

T.C  
Marmara Üniversitesi  
Endokrinoloji ve Metabolizma  
Hastalıkları Bilim Dalı

**DIYABETİK SIÇAN MODELİNDE AMİNOGUANİDİN  
İLE OLUŞTURULAN İLERİ GLİKOZİLASYON  
İNHİBİSYONUNUN GLOMERÜL BAZAL MEMBRAN  
ANYONİK YÜK İÇERİĞİNE ETKİSİ**

(Yan dal Uzmanlık Tezi )

**Uzm .Dr. Dilek (Gogas)Yavuz**

88 833

**İstanbul 1999**

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET	1
GİRİŞ VE AMAÇ	3
GENEL BİLGİLER	5
Diyabetik nefropati	
Glomerül bazal membran	
Diyabetik böbrekte histolojik bulgular	
Hiperglisemiye bağlı renal hasar mekanizmaları	
GEREÇ VE YÖNTEM	51
SONUÇLAR	55
TARTIŞMA	63
İNGİLİZCE ÖZET	68
KAYNAKLAR	70

## ÖZET

İleri glikozilasyon inhibitörü olan aminoguanidinin (AG) diyabetik sıçan modellerinde nefropati gelişim ve progresyonunu önlediği gösterilmiştir. AG' in diyabetik böbrek dokusunu koruyucu etki mekanizması ise açık değildir. Bu çalışmada diyabetik sıçanlarda AG tedavisinin idrar albümin ve heparan sülfat (HS) atılımı ile glomerül bazal membran (GBM) anyonik yükü ve kalınlığına etkisinin incelenmesi planlanmıştır. Streptozotocin (65 mg/kg ,i.p) ile diyabet oluşturulduktan sonra dişi Wistar sıçanlar 2 gruba ayrılmıştır. Onbir sıçana (AG+DM grubu) AG bikarbonat 1g/L/gün içme suyunda verilmiş, 12 sıçan diyabetik kontrol (DK grubu ) olarak takip edilmiştir. Sekiz sağlıklı sıçan (AG+S grubu) içme suyunda 1 gr/L/gün AG alırken , 8 sağlıklı sıçan (SK grubu) sağlıklı kontrol olarak takip edilmişlerdir. Sekiz haftalık çalışma süresi sonunda idrar heparan sülfat atılımı 1.9 dimetil metilen mavisi kullanılarak spektrofotometrik metod, albümin elektroforetik yöntem ile ölçülmüştür. GBM kalınlığı ve GBM'daki anyonik yüklü moleküller alcian blue ile boyanarak sayı ve dağılım açısından elektron mikroskopisi ile değerlendirilmiştir.

Sekiz haftalık takip sonunda albüminüri düzeyi SK grubunda  $82.4 \pm 10.7$   $\mu\text{g/gün}$  iken diyabetik sıçanlarda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. ( $277.4 \pm 37.5$   $\mu\text{g/gün}$  , $p < 0.05$ ). AG uygulanan diyabetik sıçanlarda idrar albumin atılımı sağlıklı kontrollerden yüksek olmakla birlikte diyabetik kontrollere göre anlamlı olarak düşüktür ( $162.5 \pm 11.8$   $\mu\text{g/gün}$   $p < 0.05$ ). İdrar heparan sülfat atılımı SK grubunda  $956 \pm 68.7$   $\mu\text{g/gün}$  olup DK grubunda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (  $2075.5 \pm 500$   $\mu\text{g/gün}$  ,  $p < 0.01$ ). AG alan diyabetik sıçanlarda ise idrar heparan sülfat atılımı DK grubuna oranla anlamlı olarak düşük ölçülmüştür ( $1050.6 \pm 195$   $\mu\text{g/gün}$   $p < 0.01$ ). Glomerül bazal

membran kalınlıkları SK, DK, AG+DM gruplarında sırası ile  $97.3\pm4.3$  nm,  $224\pm20.1$  nm ve  $114.6\pm4.1$  nm ölçülmüştür. DK grubunun GBM kalınlığı SK ve AG+DM gruplarına oranla anlamlı olarak geniş bulunmuştur ( $p<0.05$ ). GBM anyonik yüklü partikül sayısı SK, DK, AG+DM gruplarında sırası ile  $98.6\pm1.7$ ,  $36\pm2.4$  ve  $90.6\pm0.6$  bulunmuştur. DK grubunun GBM'indeki anyonik yüklü partikül sayısının diğer gruplardan anlamlı olarak düşük olduğu gözlenmiştir. Aminoguanidin uygulaması diyabetik sıçanlarda albüminüri ve idrar heparan sülfat miktarını azaltmakta; GBM kalınlaşmasını ve anyonik yüklü moleküllerin kaybını önlemektedir. İleri glikozilasyon inhibisyonunun diyabetik böbrek dokusunu koruma mekanizmalarından birisi de GBM yük seçiciliğinin korunması olabilir.

## GİRİŞ VE AMAÇ

Diyabetik nefropati kalıcı albüminüri, erken arterial kan basıncı yüksekliği, glomerüler filtrasyon hızında düşüş, kardiovasküler morbidite ve mortalite artışı ile seyreden klinik bir sendromdur (1).

Tip 1 ve tip 2 diyabetiklerde 25 yıllık hastalık süresi sonunda kümülatif diyabetik nefropati insidansı %25-40'tır (2). Diyabetik nefropati Avrupa, Amerika Birleşik Devletleri ve Japonyada son dönem böbrek yetmezliği nedenlerinin ilk sırasını işgal etmektedir (3). Önümüzdeki 15 yıl içerisinde tip 2 diyabet vakalarının 2 kat artması beklenmektedir. Buna bağlı olarak diyabetik nefropati vakalarının da artacağı açıktır. Diyabetik nefropati patogenezinin anlaşılması ve gelişiminin engellenmesi bu açıdan önemlidir.

Diyabetik nefropatinin en erken klinik bulgusu olan mikroalbüminüri 10-15 yıl içerisinde belirgin proteinüriye dönüşür. Belirgin proteinüri ise 7-10 yıl sonunda son dönem böbrek yetmezliğine gidişin işaretidir (4).

Diabetes Control and Complication Trial (DCCT) ve United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) çalışmalarının sonuçları tip 1 ve tip 2 diyabetiklerde mikrovasküler komplikasyonların gelişiminde temel etkenin hiperglisemi olduğunu; hipergliseminin sıkı kontrolünün mikrovasküler komplikasyonları ve mikroalbüminüri oluşum ve ilerlemesini azalttığını göstermişlerdir (5,6). Hiperglisemi varlığında aktive veya akselere olan poliyol ve protein kinaz C yolu, sitokinler, serbest radikaller ,nitrik oksit, ileri glikozillenme gibi mekanizmalar diyabetik nefropati ve diğer mikrovasküler komplikasyonların gelişiminden sorumlu tutulmaktadır. Ancak bu mekanizmaların hiç biri tek başına diyabetik nefropati gelişimini açıklayamamaktadır.

Son yıllarda üzerinde en fazla durulan teori dokuların ileri glikozillenmesidir. Glukozun proteinlerin amino grupları ile girdiği non enzimatik reaksiyon, kronik hiperglisemi varlığında uzun ömürlü proteinlerin geri dönüşsüz glikozillenmesi ile sonuçlanmaktadır. Doku yapı proteinlerinin glikozillenmesinin yapı ve fonksiyonlarda patolojik değişimlere neden olduğu bilinmektedir (7).

Diyabetiklerin böbreklerinde ileri glikozilasyon ürünlerinin (Advanced glycation endproducts, AGE ) birikimi mezengial doku genişlemesi, bazal membran kalınlaşması ve albüminüri gelişimi ile doğru orantılıdır (8). Bir ileri glikozilasyon inhibitörü olan aminoguanidinin diyabetik sıçanlarda mezengial genişleme, bazal membran kalınlığı ve albüminüriyi azalttığı gösterilmiştir (9,10). Aminoguanidinin diyabetik böbrekteki olumlu etkilerinin oluşum şekli ise açık değildir.

Diyabetiklerde böbrekte glomerül bazal membran negatif yükünü oluşturan glikozaminoglikanlar albüminüri gelişimine paralel olarak azalır (11). Glikozaminoglikan kaybının diyabetik ortamda sentezinin azalması ve/veya değişikliğe uğramış bazal membrana tutunmalarında azalmaya bağlı olabileceği düşünülmektedir. Diyabetik sıçanlarda albüminüri oluşum ve ilerlemesini azaltan aminoguanidinin glomerül bazal membran negatif yük içeriğine etkisi araştırılmamıştır.

Bu çalışmada bir ileri glikozilasyon inhibitörü olan aminoguanidinin streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda albüminüri, idrar glikozaminoglikan atılımı (heparan sülfat), glomerül bazal membran kalınlığı ve glikozaminoglikan içeriğine etkisinin araştırılması planlanmıştır.

## GENEL BİLGİLER

### DIYABETİK NEFROPATİ

#### *Epidemiyoloji*

Diyabetik nefropati tip 1 ve tip 2 diyabetiklerde önemli bir mortalite ve morbidite nedenidir. Tip 1 diyabetik hastaların %35-45'inde (1,2) tip 2 diyabetik vakaların %20'sinde diyabetik nefropati gelişir (12).

Diyabetik nefropatinin yıllık insidansı diyabet tanısını izleyen ilk 5 yıldan sonra belirgin olarak artmaya başlar. Yaklaşık 15-20 yıllık diyabet süresi sonunda yıllık %3 oranı ile tepe noktasına ulaşır ve daha sonra azalır. Kırk yıllık hastalık süresi sonunda yıllık insidans %1 oranına iner (13).

Diyabetik nefropati prevalansı insidansa benzer şekilde diyabet süresi ile doğru orantılı artar. Prevalans, 20-25 yıllık hastalık süresi sonunda %21 tepe noktasına ulaşır. Kırk yıldan fazla hastalık süresi olan diyabetiklerin %10'unda diyabetik nefropati görülür (12,13).

Nefropati riski diyabet süresi ile orantılı bir artış göstermektedir. Ancak 25 yıllık hastalık süresinin sonunda nefropati riskinin azalması, tüm diyabetiklerde nefropati görülmemesi yalnızca duyarlı bir grubun risk altında olduğunu düşündürmektedir. Son dönem böbrek yetmezliği tip 1 diyabetiklerin %20-30'unda gelişirken (14), tip 2 diyabetiklerin %10-20'sinde görülür (15). Amerika Birleşik Devletlerinde kronik diyaliz hastalarının 1/3'ünü diyabetik nefropati vakaları oluşturmaktadır (16). Diyabetik nefropati ülkemizde de diyaliz vakalarının en önemli nedenidir.

Diyabetik nefropatinin en erken klinik bulgusu idrarda rutin testlerle tespit edilemeyecek kadar düşük fakat anormal miktarda albümin çıkması, diğer bir deyişle mikroalbüminüridir (17). Mikroalbüminüri 10-15 yıl içerisinde açık

proteinürkiye ilerlemektedir (18-20).Açık ve kalıcı proteinüri ise son dönem böbrek yetmezliğine (SDBY) gidişin göstergesidir (21).

SDBY belirgin proteinürisi olan tip 1 diyabetik hastaların %50'sinde 10 yıl içinde, %78'inde 18 yıl içinde gelişir (22). Proteinüri aynı zamanda mortalite riskinde de belirgin artış ile karakterizedir. Belirgin proteinürisi olan diyabetiklerde böbrek yetmezliği gelişimi 7-10 yıllık bir zaman alır.

Diyabet tanısı konulduktan 40 yıl sonra proteinürik hastaların %10'u hayatta kalırken ,bu oran proteinürisi olmayanlarda %70'e ulaşmaktadır (1,22).

Tip 2 diyabetik hastaların %20-40'ında klinik nefropati gelişir; ancak bu vakaların %20'sinde 20 yıl sonunda SDBY gelişir (23). Tip 2 diyabetik hastalarda proteinüri prevalansı diyabeti süresi ile doğru orantı göstermektedir. Beş yılın altında tanı süresi olanlarda %7-10 iken ,20-25 yıldır diyabet tanısı olanlarda %20-35'e yükselmektedir (24,25). Tip 2 diyabetiklerde proteinüri gelişimi belirgin ırksal özellik göstermektedir (26). Yirmi yıllık hastalık süresi sonunda beyaz ırkta %25 oranında proteinüri gelişirken Pima kıızılderilileri ve Meksikalılarda %50 oranına yükselebilmektedir (27,28).

Tip 2 diyabetik hastalarda proteinüri mortalite riskinde belirgin bir artışa işaret etmektedir. On yıllık takip sonunda proteinürik tip 2 hastaların %30'u sağ kalır iken, proteinürisi olmayan grupta sağ kalım %55'tir (29,26). Diyabetiklerde ölümlerin %58'i kardiovasküler nedenlerdendir, vakaların küçük bir bölümü üremi nedeni ile yaşamını yitirmektedir (29).

Diyabetiklerde kardiovasküler riski belirleyen diğer bir faktör son 5 yılda mikroalbüminüri varlığıdır (30). Mikroalbüminüri ile koroner kalp hastalığı arasındaki ilişki beyaz ırkta belirgin olmakla birlikte (31) bazı ırklarda ilişkisiz bulunmuştur (32).



## Klinik seyir

Günümüzde diyabetik nefropatinin klinik seyirinde Mogensen tarafından ileri sürülen evrelendirme sistemi yaygın olarak kabul görmektedir (33). Beş evreli bu sistemin ayrıntıları tablo 1 de özetlenmiştir.

TANIM	BELIRLEYİCİ ÖZELLİKLER	YAPISAL DEĞİŞİKLİKLER	GFH	ALBUMİN İTRAHI	KAN BASINCI	PATOFİZYOLOJİK DEĞİŞİKLİK
Hiperfonksiyon ve hipertrofi evresi	Böbreklerde büyüme ve glomerüler hiperfiltrasyon	Glomerüler hipertrofi Bazal membran ve mezangium normal	=150	Artmış olabilir ancak metabolik kontrol ile düşer	Normal	Glomerüler hacimde genişleme ve intraglomerüler basınç artışı
Sessiz dönem	İdrarda albümin itrahi normal sınırlarda	Bazal membran kalınlaşması ve Mezangial genişleme	Hiperfiltrasyon olabilir	Normal stres ile artabilir	Normal veya hafif yüksek	Yukarıdaki değişiklikler bazal membran kalınlaşması ve BM benzeri madde birikimi
Başlangıç Nefropati	Mikroalbuminüri	Evre II ve IV arası şiddette değişiklikler	=130	20-200 µg/dak	Genelde hafif yüksek	Yüksek intraglomerüler basınç ve glomerüler kapanma
Aşikar Diyabetik Nefropati	Klinik proteinüri veya albuminüri >200µg/dak	Glomerüler kapanma belirgin olarak artmış Kalan glomerüllerde hipertrofi	Giderek azalmakta	>200µg/dak	Tüm hastalarda hipertansiyon	Belirgin mezangial genişleme glomerüler kapanma ve kalan glomerüllerde hipertrofi
Üremi	Son dönem böbrek yetmezliği	Tüm glomerüllerde kapanma	<10	azalma	Hipertansiyon	Glomerüler kapanma

**Tablo 1: Diyabetik nefropatinin evreleri**

Diyabetik böbrekte, morfolojik ve klinik belirtiler ortaya çıkmadan önce hemodinamik ve fonksiyonel değişiklikler olur. Gözlemlenen ilk önemli değişiklik glomerül filtrasyon hızının (GFH) artışıdır. Tip 1 (34) ve tip 2 (35) diyabetiklerde erken dönemde GFH'nın arttığı gösterilmiştir. Erken dönemde görülen hiperfiltrasyon kan şekeri düzeyleri ile yakın ilişkilidir. GFH'ındaki yükselme tip1 (36) ve tip 2 (37) diyabetiklerde iyi kan şekeri kontrolü ile normale inebilmektedir.

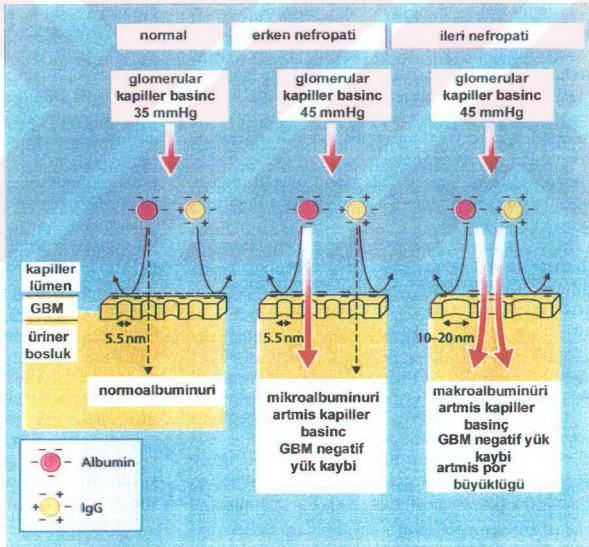
GFH'ındaki artışa renal plazma akımındaki artış da eşlik etmektedir (38).

GFH'ındaki artışa eşlik eden diğer bir bulgu da böbrek boyutlarındaki artıştır

(39). Normogliseminin sağlanması ile erken dönemde böbrek boyutlarındaki artış geriye dönebilmektedir (37,40) ancak daha geç dönemde hiperglisemi kontrolünün böbrek boyutlarına olumlu bir etkisi olduğu saptanmamıştır (41).

Erken dönemde görülen bu bulguların diyabetik nefropati gelişimindeki rolü tam olarak ortaya konmamıştır.

Hiperfiltrasyondan sonraki dönemde bazal membran kalınlaşması, glomerüler hipertrofi, mezangial genişleme ön plana çıkar (42). Bu fazı gizli nefropati diye adlandırılan mikroalbumin oluşumu izler. Sağlıklı kişilerde idrarda 1.5-20 mg/dk veya <30 mg/gün albumin atılabilir. Bu seviyede albumin atılımı normoalbuminüri olarak adlandırılır. İdrarda albumin kaçağının 20-200 mg/dk veya 30-300 mg/gün arasında olması mikroalbuminüridir (43) (Şekil 1).



**Şekil 1: Diyabette proteinüri gelişimi**

Mikroalbuminüri diyabetin erken dönemlerinde, glisemik kontrolün yetersiz olduğu durumda (44), ağır fiziksel aktivite (45) gibi nedenlerle geçici olarak

görülebilmektedir. Yerleşmiş mikroalbüminüri açık proteinüriye gidişin bir göstergesidir (46). Açık proteinüri gelişme riski mikroalbüminürisi pozitif olan tip 1 diyabetiklerde olmayanlara göre 24 kat daha yüksektir (47). Tip 2 diyabetiklerde de klinik nefropati gelişimi mikroalbüminürisi pozitif olanlarda normoalbüminürik olanlara kıyasla daha yüksek bulunmuştur (43,48).

Mikroalbüminüri prevalansı çeşitli çalışmalarda geniş bir değişkenlik göstermekte, tip 1 diyabetik hastalarda %5-37 ,tip 2 diyabetiklerde ise %8-46 oranında pozitif olarak rapor edilmektedir (13). Mikroalbüminüri insidansı diyabet tanısından sonraki ilk 3 yılda yüksektir, birinci dekadın sonunda düşer,12-15 yılda yeniden pik yapar (49,50).

Mikroalbüminüri varlığı diyabetik nefropati gelişiminin yanında diyabetiklerde mortalite ve morbidite açısından da risk faktörüdür ( 30,51)

Diyabetik nefropatinin klinik döneminin göstergesi kalıcı proteinüridir ( idrarda >300 mg/gün protein atılımı ).Kalıcı proteinüri gelişimi ile birlikte,glomerüler filtrasyon hızında son dönem böbrek yetmezliğine kadar sürecek azalma başlar ( 52,53). GFR 'deki azalma metabolik kontrolü iyi olmayan (54,55) ve hipertansif olan ( 52,55) diyabetiklerde daha hızlı gelişir.

Açık proteinürinin başlangıcını takip eden 7-10 yıl içerisinde son dönem böbrek yetmezliği gelişir. Ancak etkili bir tedavi ile bu süreç belirgin olarak uzatılabilir. Kan basıncının ve kan şekerinin iyi kontrolü, diyetle protein kısıtlaması,angiotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörlerinin kullanılması bu dönemde etkin tedavi yöntemleridir (15).

## Risk faktörleri

Nefropatisi olan tip 1 ve 2 diyabetiklerin glomerüler filtrasyon hızının (GFH) 0-24 ml/dk/yıl gibi geniş bir aralıkta azalıyor olması ve kişisel farklılıklar bazı risk faktörlerinin varlığını gündeme getirmiştir.

Tip 1 ve 2 diyabetiklerde diyabetik nefropati gelişiminde bağımsız risk faktörü kabul edilen parametreler tablo 2 de gösterilmiştir.

Tablo 2: Diyabetik nefropati gelişiminde risk faktörleri

Parametre	tip 1	Tip 2
Normoalbuminüri (ortanca değerin üzerinde)	+	+
Mikroalbuminüri	+	+
Cinsiyet	E>K	E>K
Aile öyküsü	+	+
Hipertansiyon eğilimi	+/-	?
Na/Li taşıyıcısı artışı	+/-	+/-
Etnik köken	+	+
Glisemik kontrol	+	+
Hiperfiltrasyon	+/-	?
Prorenin	+	?
Sigara	+	+
Kolesterol	+	+
Retinopati varlığı	+	+

Kan basıncı yüksekliği ve GFH'ındaki düşüş arasındaki ilişki açık bir şekilde gösterilmiştir. Sistolik kan basıncındaki yükselme glomerülde hiperfiltrasyon ve kapiller basınçta artış yolu ile hasar oluşturmaktadır (56).

Proteinürinin kendisinin sonuç olmaktan öte renal hasarın nedeni olduğu da düşünülmektedir. Tip 1 diyabetiklerde en kötü prognoz nefrotik sınırlarda proteinürisi olanlarda izlenmektedir (57). Diyabetik renal hastalığın hafiflemesi de kalıcı proteinürinin azalması ile birlikte (58).

Tip 1 diyabetiklerde kan şekerinin sıkı kontrolü ile diyabetik nefropatinin progresyonu önenebilmektedir (59). Tip 2 diyabetiklerde çalışmalar yeterli

olmamakla birlikte gliseminin sıkı kontrolünün nefropati gelişiminde anlamlı etkisi gösterilememiştir.

Hiperlipidemi kronik böbrek hastalıklarının progresyonuna glomerül kapiller duvarın harabiyetinden sonra katılır. Lipid ,lipoprotein, okside lipoproteinler mezengioma sızarlar. Bunun yanında hiperlipidemi glomerül kapiller basıncını vazodilatatör olan renal eikozonoidlerin sentezini arttırarak yükseltir (60). İstatistik analizlerde serum kolesterol düzeyleri ile diyabetik nefropati gelişimi arasında korelasyon gösterilmiştir. Ancak simvastatin tedavisinin, tip1 ve tip 2 diyabetiklerde mikroalbüminüri ve GFH üzerine olumlu etkisi gösterilememiştir (61).

Diyette protein kısıtlanması deneysel hayvan modellerinde renal hastalık gelişimini yavaşlatmaktadır. Ancak şimdiye kadar yapılan çalışmalarda diyabetik popülasyonda GFH üzerine olumlu bir etkisi gösterilememiştir (1,59). Sigara tip 1 diyabetiklerde diyabetik nefropati gelişimi için bağımsız bir risk faktörüdür (62).

Intrauterin veya erken çocukluk dönemindeki çevresel veya genetik faktörler diyabetik nefropati gelişimi ile orantılıdır. Boy kısalığı, intrauterin büyüme geriliği diabetik nefropati için risk faktörüdür (1).

Angiotensin II sentezindeki artış diyabetik nefropati başlangıç ve ilerlemesi ile ilişkilidir. Tip 2 diyabetiklerin 10 yıllık klinik takiplerinde ACE genotipi DD olan vakaların %95'inde SDBY geliştiği görülmüştür (63). Tip 1 diyabetiklerde de DD genotipine sahip kişilerde ACE inhibisyonu altında nefropati başlangıç ve seyrinin hızlı ve şiddetli olduğu gözlenmiştir (64).

## **Diyabetik böbreğin korunması**

**Primer koruma:** Risk altındaki komplike olmayan (normoalbuminürik, normotensif) diyabetiklerde uygulanan risk azaltım yöntemleri

**Sekonder Koruma:** Diyabetik nefropati gelişme riski yüksek olan (mikroalbuminüri +) uygulanan tedavi yaklaşımı

**Tersiyer koruma:** Bariz nefropatinin tedavisi olarak tanımlanır

*Primer koruma:* Komplike olmayan diyabetiklerde modifiye edilebilen risk faktörlerinin tespiti ve risk azaltılması önemlidir. Glukoz kontrolü ile ilgili çalışmaların meta-analizleri tip 1 diyabetiklerde sıkı kan şekeri kontrolünün diyabetik nefropati gelişme riskini azalttığını göstermiştir (1). DCCT çalışmasında intensif insülin tedavisi tip 1 diyabetiklerde mikroalbuminüri oluşumunu %39 azaltmıştır (5). EUCLID çalışmasında normotensif, normoalbuminürik 450 tip 1 diyabet hastası 2 yıl lizinopril verilerek takip edilmiş, çalışma sonunda mikroalbuminüri gelişimi ilaç alımı ile %12.7 az bulunmuştur (65).

