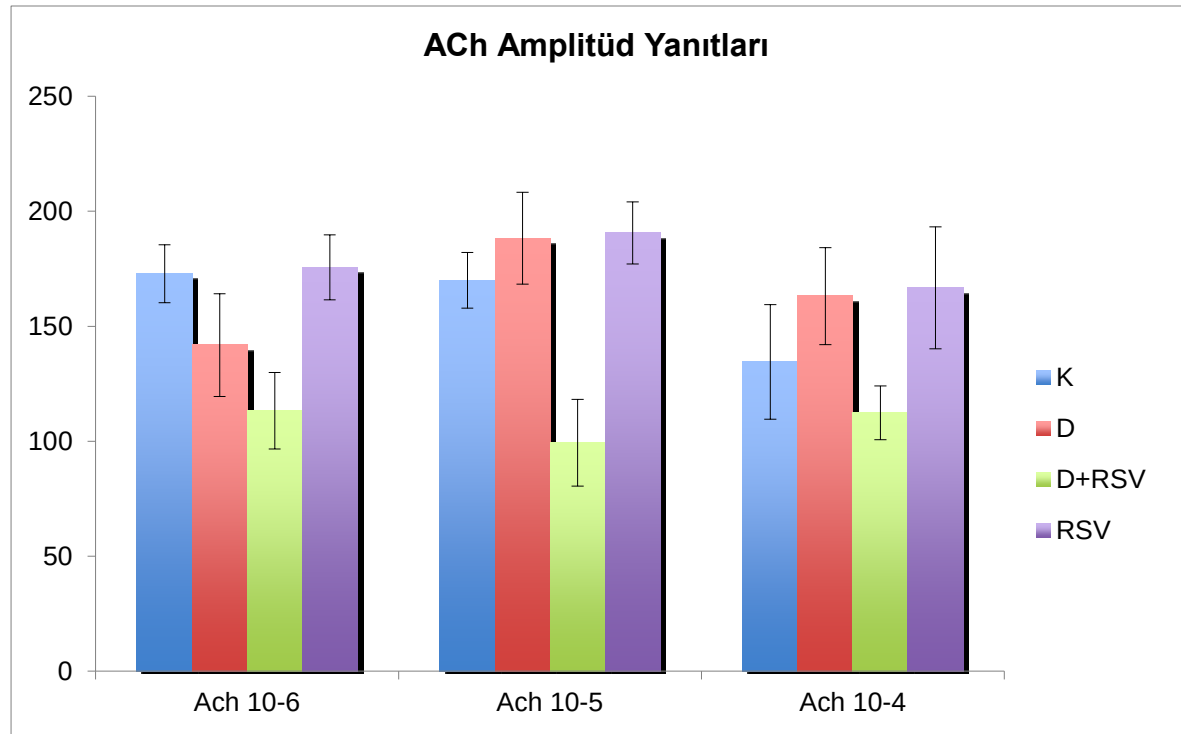


Şekil 4.11. Böbrek Dokusu Ang II Amplitüd Yanıtları

K: Kontrol Grubu, D: Diyabet Grubu, D+RSV: Diyabet+RSV Grubu, RSV: RSV Grubu

Kontrol, Diyabet ve RSV grupları arasında Ang II 10⁻⁹ ve 10⁻⁸ dozlarında anlamlı bir fark gözlenmezken Ang II 10⁻⁷ dozunda RSV grubunun kasılma yanıtlarında anlamlı bir artış gözlemlendi. Diyabet+RSV grubunda ise Ang II 'nin tüm dozlarında kontrollerine göre kasılma yanıtlarında anlamlı bir azalma gözlemlendi.

4.4.3. Asetilkolin yanıtları



Şekil 4.12. Böbrek Dokusu ACh Amplitüd Yanıtları

K: Kontrol Grubu, D: Diyabet Grubu, D+RSV: Diyabet+RSV Grubu, RSV: RSV Grubu

ACh gevşeme yanıtları incelendiğinde, Diyabet+RSV grubunda ACh 'nin tüm dozlarında kontrollerine göre anlamlı bir azalma gözlemlendi. Diğer gruplar arasında tüm dozlarda anlamlı bir fark bulunamadı.

5. TARTIŞMA

DM, endüstriyel ülkelerde prevalansı giderek artan, bulunduğumuz yüzyılda insan sağlığını önemli ölçüde tehdit eden, hiperglisemi ve endojen insülin sekresyon yetersizliği veya reseptör duyarsızlığı ile karakterize bir metabolik hastalıktır. Yapılan istatistiksel çalışmalar 2025 yılında 300 milyon tanı almış diyabetli olacağını öngörmektedir [229,230].

DM, akut ve kronik komplikasyonlara yol açmaktadır. Akut komplikasyonları arasında diyabetik ketoasidoz, hiperosmolar koma, hipoglisemi, laktik asidoz sayılabilir. Kronik komplikasyonları ise genel olarak makro ve mikrovasküler düzeyde incelenir. Makrovasküler komplikasyonlar arasında hipertansiyon, kardiyovasküler, serebrovasküler hastalıklar ile periferik arter hastalığı yer alırken, nöropati, retinopati ve nefropati ise mikrovasküler komplikasyonları oluşturur [10].

DN, diyabetin en sık rastlanan mikrovasküler komplikasyonlarından biri olup, son dönem böbrek yetmezliğinin en önemli nedenlerinden biridir [63]. DN, süreklilik gösteren mikroalbuminüri, erken kan basıncı yükselmesi, GFH' nda düşme, yüksek kardiyovasküler morbidite ve mortalite riski ile karakterizedir [11]. Genetik yatkınlık, ırk, cinsiyet, diyabetin başlama yaşı, hastalığın süresi DN gelişimini etkileyen risk faktörleridir [231]. Glisemik kontrol bozukluğu, hipertansiyon, hiperlipidemi, diyetteki yüksek protein, albuminüri varlığı, sigara kullanımı prognozu kötüleştirmektedir [232]. Genetik yatkınlık varlığında, hemodinamik ve metabolik faktörler arasındaki karmaşık etkileşim DN gelişimini kolaylaştırmaktadır [233]. DN' nin erken dönemde tanınması ve gerekli tedavilerle hastalığın önlenmesi ya da ilerlemenin yavaşlatılabilmesi son derece önemlidir. DN gelişiminde Tip 1 ve Tip 2 Diyabet ortak bir patogeneze sahip olsa bile, Tip 2 Diyabet hastalarının tanı almadan uzun süre geçirebilecekleri ve tanı aldıklarında nefropati gelişiminin ilerlemiş olma olasılığı, bu hastalarda erken tanının önemini daha da artırmaktadır (12, 32, 39). Avrupa ve Amerika'da Tip 1 diyabetli hastaların % 30-50'sinde, Tip 2 diyabetiklerin % 5-15'inde DN gelişmektedir [91].

Tip 1 Diyabet hastalarında, diyabet süresiyle ilişkili olarak artan mikroalbuminüri ve proteinürinin, 25-30 yıllık toplam insidansi %35-40 olarak bildirilmiştir [234].

Mikroalbuminürik hastaların 1/3'ünde albumin atılımı normal sınırlar içine dönerken, 1/3'ünde aşırı proteinüriye ilerlediği gösterilmiştir [235]. Proteinürik hastaların %10-50'inde son dönem böbrek yetmezliği gelişirken, %40-50'inin kardiyovasküler komplikasyonlarla erken dönemde kaybedildiği bildirilmiştir [236].

Yapılan pek çok prelinik ve klinik çalışmalar, artrit, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar [237,238] gibi kronik hastalıklarda polifenolik bir bileşik olan RSV'ün terapötik yararını göstermektedir. Yine hayvan modellerinde geniş bir araştırma konusu olan RSV'ün kuvvetli bir antioksidan ve lipid metabolizması modülatörü olduğu, antineoplastik, antiinflamatuvar ve antiplatelet aktivitesinin olduğu gösterilmiştir [140,239-241] gibi çeşitli farmakolojik etkilerinin olduğu da ifade edilmektedir. Çalışmamızda DN oluşturulmuş sıçanlarda RSV'ün böbrek üzerine çeşitli etkilerini araştırdık.

Hayvan çalışmalarında RSV'ün geniş bir doz aralığı kullanılmaktadır. (0,1-1500mg/kg vücut ağırlığı). Hebbar ve ark.larının yaptığı bir çalışmada, sıçan karaciğerinde RSV'ün doz bağımlı toksisitesi araştırılmış, 28 gün süreyle hem erkek hem de dişi sıçanlara, 300, 1000 ve 3000 mg/kg dozlarında RSV oral yolla uygulanmıştır. Çalışmanın sonunda 1000 ve 3000 mg/kg RSV verilen sıçanlarda nefrotoksisite, düşük karaciğer toksisitesi gibi zararlı etkiler gözlenirken 300 mg RSV verilen sıçanlarda herhangi bir toksik etkiye rastlanmamıştır [242]. Juan ve ark.'larının çalışmasında, 28 gün boyunca erkek Sprague Dawley sıçanlara 20 mg/kg uygulanan RSV'ün hayvanların gelişim evrelerinde zararlı bir etkisinin olmadığı, aynı zamanda bu uygulamanın toksik etkiye neden olmadığı gösterilmiştir [243]. Literatürde RSV ile tedavi amaçlı yapılan çalışmalarda verilen doz genellikle 10-20 mg/kg arasında değişmektedir. RSV'ün in vivo ve in vitro etkilerinin bu doz aralığında ortaya çıktığı gösterilmiştir [145,244].

Yapmış olduğumuz çalışmada uygulanan RSV dozu 10mg/kg/gün olup, seçmiş olduğumuz bu doz RSV'ün akut ve kronik biyolojik etkilerini araştıran çalışmalarda seçilen doz aralığı içerisinde kalmaktadır.

STZ, *Streptomyces achromogenes* tarafından üretilen bir antibiyotiktir ve deneysel diyabet oluşturmak için en yaygın olarak kullanılan maddelerden biridir [245]. STZ

insülin üreten β hücrelerin hasarına ve adacık hücreleri içinde hücre içi nikotinamid adenin dinükleotidin tükenmesine neden olur [246,247] .Literatürde hayvanlarda diyabet oluşturmak amacıyla STZ nin farklı dozları kullanılmıştır. Bir çalışmada [248] 60 mg/kg dozunda ip tek doz STZ sonrası, 72. saatte AKŞ düzeyi 350 mg/dL ve üzerinde olan sıçanlar diyabetli kabul edilirken, başka bir çalışmada [249] 50 mg/kg ip tek doz STZ uygulamasını takip eden , 72. saatte AKŞ 250 mg/dL'nin üzerinde diyabetik olarak değerlendirmiştir.

Çalışmamızda STZ dozu 65 mg/kg olarak seçildi ve uygulamadan 72 saat sonra AKŞ' leri 250 mg/dl nin üzerinde olan deneklerin diyabet olduğu kabul edildi; ancak bu ölçümden sonra 2 hafta süreyle denekler belirli aralıklarla kan şekeri takibine alınarak diyabetin stabilizasyonu için beklendi. 2 haftalık bu sürecin sonunda AKŞ düzeyleri 250 mg/dl ve üzeri olan denekler diyabetik gruplara ayrıldı. Çalışma boyunca değişik aralıklarla hayvanların AKŞ düzeyleri ölçüldü. Diyabet bulgularını değerlendirebilmek açısından beden ağırlıkları, aldıkları sıvı miktarı ve çıkardıkları idrar miktarı tespit edildi. Bu ölçümlerde AKŞ ile bağlantılı olarak hipergliseminin karakteristik semptomlarından, sıvı alımında artışı, çıkarılan idrar miktarında artışı ve beden ağırlığında azalmayı deneklerimizde gözlemledik.

Literatürde değişik dozlarda ve sürelerde RSV' ün diyabetik semptomlar üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalar mevcuttur. Çalışmaların çoğunda RSV' ün olumlu etkilerinden söz edilirken, aksini ifade eden literatür bilgileri de mevcuttur.

Örneğin, Chang ve ark. nın yapmış oldukları çalışmada, STZ (65 mg/kg) ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda diyabet oluşumundan iki hafta sonra RSV tedavisine başlanmış, bir gruba 0,1 mg/kg diğer bir gruba ise 1 mg/kg resveratrol 7 gün boyunca oral gavaj yöntemi ile uygulanmıştır. RSV uygulaması yapılan her iki grupta da diyabetik semptomların iyileştiği gözlenmiştir [250].

