

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**STZ (STREPTOZOTOSİN) İLE DİYABET OLUŞTURULMUŞ
RATLARIN BÖBREK DOKUSUNDA SİLİNGERİNİN HIF-1
(HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR-1 ALPHA) VE TLR-2 (TOLL
LIKE RECEPTOR 2) GENLERİNİN mRNA DÜZEYLERİNE
ETKİSİ**

Tuğba SEMERCİ SEVİMLİ

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK

**Bu Tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından 4397-D1-15 proje numarası ile desteklenmiştir
Tez. No: ...**

ISPARTA-2016

KABUL ve ONAY SAYFASI

Sa lık Bilimleri Enstitü Müdürlü üne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sa lık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı** çerçevesinde yürütülmü olan bu çalı ma, a a ıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmi tir.

Tez Savunma Tarihi: 09/02/2016

- Tez Danı manı : Prof. Dr. Nurten ÖZÇEL K
Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji A.D.
- Üye : Prof. Dr. rfan DE RMENC
Eski ehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji A.D.
- Üye : Doç. Dr. Nilüfer AH N CALAPO LU
Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji A.D.
- Üye : Yrd. Doç. Dr. Pınar ASLAN KO AR
Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji A.D.
- Üye : Yrd. Doç. Dr. Dilek BAYRAM
Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji A.D.

ONAY: Bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmü ve kabul edilmi tir.

Doç. Dr. Mustafa KAYAN
Enstitü Müdürü

BEYAN

“STZ (Streptozotosin) ile Diyabet Olu turulmu Ratların Böbrek Dokusunda Silibinin’in HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor-1 Alpha) ve TLR-2 (Toll Like Receptor 2) Genlerinin mRNA Düzeylerine Etkisi” adlı Doktora tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Sa lık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmı tır.

Tezi Hazırlayan

Tu ba SEMERC SEV ML

mza

Danı man

Prof. Dr. Nurten ÖZÇEL K

mza

ÖNSÖZ

Tez çalışmaları ve doktora eğitim sürecinde, bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen ve her konuda bana yardımcı olan danışman hocam ve Tıbbi Biyoloji A.D. Başkanı Sayın Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK'e,

Yatay geçiş yaptığım Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D.'deki hocaları; Prof. Dr. Hasan Veysi GÜNE, önceki danışmanım Prof. Dr. İrfan DEMİRCİ, Doç. Dr. Hülyam KURT'a

Hayvan deneylerinde yardımlarını esirgemeyen Turgut KURT, Özgür Gör. İbrahim ONARAN'a,

Deneyin sonlandırılmasında yardımlarını esirgemeyen Histoloji ve Embriyoloji A.D. Araştırma Görevlisi Aydın CANDAN'a,

Genetik çalışmalarının yapılmasında öncelikle Uzman Hüseyin PAK ve tüm ATQ Biyoteknoloji ailesine,

Anabilim dalımızdaki öğretim üyeleri; Doç. Dr. Nilüfer AKHIN, CALAPOLU ve Yrd. Doç. Dr. Pınar ASLAN KOCAR'a

Bugünlere gelmemi sağlayan maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen annem ve babamı,

Teşekkürün en büyüğü; çalışmamın ilk aşamasından itibaren, gerek Genetik ve Histoloji çalışmalarımda, gerekse hayattaki her alanda beni destekleyen ve yardımlarını esirgemeyen, aynı zamanda yol arkadaşım olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi ve İlim Dr. Murat SEVİMLİ'ye ve canımız olsun Ahmet Umut SEVİMLİ'ye can-ı gönülden teşekkürlerimi sunarım.

Tuğba SEMERCİ SEVİMLİ

Isparta, 2016

E ime ve o luma ithaf ediyorum...

Saygılarımla...

Isparta, 2016

TE EKKÜR

Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Ara tırma Projeleri Koordinasyon Birimine 4397-D1-15 no'luprojemi desteklediklerinden dolayı,

Sa lık Bilimleri enstitüsü personeli Nergiz AH N'e katkısı, insanlı ı ve yardımlarından dolayı ayrıca te ekkür ederim.

Ç NDEK LER

KABUL ve ONAY SAYFASI.....	ii
ÖNSÖZ.....	iv
TE EKKÜR	vi
Ç NDEK LER	vii
S MGELER ve KISALTMALAR D Z N	vii
TABLolar D Z N	x
EK LLER D Z N	xi
GRAF KLER D Z N	xii
RES MLER D Z N	xiii
1. G R	1
2. GENEL B LG LER.....	2
2.1. Pankreas.....	2
2.2. Diabetes Mellitus.....	3
2.2.1. Diabetes Mellitus Tanımı ve Tarihçesi.....	3
2.2.2. Diabetes Mellitusun Epidemiyolojisi	4
2.2.3. Diabetes Mellitusun Sınıflandırılması	5
2.2.4. Diabetes Mellitusun Tanısı	7
2.2.5. Diabetes Mellitusun Komplikasyonları	8
2.2.5.1. Diyabetik Nefropati.....	10
2.3. Böbrek	12
2.3.1. Böbre in Histolojisi.....	12
2.4. HIF (Hipoksi le ndüklenen Faktör).....	13
2.5. TLR	16
2.5.1. TLR-2	17
2.6. Fitoterapi	19
2.6.1. Diyabet Tedavisinde Fitoterapinin Yeri	20
2.7. Silybum Marianum L. (Deve Dikeni, Meryemana Dikeni)	21
2.7.1. Silibinin.....	22
2.7.2. Silibinin'in Koruyucu Etkileri.....	23
2.7.2.1. Kanser Üzerine Etkisi	23
2.7.2.2. Silibininin Kanser Tedavisinde Etkisi.....	25

2.7.2.3. Silibinin'in Gastrointestinal Sistemdeki Etkisi	26
2.7.2.4. Silibinin'in Diyabet Üzerine Etkisi	27
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	29
3.1. Gereç	29
3.1.1. Deney Hayvanları	29
3.1.2. Kullanılan İlaçlar	30
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	30
3.1.4. Ekipmanlar.....	31
3.1.5. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları	32
3.2. Yöntem	32
3.2.1. Deney Planı.....	32
3.2.2. Streptozotocin ile Diyabet Modeli.....	34
3.2.2.1. Streptozotocinin Yapısı ve Etki Mekanizması.....	34
3.2.2.2. Diyabet Oluşumu	34
3.2.2.3. Kan Glukoz Değerlerinin Ölçümü	34
3.2.2.4. Kilo Ölçümleri	35
3.2.3. Doku Takip Çalışmaları.....	35
3.2.4. Moleküler Çalışmalar	37
3.2.4.1. Yöntem.....	37
3.2.4.1.1. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR).....	38
3.2.4.1.2. Dokudan RNA Elde Edilmesi	39
3.2.4.1.3. RNA Konsantrasyonunun Ölçümü.....	41
3.2.4.1.4. cDNA Eldesi.....	42
3.2.4.1.5. RT- PCR Reaksiyonunun Hazırlanması	42
3.2.5. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler	45
4. BULGULAR	46
4.1. Histolojik Bulgular	46
4.2. Moleküler Bulgular	52
5. TARTIŞMA	68
SONUÇ ve ÖNERİLER.....	77
ÖZET.....	79
ABSTRACT.....	80
KAYNAKLAR	81
ÖZGEÇM	94

S İMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

DM	: Diabetes Mellitus
BGT	: Bozulmuş Glukoz Toleransı
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
TURDEP	: Türkiye Diyabet Epidemiyolojisi
HIF	: Hipoksi ile İndüklenen Faktör
HRE	: Hipoksi Response Element
TLR	: Toll benzeri reseptör
i.p.	: İnterperitoneal
PAMP	: Patojen İlişkili Moleküler Oluşumlar
HMGB1	: High Mobility Grup B1 Protein
HSP	: Isı Şok Protein
HOMA-IR	: Homeostazi Model Değerlendirme- İnsülin Direnci
GLUTs	: Glukoz Taşıyıcıları
PPAR	: Peroksizom Prolifere Aktive Reseptör
CDX2	: Caudal-Tip Homeobox Transkripsiyon Faktör
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa B
STAT	: Sinyal İleticisi ve transkripsiyon aktivatörü
IGFBP-3	: İnsülin-Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Protein-3
CXCR4	: C-X-C Kemokin Reseptör Tip 4
VEGF	: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
hs-CRP	: Yüksek-Duyarlı C-Reaktif Protein
TMIP	: Doku Metalloproteinaz İnhibitörü
GIP	: Glukoz-Bağımlı İnsülinotropik Polipeptid
CRP	: C-Reaktif Protein
AGE	: İleri Glikasyon Son Ürünü
IL	: İnterlökin

TABLULAR D Z N

Tablo 1. Çalı mada yer alan gruplar.....	32
Tablo 2. cDNA sentezi için kullanılan karı ım içeri i.....	42
Tablo 3. Bir reaksiyonluk PCR komponent karı ımı	42
Tablo 4. Kat de i imi de erleri	61
Tablo 5. p de eri.....	62

EK LLER D Z N

ekil 1. Böbre in yapısal organizasyonu.....	13
ekil 2. nsandaki HIF-1 ve HIF-1 'nın yapısı	14
ekil 3. nsan TLR-2 geninin kromozomal yerle imi.....	18
ekil 4. Silibinin'in kimyasal yapısı.....	23
ekil 5. Çalı madaki deney grupları.	29
ekil 6. Gastrik gavaj ile Silibinin verilmesi.	33
ekil 7. Moleküler çalı ma yöntemi	37
ekil 8. SYBR Green boyasının DNA'ya ba lanması	38
ekil 9. Çalı mada dokuların parçalanması için kullanılan parçalayıcı	41
ekil 10. Çalı mada kullanılan Nanodrop spektrofotometre	41
ekil 11. PCR karı ımlarının rotor disk kuyucuklarına yüklenmesi	43
ekil 12. Ara tırmada kullanılan RT-PCR cihazı	44
ekil 13. RT-PCR çalı ması sırasında verilerin elde edilmesi	44
ekil 14. Beta actin geni erime e risi.	53
ekil 15. TLR-2 geni erime e risi.....	54
ekil 16. HIF 1 geni erime e risi.	55
ekil 17. Beta actin geni amplifikasyon e risi.....	56
ekil 18. TLR 2 geni amplifikasyon e risi.	57
ekil 19. HIF 1 geni amplifikasyon e risi.	58
ekil 20. Gen ifadesi seviyelerinin renk ölçe i ile gösterilmesi	64

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. Grupların $2^{-\Delta\text{Ct}}$ de ğerleri	61
Grafik 2. Grupların kontrol grubuna göre kat de ğeri	62
Grafik 3. Grupların kontrol grubuna göre p de ğerleri	63
Grafik 4. Grupların kontrol grubuna göre up-down regülasyonları	63
Grafik 5. Grup1-Kontrol kar ıla tırmalı saçılım e risi	64
Grafik 6. Grup 2-Kontrol kar ıla tırmalı saçılım e risi	65
Grafik 7. Grup 3-Kontrol kar ıla tırmalı saçılım e risi	65
Grafik 8. Grup 4-Kontrol kar ıla tırmalı saçılım e risi	66
Grafik 9. Grup1- Grup 2 kar ıla tırmalı saçılım e risi	66
Grafik 10. Grup1- Grup 3 kar ıla tırmalı saçılım e risi	67
Grafik 11. Grup1- Grup 4 kar ıla tırmalı saçılım e risi	67

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Kontrol grubuna ait sıçan böbrek kesitinin normal histolojik görünümü... 47	47
Resim 2. Kontrol grubuna ait sıçan böbrek kesitinin normal histolojik görünümü... 47	47
Resim 3. Diyabet grubuna ait sıçan böbrek kesitinin histolojik görünümü..... 48	48
Resim 4. Diyabet grubuna ait sıçan böbrek kesitinin histolojik görünümü..... 48	48
Resim 5. Diyabet + Silibinin 100µg/kg grubuna ait sıçan böbrek kesitinin histolojik görünümü 49	49
Resim 6. Diyabet + Silibinin 100µg/kg grubuna ait sıçan böbrek kesitinin histolojik görünümü. 499	499
Resim 7. Diyabet + Silibinin 200µg/kg grubuna ait sıçan böbrek kesitinin histolojik görünümü 50	50
Resim 8. Diyabet + Silibinin 200µg/kg grubuna ait sıçan böbrek kesitinin histolojik görünümü 50	50
Resim 9. Silibinin grubuna ait sıçan böbrek kesitinin normal histolojik görünümü. 51	51
Resim 10. Silibinin grubuna ait sıçan böbrek kesitinin normal histolojik görünümü. 51	51

1. G R

Diabetes mellitus (DM); insülin salgısının eksikliği ve/veya insülin direnci ile oluşan, karbohidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki bozukluklar ile karakterize bir hastalıktır. Diyabetik hastaların çoğu iki büyük grupta yer almaktadır. Tip 1 diyabet, otoimmün veya bilinmeyen nedenlerle ortaya çıkarken; tip 2 diyabet, insülin salgısında bozulma ve/veya insülin direnci nedeni ile insülin etkisinde azalma ile kendini göstermektedir (1).