*Sekonder koruma:* ACE inhibisyonu normotansif ve mikroalbuminürik tip 1 ve 2 diyabetiklerde mikroalbuminüriyi geriletebilmektedir (1,66). ACE inhibisyonu GFR'yi korumasının yanısıra mikroalbuminürinin bariz nefropatiye dönüşümünü de engellemektedir (67).

Diyabetik nefropatinin tanısı, önlenmesi ve tedavisi ile ilgili konsensus, mikroalbuminürik diyabetiklerde sıkı kan şekeri kontrolü ( HbA1c < 7.5-8%) ve ACE kullanımını önermektedir (68)

*Tersiyer koruma:* Diyabetiklerde ACE inhibisyonunun antiproteinürik etkisi kişiden kişiye değişmektedir. Bu durumun renin-angiotensin sistemindeki (RAS) genetik farklılıklardan kaynaklanıyor olması olasıdır. ACE gen

polimorfizmi, II olan nefropatik tip 1 diyabetiklerin antiproteinürik tedaviye cevapları DD fonotipinden iyidir (69). Nefropatisi olan hipertansif tip 1 diyabetiklerde agresif antihipertansif tedavi GFR' yi korumakta ve albüminüriyi azaltmaktadır (1,67).

Önemli olan risk faktörlerinin belirlenip ,modifiye edilmesidir. Diyabetik nefropatinin gidişi ilaçlar ve sıkı kan şekeri kontrolü ile değiştirilebilir.

## **GLOMERÜL BAZAL MEMBRAN**

### ***Biyokimyasal yapı***

Bazal membranlar hücre ile interstisyel doku arasındaki ekstrasellüler yapılardır. Bazal membran glomerül ve retinada endotelial ve epitelyal hücreler arasında yer almaktadır (70). Diyabetik mikroangiopati tüm bazal membranların kalınlaşması ile karakterizedir. Vasküler ve non-vasküler dokular (tükrük bezi, meme kanalları, testis, renal tubuller) hiperglisemiden etkilenir. Diyabette tüm mikrovasküler yapılar etkilenmesine rağmen yalnızca glomerül ve retinada patolojik değişiklikler tespit edilebilir.

Bazal membranların başlıca 3 işlevleri vardır . Birincisi renal tübüller , kan damarları gibi yapılara fiziksel destek sağlamak ki bu fonksiyon dokuların gerilme sonucu yırtılmalarını önler. İkinci işlevleri hücrelerin birleşmesi ve büyümelerine katılımıdır. Endotelial hücreler plastik yüzeyde çoğaldıklarında tek tabaka oluştururken ,ekstrasellüler matriks bulunan ortamda çoğaldıklarında kan damarlarına benzer yapı oluştururlar (70,71).

Bazal membranların diğer bir işlevi de glomerül bazal membranında olduğu gibi ultrafiltrasyondur. GBM plazmadaki makromoleküller için hacim ve yük seçici bariyer oluşturur. Glomerüler kapiller duvarın bu seçici özelliği

ultrafiltrattan por boyutlarından küçük hacimli moleküllerin ,albümin dahil kaçışını önler.

GBM kollagen IV, non-kollagen yapılar ve karbonhidrat moleküllerden oluşur. GBM ekstrasellüler matriksin bir parçası olup negatif yüklü moleküllerin bağlı olduğu yapısal proteini tip IV kollagen içerir. Negatif yüklü moleküller laminin, entaktin, sülfatlı proteoglikanlardır. Laminin ve entaktin epitelyal ve endotelyal hücrelerin hücre membranlarına birleşir. Sülfatlı glikozaminoglikanlar çekirdek bir proteine birleşip sülfatlı polianyonik makromoleküllerin major bölümünü oluştururlar. GBM'daki major proteoglikan ise heparan sülfattır (72,73).

Glikozaminoglikanlar GBM anyonik yükünü temsil ederler. Katyonik boyalar (ruthenium red,alcian blue gibi) veya katyonik moleküller (katyonize ferritin gibi) ile yapılan çalışmalar anyonik yüklü moleküllerin lamina rara interna ve lamina rara eksternada kafes benzeri bir düzende bulduklarını göstermiştir (74,75,76).

Normal insan GBM'da anyonik yüklü moleküllerin lamina densanın her iki tarafında 60 nm'lik intervaller ile dağıldığı gözlenmiştir. Dağılım paterni polianyonik boyalar (ruthenium red, polietilenimin) ve monokasyonik boyalar (alcian blue,safranin O) ile açığa çıkarılmıştır (77).

Normal insan böbreğinin immünogold tekniği ile incelemesinde heparan sülfat proteoglikan moleküllerinin GBM'da diffüz bir şekilde yayıldığı ,mezengiumda ise periferik alanda yoğun, orta bölümde seyrek olarak bulunduğu açığa çıkmıştır (78).

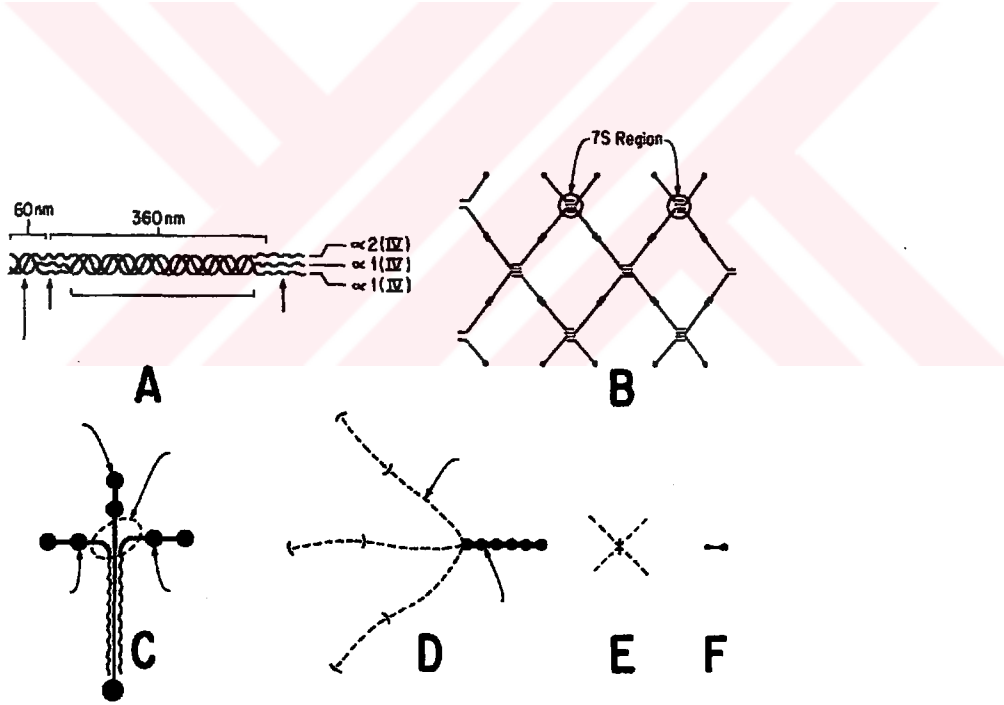
#### ***Kollagen IV:***

Bazal membrandaki kollagen tip IV kollagendir. Bu kollagen tip1,2,3,5 ten farklıdır.Kollagen molekülü polipeptid olan 3 alfa zincirinden oluşur.Tip 4



kollagen 2 adet alfa 1, ve bir adet alfa 2 zinciri içerir. Tip 4 kollagen monomeri merkezinde 360 nm uzunluğunda 3'lü heliks yapı vardır. Bu heliks her iki ucundan açılmış halde sonlanıp kollagen olmayan yapı 1 ve 2 olarak adlandırılır. NC 1 alanı karbonil ,NC 2 alanı amino molekülü ile sonlanır. NC 2 yapısının sonunda kısa bir 3'lü heliks segment vardır. Bu yapı 60 nm uzunluğunda olup, kollagenaza dirençlidir (79) (Şekil 2,A ve B) .

GBM' daki tip IV kollagen prolin, hidroksprolin ve glisin içerir. Bazal membran kollageni cilt kollageni olan tip 1 kollagenden farklıdır. GBM'nın karakteristik özelliği yarım sistein içermesidir. İmmünohistokimyasal çalışmalar GBM ve mezengiumda tip 6 kollagenin varlığını da göstermişlerdir (71).



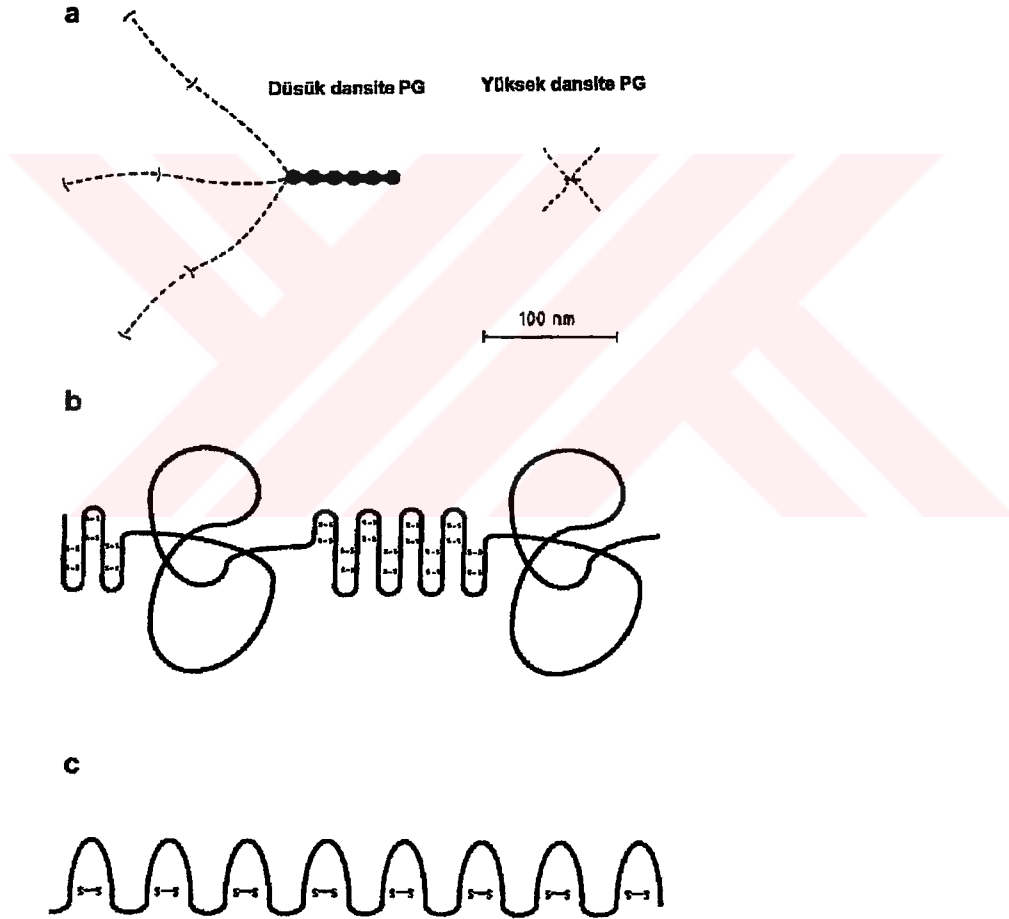
A, tip IV kollagen monomeri; B,tip IV kollagen monomer ağı ; C laminin ;D düşük dansiteli heparan sülfat; E ,yüksek dansiteli heparan sülfat; F, Nidojen

## Şekil 2: Bazal membran öğeleri

### **Kollagen olmayan yapılar:**

#### **a-Glikozaminoglikan proteoglikanlar**

Glikozaminoglikanlar (GAG) bazal membrandaki en kompleks makromoleküllerdir. En az bir GAG molekülünün kovalan olarak bağlandığı çekirdek proteinden oluşurlar. GBM'da dominant GAG molekülü heparan sülfattır. Bazal membran materyali salgılayan Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) tümörlerinde yapılan çalışmalarda heparan sülfat proteoglikanının yüksek ve düşük dansiteli 2 formu olduğu gösterilmiştir (80). GBM'da yapılan incelemeler bu veriyi desteklemektedir (81). (Şekil 3).



**Şekil 3: Bazal membran heparan sülfat proteoglikan yapıları**

Düşük-dansiteli heparan sülfat proteoglikanının moleküler kütlesi 620-720 kDa, uzunluğu 80 nm dir. Protein çekirdek 3 heparan sülfat zinciri ile sonlanır (81). GBM'dan yüksek dansiteli (130 kDa) heparan sülfat molekülü izole edilmiştir .

Küçük protein çekirdeğe 4 kısa heparan sülfat zinciri bağlanmıştır. Bu yapının düşük dansiteli proteoglikan yıkımının ürünü olabileceği ileri sürülmektedir (82). Ancak düşük ve yüksek dansiteli heparan sülfat formlarının metabolizma ve katabolizması açık değildir.

#### b-Laminin

Laminin haç benzeri ,uzun kolu 70 nm, kısa kolu 37 nm olan bir yapıdadır (Şekil 2 ,c) . Uzun kol heparin bağlayan globüler alanla sonlanır. GBM'da laminin lamina rara interna ve eksternada lokalizedir (83). Laminin'in ana fonksiyonu, tip IV kollagen ve nidojen ile birlikte,hücre adhezyonu, büyümesi, doku farklılaşmasını indüklemektedir (71,84). Laminin aynı zamanda içerdiği sialik asit nedeni ile bazal membranın yük seçici fonksiyonuna da katılır (84).

#### c-Nidojen

GBM'daki diğer bir glikoprotein nidojendir. 20 nm uzunluğunda tambur şeklinde tek zincirli bir polipeptiddir (Şekil 2,f). Nidojen ile çapraz reaksiyona giren entaktin olarak adlandırılan sülfatlı bir glikoprotein varlığı belirlenmiştir. Nidojen ve entaktinin fonksiyonları tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte lamininin fonksiyonlarını modüle ettiği düşünülmektedir (71,79).

#### d-Fibronektin

Glomerülde fibronektin mezengial matrikste bulunur. plasma ve doku formları vardır.Fibronektinin mezengial hücreler ve endotelial hücrelerde konsantre olmasının nedeni bu hücreleri birbirine ve mezengial matrikse bağlamasıdır (71,79).

### **Karbonhidrat moleküller:**

Karbonhidratlar GBM kuru ağırlığının %10-11' ini oluşturur. Glukoz , galaktoz, sialik asit, fruktoz, mannoz, glukozamin, glukuronik asit ve idorunik asitten oluşur. GBM'da şekerler 3 farklı üniteye dağılmışlardır: disakkaritler, heteropolisakkaritler ve glikozaminoglikanlar. Disakkarit üniteleri glukoz, galaktoz, heteropolisakkarit ünitesi sialik asit, fruktoz, mannoz, galaktoz ve glukozamin içerir. GAG ünitesi galaktoz, fruktoz, glukozamin, glukuronik asit ve idorunik asit barındırır ki bunların %35'i sülfatlanmıştır. GAG üniteleri disülfid bağları kullanılarak serin aracılığı ile peptidlere bağlanırlar (80,85).

### **Hipergliseminin bazal membran etkileri**

Hiperglisemi glomerül bazal membranın biyokimyasal yapısında patolojik sonuçlar yaratan değişikliklere neden olur. GBM'da kollagen IV miktarının artması ilk tespit edilen patolojik bulgudur (86). Hiperglisemi varlığında kollagen IV sentezinin arttığı deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (87). Brownlee ve Spiro alloxan ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda GBM kollagen sentezini incelemişlerdir. GBM kollagenini temsil eden aminoasitler olan prolin ve hidroksi prolinin aktivitesi ölçüldüğünde diyabetik grupta sağlıklılara oranla anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (88). Diyabette kollagen sentezindeki artışın yanısıra kollagen yıkımındaki azalmayı gösteren çalışmalar da mevcuttur (89). Kollagen yapının sentez ve yıkımında görülen değişiklikler hiperglisemik ortamda kollagenin non enzimatik glikozilasyonuna bağlanmaktadır (90). Bu veriler doğrultusunda ortaya atılan görüşe göre GBM kollageninin glikozillenmesi proteazlara dirençli hale gelmesine yol açmakta ve yeni protein depolamasını indüklemektedir (91).

GBM'da hipergliseminin etkilediği diğer bir yapı da glikozaminoglikanlardır. GBM majör GAG molekülü olan heparan sülfatın azaldığı diyabetik hayvan modellerinde ve diyabetik insanlarda gösterilmiştir (92,93). Heparan sülfat molekülleri GBM negatif yük bariyerini oluştururlar. GBM heparan sülfat miktarındaki azalma idrarda albümin atılımı ile doğru orantılıdır (94,95). Sıçanlara GBM heparan sülfatını'na karşı oluşturulan monoklonal antikolar intravenöz olarak verildiğinde selektif proteinüri oluştuğu gözlenmiştir (96). Diyabette GBM heparan sülfat miktarının azalması, sentezindeki ve/veya matriks yapıya bağlanmasındaki azalmaya bağlanmaktadır (98).

### **DIYABETİK BÖBREKTE HİSTOLOJİK BULGULAR**

Diyabetik nefropatideki patolojik değişiklikler ilk olarak Kimmelstiel ve Wilson tarafından tanımlanmıştır (98).

Diyabetik böbrekte major patolojik değişiklik glomerülde olur. Bu nedenle normal bir glomerül yapısının tanımlanması gereklidir. Normal glomerül afferent arteriolla başlayıp efferent arteriole drene olan 20-40 loop'tan oluşur . Lobul ve kapillerlerin destekleyicisi olan mezengial dokuyu hücreler ve matriks oluşturur. Loopların elektron mikroskopik incelemelerinde her birinin endotel ve visseral epitel ile çevrili bazal membrandan oluştuğu görülmüştür. Visseral epitelyal hücreler (podositler), membran boyunca uzantıları arasında porlar bırakacak şekilde foot proses adı verilen yapıları oluştururlar. Glomerüler küme Bowman kapsülü ile çevrilidir ve bu kapsül tübüler bazal membran ile devam edip üriner boşluğa bağlanır. Glomerülden plazma filtrasyonu şu sıra ile olur: kapiller ,endotel (fenestra),bazal membran ,epitel porları (99).

Diyabette tüm böbrek ve tek tek glomerül volümü artar (100).Patolojik süreç ilerledikçe böbrek boyutları da büyümeye devam eder (101). Erken dönemdeki glomerül büyümesi artan bazal membran üretimine , geç dönemdeki ise mezengial genişlemeye bağlıdır (102).

Diyabetik böbrekte en erken görülen histolojik bulgu glomerül bazal membran kalınlaşmasıdır (103). GBM kalınlaşması diyabet ortaya çıktıktan sonraki ilk 2 yıl içerisinde görülebilir ;10 yıllık hastalığı olanların çoğunda GBM kalınlaşması vardır (104). Mezengial genişleme bazal membran kalınlaşmasından sonraki aşamadır . Mezengial genişleme hücresel artıştan çok matriks birikiminden kaynaklanmaktadır (104,105).

Işık mikroskopisi değerlendirmelerinde bazal membran kalınlaşmasının yanı sıra 4 çeşit ayırt edici lezyon görülebilir. Bunlar nodüler ve diffüz interkapiller glomerüloskleroz, kapsüler drop lezyon, fibrin kap lezyonlarıdır. Diffüz glomerüloskleroz bazal membran benzeri materyalin mezengiumda diffüz birikimi ile karakterizedir. Biriken madde kapiller lümeni daraltıp kan akımını azaltabilir. Kapsüler drop lezyon Bowman kapsülünde intramüsinöz, muma benzer eozinofilik karakterdedir. Fibrin kap (eksüdatif lezyon) kapiller looplarda lümeninde yerleşmiş lipid içeren lezyondur (98,106). Bu lezyonların hiçbiri diyabet için spesifik değildir. Yerleşmiş nefropatide mezengium merkezine yerleşen PAS(+) boyanan nodüler lezyon ( Kimmelsteil-Wilson nodülü) diyabet için patognomoniktir (106). (Şekil 4 )



bc bowman kapsülünde kalınlaşma, n Kimmelstiel-Wilson nodülü,  
m diffüz mezengial kalınlaşma. x600

#### **Şekil 4: Diyabetik glomerülde nodüler glomerüloskleroz**

Glomerül bazal membranının elektron mikroskopik incelemesinde dansitelerine göre 2 farklı tabaka ayırt edilmektedir. Orta bölümde lamina densa denilen oldukça yoğun izlenen alan vardır Bu alanın her iki yanında daha az dens olan lamina lucida uzanır. Lamina lucida'nın subendotelial lokalizasyonu lamina rara interna, subepitelial lokalizasyonu lamina rara eksterna olarak adlandırılır (107).

Normal GBM'da katyonik boyalar ile tüm bazal membran boyunca diffüz dağılmış anyonik yüklü partiküllerin (primer olarak Heparan sülfat) varlığı gösterilmiştir (107-109).

Diyabetik bazal membran'da polikatonik boyalar (Ruthenium red, polietilenimin, Alcian blue ) ile yapılan elektron mikroskopik incelemelerde anyonik yüklü moleküllerin azaldığı gözlenmiştir. Chackrabarti ve ekibi GBM'ı heparan sülfat için spesifik katyonik boylarla boyayıp EM' de incelediklerinde

anyonik partiküllerin tüm bazal membran boyunca diffüz olarak azaldığını ve bazal membran kalınlığının arttığını izlemişlerdir (110). Daha sonra GBM heparan sülfat molekül kaybının idrarda albümin atılımı arasında pozitif bir korelasyon olduğu ortaya konulmuştur (111).

Diyabetik glomerülde histolojik ve fonksiyonel değişiklikler birbirine paraleldir. GBM kalınlığı artıp, anyonik yük miktarı azaldıkça, idrarda protein atılımı ve GFH' daki düşüş artmaktadır.

### **HİPERGLİSEMİYE BAĞLI RENAL HASAR MEKANİZMALARI**

Yüksek glukoz düzeylerinin böbrekte yarattığı hasarı açıklayabilen bir çok mekanizma ileri sürülmüştür. En çok üzerinde çalışılan ve olası mekanizmalar

Tablo 3' te belirtilmiştir.

---

Tablo 3: Diyabetik nefropati patogenezi, hiperglisemiye sekonder mekanizmalar

---

Non –enzimatik glikozilasyon

Anormal poliol metabolizması

Glukoz toksisitesi

Glukoza bağlı büyüme faktör artışı

Protein kinaz C aktivitesinin artışı

Sitokin üretiminin artışı

Ekstrasellüler matriks değişimi

Hücre döngüsü ve proliferasyon hızında bozulma

Bazal membran anyonik yükünün azalması

Anormal lipid metabolizması

Anormal katyon transportu

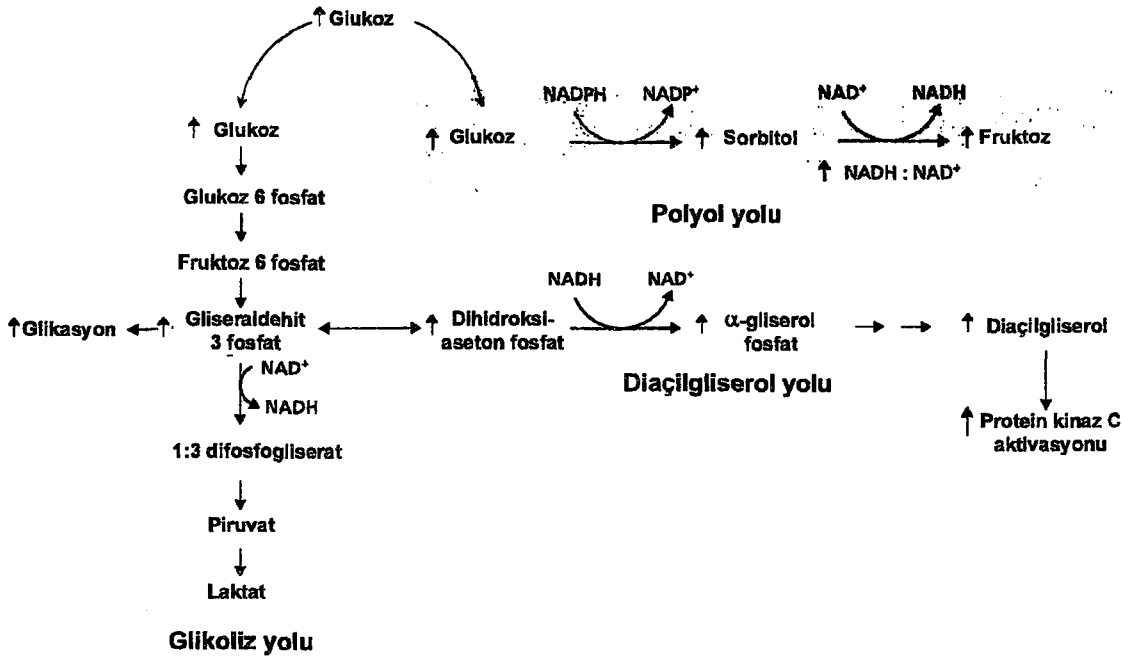
---



### ***Anormal Poliöl Metabolizması***

Glukozdan intrasellüler sorbitol yapımının artması ile aşırı artan poliyol aktivitesinin doku hasarı yaptığına ilişkin veriler güçlüdür. Kronik hiperglisemi renal tübül, glomerül, sinirler, retina gibi dokularda sorbitol birikimine neden olur. Biriken sorbitol bu dokularda hücrel osmoregülasyonu bozup intrasellüler myoinozitol miktarını azaltır (111). Hiperglisemi varlığında glukoz aldoz redüktaz enzimi ile sorbitole dönüşür.