Yine değişik araştırmacılar tarafından yapılan ve STZ ile diyabet oluşturulmuş deneklerin kullanıldığı benzer araştırmalarda RSV uygulamasının diyabete bağlı olarak görülen kilo kaybını yavaşlattığı [17,251], kan glikoz düzeyini düşürdüğü, polifaji, polidipsi gibi semptomları azalttığı [17,251], deneklerde ve trigliserit düzeylerinde azalmaya neden olduğu ifade edilmektedir [17,251].

Bir grubunda STZ ile insülin bağımlı, diğer bir grubunda da nikotinamid ile insülin-bağımsız diyabet oluşturulmuş sıçanlara, 7 gün boyunca 3 mg/kg x 3 dozda verilen RSV' ün etkilerinin incelendiği bir çalışmada; RSV' ün, soleus kasındaki glukoz taşıyıcılarından GLUT4 ekspresyonunu artırdığı saptanmıştır. Ayrıca aynı şekilde diyabetik sıçanlara 0.05-10 mg/kg RSV uygulamasından 90 dakika sonra kan glukoz düzeylerinin anlamlı ölçüde azaldığı ve insülin düzeylerinin yükseldiği saptanmıştır [252].

Bir diğer çalışmada ise, 3 mg/kg RSV' ün intraperitoneal uygulanmasının diyabetik sıçanlarda insülin salınımında artışa bağlı olarak plazma glukoz düzeyini düşürdüğü ve bu etkinin pankreasın β hücrelerindeki K^+ kanallarını bloke ederek gerçekleştirmiş olabileceği belirtilmektedir [253]. Ancak yapılan başka bir çalışmanın sonuçları ise diyabetik sıçanlarda RSV'ün, STZ' nin neden olduğu β hücre harabiyeti üzerinde anlamlı bir geri dönüştürücü etkisi olmadığı, diyabetin neden olduğu kilo kaybını önleyemediği ve yükselen kan glukoz düzeyinde de bir iyileşme sağlayamadığı yönündedir [214].

Literatürdeki çoğu bulgunun aksine çalışmamızda 10 mg/kg dozda ve 8 hafta uygulanan RSV nin diyabetik hayvanlarda yükselen AKŞ ve TKŞ düzeylerinde belirgin bir düşme meydana getirmedeği ayrıca aynı hayvanlarda gözlenen kilo kaybı, sıvı alımında ve çıkarılan idrar miktarında artma gibi diyabetik semptomlar üzerinde anlamlı bir iyileştirici etkisinin olmadığını gözlemledik. Çalışmamızdaki asıl amacımız DN gelişmiş olan sıçanlarda RSV 'ün böbrekler üzerindeki gerek vasküler ,gerek patolojik ve gerekse biyokimyasal olumlu yada olumsuz etkilerini incelemektir. Çalışmamızda STZ uygulamasından yaklaşık 2 hafta sonra RSV ye başlanılmış ve 8 hafta boyunca uygulama devam etmiştir.

Yapılan bir çalışmada STZ (65 mg/kg) uygulamasından 8 hafta sonra sıçanlarda nefropati geliştiğini serum kreatinin, BUN ve ALB düzeylerindeki anlamlı artışla ifade etmişlerdir [254].

Kan biyokimyası sonuçlarımızı değerlendirdiğimizde, diyabetik deneklerde ALB, ALP, ALT, BUN ve kreatinin düzeylerinde artma , sodyum düzeyinde ise azalma

tespit ettik. Bu bulgular yaklaşık 10 haftalık diyabetik deneklerimizde diyabete bağlı olarak gelişen böbrek fonksiyonlarındaki bozulmayı dolayısıyla oluşturmaya hedeflediğimiz DN' yi destekler nitelikte idi. Çalışmamızda RSV uygulaması ile bozulan bu parametrelerde anlamlı bir düzelme tespit edemedik. Bu yöndeki bulgularımız literatürdeki pek çok çalışmayı destekler niteliktedir . Nitekim Juan ve arkadaşları diyabetik sıçanlarda [243] Thomas ve arkadaşları da Metabolik sendrom modeli oluşturulmuş domuzlarda RSV tedavisinin yükselen AST ve ALT düzeylerinde herhangi bir düzelme meydana getirmediğini bildirmişlerdir [255].

Ancak literatürde bizim bulgularımızın aksine STZ diyabetik sıçanlarda 8 haftalık RSV uygulamasının artan kan glukoz, kreatinin, trigliserit ve kolesterol değerlerinin düştüğü, artan idrar miktarını azaldığı yönünde de bilgiler mevcuttur [20].

Sonuç olarak tüm bu veriler bize RSV' ün multifonksiyonel bir bileşik olmasından ötürü, diyabet semptomlarını iyileştirici etkisinden belki daha ağırlıklı olarak diyabet oluşumunu önleyici etkilerinin olup olamayacağının araştırılmasının gerektiğini düşündürmektedir.

DN, glomerüler hipertrofi, GBM' da kalınlaşma, ekstrasellüler matriks artışı ile karakterize ve sonuçta tübülointerstiyal ve glomerüler fibrozis ve sklerozise neden olun bir patolojik durumdur [256]. GBM kalınlaşması [101] proteinüri ile ilişkili olarak podosit sayısındaki azalma, podosit pedisellerinde silinme [103] DN nin bilinen mikroskobik değişikliklerindendir. Çalışmamızda idrarda proteinürünün varlığı ve EM bulguları diyabetik deneklerimizde DN gelişimini destekler niteliktedir.

Yaptığımız EM incelemelerde GBM, mezengiyum, kapiller endotel hücreleri ile podosit pediselleri Kontrol ve RSV uygulanan gruplarda normal görünümde izlenmiştir. Diyabet grubunda ise GBM' da yer yer kıvrıntılı seyir ve düzensiz kalınlaşmaların olduğu, mezengial matrikste dikkati çeken elektron yoğun deposit birikiminin varlığı dikkati çekmiştir.

Sharma ve arkadaşları 4 haftalık diyabeti takiben 2 hafta süreyle farklı 2 gruba 5 ve 10 mg/kg RSV' ü oral yolla verdikleri çalışmalarında diyabetik sıçanların böbreklerinde korteks ve dış medullada belirgin histolojik değişiklikler, GBM

kalınlaşması ve orta interstisyel fibrozis ve arteriolopati gözlemlemiştir. Yine araştırmacılar aynı çalışmalarında RSV tedavilerinin Interstisyel ve glomerüler değişiklikleri anlamlı düzeyde iyileştirdiğini ifade etmektedirler [251].

STZ ile diyabet yapılan sıçanlarda 8 haftalık RSV uygulaması sonrasında GBM kalınlığında azalma olduğu, diyabete bağlı olarak artan glomerüler Fibronektin, kollajen IV ve TGF- β ekspresyonunun RSV tedavisi sonrası azaldığı ifade edilmektedir [20].

Bu literatür bulgularını destekler nitelikte RSV uygulanan diyabetik grubumuzda, diyabetik kontrol grubundan farklı olarak GBM' deki kıvrıntılı seyrin bazı alanlarda halen varlığını koruduğu saptadık. Bu bulgu literatürü destekler nitelikte olmasına rağmen literatürün aksine tamamen iyileşme gözlenmedi. Ancak çalışmamızda Diyabet grubunda mezengial matrikste dikkati çeken elektron yoğun deposit birikimi, podosit pedisellerinde silinme RSV uygulanan diyabet grubunda görülmedi. Benzer şekilde Hongfei ve ark. larının yaptıkları çalışmada diyabetik sıçanlarda GBM' nin kalınlaştığı, böbrek glomerül hücrelerinin hacminin arttığı mezangiyal hücrelerin olduğu EM incelemelerinde podosit pedisellerinin kaybolduğu gösterilmiştir, RSV tedavisi ile mezangiyal hücre sayısının azalması ile birlikte GBM kalınlığının azaldığı ve bir dereceye kadar podosit pedisellerinin yeniden gözlendiği belirtilmektedir. Yine aynı çalışmada glomerüllerde RSV uygulamasına bağlı olarak fibronektin ve kollajen IV düzeylerinin anlamlı ölçüde arttığı ifade edilmektedir [257].

Diyabetik böbrekte gözlenen başlıca morfolojik anormallikler tübüler hücre şişmesi, endotel hücrelerinde vakuolizasyon, glomerüler hipertrofi, GBM' da kalınlaşma, piknotik çekirdekler, medüller tıkanıklığı, genişletilmiş proksimal tübüler hücreler, hemorajik ve hiyalinizasyon, nekroz ve sıkışık glomerüler kılcal damarlardır. [258].

Çalışmamızda Diyabet grubunda hiperplaziye uğrayan, ayrıca hipertrofik görünüme sahip olan kapiller endotel hücreleri RSV uygulanan diyabet grubunda normal görünümde izlendi. Yine Diyabet grubunda bazı endotel hücrelerinde iri vakuollerin şekillendiği belirlenirken, RSV uygulanan diyabet grubunda az sayıdaki hücrede vakuoller izlendi.

Yapılan bir çalışmada bulgularımızı destekler şekilde; STZ diyabetik sıçanlara, 5 mg/kg doz RSV' ün 30 gün süresince oral yoldan uygulanması sonucunda yapılan incelemelerinde normal böbrek histolojisini önemli ölçüde koruduğu gösterilmiştir [259]. Diyabetik sıçanlarda 3 hafta süreyle 10mg/kg/gün dozda oral yolla uygulanan RSV'ün DN 'de meydana genel böbrek hipertrofisine karşı koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir [260].

TGF- β çok çeşitli hücresel aktivitede rol oynayan (proliferasyon, differansiyasyon, ekstrasellüler matriks regülasyonu ve survival) multifonksiyonel bir sitokindir [261].

DN' de görülen yapısal değişikliklerin başlıca etkileyenlerindendir. Üriner albümin atılımı olan DM hastalarında normal bireylere oranla daha yüksek miktarda bulunur [256].

TGF- β ' nın böbrek hipertrofisine neden olduğu ifade edilmektedir. TGF- β ' nın yüksek seviyeleri STZ ile oluşturulmuş diyabetik sıçanların glomerüllerinde ölçülmüştür [126].

Yaptığımız immünohistokimyasal incelemelerde diyabetik gruplarımızda gerek korteks gerekse medullar bölgede TGF- β tutulumunun artması DN oluşumunu desteklemektedir.

Chavez ve ark.larının yaptığı bir çalışmada sıçanlara uygulanan RSV'ün TGF- β üretimini inhibe ettiği ve kollajen değerlerini azalttığı bildirilmiştir [262].

Çalışmamızda, TGF- β tutulumunun diyabet grubunda artması, RSV uygulamasının TGF- β ekspresyonunu gerek korteks gerekse medulla bölgesinde azaltması literatür verilerini destekler niteliktedir.

Diyabetik hayvan modellerinde böbrekte in vivo çalışmalarda NO ve NOS ekspresyonunun önemini gösteren geniş bir literatür bulunmaktadır [263]. Diyabetik sıçanlarda renal kortekste iNOS [264,265] ve eNOS [264] ekspresyonunun azaldığını gösteren çalışmalar mevcuttur.

Çalışmamızda diyabete bağlı olarak artan iNOS immunreaktivitesinin RSV

uygulamasıyla arttığı; diyabetle birlikte azalan eNOS immunreaktivitesinin ise literatürle uyumlu olarak arttığı gözlemlendi.

Nitekim literatür verilerinde Samarjit ve arkadaşları 7 gün süreyle sıçanlara 2,5 mg/kg RSV yutturmuş sonuçta RSV'nin erken dönemde, eNOS , geç dönemde de (RSV uygulamasından 3 gün sonra). eNOS aktivasyonu ve VEGF proteinlerinin indüksiyonunu arttırdığını göstermişlerdir [266].

Wallerath ve ark. da insan umbilikal ven endotelial hücrelerinde,RSV'ün NO üretimini ve eNOS ekspresyonunu artırdığını belirtmişlerdir [189].

Literatürde diyabetin erken dönemlerinde erken RSV uygulamasının nefropati üzerine olan etkilerini inceleyen pek çok çalışma mevcuttur; ancak böbrek vasküler yanıtları incelenmemiştir. Çalışmamızda literatürden farklı olarak geç dönem diyabetik sıçan böbreğindeki vasküler yanıtları da inceledik.