Diyabetik hastalarda enfeksiyonlara yakalanma sıklığı yüksektir. Bu durumun en önemli nedenleri; bağışıklık sistemi bozukluğu, nöropati ve damar yapılarında meydana gelen bozukluklardır. TLR (Toll benzeri reseptör)'ler çeşitli patojen ajanlara karşı doğal immün cevabın oluşumunda NF-kB (Nükleer faktör kB) ve interferon düzenleyici faktör bağımlı sinyal yollarını aracılığıyla rol oynayan transmembran proteinlerdir (2). İnflamasyon ve infeksiyon alanlarında doku metabolizmasında çeşitli değişiklikler gözlenir. Bu değişikliklerin sonucu olarak da hipoksi gözlenmektedir. HIF (Hipoksi ile indüklenen faktör) memeli hücrelerinde bulunan bir transkripsiyon faktörüdür ve hücrelerin hipoksiye karşı verdiği cevaplarda önemli roller üstlenmektedir. Hücreler azalmı oksijen konsantrasyonlarına artan HIF aktivitesi ile cevap vermektedir. Bunun sonucunda; kanser gelişimi, anjiyogenezis, hücre sağ kalımı, glukoz metabolizması ve invazyon ile ilişkili birçok genin ekspresyonu artmaktadır. HIF aracılığıyla bu değişen gen ekspresyonlarının ise kronik böbrek hasarında etkili olduğu görülmektedir (3). Silibinin, *Silybum marianum* (Deve dikeni) adı verilen bitkiden elde edilen bir flavanoiddir. Hücre koruyucu, antiinflamatuar, antikanserojen, antioksidan etkileri olan ve proteüniyi azalttığı bilinen bu etken madde, çalışmamızda kullanmayı planladığımız fitoterapötik ajandır (4).

Bu çalışmamızın amacı, deneysel olarak diyabet oluşturulan sıçanların böbrek dokularında Silibinin'in, HIF-1 (Hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa) ve TLR-2 (Toll benzeri reseptör) genlerinin ekspresyon düzeyleri etkisini inceleyip histokimyasal olarak da göstermektir.

2. GENEL B LG LER

2.1. Pankreas

Pankreas; üzüm salkımı ekinde, ba , gövde ve kuyruktan olu an uzun bir bezdir. Ba bölümü, duedonumun C- ekilli kıvrımında yer alan geni bir parçasıdır. Gövde merkezi yerle imlidir ve insan vücudunun orta hattını kateder. Kuyruk, dala ın hilusuna uzanır. Bezin çevresinde ince bir ba dokusu kapsül olu turur. Bu kapsülden çıkan septumlar, organı belirgin olmayan lobüllere ayırmaktadır. Lobüllerin arasında ba dokusu, büyük kanalları, kan damarlarını ve sinirleri çevreler. Ayrıca pankreatik kanalı çevreleyen ba dokusunda kanala bo alan küçük müköz bezler ulunmaktadır (5).

Pankreas ekzokrin ve endokrin bir bezdir. Bu iki fonksiyon yapısal olarak farklı iki bölüm tarafından yerine getirilmektedir. Ekzokrin bölüm; ba ırsaktaki sindirim için gerekli enzimleri sentezleyip duedonuma salgılar. Endokrin bölüm, Langerhans adacıklarından olu maktadır. Her bir adacık birkaç hücre veya yüzlerce hücre içermektedir ve pankreas hacminin %1-2'sini olu turmaktadırlar. Adacıklar, hemotoksilen-eozin ile boyanımı kesitlerde soluk boyanımı hücre kümeleri halinde görülmektedirler. Bu boyamalar ile adacıklardaki hücre tiplerini belirlemek imkansızdır. Bazı özel boyamalardan sonra A (alfa), B (beta), D (delta) olmak üzere üç tipini tanımlamak mümkün olabilmektedir. A hücreleri; adacık popülasyonunun %15-20'sini olu turup glukagon hormonu salgırlar. D hücreleri; pankreatik endokrin dokunun %5-10'unu olu turup somatostatin hormonunu salgırlar. B hücreleri; adacık hücrelerinin %70'ini olu turur ve insülin salgırlar. nsülinin yoklu u ya da yetersiz miktarda olması, kan glukoz seviyesinin yükselmesine ve idrarda glukoz bulunmasına yol açtı ından bu durum diyabetes mellitus (DM) olarak bilinmektedir (5).

2.2. Diabetes Mellitus

2.2.1. Diabetes Mellitus Tanımı ve Tarihçesi

M.S. ikinci yüzyıl civarlarında Kapodokya’da yaayan Aretaeus tarafından a ırı idrar, a ırı su iste i ve beraberinde kilo kaybı gibi özellikler gösteren hastalardaki bulgular ilk defa, eriyip giden anlamına gelen “diyabet” kelimesi ile adlandırılmı ır. Ancak bu hastalı ın daha önceki dönemlerde de bilindi ine yönelik kanıtlar bulmak mümkündür. Bunlardan en eskileri M.Ö. 1500’lü yıllarda diyabete benzer klinik tablonun tarif edildi i eski mısır yazıtları kabul edilebilir. Ayrıca diyabetteki duruma benzer bulguların eski hint uygarlı ına ait medikal kaynaklarda yer aldı ı ve “tatlı idrar hastalı ı” olarak bahsedildi i bilinmektedir. Yine büyük tıp bilgini bni Sina, günümüzdeline yakın bir tanımlama ile hastalı ı ve özellikle bu hastalarda görülebilen diyabetik ülseri ilk defa tanımlayan ki i olmu tur (6).

17. yy’da ngiliz Tıp Adamı Thomas Willis, bu hastalarda idrarın tatlı oldu u bulgusunu yeniden gündeme getirerek hastalı ı ekerli diyabet anlamı ta ıyan “diabetes mellitus” (DM) olarak adlandırmı ve bu adlandırma halen kullanılmaktadır (7). Ancak her ne kadar diyabet hastalarındaki idrarın tatlı oldu u bilinse de, bu tadın idrardaki glukozdan kaynaklandı ı 18. yy’da yine bir ngiliz hekim Matthew Dubson tarafından kanıtlanmı tır. Yine aynı dönemlerde Fehling tarafından idrarda kantitatif eker tespit yöntemi geli tirilmi tir (8).

1800’lü yıllarda Oskar Minkowski ve Joseph von Mering yaptıkları çalı mada pankreasını çıkardıkları bir köpekte susama, sık idrara çıkma, kilo kaybı ve hiperglisemili bulgular göstermi tir. Böylelikle hem pankreasın ya am için gerekli oldu u gösterilmi , hem de ilk defa diyabet hastalı ı ve pankreas arasındaki ili ki kanıtlanmı tır (9). Bunun ardından pankreas üzerine yapılan çalı malar artmı tır. İlk defa aynı yüzyılda Paul Langerhans, pankreas kesitlerinde küçük hücre kümeleri oldu unu tanımlamı tır. ekilleri nedeniyle buradaki hücreleri sinir sisteminin birer üyesi olarak tanımlamı tır (10), ancak bu hücre kümelerinin pankreas endokrin hücrelerini içerdi i ve diyabetle ili kisi oldu u fikri Eduard Laguesse tarafından ortaya atılmı tır (11).

insülin hormonu ise ilk defa Frederic Banting ve ekibi tarafından 1920'li yılların sonunda tanımlanmıştır (12). Ardından James Bertram Collip, 1922 yılında ilk defa pankreatik ekstraktlardan insülin izolasyonu gerçekleştirmiştir (13). İlk defa insülin amino asit dizilimi Frederic Sanger tarafından 1950'li yılların ortasında keşfedilmiştir. Kimya dalında Nobel ödülü kazandıran bu buluş sayesinde insülinin klinik kullanıma girmesi adına büyük bir adım atılmıştır (14). Bu gelişmenin ardında 1982 yılında rekombinant DNA teknolojisi ile ilk defa insan insülini üretimi gerçekleştirilmiştir. Bundan önce, diyabet tedavisinde domuz ve sıçır pankreaslarından izole edilen insülin kullanılmaktaydı (13).

Diyabet insülin sekresyonu ve/veya insülin etkisinde meydana gelen kusur nedeniyle gelişen, hiperglisemik tabloyla seyreden bir grup metabolik hastalığın ortak adıdır. Kronik hipergliseminin, uzun dönemde farklı organlarda meydana getirdiği hasarlar nedeniyle diyabet ayrıca önemli bir mortalite ve morbidite nedenidir (15). Diyabette gözlenen metabolik bozukluklar insülinin önemli bir anabolik hormon olması nedeniyle gözlenmektedir. Yetersiz seviyelerdeki insülin veya bu hormona karşı özellikle iskelet kası ve yağ dokusu gibi dokularda; insülin reseptörleri, sinyal iletimi, efektör enzimler veya genlerde meydana gelen anormalliklerden insülin direnci sorumludur. Giderek artan görülme oranları ile de çağımızın salgını olarak kabul edilmektedir (1).

2.2.2. Diabetes Mellitusun Epidemiyolojisi

Diyabet epidemiyolojisi dünya üzerinde bölgesel farklılıklar göstermektedir. Orta Doğu ve Kuzey Afrika gibi bölgeler özellikle yeti kinler arasında diyabetin % 10.9'luk oranı ile en sık görüldüğü yerlerdir. Batı Pasifik ülkeleri ise genel anlamda % 37.5'lik oran ile diyabetin en sık görüldüğü bölgedir (1).

Yaşam tarzı değişimleri ve globalleşme; özellikle son elli yılda toplumlar, politik sistemler, çevre ve insan davranışları üzerinde ciddi değişimler meydana getirmiştir. Hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde diyabet ve obezite bu değişimlere paralel olarak giderek yaygınlaşmıştır. Uluslararası Sağlık Kuruluşları'nca diyabet artık global bir salgın olarak tanımlanmakta ve hem insan

sa lı ı hem de ÷lke ekonomileri açısından ciddi bir tehdit olarak kabul edilmektedir. Diyabetik epidemiyoloji ve sonuçları hastalı ın karma ık genetik ve epigenetik sistem ile davranı sal ve çevresel etkileri içeren kompleks toplumsal yapı arasındaki etkile imin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (16).

Uluslararası Diyabet Fedarasyonu 2010 yılı verileri dñya çapında 300 binden fazla diyabet hastası oldu unu ve 2030 yılı itibari ile bu sayının 500 bini a masının beklendi ini aıklamı tır (17). Dñya Sa lık Örgütü (WHO) de bu verileri do rulamakta ve diyabetik hasta sayısının her yıl %4 oranında arttı nı bildirmektedir (18). Diyabetin epidemiyolojisi üzerine etki eden di er faktörler hasta ya ı, cinsiyeti, etnik kökeni ve hastalı ın tipine göre de i iklik gösteren etyolojik faktördür (19). Tüm epidemiyolojik çalı malardan çıkarılabilecek ortak sonuç ise, bu hastalı ın dñya çapında görülme oranlarında tahmin edilemeyen ve önüne geçilemeyen artı ların olması sebebiyle halk sa lı ı açısından önemli bir sa lık sorunu olmasıdır. Uluslararası diyabet fedarasyonu verilerine göre diyabetin en sık gözlendi i 10 ÷lkeden dördü Asya'da yer almaktadır ve Asya global diyabet salgınının merkezi konumundadır. Diyabetik hastaların %80'i geli mekte olan ÷lkelerde ya ayan dü ÷k-orta gelir grubundaki insanlardan olu maktadır. Geli mi olan ÷lkelerde ise diyabet özellikle daha genç ya grubu arasında hızlı bir artı göstermektedir (16).

Ülkemizde 1997-1998 yıllarında yapılan Türkiye Diyabet Epidemiyolojisi (TURDEP-1) alı malarının sonuçlarına göre; tip 2 DM prevelansı % 7.2, bozulmu glukoz toleransı (BGT) sıklı ı % 6.7 oranında bulunmu tur. Yakın zamanda yayımlanan TURDEP-II alı masının sonucuna göre; ÷lke genelinde 20 ya üzeri 26.499 ki i incelenmi ve tip 2 DM sıklı ının geçen yıllara göre önemli derecede arttı ı ve %13.7'ye yükseldi i gözlenmi tir.