Bu işlem sırasında NADPH-NADP ye okside olur. NAD ın NADH dönüşümüne bağlı olarak sorbitol, sorbitol dehidrogenaz enzimi ile fruktoza okside olur. Bu reaksiyonların net sonucu dokularda sorbitol birikimi , NADH/NAD oranının artışına bağlı redoks potansiyelinin değişimidir. Değişen oran gliserol aktivasyonu gibi önemli bir çok metabolik yolu etkiler (111) (Şekil 5). Hiperglisemi aynı zamanda myoinozitol miktarını azaltır. Glukoz , yarışmalı inhibisyon yolu ile hücrenin myoinoziyol alımını azaltır (112). Azalmış myoinozitol sinyal ileti sisteminde aksaklıklar doğurur. Sellüler Na/K-ATP az aktivitesi azalır. Hücre içi sodyum konsantrasyonu yükselir (113). Aldoza redüktaz inhibitörü olan sorbinilin diyabetik sıçanlarda artmış GFR'yi normale yaklaştırıp, albüminüriyi azalttığı bir ön çalışmada gösterilmiştir (114).



**Şekil 5: Poliöl ve diaçil gliserol yolları arasındaki ilişki**

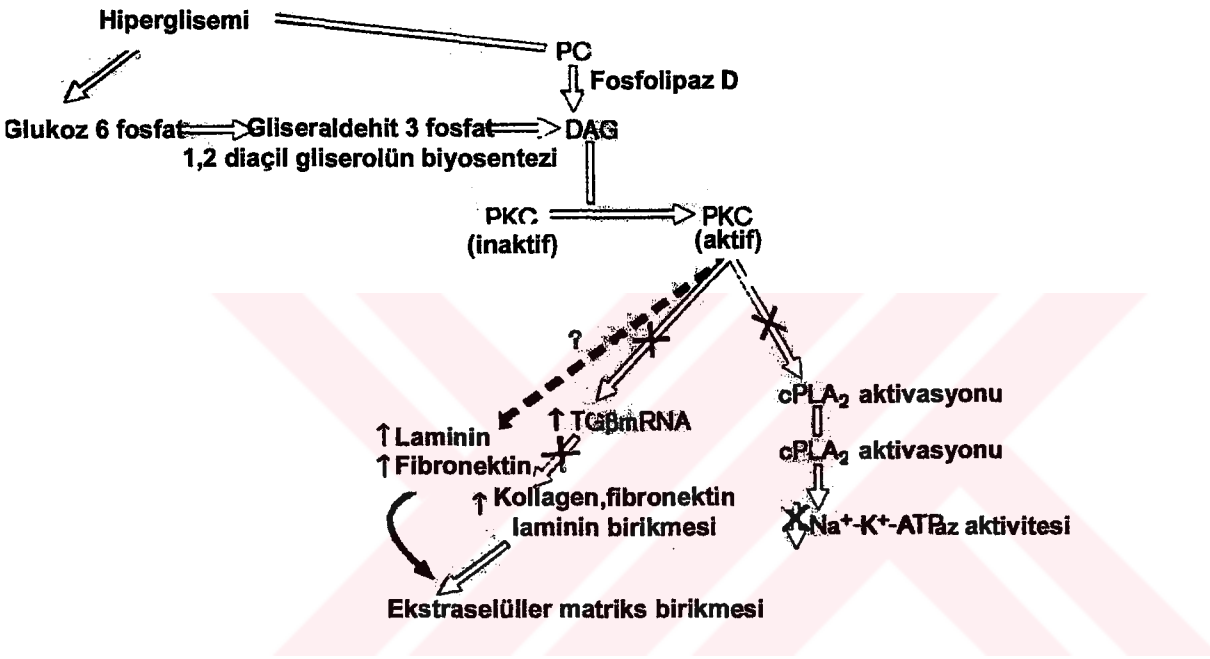
### **Glukoz toksisitesi**

Glukozun kendisi hücreler üzerinde toksik etkiye sahiptir. Lorenzi ve ekibi insan endotelial hücre kültüründe yüksek glukoz konsantrasyonlarının hücre fonksiyonlarında poliöl yolunun aktivasyonu ile açıklanamayacak değişikliklere yol açtığını göstermiştir (115). Yüksek glukoz miktarı hücre siklusu ve proliferasyonunu bozup, kollagen, laminin, fibronektin sentezinde artışa neden olabilmektedir (116). Yüksek glukoz ortamına maruz bırakılan mezengial hücrelerin daha az heparan sülfat sentezledikleri gösterilmiştir ki bu sonuç GBM'daki negatif yük kaybını destekler niteliktedir (117). Bundan başka mezengial hücreler yüksek glukozda inkübe edildiklerinde TGF- $\beta$  sentezi indüklenmektedir. TGF- $\beta$ 'nın matriks sentezini stimüle edip, yıkımını azalttığı bilinmektedir (118).

### **Protein kinaz C Aktivasyonu**

Protein kinaz C (PKC) pek çok vasküler fonksiyonu regüle eden bir enzimdir. Vasküler permeabilite, kontraktilite, sellüler proliferasyon, bazal membran sentezi, sinyal iletimi ve büyüme faktörlerinin regülasyonu ile ilişkisi

kanıtlanmıştır (119). Diyabetiklerde diaçilgliserol düzeylerinin artması nedeni ile PKC aktivasyonu olur. Diaçilgliserol birkaç mekanizma ile üretilir. Fosfatidil inositolden ve glikolitik ara ürünlerden (gliserol 3-fosfat) sentezlenebilir. Hiperglisemi, spesifik PKC izoformlarını aktive eder. Aort ve kalpte PKC B2,retinada PKC B1,B2, renal dokuda a,b,d aktive olur (120). (Şekil 6 )



**Şekil 6: Artmış PKC aktivitesinin renal matris'e etkileri**

Diyabetik böbrekte erken dönemde artan GFH'nın PKC aktivasyonu sonucu prostoglandin üretimine bağlı olduğu düşünülmektedir. PKC inhibitörlerinin mezengial hücre kültürlerinde prostoglandin yapımını inhibe etmesi bu fikri desteklemektedir (121).

PKC'nin aktivasyonu mezengial hücrelerde iNOS miktarını arttırmakta; inhibisyonu ise NO üretimini azaltmaktadır (122). Bu veriler diyabetik renal

dokuda NO artışının iNOS'un PKC tarafından aktivasyonuna bağlı olabileceğini düşündürmektedir.

Diyabetiklerde PKC aktivasyonu kontraktıl proteinlerin ekspresyonunu değiştirerek vasküler kasılmayı etkiler. PKC aktivasyonu coldesmon miktarını düşürür. Coldesmon düzeylerinin azalması acto-miyozin ATP'az inhibisyonunu azaltır ve damarlarda kontraksiyon artar. (120). Diyabette BM kalınlaşması ve PKC arasındaki ilişki de incelenmiştir. Yüksek glukoza bağlı glomerüler matriks komponentlerinin (kollagen IV, fibronektin,laminin) artışı PKC aktivasyonu ile ilişkilidir. GBM'da Kollagen IV artışı PKC inhibitörleri ile engellenebilmektedir (123).

PKC aktivasyonu ile artan diğer bir molekül de TGF  $\beta$ 'dır. Bu prototip çok fonksiyonlu sitokin matriks komponentlerinin (kollagen IV, fibronektin,laminin gibi) üretimini arttırmaktadır. PKC'nin TGF  $\beta$ 'nın aşırı ekspresyonuna yol açarak matriks üretimini arttırabileceği düşünölmektedir (120).

PKC aktivasyonunun vasküler permeabiliteye etkisi tamamiyle anlaşılabilmiş değildir. PKC aktin bağlayan proteinleri fosforilize ederek fonksiyonel yapıyı bozabilmektedir.

Hücre büyümesindeki değişim ve neovaskülerizasyon diyabetik mikrovasküler komplikasyonların temelidir. PKC sistemi büyüme faktörlerinin ekspresyonunu bozarak bu olaya katılır. Hiperglisemik ortamda miktarı artan vasküler endotelial büyüme faktörü VEGF ( vascular endothelial growth factor), PKC inhibitörleri ile inhibe olabilmektedir.(124)

Hiperglisemi nedeni ile Na/K ATP az aktivitesinin azalmasında PKC aktivasyonun etkili olduğu düşünölmektedir. PKC bu etkiyi araşidonik asit

metabolizması üzerinden göstermektedir (125). Araşidonik asit ve ürünlerinin Na/K ATP az' ı inhibe ettiği bilinmektedir.

Diaçilgliserol-protein kinaz C yolunun aktivasyonu çeşitli enzim aktiviteleri ile gen ekspresyonlarını değiştirmekte ve retina ,böbrek ve kalpte fonksiyonel değişikliklere neden olmaktadır (120,126).

### **Büyüme faktörleri:**

Sitokinler ve büyüme faktörleri diyabette gözlenen metabolik, yapısal, hemodinamik değişikliklerin bir kısmından sorumlu tutulmaktadır. Büyüme faktörlerinin diyabetik nefropati ile ilgili biyolojik fonksiyonları şunlardır:

1-Hemodinamik etki:

Renal kan akımı ve GFH artışı ( IGF-1, PDGF)

2- Hücre hipertrofisi ( TGF- $\beta$ , IGF 1)

3-Apoptozis ( TNF- $\alpha$ , TGF  $\beta$ )

4-Bazal membran ve matriks genişlemesi ( TGF  $\beta$ , IGF 1, PDGF)

5-Hipersellülarite ( PDGF, FGF )

6-İnsülin reseptör sinyal iletimi ( TNF- $\alpha$ , IGF 1)

7-Glukoz taşıyıcısı/enzim modülasyonu ( PDGF)

Büyüme faktörleri (BF) etkilerini otokrin, parakrin, klasik endokrin yoldan gerçekleştirebilirler (127). Diyabetik insan ve deney hayvanlarının renal dokularında pek çok BF'ünün mRNA'ları tespit edilmiştir. In vitro çalışmalarda hipergliseminin, TGF- $\beta$ , FGF, PDGF, VEGF gibi BF'lerinin ekspresyonunu uyardığı gösterilmiştir (128).

Diyabette BF ekspresyonunu etkileyen pek çok mekanizma tarif edilmiştir(129). Bunlar şu şekilde sıralanabilir:

İnsülin eksikliği / insülin rezistansı

Hiperglisemi / glikasyon ürünleri

Protein kinaz C aktivasyonu

Hemodinamik değişiklikler

Vazoaktif hormonlar

Protein alımı

Lipoprotein ve okside lipoproteinler

Trombosit aktivasyonu

Mononükleer hücre infiltrasyonu

GH ve IGF ile yapılan çalışmalar bu hormonların diyabette hiperfiltrasyon ve hipertrofinin potansiyel mediatörleri olduğunu ortaya çıkarmıştır. Sağlıklı insanlara GH ve IGF-1 infüzyonu yapıldığında diyabetin erken dönemine benzer hemodinamik değişiklikler izlenmiştir (130).

IGF-1 diyabetin erken döneminde renal hipertrofi ile ilişkili görülmektedir ancak geç dönemde etkili bulunmamıştır (131).

Büyüme faktörleri GBM kalınlaşması, sentez ve yıkımına da etkilidirler. Mezengial matriks, morfolojik olarak GBM'dan farklı olmasına rağmen benzer moleküllere sahiptir. Diyabetik nefropatinin erken döneminde TGF  $\beta$ 'nın renal ekspresyonu artar. Bu durum progresif matriks birikimi ile ilişkili görülmektedir. Diyabetik glomerülde matriks birikimi ileri glikozillenme ile de ilişkilidir. Sıçanlara glikozile albümin injekte edildiğinde glomerüldeki TGF  $\beta$  'nın arttığı, AGE inhibitörü aminoguanidin verilmesi ile TGF ve diğer matriks proteinlerinin azaldığı izlenmiştir (132).

TGF ve PDGF ile ilgili son çalışmalarda, renal hipertrofide önemli roller oynadıkları gösterilmiştir. TGF  $\beta$ 'yı nötralize eden antikorlar ile diyabetik renal dokuda kollagen, fibronektin ve TGF- $\beta$ 'nın mRNA ekspresyonunun azaldığı bulunmuştur (133).

Sitokinler ve büyüme faktörleri apoptotik hücre ölümü ve/veya sellüler rejenerasyonda rol almaktadırlar. Diyabetik nefropatide renal epitel kaybı olduğu bilinmesine rağmen FGF, PDGF, TNF  $\alpha$ 'nın bu olaya etkisi bilinmemektedir. TNF  $\alpha$ 'nın diyabetik sıçan glomerülünde arttığı gösterilmesine rağmen nefropati patogenezindeki yeri açık değildir(129).

### ***Serbest radikaller ve oksidatif stres***

Oksidatif stres dokularda reaktif oksijen radikallerinin artması ve buna bağlı hücre hasarıdır. Biyolojik sistemlerde serbest radikal kaynakları oksijen ve karbon atomlarıdır. Normal hücre metabolizması sırasında serbest radikaller elektron transferi reaksiyonu ile üretilir. Süperoksit ( $O^{\cdot -}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroksil iyonu ( $OH^{\cdot}$ ), singlet oksijen, hücre metabolizması sırasında üretilen reaktif oksijen ürünleridir.

Tüm biomoleküller serbest radikal atağından etkilenirler ancak en duyarlı olanlar lipidlerdir. Lipidler hücre membran yapısının temel taşlarıdır. Hücre membranındaki çokludoymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak adlandırılır. Lipid peroksidasyonu zincirleme reaksiyon başlatır ve hücrenin diğer öğelerinin de hasarına neden olur. Oksidatif stresin hücredeki hasarı membran geçirgenliğinin artması ile başlar. Membran destabilizasyonu, protein sentez inhibisyonu, enzimatik aktivitenin azalması, DNA hasarı oksidatif strese maruz kalmış hücrelerde karşılaşılan hasarlardır.

Normal biolojik sistemlerde oksidatif stresin yaratabileceği hasarlar antioksidan mekanizmalar ile önlenir. Antioksidan savunma mekanizmaları: elektron transferi ve metal iyonlarının sekestrasyonu, peroksidasyon ürünlerinin ortamdaki uzaklaştırılması (katalaz, glutatyon peroksidaz gibi enzimlerle), serbest radikal scavenger'larıdır. Serbest radikal scavengerları içinde tek enzim süperoksit dismutazdır. Süperoksit radikalini indirger. Alfa tokoferol lipid peroksidasyon zincirini bloke eder. Askorbik asit ise hücre içi ve plazmada bulunan antioksidandır (134).

Diyabet oksidatif stresin artmış olduğu bir durumdur. Oksidatif stres ile diyabetin komplikasyonları arasındaki ilişki güçlüdür. Diyabetiklerin plazmasında lipid peroksidasyon ürünleri sağlıklı kişilere oranla yüksek bulunmuştur. Diyabetik grupta retinopatisi olanlarda olmayanlara göre lipid peroksidasyon ürünlerinden tiobarbitürik asit (TBA) miktarı anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (135). Streptozotocin ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda böbrek ve retinal dokudaki lipid peroksidasyon miktarı yüksek ölçülmüştür (136). Diyabetiklerde antioksidan durum değerlendirildiğinde plazma askorbik asit düzeylerinde düşme, oksidasyon ürünü olan dehidroaskorbat düzeylerinde yükselme en göze çarpan bulgulardır (137). Ayrıca vitamin E düzeyleri insan ve deney hayvanlarında düşük bulunmuştur (138).

Hiperglisemik ortamda oksidatif stresin diğer bir sonucu da glukozun otooksidasyonudur. Fizyolojik şartlarda, glukoz diğer  $\alpha$ -hidroksialdahitler gibi oksijen molekülünü indirger, serbest radikal ve hidrojen peroksit kaynağı olabilir (139). İn vitro olarak LDL'nin glukoz ile reaksiyonunda massif peroksit üretildiği gösterilmiştir (140). Glukozun otooksidasyonu ile ortaya çıkan



serbest radikaller ve hidrojen peroksit protein ve lipid yapılarında hasara neden olur.

Reaktif oksijen ürünlerinin diğer bir kaynağı da ileri glikozilasyon son ürünleridir. Amadori ürünlerinin oksidasyonu karboksimetillizin (CML) ve pentazodin gibi ciddi doku hasarı yapan bileşikler yaratmaktadır (141).

Diyabetik plazma ve dokularda glikooksidasyon ve lipooksidasyon ürünlerinin yüksek bulunması diyabette oksidatif stresin artmış olduğu hipotezini desteklemektedir. Oksidatif strese bağlı proteinlerin kimyasal modifikasyonunun mikrovasküler hasara neden olduğu düşünülmektedir.

Oksidatif stresin diyabetik böbrekte oluşturduğu patolojik değişikliklerin en önemlisi vasküler disfonksiyondur. Diyabetik vasküler disfonksiyon oluşum faktörlerinden biri nitrik oksit (NO) üretimi ve etkisindeki değişimdir. Böbrekte NO üretimi diyabetin erken dönemlerinde artarken, ilerleyen dönemlerde reaktif oksijen radikalleri ve ileri glikozilasyonun artmasını takiben azalmaktadır (142).

NO'in diyabetik böbrek üzerine etkilerini inceleyen araştırmaların sonuçları çelişkilidir. Diyabetik sıçanlarda NO üretiminin göstergesi olan idrar  $NO_2/NO_3$  atılımı artmıştır. Artan NO üretimi diyabetin erken dönemlerinde görülen hiperfiltrasyon ile ilişkili bulunmuştur (143). Diyabetik sıçanlarda nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörleri ile albümin atılımı ve renal plazma kan akımı azaltılabilirken ,geç dönemde NOS inhibitörlerinin etkisi gözlenmemiştir (144).

Yine diyabetik sıçanlarda NOS inhibitörü olan nitro-L-arginin metil ester ( NAME) 'in albüminüriyi arttırdığı gözlenmiştir (144,145).

NO 'in diyabetik nefropati gelişiminde olası rolleri:

a) Yıkıcı

Hiperfiltrasyonu artırması

Peroksinitrik ve hidroksil radikal üretimi ile doku hasarı oluşturması

b) Koruyucu

Kapiller kan akımını artırması ve Angiotensin II antagonizmi

Trombosit agregasyon inhibisyonu

Mezengial hücre proliferasyonunun baskılanması

Albüminin endotelial hücre permeabilitesinin azaltılması

Endotel hücrelerinde süperoksit radikal üretiminin inhibisyonu

NADPH oksidaz aktivitesinin inhibisyonu ile nötrofillerde oksidatif stresin azaltılması

Bakır ile katalizlenen LDL oksidasyonunun inhibisyonu

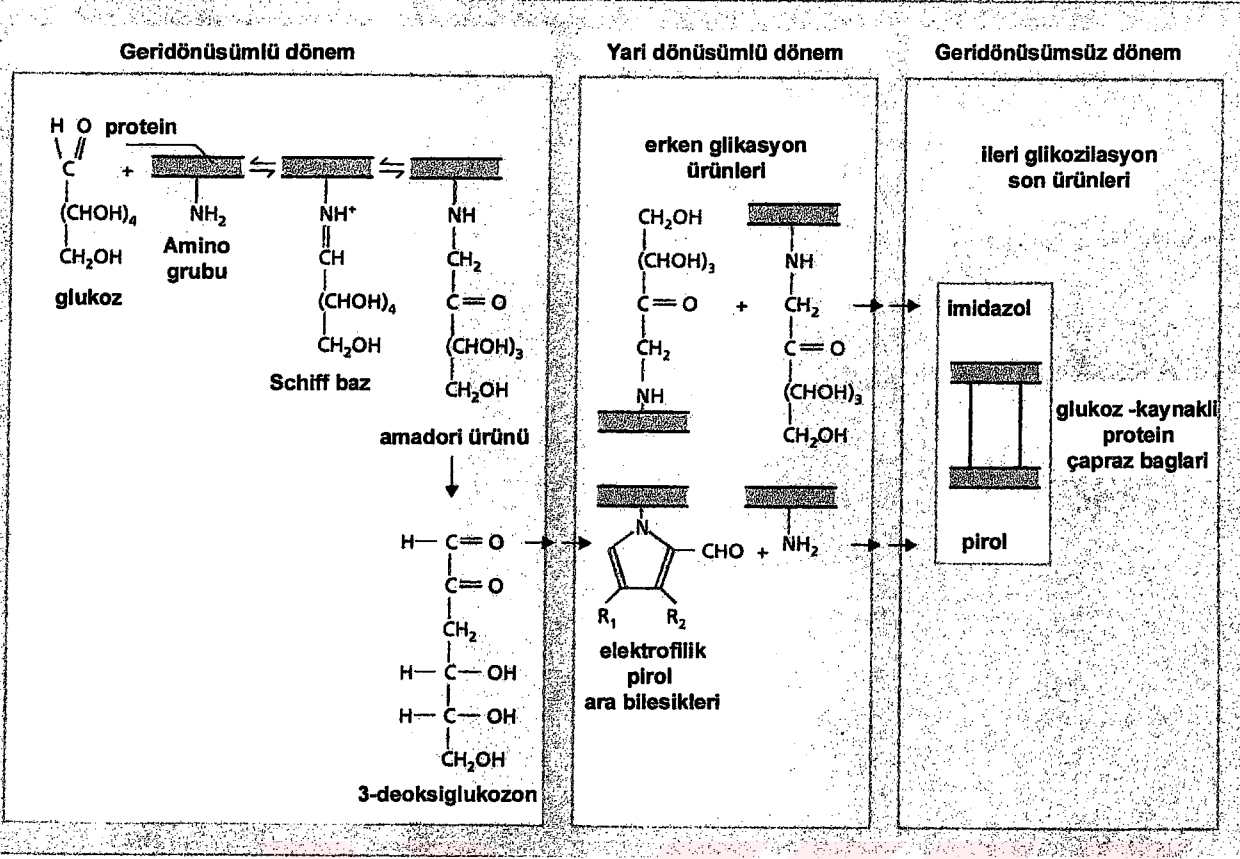
PDGF ekspresyonunun baskılanması

Mezengial hücre kültüründe TGF- $\beta$  ve kollagen sentezinin baskılanması

Eldeki verilerden elde edilen sonuç şudur: Diyabette nitrik oksit sentezi artmıştır. Bununla birlikte NO'in etkileri ,NO miktarına, ortamdaki süperoksit düzeyine ,hücredeki antioksidan mekanizmaların varlığına ve NO'in yıkıcı nitrojen ürünlerine dönüşümüne bağlıdır (146).