Endotel, damar tonusu düzenlenmesi de dahil olmak üzere arter duvarında çeşitli fizyolojik fonksiyonlar için hayati önem taşımaktadır. Endotel vazodilatatör NO, vasokonstriktör ET gibi vasküler düz kas hücrelerine etki eden çeşitli vazoaaktif mediyatörler üretir. NO üretimi ACh, bradikinin, insülin gibi hormonların stimüle ettiği NOS enziminin katalizlediği bir mekanizma ile üretilir. NOS izofromlarından olan, eNOS aktivasyonunun ve ekspresyonunun artması, diyabetik böbrekte glomerüler ve işlevsel hemodinamik değişikliklere neden olmaktadır [267].

Wang ve ark.ları eNOS spesifik agonisti kullanarak ACh infüzyonu yaparak, diyabetik sıçanlarda ACh' nin vasküler yanıtlarının bozulduğunu göstermişlerdir. Bu veriler, diyabetik böbrekte NO' in biyoyararlılığının azaldığını vurgulamaktadır.Son zamanlarda yapılan iskemi reperfüzyon çalışmalarında RSV'ün böbrek, kalp ve beyinde koruyucu özelliği olduğu bildirilmiştir [268,269]. Böbrek hücrelerinde de NO miktarını artırarak veya lipid peroksidasyonunu inhibe ederek koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir [159,270].

RSV' ün vasküler fonksiyonlar üzerine olan yararlı etkilerinin akut ve kronik RSV uygulaması sonrası hücre kültürlerinde, eNOS ekspresyonunu ve aktivitesini artırarak olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [189,271,272].

Çalışmamızda RSV uygulamasının böbrekte gerek korteks gerekse medulla bölgesinde hem iNOS hem eNOS ekspresyonun arttığını , yine lipid peroksidasyonu azalttığını tespit ettik ancak dokudaki total NO düzeyinde anlamlı değişikliğe neden olmadı.

Chen ve ark.ları çalışmalarında izole rat aortası üzerinde RSV'ün güçlü vazodilatatör etki yarattığını göstererek bu etkinin, koroner akım miktarının artışına neden olabileceğini düşünmüşlerdir [273].

İkizler ve ark.ları da yaptıkları çalışmada hemodinamik değerler dışında, reperfüzyon döneminde koroner akım miktarının, RSV uygulanan gruplarda anlamlı olarak yükseldiğini göstermişlerdir. Bu sonuç iskemi esnasında miyokardın korunması yanında, RSV' ün güçlü vasodilatatör etkisi ile açıklanmıştır [274].

Gordish ve ark.larının [275] bir çalışmasında RSV' ün endotelial bağımlı NO aracılığı yolu ile, normal sıçanlarda renal damar genişlemesine neden olduğu gösterilmiş. Bununla birlikte, RSV kaynaklı renal damar genişlemesinin sadece yaklaşık yarısının yarışmalı NOS inhibisyonu tarafından engellendiği bu çalışma bulguları Li ve ark.larının izole domuz koroner arterleri kullanarak yaptıkları çalışmanın sonuçlarına benzerlik göstermekte olup [276] NOS inhibisyonu veya deendothelizationun her ikisinde kısmen RSV'ün neden olduğu vasküler gevşemeyi tesine çevirdiği gösterilmiştir.

Bilindiği üzere, gerek Phe gerekse Ang II' nin oluşturduğu kasılma yanıtları, Phe'nin $\alpha 1$ reseptörleri, Ang II 'nin AT1 reseptörleri uyarması sonrası hücre içinde IP3 ve DAG üzerinden sarkoplazmik retikulumdan Ca^{+2} salıverilmesine bağlıdır.

Yüksek fruktoz içeren mısır şurubu ile beslenen sıçanlarda, RSV' ün kardiyovasküler etkisinin incelendiği bir çalışmada; sıçanların torasik aorta halkalarında, Phe' e karşı meydana gelen kasılma ve ACh' e karşı ortaya çıkan

gevşeme yanıtlarına karşın RSV' ün endoteli koruyucu etkisi göze çarpmıştır [277].

Deneylerimizin sonuçlarına göre gerek diyabetik gruptan, gerekse tek başına RSV uygulanan gruplardan izole edilen sıçan böbreklerinde Ang II ve Phe 'nin perfüzyon basıncını artırıcı etkilerinin kontrole göre farklı olmadığı gözlemlendi. Esasen diyabette damar endotelinden NO salıverilmesinin azaldığından ve bu durumda NO' in vazodilatör etkisi ortadan kalkacağından kasılma yanıtlarının NO azalmasına bağlı olarak artması beklenirdi; ancak resveratrolün NO sentezini arttırmasına bağlı olarak, resveratrol ile tedavi edilen diyabetik grupta kasılma yanıtlarının anlamlı ölçüde azalmasını RSV' ün NO salınımını artırması ile açıklamaktayız.

NO salıverilmesinin bir göstergesi olarak kabul edilen ACh gevşeme yanıtları incelendiğinde deneylerimizde ACh' e bağlı NO salıverilmesine ait yanıtların perfüzyon basıncını düşürücü yanıtlarında diyabetik grupta ve RSV verilen grupta değişmediği gözlenmiştir. Dolayısıyla bu yanıtların değişmemesi oluşan diyabetin süresine bağlı olabileceğini düşündürmektedir.

RSV ile tedavi edilen diyabetik gruptan izole edilen sıçan böbreklerinde gerek AngII gerekse Phe yanıtlarının anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır. Hiperglisemide K_{ATP} kanallarının kapandığı bilinmektedir. Hücre için Ca^{+2} artışı K^{+} kanallarının aktivasyonu ile ilişkili olduğu, K_{ATP} kanal blokerlerinin Ca^{+2} artışını inhibe ettiği [278], RSV'ün ise düz kasların Ca^{+2} a duyarlılığını azalttığı ve endotelde sistolik Ca^{+2} artışına neden olduğu gösterilmiştir [279].

Başka bir çalışmada RSV'ün insan umbilikal ven endotel hücresinde Ca^{+2} ile aktive olan K^{+} akımları üzerinde tetikleyici etkilerinin olduğu bulunmuştur. Daha sonra RSV'ün Wistar sıçan aortasında vazodilatör etkisinin endotel bağımlılığı incelenmiş ve RSV'ün endotel bağımlı gevşetici etkisinin, vasküler NADH/NADPH oksidaz inhibisyonu ile bazal hücre süperoksit radikal oluşumunun azalmasıyla ilgili olduğu bulunmuştur [280].

Buluç ve ark.larının yaptığı bir çalışmada, kalp kapağı endotelinde RSV' ün Ca^{+2} üzerine etkisi incelenmiştir. RSV' ün endotel bağımlı gevşetici etkisinin, endotel hücrelerinde Ca^{+2} düzeylerindeki artışla ilişkili olduğu, fakat vasküler düz kas

kontraksiyonun da inhibe edici etkisinin Ca^{+2} düzeylerindeki azalmaya bağılı olarak gerçekleşebileceği belirtilmiştir [279].

Sıçan aortaları üzerinde RSV etkisinin incelendiği başka bir çalışmada da 21 gün boyunca sıçanlara içme suyu içerisinde 50 mg/L RSV verilmiştir. RSV uygulamasının, endotelde ACh' e karşı olarak ortaya çıkan gevşeme yanıtını hızlandırdığı bildirilmiştir [281,282].

Çalışmamızda RSV ile tedavi edilen diyabet gruplarında vasokonstriktör yanıtların azalması hem diyabette Ca^{+2} artışının engellenmesi hem de RSV' ün düz kasların Ca^{+2} duyarlılığını azaltması sonucu olabileceği hem de aynı zamanda RSV' ün NO sentezini artırmasına bağılı olabileceğini düşündürmüştür. RSV ile tedavi edilen diyabetik gruptan izole edilen böbreklerde ACh 'nin vasodilatatör yanıtlarının anlamlı olarak azalmasında yine aynı mekanizma üzerinden olabileceğini düşünülmektedir. Zira intrasellüler Ca^{+2} artışının hiperglisemide engellenmesi RSV' ün de Ca^{+2} 'a duyarlılığı azaltması yanıtlarda azalmaya neden olabilir. Ayrıca RSV tedavi edilen grupta vasokonstriktör yanıtların azalması, RSV' ün NO sentezini arttırmasından dolayı olduğunu ve sonuç olarak RSV' ün iyileştirici etkisinin olduğunu literatür bulgularını da destekler nitelikte gözlemledik.

Diyabet kronik metabolik bir bozukluk olduğu gibi, aynı zamanda artmış bir oksidatif stres durumudur. Diyabette artan serbest radikaller membran bütünlüğünün kaybına neden olduğu gibi aynı zamanda artan oksidatif stres diyabetin makro ve mikro vasküler komplikasyonlarının gelişimine katkıda bulunur [215].

Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak diyabetik gruplarda böbrek dokusu MDA düzeylerini kontrollerine göre anlamlı yüksek, GSH düzeyleri ise düşük bulduk.

Yapılan bir çalışmada bulgularımızı destekler şekilde; STZ diyabetik sıçanlara, 5 mg/kg doz RSV' ün 30 gün süresince oral yoldan uygulanması sonucunda, lipid peroksid, hidroperoksit düzeylerinin anlamlı ölçüde azaldığı bilirlmiştir. Ayrıca RSV' ün SOD, CAT ve GPx gibi antioksidan enzim düzeylerini önemli ölçüde arttırdığı ifade edilmiştir [259].

RSV, SOD ve katalaz enzimleri gibi antioksidan bir yapıya sahiptir. Bir araştırmada, RSV'ün SOD ve katalaz gibi serbest oksijen moleküllerini süpürücü etkisinin olduğu gösterilmiştir [244].

Yine STZ diyabetik sıçanlarda 10 mg/kg doz 30 gün süreyle RSV uygulamasının karaciğer ve böbrekte, SOD düzeyi ve delta aminolevülinik asit aktivitesini yükselttiği ve buna bağlı olarak antioksidan etkinliğinin olabileceği ifade edilmiştir ve RSV'ün lipid peroksidasyonunu azaltarak antioksidan savunmayı güçlendirdiği ve dokuları oksidatif stres hasarından koruyucu bir etkiye sahip olduğu bildirilmektedir [283].

Sharma ve arkadaşları da diyabet oluşumunu takip eden 5. haftadan itibaren bir gruba 5 mg/kg diğer bir gruba da 10 mg/kg RSV'ü 2 hafta süreyle oral yolla vermişlerdir. Böbrek dokusu MDA düzeylerinde, diyabetik gruba oranla doz bağımlı olarak anlamlı bir azalma, GSH düzeylerinde anlamlı bir artma olduğunu gözlemlemişlerdir. RSV'ün diyabetik sıçanlarda renal fonksiyon kaybı ve oksidatif stresi önemli ölçüde azalttığı belirtmişlerdir [251].

Hongfei ve arkadaşları ise 60 mg/kg doz STZ ile diyabet oluşturdukları sıçanlarda 12 haftalık RSV uygulaması ile böbrek dokusunda MDA düzeylerini anlamlı bir biçimde azalttığını bildirilmiştir [257].

Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak diyabetik gruplarda böbrek dokusu MDA düzeylerini kontrollerine göre anlamlı yüksek, GSH düzeyleri ise düşük bulduk. Ve yine 8 hafta süreyle uyguladığımız RSV tedavisinin, değerleri kontrole göre yine farklı olmakla birlikte doku MDA düzeylerini düşürdüğünü, GSH düzeyini ise yükselttiğini tespit ettik. Ancak doku NO düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edemedik.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak;

Diyabetik sıçanlara 8 hafta boyunca 10 mg/kg/gün dozunda uyguladığımız RSV , diyabetin biyokimyasal bulgularında genel olarak anlamlı bir düzelme meydana getirmedir. Ancak diyabetin neden olduğu böbrek dejenerasyonu ile uyumlu olarak artan TGF- β , fibronektin ve iNOS immunreaktivitesinin RSV uygulamasıyla kısmen azaldığı; diyabetle birlikte azalan eNOS seviyesinin ise RSV uygulamasıyla arttığı gözlemlendi. Yine RSV uygulaması ile DN' ye bağlı olarak artan lipid peroksidasyonda azalma, azalan antioksidan düzeyinde ise yükselme meydana getirdi. RSV ile tedavi edilen Diyabetik grupta ise hem Ang II hem de Phe yanıtlarının azaldığı yine aynı grupta ACh' nin vazodilatatör yanıtlarının da azaldığı gözlemlendi.