2.2.3. Diabetes Mellitusun Sınıflandırılması

Diyabetik bir hastada hastalı ın tipi tanı anında mevcut olan duruma ba lı olarak ekillenmektedir ve bu nedenle birçok hastanın herhangi bir sınıfa dahil olmasında zaman zaman zorluklar ya anabilmektedir. Amerikan diyabet

toplulu unun yaptı ı ve yaygın olarak kabul gören diyabet sınıflandırması u ekildedir (20) ;

1. Tip 1 diyabet
 - a. mmün aracılı
 - b. diopatik
2. Tip 2 diyabet
3. Di er spesifik tipler
 - a. Beta hücre fonksiyonlarını etkileyen genetik bozukluklar
 - b. nsülin etkisinde genetik bozukluklar
 - c. Ekzokrin pankreas hastalıkları
 - d. Endokrinopatiler
 - e. laç ve kimyasal maddeler tarafından indüklenen
 - f. Enfeksiyonlar
 - g. mmün aracılı diyabetin yaygın olmayan formları
 - h. Bazen diyabetle ili kisi gözlenen di er genetik sendromlar
 - i. Gestasyonel diyabet

Tip 1 diyabet tüm diyabetik hastaların yakla ık %5-10'luk bir kısmını olu turmaktadır. mmün aracılı olan tipinde, beta hücrelerinin otoimmün olarak yıkımı söz konusudur. Bu hastalık kuvvetli oranda DQA ve DQB genleri ile ba lantılı olarak HLA ili kisi göstermektedir. Bu yıkımın hızlı bir ekilde görüldü ü hastalar, çocukluk döneminde tanı alırken daha yava beta hücre yıkımı görülen hastalarda semptomlar yeti kin dönemde görülebilir. Bu hastalı ın ortaya çıkmasında rolü olan genetik yatkınlıklar ve çevresel faktörler henüz tam olarak aydınlatılamamı tur. Bu hastalar ya amlarını sürdürebilmek için ekzojen insülin kullanmak zorundadırlar (15).

Tip 2 diyabet tüm diyabetik hastaların %90-95'ini olu turmaktadır. Bu hastalarda ço unlukla insülin direnci söz konusudur. Bu hastalar ya amlarını devam ettirebilmek için insüline ihtiyaç duymazlar. Bu patolojinin geli iminde birçok neden olabilir ancak beta hücrelerinin otoimmün yıkımı söz konusu de ildir. Bu hastalar

ço unlukla abdominal obezite gösteren hastalardır. Ço unlukla ketoasidoz bulguları ile tanı alırlar (15). Tip 2 diyabet geli iminde multifaktöryel bir kalıtım ekli söz konusudur. nsülin sinyal yola ı ve insülin reseptörlerindeki genetik bozuklukların aracılık etti i bir insülin direnci söz konusudur.

2.2.4. Diabetes Mellitusun Tanısı

Diyabetin günümüz altın standart tanı ekli venöz plazmadaki glukoz miktarının ölçümüdür. Bu ölçüm ancak kan örne indeki glikolizis kısa süre içinde inhibe edilirse do ru sonuç verebilir. Bu durum iki ekilde mümkündür. Örne in alındı ı tüp, buz üzerinde muhafaza edilmeli ve 30 dk içinde santrifüj edilmelidir, ya da sitarit ve flurit gibi inhibitör maddeleri içeren özel tüpler kullanılmalıdır. Diyabet tanı kriteri olarak kabul gören de erler ise unlardır;

- HbA1c % 6.5 (48 mmol/l)
- Rastgele ölçülen plazma glukozu 200 mg/dl (11.1 mmol/l)
- Açlık plazma glukozu 126 mg/dl (7.0 mmol/dl)
- Oral Glukoz Tolerans Testi 2. Saat venöz plazma glukozu 200 mg/dl (11.1 mmol/l)

Bu kılavuzlar 2010 yılından beri HbA1c kullanımını diyabet tanısında tavsiye etmektedir. Bu muhtemelen uluslararası ölçüm metotlarının standardizasyonu için önerilmektedir. Di er taraftan güncel epidemiyolojik ara tırmalar HbA1c %6.5 de erinin diyabet tanısını do rulamaya yetecek özgüllükte oldu unu; HbA1c < %5.7 de erinin ise diyabet tanısında yeteri kadar duyarlı bir dı lama kriteri olabilece ini göstermektedir. Bu nedenlerle HbA1c bazı vakalarda diyabet tanısında iyi bir araç iken aynı zamanda oldukça hassas bir diyabet dı lama kriteri konumundadır. Bu kılavuzlara göre HbA1c düzeyleri 5.7 ve 6.4 arasında oldu unda ise diyabet ve prediyabet tanısı için klasik kriterler çerçevesinde kan glukoz düzeyleri de erlendirilip tanı konulabilir (21).

2.2.5. Diabetes Mellitusun Komplikasyonları

Birçok ülkede diyabet; kardiyovasküler hastalıklar, böbrek yetmezliği, körlük ve alt ekstremitte amputasyonlarının en önemli nedeni konumundadır. Bu bakımdan diyabetin kendisi kadar neden olduğu komplikasyonlar da ayrı bir halk sağlığı sorunu niteliindedir. Özellikle tip 2 diyabetik hastaların yaklaşık yarısında tanı anında diyabete bağlı bir komplikasyonun mevcut olduğu tahmin edilmektedir. Özellikle tip 2 diyabetik hastalarda erken ölümlerin büyük kısmı, kardiyovasküler komplikasyonlara bağlı olarak gelişmektedir. Son çalışmalar bu komplikasyonların özellikle ilk tanı anından itibaren düzenli bir glisemik kontrol sağlanamayan hastalarda daha sık gözlemlendiğini ortaya koymaktadır. Ancak tanı aldıktan yaklaşık 10 yıl kadar sonra uygulanacak sıkı glisemik kontrolün ise zıt etkilere neden olabileceği yönünde veriler bulunmaktadır (22).

Diyabet beklenen yaşam sürelerinde yaklaşık %10 ile 30 arasında bir azalmaya neden olmaktadır. Bundaki en önemli pay diyabette görülen komplikasyonlara aittir. Diyabetin komplikasyonları öncelikle akut ve kronik komplikasyonlar olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Kronik komplikasyonlar ise kendi arasında makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonlar olarak sınıflandırılır.

Diyabetin akut komplikasyonları; diyabetik ketoasidoz, hiperglisemik hiperosmolar koma, hipoglisemik diyabetik koma, infeksiyonlardır (23). Hipoglisemi diyabette en sık gözlenen metabolik bozukluklardan biridir. Çoklukla insülin veya oral antidiyabetiklerin yan etkisine bağlı olarak ortaya çıkar. Diyabetik ketoasidoz ve hiperglisemik hiperosmolar koma ise diyabetin en ciddi akut metabolik komplikasyonlarıdır. Çoklukla tip 1 diyabeti olan hastalarda ancak, ciddi infeksiyon travma ve kardiyovasküler hastalıklar gibi durumlarda tip 2 diyabet hastalarında da gözlenir. Laktik asidoz, yüksek mortalite oranı ile diyabetin en korkulan akut komplikasyonudur (24).

Kronik mikrovasküler komplikasyonlar; diyabetik nefropati, diyabetik nöropati ve diyabetik retinopatidir. Diyabetin kronik makrovasküler komplikasyonları ise; miyokard enfarktüsü ve anjinaya neden olabilen koroner arter

hastalığı, periferik vasküler hastalık, inme ve geçici iskemik atak gibi serebrovasküler olaylar, diyabetik ayak ve diyabetik ensefalopati olarak sıralanabilir (23).

Makrovasküler komplikasyonlar, ateroskleroz gelişimi sonucu ortaya çıkan ciddi patolojilerdir. Koroner arterlerin tutulumuna bağlı olarak gelişen koroner kalp hastalığı diyabete bağlı ölümlerin yaklaşık yarısından sorumludur. Uzun süren hiperglisemi başta olmak üzere hiperinsülinemi ve kan düzeylerinde artmış gözlenen serbest yağ asitlerinin endotel fonksiyonlarını bozucu etkisi önemlidir. Diyabette iskemik kalp hastalıklarının yanı sıra serebral inmenin de görülme oranları artmaktadır. Diyabetik hastalarda bu oran diyabetik olmayanlara göre yaklaşık olarak 4 kat daha fazladır. Burada serebral damarların özellikle diyabette yükselen kan basıncından olumsuz etkilenmesi önemli bir risk faktörü olarak görülmektedir. Diyabette görülen periferik damar hastalığı gelişiminin temelinde endotel disfonksiyon ve ateroskleroz gelişimi rol oynamaktadır. Burada endotel hücreleri kan akımındaki dinamik değişikliklere bağlı olarak çeşitli parakrin etkili mediatörler salgılamaktadır. Bu parakrin moleküllerin damar düz kas hücreleri üzerine olan etkileri ile vasküler tonus ve fonksiyonlar düzenlenmektedir. Endotel disfonksiyonunun ilerleyen aamalarında hem bu mediatörlerin salınımında azalma hem de vasküler düz kaslarda bu mediatörelere yanıtızsızlık ortaya çıktığı zaman damarlardaki patoloji daha da ağırlaşmaktadır (25).

Diyabetik retinopati; hiperglisemi sonucu ortaya çıkan ve retinal kapillerler, arterioller ve venülleri etkileyen klinik bir tablodur. Hastalığın ilerleyen aamalarında yeni damar oluşumu sonucu optik sinir ve maküla hasarı sonucu hastalarda körlük gelişmektedir ve dünyadaki en önemli körlük nedenlerinden biridir (26). 20 -74 yaş arası yeni görme kaybı vakalarının büyük çoğunluğu diyabetik retinopatiye bağlı olarak gelişmektedir. Tip 2 diyabet hastaları ile kıyaslandığında tip 1 diyabetik hastalar retinopati gelişimi açısından daha büyük risk altındadır. Toplam diyabetik hastaların % 90'ı tip 2 diyabet hastalarından oluştuğundan dolayı, sayısal olarak en fazla bu grupta gözlenir (27).

Diyabetik nöropatiler diyabette en sık görülen komplikasyonlar arasında yer almaktadır. Gelişiminde hastalık süresi ve glisemik kontrol düzeyleri büyük önem

tır. Özellikle 60 ya üstü diyabetik hastaların yarısından fazlasında görülmektedir. Tek başına hayatı olumsuz etkileyen nöropatik ağrılara neden olabildiği gibi diyabetik ayak ve ülser lezyonlarının oluşumuna da dolaylı olarak katkı sağlamaktadır. Motor, duyuşsal veya otonomik sinirlerin tutulumuna bağlı olarak farklı semptomlara neden olabilirler (26).

2.2.5.1. Diyabetik Nefropati

Diyabetik nefropati (DN), son dönem böbrek yetmezliğinin önemli bir sebebidir. Tip 1 diyabetik hastalardaki en önemli mortalite ve morbidite nedeni olmakla beraber tip 2 diyabetik hastalarda da ciddi bir sağlık sorunu haline gelmeye başlamıştır. Böbrekteki patolojiyi başlatan olaylar; artan böbrek kan akımı, hipertrofi, glomerüler hiperfiltrasyon ve hiperperfüzyondur. Bu erken dönemde değişiklikler geri dönüşlüdür ve diyabetik nefropati gelişiminin tam olarak erken belirteçleri sayılmaz. Ancak uzun süre devam eden hiperglisemi, böbrekte hücresel düzeyde değişikliklere neden olmakta ve yapısal değişiklikleri başlatmaktadır. Diyabetik nefropatide görülen belirgin yapısal değişiklikler; glomerüler bazal membranda kalınlaşma, glomerüler hipertrofi, artan ekstraselüler matriks birikimi (tubulo intersitisyel fibrozis) nedeniyle mezangial genişleme ve tubulointersitisyel genişleme olarak sayılabilir. Yüksek kan glukozu böbrekteki farklı hücre tiplerinde hücresel değişikliklere neden olabilir (27,28).

Nefropati gelişiminde böbreklerde ilk olarak glomeruler mezangium ve glomeruler bazal membranda şişme gözlenir, buna bağlı olarak hipertrofi gelişir. Erken evrelerde glomerüler bazal membran kalınlığı artmaya devam ederken, glomerüler yapılarda bozulmalar gözlenir. Glomerüllerin oluşturan damarlarda skleroz gelişimi sonucu tıkanmalar gözlenir. Bazı fonksiyon görmeye devam eden glomerüllerde ise, kompansatuar bir hipertrofi gelişir. Kimmelstein Wilson Nodüler sklerozu olarak adlandırılan patolojik bulgu, diyabetik nefropatinin diagnostik belirteçidir (29).