***Dokuların ileri glikozilasyonu***

Hipergliseminin en önemli sonuçlarından biri de dokuların glikozillenmesi, diğer bir deyişle şekerlenmesidir. Glukoz proteinlerin amino grupları ile nonenzimatik bir reaksiyona girip "Maillard Reaksiyonu" olarak adlandırılan bir seri glikozilasyon işlemini başlatır (147 ). (Şekil 7 )

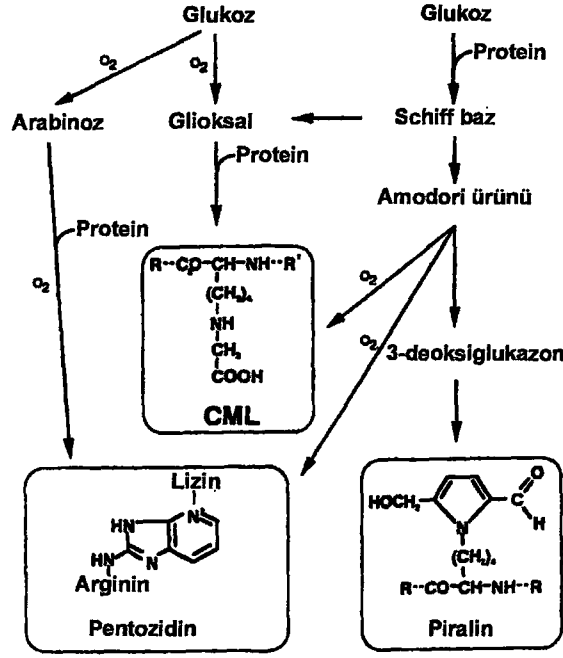


**Şekil 7 : AGE gelişiminin aşamaları**

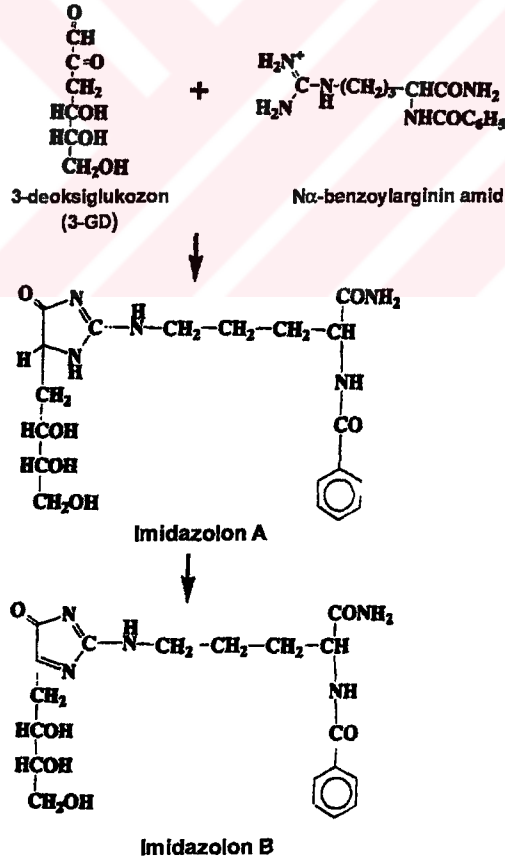
Şeker molekülünün aldehit veya keton bölümü proteinlerin amino grupları ile non-enzimatik bir reaksiyonla Schiff baz ürünlerini oluşturur. Glukoz konsantrasyonu ile doğru oranda oluşan Schiff baz ürünleri saatler içerisinde dengeye ulaşır (147,48). Schiff baz ürünleri daha sonra kendilerinden daha dayanıklı olan amadori ürünlerini (1-amino,L-deoksi-D-ketose türevleri , fruktoz-lizin, hexiol-lizin gibi ) oluştururlar. Amadori ürünlerinin dengeye ulaşması haftalar alır. Schiff baz ve amadori ürünleri erken glikozilasyon ürünleri olup geri dönüşümlüdürler . Bu ürünlerin oluşumunda en önemli faktörler ortamdaki glukoz konsantrasyonu ve dokuların hiperglisemiye maruz kaldıkları süredir. Ayrıca ortamın PH'sının >7 olması, ısı artışı ,protein konsantrasyonu erken glikozilasyon ürünlerinin oluşumunu artırır (148). Glukoz konsantrasyonu yükseldikçe erken glikozilasyon ürünlerinin oluşum

hızı ve denge düzeyleri doğru orantılı artar. Glukoz düzeyleri normale indirildiğinde erken glikozilasyon ürünlerinin düzeyi düşer. Bu ürünler kollagen gibi ömrü uzun olan yapısal proteinlerde birikmezler. Bu nedenle doku konsantrasyonları diyabetin mikrovasküler komplikasyonları ile ilişkili değildir (149). Erken glikozilasyon ürünleri zararlı olarak kabul edilmeseler de bazı hücre fonksiyonları etkileyebilirler. Damarlarda LDL uptake'ini artırabilir (150), serbest radikal oluşumunu indükleyebilirler (151).

Kronik hiperglisemi durumunda amadori ürünleri multipl dehidratasyon ve yeniden düzenlenme reaksiyonlarından geçerek ileri glikozilasyon son ürünlerini (Advanced glycation end products ,AGE) oluştururlar (114-149). Maillard reaksiyonunun bilinen en son ürünleri karboksimetillizin (CML), piraline, pentazodindir (152,153). CML ve Pentazodin bir seri glikasyon ve oksidasyon reaksiyonu ile oluşurlar. CML iki yoldan oluşur. Biri fruktozlinin oksidatif yıkımı (154) diğeri glukozun oksidasyon ürünü olan glyoxal ile protein reaksiyonudur (155). Pentazodin, lizin ve arginin kalıntıları arasındaki amadori ürünleri veya arabinoz ile sağlanan glukooksidasyon sonucu gelişir (155). Piraline ise 3-deoksiglukozon ile proteinin reaksiyonu ile oluşur(156). (Şekil 8) Glukozdan kaynaklanan AGE'ler 1-amino-1-deoksiketoz ürününün modifikasyonu ile iki farklı yoldan gelişirler .İki amadori ürününün reaksiyonu sonucu heterosiklik imidazol türevine benzer [2-furoyl-4(5)-(2-furanyl) 1-H imidazolin] yapı meydana gelir. Ürün flurosan spektrofotometrede sarı renk ile karakterizedir. Bu tip AGE enzimatik olarak hidrolize olabilen dokularda bulunur (157). Glukozdan AGE oluşumunun diğeri bir yolu amadori ürünü ile reaktif dikarbonil bileşiği taşıyan şeker yıkım ürünlerinin ( 3-deoksi-glukozon , metilglioksal gibi ) reaksiyona girmesidir (158 ) ( Şekil 9).



Şekil 8: CML ,Pentozidin,Piralin oluşum mekanizmaları



Şekil 9: İmidazolin türevi AGE nin 3-deoksiglukozon ve arginin derivativesinden oluşumu

AGE'ler yarı ömrü birkaç haftadan uzun olan proteinlerde gelişir. En yüksek AGE düzeyleri uzun ömürlü yapı proteini olan konnektif doku matriksinde ve bazal membranda bulunmuştur. Ancak son çalışmalar lipid ögeleri ve nükleik asit gibi kısa ömürlü proteinlerde AGE oluşabildiğini göstermiştir (159). AGE'ler hiperglisemi düzeltildikten sonra kaybolmazlar; proteinlerin yaşam süresince birikmeye devam ederler.

Dokuların ileri glikozillenemsi diyabetik mikrovasküler komplikasyonların gelişiminde "hiperglisemik bellek" oluşumundan sorumlu tutulmaktadır.

Hiperglisemik bellek , normoglisemi sağlandıktan sonra da mikrovasküler değişikliklerin oluşmaya ve ilerlemeye devam etmesidir. Diyabetik köpeklerde 2.5 yıl hiperglisemik tutulduktan sonra retinada değişiklik bulunmaz iken, normoglisemi sağlandıktan sonraki 2.5 yıl süresince şiddetli retinopati tespit edilmiştir (160). Bu ve benzer çalışmalar dokuların şekerle modifikasyonunun hiperglisemik bellek oluşturduğunu göstermektedir.

AGE'ler intra ve ekstrasellüler yapılarda gelişebilir. Ekstrasellüler makromoleküllerde oluşan AGE'ler daha çok glukoz kaynaklıdır. Glukoz Schiff baz gelişme hızı en düşük olan şeker molekülüdür (148). Schiff baz oluşumu için şeker molekülünün açık zincirli hali gereklidir. D-fruktoz glukozdan 7.5 kez, d-riboz 16 kez, glikolitik bir ara ürün olan gliseraldehit 3- fosfat 200 kez daha hızlı Schiff baz oluştururlar. Bu nedenle hiperglisemi varlığında hücre içindeki amino grupları, hücre dışındakilerden daha hızlı şekerlenir (161).

AGE'lerin oluşumu kompleks bir seri dehidratasyon, yeniden şekillenme işlemi gerektirir ve gelişme süreçleri tam olarak bilinmemektedir. AGE oluşumunun glukoz konsantrasyonu ile ilişkisi doğru orantılı değildir. Oluşum hızı, ortamdaki glikolize amino grupları ile ilişkili bulunmuştur. Glukoz

konsantrasyonlarında orta derecede bir yükselme AGE birikimini aşırı derecede arttırabilir (162).

AGE'ler makromoleküllere geri dönüşümsüz olarak bağlandıkları için AGE miktarı hipergliseminin düzelmesi ile düşmez. Bunun yerine AGE'ler diyabetik dokularda değişen hızlarda birikmeye devam ederler (163).

AGE'lere karşı geliştirilmiş antikolar ile yapılan çalışmalarda immünolojik olarak sık rastlanan AGE'lerin farklı şeker ve protein kombinasyonu olduğu gösterilmiştir (164). Floresan ve immünolojik AGE ölçümleri ,diyabetiklerde glukozdan kaynaklanan AGE'lerin dominant olduğunu göstermiştir (165).

Diyabetik insan dokularında AGE ürünlerinin doku harabiyetine ilişkin kanıtları direkt olmamakla birlikte glikasyon ürünlerinin miktarı diyabet komplikasyonlarının şiddeti ve yayılımı ile ilişkili bulunmuştur (166).

AGE ürünlerinin diyabetik dokuda 3 mekanizma ile hasar oluşturdukları düşünülmektedir:

- 1) AGE'ler matriks proteinleri ile birleşerek ekstrasellüler matriksin yapı ve fonksiyonlarını bozabilirler
- 2) Çeşitli hücrelerde AGE reseptörleri yoluyla sitokin, büyüme faktörleri , serbest radikal aktivitelerini etkileyebilirler.
- 3) AGE'ler doğrudan enzimler ve intrasellüler anahtar proteinlerin fonksiyonlarını değiştirebilirler.

#### **1-AGE'lerin ekstrasellüler matriks proteinlerine bağlanması:**

**a) Ekstravaze plazma proteinlerinin AGE'ler aracılığı ile matrikse bağlanması:**

Diyabetik damarlarda geçirgenliğin artması nedeni ile sızan plazma proteinleri hücrelerdeki matriks proteinlerine AGE'ler aracılığı ile bağlanırlar. Kısa ömürlü LDL, IgG gibi proteinler glikozillenip bağlandıkları matriks yapıda yeni AGE

oluşumunun substratı olurlar (167). In vitro şartlarda LDL ,ileri glikozilasyon ile modifiye olmuş kollagene kovalan olarak, ortamdaki AGE miktarı ile doğru orantılı bir şekilde bağlanır (168). Bu bulgu LDL'nin AGE'lere spesifik olarak bağlandığını düşündürmektedir. Hiperglisemik seyreden diyabetiklerde LDL düzeyi normal sınırlarda olsa bile devam eden aterosklerotik olayı açıklamaktadır. Bunun yanında lipid ve apolipoproteinlerin glikozillenmesi ateroskleroz gelişimini hızlandırmaktadır (169).

**b) Matriks komponentlerinin AGE'ler aracılığı ile birbirine bağlanması:** Yaşam süresi uzun olan matriks proteinleri AGE'lerin varlığında kovalan bağlar ile birbirlerine bağlanırlar (167). Fizyolojik koşullarda NH<sub>2</sub> ve COOH terminallerinden bağlantı yapabilen kollagen molekülü, AGE ile modifiye olduğunda tüm molekül boyunca bağlantı yapabilecek hale gelir. Diyabetik sıçanların aortik kollageninde bağlantı yerleri incelendiğinde diyabetik olmayanlara oranla 3 kat daha fazla olduğu gözlenmiştir (170).

Glikozile olmuş matriks ögeleri diyabetik dokularda birikirler. Bunun nedeni AGE ile değişikliğe uğramış yapıların enzimatik yıkıma daha dayanıklı olmalarıdır. Diyabetik bazal membran pepsin, papain, tripsin ve proteaz sindirimine dirençli bulunmuştur (171). Damar duvarlarında ileri glikozilasyon ile değişikliğe uğramış matriks proteinlerinin birikimi lümen daralması ile sonuçlanır.

Matriks proteinlerinin AGE ile modifikasyonu bazal membran bütünlüğünü ve yapısını bozar. Bazal membranın yapı bütünlüğü tip IV kollagen, laminin, heparan sülfat proteoglikan ve entaktin'in geometrik bileşimine bağlıdır. AGE modifikasyonu ile geometrik yapı bütünlüğü kaybolur (172). Laminin molekülünün ileri glikozillenmesi tip IV kollagen ve heparan sülfat



proteoglikan'ın bu moleküle bağlanmasını azaltmaktadır (173). Uzun süreli diyabette GBM'da heparan sülfat miktarının azlığı, bazal membran bağlantısının azalmasına atfedilmektedir (174). HSPG matriks üretimini inhibe eder . HSPG yokluğu bazal membran matriks proteinlerinin üretiminde uyarıya yol açar (175)

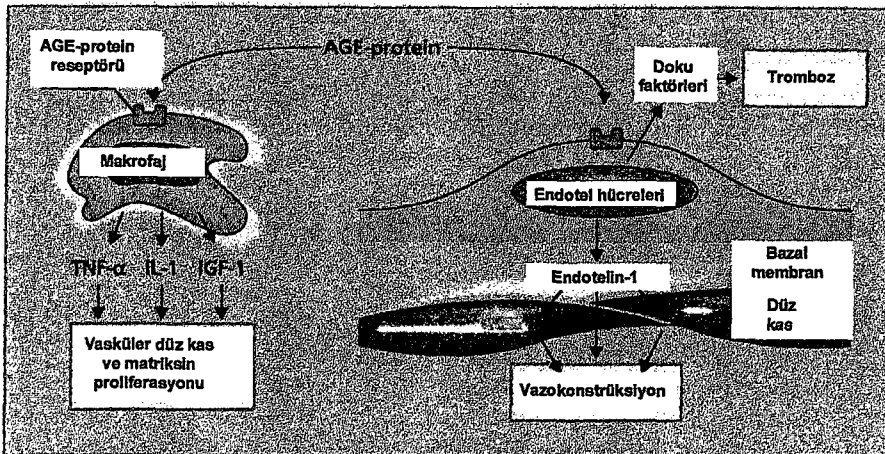
c) AGE oluşumu matriks ve komşu hücreler arasındaki ilişkiyi de etkiler . Örneğin kollagen IV molekülünü hücreye bağlayan alanın glikozillenmesi endotelial hücre adhezyonunu azaltır (176). Matrikste biriken AGE'ler vazodilatatör ve antiproliferatif faktörleri bloke ederek vasküler oklüzyonu arttırabilirler.

Nitrik oksit (NO) endotelden salgılanan ve vasküler düz kas hücrelerinde vazodilatasyon yapan bir maddedir; aynı zamanda vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu inhibe eder. AGE'ler NO'nin etkilerini doza bağlı bir şekilde değiştirirler. Diyabetik sıçanlarda NO'nin vazodilatasyon yanıtı bozulmuştur. Bu defektin şiddeti biriken AGE'lerin miktarı ile ilişkilidir. AGE oluşumunu bloke eden ilaçlar NO'nin bu defektif yanıtını önleyebilmektedir (177). NO'nin vasküler düz kas hücrelerindeki sitostatik etkisinin AGE'ler ile bloke edildiği de gösterilmiştir (178). Büyük arterlerde AGE oluşumu elastisiteyi azaltıp sıvı filtrasyonunu arttırmaktadır (179).

## **2- AGE' lerin sellüler reseptörler yoluyla etkileri:**

AGE'leri spesifik olarak tanıyıp bağlayan bir reseptörün varlığı ilk olarak makrofaj membranında gösterilmiştir (180). Daha sonra endotelial, glomerül mezengial hücrelerinde de AGE reseptör varlığı tespit edilmiştir. Bir makrofaj hücrelerinin yüzeyinde  $1.5 \times 10^5$  reseptör bulunmakta ve bağlanma katsayısı (Ka)  $1.75 \times 10^7 \text{ m}^{-1}$  dir . Bu reseptör yalnızca AGE' lere duyarlı olup amadori

ürünlerini tanınamamaktadır (181). Şu ana kadar en az 6 adet AGE bağlayan protein tespit edilmiştir. Biri RAGE olarak bilinen immunoglobulin ailesine ait bir reseptördür. Diğer bir AGE bağlayan protein, laktoferrin benzeri bir moleküldür ve RAGE ile kovalan ilişkilidir. OST 40, 80 K-H, Galektin 3 ve antibakterial protein lizozim bilinen AGE reseptörleridir (182). AGE ile modifiye proteinler makrofajlar üzerindeki reseptörlerine bağlandıklarında IL-1, IGF-1, TNF- $\alpha$  gibi monokinleri açığa çıkarırlar. Bu monokinlerin lokal konsantrasyonları glomerüler matriks sentezi, vasküler düz kas hücre proliferasyonu, tip IV kollagen sentezini stimüle edecek düzeye ulaşır (183,184). Monokinler aynı zamanda proteoglikan yıkımını da stimüle ederler. Buldukları ortamda mezenkimal hücrelerden kollagenaz ve proteaz'ların sentez ve salınımını uyararak kendi yıkımlarını da başlatmış olurlar (185). Endotelial hücrelerde AGE reseptörleri uyarıldığı zaman tromboz ve vazokonstriksiyon ile sonuçlanan mekanizmalar harekete geçerler (Şekil 10). Trombomodulin aktivitesi azalırken koagülasyon faktörleri IX ve X artar. Buna endotelin-1 üretimindeki artış eşlik eder. Glomerül mezengial hücrelerindeki AGE reseptörleri uyarıldığında PDGF'e bağlı olarak tip IV kollagen, laminin ve heparan sülfat üretiminin arttığı gösterilmiştir (186).



**Şekil 10: Makrofaj ve epitel hücrelerindeki spesifik AGE reseptörlerinin diyabetik damarlarda oluşturduğu patolojik değişiklikler**

### **3-AGE' lerin intrasellüler etkileri**

Ekstrasellüler moleküllerdeki AGE'ler glukoz kaynaklıdır. Intrasellüler AGE'ler daha çok glukoz dışı şekerlerden kaynaklanırlar. Fruktoz, riboz, gliseraldehitfosfat gibi intrasellüler şekerler glukozdan daha hızlı AGE oluştururlar (187). Intrasellüler şekerler DNA nükleotidlerinin amino grupları ile reaksiyona girerler . Nükleotidlerde AGE oluşumu diğer proteinlerdeki AGE oluşumuna benzerdir. Prokaryotik hücrelerin DNA'sında AGE oluşumu mutasyonlar (delesyon, insersiyon) ve gen ekspresyonunda değişimler yaratır (188). Hiperglisemi ökaryotik hücrelerin DNA'sını da etkiler. İnsan endotel hücreleri 30 mmol/L glukoz ile inkübe edildiklerinde tek heliks DNA da kopmalar ve DNA sentezinde aksaklıklar tespit edilmiştir (189).

Intrasellüler AGE'ler protein sentezini de etkilerler. Endotel hücreleri yüksek glukozlu ortamda 1 hafta inkübe edildiklerinde intrasellüler AGE miktarı 13.8 kat, mitojenik aktivite %70 artarken , AGE ile modifiye olan fibroblast growth faktör 6.1 kat artar (190). Intrasellüler proteinlerin AGE ile modifikasyonu vasküler ve nöronal disfonksiyon ile sonuçlanır.

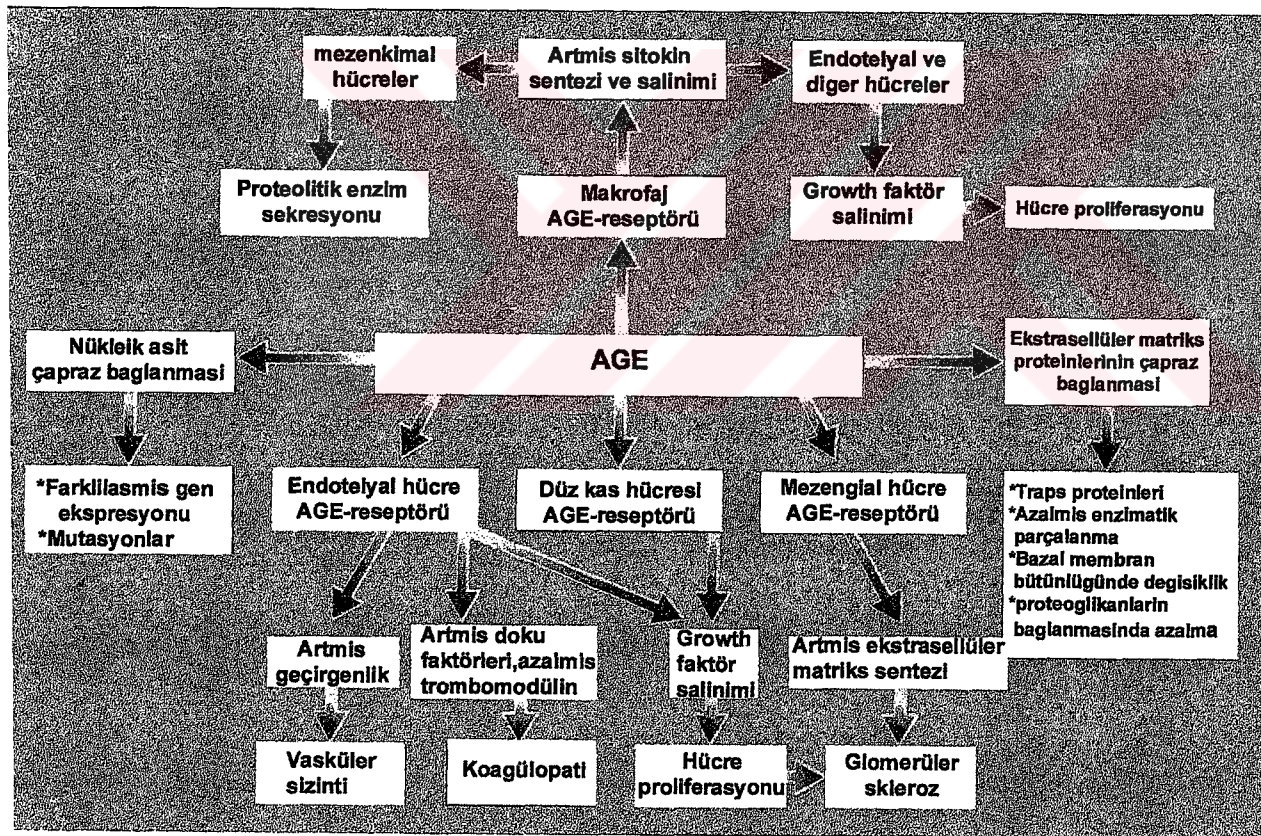
### **AGE dönüşümü**

AGE'lerin primer yıkım mekanizması AGE-reseptör sistemidir. AGE ile modifiye proteinlerin yıkılması sonucu küçük ve çözülebilen AGE-peptidler dolaşıma verilir ve böbrekler tarafından atılır (163). Dolaşımdaki AGE peptid düzeylerinin renal fonksiyon ile korelasyonu bu teoriyi desteklemektedir (163). Normal kişilerde AGE-peptid klirensi 0.72 ml/dak dır. Böbrek fonksiyonları normal olan diyabetiklerde de klirens hızı aynıdır. Böbrek fonksiyonları bozulması ile birlikte dolaşımdaki AGE düzeyi artar. Hemodiyaliz ve periton diyalizi AGE peptidlerinin eliminasyonunda etkili değildir. Son

dönem böbrek yetmezliğinde AGE eliminasyonunda en etkili yöntem renal transplantasyondur (191). Hemodiyaliz sırasında AGE klirensi 203,6ml/dak olmakla birlikte hemodiyaliz sonrasında sıfırlanır takiben dolaşımdaki AGE-peptid düzeyinde artış olur (192). Üremik kişilerde karbonhidrat ve lipidlerin oksidasyonu sinerjik olarak aterosklerotik olayların yaygınlaşmasına neden olur (193). Atılmayan AGE peptidler (AGE-LDL,AGE-B2 mikroglobülin gibi) tüm duyarlı dokulardaki hasarı artırırlar (194).

### AGE oluşumunun diyabetik nefropati gelişimindeki yeri:

Şekil 11'de AGE oluşumunun diyabetik nefropati gelişimindeki olası mekanizmaları özetlenmiştir.



Şekil 11: Diyabetik nefropati gelişiminde AGE'ye bağlı mekanizmalar

Böbrek dokusunda AGE birikimi yaş, renal fonksiyon ve plazma glukoz düzeyleri ile ilişkilidir (195). Diyabetik nefropatinin erken döneminde plazma glukoz konsantrasyonlarının artması AGE oluşumunu artırıp renal matrikste

birikimini tetikler. Renal fonksiyon bozulduğunda ise AGE birikimi daha da artar ve renal lezyonların daha hızlı gelişimine neden olur. Geç dönemde sıkı glukoz kontrolünün AGE birikimini önlemede faydası yoktur (196). Bu nedenle renal fonksiyonlar bozulmadan önceki kan şekeri normalizasyonu önemlidir.

Diyabetik böbrekte AGE'ler genişlemiş mezengial alan, nodüler lezyon ve arteriol duvarında birikir (197,198). Niawa ve ekibi diyabetik hastaların postmortem böbrek dokusu ve aorta örneklerinde bir ileri glikozilasyon ürünü olan imidazolinin lokalizasyonunu incelemişlerdir. İmidazolin'i aterosklerotik lezyonlar ve böbrekte mezengium ve nodüler lezyonlarda tespit etmişlerdir (199). Schleicher ve ekibi CML'in diyabetik dokudaki lokalizasyonunu incelediklerinde cilt kollajeni, arteriol duvarı ve glomerülde bulunduğunu gözlemlediler. Ayrıca CML ile HbA1c düzeyleri arasında zayıf bir korelasyon tespit ettiler (200).

Uzun süreli tip 1 diyabetiklerde komplikasyonlar ile glikozillenmiş kollagen miktarı arasındaki ilişkiyi Monier ve ekibi araştırmıştır. Bu hastaların cilt biopsi örneklerinde retinopati ve nefropati şiddeti ile AGE ölçümleri arasında güçlü bir korelasyon bulmuşlardır (201).