Çalışmamızdaki bulgulardan yola çıkarak RSV' ün diyabetin septomları üzerinde literatürde sıkça belirtildiği gibi çok olumlu bir etkisin olmadığını söyleyebiliriz. Ancak çalışmamızın sonuçları RSV' ün , DN' nin olumsuz etkilerine karşı böbrek üzerinde bir ölçüde koruyucu etkilerinin olabileceğini, göstermesi ve bu konuda literatüre ışık tutması açısından önemlidir.

Hastalık komplikasyonlarının önlenmesi veya azaltılması, gerek hasta açısından gerekse sağlıkla ilgili maliyetlerin azaltılması yönünden önemli olduğundan çalışmamızda RSV' ün diyabetin geç dönem böbrek hasarı üzerindeki olumlu sonuçları diğer literatür bilgileri ile birlikte gelecek günlerde hastalar için yeni bir tedavi seçeneği olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca çalışmamız RSV' ün, Tip 2 Diyabetin komplikasyonlarının önlenilebileceği konusunda da yeni bir tedavi seçeneği olabileceğini düşündürmektedir. Bunlarla birlikte RSV' ün literatürde gösterilen antioksidan etkilerinin de yapılacak doku çalışmalarıyla desteklenebileceğini ve RSV' ün düşük maliyetli ve alternatif bir tedavi olabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Öztürk, Y., Altan, V. M., ve Yıldızoğlu, A. N. (1996). Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions. *Pharmacology Review*, 48: 69-112.
2. Robertson, R. P. and Harmon, J. S. (2006). Diabetes glucose toxicity, and oxidative stress: A case of double jeopardy for the pancreatic islet beta cell. *Free Radical Biology Medicine*, 41(2): 177-84.
3. Kohl, C., Ravel, D., Girard, J., and Pegorier, J. P. (2002). Effects of benfluorex on fatty acid and glucose metabolism in isolated rat hepatocytes. *Diabetes*, 51: 2363-2368.
4. Nukatsuka, M., Yoshimura, Y., Nishida, M., and Kawada, J. (1990). Importance of the concentration of ATP in rat pancreatic beta cells in the mechanism of streptozotocine-induced cytotoxicity, *Journal Endocrinology*, 127(1): 161-165.
5. Morgan, N. G., Cable, H. C., Newcombe, N. R., and Williams, G. T. (1994). Treatment of cultured pancreatic b-cells with streptozotocin induces cell death by apoptosis, *Bioscience Reports*, 14:243-250.
6. Karabay, G., Erdoğan, T., Take, G., ve Karasu, Ç. (2005). Deneysel diyabette probukol uygulamasının endokrin pankreas dokusuna etkisinin ultrastrüktürel olarak incelenmesi, *Uludağ Tıp Fakültesi Dergisi*, 31(1): 5-8.
7. Altan, N., Dinçel, A. S., ve Koca, C., (2006). Diabetes mellitus and oxidative stress. *Turkish Journal of Biochemistry*, 31(2):51-56.
8. Yılmaz, S., Üstündağ, B. (2002). Streptozotosin ile diyabet oluşturulan ratların karaciğer ve böbrek dokularında pirüvat kinaz aktivite düzeyleri. *Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences*, 26:549-553.
9. Baynes, J. W. and Thorpe, S. R. (1999). Role of oxidative stress in diabetic complication: A new perspective on an old paradigm. *Diabetes*, 48: 1-9.
10. Orhan, Y. (2001) Diabetes mellitus. Sencer E (Editör). *Endokrinoloji, metabolizma ve beslenme hastalıkları*. Birinci baskı. İstanbul. Nobel Tıp Kitabevi, s.246-51.
11. Parving, H. H., Tarnow, L., and Rossing, P. (1996). Genetics of diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 7:2509-17.
12. Pickup, J. and Williams, G. (1997). Pathogenesis of diabetic nephropathy. In: Pickup J, Williams G (Eds.). *Textbook of diabetes*. Second ed. Edinburg. Blackwell Science, p. 52.1-21.
13. Gambaro, G. and Baggio, B. (1998). Growth factors and the kidney. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 35:117-51.

14. Andersen, S. (1994). Relevance of single nephron studies to human glomerular function. *Kidney International*, 45:384-9.
15. Arya, A., Yadav, H. N., and Sharma, P. L. (2011). Involvement of vascular endothelial nitric oxide synthase in development of experimental diabetic neuropathy in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 805-6.
16. Li, Y., Cao, Z. and Zhu, H. (2006). 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, *Pharmacological Research*, 53: 6–15.
17. Su, H.C., Hung, L. M., and Chen, J.K. (2006). Resveratrol, a red wine antioxidant, possesses an insulin-like effect in streptozotocin-induced diabetic rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 290: 1339-1346.
18. Sun, C., F, Zhang., and Ge, X. (2007). SIRT 1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. *Cell Metabolism*, 6; 307-319.
19. Lee, J. H., Song, M. Y., and Song, E. K. (2009). Overexpression of SIRT1 protects pancreatic beta-cells against cytokine toxicity by suppressing the nuclear factor-kappa B signaling pathway. *Diabetes*, 58: 344-351.
20. Chen, K. H., Hung, C. C., Hsu, H. H., Jing, Y. H., Yang, C. W., and Chen JK. (2011). Resveratrol ameliorates early diabetic nephropathy associated with suppression of augmented TGF- β /smad and ERK1/2 signaling in streptozotocin-induced diabetic rats. *Chemico Biological Interactions*.15;190(1):45-53.
21. Sener, G., Tugtepe, H., ve Yuksel, M. (2006). Resveratrol improves ischemia/reperfusion-induced oxidative renal injury in rats. *Archives Medical Research*, 37: 822–829.
22. Palsamy, P., Sivakumar, S., and Subramanian S. (2010). Resveratrol attenuates hyperglycemia-mediated oxidative stress, proinflammatory cytokines and protects hepatocytes ultrastructure in streptozotocin-nicotinamide-induced experimental diabetic rats. *Chemico Biological Interactions*,186(2):200-10.
23. Sodeman, W. A. and Cesur, N. K. (1992). Editör. *Sodeman's Pathological Physiology mechanisms of disease*. Birinci Baskı. Ankara. Hekimler birliği vakfı, Türkiye Klinikleri yayınevi.
24. WHO. (1999). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. *Report of a WHO consultation*, Geneva.
25. Kaş Y. (1999). Diabetes mellitusun yeni kriterleri ve tedavisine genel yaklaşım-I. *İlaç ve tedavi dergisi*, 12(1):11-17.

26. Dobson, M. (1776). "Nature of the urine in diabetes". *Medical Observations and Inquiries*, 5: 298–310.
27. Cornelius V. (1993). *The history of clinical endocrinology*, Pg. 23 – 34
28. Blázquez-Medela, A. M., López-Novoa, J. M. and Martínez-Salgado, C. (2010). Mechanisms involved in the genesis of diabetic nephropathy. *Current Diabetes Reviews*, Volume 6, Issue 2, pp.68-87.
29. Bağrıaçık N. (1997). *Diabetes Mellitus: Tanımı, Tarihçesi, Sınıflaması ve Sıklığı*. İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıp Eğitimi Etkinlikleri Diabetes Mellitus Sempozyumu 9-18, İstanbul.
30. Kimmelstiel, P. and Wilson, C. (1936). Intercapillary lesions in the glomeruli of the kidney. *American Journal of Pathology*, 2(1): 83-98 .
31. Melmed, S., Polonsky, K., Larsen, P. R., and Kronenberg, H. M. (Editors) *Williams textbook of endocrinology*, Philadelphia: Elsevier/Saunders, 1371–1435.
32. Muhammedi, F. Z. (2014). Simple treatment to curb diabetes. *The Jakarta Post*, 5.
33. Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., and King, H. (2004). Global prevalence of diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 27 (5).
34. Shaw, J. E., Sicree, R. A., and Zimmet, P. Z. (2010). Global estimates of the prevalence of diabetes. *Diabetes Research Clinical Practice*, 87: 4-14.
35. Satman, I., Yılmaz, T., ve Şengül, A. (2002). Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: Results of the Turkish diabetes epidemiology study (TURDEP). *Diabetes Care*, 25(9): 1551-1556.
36. Hearnshaw, H. and Lindenmeyer, A. (2005). What do we mean by adherence to treatment and advice for living with diabetes? A review of the literature on definitions and measurements. *Diabetic Medicine*, 23(7): 720 – 728.
37. American Diabetes Association. (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 37(Suppl. 1):S81–S90.
38. International Expert Committee. (2009). International Expert Committee report on the role of the HbA1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*, 32: 1327–1334.
39. American Diabetes Association. (2011). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, volume 34, supplement 1.
40. Yeğin, A. and Tomris, Ö. (1996). Nonenzimatik Glikasyon Reaksiyonları. *Biyokimya Dergisi*, 21:59-72.

41. Türkiye Endokrin ve Metabolizma Derneği (2013). *Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı Tedavi ve İzlem Kılavuzu* 6. Baskı.
42. Sato, K. K., Hayashi, T., Harita, N., Yoneda, T., Nakamura, Y., Endo, G., and Kambe, H. (2009). Combined measurement of fasting plasma glucose and A1C is effective for the pre- diction of type 2 diabetes: the Kansai Healthcare Study. *Diabetes Care*, 32: 644–646.
43. Fauci, B., Kasper, H., Longo, J. and Loscalzo (editors-in chief). (2008) *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 17th Edition. Mc Graw Hall.
44. Zimmet, P. Z., Tuomi, T., Mackay, R., Rowley, M. J., Knowles, W., and Cohen, M. (1994). Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA): the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency. *Diabetic Medicine*, 11: 299–303.
45. Wu, Y. L., Ding, Y. P., Gao, J., Tanaka, Y., and Zhang, W. (2013) Risk Factors and Primary Prevention Trials for Type 1 Diabetes. *International Journal of Biological Sciences*, 9(6):666-679.
46. Erdoğan, G. (2005). *Koloğlu-Endokrinoloji ve Temel Klinik*, Ankara: MN Medikal ve Nobel Yayınevi.
47. Verge, C. F., Gianani, R., Kawasaki, E., Yu, L., Pietropaolo, M., and Jackson, R. A. (1996). Predicting type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes*, 45: 926–33.
48. Humphrey, A. R. G., McCarty, D. J., Mackay, I. R., Rowley, M. J., Dwyer, T., and Zimmet, P. (1998). Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase and phenotypic features associated with early insulin treatment in individuals with adult– onset diabetes mellitus. *Diabetic Medicine*, 15: 113– 19.
49. DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Keen H., and Zimmet, P . (2005) (editors-in chief). *International Textbook of Diabetes Mellitus*. Third Edition. Vol. 1. John Wiley and Sons, Ltd., England.
50. Japan and Pittsburgh Childhood Diabetes Research Groups (1985). Coma at onset of young insulin–dependent diabetes in Japan: the result of a nationwide survey. *Diabetes*, 34: 1241–46.
51. McLarty, D. G., Athaide, I., Bottazzo, G. F., Swai, A. B. M. and Alberti, K. G. M. M. (1990). Islet cell antibodies are not specifically associated with insulin–dependent diabetes in rural Tanzanian Africans. *Diabetes Research Clinical Practise*, 9: 219–24.
52. Ahrén, B. and Corrigan, C. B. (1984). Intermittent need for insulin in a subgroup of diabetic patients in Tanzania. *Diabetic Medicine*, 2: 262–64.