Diyabetik böbrek hastalığının seyri tip 1 ve tip 2 diyabet arasında farklılık göstermektedir. Tip 1 diyabet için tanımlanmış olan beş evre Tip 2 diyabet için

geçerli olmayabilir çünkü bazen tip 2 diyabet hipertansiyon, proteinüri, böbrek yetmezliği gibi bazı patolojiler geliştikten sonra tanı almaktadır. Mikroalbuminüri gelişimi ve ağırlı proteinüri olumu en yaygın klinik bulgulardır. 2010 yılında yeniden yapılan diyabetik böbrek lezyonlarının patolojik sınıflandırmasından sonra diyabetik nefropati konsepti, yerini diyabetik kronik böbrek hastalığı tanımına bırakmaktadır çünkü histolojik lezyonlar nodüler ya da diffüz glomerülosklerozisten, tubulo intersitisyel ve/veya vasküler lezyonlara kadar değişen farklı patolojilerden oluşabilmektedir (30). Nodüler glomerülosklerozis, ilk defa 1936 yılında Kimmelstiel Wilson tarafından diyabetik nefropatinin patognomonik bir lezyonu olarak tanımlanmıştır. Ancak bundan yıllar sonra nodüler glomerülosklerozis diyabeti olmayan bazı hastalarda da tanımlanmıştır. İmmüno Floresan, elektron mikroskopik çalışmaları, klinik ve patoloji doğrulamaları, nodüler glomerülosklerozisi taklit eden diğer tabloların ayırımının yapılabilmesi için gereklidir. Bu tabloya neden olabilen diğer patolojilere; kronik membranoproliferatif glomerulonefrit, disproteinemiler, glomerüler depo hastalıkları ve kronik hipoksik veya kronik iskemik durumlar gösterilebilir. 1999 yılında Helzenberg tarafından nodüler glomerülosklerozis görülen diyabetli hastalıklar revize edilerek iki kategoriye ayrılmıştır. Birinci gruptaki hastalar bozulmuş glukoz metabolizması olan ve/veya retinopatisi olan diyabetik nefropati olarak kabul edilen hastalar, ikinci grup hastalar ise idiopatik nodüler glomerülosklerozis olarak tanımlanmıştır. Ancak o dönemin artıkları ile bozulmuş açlık glukozu veya bozulmuş glukoz toleransı ölçümü veya HbA1C de erlendirmeleri yapılamadığı için, idiopatik olarak de erlendirilen birçok hastanın günümüzde diyabetik nefropati olarak de erlendirilmesi mümkündür.

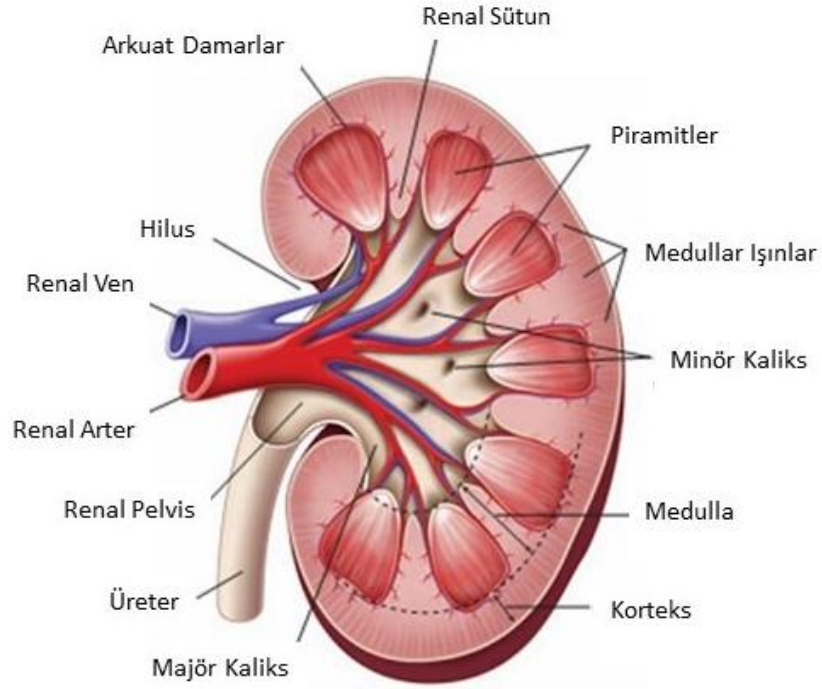
Günümüz diyabetik nefropati sınıflandırmasında glomerüler değişikliklere göre 4 ana grup oluşturulmuştur. Grup 1'de glomerüler bazal membran kalınlaşması vardır. Grup 2'de mezangial genişleme vardır; diğer hafif ise 2a, ciddi ise 2b olarak ayrılır. Grup 3'te nodüler sklerozis vardır (Kimmelstiel-Wilson lezyonları). Grup 4'de ise ilerlemiş glomerülosklerozis gözlenir. Bu sınıflandırma ayrıca diyabetik nefropatinin başlangıcından ileriki aşamalarına kadar seyrettiği aşamaları göstermesi açısından da oldukça yararlıdır (31).

2.3. Böbrek

2.3.1. Böbre in Histolojisi

Her bir böbrek hilum olarak isimlendirilen, konkav ekilli medial yerle imli alana sahiptir (ekil 1). Burası sinirlerin giri yapıp üreterin çıktığı, kan ve lenf damarlarının giri -çıkışı yaptığı alandır. Böbrekler en dıştan ince fibröz bir kapsülle sarılıdır. Hilumda üreterin üst ucu geni leyerek renal pelvis adı verilen yapıyı oluşturmaktadır. Bu yapı da iki ya da üç majör kalikse ayrılır. Bu yapıların küçük dallanmaları minör kaliks olarak isimlendirilir. Renal pelvis ve kaliksleri ya da doku çevrelemektedir (32). Böbrek dışta korteks, içte medulla denilen yapılardan oluşur. Korteks daha koyu boyanan, renal korpüsküller ve tübüllerin kesitlerini içeren bir alandır. Medulla ise, daha açık renkte boyanan ve tübül yapılarını içeren bölgedir. İnsanlarda renal medulla 8-12 konik yapıdan oluşur. Bu yapılara renal piramid adı verilir. Renal piramidler renal kolon denilen korteks uzantılarıyla birbirinden ayrılır. Her bir piramidi çevreleyen kortikal doku bir renal lobu meydana getirir. Medulladan kortekse doğru uzanan çizgilenmelere medullar ray denir. Her bir piramidin uç kısmı renal papilla olarak isimlendirilir ve buraya minör kaliksler piramidler içindeki tübüllerden topladığı idrarı boşaltır (33).

Herbir böbrek nefron denilen fonksiyonel birimlerden oluşmaktadır. Bir nefron; renal korpüskül, proksimal tübül, henle kulpu, distal tübül ve toplayıcı tübülden oluşur. Farklı nefronların toplayıcı tübülleri toplayıcı kanallara boşalır. Toplayıcı kanallar da minör kalikslere bağlanır. Kortikal nefronlar korteksin birçok alanında lokalize olurken, jukstamedüller nefronlar medullaya yakın olarak yerleşir ve uzun bir henle kulpuna sahiptir (34).



ekil 1. Böbre in yapısal organizasyonu (5).

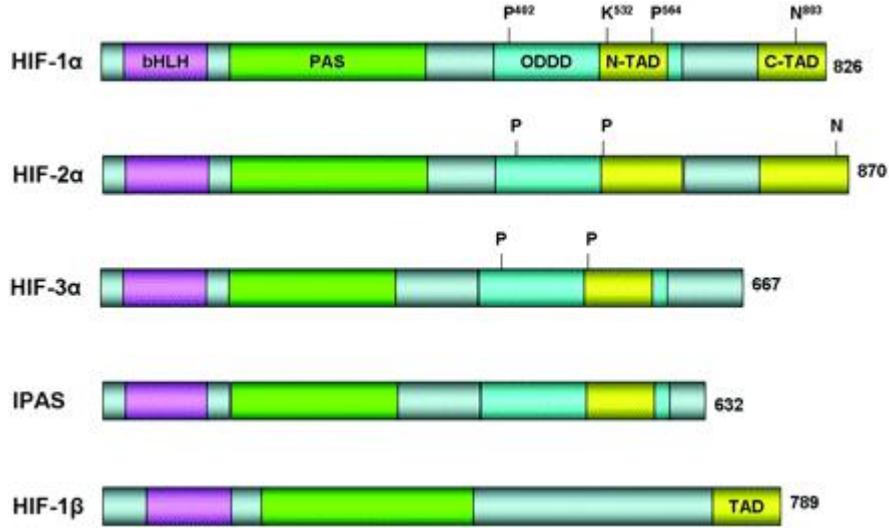
2.4. HIF (Hipoksi le ndüklenen Faktör)

HIF memeli hücrelerinde bulunan bir transkripsiyon faktörüdür ve hücrelerin hipoksiye karşı verdiği cevaplarda önemli roller üstlenmektedir. HIF iki alt birimden oluşan heterodimer bir yapıya sahiptir;

1. O₂'ye duyarlı HIF
2. ARNT olarak da bilinen HIF

HIF 'nın; HIF-1 , HIF-2 ve HIF-3 olmak üzere 3 alt tipi bulunmaktadır (ekil 2). HIF-1 ve HIF-2 büyük oranda benzer yapıya sahip olup, HIF ile heterodimer oluşturabilmekte ve sonuç olarak hedef genler üzerinden benzer şekilde dokuya özgü ekspresyon özellikleri göstermektedirler. HIF-3 hakkında ise daha az bilgi mevcuttur, ancak bazı çalışmalar negatif düzenleyici özellikleri olduğunu yönünde bilgiler vermektedir. Hücreler azalmı O₂ konsantrasyonlarına artan HIF-1 aktivitesi ile cevap vermektedir. HIF-1 aktivitesi sonucunda ise; kanser gelişimi, anjiyogenez, hücre sağ kalımı, glikoz metabolizması ve invazyon ile ilgili birçok

genin ekspresyonunda artı gözlenmektedir. Günümüzde HIF ve ili kili mekanizmaların öneminin ortaya çıkarılması ile HIF-1 'yı hedef alan çe itli moleküllerin ara tırılması ve geli tirilmesi çalı malarının da önem kazandı ı görülmektedir.



ekil 2. nsandaki HIF-1 ve HIF-1 'nın yapısı. Basit helix-loop-helix-Per-ARNT-Sim (bHLH-PAS) protein ailesi. 2 transaktivasyon bölgesi N-terminal (N-TAD) ve C-terminal (C-TAD) oksijen ba ımlı indirgeme bölgesi (ODDD) (3)

Hücreler için normoksik ko ullarda oksijen düzeyleri %21 civarında iken, hipoksik ko ullarda bu oran %1'lere kadar dü mektedir. Hipoksinin gen ekspresyonları ve hücre biyolojisindeki çe itli moleküler mekanizmalar üzerine olan güçlü etkilerinin anla ılması ile HIF biyolojisine olan ilgi de giderek artmaktadır. Özellikle kanser ve hipoksik ko ullara neden olan di er patolojik durumlardaki rolleri üzerine çok sayıda ara tırmanın yapıldı ı görülmektedir. Aslında HIF'ler ilk defa, hipoksik ko ullarda eritrosit proliferasyonunu artıran eritropoetin geninin 3' enhancer bölgesindeki hipoksi response elementin (HRE) belirlenmesi ile ke fedilmi tir. Bunu izleyen çalı malar HRE bölgesine hipoksik ko ullarda ba lanan heterodimerik yapıda bir molekülün varlı ını ortaya koymu tur ve bu molekül HIF-1 'dır. Günümüzde hipoksinin ve HIF-1 yola ının embriyonik geli imle ve çe itli patolojilerle ba lantısı oldu u bilinmektedir. Bununla birlikte kanser hücreleri tarafından anjiyogenezin uyarılması ve glikolizisin sa lanması ile karakterize Warburg etkisi olarak bilinen durumda da HIF'lerin rolü oldu u görülmektedir. HIF-

HIF-1 sistemi embriyonik gelişimde de büyük önem taşımaktadır. HIF knockout hayvanlarda anormal vasküler gelişim nedeniyle ölümler gözlenmiştir. Ayrıca bu hayvanlarda benzer şekilde anormal nöral katlanma ve kardiyovasküler malformasyonlar gözlenmiştir (3).

Normoksik koşullarda HIF-1 proteozomlar tarafından yıkılmaktadır. Bu yıkım HIF-1 'nin prolin hidroksilaz 2 (PHD-2) ve vonHippel-Lindau (VHL) ubiquitin ligaz kompleksi tarafından yıkım için iaretlenmesi ile sağlanmaktadır. Bu durumda yeterli oksijen varlığında hücrelerde HIF-1 fonksiyon görmemektedir. Bu olaya HIF-1 'yı hidroksilleyen ve böylece koaktivatör olarak fonksiyon gören p300 ve CBP ile etkileşimini önleyen Faktör inhibiting HIF1 (FIH) proteininin de katkısı bulunmaktadır. Ancak hipoksik koşullarda ise HIF-1 proteinleri stabildir ve aktiftir. Çünkü VHL ve FIH proteinleri oksijen yokluğunda inhibe olmuş durumdadır. Böylece HIF-1 koaktivatörleri ile etkileşime geçebilir ve beta alt birimi ile dimerize olabilir. Stabilize olan HIF-1 sonuçta hedef genlerin düzenleyici bölgesine bağlanarak hedef genlerin ekspresyonlarını etkileyebilir. Bunun yanı sıra HIF'lerin oksijen konsantrasyonlarından bağımsız bir moleküler mekanizması da bulunmaktadır. Bu mekanizmayı çoğunlukla HIF-1 translasyonunu düzenleyen proteinler uyarılmaktadır. Bu durum ise zaten sentezlenmiş olan HIF-1 üzerine etkileden oksijen bağımlı düzenleme mekanizmalarına tamamen ters düşmektedir. Bu mekanizmaların bağında protein kinaz C gelmektedir. Bu düzenleme HIF-1 transkripsiyon hızını ve fonksiyonunu artırmaktadır. Yanı sıra diğer bir yolak ise HIF-1 translasyonunu artıran fosfotidilinozitol 3 kinaz'dır. Bu yolakların etkisi ile normoksik koşullarda bile HIF-1 translasyonu büyük oranda artabilir, bunun sonucunda ise, bu alt birimin proteozomal yıkım etkilerine karşı koyan ve sonuç olarak hücre içi HIF-1 düzeylerini artıran bir durum ortaya çıkabilir. Bu şekilde bir aktivasyonun özellikle PI3K yolağı aracılığı ile lipopolisakkarit gibi çeşitli ajanların etkisiyle HIF-1 'nin damar düz kas hücreleri ve makrofajlarda aktive olması sırasında rastlanmaktadır (35).