Sakai ve ekibi diyabetik nefropatisi olan kişilerin böbrek biopsi örneklerinde AGE ve amadori lokalizasyonları ile sitokin ve bazı enzimlerin mRNA ekspresyonlarını incelemişlerdir (202). Anti AGE antikolları ile AGE'lerin dominant olarak mezengial alanda ve doku harabiyeti ile doğru orantılı miktarda toplandıkları izlenmiştir. Ayrıca glomerül kapillerlerinde ,tübüler hücrede mezengiumdan daha az olmak üzere AGE pozitifliği bulunmuştur. Bir amadori ürünü olan Hexiol-lisin antikollarının dağılımının da AGE'lere paralel olduğu gözlenmiştir. Aynı dokuda TGF B1 ve matriks proteinaz-1' in doku

inhibitörü (TIMP-1) mRNA ekspresyonları incelendiğinde, bu parametrelerin orta derecede doku hasarı olan biopsi örneklerinde artmış, doku hasarı ileri olan örneklerde ise azalmış olduğu görülmüştür. Bu veri, AGE'lerin enzimlerin yapısını bozarak enzimatik aktiviteyi azalttığı şeklinde yorumlanmıştır (202)

AGE'lerin diyabetik nefropatinin karakteristik lezyonları olan genişlemiş matriks ve nodüler lezyonlarda bulunması AGE birikimi ile diyabetik nefropati gelişimi arasında güçlü bir ilişkiye işaret etmektedir.

Diyabetik böbrekte AGE birikimi ise nefropatinin şiddeti ile orantılı görünmektedir.

AGE'ler ekstrasellüler matriks ve bazal membranın yapısını ve fonksiyonunu değiştirirler. AGE'ler mezengial hücrelerden AGE reseptörleri yolu ile sitokin ve büyüme faktörü ( IL-1, IGF-1 ) salınımını arttırarak mezengial hücre proliferasyonunu ve kollagen IV sentezini uyarırlar (203). Tip 1 diyabetiklerde renal doku AGE düzeyleri ile idrar albümin atılımı arasında doğru orantı bulunduğu gösterilmiştir (204).

Soulis-Liarota streptozotocin ile diyabet oluşturulmuş sıçan böbreklerinde AGE miktarının arttığını, buna mezengial genişleme ,bazal membran kalınlaşması ve albüminürinin eşlik ettiğini izlemiştir. Diyabetik sıçanlara, ileri glikozilasyon inhibitörü olan aminoguanidin verildiğinde renal AGE miktarı, albüminüri ve mezengial genişlemede azalma saptanmıştır (205).

Lee ve ekibi STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda AGE'lerin 4 kat, albüminürinin 5 kat, glomerüler volumün %50, TGF  $\beta$  mRNA'nın 2.5 kat ve tip IV kollagen ile laminin proteinlerinin sağlıklı sıçanlara oranla artmış olduğunu göstermişlerdir. Aminoguanidin tedavisi ile diyabetik sıçanlarda albüminüri, glomerüler hacim,TGF- $\beta$  mRNA ekspresyonu, kollagen tip IV , laminin

miktarlarında hiperglisemi düzelmeksizin belirgin bir azalma olduğunu bulmuşlardır (206).

Bu veriler diyabette hiperglisemiye bağlı renal doku hasarının büyük ölçüde endojen AGE oluşumundan kaynaklandığını düşündürmektedir.

Ancak sağlıklı deney hayvanlarında yapılan deneyler AGE'lerin hiperglisemiden bağımsız olarak da doku hasarı oluşturabildiklerini açığa çıkarmıştır. Diyabetik olmayan sıçanlar uzun süre AGE'ye maruz bırakıldığında glomerüler hipertrofi, bazal membran kalınlaşması ve mezengial matriks genişlemesi ve buna eşlik eden aşikar albüminüri gelişmektedir . Aminoguanidin tedavisi ile yapısal ve fonksiyonel defektler sınırlanmaktadır ( 207)

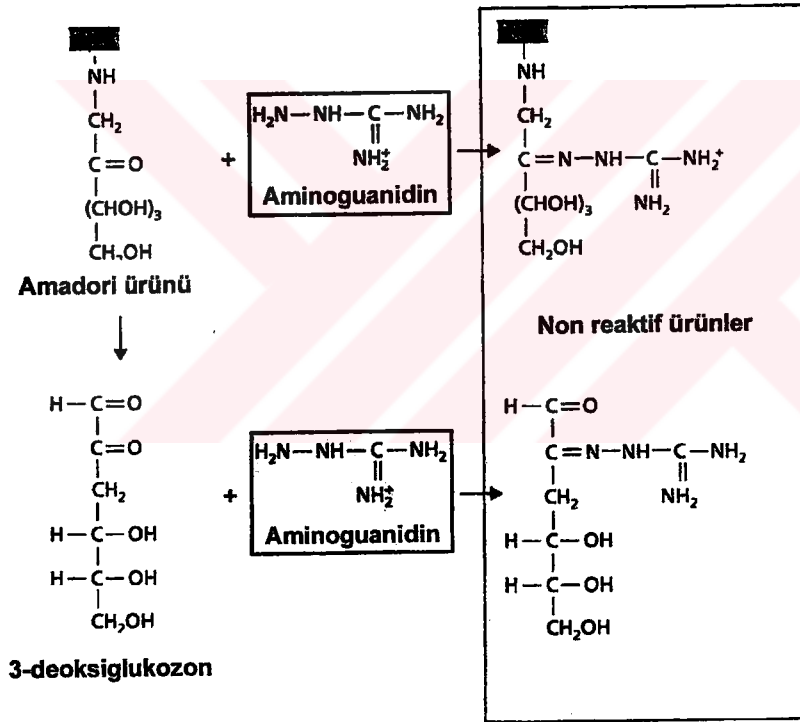
Sağlıklı sıçanlara ileri glikozile edilmiş albümin i.v verildiğinde diyabetteki benzer şekilde glomerüler volumün arttığı laminin B1, tip IV kollagen mRNA ekspresyonunun arttığı; aminoguanidin uygulaması ile bu patolojik bulguların kaybolduğu gözlenmiştir. Bu veri AGE'lere karşı glomerüler cevabın spesifik olduğunu düşündürmektedir (208).

### ***AGE oluşumunun inhibisyonu***

AGE oluşumu ve sonuçlarının diyabetik komplikasyon gelişimindeki rolü açıkça ortaya konulduktan sonra AGE oluşumunun farmakolojik olarak inhibisyonu gündemdedir.

Bir nükleofilik hidralazin derivesi olan aminoguanidin (AG) AGE inhibitörlerinin prototipidir. AG, AGE öncülleri olan 3-deoksiglukozon, metilglioksal ve glikoaldehitin reaktif karbonil gruplarını selektif olarak bloke eder. AGE öncüllerini non reaktif hale getirerek AGE gelişimini engeller (209)(Şekil 12 ).

AG post amadori ürün inhibitörü olup, erken glikozilasyon ürünlerinin oluşumunu engellemez (210,211). Deney hayvanlarında toksik olmadığı gösterilmiştir (rodentlerde LD 50=1800 mg/kg). Enzimatik yolla oluşmuş kollagen bağlantılarına etkisi yoktur (212). In vitro şartlarda albümin glukoz ile enkübe edildiğinde 4 günde AGE ürünleri oluşmaktadır. Ortama AG eklendiğinde AGE oluşumu %90 azalmakta ancak amadori ürün miktarı değişmemektedir (209).



**Şekil 12: Aminoguanidinin etki mekanizması**

AG'in diyabetik doku hasarı üzerindeki etkileri deney hayvanlarında retina, sinir, arter, böbrek dokularında çalışılmıştır. Diyabetik sıçanların AG tedavisi altında retinaları incelendiğinde diyabetik kontrol grubuna oranla asellüler kapiller hücre miktarında 20 kat ,mikroanevrizma gelişiminde %80 ve perisit



kaybında belirgin azalma tespit edilmiştir (213). AG'in diyabetik retinopatisi olan sıçanlara verildiğinde retinopati ilerlemesini yavaşlattığı izlenmiştir (214). AG'in nöronlara etkileri de sıçan modellerinde araştırılmıştır. Streptozotocin ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda AG tedavisi ile 2 aylık izlem sonunda motor sinir ileti hızlarında progressif bir artış görülmüştür. Ancak siyatik sinirlerin histolojik değerlendirmesi diyabetik kontrol gurubunkinden farklı bulunmamıştır (215). Kihara ve ekibi AG alan diyabetik sıçanlarda, sinir kan akımı ve ileti hızının 8 hafta sonunda normale yaklaştığını gözlemlemişlerdir (216). Bir başka çalışmada AG'in aksonal atrofi, miyelin kaybı ve paranodal demiyelinizasyonu azalttığı gösterilmiştir (217).

AG'in arterial yapıya etkisi vasküler elastisiteyi arttırmak ve sıvı permeabilitesini azaltmak yönünde olmaktadır. Diyabetik sıçanlara AG verilmesi ile diyabetik kontrol grubuna oranla karotid statik komplansta artış, arterial nabız basıncında azalma, sol ventrikül output'u ve karotis duvarından sıvı filtrasyonunda azalma bulunmuştur. Bu veriler sol ventrikül performansında iyileşme ve vasküler permeabilitenin düzelmesi olarak yorumlanmıştır (218). Rumble ve ekibi deneysel diyabette AG'in mezenterik vasküler hipertrofiye etkisini incelemişlerdir. Diyabetik sıçanlarda kontrol grubuna oranla TGF B1 ve kollagen IV  $\alpha$ 1 gen ekspresyonunda >%100 artma bulunurken AG alan diyabetik grupta bu parametrelerde sağlıklı gruba yakın değerler elde edilmiştir. İmmünohistokimya incelemelerinde kollagen IV ve AGE boyamaları sağlıklı gruba benzer boyanma izlenmiştir (219).

AG'in renal dokuya etkisi diğer organlardan daha geniş incelenmiştir. AG'in diyabetik böbrekteki etkileri albüminüri , mezengial genişleme ve bazal membran kalınlığını azaltmasıdır. AG diyabetik böbrekte AGE bağlanmasını

engeller ve birikimini azaltır (219). Edelstein ve ekibi hipertansif diyabetik sıçanlarda AG'in kan basıncı ve hiperglisemiden bağımsız olarak idrar albümin atılımını diyabetik kontrol grubuna göre %75 azalttığını göstermişlerdir(9). AG'in GBM kalınlığına etkisi ilk olarak Eileen ve Good tarafından araştırılmıştır. Dokuz ay AG alan diyabetik sıçanlarda GBM kalınlığı ve böbrek kütlelerinin diyabetik kontrollere oranla azaldığını bulmuşlardır (10). Soulis ve ekibi diyabetik sıçanları 32 hafta AG tedavisi ile takip ettikten sonra böbrek ve aorta örneklerinde kollagen glikozillenmesinde azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Bunun yanısıra albüminüri ve fraksiyonel mezengial volümde belirgin azalma bulunmuş fakat GBM kalınlığına olumlu bir etki gözlenmemiştir (205). Aynı ekip daha sonra aynı diyabetik nefropatide AG' in renoprotektif etkisinin tedavi süresi ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (220). AG, AGE inhibitörü olmasının yanısıra ,nitrik oksit sentetaz inhibitörüdür (221). AG'in diyabetik böbrekteki renoprotektif etkileri ile nitrik oksit metabolizması arasındaki ilişki açık değildir ve halen araştırılmaktadır. AG alan diyabetik sıçanların idrar nitrit/nitrat ve albümin atılımı diyabetik kontrollere göre anlamlı olarak azalmaktadır. Ancak glomerülde iNOS boyanması, diğer NOS inhibitörlerini (L-NAME, Metilguanidin) alan diyabetik sıçanlardan farklı bulunmamıştır. Bu veriler AG'in renoprotektif etkilerini NOS inhibisyonundan çok AGE oluşumunu engelleyerek sağladığı yönündedir (222). Sugimoto ve ekibi diyabetik nefropati gelişiminde CML-Sitokin-NO aksının etkili olabileceğini ileri sürmektedirler. Bu ekip diyabetik sıçanlarda iNOS, TNF- $\alpha$ , ve nitrit/nitrat gen ekspresyon artışı gösterdiler. AG tedavisi ile TNF- $\alpha$ , iNOS ekspresyonu azalmakta, buna intraglomerüler nitrit/nitrat üretiminde ve albüminüride azalma eşlik etmektedir (223).

Tüm bu çalışmaların işaret ettiği gibi, bir AGE inhibitörü olan ve deney hayvanlarında toksik olmadığı gösterilen AG diyabetik mikrovasküler komplikasyonların önlenmesinde umut vaad etmektedir. Ancak AG'in diyabetik insan dokuları üzerine etkileri bilinmemekte ve faz 3 (Ticari ismi "Pimagedine", Alteon Inc.) çalışmaları devam etmektedir (224).

AG'in diyabetik insanlarda antidiyabetik bir ilaç olarak kullanımını 3 faktöre bağlı görünmektedir. Diyabetiklerde mikrovasküler komplikasyonlara olumlu etkilerinin gösterilmesi, yan etkilerinin kabul edilebilirliği ve etki mekanizmasına ilişkin bilgilerin artması AG veya benzer ilaçların klinik kullanımını olanaklı hale getirebilecektir.



## YÖNTEM-GEREÇ

Çalışmaya 40 adet ,10 haftalık dişi Wistar sıçan alındı. Bir gecelik açlık sonrası yirmidört sıçana, PH 4.5 sodyum sitrat tamponu içinde Streptozotocin (STZ) (Sigma, St Louis MO,USA) 55 mg/kg intraperitoneal olarak injekte edilerek diyabet oluşturuldu. Bir hafta sonunda kan glukoz düzeyleri 200 mg/dl üzerinde olanlar diyabetik kabul edilip çalışmaya dahil edildi. Diyabet oluşturulmuş sıçanların 12 tanesine aminoguanidin bikarbonat (Sigma cat no:A-7259) 1 gr/L/gün içme suyunda verildi (AG+DM grubu). Oniki diyabetik sıçan diyabetik kontrol olarak ilaçsız takip edildi (DK). Onaltı sıçana ise STZ uygulanan gruba benzer şekilde eşit volümde steril distile su intraperitoneal injekte edildi. Sekiz tanesine AG 1 gr/L/gün ( AG+S grubu) , içme suyunda verildi, 8 tanesi ise sağlıklı kontrol olarak ilaçsız takip edildi (SK grubu).

Tüm grupların içme suyu şişeleri günlük değiştirildi. Sıçanlardan hiçbiri çalışma boyunca antidiyabetik tedavi almadı.

Çalışma Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi hayvan laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışma boyunca sıçanlar %20 protein içeren standart sıçan yemi ile beslendiler. Deneyler uluslararası laboratuvar hayvanları kurallarına uygun olarak yapıldı. Çalışma Marmara Üniversitesi hayvan etik kurulu tarafından onaylandı.

Çalışmanın başında ve 8 haftalık takip süresinin sonunda sıçanlar 24 saatlik idrarları toplanmak üzere metabolik kafeslere konuldu. Çalışma süresinin sonunda ether anestezisi ile sakrifiye edilerek kan ve böbrek dokusu örnekleri alındı. Sağ böbrek fosfat tamponlu formaldehit solusyonunda fikse edilerek ışık mikroskopisinde değerlendirilmek üzere parafinde bloklandı. Sol böbreğin

üst polü elektron mikroskopik incelemeler için ayrılırken kalan doku sıvı nitrojeni takiben , -80 °C de saklandı.

AG+DM grubundan bir sıçan çalışma devam ederken öldüğünden bazal verileri değerlendirmeye alınmadı.

**Elektron mikroskopik inceleme:** Sol böbreğin üst polünden alınan milimetrik korteks parçaları 0.3 mM MgCl ve %0.05 alcian blue içeren fosfat tamponlu %2.5'lik glutaraldehitte fikse edildikten sonra Epon-Resin'de bloklandı (225). Bir mikronluk kesitlerde glomerüller tespit edildikten sonra bloklardan 60 nm'lik kesitler alınıp elektron mikroskopisinde incelendi.

GBM kalınlığı x50000 büyütmede, her örnekten 3 glomerülde ve her glomerülün en az 5 farklı yerinde ortogonal metoda göre değerlendirildi. Her gruptan 3 böbrek elektron mikroskopik incelemeye alındı. Alcian blue ile boyanan partiküller heparan sülfat içeren (anyonik) partiküller olarak kabul edilip büyüklüklerine göre rastgele küçük(<10 nm), orta (10-20 nm) ve büyük (>20nm) olarak sınıflandırıldı. Tüm GBM ayrıca lamina rara interna, eksterna ve foot procesler heparan sülfat moleküllerinin dağılımı, partikül sayısı ve büyüklüğü açısından değerlendirildi. Anyonik yük değerlendirilmesi her örnekten 3 glomerülde, her glomerülün en az 5 farklı bölgesinde kalitatif olarak yapıldı. Partikül sayısı #/ $\mu\text{m}^2$  olarak belirtildi.

**Işık mikroskopi incelemesi:** Beş mikronluk kesitler kritik elektrolit konsantrasyonu tekniğine uygun olarak 0.3 mM MgCl ve %0,5 alcian mavisi 8GX (Sigma kat no:A-5268) ile boyandı (226). Alcian mavisi ile boyanmış her bir preparatda en az 20 glomerül ve her glomerülün 8 farklı bölgesi değerlendirildi. GBM'ın alcian blue ile boyanması 0-3+ olarak semikantitatif

değerlendirildi (0= boyanma yok, 1+= fokal boyanma, 2+ diffüz hafif boyanma,3+ güçlü ve yaygın boyanma)

Renal hasara ait diğer semi-kantitatif inceleme periyodik asit schiff ve methenamin silver boyaması ile yapıldı. Mezengial genişleme, interstisyel fibrozis, tübüler atrofi,arteriolar hyalinozis ve interstisyel inflamasyon incelendi.

Mesengial genişleme 0-3 arası derecelendirildi ( 0 değişiklik yok, 1+ hafif değişiklikler kapiller lümeni daraltmamış mezengial genişleme, 2+ orta değişiklikler kapiller lümeni daraltan mezengial genişleme, 3+ şiddetli değişiklikler kapiller lümeni tıkayan mezengial genişleme ). Interstisyel fibrozis ve tübüler atrofi 0 dan -3 e kadar derecelendirildi. ( 0 değişiklik yok, 1+ örneğin <%10 kapsayan değişiklikler, 2+ örneğin %10-25 ini kapsayan değişiklikler, 3+ örneğin >%25 ini kapsayan değişiklikler ). Arterial hyalinozis de 0 ile 3 arası derecelendirilerek değerlendirildi (0 hyalin deposit yok,+1 hyalin deposit çeperinin <%50,+2 hyalin deposit çeperinin %50 den fazla,3+ diffüz). Vasküler lümeni daraltan aterosklerotik değişiklikler 0 ile 4 arası derecelendirildi. ( 0 değişiklik yok, +1 hafif kalınlaşma lüminer çaptan küçük,+2 duvar kalınlaşması lümen çapına eşit,+3 duvar kalınlığı lümen çapından daha fazla ,+4 lüminer tıkanma) (227).

Glomerül çapı her örnekte en az 8 glomerülde oküler mikrometre ile perpendiküler aksta ölçüldü.(228) Glomerüler kapiller alan  $\pi r^2$  formülü ile hesaplandı. Glomerüldeki total hücre sayısı her örnek için 8 glomerülde sayılarak ortalaması alındı.(229)

**Eritrosit anyonik yük (EAY) ölçümü:** EAY katyonik bir boya olan alcian blue kullanılarak Levin'in tarif ettiği metoda göre ölçüldü (230). Sitratlı tüpe alınan kan örneklerinde Beutler'in tarif ettiği şekilde trombosit ve lökositler ayrıldı

(231).Eritrositler 3 kez salinde yıkandıktan sonra 250mg/L konsantrasyonunda alcian blue içeren tamponlu solüsyonla karıştırıldı.

37 °C de 30 dakika bekletildikten sonra süspansiyon santrifüj edildi ve süpernatandaki alcian blue konsantrasyonu 650 nm dalga boyunda Shimatsu 2000 UV spektrofotometrede okutuldu. Alcian blue'nun eritrositlerdeki tutulumunun intra ve interassay varyasyon katsayıları %5.8 ile %7.6 bulundu.

**İdrar GAG atılımının ölçülmesi:** İdrar GAG atılımı 24 saatlik idrarda 1,9 dimetil metilen mavisini (Aldrich Chem Co USA) ve standart olarak sığır böbrek heparan sülfatı (Sigma Kat no:H7640) kullanılarak Jong'un tarif ettiği yöntemle (232) Shimatsu 2000 UV spektrofotometrede 520 nm dalga boyunda ölçüldü.

Intra ve interassay varyasyonları %2.4 ve %15 idi. İdrar albümin atılımı elektroforez ile tayin edildi (Helena Lab, Sunderland, İngiltere). Plazma glukozu glukoz oksidaz metoduna dayalı kolorimetrik kit ile ölçüldü (Boehringer Mannheim ,Almanya) İdrar ve plazma kreatinini Jaffe metoduna dayalı kolorimerirk kit ile değerlendirildi (Boehringer Mannheim, Almanya)

Kreatinin klirensi  $U.V/P$  formülü ile hesaplandı.(U idrar kreatinini,V volum,P plazma kreatinini)

İstatistik analizler IBM uyumlu Instat 2 programı kullanılarak yapıldı. Tüm analizlerde non parametrik testler kullanıldı .Grupların karşılaştırılmaları Kruskall Wallis ANOVA ve Mann Whitney U ,korelasyon analizleri Spearman Rank testi ile yapıldı. Sonuçlar Ortalama±SEM olarak belirtildi.

## SONUÇLAR

Sekiz haftalık çalışma süresinin sonunda açlık kan şekeri düzeyleri sırası ile SK, AG+S, AG+DM, DK gruplarında  $79.5 \pm 11.1$  mg/dl,  $126,3 \pm 19$  mg/dl,  $328.8 \pm 61$  mg/dl,  $436.2 \pm 66.9$  mg/dl idi. Diyabetik grupların kan şekeri düzeyleri sağlıklılara oranla anlamlı olarak daha yüksek bulundu ( $p < 0.05$ ).

Eritrosit anyonik yük değerleri diyabetik kontrol grubunda diğer 3 gruptan anlamlı olarak daha düşük bulundu ( $p < 0.05$ ). (Tablo 4). Yirmidört saatlik idrar albümin atımları karşılaştırıldığında diyabetik kontrol grubunda ( $277.4 \pm 37.5$   $\mu\text{g/gün}$ ) SK grubu ( $106 \pm 27$   $\mu\text{g/gün}$ ,  $p < 0.001$ ) ve AG+S ( $82.4 \pm 10.7$   $\mu\text{g/gün}$ ,  $p < 0.001$ ) gruplarına göre anlamlı olarak yüksek olduğu görüldü. Bununla birlikte AG alan diyabetik sıçanların albümin atımları ( $162.5 \pm 21.8$   $\mu\text{g/gün}$ ) diyabetik kontrollere göre düşük olmasına rağmen ( $p < 0.05$ ) sağlıklı kontrollere oranla halen yüksekti ( $p < 0.05$ ).

Günlük idrarda heparan sülfat atılımı sağlıklı sıçanlarda  $899.4 \pm 158.6$   $\mu\text{g/gün}$  iken, diyabetik kontrol grubunda  $2075.5 \pm 500$   $\mu\text{g/gün}$  bulundu ve bu değer sağlıklılara göre anlamlı olarak yüksekti ( $p < 0.05$ ). AG ile tedavi edilen diyabetik sıçanlarda idrar heparan sülfat atılımı diyabetik kontrollerden anlamlı olarak düşüktü ( $1050.6 \pm 195$   $\mu\text{g/gün}$ ,  $p < 0.05$ ). İdrar GAG/kreatinin oranı İdrar GAG (heparan sülfat) atılımı ile benzer bulundu.

İdrar albümin atılımı tüm çalışma grubunda plazma glukoz düzeyleri ( $r = 0.87$ ,  $p < 0.0001$ ) ve idrar heparan sülfat atılımı ( $r = 0.73$ ,  $p < 0.0001$ ) ile korele idi. EAY ile glukoz düzeyleri ( $r = -0.51$ ,  $p < 0.05$ ), idrar albümin atılımı ( $r = -0.35$ ,  $p < 0.05$ ) ve idrar heparan sülfat atılımı ( $r = -0.61$ ,  $p < 0.0005$ ) arasında negatif korelasyon gözlemlendi.