53. Haller, M. J., Atkinson, M. A., and Schatz D. (2005). Type 1 diabetes mellitus: Etiology, presentation, and management. *Pediatric Clinics of North America*, 52: 1553-78.
54. Redondo, M. J. and Eisenbarth, G. S. (2002) Genetic control of autoimmunity in Type I diabetes and associated disorders. *Diabetologia*, 45 (5): 605-22.
55. Harris, R. C., McKanna, J. A., Akai, Y., Jacobson, H. R., Dubois, R. N., and Breyer, M. D. (1994) Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *Journal of Clinical Investigation*, 94: 2504–2510.
56. Chandrasekharan, N. V., Dai, H., Roos, K. L., Evanson, N. K., Tomsik, J., Elton, T. S., and Simmons, D. L. (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proceedings National Academy Science*, 99: 13926–13931.
57. Fagot-Campagna, A., Pettitt, D. J., Engelgau, M. M., Burrows, N. R., Geiss, L. S., Valdez, R., Beckles, G. L., Saaddine, J., Gregg, E. W., Williamson, D. F., and Narayan, K. M. (2000). Type 2 diabetes among North American children and adolescents: An epidemiologic review and a public health perspective, *Journal of Pediatrics*, 136 (5); 664-672.
58. Justin, L. and Rains, Jain, S. K. (2011). Oxidative stress, insulin signaling and diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*, 50:567-575.
59. American Diabetes Association. (2007). Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*, volume 30, supplement 1.
60. Hussain, A., Claussen, B., Ramachandran, A., and Williams, R. (2007). Prevention of type 2 diabetes. *Diabetes Research Clinical Practise*, 76: 317-326.
61. Caro, J. F. (1991). Clinical Review 26, Insulin Resistance In obese and Nonobese Man. *Journal of Clinical Endocrin and Metabolism*, 73(4): 691-695.
62. Pedersen, O., Bak, J. F., and Andersen, P. H. (1990). Evidence against altered expression of GLUT 1 or GLUT 4 in skeletal muscle of patients with obesity or NIDDM. *Diabetes*, 39:865-70.
63. Mızrak, F. K. B. (2011). *Diyabetik nefropati tanısında mikroalbüminüri tek seçenek mi?* Uzmanlık tezi, Yeditepe Üniversitesi, İstanbul.
64. Pirola, L., Johnston, A. M., and Obberghen, E. (2004). Modulation of insulin action. *Diabetologia*, 47:170–184.
65. Vinik, A., Pittenger, G., Rafaeloff, R., Rosenberg L., and Duguid W. (1996). Determinants of pancreatic islet cell mass. *Diabetes review*, 4: 235-263.
66. Sesti, G. (2006). Pathophysiology of insulin resistance. *Best Practise Research Clinical Endocrinology and Metabolism*, 20:665–679; 2006.

67. Ogawa, W., Matozaki, T., and Kasuga, M. (1998) Role of binding proteins to IRS-1 in insulin signalling. *Molecular Cellular Biochemistry*, 182:13–22.
68. Bloch-Damti, A. and Bashan, N. (2005). Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxidants Redox Signaling*, 7:1553–1567.
69. Saltiel, A. R. and Kahn, C. R. (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414:799–806.
70. Kriauciunas, K. M., Myers, Jr., M, G. and Kahn, C. R. (2000). Cellular compartmentalization in insulin action: altered signaling by a lipid-modified IRS-1. *Molecular and Cellular Biology*, 20: 6849–6859.
71. Copps, K. D. and White, M. F. (2012). Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia*, 55: 2565-82.
72. Foukas, L. C. and Withers, D.J. (2010). Phosphoinositide Signalling Pathways in Metabolic Regulation. *Curr Top Microbiology and Immunology*, 346: 115-41.
73. Samreen, R. (2009). Diabetes mellitus, *Scientific Research and Essay*, 4(5); 367-373.
74. American Diabetes Association (2012). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, Volume 35, Supplement 1.
75. Alberti, K.G.M. and Zimmet P.Z. for the WHO Consultation. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetic Medicine*, 15: 539–553.
76. Karakurt, F., Çarlıoğlu, A., Kasapoğlu, B., ve Gümüş, İ. İ. (2009). Gestasyonel Diabetes Mellitus Tanı ve Tedavisi. *Yeni Tıp Dergisi*, 26: 134-138.
77. Burtis C. A., Ashwood, E. R., David E. and Bruns (Editors) (2008). *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Missouri: Saunders Elsevier.
78. Hsueh, W. A., Moore, L. and Bryer-Ash, M. (2005). *Contemporary diagnosis and management of type 2 diabetes*. 2nd Edition. Pennsylvania: Handbooks in Health Care Co.
79. Boyle, P. J. (2007). Diabetes mellitus and macrovascular disease mechanisms and mediators. *American Journal of Medicine*, 120:12–17.
80. Donaghue, K. C., Chiarelli, F., Trotta, D., Allgrove. J, and Dahl-Jorgensen K. (2009). Microvascular and macrovascular complications associated with diabetes in children and adolescents. *Pediatric Diabetes*, 10 (Suppl. 12): 195–203.

81. Fowler, M. J. (2008). Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. *Clinical Diabetes*, Vol.26, Number.2.
82. Adlin, E. V. (Editor) (1994). *Endocrine and Metabolic Diseases*. Giza, Egypt: Mass Publishing Co. 401-463.
83. Paragas, N., Zhang, Q. A., Samstein, B., Deng, S. X., Schmidt-Ott, K. M., Viltard, M., Yu, W., Forster, C. S., Gong, G., Liu, Y., Kulkarni, R., Mori, K., Kalandadze, A., Ratner, A. J., Devarajan, P., Landry, D. W., D'Agati, V., Lin, C. S., and Barasch, J. (2011). The Ngal Reporter Mouse Detects the Response of the Kidney to Injury in Real Time. *Nature Medicine*, 17(2): 216–222.
84. Bolignano, D., Lacquaniti, A., Coppolino, G., Donato, V., Fazio, M. R., Nicocia, G., and Buemi, M. (2009). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as an early biomarker of nephropathy in diabetic patients. *Kidney Blood Press Research*, 32(2): pp. 91-98.
85. Ludvik, B., Nolan, J. J., Baloga, J., Sacks, D., and Olefsky, J. (1995). Effect of obesity on insulin resistance in normal subject and patients with NIDDM. *Diabetes*, 44:9 1121-1125.
86. Boulton, A. J., Vinik, A., Arezzo, J. C., Bril, V., Feldman, E.L., Freeman, R., Malik, R. A., Maser, R. E., Sosenko, J. M., and Ziegler, D. (2005). Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*, 28:956–962.
87. Vujčić, B., Turk, T., Crncević-Orlić, Z., Đorđević, G., and Racki, S. (Editor) (2012) Ogintubeju, O. O. *Diabetic Nephropathy, Pathophysiology and Complications of Diabetes Mellitus*.
88. Kimmelstiel, P. and Wilson, C. (1936). Benign and malignant hypertension and nephrosclerosis. A clinical and pathological study. *American journal of pathology*, 12:45-8.
89. The World Health Report (2006): *Working Together with Health*. Geneva, Switzerland:World Health Organization.
90. Magri, C. J. and Fava, S. (2009). The role of tubular injury in diabetic nephropathy. *European Journal of Internal Medicine*, (20): 551–555.
91. Hermon, W. H. (1990). Eye disease and nephropaty in NIDDM Diabetes. *Diabetes Care*, 13:24- 29.
92. Kurt M., Atmaca A., ve Gürlek A. (2004). Diyabetik nefropati. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 35:12-17.
93. Amanda, I., Adler, R. J., Stevens, S. E., Manley, R. W., Bilous, C. A., Cull and Rury R. (2003). Holman on behalf of the UKPDS GROUP, Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: The United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). *Kidney International*, vol. 63: pp. 225–232.

94. Shaw, J. and Zimmet, P. (2002). Epidemiology of type 2 diabetes, an increasing problem, also in dialysis units. In: Mogensen CE editor. *Diabetic nephropathy in type 2 diabetes*. London: Science Press, 21- 30.
95. Williams, M.E. and Stanton, R.C., Management of diabetic kidney disease (2005) In: Kahn CR, Weir GC, King GL, Jacobson AM, Moses AC, Smith RJ, editors. *Joslin's diabetes mellitus*. 14th Ed. Boston. Lippincott William&Wilkins, 925-950.
96. Mogensen, C. E. (1999). Microalbuminuria, blood pressure and diabetic renal disease: origin and development of ideas. *Diabetologia*, 42:263-285.
97. Ikeda, K., Fukuda, N., Ueno, T., Endo, M., Kobayashi, N., Soma, M., and Matsumoto, K. (2014). Role of complement 3a in the growth mesangial cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clinical Experimental Hypertension*, 36(1):58-63.
98. Romero-Aroca, P., Mendez-Marin, I., Baget-Bernaldiz, M., Juan Fernandez-Ballart, J. and Santos-Blanco, E. (2010). Review of the Relationship between Renal and Retinal Microangiopathy in Diabetes Mellitus Patients. *Current Diabetes Reviews*, Volume 6, Issue 2, pp.88-101 (14).
99. Doğan, D. (2008). *Tip 2 diyabetli hastalarda eğitim düzeyi ile diyabet başlangıç yaşı, vücut kitle indeksi, HbA1c düzeyi ve mikroanjiyopatik komplikasyonların karşılaştırılması*. Uzmanlık Tezi, Sağlık bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Aile Hekimliği, İstanbul.
100. Buchan, I. E. (1997). Arcus QuickStat Biomedical version. Cambridge. Addison Wesley Longman Ltd.
101. Vinod, P. B. (2012). Pathophysiology of Diabetic Nephropathy. *Nephrology*, 0102 121–126.
102. Osterby, R., Gundersen, H. J. G., and Horlyck, A. (1983). Diabetic glomerulopathy: structural characteristics of the early and advanced stages. *Diabetes*, 1983;32:79.
103. White, K. E., Bilous, R. W., and Marshall, S. M. (2002). Podocyte number in normotensive type 1 diabetic patients with albuminuria. *Diabetes*, 51:3083–9.
104. DallaVestra, M., Masiero, A., Roiter, A. M., Saller, A., Crepaldi, G., and Fioretto, P. (2003). Is podocyte injury relevant in diabetic nephropathy? Studies in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*, 52:1031–5.
105. Gassler, N., Elger, M., and Kränzlin, B. (2001). Podocyte injury underlies the progression of focal segmental glomerulosclerosis in the fa/fa Zucker rat. *Kidney International*, 60: 106–16.
106. Coimbra, T. M., Janssen, U., and Gröne, H. J. (2000). Early events leading to renal injury in obese Zucker (fatty) rats with type II diabetes. *Kidney International*, 57:167–82.

107. Russo, L. M., Sandoval, R. M., Campos, S. B., Molitoris, B. A., Comper, W. D., and Brown, D. (2009). Impaired tubular uptake explains albuminuria in early diabetic nephropathy. *Journal of American Society Nephrology*, 20(3):489-94.
108. Ishida, T., Haneda, M., Maeda, S., Koya, D., and Kikkaw R. (1999). Stretch-induced overproduction of fibronectin in mesangial cells is mediated by the activation of mitogen-activated protein kinase. *Diabetes*, 48:595–602.
109. Tervaert, T. W., Mooyart, A. L., Amann, K., Cohen A. H., Cook, H. T., Drachenberg, C. B., ferrario, F., Fogo, A. B., Hass, M., Heer, E., Joh, K., Noel, L. H., Radhakrishnan, J., Seshan, S. V., Bajema, I. M., and Burjin, J. A. (2010). Pathologic Classification of Diabetic Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 21: 556-563.
110. Raparia, K., Usman, I. and Kanwar, Y. S. (2013). Renal morphologic lesions reminiscent of diabetic nephropathy. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 137:351–359.
111. San, A. and Gök, H. (1984). Diyabet ve böbrek. *Türkiye Klinikleri*, Cilt :4, Sayı:1.
112. Stadler, G. and Schmidt, R. (1959). Severe functional disorders of glomerular capillaries and renal hemodynamics in treated diabetes mellitus during childhood. *Annals pediatric*, 193:129-138.
113. Ziyadeh, F. and Wolf, G. (2008). Pathogenesis of the podocytopathy and proteinuria in diabetic glomerulopathy. *Current Diabetes Review*, 4: 39–45.
114. Gábor L. and Kovács. (2009). Diabetic Nephropathy. *The Journal of The International Federation of Clinical Chemistry And Laboratory Medicine*. eJIFCC 20/01.
115. Thomson, S. C., Vallon, V., and Blantz, R. C. (2004). Kidney function in early diabetes: the tubular hypothesis of glomerular filtration. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 286: 8–15.
116. Hilgers, K. and Veelken, R. (2005). Type 2 diabetic nephropathy: never too early to treat? *Journal of American Society Nephrology*, 16: 574–575.
117. Nagai Y. (2005). Temporary angiotensin II blockade at the prediabetic stage attenuates the development of renal injury in type 2 diabetic rats. *Journal of American Society Nephrology*, 16: 703–711.
118. Sharma K. (1999). Captopril-induced reduction of serum levels of transforming growth factor- β 1 correlates with long-term renoprotection in insulin- dependent diabetic patients. *American Journal of Kidney Disease*, 34: 818–823.
119. Dronavalli, S., Duka, I., and Bakris, G.L. (2008). The pathogenesis of diabetic nephropathy. *Endocrinology & Metabolism*, Vol.4 No.8.
120. Harris, R. D. (1991). Global glomerular sclerosis and glomerular arteriolar hyalinosis in insulin dependent diabetes. *Kidney International*, 40: 107–114.