2.5. TLR

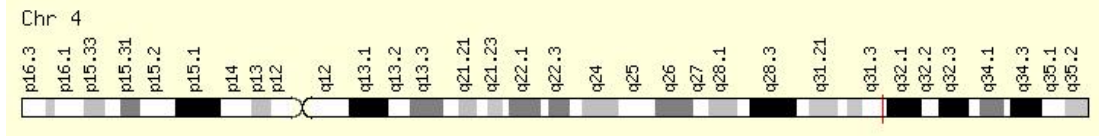
Toll reseptörleri ilk kez *Drosophila*'da kefedilmiştir. *Drosophila* Toll yolu ile memeli IL-1 yolunun benzerliğini anlamınca immünoloji alanında çalışmalar başlatılmıştır (36). Toll benzeri reseptörler (TLRs), doğal bağışıklık sisteminde anahtar rol oynayan proteinlerin bir sınıfıdır. Tek membran geçişli katalitik olmayan reseptörlerdir. Genellikle makrofaj ve dendritik hücreler gibi bağışıklık sistemi hücrelerinde eksprese olurlar ve mikroorganizmalar deri veya bağırsak sistemindeki fiziksel bariyeri atıklarında TLR'ler aracılığı ile tanınırlar. TLR'ler; TLR-1, TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-5, TLR-6, TLR-7, TLR-8, TLR-9, TLR-10, TLR-11, TLR-12 ve TLR-13 olmak üzere farklı tiplerden oluşmaktadır, ancak TLR-11, TLR-12 ve TLR-13 insanda bulunmamaktadır. TLR-1, 2, 4, 5, 6, 10 ve 11, hücre yüzeyinde bulunurken; TLR-3, 7, 8 ve 9 endozomlarda ve endoplazmik retikulumda yerleşmiştir.

insanda tanımlanan ilk toll homoloğu TLR-1'dir ve 1997 yılında tanımlanmıştır. Bu reseptörlerden fonksiyonu ilk belirlenen ise TLR-4'dür. Farklı TLR tiplerinin farklı hücrelerde eksprese edildiği bilinmektedir. Buna göre; TLR-1 monosit, nötrofil, B hücreleri ve doğal killer hücrelerde; TLR-2 monosit, nötrofil ve dendritik hücrelerde; TLR-3 dendritik hücrelerde; TLR-4 endotelial hücreler, monosit, nötrofil ve dendritik hücrelerde; TLR-5 ise, monosit ve dendritik hücrelerde eksprese olmaktadır (37, 38). Her bir TLR'nin ligand spesifitesi farklıdır. Patojenler üzerinde evrimsel olarak korunmuş yapılar bulunmaktadır. Bunlar hastalık etkenlerine eşlik eden moleküler yapılar (PAMP- pathogen associated molecular patterns) olarak isimlendirilmektedir. Bakteriyel hücre duvarı gibi yapıları oluşturan PAMP' lar mikrobiyal sağ kalım için kritik önem taşımaktadır. Doğal immün sistem hücreleri üzerinde bulunan ve bunları tanıyan reseptörlere de Pathogen Recognition Receptor (PRR) adı verilmektedir. Bu reseptörler, endositik, sekrete edilen ve sinyal ileten olmak üzere üç gruba ayrılır. TLR ailesi sinyal ileten reseptör grubunu oluşturmaktadır (3). TLR'ler doğrudan gelen bağışıklık ve inflamasyon aktivitesinde önemli bir rol oynamaktadır. Her bir TLR aile üyesi, belirli bir patojen bileşeni tanıyarak ve aktivasyon ile adaptif immün yanıt ve sitokin üretimine yol açan bir sinyal kaskadını tetikler. Burada NF- κ B yolunu tetikleyip, MyD 88 (myeloid

differentiation gene 88), TIRAP (Toll IL-1 reseptör bölgesi içeren uyarlayıcı protein), IRAK (IL-1 receptor associated kinase) ve TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-) gibi aracı moleküller sayesinde IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF gibi çe itli sitokin ve kemokinlerin salınımını sa larlar ve CD80, CD86 ve CD40 gibi moleküllerin yapımını artırırılar (2).

2.5.1. TLR-2

Hücre yüzeyinde eksprese edilmektedir ve bakteri, mantar ve virüslerden köken alan bir takım mikrobiyal komponentin tanınmasında rol oynamaktadır. TLR-2 4. kromozomda yer almaktadır (ekil 3). TLR-2 ve TLR-4 böbrekte tübüler epitel hücrelerinde ve mezengial hücrelerde de eksprese edilmektedir. Ayrıca TLR-2'nin inhibisyonu yüksek ya lı diyet ile beslenen farelerde beyaz ya doku ve kasta insülin duyarlı lı nı artırmaktadır. TLR-2 ve TLR-4 ba lıca ligandları high mobility grup B1 protein (HMGB1), ısı ok Protein (HSP) 60, HSP70, endotoksin, hiyalüronan, ileri glikozilasyon son ürünleri ve hücre dı ı matriks bile enleridir. TLR-2 gram pozitif bakterilere, TLR-4 gram negatif bakterilere ba lanır. TLR-2; bazen TLR-1 ve TLR-6 ile bazen de CD14 ve CD36 ile heterodimer yapabildi inden dolayı yüksek ba lanma kapasitesine sahiptir. Ayrıca TLR-2'nin kas hücrelerinde susturuldu u hücre kültür çalı malarında, palmitat tarafından indüklenen insülin direncinin engellendi i görülmektedir. Obezite, kronik bir ekilde devam eden dü ük dereceli inflamasyona neden olmaktadır. Bu inflamatuvar sinyallerdeki aktivasyon ise obezite ili kili insülin direncine yol açmaktadır. TLR'ler ayrıca hücre hasarında ortaya çıkan yıkım ürünleri, proteolitik kaskad ürünleri, hasarlı hücrelerden aç ı a çıkan intraselüler moleküller, doku iskemisi ve inflamasyonunun uyard ı genler ile eksprese olan hücresel ürünler gibi endojen molekülleri de tanımaktadır. Güncel çalı malar periferik insülin direncinde TLR ba ımlı sinyalin rolü oldu unu göstermektedir (39).



ekil 3. nsan TLR-2 geninin kromozomal yerle imi

Tip 2 DM; hiperglisemi, inflamasyon ve insülin direnci gibi metabolik bozuklukları içeren bir patolojidir. Bu metabolik bozukluklara yol açan mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Kandaki düzeyi artıran glukozun zararlı etkilerinin çeşitli reseptörler aracılığıyla oksidatif stres ve inflamasyon artmasına neden olduğuna dair önemli kanıtlar vardır. Dolağımdaki c-reaktif protein, proinflamatuvar sitokinler, homeostazi model değerlendirme-insülin direnci (HOMA-IR)'nin Tip 2 DM ve insülin direncinin gelişmesinde inflamasyonun önemli olduğunu göstermiştir. Çalışmalar; TLR-2 ve TLR-4 polimorfizmleri ile TLR fonksiyonu, diyabet ve komplikasyonlar arasında bağlantı olduğunu göstermiştir. TLR'ler arasında TLR-2 ve TLR-4; insülin direnci, diyabet ve ateroskleroz patogeneğinde kritik rol oynar. TLR-2 ve TLR-4 ekspresyonu, Tip 2 diyabetin çizgili kas ve yağ doku gibi hedef organlarında artmış gösterilmiştir. Tip 2 diyabette TLR'nin önemini gösteren bu çalışmalar, TLR-2/TLR-4 ligandları, kofaktör downstream sinyali çalışmaları ile elde edilmiştir. Ayrıca sistemik inflamasyon tip 2 diyabet etiolojisinde önemli bir rol oynamaktadır. TLR-2 ve TLR-4'ün diyabet patogeneindeki rolleri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Farelerde yapılan çalışmalar, TLR-2 ve TLR-4 aktivasyonu sonucu, sitokin üretiminin diyabete yol açabileceğini gösterilmiştir. Serbest yağ asitleri, inflamasyon ve doğal bağışıklık arasında TLR-4'ün bağlantılı olduğu bir moleküler mekanizmanın varlığı gösterilmiştir. Bu gözlemler TLR-2 ve TLR-4'ün Tip 2 diyabette önemli bir yere sahip olduğunu göstermektedir. Diyabetik insan örneklerinde de TLR-2 ve TLR-4'ün inflamasyona katkıda bulunup bulunmadığı da araştırılması gereken önemli konular arasındadır (37).

Bazı çalışmalar iskemi ve inflamasyon süreçlerinde TLR-2'nin böbreklerde upregüle olduğunu göstermektedir, buradan da TLR'lerin inflamatuvar böbrek hastalıklarının gelişimi ve ilerlemesinde TLR'lerin sorumlu olabileceğini göstermektedir (40).

2.6. Fitoterapi

Günümüzde kronik hastalıkların doğal seyri, tanı-tedavide tam başarılanamaması ve çoğunun ölümlü sonuçlanması gibi nedenlerden dolayı hem hastalar hem de sağlık çalışanları alternatif tıba yönelebilmektedir. Alternatif tıp, geleneksel tıbbın dışındaki tedavi ve uygulamaları içermektedir. Bu uygulamalardan en önemlisi fitoterapi uygulamalarıdır. Fitoterapi terimi bitkilerle tedavi anlamına gelmektedir. "fitoterapi" teriminin ilk kez 1870-1953 yılları arasında yaygın olarak Fransız hekimleri tarafından La Presse Medical adlı dergide kullanıldığı iddia edilmektedir. Bununla birlikte bu tarihten önceki zamanlarda da insanların sağlıkları için bitkileri kullandıklarını bilmekteyiz. Bu konuya ait ilk yazılı belge, M.Ö. 3000 yıllarına ait Ninova tabletleridir. Bu tabletlerde, bitkisel ve hayvansal tedavilerin olduğu görülmektedir. İslam uygarlığı döneminde Ebu Reyhan, İbn-i Sina ve Al Gafini bitkisel tıp konusunda önemli eserlere imza atmışlardır.

Son yıllarda sentetik ilaçların meydana getirdiği ciddi yan etkiler ve ekonomik nedenlerden dolayı fitoterapi kavramı önem kazanmaya başlamıştır. Dünya Sağlık Örgütü insanların %80'inin doğal tedavilere inandığını açıklamıştır. Avrupa, Kuzey Amerika ve endüstriyel bölgelerde toplumun %50'den fazlası tamamlayıcı ya da alternatif tıp yöntemlerinden en az birini kullanmaktadır. Ancak asıl önemli problem, insanların bitkileri çok rahat kullanıp güvenmesidir. Doğal demek her zaman güvenli demek değildir. Çoğu bitki oldukça toksiktir. Bilinçsizce uygulanan bazı bitkisel tedavilerden kaynaklanan oldukça tehlikeli, hatta ölüme neden olabilen yan etkiler kaydedilmiştir. Bu etkilerin sebepleri; bitkinin doğrudan toksik olması, alerjik reaksiyonlar, kontaminasyona bağlı etkiler ve diğer ilaçlarla etkileşimi nedeniyle olabilmektedir. Bu sorunlar nedeniyle fitoterapi konusunda, birçok bilimin sinerjisiyle yeni ilaçlar geliştirilmeye başlanmıştır. Bitkilerin etken maddeleri önemli olduğu için bu maddelerin sentetik olarak elde edilmesine çalışılmaktadır. İnsan, doğa ve çevre sağlığı fitoterapinin gerekli olduğunu göstermektedir. Günümüzde dünya nüfusunun çoğunluğu için bitkiler, en seçkin ilaç kaynaklarıdır (41).

2.6.1. Diyabet Tedavisinde Fitoterapinin Yeri

Diyabet sıklığı dünya genelinde hızla artmaktadır. Önümüzdeki yıllarda yanlış beslenme ve obezite kaynaklı sorunlar nedeniyle daha da artacağı beklenmektedir. Tip 1 DM tedavisinde insülinin kesintisiz kullanımı, Tip 2 DM tedavisinde oral antidiyabetik ilaçların ciddi yan etkilerinden dolayı, bitkisel tedaviye yönelim başlamıştır. Bitkiler, diyabet tedavisi için önemli bir kaynak olmaya başlamıştır.