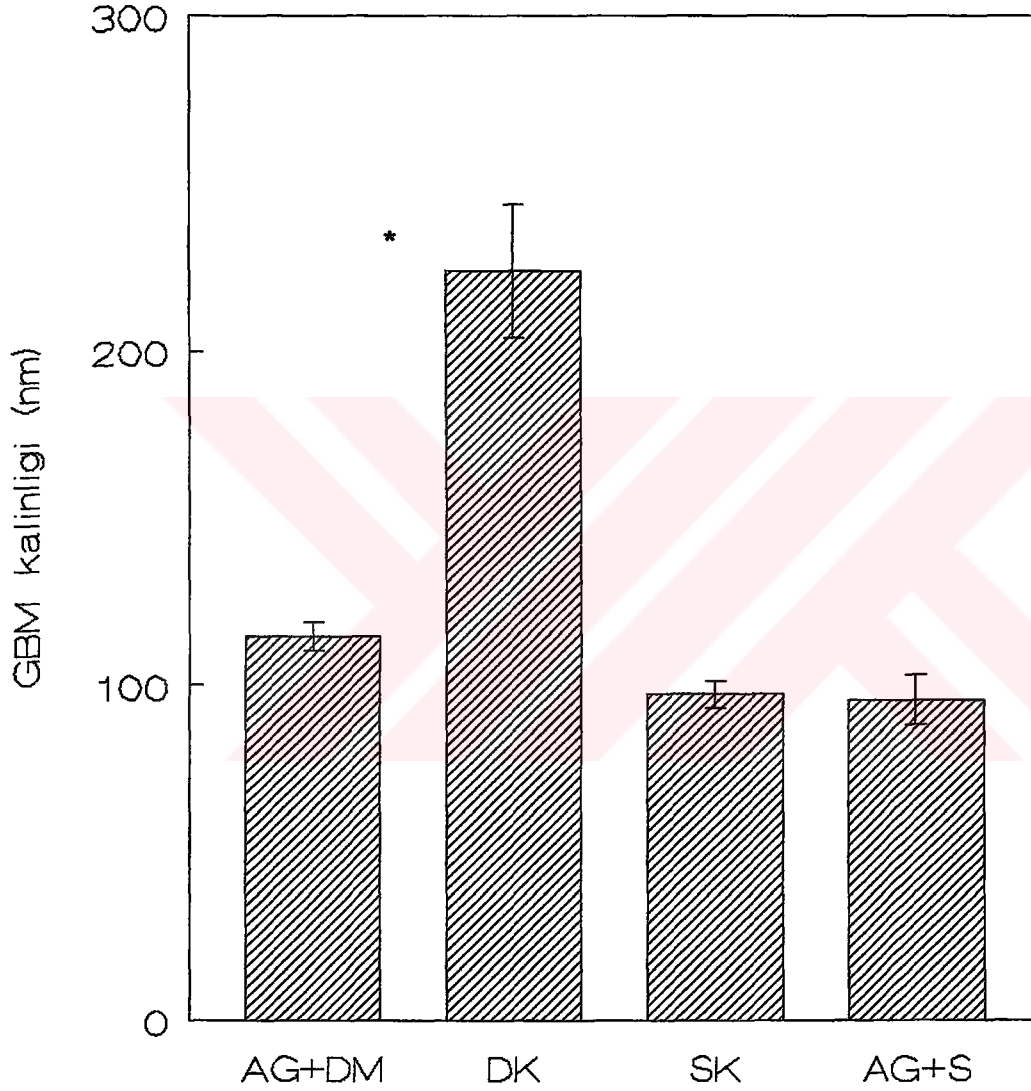


**Tablo 4 : Çalışma sonundaki biyokimya parametreleri**

	AG+DM	DK	SK	AG+S
Glukoz ( mg/dl)	328.8±61 <sup>a</sup>	436.2±66.9 <sup>a</sup>	79.5±11.1	126.3±19
EAY ( ng Alcian blue / 10 <sup>6</sup> RBC )	465.5±3.9	367.5±32.9 <sup>b</sup>	423.4±14.8	468.6±5.5
Albuminuri (µg/gün)	162.5±21.8	277.4±37.5 <sup>c</sup>	106±27	82.4±10.7
Albumin/kreatinin (µg/mg)	7.36±1.4	22.8±7.8 <sup>d</sup>	0.42±0.12	0.39±0.16
İdrarHeparan sulfate (µg/ gün)	1050.6±195	2075.6±505 <sup>e</sup>	899.4±158.6	956±68.7
İdrar Heparan sulfate/ kreatinin (µg/ mg kreatinin)	4.31±1	28.8±11.4 <sup>f</sup>	2.38±0.9	1.16±0.16

a: p<0.05 sağlıklı sıçanlara göre , b: p<0.05 diğer gruplara göre , c: p<0.001 sağlıklı gruba göre, p<0.05 AG+DM grubuna kıyasla , d: p< 0.001 sağlıklı gruba göre , p<0.05 AG+DM grubuna kıyasla, e: p<0.05 diğer gruplara kıyasla, f: p<0.01 sağlıklılara göre ,p<0.05 AG+DM grubuna göre

Elektron mikroskopi incelemesinde GBM kalınlığı sırası ile AG+DM, DK, AG+S, SK gruplarında  $114.6 \pm 4.1 \text{ nm}$ ,  $224 \pm 20.1 \text{ nm}$ ,  $95.7 \pm 7.6 \text{ nm}$ ,  $97.3 \pm 4.3 \text{ nm}$  bulundu. Tedavi almayan diyabetik sıçanların GBM kalınlığı sağlıklılara oranla anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p < 0.001$ ). AG alan diyabetik sıçanların GBM kalınlıkları diyabetik kontrollere oranla düşüktü ( $p < 0.05$ ) ( Şekil 13 ).



\*  $p < 0.05$  AG+DM grubuna kıyasla

**Şekil 13 : Tüm çalışma grubunda GBM kalınlıkları**

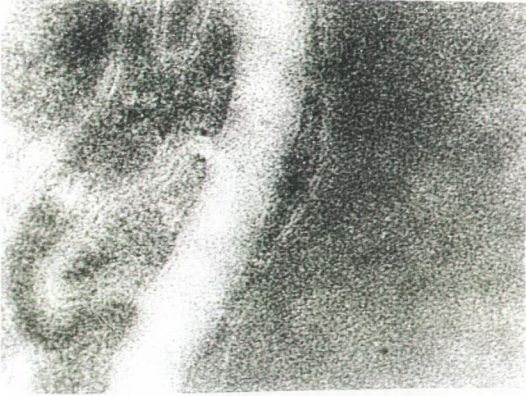
GBM'da alcian blue ile boyalı partikül sayısı sırası ile AG+DM, DK, SK ve AG+S gruplarında  $90.6 \pm 0.6$ ,  $36 \pm 2.4$ ,  $93.8 \pm 1.7$ ,  $98.6 \pm 1.7$  bulundu. Diyabetik kontrollerde partikül sayıları sağlıklı gruplar ve AG+DM grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ( $p < 0.01$ ).

GBM kalınlık ve anyonik yük dağılımı Şekil 14'te görülmektedir. Sağlıklı sıçan GBM'da partiküllerin diffüz şekilde dağıldığı gözlemlendi (Şekil 14,a), Tedavi almamış diyabetik sıçanlarda anyonik partiküller sağlıklılara oranla anlamlı olarak azalmış görünüyordu. Küçük boyutlu partiküller lamina densada, yer yer birikmiş izleniyordu (Şekil 14,b).

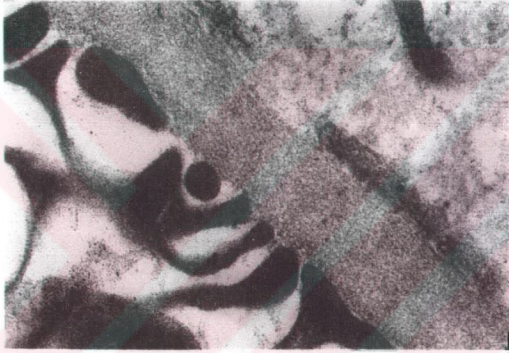
AG alan diyabetik sıçanların GBM'da anyonik boyalı partiküller tüm membran boyunca diffüz dağılım göstermekteydi. Küçük boyutlu partiküller tüm membranda dominant görünüyordu ve yayılım paterni sağlıklı sıçanlardakine oldukça benzemekteydi (Şekil 14,c). AG alan sağlıklı sıçanların glomerül bazal membranı sağlıklı kontrollerden farklı bulunmadı .

GBM'ın  $0.1 \text{ mm}^2$ 'lik alanında küçük boyutlu partiküller sırası ile AG+DM,DK,SK,AG+S gruplarında  $90.6 \pm 0.6$ ,  $26.2 \pm 0.8$ ,  $92.4 \pm 1$  ve  $98.8 \pm 0.5$  olarak sayıldı. DK grubunda küçük partikül sayısı SK grubundan anlamlı olarak düşüktü ( $p < 0.01$ ), AG+DM grubunda DK grubuna göre anlamlı olarak yüksekti ( $p < 0.01$ ). Orta boyutlu partiküller sırası ile AG+DM,DK,SK,AG+S gruplarında  $1 \pm 0.4$ ,  $8.4 \pm 1.4$ ,  $1.4 \pm 0.5$  ve  $2 \pm 0$  idi. DK grubunun değeri diğer 3 gruptan yüksek bulundu ( $p < 0.001$ ). Büyük boyutlu moleküller yalnızca DK grubunda izlendi ( $2 \pm 0$ ).

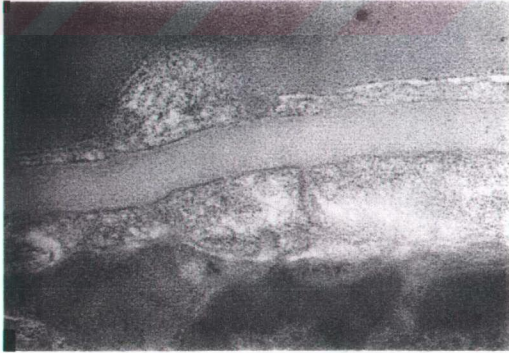
a



b



c



a- SK grubu ,b-DK grubu,c-AG+DM grubu

**Şekil 14: GBM da anyonik yüklü partiküllerin dağılımı**

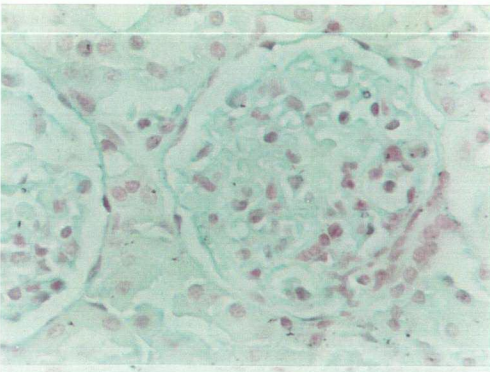
Işık mikroskopi incelemelerinde semi-kantitatif alcian blue boyanmasının diyabetik sıçanlarda sağlıklılara oranla daha silik olduğu görüldü ( $p<0.01$ ) (Şekil 15 a,b) AG alan DK glomerülleri sağlıklılara benzer şekilde boyanmıştı (Şekil 15,c)

Mezengial matriks DK grubunda sağlıklılara oranla genişlemiş izlendi ( $p<0.001$ ). AG+DM grubunda mezengial matriks genişlemesi DK grubu ile benzerdi. GBM kalınlıkları semi-kantitatif olarak incelendiğinde DK grubunda sağlıklı kontrollere ve AG+DM grubuna göre anlamlı olarak kalın bulundu ( $p<0.01$ ) (Tablo 5).

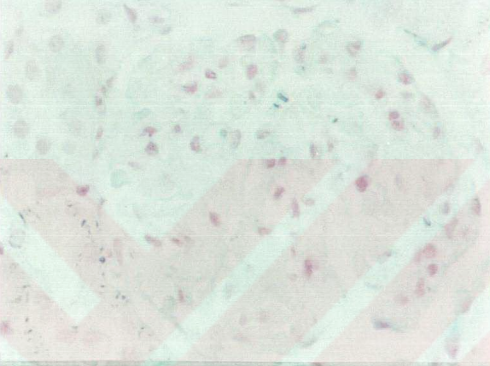
Glomerüldeki total hücre sayısı AG+DM grubunda  $26.9\pm1.6$ , DK grubunda  $31.0\pm1.1$ , SK grubunda  $26.6\pm1.0$ , AG+S grubunda  $22.6\pm1.0$  olup DK grubunun değeri SK grubundan anlamlı olarak yüksekti ( $p<0.001$ ).AG+DM grubunda DK grubuna göre daha az hücre bulunmaktaydı ( $p<0.01$ ).

Glomerül çapları AG+DM,DK,SK,AG+S gruplarında sırası ile  $42.2\pm0.3 \mu\text{m}$ ,  $46.3\pm0.8 \mu\text{m}$ ,  $40.4\pm0.6 \mu\text{m}$ ,  $40.3\pm1.0 \mu\text{m}$  idi.DK grubunun glomerül çapları ve buna bağlı olarak glomerül alanları anlamlı olarak yüksekti ( $p<0.05$ ).

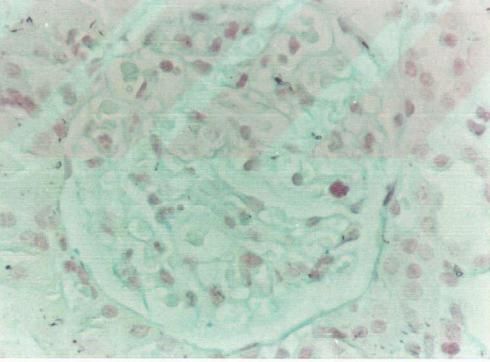
a



b



c



**Şekil 15:** Işık mikroskopisinde GBM alcian blue tutulumunun değerlendirilmesi. a-SK grubu, b-DK grubu, c AG+DM grubu, X400 büyütme

**Tablo 5:Renal biopsi örneklerinin ışık mikroskopisinde semi-kantitatif değerlendirilmesi**

	AG+DM (n=11)				DK (n=12)				SK (n=8)				AG+S (n=8)			
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
GBM alcian blue boyanması	0	2	6	3	2	8	2	0 <sup>a</sup>	0	1	2	5	0	0	4	4
Mesengial matriks kalınlaşması	0	2	4	5 <sup>b</sup>	0	1	4	6 <sup>b</sup>	5	3	0	0	6	2	0	0
GBM kalınlaşması	3	7	1	0 <sup>c</sup>	0	1	4	7	5	2	1	0	6	1	1	0
intersitisyel inflamation	5	6	0	0	2	9	1	0 <sup>d</sup>	7	1	0	0	8	0	0	0
intersitisyel fibrosis	8	3	0	0	8	3	1	0	7	1	0	0	8	0	0	0
tubuler atrofi	10	1	0	0	9	2	1	0	8	0	0	0	8	0	0	0
arteriolar hyalinosis	4	4	3	0 <sup>e</sup>	3	7	2	0 <sup>e</sup>	7	1	0	0	8	0	0	0
arteriosclerosis	3	7	1	0 <sup>f</sup>	4	6	2	0 <sup>f</sup>	8	0	0	0	7	1	0	0

<sup>a</sup> p< 0,0001 diğer gruplara göre

<sup>b</sup> p<0,0001 diyabetik ve sağlıklı gruba göre

<sup>c</sup> p<0,001 SK grubuna göre ,p<0,05 DK grubuna göre.

<sup>d</sup> p<0,05 SK grubuna göre

<sup>e</sup> p<0,001 SK grubuna göre

<sup>f</sup> p<0,05 sağlıklı sıçanlara göre

## TARTIŞMA

Bu çalışmada diyabetik sıçan modelinde aminoguanidin ile oluşturulan ileri glikozilasyon inhibisyonunun albüminüriyi azalttığı ,bazal membran kalınlaşması ve GBM anyonik yük kaybını önlediği gösterilmiştir.

İlk kez Eileen ve ekibi diyabetik Lewis sıçanlarında aminoguanidinin idrar albümin atılımı ve GBM kalınlığını azalttığını göstermişlerdir (10). Edelstein ve Brownlee spontan hipertansif ,diyabetik sıçanlarda aminoguanidinin kan basıncından bağımsız olarak albüminüri miktarını kontrol grubuna oranla 4 kat azalttığını ortaya koymuşlardır (9). İtakura streptozotocin ile diyabet oluşturduğu sıçanlarda 10 haftalık aminoguanidin uygulamasının albüminürinin yanı sıra 77 kd'dan daha yüksek ağırlıktaki proteinlerin kaybını da önlediğini gözlemlemiştir (240). Literatürdeki benzer çalışmalar diyabetik proteinürinin etyolojisinde yapı proteinlerinin ileri glikozilasyonunun önemli rolü olduğunu; ileri glikozilasyon inhibisyonu ile yapısal ve fonksiyonel değişikliklerin gerileyebildiğini göstermektedir.

Ancak literatürde ileri glikozilasyon inhibisyonunun diyabetik proteinüriye etkili olmadığı yönünde yayınlar da mevcuttur. Tip 2 diyabetik sıçan modelinde aminoguanidinin bazal membran kalınlaşmasını azalttığı halde albüminüriyi etkilemediği ileri sürülmüştür (233).

Huijberts ve ekibi diabetik Wistar sıçanlarda 8 haftalık aminoguanidin tedavisi sonunda göz, iskelet kası, akciğer ve böbrekte regional albümin klirensinin azaldığını ancak albüminüri miktarının azalmadığını ortaya koymuşlardır (241). Glikozilasyon konusunda ileri deneyimi bulunan Dr. Soulis ve ekibi diyabetik sıçanlarda 32 haftalık aminoguanidin uygulaması sonunda glomerül ve renal tübüllerde AGE birikiminin önlendiğini, GBM kalınlığında azalma



olmaz iken albüminürinin gerilediğini izlemişlerdir (205). Aynı ekip yine diabetik sıçanlarda aminoguanidinin renoprotektif etkisinin uygulama zamanından çok kullanım süresi ile ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır (220). Tüm çalışmaların ortak sonucu AGE'lerin diyabetik böbrek patogenezinde primer rol oynadığı ve ileri glikozilasyon inhibisyonunun renoprotektif olduğu yönündedir.

Bir grup araştırmacı aminoguanidin uygulaması ile ilişkilendirdikleri tümör gelişimi saptamışlardır. Oturai ve ekibi aminoguanidin uygulamasının Sprague-Dawley sıçanlarında 8 ay sonunda malign böbrek tümörü geliştirdiğini ileri sürmüşlerdir (242). Ancak aminoguanidin ile yapılan diğer uzun süreli çalışmalarda bu maddeye bağlı tümör gelişimine rastlanmamıştır. Bu durumun aminoguanidinden çok streptozotocine bağlı olma ihtimali yüksektir. Bir kemoterapötik ajan olan streptozotocin in sıçanlarda 7 ayın üzerindeki takiplerde özellikle böbrek tümörü oluşturduğu bilinmektedir (234). Bu çalışmada elde edilen bulgulardan biri de diyabetik sıçanlarda idrar GAG atılımının sağlıklı sıçanlara oranla yüksek olmasıdır.

Diyabetiklerde idrar GAG atılımının arttığı ve idrar GAG miktarı ile albüminüri arasında doğru orantılı bir ilişki olduğu ilk kez Reddi tarafından diyabetik sıçanlarda gösterilmiştir (234). Aynı kişi diyabetik sıçanlarda glomerül heparan sülfat sentezinin azaldığını, ACE inhibisyonu ile idrar GAG miktarının azalıp glomerül sentezinin arttığını ortaya koymuştur (243).

Diyabetik insanlarda da benzer sonuçlar rapor edilmiştir. Gambaro ve ekibi tip 1 diyabetiklerde idrar glikozaminoglikan atılımının diyabette glomerül tutulumunun göstergesi olduğunu ileri sürmüşlerdir (244).

Dışarıdan glikozaminoglikan molekülü verilmesinin diyabetik sıçanlarda renal morfolojiyi koruyup albüminüriyi azalttığıın gösterilmesi (245), diyabetik nefropatide GAG metabolizmasının patolojik rolünü vurgulamıştır.

Bu çalışmada aminoguanidin alan diyabetik sıçanların idrar GAG atılımının aminoguanidin almayanlara göre azaldığı gösterilmiştir. Tüm çalışma grubunda idrar GAG atılımı ile albüminüri arasında doğru orantılı bir ilişki bulunmuştur. Bu veri idrar glikozaminoglikan atılımının glomerül yük seçiciliğinin bir göstergesi olduğu hipotezini desteklemektedir. Diyabetik sıçanlarda aminoguanidin uygulaması ile idrar GAG atılımı ve albüminürinin doğru orantılı olarak azalması bu maddenin diyabetik glomerül GAG metabolizmasında olumlu değişiklikler yarattığını düşündürmektedir. İdrarda atılan majör GAG molekülü heparan sülfat olduğu için primer olarak heparan sülfat moleküllerinin etkilendiği söylenebilir.

Kollagen, laminin, fibronektin gibi, glomerül bazal membran yapı proteinlerinin ileri glikozillenmesinin engellenmesi ile GBM yapısının korunduğu ve GAG moleküllerinin bu proteinlere tutunmasının arttığı, bu şekilde de idrara kaçışın engelenmediği ileri sürülebilir. Ancak çalışma bu hipotezi irdelenecek şekilde planlanmamıştır.

Eritrosit anyonik yükü, GBM anyonik yükünün indirekt bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (230,235). Bu çalışmada diyabetik sıçanlarda eritrosit anyonik yükünün azaldığı gösterilmiştir. AG alan diyabetik sıçanlarda eritrosit anyonik yükünün sağlıklı kontrol grubu ile benzer olduğu gözlenmiştir. Tüm çalışma grubunda idrar GAG miktarı ve albüminüri eritrosit anyonik yükü ile ters orantılı bir korelasyon göstermiştir. Bu veri literatürdeki ilk veri olup aminoguanidin tedavisinin glomerül yük seçici bariyerini koruduğunu

göstermektedir. Eritrosit anyonik yükü ve albüminüri arasındaki ilişki Gambaro'nun bulguları ile uyumludur (235).

Elektron mikroskopi değerlendirmelerinde diyabetik sıçan glomerül bazal membranında birim alandaki anyonik partikül sayısı sağlıklara oranla anlamlı olarak düşük bulunmuştur. AG alan diyabetik sıçanların GBM'da anyonik yüklü partiküllerin sayısı sağlıklılar ile benzerdir. Bu bulguların ışığı altında diyabetik sıçanlara aminoguanidin uygulamasının GBM'dan glikozaminoglikan kaybını engellediği ileri sürülebilir.

GBM'da primer heparan sülfat molekülü heparan sülfattır. Işık ve elektron mikroskopisinde kullanılan preparatların boyanmasında kritik elektrolit konsantrasyon tekniği uygulanmıştır. Histopatolojik incelemelerde kullanılan alcian blue spesifik olarak sülfatlı glikozaminoglikanları, 0.3 molar konsantrasyonundaki magnezyum klorür ise heparan sülfatı boyamaktadır (226). Bu nedenle histopatolojik değerlendirmede anyonik boyalı partiküller heparan sülfat olarak yorumlanmıştır.

Histopatolojik değerlendirmede diyabetik sıçan GBM'da anyonik partikül sayısının azaldığı açıkça gösterilmiştir. İdrar heparan sülfat miktarındaki artışın eş zamanlı olması diyabetik böbrekte ilk planda heparan sülfat yıkımının artmış olabileceğini düşündürmektedir. Diyabetik GBM'da heparan sülfat miktarının azalması yıkım artışının yanı sıra molekülün sülfatlanma defekti veya glikozillenmiş yapı proteinlerine tutunmasındaki azalmaya da bağlı olabilir (92-98).

GBM incelemelerinde diyabetik grupta birim alana düşen anyonik partikül sayısının sağlıklılara oranla sayıca azalması, GBM hacminin artmasına bağlı

olabilir. Diyabetiklerde GBM kalınlaşması membran proteinlerinin sentezinin ve birikiminin artması yani turnover'larının düşmesinden kaynaklanmaktadır . Artan hacimle birlikte birim alana düşen anyonik partikül sayısında dilüsyonel bir azalma olabileceği de göz önünde tutulmalıdır.

Elektron mikroskopi değerlendirmelerinde anyonik partiküllerin dağılım paterninde de değişiklik izlenmiştir.Sağlıklı sıçan glomerül bazal mebranında küçük moleküller membran boyunca diffüz dağılımlarına rağmen diyabetik kontrol grubunda lamina rara internada yer yer biriktikleri izlenmiştir.Bunun yanı sıra tedavi almayan diyabetik grupta orta ve büyük çaplı moleküllerin sayısında sağlıklı sıçanlara göre artış saptanmıştır. Diyabetik sıçanların partikül boyutlarındaki artış, GAG moleküllerinin yıkımındaki azalmaya ve/veya kompensatuar artışına bağlı olabilir (239).

Işık mikroskopi değerlendirmelerinde diyabetik kontrol grubunda glomerül çapı, glomerüldeki total hücre sayısı ve mesengial matriks sağlıklı gruba göre bariz bir şekilde artmış görülmektedir ki bu tablo diyabette beklenen histolojik değişimleri yansıtmaktadır. AG alan diyabetik sıçan glomerüllerinde glomerül total hücre sayısında , glomerül çapında , intersitisyel enflamasyon ve intersitisyel fibrosiste diyabetik kontrol grubuna oranla azalma izlenmiştir. Sekiz haftalık tedavi sonunda AG uygulaması ile mezengial matrikste önemli bir değişiklik görülmemiştir.