121. Heilig, C. W. (1995) Over expression of glucose transporters in rat mesangial cells cultured in a normal glucose milieu mimics the diabetic phenotype. *Journal of Clinical Investigation*, 96: 1802–1814.
122. Mishra, R. (2005). High glucose evokes an intrinsic proapoptotic signaling pathway in mesangial cells. *Kidney International*, 67: 82–93.
123. Lin, C. L. (2006). Wnt/ β -catenin signaling modulates survival of high glucose-stressed mesangial cells. *Journal of American Society Nephrology*, 17: 2812–2820.
124. Tugrul, A. (2012). Diyabetik Nefropati, *Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 19 (2); 113-121.
125. Araz, M. and Harrison (2004). *İç Hastalıkları Prensipleri*. Sağlıker Y. (editor) 15. baskı, İstanbul. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. 2:2109-37.
126. La Page, S. N. and Hirschberg, J. R. (2000). Role of glomerular ultrafiltration of growth factors in progressive interstitial fibrosis in diabetic nephropathy. *Kidney International*, 57:1002–14.
127. Satchell, S. C., Anderson, K. L., and Mathieson, P. W. (2004). Angiopoietin 1 and vascular endothelial growth factor modulate human glomerular endothelial cell barrier properties. *Journal of American Society Nephrology*, 15:566–74.
128. Kanesaki, Y., Suzuki, D., and Uehara, G. (2005). Vascular endothelial growth factor gene expression is correlated with glomerular neovascularization in human diabetic nephropathy. *American Journal of Kidney Disease*, 245:288–94.
129. Wautier, M. P., Chappey, O., and Corda, S. (2001). Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *American Journal Physiology Endocrinology and Metabolism*, 280:685–694.
130. Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414:813–820.
131. Dickinson, P. J., Carrington, A. L., Frost, G. S., and Boulton A. J. M. (2002). Neurovascular disease, antioxidants and glycation in diabetes. *Diabetes Metabolism Research Review*, 18:260–272.
132. Koya, D., Hayashi, K., and Munehiro, K. (2003). Effects of antioxidants in diabetes-induced oxidative stress in the glomeruli of diabetic rats. *J American Society of Nephrology*, 14: 250–253.
133. Finkel, T. and Holbrook, N. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 2000,408: 239–247.
134. Ergin, K. and Yaylalı, A., (2013). Resveratrol ve etkileri üzerine bir gözden geçirme *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 20(3), 115-120.

135. Keskin, N., Noyan, T. and Kunter, B. (2009). Resveratrol ile üzümden gelen sağlık. *Türkiye Klinikleri*, 29(5):1273-9.
136. Basly, J. P., Marre-Fournier, F., Le Bail, J. C., Habrioux, G., and Chulia, A. J. (2000). Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E)- and (Z)-resveratrol. *Life Sciences*, 66(9): 769-77.
137. Szkudelska, K. and Szkudelski, T. (2010). Resveratrol, obesity and diabetes *European Journal of Pharmacology*, 635:1-8.
138. Siemann, E. H. and Creasy, L. L. (1992). Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *American Journal Enology Viticulture*, 43:49e52.
139. Planas, M. P., Colom, H., and Juan, M. E. (2011). Resveratrol: A polyphenol with multiple effects. *Recent Advances in Pharmateutical Sciences*, 101-120.
140. Fremont, L. (2000). Biological effects of resveratrol. *Life sciences*, 66(8):663-673.
141. Pervaiz, S. (2003). Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *Faseb journal*, 17(14):1975-85.
142. Soleas, G. J., Diamandis, E. P., and Goldberg, D. M. (1997). Wine as a biological fluid:history, production and role in disease prevention. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 11(5):287-313.
143. Sovak, M. (2001). Grape Extract, Resveratrol, and Its Analogs: A Review. *Journal Medicinal Food*, 4: 93-105.
144. Raffaelli, F., Vignini, A., Giulietti, A., Alidori, F., Borroni, G. Sforza, E., Faloia, L., Mazzanti, L., and Nanetti. (2013). In vitro effects of resveratrol on oxidative stress in diabetic platelets *Acta Diabetology*, 00592-013-0480.
145. Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., and Beecher, C. W. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 1275(5297):218-20.
146. Signorelli, P. and Ghidoni, R. (2005). Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis open questions and promises. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16: 449-466.
147. Kuhnle, G., Spencer, J. P., Chowrimootoo, G., Schroeter, H., Debnam, E. S., and Srai, S. K. (2000) Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrol glucuronide. *Biochemical Biophysics Research Community*, 272: 212–7.
148. Kaldas, M. I., Walle, U. K. and Walle, T. (2003). Resveratrol transport and metabolism by human intestinal Caco-2 cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 55:307-12.

149. Bertelli, A., Bertelli, A. A., Gozzini, A., and Giovannini, L. (1998). Plasma and Tissue Resveratrol Concentrations and Pharmacological Activity. *Drugs under experimental and clinical research*, 24(3): 133-8.
150. Bertelli, A. A., Giovannini, L., Stradi, R., Urien, S., and Tillement, J. P. (1998). Evaluation of Kinetic Parameters of Natural Phytoalexin in Resveratrol Orally Administered in Wine to Rats. *Drugs under experimental and clinical research*, 24: 51- 5.
151. Henry-Vitrac, C., Desmouliere, A., Girard, D., and Merillon, J. M. (2006). Transport, deglycosylation and metabolism of trans pieced by small intestinal epithelial cells. *European Journal of Nutrition*, 45:376-382.
152. Marier, J. F., Vachon, P., Gritsas, A., Zhang, J., Moreau, J. P., and Ducharme, M. P. (2002). Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enteropathic recirculation evidenced by alinked-rat model. *Journal of Pharmacology experiment therapy*, 302(1): 369-73.
153. Andlauer, W., Kolb, J., Siebert, K., and Furst, P. (2000). Assessment of resveratrol bioavailability in the perfused small intestine of the rat. *Drugs under experimental and clinical research*, 26:47 – 55.
154. Vitrac, X., Desmouliere, A., Brouillaud, B., Krisa, S., Deffieux, G., and Barthe, N. (2003). Distribution of [14C]-trans-resveratrol, a cancer chemo- preventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. *Life Sciences*, 72:2219-33.
155. Sayın, O., Arslan, N., ve Güner, G. (2008). Resveratrol ve kardiyovasküler system *Türk Biyokimya Dergisi*, 33(3): 117-121.
156. Tedesco, I., Russo, M., Russo, P., Iacomino, G., Russo, G. L., and Carraturo, A. (2000). Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 11(2):114-9.
157. Celotti, E., Ferrarini, R., Zironi, R. and Conte, L. S. (1996). Resveratrol content of some wines obtained from dried Valpolicella grapes: Recioto and amarone. *Journal of Chromatography A*, 730(1-2):47-52.
158. Das, D. K. and Maulik, N. (2006). Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine. *Molecular Interview*, 6: 36- 47.
159. Frankel, E. N., Waterhouse, A. L., and Kinsella, J. E. (1993) Inhibition of human LDL oxidation bey resveratrol. *The Lancet*, 341 (8852): 1103-1104.
160. Hung, L. M., Su, M. J., Chu, W. K., Chiao, C. W., Chan, W. F., and Chen, J. K. (2002). The protective effect of resveratrols on ischaemia-reperfusion injuries of rat hearts is correlated with antioxidant efficacy. *British Journal Pharmacology*, 135(7):1627-33.

161. Law, M. and Wald, N. (1999). Why heart disease mortality is low in France: The time lag explanation. *British Medical Journal*, 275:218-20.
162. Chander, V., Tirkey, N., and Chopra, K. (2005). Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin protects against cyclosporine-induced nephrotoxicity through nitric oxide dependent mechanism. *Toxicology*, 210:55-64.
163. Morales, A. I., Buitrago, J. M., Santiago, J. M., Fernandez-Tagarro M., Lopez-Novoa, J. M., and Perez-Barriocanal, F. (2002). Protective effect of transresveratrol on gentamicin-induced nephrotoxicity. *Antioxidants and Redox Signaling*, 4:893-898.
164. Nihei, T., Miura, Y., and Yagasaki, K. (2001). Inhibitory effect of resveratrol on proteinuria, hypoalbuminemia and hyperlipidemia in nephritic rats. *Life Science*, 68: 2845-2852.
165. Deng, J. Y., Hsieh, P. S., Huang, J. P., Lu L. S., and Li-Man Hung. (2008). Activation of Estrogen Receptor is Crucial for Resveratrol-Stimulating Muscular Glucose Uptake via Both Insulin-Dependent and-Independent Pathways. *Diabetes*, 57: 1823-1814.
166. Fröjdö, S., Durand, C., Molin, L., and Carey, A. L. (2011). Phosphoinositide 3-Kinase as a Novel Functional Target for the Regulation of the Insulin Signaling Pathway by SIRT1. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 335: 166-76.
167. Zhang, J. (2006). Resveratrol Inhibits Insulin Responses in a Sirt1-Independent Pathway. *Journal of Biochemistry*, 397: 527-519.
168. Bruckbauer, A., Zemel, M. B., Thorpe, T., Akula, M. R., and Stuckey, A. C. (2012). Synergistic Effects of Leucine and Resveratrol on Insulin Sensitivity and Fat Metabolism in Adipocytes and Mice. *Nutrition and Metabolism*, 9: 77-9.
169. Sara, F. R., Cozzone, D., Vidal, H., and Pirola, L. (2007). Resveratrol is a Class IA Phosphoinositide 3-Kinase Inhibitor. *Biochemical Journal*, 406: 518-511.
170. M, Kitada., Z, Zhang., A, Mima., and G. L. King. (2010). Molecular mechanisms of diabetic vascular complications. *Journal of Diabetes Investigation*, vol. 1, no. 3, pp. 77–89.
171. M. Y. Kim, J. H. Lim and H. H. Youn (2013). Resveratrol prevents renal lipotoxicity and inhibits mesangial cell glucotoxicity in a manner dependent on the AMPK-SIRT1-PGC1 axis in db/db mice *Diabetologia*, vol. 56, no. 1, pp. 204–217.
172. Zhang, S., Cai, G. and Fu, B. (2012). SIRT1 is required for the effects of rapamycin on high glucose-inducing mesangial cells senescence, *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 133, no. 6, pp. 387–400.
173. Zhang, L., Pang, S., and Deng, B. (2012). High glucose induces renal mesangial cell proliferation and fibronectin expression through JNK/NF- κ B/NADPH oxidase/ROS pathway, which is inhibited by resveratrol, *The*

International Journal of Biochemistry and Cell Biology, vol. 44, no. 4, pp. 629–638.

174. Kitada, M. and Koya D. (2013). Renal Protective Effects of Resveratrol
Oxidative Medicine and Cellular Longevity Article ID 568093.
175. Wang, S., Zhang, M., Liang, B., Xu, J., Xie, Z., Liu, C., Viollet, B., Yan, D., and Zou, M. H. (2010). AMPK $\alpha 2$ deletion causes aberrant expression and activation of NADPH oxidase and consequent endothelial dysfunction in vivo: role of 26S proteasomes. *Circulation Research*, 106(6):1117-28.
176. Ko, H. J., Zhang, Z., Jung, D., Y, Jun, J. Y., Ma, Z., Jones, K. E., Chan, S. Y., and Kim J. K. (2009). Nutrient stress activates inflammation and reduces glucose metabolism by suppressing AMP-activated protein kinase in the heart. *Diabetes*, 58(11):2536-46.
177. Ceolotto, G., Gallo, A., Papparella, I., Franco, L., Murphy, E., Lori, E., Pagnin, E., Fadini, G. P., Albiero, M., Semplicini, A., and Avogaro, A. (2007). Rosiglitazone reduces glucose-induced oxidative stress mediated by NADPH oxidase via AMPK-dependent mechanism. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 27(12):2627-33.
178. Jeong, H. W., Hsu, K. C., Lee, J. W., Ham, M., Huh, J. Y., Shin H. J., Kim W. S. and Kim, J. B. (2009). Berberine suppresses proinflammatory responses through AMPK activation in macrophages. *American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism*, 296(4): 955-64.
179. Zhang, L., S, Pang., and Deng, B. (2012). "High glucose induces renal mesangial cell proliferation and fibronectin expression through JNK/NF- κ B/NADPH oxidase/ROS pathway, which is inhibited by resveratrol, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 44, no. 4, pp. 629-638.
180. Çekmen, M.B, Turgut, M., Türköz, Y., Aygün, D. A., ve Gözükar, E. M. (2001). Nitrik Oksit (NO) ve Nitrik Oksit Sentaz (NOS)'ın *Fizyolojik ve Patolojik Özellikleri Türkiye Klinikleri Pediatri Dergisi*, 10.
181. Ignarro, J. L. (2008). *NO Kalp hastalıklarına son*. İstanbul. Akis Kitapevi. s1-36.
182. Davies, M. G., Fulton, G. J., and Hagen, P. O. (1995). Clinical biology of nitric oxide. *British Journal of Surgery*, 82: 1598-1610.
183. Pendurthi, U. R., Williams, J. T., and Rao, L. V. (1999). Resveratrol, a polyphenolic compound found in wine, inhibits tissue factor expression in vascular cells: a possible mechanism for the cardiovascular benefits associated with moderate consumption of wine. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 19: 419-426.
184. Türköz, Y. ve Özerol, E. (1997). Nitrik oksit'in Etkileri ve Patolojik Roller. *Journal of Turgut Özal Medical Center*, 4(4).