Diyabet tedavisinde bitkisel kaynakların kullanımı, 20. yy ilk çeyreinde başlamıştır. *Galega officinalis* bitkisi üzerine yapılan çalışmalarda, guanidin türevi bileşiklerin zengin olduğu ve bunların hipoglisemik etkilere sahip olduğu gözlemlenmiştir. Daha sonra guanidin türevlerinin toksik etkileri saptandı, alkali di guanidinler sentezlendi. Sintalin A ve B, Avrupa'da diyabet tedavisinde oral antidiyabetikler olarak kullanılmıştır. İnsülinin keşfinde, bugün insülin türevlerinden olan metformin halen sıklıkla kullanılmaktadır. Bitkilerin hipoglisemik etkisi; başlıca insülin salgılayan pankreas beta hücrelerinden insülin sekresyonunu artırarak, hepatositlerden glikoz üretiminin engellenmesi ya da glikoz taşıyıcıları (GLUTs) aracılığıyla periferel dokuya glikoz alımının artırılması ile gerçekleştirilir. *Adiantum vasica* Nees (Acanthaceae), *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees, *Cedrus libani* A. Rich (Pinaceae), *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae), *Tournefortia hartwegiana*, *Scilla peruviana* (Hyacinthaceae), *Rheum emodi*, *Salvia acetabulosa*, *Marrubium vulgare*, *Plantago ovata*, *Mangifera indica* L., *Lagerstroemia speciosa*, *Trigonella foenum-graecum* L., *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. gibi bitkilerin dünya genelinde halk arasında antidiyabetik olarak kullanıldığı son yayınlarda rapor edilmiştir. Bu bitkilerin etki mekanizması, başlıca insülin salgılayan pankreas beta hücrelerinden insülin sekresyonunu artırarak, hepatositlerden glikoz üretiminin engellenmesi ya da glikoz taşıyıcıları (GLUTs) aracılığıyla periferel dokuya glikoz alımının artırılması ile gerçekleştirilir. Glikoz taşıyıcılarının (GLUTs) upregülasyonu ve glikoz alımının artırılmasıyla antidiyabetik etki gösteren bitkiler; *Cecropia obtusifolia* Bertol, *Cecropia obtusifolia*, *Lyophyllum decastes*, *Liriope platyphylla* Wang et Tang, *Panax ginseng*, *Abelmoschus moschatus*, *Syzygium cumini*, *Azadirachta indica*'dır. Nükleer reseptör PPAR- γ 'ı aktive ederek antidiyabetik etki gösteren bitkiler; *Alisma plantago aquatica*, *Catharanthus roseus*, *Acorus calamus*, *Euphorbia balsamifera*, *Jatropha curcas*, *Origanum majorana*, *Zea mays*, *Capsicum frutescens* and *Urtica dioica*,

Panax quinquefolius, ye il çay (*Camellia sinensis* L.) dır. Adiponektin salınımını artırarak antidiyabetik etki gösteren bitkiler; *Ipomoea batatas* (Caiapo), *Agaricus blazei* Murill (ABM), *Aronia melanocarpa* E, *Momordica charantia*, Plum ekisu, *Salacia reticulate*'dir. Kan-glukoz seviyesinin kontrolündeki di er önemli yapıta ı; lipogenez ve glikogenezi kapsayan, karaci er metabolik fonksiyonlarıyla ili kili olan hepatik üretimdir. Bu mekanizmalar üzerinden antidiyabetik etki gösteren bitkiler; *Caralluma sinaica* L., *Panax ginseng*, *Momordica charantia*, *Tamarindus indica*'dır . Antioksidan olup antidiyabetik etki gösteren bitkiler; *Allium sativum*, *Azadirachta indica*, *Momordica charantia*, *Ocimum sanctum*, *Momordica grosvenori*, *Scutellaria baicalensis*, *Aralia taibaiensis*, *Lycium barbarum*, *Strobilanthes crispus*, *Pueraria lobata*, *Morinda officinalis*, *Gentiana olivieri* Griseb., *Phyllanthus amarus*, *Capparis deciduas*, *Camellia sinensis*, *Emblica officinalis*, *Ficus bengalensis*, *Musa sapientum*, *Punica granatum* ve *Silybum marianum*'dur (42, 43).

2.7. Silybum Marianum L. (Deve Dikeni, Meryemana Dikeni)

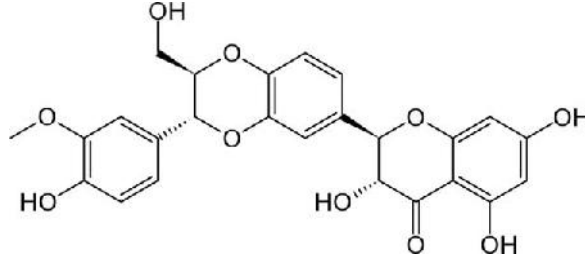
Silybum marianum L., Avrupa ve asya kökenli geleneksel tıp sisteminde oldukça sık kullanıma sahip tıbbi bir bitkidir (44). *Silybum marianum* (Meryem ana dikeni) *Asteraceae* familyasına ait gövdesi kö eli, seyrek tüylü, 40-150 cm'ye uzanan yenilebilir otsu bir bitkidir. Yaprakları kesik ve yuvarlaktır. Çiçekleri ba ektinde ve bir arada toplu görünüme sahiptir. Çiçekler parlak kırmızı-pembe veya eflatun-kahverengi ve dikenlidir (43). Anavatanı Akdeniz bölgesidir ancak Avrupa'dan Amerika'ya kadar yayılım göstermektedir. Ülkemizde ise güney ve batı anadoluda, akdeniz, ege ve marmara bölgesi kıyılarında yeti mektedir. Ülkemizde meryemana dikeni, deve dikeni, ala kengel ve sütlü kengel gibi isimlerle de anılmaktadır (45).

Bitkinin tüm kısımları yenilebilir çünkü toksik de ildir (46, 47). Bu bitkinin antik zamanlardan beri kullanıldı na dair bilgiler bulunmaktadır. *Silybum marianum* için "geçmi ten gelece e kutsanmı bitki" diye söz edilmi tir. Hz. Meryem'e adanmı olup Meryemana dikeni olarak da adlandırılmı tir. Efsaneye göre o lu Hz. sa'yı emzirirken bu bitkinin altında oturmu tur. Sütünden akan damla bu bitkinin üzerine dü mü ve orada beyaz bir leke olarak kalmı tir. Yaprak üzerindeki izlerin

buradan kaynaklandığı belirtilmektedir. John Eveleyn bitkiyi bu yüzden, emziren kadınlarda laktasyon artırıcı olarak da önermiştir. Theophrastus 4.yy'da bu bitkiden Pternix adıyla bahsetmiştir. Dioscorides yılan ısırığında tedavideki öneminden bahsetmiştir. Plinius the Elder balla karı tırlığında safra akışı üzerine artırıcı etkisinden söz etmiştir. Bu bilgi, bitkinin karaciğer ile ilgili kullanımına dair ilk referanstır ve bitkiye Silybum adını vermiştir. 16.yy'da John Gerard bitkiyi melankoli ve karaciğer ikâyetleri için tavsiye etmiştir. Nicholas Culpeper, 1650'de karaciğerde ve dalakta farklı olgularda kullanımından bahsetmiştir. Tohumdaki etken maddenin izole edilme çalışmaları 1958'de başlamıştır. 1954'den bu yana bilim adamları tarafından bu bitkinin flavonoid içerdiği bilinmekle birlikte, ancak 1960'larda Alman bilim adamları Silybum marianum L.'ye ait bir grup etken madde keşfetmiş ve bunların hepsine birden "silimarin" adını vermişlerdir (48).

2.7.1. Silibinin

Silybum marianum L. bitkisinin tohumlarından elde edilen özütte yaklaşık olarak % 70 - % 80 oranında silmarin flavonolignanları ve % 20 - % 30 oranında ise çoğunlukla polimerik ve oksidize polifenolik bileşikler kapsayan kimyasal olarak tanımlanmamış bileşikler bulunmaktadır. Silmarin kompleksinin esas bileşeni olan silibinin, esas bileşeni silibinin'dir (ekil 4) (49). Silibinin muhtemelen bitki içinde koniferil alkol ile flavonolun kombinasyonu ile üretilmektedir (50, 46). Silibinin, iki diastereomer A ve B'nin yaklaşık olarak 1:1 oranında karışımından oluşmaktadır (4, 51). Isosilibinin, dehidrosilibinin, silikristinin, silidianinin ve bağıca taxifolin olmak üzere birkaç flavonon gibi flavonolignanlarda önemli miktarlarda, silymarin kompleksinde bulunmaktadır (4).



ekil 4. Silibinin'in kimyasal yapısı (IUPAC name (2R,3R)-3,5,7-trihydroxy-2-[(2R,3R)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-(hydroxymethyl)2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-yl]chroman-4-one; C₂₅H₂₂O₁₀ (49)

2.7.2. Silibinin'in Koruyucu Etkileri

2.7.2.1. Kansere Üzerine Etkisi

Silibininin en önemli özelliği antioksidan olmasıdır bu yüzden kansere karşı koruyucu özelliği vardır (4).

CDX2 geni ve CDX2 proteininin ekspresyon seviyeleri üzerine Silibinin'in etkisinin araştırıldığı bir kolon adenokarsinom çalışmasında, tümör dokusundaki patolojik değişimlerin bastırıldığı gözlenirken(52), N-butil-N-(4-hidroksibutil) nitrozamin ile oluşturulan mesane kanseri modelinde, mesane hasarlarını azalttığı gözlenmiştir (53). Silibinin'in NF-κ ve STAT-1 aktivasyonunun inhibisyonu aracılığıyla antioksidatif, anti inflamatuvar ve anti apoptotik etkiler gibi birçok önemli özelliği de bilinmektedir. Dahası, silibinin MMP'ler ve EMT'yi inhibe ederek ve TIMP-2 ekspresyonunun düşürerek kanser önleyici ve antikanserojen etkileri de göstermektedir (54). Azoksimetan ile oluşturulan kalın bağırsak kanseri modelinde proliferasyonu önemli ölçüde azaltmıştır (55). Silmarin'in; benzoil peroksit ya da 12-O tetradekanoilforbol13-asetat ile oluşturulmuş cilt kanseri modelinde karsinogenezi inhibe ettiği gözlenmiştir (56). Silibinin, östrojen bağımlı ve bağımsız insan meme kanseri hücre hatlarında doksorubisin, cisplatin ve karboplatinin terapötik etkisini arttırdığı gözlenmiştir. Bu ajanların her biri tek başına test edildiğinde, doza ve zamana bağlı olarak her iki hücre dizisinde de büyümenin baskılandığı görülmüştür (57).

Silibinin'in, yapılan hayvan çalı malarında prostat, deri ve akci er kanserlerini içeren solid tümörlere kar ı antikanserojen etkileri gösterilmi tir (58, 59, 60). Silibininin, prostat kanseri hücre hatlarında da apoptozu indükledi i gösterilmi tir (61, 62). nsülin-benzeri büyüme faktörü ba layıcı protein-3 (IGFBP-3)'ün olu masında da Silibinin'in tümör baskılayıcı etkisi gözlenmi tir (63). TNF- /IFN- -indüklü kromozomal bozukluk içeren cDNA mikroarray çalı masında, silibininin TNF- -indüklü tümör büyümesini baskıladı ı gözlenmi tir (49). Hepatoselüler karsinoma hücre hatlarında yapılan çalı mada Silibinin'in, sorafenib ve gefitinible birlikte büyüme i inhibe eden faktörleri artırdı ı gözlenmi tir (64). Meme kanseri hücre hattında yapılan çalı malarda; kanserin invazyonu ve migrasyonundan sorumlu protein olan C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4)'ün antagonisti olabilece i belirtilmi tir (65). Kolon kanser kök hücreleri (CSC) üzerinde silibinin etkisinin ara tırıldı ı bir çalı mada, mitojenik ve interlökin (IL) aracılı sinyalizasyon varlı ında üretilen CSC sferoitlerinin ve tümör hücrelerinin sa kalımının silibinin varlı ında azaldı ı gözlenmi tir (66). Oral karsinoma hücreleriyle yapılan bir çalı mada; stabilize ajan polivinil alkol (PVA) varlı ında Silibinin Eudragit® E (EE) nanopartiküller ile kapsül haline getirilmi tir. Kapsüllü ve kapsülsüz silibinin verildikten sonra DNA hasarı ölçüldü ünde, nanopartiküllü silibininin, hasarı daha fazla azalttı ı belirlenmi tir (67). Prostat kanseri hücre serisinde (LNCaP) yapılan çalı malarda silibinin'in antiandrojenik aktivite göstererek tümör büyümesini inhibe etti i gözlenmi tir (68, 69). Vasküler endotelial büyüme faktöründe (VEGF) azalmayla ili kili olarak Silibinin ve Silmarin, insan umbilikal ven hücrelerinde antianjiyogenik aktivite göstermi lerdir (70). Silibinin nöroprotektif etkileri gösterilmi flavonoidlerin bir üyesidir (4,71). Silibinin'in (100 ve 200 mg/kg) STZ indüklü hayvanlarda hafıza kaybı ve dopamin toksisitesine ba lı davranı bozukluklarını önledi i de gözlenmi tir (72,73). Silibinin'in (50 mg/kg) 6 hafta boyunca verildi i ba ka bir çalı mada, ya lanmayı geciktirdi i gözlenmi tir (74).