AGE'lerin mesengial matriks yapımını arttırdığı ve ileri glikozilasyon inhibisyonunun mezengial matriks genişlemesini geriletmediği bilinmektedir (246). Bizim çalışmamızda mezengial matriks değerlendirmesi için kullanılan semi-kantitatif yöntem yeterince duyarlı değildir. Ayrıca çalışma süresinin 8 hafta

gibi kısa bir süre olması turnover'ları düşük olan matriks proteinlerini değerlendirmek için yeterli olamamış olabilir.

Bu çalışmada elde edilen tüm veriler diyabette ileri glikozilasyon inhibisyonunun renoprotektif olduğunu göstermektedir. Aminoguanidin diyabetik sıçanlarda albüminüriyi azaltmasının yanında GBM'daki anyonik partiküllerin sayı ve dağılımını sağlıklılara yakın tutmakta , bazal membranlardaki anyonik yükü korumaktadır.

Diyabetiklerde bozulmuş GAG metabolizmasının AG tarafından düzeltiliyor olması ,GBM yapı proteinlerinin non-enzimatik glikozillenmesinin önlenmesine ve böylece yapının normale yakın tutulmasına bağlı görünmektedir.

Sonuç olarak, diyabetik sıçanlarda aminoguanidin uygulaması GBM kalınlaşmasını engellemekte ve anyonik yük kaybını azaltmaktadır. İleri glikozilasyon inhibisyonunun diyabetik renal hasarı önleme mekanizmalarından biri de glomerüler yük seçiciliğini korumasıdır.

## SUMMARY

Aminoguanidine (AG) has previously been shown to prevent glomerular basement membrane thickening and albuminuria in diabetic rats. The aim of this study was to investigate the effect of AG on glomerular basement membrane (GBM) thickness, heparan sulfate (HS) content which represents anionic charge and urinary albumin and HS excretion, in Streptozotocin induced diabetic rats.

After diabetes induction female Wistar rats were divided into 2 groups. Group A (n=11) received 1 g/L aminoguanidine carbonate in drinking water, group B (n=12) was given only tap water. Control rats received AG (group C, n=8) or tap water (group D, n=8). At the end of an 8 week period 24-hour urine collections were made and kidneys dissected. Urinary albumin was measured by electrophoresis, glycosaminoglycan excretion was detected by 1,9 dimethylene blue based spectrophotometry. Glomerular basement membrane HS content was measured by alcian blue stained particle count (ab SPC) by electron microscopy.

<b>Results:</b>	<b>albuminuria mg/d</b>	<b>urinary HS mg/d</b>	<b>GBM thickness nm</b>	<b>abSPC</b>
Group A	162,5±21,8	1050,6±195***	114,6±4,1	90,6±0,6
Group B	277,4±37,5*	2075,6±505 *	224±20,*	36±2,4**
Group C	106±27	899,4±158	95,7±7,6	93,8±1,1
Group D	82,4±10,7	956±68,7	97,3±4,3	98,6±1,7

\*p<0,05,\*\*p<0,01 vs other groups,\*\*\* p<0,01 vs group B

Diabetic rats showed a lower count of alcian blue stained particles on GBM while AG treated diabetic rats had counts similar to healthy rats.

Aminoguanidine prevents the decrease in GBM anionic charged molecules and GBM thickening. This can be one of the mechanisms by which AG decreases albuminuria in diabetic rats.



## KAYNAKLAR

1-Parving H-H. Renoprotection in diabetes:genetic and nongenetic risk factors and treatment. Diabetologia 1998;41:745-759

2-Andersen AR, Christiansen JS,Andersen SK,Krenier S,Deckert T. Diabetic nephropathy in type 1 (insulin dependent) diabetes: an epidemiologic study. Diabetologia 1983;25:496-501

3-Parving H-H,Osterby R,Anderson PW,Hsueh WA. Diabetic nephropathy 1996 In: Brenner BM (ed). The Kidney 5th ed. Saunders. Philadelphia pp1864-1892

4- Krolewski AS, Warram JH. Natural history of diabetic nephropathy. Diabet Rev. 1995;3:510-564

5- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin dependent diabetes mellitus. N Engl J Med 1993;329:977-986

6-UKPDS 33. An intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin reduces the risk of diabetic complications with type 2 diabetes. Lancet 1998;352:837-853

7-Brownlee M. Advanced products of non-enzymatic glycation and the pathogenesis of diabetic complications. In Refkin H,Porte DJ Eds Diabetes Mellitus: Theory and practice. New York: Elsevier 1990;279-291

8-Beisswenger PS, Malita Z, Curpher TS,Moore LL,Jean S,Brinck-Johnsen T,Bucala R,Vlassara H. Formation of immunochemical advanced glycation end products precedes and correlates with early manifestations of renal and retinal disease in diabetes. Diabetes 1995;44:824-829

9-Edelstein D,Brownlee M. Aminoguanidine ameliorates albuminuria in diabetic hypertensive rats. Diabetologia 1992;35:96-97

10-Eileen NE, Good BH. Prevention of glomerular basement membrane thickening by aminoguanidine in experimental diabetes mellitus. Metabolism 1991;40:1016-19

11-Rohbrach DH, Hassell JR, Kleinman HK,Martin GR. Alterations in basement membrane (Heparan sulfate) proteoglycan in diabetic mice. Diabetes 1992;31:185-188

12- Materson BJ, Preston RA. Prevention of diabetic nephropathy. Hospital Prac. 1997;3:129-140



- 13- Viberti G;W,seman MJ,Pinto JR,Messent J. Diabetic nephropathy.In:Kahn CR,Weir GC eds. Joslins Diabetes Mellitus,Pennsylvania Lea and Febiger 1994;691-737
- 14-DeFRonzo RA. Diabetic nephropathy: etiologic and therapeutic considerations. Diabet Rev 1995;3:510-564
- 15- Ritz E, Stefansky A. Diabetic nephropathy in type 2 diabetes Am J kidney Disease 1996;27:167-194
- 16- Nelson RG, Knowler WC,Pettitt DJ,Bennett PH. Kidney disease in diabetes. In : Harris MI ed. Diabetes in America 2nd ed NIH publication No95 1995;1468:349-400
- 17-Bennett PH, Haffner S,Kasiske BL. Screening and management of microalbuminuria in diabetes mellitus. Am J kidney Dis. 1995;25:102-112
- 18-Krolewsky AS, Warren JH. Natural history of diabetic nephropathy Diabet Rev 1995;3:510-564
- 19-Viberti GC,Hill RD,Jarrtett RJ. Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin dependent diabetes mellitus. Lancet 1982;i:1430-1432
- 20- Parving H-H, Oxenboil B,Svendson PA. Early detection of patients at the risk of developing diabetic nephropathy. A longitudinal study of urinary albumin excretion. Acta Endocrinol 1982;100:550-555
- 21-Noth RH,Krolewsky AS,Kaysen GA,Meyer TW,Schambelin M. Diabetic nephropathy: Hemodynamic basis and implicaitons for disease management. Ann Intern Med 1989;110:795-813
- 22-Krolewski AS,Warren JA,Chrottieb AR,Busick EJ,Kahn JR. The changing natural history of nephropathy in type 1 diabetes Am J Med 1985;78:785-794
- 23-Hismphry CC,Butterel DJ,Frohnart PP. Chronic renal failure in non-insulin dependent diabetes mellitus. A population based study in Rochester Minnesota. Ann Intern Med 1989;111:788-796
- 24-Klein R,Klein BEK,Mass S,Demets DL. Proteinuria in diabetes Arch Intern Med 1988;148:181-186
- 25- Harris MI,Klein R,Welborn TA,Kuiman MW. Onset of NIDDM occurs at least 4-7 years before clinical diagnosis. Diab care 1992;15:815-819
- 26- Ballerel DJ,Hampry LL,Melton LJ,Frohnert PP,Chu CP,O' Ffallen WM,Palumbo PJ. Epidemiologia of persistant proteinuria in type 2 diabetes mellitus. Diabetes 1988;37:405-412

- 27- Sasaki A, Hozumi N, Hasegawa K, Uehara M. Risk factors related to the development of persistent albuminuria among diabetic patients observed in a long term follow up. *J of The Diabetes Soc* 1986;29:1017-1023
- 28- Kunzelman CL, Knowler WC, Pettitt DJ, Bennett PH. Incidence of proteinuria in type 2 diabetes mellitus in the Pima Indians *Kidney Int* 1989;35:681-687
- 29- Schmitz A, Vaeth M. Microalbuminuria: a major risk factor in non-insulin dependent diabetes. A 10 year follow up study of 503 patients *Diabetic Med* 1988;5:126-134
- 30- Dansgaard EM, Fruland A, Jørgensen OD, Mogensen CE. Prognostic value of albumin excretion rate and other risk factors in elderly diabetic patients and non diabetic control subjects surviving the first 5 years after assessment. *Diabetologia* 1993;36:1030-36
- 31- Earle K, Walker J, Hill C, Viberti GC. A familial clustering of cardiovascular disease in patients with insulin dependent diabetes and nephropathy. *NEJM* 1992;326:673-677
- 32- Pettitt DJ, Foud MF, Bennett DH, Nelson RG, Knowler WC. Familial predisposition to renal disease in two generations of Pima Indians with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 1990;33:438-443
- 33- Mogensen CE, Schmitz O. The diabetic kidney: From hyperfiltration and microalbuminuria to end stage renal failure. *Med Clin North Am* 1988;72:1465-1492
- 34- Mogensen CE. Glomerular filtration rate and renal plasma flow in short-term and long-term diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest* 1971;28:91-100
- 35- Ishida K, Ishibashi F, Takashina S. Comparison of renal hemodynamics in early non-insulin dependent and insulin dependent diabetes mellitus. *J Diabet Compl* 1991;5:143-145
- 36- Wiseman MJ, Saunderson AJ, Keen H, Viberti GC. Effect of blood glucose on increased glomerular filtration rate and kidney size in insulin dependent diabetes *NEJM*. 1985;312:617-621
- 37- Schmitz A, Hansen HH, Christiansen T. Kidney function in newly diagnosed type 2 non-insulin dependent diabetic patients before and during treatment. *Diabetologia* 1989;32:434-439
- 38- O' Donnell MP, Kasuke BL, Keane WF. Glomerular hemodynamics and structural alterations in experimental diabetes mellitus. *FASEB J* 1988;2:2339-2347
- 39- Christiansen JS, Gammelgaard S, Fransen M, Parving HH. Increased kidney size, glomerular filtration rate and renal plasma flow in short term insulin dependent diabetes. *Diabetologia* 1981;20:451-456

- 40-Wiseman MJ,Viberti GC. Kidney size and glomerular filtration rate in type 1 insulin dependent diabetes mellitus revisited *Diabetologia* 1983;25:530-535
- 41- Seyer-Hansen K. Renal hypertrophy in streptozotocin –diabetic rats *Clin Sci Med* 1976;51:551-555
- 42- Viberti GC,Keen H. The pattern of proteinuria in diabetes mellitus. *Diabetes* 1984;33:686-692
- 43- Mogensen CE. Microalbuminuria as a predictor of clinical diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1987;31:673-689
- 44-Mogensen CE,Keane WF,Bennett PH,Jerums G,Parving HH,Passa P,Steffes MW,Striker GE,Viberti GC. Prevention of diabetic renal disease with special reference to microalbuminuria . *The Lancet* 1995;346:1080-1084
- 45-Mogensen CE,Vittingho E.Urinary albumin excretion during exercise in juvenile diabetes: a provocation test for early abnormalities. *Scand J Clin Invest* 1975;35:295-300
- 46-Mogensen CE. Urinary albumin excretion in early and long term juvenile diabetes. *Scand J Clin Lab Invest* 1971;28:183-193
- 47-Mogensen CE , Christiansen CK. Predicting diabetic nephropathy in insulin dependent patients *NEJM* 1984;1:1430-1432
- 48-Jarrtett RJ, Viberti GC,Argyropoulos A,Hill RD,Mahmud U,Murrells TJ. Microalbuminuria predicts mortality in non-insulin dependent diabetes. *Diabet Med.*1984;1:17-19
- 49-Krolewski M, Eggers PW,, Warram JH. Magnitude of end stage renal disease in IDDM: 35 year follow up study. *Kidney Int* 1996;6:2041-2046
- 50-Microalbuminuria Collaborative study group, United Kingdom: Risk Factors for developmet of microalbuminuria in insulin dependent diabetic patients: a cohort study. *BMJ* 1993;306:1235-1239
- 51-Mogensen CE. Progression of nephropathy in long-term diabetes with proteinuria and effect of initial antihypertensive treatment. *Scand J Clin Lab Invest* 1976;36:383-388
- 52-Viberti GC,Bilous RW, Machintash D,Keen H. Monitoring glomerular function in diabetic nephropathy. *Am J Med* 1983;74:256-264
- 53-Nyberg G,Blohne G,Narden g. Impact of metabolic control in progression of diabetic nephropathy. *Diabetologia* 1987;30:82-86

54- Hasslacher C, Stech W, Wahl P, Ritz E: Blood pressure and metabolic control as risk factors for nephropathy in type 1 insulin dependent diabetics. *Diabetologia* 1985;28:6-11

55- Tarnow L, Rossing P, Gall M-A, Nielsen FS, Parving H-H: Prevalence of arterial hypertension in diabetic patients before and after the JNC-V. *Diab Care* 1994;17:1247-1251

56- Remuzzi G, Bertani T. Is glomerulosclerosis a consequence of altered glomerular permeability to macromolecules ?. *Kidney Int* 1990;38:384-394

57- Levey AS, Gassman J, Hall PM, Walker WG. Assessing the progression of renal disease in clinical studies. Effect of duration of follow-up and regression to the mean. *J Am Soc Nephrol* 1991;1:1087-1094

58- Alveras A, Thomas SM, Sagnotis A, Viberti GC. Promoters of progression of diabetic nephropathy. The relative roles of blood glucose and blood pressure control. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12:71-74

59- Mourhead JF, El-Nahas M, Chan MK, Varghese Z. Lipid nephrotoxicity in chronic progressive glomerular and tubulo-interstitial disease. *Lancet* 1982;ii:1309-1311

60- Lam KS, Cheng IKP, Janus ED, Pang RWC. Cholesterol –lowering therapy may retard the progression of diabetic nephropathy. *Diabetologia* 1995;38:604-609

61- Sawicki PT, DiDjurgeit U, Muhlhauser I, Bender R, Heinemann L, Berger M. Smoking is associated with progression of diabetic nephropathy. *Diab Care* 1994;17:126-31

62- Yashida H, Kuriyama S, Atsuma Y. Angiotensin 1 converting enzyme gene polymorphism in diabetes mellitus. *Kidney Int* 1996;50:657-664

63- Bjorck S, Blohme G, Sylven C, Mulec H. Deletion and insertion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene polymorphism of diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12:67-70

64- The EUCLID study group: Randomised placebo controlled trial of lisinopril in normotensive patients with insulin dependent diabetes and normoalbuminuria or microalbuminuria. *Lancet* 1997;349:1787-1792

65- Marre M, Chatellier G, Lebnac H, Guyenne T-T, Menard J, Passa P. Prevention of diabetic nephropathy with enalapril in normotensive diabetics with microalbuminuria. *BMJ*, 1988;297:1092-1095

66- Mathiesen ER, Homme E, Hansen HP, Parving H-H. Preservation of normal GFR with long –term captopril treatment in normotensive IDDM patients with microalbuminuria. *J Am Soc Nephrol*. 1997;8:115A (abstract)

- 67- Mogensen CE,Keane WF,Bennett PH. Prevention of diabetic renal disease with special reference to albuminuria. *Lancet* 1995;346:1080-1084
- 68-Jacobsen P,Rossing K,Rossing P. Role of an insertion/deletion polymorphism in the angiotensin converting enzyme gene on antiproteinuric effect of ACE inhibitor in IDDM patients with diabetic nephropathy: an observational follow up study. *Kidney Int* 1988;53:1002-1006
- 69- Leblond CP,Inoue S. Structure ,compositon and assembly of basement membrane. *Am J Anat* 1989;185:367-390
- 70- Reddi AS. The basement membrane in diabetes: In the diabetes anual 9 edts. Marshall SM, Home PD, Rizza RA, Elsevier, 1995;245-263
- 71-Kanwar YS,Hascall VC,Fahquar MG. Partial characterization of newly synthesized proteoglycans isolated from the GBM. *J Cell Biol* 1981;90:527-532
- 72-Lemkin MC,Farquhar MG. Sulfated and non-sulfated glycosaminoglycans and glycopeptides are synthesized by kidney in vivo and incorporated into GBM. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:1726-1730
- 73- Caulfield JP,Farquhar MG. Distribution of anionic sites in glomerular basement membranes. Their possible role in filtration and attachment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:1646-1650
- 74-Farquhar MG. Role of the basement membrane in glomerular filtration results obtained with electron-dense tracers. In edts: Maunsbach AB,Olsen TS,Christiansen E. *Functional ultrastruaction of the kidney*. Academic press ,New-York 1991,31-51
- 75-Laurie GW,Leblond CP,Inoue S,Martin GR,Chung A. Fine structure of the glomerular basement membrane and immunolocalisation of 5 basement membrane components to the lamina densa and its extensions in both glomeruli and tubuli of the rat kidney. *AM J Anat* 1984;169:463-483
- 76-Reale E, Lucino L,Kühn KW. Ultrastructural architecture of proteoglycans in the glomerular basement membrane. *J Histochem,Cytochem.* 1983;31:662-668
- 77- Moss J,Woodrow DF,Shore I,Gowwe P,Phillips M,Spiro RG. Ultrastructural immunologic studies of heparan sulfate proteoglycan in normal human glomeruli and glomerulonephritis. *J Pathol* 1990;161:137-143
- 78- Timpl R. Recent advances in the biochemistry of glomerular basement membrane. *Kidney Int* 1986;30:293-298
- 79-Timpl R. Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur J Biochem* 1989;7 :487-502

80-Fujiwara S, Wiedemann H, Timpl R, Lasting A, Engel J. Structure and interactions of heparan sulfate proteoglycans from a mouse tumor basement membrane *Eur J Biochem* 1984;143:145-157

81-Kanwar YS, Veis A, Kimura JH, Jakubowsky ML. Characterization of heparan sulfate proteoglycan of glomerular basement membranes. *Proc Acad Sci* 1984;81:762-766

82-Ohno M, Martinez-Hernandez A, Ohno N, Kefalides NA. Basement membrane In eds Shitala S, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985 pp 3-11

83-Yamada Y, Sasaki N, Kahno K, Kleinman HK, Kato S, Martin GR. Basement membranes In Shikata S ed. Elsevier Science Publishers, Amsterdam 1985;139-146

84-Whal P, Deppermann D, Hasslacher C. Biochemistry of glomerular basement membrane of normal and diabetic human Kidney *Int* 1982;21:744-749

85- Mauer SM, Steffes MW, Brown DM. The Kidney in diabetes *Am J Med* 1981;70:603-612

86-Karttunen T, Risteli J, Autio-Harmanene H, Risteli L. Effect of age and diabetes on type IV collagen and laminin in human kidney cortex. *Kidney Int* 1986;30:586-591

87- Brownlee M, Spiro RG. Glomerular basement membrane metabolism in the diabetic rat: in vitro studies. *Diabetes* 1979;28:121-125

88- Cameroni-Davalos RA, Valesco CA, Reddi AS. Metabolism of glomerular basement membrane in diabetes. In: tissue-specific metabolic alterations in diabetes. In eds Belfiore F, Molinatti GM, Reaven GM. *Front Diabetes*, Basel-Karger 1990;10:61-77

89-Cohem MP, Urdanvia E, Surma M, Cibarowsky CS. Non enzymatic glycolisation of basement membranes. *Diabetes* 1981;30:367-371

90- Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications *NEJM*;1988;318:1315-1321

91-Rochrbach DH, Hassell JR, Kleinmann HK, Martin GR. Alterations in the basement membrane (heparan sulfat) proteoglycan in diabetic mice. *Diabetes* 1982;31:185-188

92-Parthasrty N, Spiro RG. Effect of diabetes on the glycosaminoglycan component of the human glomerular basement membrane. *Diabetes* 1982;31:738-741

- 93-Mariya T, Nakazawa K, Hoh N, Shigematsu H, Okada N, Aizawa T, Yagima Y. Loss of glomerular anionic sites and the development of albuminuria in rats with streptozotocin induced diabetes. *Nephron* 1993;65:444-448
- 94-Groggel GC, Stevenson J, Hovingh P, Linker A, Bonder WA. Changes in heparan sulfate correlate with increased glomerular permeability. *Kidney Int* 1988;33:517-523
- 95-Vanden born J, Van den Hauvel LPWJ, Bukler MAH, Veerkamp JH, Assman KJM, Berden JHM. A monoclonal antibody against GBM heparan sulfate induces an acute selective proteinuria in rats. *Kidney Int* 1992;41:115-123
- 96-Kanwar YS, Risensweig LJ, Linker A, Jakubowski ML. Decreased de novo synthesis of glomerular proteoglycans in diabetes: biochemical and autoradiographic evidence. *Proc Natl Acad Sci* 1983;80:2272-2275
- 97-Reddi AS, Cameroni-Davalos RA. Diabetic Nephropathy. *Arc Intern Med* 1990;150:31-43
- 98-Tisher CC. Anatomy of the kidney. In: Brenner DM, Rector FC eds. *The Kidney Vol 11*, Philadelphia WB Saunders 1981;3-75
- 99-Mogensen CE, Osterby R, Gundersen HJG. Early functional and morphologic vascular renal consequences of the diabetic state. *Diabetologia* 1979;17:71-76
- 100-Osterby R, Gundersen HJG, Nyberg G, Aurell M. Advanced diabetic glomerulopathy. Quantitative structural characterization of non-occluded glomeruli. *Diabetes* 1987;36:612-619
- 101-Osterby R, Gundersen HJG. Fast accumulation of basement membrane material and the rate of morphological changes in acute experimental diabetic glomerular hypertrophy. *Diabetologia* 1980;18:493-500
- 102-Bergdtrand A, Bucht H. The glomerular lesions of diabetes mellitus and their electron microscopic appearance. *J Pathol Bacteriol* 1959;77:231-242
- 103- Mauer MS, Steffes MW, Ellis EN, Sutherland DER, Brown DM, Goetz FC. Structural –functional relationships in diabetic nephropathy. *J Clin Invest* 1984;74:1143-1155
- 104-Steffes MW, Bilous RW, Sutherland DER, Mauer SM. Cell and matrix components of the glomerular mesangium in type 1 diabetes. *Diabetes* 1992;41:679-684
- 105-Marley AR. Renal vascular disease in diabetes mellitus. *Histopathology* 1988;12:343-358

106-Schurere JE, Kalicharan D, Hoedemaeker PJ, Molenaar I. The use of polyetylenimine for demonstration of anionic sites in the basement membrane and collagen fibers. *J Histochem Cytochem* 1978;26:688-689

107-Kanwar YS, Farquhar MG. Anionic sites in the glomerular basement membrane: in vivo and vitro localisation to the lamina rara by cationic probes. *J Cell Biol* 1979;81:137-153

108-Kubosawa H, Kando Y. Reevaluation of anionic sites in the rat glomerular basement membrane. *Nephron* 1997;76:445-451

109-Chakrabarti S, MA N, Sima AAF. Reduced number of anionic sites is associated with glomerular basement membrane thickening in the diabetic BB rat. *Diabetologia* 1989;32:826-828

110-Mariya T, Nakzawa K, Hoh N, shiematsu H, Okada N, Aizawa T, Yamada T, Yagima Y: Loss of glomerular anionic sites and the development of albuminuria in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Nephron* 1993;65:444-448

111-Greene D. The pathogenesis and prevention of diabetic neuropathy and nephropathy. *Metabolism* 1988;37(suppl 1):25-29

112-Greene DA, Lattim SA. Impaired rat sciatic nerve sodium-potassium adenosin triphosphate in acute streptozotocin diabetes and its correction by dietary myo-inositol supplementation. *J Clin Invest* 1983;72:1058-1063

113-Winegrad AI. Does a common mechanism induce the disease complication of diabetes ?. *Diabetes* 1986;36:396-406

114-Tilton RG, Chang K, Pugliese G. Prevention of hemodynamic and vascular albumin filtration changes in diabetic rats by aldose reductase inhibitors. *Diabetes* 1989;38:1258-1270

115- Lorenzi M. Glucose toxicity in the vascular complications of diabetes: The cellular perspective. *Diab. Metab. Rev* 1992;8:85-103

116-Ayo SH, Radnik RA, Gliss IWF, Garoni SA, Rompt ER, Appling DR, Kreisberg JF. Increased extracellular matrix synthesis and mRNA in mesangial cells grown in high glucose medium. *AM J Physical* 1990;260:F185-191

117-Olgemalla B, Schwaabe S, Gerbitz KD, Schleicher ED. Elevated glucose decreases the content of basement membrane associated proteoglycan in proliferating mesangial cells. *Diabetologia* 1992;35:183-186

118- Walf G, Sharma K, Chen Y, Ericksen M, Ziyadeh FN. High glucose-induced proliferation in mesangial cells is reversed by autocrine TGF- $\beta$ . *Kidney Int* 1992;42:647-656



119-King GL, Ishu H,Kaya D. Diabetic vascular dysfunction:a model of excessive activation of protein kinase C. *Kidney Int* 1997;52:577-585