185. Rodomski, M. W., Palmer, R. M. J., and Mondaca, S. (1990). Characterisation of L-arginin nitric oxide pathway in human platelets. *British Journal of Pharmacology*, 101: 325- 328.
186. Zavillo, I., Capikova, D., Pechanova, O. and Bernatova, I. (2001). Wine polyphenols increase NO synthase activity in both normotensive and hipertensive rats. *Physiological Research*, 130: 357–367.
187. Wallerath, T., Li, H., Gödtel-Ambrust, U., Schwarz, M. P., and Förstermann U. (2005). A blend of polyphenolic compounds explains the stimulatory effect of red wine on human endothelial NO synthase. *Nitric Oxide*, 12(2): 97-104.
188. Söylemez S. (2007) *Dişi ve erkek sıçanlarda uzun süreli resveratrol tedavisinin endotel hücre reaktivitesi ve eNOS, iNOS ekspresyonları üzerine etkilerinin araştırılması*. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara.
189. Wallerath, T., Deckert, G., Ternes, T., Anderson, H., Li, H., and Witte, K. (2002). Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, 106: 1652-1658.
190. Zhang, H., Zhang, J., Ungvari, Z., and Zhang, C. (2009). Resveratrol improves endothelial function. Role of TNF and vascular oxidative stress. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 29: 1164–1171.
191. Das, S., Alagappan, V. K. T., Bagchi, D., Sharma, H. S., Maulik, N., and Das, D. K. (2005). Coordinated induction of iNOS-VEGF-KDR-eNOS after resveratrol consumption. A potential mechanism for resveratrol preconditioning of the heart. *Vascular Pharmacology*, 42: 281-289.
192. Mercan, U. (2004). Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi, *Yüzüncüyıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 15 (1-2):91-96.
193. Halliwell, B. and Gutteridge J. M. C., (2003) *Free Radicals in Biology And Medicine*, 3rd ed: Oxford University Press.
194. Uysal M. (1998). Serbest radikaller, lipid peroksidleri organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. *Klinik gelişim*. 11: 336-341.
195. Gilbert, D. L. (2000). *Fifty Years of Radical Ideas in Reactive Oxygen Species*, Ed Chiueh C. C. , Ann. N. Y. Acad. Sci, 899:1-14.
196. Babior, B. M. (2000). Phagocytes and oxidative stress. *The American Journal of Medicine*, 109(1):33-44.
197. Akkuş, İ. (1995). *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*, 1. Baskı, Konya: Mimoza Yayınları.
198. Bingöl, F., Aydın, S. ve Açıkgöz, S. (1993). Serbest Radikaller. *Ankara Hastanesi Tıp Dergisi*, 28(2), 1-23.

199. Frenkel, K. (1992). Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative DNA damage. *Pharmacology and Therapeutics*, 53, 127-166.
200. Kelce, W. R. and Wilson, E. M. (2001). Antianrogenic effects of environmental endocrine disruptors: The Book of Environmental Chemistry, Endocrine Disruptors Part 1, Meltzer M(ed), Springer- Verlag Berlin Heidelberg. S. 39-61.
201. Stamler, J. S., Singel, D. and Loscalzo, J. (1992). Biochemistry, of nitric oxide and its redox activated forms. *Science*, 258:1898-1902.
202. Dröge, W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function, *Physiological Review*, 82, 47-95.
203. Knight, D.C. and Eden, J. A. (1996). A Review Of The Clinical Effects Of Phytoestrogens. *Obstetrics and Gynecology*, 87:897-904.
204. Lowenstein, C. J., Dinerman, J. L., and Snyder, S. H. (1994). Nitric oxide: A physiologic messenger, *Annals of Internal Medicine*, 120:227-237.
205. Floyd, R. A. (1992). *DNA Damage and Repair in Oxidative Damage and Repair*, Pergamon Press. 175-180.
206. Evans, P. and Halliwell, B. (2001). Micronutrients: Oxidant/Antioxidants Status, *British Journal of Nutrition*, 85(2): 67-74.
207. Podda, M., Traber, M. G., Weber, C., Yan, L. J, and Pakcer, L. (1998). UV-irradiation depletes antioxidants and causes damage in a model human skin. *Free Radical Biology and Medicine*, 92: 5259-5265.
208. Beckman, K. B. and Ames, B. N. (1998). The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiology*, 78: 547–581.
209. Özenirler, S., Tuncer, C., Ongun, C. Ö., Altan, N., ve Kandilci, U. (1994) Activity of Superoxide Dismutase in Erythrocyte of Nonalcoholic Chronic Liver Diseases. *General Pharmacology*, 25(7): 1349-51.
210. Engin, A., Bozkurt, B. S., Altan, N, Memiş, L., ve Bukan N. (2003). Nitric oxide-mediated liver injury in presence of experimental bile duct obstruction. *World Journal of Surgery*, 27(3): 253-5.
211. Yardım-Akaydin, S., Sepici, A., Özkan, Y., Torun, M., Şimşek, B., ve Sepici, V. (2004). Oxidation of uric acid in rheumatoid arthritis: Is allantoin a marker of oxidative stress? *Free Radical Research*, 38(6): 623-628.
212. Van Dam, P. S., Van Asbeck, B. S., Erkelens, D. W., Marx, J. J., Gispen, W. H., and Bravenboer, B. (1995.) The role of oxidative stress in neuropathy and other diabetic complications. *Diabetes Metabolism Reviews*, 11(3): 181- 192.
213. Bukan, N., Sancak, B., Yavuz, Ö., Koca, C., Tutkun, F., Özçelikay, T. A., ve Altan, N. (2003). Lipid peroxidation and scavenging enzyme levels in the liver

- of streptozotocin-induced diabetes rats. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 40(6): 447-450.
214. Yar, A. S. (2008) *Streptozotosin ile oluşturulmuş diyabetli sıçanlarda resveratrol kullanımı sonucunda siklooksijenaz-1 (Cox-1) ve siklooksijenaz-2 (Cox-2) genlerinin ekspresyonlarının araştırılması*. Yüksek lisans tezi. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ankara.
 215. Memişoğulları, R. (2005). Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 3:30-39.
 216. Nordberg, J. and Arner, E. S. J. (2001). Reactive oxygen species, antioxidant and the mammalian thioredoxin system, *Free Radicals Biology Medicine*, 31 : 1287-1312.
 217. Das, S. K. and Vasudevan, D. M. (2005). Biochemical diagnosis of alcoholism. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 20 : 35-42.
 218. Masella, R., Benedetto, D.I., Vari R, Filesi RC and Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathionerelated enzymes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16 : 577-586.
 219. Lee, M. M. (2007). Endocrine disrupters. *Pediatric Endocrinology*, 109- 118.
 220. Wu, G., Fang, Y. Z., and Yang, S. (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *Journal of Nutritions*, 134(3): 489-92.
 221. Babior, B.M. (1997). Superoxide: a two–edged sword. *Medical and Biological Research*, 30, 141-155.
 222. Yavuz, Ö. (1994) *Gerbillerde deneysel olarak oluşturulan iskemireperfüzyon modelinde 2-kloroadenozinin beyin dokusu lipid peroksit düzeyleri ve glutatyon peroksidaz aktivitesine etkisi*, Uzmanlık Tezi, Gazi Üniversitesi Tıp Fkültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara.
 223. Fantone, J.C. and Ward, P.A. (1982). Role of oxygen-devired free radicals and metabolites in leococyte-development inflammatory reactions. *American Journal of Pathology*, 107(3), 397-418.
 224. Messina, M., Gugger, E. T., and Alekel, D.L. (2001). Soy protein, soybean isoflavones, and bone health: A review of the animal and human data. *Nutraceuticals and Functional Foods* (Ed. Wildman RE.) 1st ed. USA: CRP Press, 77-99.
 225. Nicholas, S. B., Mauer, M., Basgen, J. M., Aguiniga, E., and Chon, Y. (2004). Effect of angiotensin II on glomerular structure in streptozotsin-induced diabetics rats. *American Journal of Nephrology*, 24(5):549-556.
 226. Casini, A., Ferrali, M., and Pompella, A. (1986). Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissue of bromobenzene intoxicated mice, *American Journal of Pathology*, 123, 520-531.

227. Aykaç, A. G., Uysal, M., Yalçın, A. S., Koçak-Toker, N., ve Sivas, A., Öz H. (1985). The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats, *Toxicology*, 36, 71-76.
228. Miranda, K. M., Espey, M. G., and Wink, D. A. (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite, *Nitric Oxide*, 5: 62-71.
229. Anabela, P. and Rolo, Carlos, M. (2006). Palmeira Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress *Toxicology and Applied Pharmacology*, 212 :167–178.
230. Tripathi, B. K. and Srivastava A. K. (2006). Diabetes mellitus: Complications and therapeutics, *Medical Science Monitor*, 12(7): 130-147.
231. Altıparmak, M. R. ve Apaydın, S. (2001). Diyabetik nefropati. Yenigün M (Editör). *Her yönüyle diabetes mellitus*. 2. baskı. İstanbul. Nobel Tıp Kitabevi. 383-99.
232. Earle, K. A., Porter, K. K., Otsberg, J., and Yudkin, J. S. (2001). Variation in the progression of diabetic nephropathy according to racial origin. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 16:286-90.
233. Cooper, M. E. (1998). Pathogenesis, prevention and treatment of diabetic nephropathy. *Lancet*, 352:213-9.
234. Marshall, S. M. (2004). Recent advances in diabetic nephropathy. *Postgrad Medical Journal*, 80:624-33.
235. Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) Research Group. (1995) *Effect of intensive therapy on the development and progression of diabetic nephropathy in the Diabetes Control and Complications Trial*. *Kidney Int* 1995;47:1703-20.
236. Ruggenenti, P., Fassi, A., Parvanova-Ilieva, A., Bruno, S., Petrov-Iliev I, and Brusegan. (2004). V for the Bergamo Nephrologic Diabetes Complications Trial (BENEDICT) Investigators. Preventing microalbuminuria in type 2 diabetes. *New England Journal of Medicine*, 2004;351:1941-51.
237. Saiko, P., Szakmary, A., Jaeger, W., and Szekeres, T. (2008). Resveratrol and its analogs: defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad *Mutation Research*, 658(1- 2):68-94.
238. Bishayee A. (2009). Cancer prevention and treatment with resveratrol: from rodent studies to clinical trials. *Cancer Prev Res* 2(5):409-418.
239. Dong, Z. (2003). Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. *Mutation Research*, 523-524:145-150.