2.7.2.2. Silibininin Kanser Tedavisinde Etkisi

Silibininin kanser alanında çok çalı ılmasının en önemli sebebi, antioksidan özelli inin olması ve böylece hücreleri koruyabilme yetene ine sahip olmasıdır. Akut myeloid lösemi, tedavi açısından halen zor bir hastalıktır. Sitozin Arabinoside (Ara-C) sıklıkla hematolojik malignensi tedavisinde kullanılmaktadır ancak sık sık kötü prognoza yol açabildi i ve ilaca direnci artırabildi inden etkisiz hale gelmektedir. Bu nedenle, ilaç direncinden sorumlu mekanizmasını anlamak ve bunu a mak için ara tırıcılar Hesperidin ve silibinin'i birlikte çalı mı lardır. Sonuçta sitotoksitenin azaldı ını gözlemlemi lerdir (75). Polimiyelositik lösemili bir kadında silimarin kullanımı sonucunda; metotraksat ve 6merkaptopürin ile yapılan kemoterapik tedavi sırasında karaci erde doza ba lı olarak hasarlar olu tu u gözlenmi , daha sonra hastaya 4 ay süre ile bu ilaçlara ek olarak 800 mg Silmarin uygulandı ında hastanın karaci erinde aminotransferaz seviyelerinin normale döndü ü görülmü tür (4). STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) çe itli kanser tiplerinde aktif olan, tümörün metastaz ve büyümesinden sorumlu bir transkripsiyon faktörüdür. Geçmi te yapılan çalı malarda STAT3 ve phospho-STAT3 (pSTAT3 ya da aktive STAT3) ekspresyonunun; meme, kolon, prostat ve küçük hücreli olmayan akci er kanseri için zayıf belirteç oldu u belirlenmi tir. Preklinik kanser modellerinde silibinin'in, pSTAT3 ekspresyonunu inhibe etti i gösterilmi tir (76). Silibinin'in, 1,25D (1,25-dihydroxyvitamin D) dirençli insan kolon karsinom hücrelerinde Snail1 ve Snail2'nin TNF- -indüklü upregülasyonunu tersine çevirdi i gözlenmi tir (77). Yapılan bir çalı mada, MCF7 meme kanseri hücreleri üzerindeki Silibinin'in sitotoksik etkileri incelenmi tir. Bak, p53, p21, BRCA1, BCL-X1, ATM gibi odak genler üzerine silibininin etkisi analiz edilmi tir. Sonuç olarak Silibinin'in; Bak, p53, p21, BRCA1, BCL-X1, ATM genlerinin down regülasyonu ile MCF-7 hücrelerinde de apoptozu indükledi i ve proliferasyonu inhibe etti i gösterilmi tir (78).

2.7.2.3. Silibinin'in Gastrointestinal Sistemdeki Etkisi

Silibinin, deve dikeninin farmakolojik olarak aktif bile enidir. Silybum marianum, eski ça lardan beri çe itli karaci er hastalıkları için kullanılmaktadır. Günümüzde; siroz, akut-kronik hepatit ve alkol-toksin ba ımlı hepatit tedavisinde kullanılmaktadır (79). Silibinin etkileri arasında antioksidan aktivite en önemlisi olabilir. Güvenli ve yan etkisi olmadı ndan geni bir kullanım alanına sahiptir. Son çalı malar, kimyasal ve ilaç kaynaklı karaci er hasarına kar ı Silibinin'in karaci eri korudu unu göstermi tir (80).

Karaci er homeostazinin devamını sa lar ve birincil detoksifiye edici organdır. Bu nedenle karaci er hastalıkları dünya çapında önemli bir problemdir. Serbest radikal üreten çe itli bile ikleri metabolize etmektedir. Karaci erde antioksidanlar serbest radikalleri temizleyip, oksidatif/antioksidatif dengeyi sa larlar. Oksidatif stres karaci erde zararlı olu umları sa layıp, karaci er hastalıklarını olu turur. Bu nedenle, antioksidanlar homeostazinin devamı için gereklidir. Son zamanlarda karaci er hastalıklarını iyile tirmede kullanılan antioksidanlar tabloda gösterilmi tir (81). Ayrıca, ço u ilaçlar hepatoksik yan etkiye sahiptir. Bir çalı mada, Silmarin'in yüksek karaci er enzimlerine sahip hastalarda karaci er zedelenmesi- hasarı üzerine etkisi ara tırılmı tır. Silmarin'in karaci er enzim yüksekli i olan hastalar için güvenli ve etkili bir tedavi seçene i oldu u, hayat kalitesi ve performansı gibi karaci erle ili kili semptomlar açısından yararı tedaviden iki ay sonra zaten gösterilmi tir (82). nsüline ba ımlı olmayan diabetes mellitus (T2DM) ve ili kili kronik karaci er hastalı ı olan hastalarda; plazma glukoz, insülin ve trigliserit seviyesi yüksektir, lipid peroksidasyon artar ve do al antioksidan rezervleri azalır. Hücre redoks düzeyleri ve karaci er fonksiyon iyile tirilmesi ve yeniden dengelenmesi için silibinin ile bir çalı ma yapılmı tır. T2DM'li hastalarda Silibinin'in kullanımı; hem insülin hem de trigliserid, plazma glukoz seviyelerinde önemli bir azalmaya neden olmu tur (83).

Silibinin, güçlü antihepatoksik etkisi nedeniyle neredeyse tüm dünya tarafından artık günlük diyetle bile kullanılmaktadır. Silmarin yüzyıllar boyunca karaci er hastalıkları için bitkisel ilaç olarak kullanılmı tır ve günümüzde halen karaci er koruyucu özelliklerinden dolayı kullanılmaktadır (84,80). n vitro

çalı malar, Silmarin'in hem antioksidan hem de Küpffer hücrelerinde süperoksid üretimin engellenmesini içeren anti-inflamatuar özelliklerini göstermiştir (85). Dahası silibinin, endotelial hücrelerinde hidrojen peroksid indüklü apoptozunu engellemektedir (86).

2.7.2.4. Silibinin'in Diyabet Üzerine Etkisi

Silmarin'in tip 2 diyabetli hastalarda ve STZ indüklü diyabetik sıçanlarda proteinüriyi azalttığı gözlenmiştir (87, 88). Podosit hasarı diyabetik nefropatinin en belirgin özelliğidir. Fare podosit kültürü ve OVE26 tip 1 diyabetli ve nefropatili farede yapılan çalışmada; Silibinin'in podosit hasarı ve yüksek glikoz indüklü oksidatif stresi in vivo ve in vitro olarak azalttığı gözlenmiştir (89). Diyabetik sıçanlarda yapılan bir çalışmada, diyabet kaynaklı kardiyomiyosit hasarına karşı silmarin'in hücre koruyucu etkisi incelenmiştir. Silmarin ile tedavi edilen grupta; apoptoza karşı kardiyomiyositlerin korunduğu ve pankreas β -hücrelerinin hayatta kalmasının sağlandığı gözlenmiştir (90). Nkx6.1; farklılaşma, yenilenme ve pankreatik hücrelerin devamından sorumlu transkripsiyon faktörüdür. Bir çalışmada; Nkx6.1 transkripsiyon faktörü ekspresyonu ve hücreleri neogenezinde Silmarin etkisi incelenmiştir. Silmarin ile tedavi edilen pankreatektomili sıçanlarda; Nkx6.1 ekspresyonunun arttığı, serum insülin ve serum glikoz normalizasyonunda artış meydana getirdiği gözlenmiştir (91). Peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptörler (PPARs) glukoz ve lipid metabolizmasında anahtar bir rol oynayan reseptörlerdir. PPAR tip 2 diyabetli hastalarda kan şekeri düzeylerini düşürmek için insülin sensibilizatör olarak klinikte kullanılan tiazolidinedionların agonistidir. Bu ilaç grubunun birçok yan etkisi gözlemlenen bazı ülkelerde kullanımını yasaklanmıştır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda; deve dikeninin PPAR için agonist özellik gösterdiği anlaşılmıştır (92). Tip 2 diyabetik hastalarda; Silmarin'in oksidatif stres endeksleri ve hs-CRP (Yüksek-duyarlı C-reaktif protein) üzerine etkilerini belirlemek amacıyla yapılan randomize klinik bir çalışmada, bazı antioksidan endeksleri (SOD, GPX ve TAC) artırdığını, hs-CRP düzeylerini düşürdüğü gözlenmiştir (93).

Yapılan di er bir çalı mada; Diyabetik sıçanlarda, atorvastatinin farmakokineti i üzerine Silmarin'in etkileri incelenmi tir. Sonuçta, diyabette mikrozomal enzim aktivitelerinin up-regülasyonu gözlenmi tir. Sonuç olarak Silmarin'in, diyabetik sıçanlarda enzim aktivitelerini ve atorvastatinin farmakokineti ini önemli ölçüde düzenleyebildi i sonucuna varılmı tır (94).

Yüksek glikozla birlikte azalmı oksijen seviyesi, diyabetik hastalarda kronik yaralara sebebiyet verebilmektedir. Geciken yara iyile mesi, azalan endotel hücre göçü sonucunda bozulan anjiyogeneze neden olmaktadır. Silmarin'in, liyofilize ilaç kapsülü haline getirildi inde, yüksek glikoz kaynaklı endotel hücre göçünde azalmayı sa ladı ı gözlenmi tir (95).

Bu amaçla çalı mamızda deneysel olarak diyabet olu turulmu sıçanlarda Silibinin etken maddesinin HIF-1 ve TLR-2 genlerinin ekspresyon seviyelerine etkisini inceleyip histokimyasal olarak da göstermeyi hedefledik. Yaptı ımız literatür taramaları sonucunda, Silibinin'in iyile tirici birçok özelli i bulundu u ve yan etkisi olmadı ı görülmektedir. Silibinin'in diyabetik nefropati patogenezinde önemli oldu unu dü ündü ümüz HIF-1 ve TLR-2 genlerinin ekspresyon seviyelerini de i tirmesini, bu de i imlerin böbrek histopatolojisi üzerine olan etkileri de inceleyerek diyabetik nefropatide kullanılabilecek bir fitoterapotik ajanı ve etki mekanizmasını bilim dünyasına kazandırmayı hedefledik.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalı ma Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan laboratuvarı, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Ara tırma laboratuvarı, ATQ Biyoteknoloji laboratuvarı, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Gereç

3.1.1. Deney Hayvanları

Deneyel uygulamalar, Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan onay alınarak gerçekleştirildi (Karar no: 04.04.2007/12). Bu çalı mada a ırkları 250-350 gram arasında de i en Wistar cinsi toplam 56 adet erkek sıçan kullanıldı (ekil 5).



ekil 5. Çalı madaki deney grupları.

Deneyde kullanılan sıçanlar, Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Laboratuvarından temin edildi. Sıçanlar standart 12 saat gün ışığı / 12 saat

karanlık), ısı (25° C)'da yeteri kadar su ve yem (Yem Kurumu Standart Sıçan Yemi) ile toplam 4 hafta süreyle beslendiler (Tablo 1).

3.1.2. Kullanılan ilaçlar

1. Streptozotosin (STZ)
2. Silibinin

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

1. Ketamin (Alfamin, Alfasan IBV.)
2. Ksilazin (Alfazin, Alfasan IBV.)
3. Karboksi metil selüloz (Sigma)
4. RNA later (Qiagen)
5. QIAZOL Lysis Reagent (Qiagen)
6. Buffer RLT (Qiagen)
7. % 70 lik Etanol (Merck)
8. Buffer RWT (Qiagen)
9. Buffer RPE (Qiagen)
10. RNase Free Water (Qiagen)
11. 10X Buffer RT 2 µg (Qiagen)
12. dNTP Miks 2 µg (Qiagen)
13. Oligo-dT Primer (10µM) 2 µg (Qiagen)
14. RNase inhibitör (10ünite/µl) 1µg (Qiagen)

15. Omniscript Reverse Transcriptase 1µg (Qiagen)

3.1.4. Ekipmanlar

1. So utmalı santrifüj: Eppendorf MR5415
2. Santrifüj: Jouan B4
3. Buzdolabı: Arçelik
4. Derin dondurucu: U ur
5. Hassas terazi: Scaltec SPB 33
6. Vorteks: yellow line TTS2
7. Çalkalayıcı: velp scientifica
8. Otomatik pipetler: Eppendorf
9. Nano drop: Thermo, Scientific
10. pH metre: Hanna Instruments
11. Manyetik karı tırıcı: Nüve
12. Thermal cycler: ler (Corbett Palm Cyclers)
13. Tissue-Lyser II (Qiagen VX350 Series 2 WPS 3601C12)
14. RT²-PCR cihazı: Rotor Gene Q
15. Laminar akım kabini: (Hepa filtreli) (Thermo, Scientific)
16. Ara tırma mikroskobu: Olympus BX50

3.1.5. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları

0.01 M Sodyum Sitrat Çözeltisi: 0,294 g sodyum sitrat dihidrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O = 294,1$ g/mol) alınarak, deiyonize su ile hacim 100 ml'ye tamamlandı ve 1 Normal HCl ile pH'sı 4.5 olarak ayarlandı.