120-Murphy M,McGinty A,Godson C, Protein kinases C: Potential targets for invention in diabetic nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998;7:563-570

121-Ishii H,Jirousek MR,Koya D,Takagai C,Xia P,Clement A,Bursell SE.et al.Amelioration of vascular dysfunction in diabetic rats by an oral PKC inhibitor. *Science* 1996;272:728-731

122-Komers R,Allen TJ,Cooper ME. Role of endothelium derived nitric oxide in the pathogenesis of the renal hemodynamic changes of experimental diabetes. *Diabetes* 1994;43:1190-1197

123-Fumo P,Kuncio GS,Ziyadeh FN. PKC and high glucose stimulate collagen alpha 1(IV) transcriptional activity in a reporter mesengial cell line. *AM J Physiol* 1994;267:F632-638

124-Xia P, Ailello LP,Ishii H,Jiang Z,Park DJ,Robinson GS,Takag H,Newsure WP,Jirusek MR,King GL. Characterization of vascular endothelial growth factors ;effect on the activation of protein kinase C, Its isoforms and endothelial cell growth. *J Clin Invest* 1996;98:2018-2026

125- Xia P,Kramer RM, King GL. Identification of the mechanism for the inhibition of Na K ATP ase by hypoglycemia involary action of Protein kinase C and cytosolic phospholipase A2. *J Clin Invest* 1995;96:733-740

126-Kikkawa U,Kishimoto A,Nishizuka Y. The protein kinase C family: heterogenity and Its implications. *Ann Rev Biochem* 1989;58:31-44

127-Pfeiffer A,Schatz H. Diabetic microvascular complications and growth factors. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*.1995;103:7-14

128-Nakamura T,Fukai M,Ebihara I,Osada S,Nakaoga I,Tomino Y,Koide H. mRNA expression of growth factors in glomeruli from diabetic rats. *Diabetes* 1993;42:450-456

129-Abboud HE. Growth factors and diabetic nephropathy:an overview.*Kidney Int* 1997;52 (Suppl 60)S3-6

130-Hammerman MR,Miller SB. The growth hormon,insulin like growth factor axis in kidney revisited. *AM J Physiol* 1993;265:F1-14

131- Flyuberg A,Nielsen B,Skgaerbeek C,Frystyk JAN,Gronbaejk H,Orskov H. Roles of growth factors in diabetic kidney disease,In ed. Mogensen CE .The kidney and hypertension in diabetes mellitus,Norwell,KlawerAcademia Publishers 1994 pp 115-182

132- Nahman NS,Leanhark KC,Cosio FG,Herbert CL. effects of high glucose on cellular proliferation and fibronectin production by cultured human mesangial cells. *Kidney Int* 1992;41:396-402

133-Sharma K,Jin Y,Gua J,Ziyadeh FN. Neutralisation of TGF  $\beta$  by anti TGF  $\beta$  antibody attenuates kidney hypertrophy and the enhanced extracellular matrix gene expression in STZ induced diabetic mice. *Diabetes* 1996;45:522-530

134-Cheeseman KH,Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin* 1993;49:481-493

135-Uzel N,Sivas A,Uysal M,Oz H. Erythrocyte lipid peroxidation on glutathione peroxidase activation in patients with diabetes mellitus. *Hormon Metab Res* 1987;19:89-90

136-Nishimura C,Kuriyama K. Alterations of lipid peroxide and endogenous antioxidant contents in retina of streptozotocin-induced diabetic rats:effect of vitamin A administration. *Jpn J Pharmacol.* 1985;37:365-372

137-Kue DK,Mc Lennan S,Fisher E. Ascorbic acid metabolism and the polyol pathway in diabetes. *Diabetes* 1989;38:257-261

138-Kargen CW, Cataland S, O'Dorsio TM,Panganamala RV. Interrelation of platelet vitamin E and thromboxane synthesis in type 1 diabetes mellitus. *Diabetes* 1984;33:239-243

139- Wolf SP,Dean RT. Glucose autooxidation and protein oxidation:the rate of autooxidative glycosylation in diabetes mellitus and ageing. *Biochem J*1987;245:243-250

140- Hunt JV,Smith CCCT,Wolff SP. Autooxidation glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes* 1990;39:1420-1424

141-Grandheer SK,Monnier VM. Mechanism of formation of the maillard protein crosslink pentosidine,glucose,fructose and ascorbate as pentosidine precursors. *J Biol Chem* 1991;266:11649-11653

142-Bohlen HG,Lash JM. Topical hypoglycemia rapidly suppresses EDRF mediated vasodilatation of normal rat arteriols *Am J Physiol* 1993;265:H219-H225

143-Tolins SP,Shultz PJ,Raj L,Brown DM,Mauer SM. Abnormal renal hemodynamic response to reduced renal perfusion pressure in diabetic rats:Role of NO. *Am J Physiol* 1993;265:H886-895

144-Nyengaard JR,Chang K,Berharst S,Reiser KM,Williamson JR,Tilton RG. Discordant effects of guanides on renal structure and function on renal

vascular dysfunction and collagen changes in diabetic rats. *Diabetes* 1997;46:94-106

145-Mackay K, Kondaiah P, Danielpour D, Austin HA III, Brown PD. Expression of transforming growth factor B1 and B2 in rat glomerulus. *Kidney Int* 1990;38:1095-1100

146-Craven PA, Derubertis FR, Melhem M. Nitric oxide in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1997;52:S46-S53

147- Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *NEJM* 1988;318:1315-21

148-Brownlee M, Cerami A. The biochemistry of the complications of diabetes mellitus. *Annu Rev Biochem* 1981;50:385-392

149- Brownlee M, Vlassara H, Cerami A. Non-enzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann Intern Med* 1984;101:527-37

150-Witzum JL, Mahoney EM, Banks MJ. Non-enzymatic glycosylation of low-density lipoprotein alters its biochemical activity. *Diabetes* 1982;3:283-91

151-Gillery P, Monboisse JC, Maquart FX, Borel JP. Glycation of proteins as a source of superoxide. *Diab Metab* 1988;14:25-30

152- Reddy S, Bichter J, Wells-Knecht KJ, Thorpe SR, Baynes JW. N (carboxymethyl)lysine is a dominant advanced glycation end products (AGE) antigen in tissue proteins. *Biochemistry* 1995;34:10872-78

153-Nyorage FG, Sayre LM, Monnier VM. Detection of glucose derived pyrrole compounds during maillard reaction under physiological conditions. *Carbohydrate Res* 1987;167:211-220

154 Ahmed MU, Thorpe SR, Baynes JW. Identification of N<sup>ε</sup> (carboxymethyl)lysine as a degradation product of fructolysine in glycated protein. *J Biol Chem* 1986;261:4889-4894

155-Wells-Knecht KJ, Zyzak DV, Litchfield JE, Thorpe SR, Baynes JW. Mechanism of autooxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry* 1995;34:3702-3709

156-Walf SP, Dean RT. Glucose autooxidation and protein modification. The potential role of autooxidative glycosylation in diabetes. *Biochem J* 1987;245:243-250

157- Chang JCF, Ulrich PC, Bucala R, Cerami A. Detection of an advanced glycosylation product bound to protein insitu. *J Biol Chem* 1985;260:7970-74

158-Niwa T, Takeda N, Miyazaki H, Yoshirami A, Tatematsu K, Maeda M, Ohara S, Tomiyama S, Niimora K. Elevated serum levels of 3-deoxyglucosone, a potent cross-linking intermediate of maillard reaction in uremic serum. *Nephron* 1995;69:438-443

159- Vlassara H, Bucala R. Advanced glycation and diabetic complications: an update. 1995 *Diabetes Annual* 9 in Marshall SM, Home PD, Rizza RA eds. pp 227-244

160- Engerman RL, Kern TS. Progression of incipient diabetic retinopathy during good glycemic control. *Diabetes* 1987;36:808-812

161-Brownlee M. Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications. *Diab Care* 1992;15:1835-1843

162-Tanaka S, Avigad G, Badosky B, Eikenberry EF. Glycation in diabetes extends of the molecular packing of collagen. *J Mol Biol* 1988;203:495-505

163-Makita Z, Rudoff S, Royfield EJ, Yang Z, Skolnik E, Delony V, Friedman EA, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycation end products in patients with diabetic nephropathy. *NEJM* 1991;325:836-842

164-Makita Z, Vlassara H, Cerami A, Bucala R. Immunochemical detection of advanced glycosylation end products in vivo. *J Biol Chem* 1992;267:5133-5138

165-Knecht KJ, Feather MS, Baynes JW. Detection of 3-deoxyglucosone in human plasma for intermediate stages of the maillard reaction in vivo. *Diabetes* 1992;41(suppl 1):23A

166-Vogt BW, Schleicher E, Wieland OH. Aminolysine bound glucose in human tissues obtained at autopsy: increase in diabetes mellitus. *Diabetes* 1982;31:1123-1127

167-Brownlee M, Pongor S, Cerami A. Covalent attachment of soluble proteins by nonenzymatically glycosylated collagen: role in the in situ formation of immune complexes. *J Exp Med* 1983;158:1739-1744

168- Brownlee M, Vlassara H, Cerami A. Non-enzymatic glycosylation products on collagen covalently trap low-density lipoprotein. *Diabetes* 1985;34:938-941

169- Bucala R, Makita Z, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H. Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90:6434-6438

170-Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, Ulrich P, Cerami A. Aminoguanidin prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science* 1986;232:1629-1632

171-Labec G, Pollak A. Reduced susceptibility of non-enzymatically glycosylated glomerular basement membrane to proteases: is thickening of glomerular basement membrane due to reduced proteolytic degradation? *Renal Physiol* 1980;3:4-8

172- Tarsio JF, Reger LA, Furcht LT. Decreased interaction of fibronectin, type IV collagen and heparin, due to non-enzymatic glycosylation. Implications for diabetes mellitus. *Biochemistry* 1987;26:1014-1020

173- Charonis AS, Reger LA, Dege JE, Kouzi-Koliakis K, Furcht LT, Wohlheuter RM, Tsilibary EC. Laminin alterations after in vitro nonenzymatic glycosylation. *Diabetes* 1990;39:807-14

174-Klein DJ, Oegama TR, Brown DM. Release of glomerular heparan 35-SO<sub>4</sub> proteoglycan heparin from glomeruli of streptozocin induced diabetic rats. *Diabetes* 1989;38:130-139

175- Rohbrach DH, Hassel JR, Kleinman HK, Martin GR. Alterations in basement membrane (heparan sulfate) proteoglycan in diabetic mice. *Diabetes* 1982;31:185-188

176-Haitoglou CS, Tsilibary EC, Brownlee M, Charonis AS. Altered cellular interactions between endothelial cells and non enzymatically glycosylated laminin/type IV collagen. *J Biol Chem* 1992;267:12404-12407

177-Bucala R, Tracey KJ, Cerami A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest* 1991;87:432-438

178- Hogan M, Cerami A, Bucala R. Advanced glycosylation end products block the antiproliferative effects of nitric oxide. *J Clin Invest* 1992;90:1110-1115

179-Wolffenbutel BH, Boulanger CM, Crijins FR, Huijberts MS, Poitevin P, Swennen GN, Veson S et al. Breakers of advanced glycation end products restore large artery properties in experimental diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;8:4630-4634

180- Vlassara H, Brownlee M, Cerami A. Novel macrophage receptor for glucose modified proteins is distinct from previously described scavenger receptors. *J Exp Med* 1986;164:1301-1309

181- Vlassara H, Brownlee M, Cerami A. High affinity receptor mediated uptake and degradation of glucose-modified proteins: a potential mechanism for the removal of senescent macromolecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:5588-5592

182- Li YM, Mitsuhashi T, Wajciechowicz D, Shimizu N, Li J, Stitt AA, He CJ, Banerjee D, Vlassara H. Molecular identity and cellular distribution of

advanced glycation end product receptors:relationship of p60,OST-40 and p90 to 80 k-h membrane proteins. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:11047-11052

183-Vlassara H, Brownlee M, Monoque K, Dinarella CA, Parsaguin A. Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose modified proteins: role in normal tissue remodeling Science 1988;240:1546-1548

184-Kirstein M,Aston C,Hintz R,Vlassara H. Receptor specific induction of insulin like growth factor 1 in human monocytes by advanced glycosylation end product-modified protein. J Clin Invest 1992;90:439-446

185- Le J, Vilcek J. Tumor necrosis factor alpha and interferon 1: cytokines with multipl overlapping biochemical activities. Lab Invest 1987;56:234-248

186-Dio T, Vlassara H, Kirstein M, Yamada Y, Striker GE,Striker LJ. Receptor specific increase in extracellular matrix production in mouse mesengial cells by advanced glycation end products is mediated via platelet derived growth factor. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:2873-2877

187- Bucala R, Model P, Cerami A. Modifications of DNA ase reducing sugars: a possible mechanism of nucleic acid aging and age related dysfunction in gene expression. Proc Natl Acad Sci 1984;81:105-109

188- Lee AT, Cerami A. Elevated glucose 6- phosphate levels are associated with plasmid mutations in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:8311-8314

189- Lorenzi M, Montisono DF, Toledo S,Barreux A. High glucose and DNA damage in endotelial cell. J Clin Invest 1986;77:322-325

190-Giardino I, Edelstein D, Brownlee M. Non-enzymatic glycosylation invitro and in vascular endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity: A model for intracellular glycosylation in diabetes. J Clin Invest 1994;94:110-17

191-Monnier VM, Sell DR, Naganj RH. Maillard reaction mediated molecular damage to extracelular matrix and other proteins in diabetes, aging and uremia. Diabetes 1992;41:36-41

192-Makita Z, Bucal R, Royfield EJ, Friedman EA, Kaufnman AM, Korbet JM. Diabetic-uremic serum advanced glycation end products are chemically reactive and resistant to dialysis therapy. Lancet 1994;343:1519-1522

193- Foote EF, Look ZM,Giles P,Keene WF,Halstenson CE. The pharmacokinetics of aminoguanidine in end stage renal disease patients on hemodialysis. Am J Kidney Dis 1995;25:420-425

194- Miyata T, Strihou CVY, Kurokawa K Baynes JW. Alteration in nonenzymatic biochemistry in uremia: origin and significance of " carbonyl stress in long-term uremic complications. Kidney Int 1999;55:389-399

195- Bucala R, Makita Z, Vega G, Grandy S, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H. Modification of LDL by advanced glycation endproducts contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:9441-45

196-Sugiyama S, Miyata T, Horie K, Lida Y, Tsuyaki M, Tanaka H, Maeda K. Advanced glycation end products in diabetic nephropathy. Nephrol Dial Transplant 1996;11 (Suppl 5) S91-S94

197-Makino H, Shikata K, Hironaka K. Ultrastructure of non-enzymatically glycosylated mesangial matrix in diabetic nephropathy. Kidney Int 1995;48:517-526

198- Miyata S, Monnier VM. Immunochemical detection of advanced glycation end products in diabetic tissues using monoclonal antibody to pyrraline. J Clin Invest 1992;89:1102-1112

199- Niwa T, Katsuzuki, Miyazaki S, Miyazaki T, Ishizaki Y, Hayase F, Totemichi N, Takei Y. Immunochemical detection of imidazolone, a novel advanced glycation end product in kidneys and aortas of diabetic patients. J Clin Invest 1997;99:1272-1280

200-Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG. Increased accumulation of the glycoxidation product N (carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging J Clin Invest 1997;99:457-468

201-Monnier VM, Vishwanath V, Frank KA, Elmets CA, Douchot P, Kohn RR. Relation between complications of type 1 diabetes mellitus and collagen-linked fluorescence. NEJM 1984;314:403-408

202- Sakai H, Jinde K, Suzuki D, Yagame M, Nomoto Y. Localisation of glycosylated proteins in the glomeruli of patients with diabetic nephropathy. Nephrol Dial Transplant 1996;11 (Suppl 5):S66-71

203-Kirstein M, Aston C, Hintz R, Vlassara H. Receptor specific induction of insulin like growth factor-1 in human monocytes by activated glycation end product modified protein. J Clin Invest 1992;90:439-446

204-Beisswenger PS, Makita Z, Cerami A, Moore LL, Jean S, Brinck-Johnsen T, Bucala R, Vlassara H. Formation of immunochemical advanced glycation end products precedes and correlates with early manifestations of renal and retinal disease in diabetes. Diabetes 1995;44:824-829

205- Souli- Liparata T, Cooper M, Papazoglou D, Clark B, Jerums G. Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion and tissue fluorescence in streptozotocin-induced diabetic rat. Diabetes 1991;40:1328-1334

206-Lee BH, Cha MK, Sony KI, Kim JH, Lee EY, Kim SI, Kim J, Yoo MH. Pathogenic role of advanced glycosylation end products in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1997;52 (Suppl 5) S60- S65

207-Vlassara H, Striker LJ, Teichberg S, Fuh H, Li YM, Steffes M. Advanced glycosylation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:11704-11708

208- Yang CW, Vlassara H, Striker GE, Striker LJ. Administration of AGEs in vivo induces genes implicated in diabetic glomerulosclerosis. *Kidney Int* 1995;47(suppl 49) ppS35-S38

209- Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, Ulrich P, Cerami A. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science* 1986;232:1629-1632

210-Booth AA, Khalifah RG, Todd P, Hadson BG. In vitro kinetic studies of formation of antigenic advanced glycation end products (AGEs). *J Biol Chem* 1997;272:5430-5437

211-Oxlund H, Andreassen TT. Aminoguanidine treatment reduces the increase in collagen stability of rats with experimental diabetes mellitus. *Diabetologia* 1992;35:19-25

212-Edelstein D, Brownlee M. Mechanistic studies on advanced glycosylation endproduct inhibition by aminoguanidine. *Diabetes* 1992;41:26-29

213-Hammes H-P, Martin S, Federlin K, Geisen K, Brownlee M. Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc Natl Acad Sci* 1991;88:11555-11558

214- Hammes H-P, Ströder D, Weiss A, Bretzel RG, Federlin K, Brownlee M. Secondary intervention with aminoguanidine retards the progression of diabetic retinopathy in diabetic rat model. *Diabetologia* 1995;38:656-660

215-Miyauchi Y, Shikama H, Takasu T, Okamiya H, Umeda M, Hirasaki E. Slowing of peripheral motor nerve conduction was ameliorated by aminoguanidine in Streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Endocrinol* 1996;133:467-473

216-Kihara M, Schmelzer JD, Paduso JF, Curron GL, Nickander KK, Low PA. Aminoguanidine effects on nerve blood flow, vascular permeability, electrophysiology and oxygen free radicals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:6107-6111

217-Yagihashi S, Kamiyo M, Baba M, Yagihashi N, Naga K. Effect of aminoguanidine on functional and structural abnormalities in peripheral nerve of streptozotocin induced diabetic rats. *Diabetes* 1992;41:47-52



218-Huijberts MS, Wolffenbuttel BRH, Strujker Boudier HAS. Aminoguanidine treatment increases elasticity and decreases fluid filtration of large arteries from diabetic rats. *J Clin Invest* 1993;92:1407-1411

219-Rumble JR, Cooper ME, Soulis T, Cox A, Wu Z, Youssef S, Jasik M, Jerum G, Gilbert RE. Vascular hyperthrophy in experimental diabetes. *J Clin Invest* 1997;99:1016-1027

220-Soulis T, Cooper ME, Vranes D, Bucala R, Jerum G. Effects of aminoguanidine in preventing experimental diabetic nephropathy are related to the duration of treatment. *Kidney Int* 1996;50:627-634

221-Corvell JA, Tilton RG, Charg K, Hasan KS, Ido Y, Wang JL, Sweetland MA, Lancaster JR, Williamson JR, McDaniel MC. Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation, prevents diabetic vascular dysfunction. *Diabetes* 1992;41:552-556

222-Soulis T, Cooper ME, Sastra S, Thallas V, Panagiotopoulos S, Bjerrum OJ, Jerums G. Relative contributions of advanced glycation and nitric oxide synthase inhibition to aminoguanidine mediated renoprotection in diabetic rats. *Diabetologia* 1997;40:1141-1151

223-Sugimoto H, Shikata K, Wada J, Horiuchi S, Makino H. Advanced glycated endproducts-cytokine-nitric oxide sequence pathway in the development of diabetic nephropathy: Aminoguanidine ameliorates the overexpression of tumor necrosis factor  $\alpha$  and inducible nitric oxide synthase in diabetic rat glomeruli. *Diabetologia* 1999;42:878-886

224-Monnier VM. Aminoguanidine and diabetic neuropathy. *Eur J Endocrinol* 1996;134:398-400

225-Raele E, Luciano L, Kühn K. Cationic dyes reveal proteoglycans on the surface of epithelial and endothelial kidney cells. *Histochemistry* 1985; 82:513-518

226-Schumacher U, Adam E: Standardization of staining in glycosaminoglycan histochemistry: alcian blue it's analogues and diamine methods. *Biothecnic and biochemistry* 69 : 18-24,1994

227-Bertani T, Gambarà V, Remuzzi G: Structural basis of diabetic nephropathy in microalbuminuric NIDDM patients: a light microscopic study *Diabetologia* 39:1625-28,1996

228-Pirani CL: Evaluation of Kidney biopsi specimens in Renal Pathology, Edited by Tisher CC, Brenner BM, Philadelphia , Lippincott company 1989,pp 1-31

229-Mauer S, Steffes MW, Ellis EN, Sutherland ER, Brown DM, Goetz FC. Structural-functional relationship in diabetic nephropathy. *J Clin Invest* 74:1143-55,1984

230- Levin M, Smith C, Walters MDS, Gascoine P, Barratt TM. Steroid responsive nephrotic syndrome: a generalised disorder of membrane negative charge. *The Lancet* 2:239-242,1985

231-Beutler E, Weat C, Blume KG: Removal of leucocytes and platelets from whole blood .*J Lab Clin Med* 88:328-333,1976

232-Jong JGN, Wavera RA, Laarakkers C, Poorthula BJHM. Dimethylene blue based spectrophotometry of glycosaminoglycans in untreated urine : a rapid screening procedure for mucopolisaccharidosis: *Clin Chem* 35:1472-77,1989

233-Yamauchi A, Taka I, Makata Z, Hakamoto S, Ohani N, Kiguchi H: Effects of aminoguanidine on serum AGE ,urinary albumin excretion mesangial expansion and glomerular basement membrane thickening in Otsuka Long Evans Tokushima fatty rats. *Diabetes Res Clin Pract* 34:127-30,1997

234-Reddi AS. Glomerular and urinary glycosaminoglycans in diabetic rats. *Clinica Chemica Acta* 189:211-220,1990

235-Gambaro G, Baggio B, Cicerello E, Mastrosimone S, Marzaro G, Basatti A, Crepaldi G: Abnormal erythrocyte charge in diabetes mellitus, link with microalbuminuria. *Diabetes* 37:745-48,1988

236-Reddi AS: Prevention of albuminuria by captopril in diabetic rats. *Gen Pharmacol* 22:323-328,1991

237- Gambaro G, Cavazzana AO,Luzi P. Glycosaminoglycans prevent morphological renal alterations and albuminuria in diabetic rats. *Kidney Int* 1992;42:285-291

238-Cook HC. *Carbohydrates: Theory and Practice of Histologic thecniques*, London ,Curchill Livinstone Inc ,1990,177-251

239-Rohrbach R. Reduced content and abnormal distribution of anionic sites (acid proteoglycans) in the diabetic glomerular basement membrane. *Virchows Arch.*51:127-135,1986

240- Itakura M, Yaohikawa H, Bannai C, Kato M, Kunika K, Kawakami Y, Yamaoka T, Yamashita K. Aminoguanidin decreases urinary albumin and high molecular weight proteins in diabetic rats. *Life Sci* 1991;49:889-897

241-Huijberts MS,Wolffenbuttel BH,Crijns FR,Nieuwenhuijzen Kruseman AC, Bemelmans MH, Struijker Bouldier HA. Aminoguanidine reduces regional albumin clearance but not urinary albumin excretion in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 1994;37:10-14

242- Oturai PS, Rasch R, Hasselager E, Johansen PB, Yokoyama H, Thomsen MK, Myrup B, Kofoed-Enevoldsen A,Deckert T. Effects of heparin

and aminoguanidine on glomerular basement membrane thickening in diabetic rats. *APMIS* 1996;104:259-264

243-Reddi AS, Ramamurti R, Miller M, Dhuper S, Lasker N. Enalapril improves albuminuria by preventing glomerular loss of heparan sulfate in diabetic rats. *Biochem Med and Metabol. Biol* 1991;45:119-131

244-Gambaro G, Cicerollo S, Mastrosimone S, Lavagnini T, Baggio B. High urinary excretion of glycosaminoglycans: a possible marker of glomerular involvement in diabetes. *Metabolism* 1989;38:419-420

245-Gambaro G, Venturini AP, Noovan DM, Fries W, Giuliana RE, Garbisa S, et al. Treatment with a glycosaminoglycan formulation ameliorates experimental diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1994;46:797-806

246-Adler S. Structure-functional relationship in diabetic nephropathy: Lessons and limitations. *Kidney Int* 1997;52:S42-S45