240. Aggarwal, B. B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R. S., Seeram, N. P., Shishodia, S., and Takada Y. (2004). Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Research*, 24(5A):2783- 2840.
241. Pace-Asciak, C. R., Hahn, S., Diamandis, E. P., Soleas, G, and Goldberg, D. M.(1995). The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clinica Chimica Acta* ,31;235(2):207-219.
242. Hebbar, V., Shen, G., Hu. R, Kim, B. R., Chen, C., Korytko, P. J., Crowell, J. A., B.S Levine, and Kong, A.N. (2005). Toxicogenomics of resveratrol in rat liver. *Life Sciences*, 76: 2299–2314.
243. Juan, M. E., Vinardell, M. P., and Planas, J. M. (2002). The daily oral administration of high doses of trans-resveratrol to rats for 28 days is not harmful. *Journal of Nutrients*, 132: 257–260.
244. Martinez, J. and Moreno, J.J.(2000). Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochemical Pharmacology*, 59(7): 865-70.
245. Tatsuki, R., Satoh, K., and Yamamoto, A. (1997). Lipid peroxidation in the pancreas and other organs in streptozotocin diabetic rats. *Japanese Journal of Pharmacolgy*, 75: 267–273.
246. Kanter, M., Coskun, O., ve Korkmaz A. (2004). Effects of *Nigella sativa* on oxidative stress and β -cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Anatomical Record*, 279: 685–691.
247. Coskun, O., Ocakci, A., ve Bayraktaroglu, T. (2004). Exercise training prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas. *Journal of experimental medicine*, 203: 145–154.
248. Pushparaj, P., Tan, C. H., and Tan, B. K. H. (2000) .Effects of *Averrhoa bilimbi* leaf extract on blood glucose and lipids in streptozotocin- diabetic rats. *Journal Ethnopharmacology*, 72:69-76.
249. Cetto, A. A., Wiedenfeld, H., Revilla, M. C., and Sergio, I. A. (2000). Hypoglycemic effect of *Equisetum myriochaetum* aerial parts on streptozotocin diabetic rats. *Journal Ethnopharmacology*, 72:129- 33.
250. Chang, C.C., Chang, C.Y., Wu, Y.T., Huang, J. P., Yen, T., and Hung L. M. (2011). Resveratrol retards progression of diabetic nephropathy through modulations of oxidative stress, proinflammatory cytokines, and AMP-activated protein kinase *Journal of Biomedical Science*, 18:47.
251. Sharma, S., Anjeneyulu, M., Kulkarni, S.K., and Chopra K. (2006). Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin, attenuates diabetic nephropathy in rats. *Pharmacology*, 76:69–75.
252. Tzong-Cherng. C., Chen, W. P., Chi, T-Li., Tzong-Fu, K., Lee, S. S., Cheng, T. J., and Su, M. J. (2007). Phosphatidylinositol-3-kinase is Involved in the

- antihyperglycemic effect induced by resveratrol in streptozotocin- induced diabetic rats. *Life Sciences*, 80: 1720-1713.
253. Chen, W. P., Chi, T. C., Chuang, L. M., and Su, M.J. (2007). Resveratrol enhances insulin secretion by blocking KATP and KV channels of beta cells. *European Journal Pharmacology*, 568: 269–277.
 254. Alhaider, A. A., Korashy, H. M. ,Sayed-Ahmed, M. M., Mobark, M., Kfoury, H., and Mansour, M. A. Metformin attenuates streptozotocin- induced diabetic nephropathy in rats through modulation of oxidative stress genes expression. (2011). *Chemico- Biological Interactions*, 192(3): 233-242.
 255. Thomas, M. A., Burgess, P., Michael, M. D., and Robich, M. (2011). Improving Glucose Metabolism with Resveratrol in a Swine Model of Metabolic Syndrome Through Alteration of Signaling Pathways in the Liver and Skeletal Muscle. *Archives of Surgery*, 146: 564-556.
 256. Montserrat, B., Salgado, D., Alberto, F., and Guerra, R. (2014). Diabetic nephropathy and inflammation. *World Journal of Diabetes*,15; 5(3): 393-398.
 257. Ji, H., Wu, L., Ma, X. and Qin, G. (2014). The effect of resveratrol on the expression of AdipoR1 in kidneys of diabetic nephropathy. *Molecular Biology Reports*, 41:2151–2159.
 258. Obineche, E. N., Mensah-Brown, E., Chandranath, S. I., Ahmed, I., Naseer, O., and Adem, A. (2001). Morphological changes in the rat kidney following long-term diabetes. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 109:241–245.
 259. Palsamy, P. and Subramanian, S. (2011). Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via Nrf2–Keap1 signaling. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1812 (2011) 719–731.
 260. Ding, D. F., You, N., Wu, X. M. Xu, J. R., Hu, A. P., Ye, X. L., Zhu, Q., Jiang, X. Q., Miao, H., Liu, C., and Lu Y. (2010). Resveratrol attenuates renal hypertrophy in early-stage diabetes by activating AMPK. *American Journal of Nephrology*, 31:363–374.
 261. Blobel, G. C., Schiemann, W. P., and Lodish, H.F. (2000). Role of transforming growth factor- β in human disease. *New England Journal of Medicine*, 342, 1350–1358.
 262. Chavez, E., Reyes-Gordillo, K., Segovia, J., Shibayama, M., Tsutsumi, V., and Vergara, P. (2008). Resveratrol prevents fibrosis, NF-kappaB activation and TGF-beta increases induced by chronic CCl₄ treatment in rats. *Journal of Applied Toxicology*, 28(1):35-43.
 263. Sharma, S. and Prabhakar (2004). Role of Nitric Oxide in Diabetic Nephropathy. *Seminars in Nephrology*, Vol 24, No: 4pp 333-344.
 264. Veelken, R., Hilgers, K. F., and Hartner A. (2000). Nitric oxide synthase

- isoforms and glomerular hyperfiltration in early diabetic nephropathy. *Journal of American Society Nephrology*, 11:71-79.
265. Trachtman, H., Futterweit, S., and Pine, E. (2002). Chronic diabetic nephropathy: Role of inducible nitric oxide synthase. *Pediatric Nephrology*, 17:20-29.
 266. Das, S., Fraga, C. S., and Das D.K. (2006). Cardioprotective effect of resveratrol via HO-1 expression involves p38 map kinase and PI-3-kinase signaling, but does not involve NFkB. *Free Radicals Research*, Vol. 46, No. 3, 359-359.
 267. Naderali, E. K., Smith, S. I., Doyle, P. J., and Williams, G. (2001). The mechanism of resveratrol-induced vasorelaxation differs in the mesenteric resistance arteries of lean and obese rats. *Clinical Science*, 100, 55–60.
 268. Hung, L. M., Cehn, J. K., Huanng, S. S., Lee R. S., and Su, M.J. (2000). Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovascular Research*, 18;47(3):549-55.
 269. Olas, B., Wachowicz, B., Szczuk, J., Saluk-Juszczak, J., and Kaca W. (2001). The effect of resveratrol on the platelet secretory process induced by endotoxin and thrombin. *Microbios*, 105(410):7-13.
 270. Ray, P. S., Maulik, G., Cordis, G. A., Bertelli, A. A., Bertelli A. and Das, D. K. (1999). The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemia reperfusion injury. *Free Radical Biology and Medicine*, (27):160-169
 271. Nicholson, S. K., Tucker, G. A., and Brameld, J. M. (2008). Effects of dietary polyphenols on gene expression in human vascular endothelial cells. *Proceedings of the Nutrition Society*, 67(1):42-47.
 272. Xu, Q., Hao, X., Yang, Q., and Si, L. (2009). Resveratrol prevents hyperglycemia-induced endothelial dysfunction via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *Biochemical Biophysical Research Community*, 388(2):389-394.
 273. Chen, C. K. and Pace-Asciak, C.R. (1996). Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta. *General Pharmacology*, 27:363-6.
 274. İkizler, M., Dernek, S., Erkasap, N., Kaygısız, Z., Sevin, B., ve Kural, T. (2003). İzole Rat Kalplerine Uygulanan Reperfüzyon Hasarında Resveratrol'ün Hemodinamik Etkileri. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi*, 11:91-95.
 275. Gordish, K. L., and Beierwaltes, W. H. (2014). Resveratrol induces acute endothelium-dependent renal vasodilation mediated through nitric oxide and reactive oxygen species scavenging. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 306: 542–550.
 276. Li, H. F., Tian, Z. F., Qui, X. Q., Wu, J. X., Zhang, P. and Jia, Z. J. (2006). A study of mechanisms involved in vasodilation induced by resveratrol in isolated porcine coronary artery. *Physiological Research*, 55: 365–372.

277. Akar, F., Uludağ, O., Aydın, A., Aytekin, Y. A., ve Elbeg, S. (2012). High-Fructose Corn Syrup Causes Vascular Dysfunction Associated with Metabolic Disturbance in Rats: Protective affect of resveratrol. *Food Chemical of Toxicology*, 50: 2135-41.
278. Martin, S., Andrianbeloson, E., Takeda, K. and Andriantsitohaina, R. (2002). Red winw phenols increase calcium in bovine aortic endothelial cells: a basis to elucidate signal pathways leading to nitric oxide production. *British Journal of Pharmacolgy*, 135: 1579-1587.
279. Buluc M. ve Demirel-Yılmaz E. (2006). Resveratrol decreases calcium sensitivity of vascular smooth muscle and enhances cytosolic calcium increase in endothelium. *Vascular Pharmacology*, 44:231-237
280. Orallo, F., Alvarez, E., Camina, M., Leiro, J. M., Gomez, E., and Fernandez, P. (2002). The possible implication of trans-resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Molecular Pharmacology*, 61: 294- 302.
281. Soylemez, S., Sepici, A. ve Akar, F. (2009). Resveratrol Supplementation Gender Independently Improves Endothelial Reactivity and Suppresses Superoxide Production in Healthy Rats. *Cardiovascular Drugs Therapy*, 23: 458-449.
282. Akar, F., Pektaş, M. B., Tufan, C., Soylemez, S. ve Sepici, A. (2010). Resveratrol shows vasoprotective effect reducing oxidative stress without affecting metabolic disturbances in Insulin-dependent diabetes of rabbits. *Cardiovascular Drugs Theraphy*, 7: 6255.
283. Schmatz, R., Perreira, L. B., Stefanello, N., Mazzanti, and C., Spanevello, R. (2011). Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochimistry*, 10-1.

EKLER

Ek-1. Etik Kurul Onayı


T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

SAYI : B.30.2.GÜN.0.05.06.00/183-17448
KONU : 26.09.2011

Sayın
Doç.Dr.Çiğdem ÖZER
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

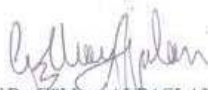
Araştırmacı grubu Çiğdem ÖZER, Aydan BABÜL, Z.Sevim ERCAN, Duygu TOZCU ALTIN, Gülnur TAKE KAPLANOĞLU ve Şevin GÜNEY'den oluşan, G.Ü.ET-11.086 kod numaralı ve "*Diyabetik Sıçan Böbreğinde Resveratrolün Etkisi*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelerle uygun olduğu saptanarak oraylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-11.086 and entitled "*The Effects of Resveratrol on Diabetic Rat Kidney*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

EK : 1 Liste


Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı: ALTIN,Duygu

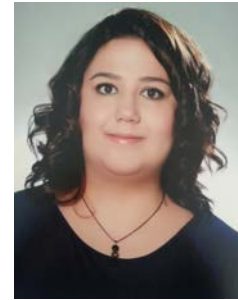
Uyruğu: T.C.

Doğum yeri ve tarihi: 31/07/1982 Ankara

Medeni hali: Evli

Telefon: 0 (506) 690 17 26

e-posta: dygaltin@gmail.com



Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet Yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi /Fizyoloji AbD	2014
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi /Fizyoloji AbD	2008
Lisans	Gazi Üniversitesi/Biyoloji Bölümü	2006
Lise	Kılıçarslan Süper Lisesi	2000

İş Deneyimi, Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2008	Ankara Eczacı Odası	Biyolog

Yabancı Dili

İngilizce

Yayınlar

1. Duygu Tozcu Altın, Çiğdem Özer, Ediz Yeşilkaya, Aydan Babül, Aysun Bideci and Peyami Cinaz. ***Effect of the Plant Growth Regulator (4-chlorophenoxy acetic acid) Into the Oxidative Stress Parameters in Rat Liver.*** African Journal of Pharmacy and Pharmacology Vol.5(22) , pp. 2498 - 2504 , December 2011 DOI:10.5897/AJPP11.661 ISSN 1996-0816
2. Güleser Göktaş, Duygu Tozcu Altın, Gülnur Take Kaplanoğlu, Çiğdem Özer. ***Diyabetik Sıçanlarda Aortta Meydana Gelen Değişikliklere Resveratrolün Etkisi*** Cell & Tissue Biology Research Volume 4 / 2014 Supplement.



GAZİ GELECEKTİR..



Gazi gelecektir...