Streptozotocin Çözeltisi: Her hayvanın ağırlığına göre STZ hesaplanıp sodyum sitrat tamponu içinde çözdürüldü. STZ ılık ve ıstıdan kolayca etkilendi için; buz dolu kapta ve alüminyum folyo ile sarılarak hazırlandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Deney Planı

Çalı mamız 5 gruptan oluştu.

Tablo 1. Çalı mada yer alan gruplar

Deney Grupları	Hayvan Sayısı/Grup	Uygulanan İlaç	Doz	Süre
Kontrol Grubu	10	Kontrol	-	4 hafta
Diyabetik grup	12	STZ	65mg/kg	tek doz
Diyabetik Grup + 100 mg/kg Silibinin tedavi grubu	12	STZ (tek doz)+Silibinin	100 mg/kg	4 hafta
Diyabetik Grup + 200 mg/kg Silibinin tedavi grubu	12	STZ (tek doz)+Silibinin	200 mg/kg	4 hafta
Silibinin Grubu (5 sıçana 100 mg/kg, 5 sıçana 200 mg/kg Silibinin verilen grup)	10	Silibinin	100 mg/kg 200 mg/kg	4 hafta

Grup I: (Kontrol grubu): Bu gruba hiçbir madde verilmedi.

Grup II: (Diyabet grubu): Deneysel diyabet modeli 0.01 M sitrat tamponu (pH 4.5) içinde taze olarak hazırlanmış STZ çözeltisinden 65 mg/kg olacak şekilde tek doz i.p. olarak insülin enjektörü kullanarak uygulanmıştır. 24 ve 48 saat sonra

kuyruk veninden alınan kanla glukoz tayini yapıldı. Kan glukoz de eri 200 mg/ml ve üzeri olanlar diyabetik kabul edildi. Deney sonuna kadar bu gruptan 1 sıçan öldü.

Grup III: (Diyabet + 100 mg/kg Silibinin grubu): Diyabet protokolü grup II'ye yapıldı ı gibi uygulandı. Bu gruptaki sıçanlara hergün 100 mg/kg Silibinin günde tek doz olarak gastrik gavajla 4 hafta süreyle uygulandı (ekil 6). Deney sonuna kadar bu gruptan 1 sıçan öldü.

Grup IV: (Diyabet + 200 mg/kg Silibinin grubu): Diyabet protokolü grup II'ye yapıldı ı gibi uygulandı. Bu gruptaki sıçanlara hergün 200 mg/kg Silibinin günde tek doz olarak gastrik gavajla 4 hafta süreyle uygulandı.

Grup V: (200 mg/kg + 100mg/kg Silibinin grubu): Bu gruptaki 5 sıçana hergün 200 mg/kg Silibinin, di er 5 sıçana 100 mg/kg Silibinin günde tek doz olarak gastrik gavajla 4 hafta süreyle uygulandı. Deney sonuna kadar bu gruptan 1 sıçan öldü.



ekil 6. Gastrik gavaj ile Silibinin verilmesi.

3.2.2. Streptozotocin ile Diyabet Modeli

3.2.2.1. Streptozotocinin Yapısı ve Etki Mekanizması

Streptozotocin (STZ)'nin kapalı formülü $C_8H_{15}N_3O_{17}$ olup, molekül a ırlı ı 265.2 daltondur. Kimyasal bir toksindir ve *Streptomyces griseus* adlı mantarın küfünden elde edilmektedir. Yüksek ısıda bozunan, beyaz ve açık sarı renk arasında de i en bir renge sahiptir. -20^0C 'de saklanması ve hazırlanması gerekmektedir. Su, alkol ve ketonlarda çözünmektedir. Çözeltideki çözünenlerin kararsızlı ı nedeniyle kullanım sırasında hazırlanmalıdır. Belirgin özelli i; hepatoksik ve nefrotoksik olmasıdır. Antioksidan enzim sisteminin olmadığı pankreas β hücrelerini oksidan etkisi ile tahrip etmektedir (96,97). STZ, Langerhans adacıkları β hücrelerinde GLUT-2 glukoz taşıyıcı reseptörleri aracılı ıyla hücre içine alınmaktadır. STZ'in sitotoksik etkisi, NAD seviyelerinin azaltılması, serbest radikallerin oluşturulması ve DNA zincir kırılmaları ile olmaktadır. Pankreas β hücrelerinin NAD seviyeleri dü üktür böylece STZ muamelesi ile kolayca hasar görebilmektedirler (98).

3.2.2.2. Diyabet Olu umu

Diyabet oluşturmamak amacıyla pH'sı 4.5 olan 0.01 M sitrat tamponu içinde her hayvanın a ırlı ına göre STZ hesaplandı ve çözdürüldü. Deney boyunca STZ ılık ve ırsıdan korundu. STZ verilecek hayvan grupları için, STZ her defasında taze olarak hazırlandı.

3.2.2.3. Kan Glukoz De erlerinin Ölçümü

insülin enjektörü ile hayvanların a ırlıklarına göre, tek doz 65 mg/kg STZ i.p olarak verildi. 24 ve 48 saat sonra kuyruk veninden kan alınıp glukometre (optium xceed) ile kan glukoz de erleri ölçüldü. STZ verilen bütün sıçanların kan glukoz de eri >200 mg/dl olduğundan diyabetik kabul edilip, deneye başlandı.

3.2.2.4. Kilo Ölçümleri

Deneye başlamadan önce kilo ölçümleri yapıldı. Bu kilolara uygun doz hesabı yapılarak STZ ve Silibinin uygulandı. Deney bitiminde de kilo ölçümleri hassas terazide yapılarak de i iklikler kaydedildi

Sıçanlara enjeksiyon uygulanmasını takiben 4. haftada intramusküler (im.) olarak uygulanan % 10'luk ketamin (Alfamin, Alfasan IBV.)-% 2'lik ksilazin (Alfazin, Alfasan IBV.) anestezisi verilerek deney sonlandırıldı.

Moleküler parametrelerinin incelenmesi için sağ böbrekten kesitler alınıp RNA later solüsyonuna alındı. Histopatolojik incelemeler için de sol böbrek %10'luk nötral formalin solüsyonuna alındı. Real Time-PCR için alınan numuneler analizin yapılacağı tarihe kadar -20°C'de saklandı.

3.2.3. Doku Takip Çalışmaları

%10'luk nötral formalin solüsyonunda, immersiyon fiksasyon yöntemi uygulanan doku örnekleri tespitten sonra bir gece akan suda yıkama işlemine tabi tutulduktan sonra aşağıda gösterilen işlemlerden geçirildi.

A) Dehidratasyon

Alkol derecesi	Süre
%70	1 gece
%80	1 saat
%90	1 saat
%100	1 saat
%100	1 saat

B) effaflandırma

Ksilol I ½ saat

Ksilol II ½ saat

C) Emdirme

Ksilol+parafin (60°C etüvde) 15 dakika

Yumu ak parafin (60°C etüvde) 1 saat

Sert parafin (60°C etüvde) 4 saat

D) Gömme

Sert parafin

Hazırlanan parafin bloklardan, Leica tipi kızaklı mikrotom kullanılarak 4 mikron kalınlı ında kesitler alındı. Histolojik de erlendirme için preparatlar Hematoksilen-Eozin ile boyandı. Boyanan örnekler Olympus BX50 tipi binoküler mikroskopta incelendi ve foto raflar elde edilerek de erlendirildi.

3.2.4. Moleküler alı malar

Doku rneklerinin alınması



Dokunun homojenize edilmesi



RNA izolasyonu



cDNA sentezi



RT- PZR



Veri analizi

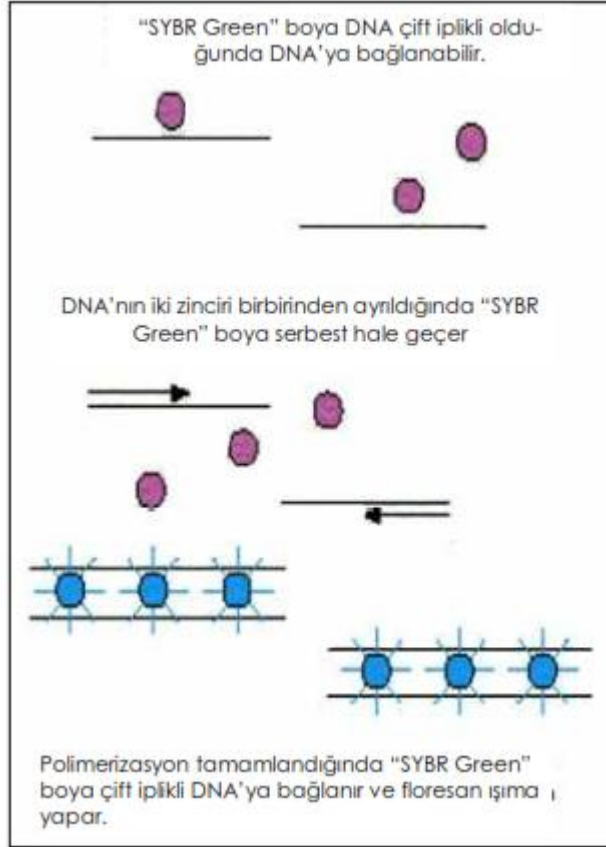
ekil 7. Moleküler alı ma yöntemi

3.2.4.1. Yöntem

Sa böbrek dokusu eppendorf tp içerisine alındı ve tüm dokuyu kaplayacak ekilde RNA later stabilizasyon solüsyonu ilave edildi. Doku içerisine nüfuz etmesini sa lamak amacı ile 24 saat oda ısısında bekletildikten sonra -20 C'de muhafaza edildi. -20 derecede saklanan doku örneklerinden sırasıyla doku homojenizasyonu, RNA izolasyonu, cDNA sentezi, gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yapıldı (ekil 7).

3.2.4.1.1. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

cDNA'ya dönü türülen RNA molekülünün enzimatik tepkime ile in-vitro ço altılması temeline dayanan bir yöntemdir. cDNA'nın kopya sayısını sayısal de erlere dönü türme ve mRNA'nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilmektedir. Ayrıca tek nokta mutasyonları, patojenler, DNA hasarı, metilasyon, SNP analizi, kromozom bozukluklarının tespiti gibi çalı malarda da kullanılmaktadır. Kantitasyon, reaksiyon sırasında olu an ürüne ba lanan boya ile birlikte artan floresan ı ımanın ölçülmesi sayesinde yapılır. "SYBR Green" en fazla kullanılan boya çe itidir (ekil 8).



ekil 8. SYBR Green boyasının DNA'ya ba lanması (99).

Reaksiyon sırasında meydana gelen ürünün artı ma do ru orantılı olarak, DNA -boya kompleksi meydana gelir ve orantılı olarak floresan ı ıma artar. Floresan i aretli problara ihtiyaç olmadı ı için maliyeti ucuzdur. Yöntemin dezavantajları da vardır. stenmeyen PCR ürünlerin ço almasında da floresan aç ı a çıkaca ından her

zaman istedi imiz DNA'nın ço aldı mını i aret etmeyebilir. Böylelikle yanlış pozitif sonuç almak mümkündür. Ortamda hedef DNA dizisi olmadığı nda primerlerin birbiri ile bağlanmaları sonucunda “primer dimer”leri gözlemlenebilir. Ço altılan DNA'nın istenilen hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek için DNA'ların erime ve erime analizi (“melting curve”) yapılması gerekmektedir. Erime ve erime analizi yapılmak istendi inde cihaz PCR tüplerini yavaşça ısıtmaya başlar. Çift zincirli DNA birbirinden ayrılmaya başladığı nda floresan boya serbest kalır ve okunan floresan miktarı da düşer (99).

3.2.4.1.2. Dokudan RNA Elde Edilmesi

1. Dokular RNA later içerisinde çıkarıldı.
2. 900 µl QIAzol Lysis Reagent çözeltisi ile birlikte içerisinde 1 adet steril çelik bilye (Stainless Steel Beads, 5 mm Qiagen) bulunan plastik tüplere konuldu.
3. Homojenizasyon cihazı (Tissue Lyser) ile dakikada 50 osilasyon olacak şekilde yaklaşık 2 dk i leme tabii tutulup homojenize edildi (ekil 9).
4. TissueLyser LT cihazı ile homojenizasyonun ardından tüpler oda sıcaklığı nda yaklaşık 5 dk bekletildi
5. çerisine 100 µl gDNA Eliminator Solüsyonu eklendi. Bu solüsyon örnekler içerisinde yer alan gDNA'yı etkili bir şekilde azaltmakta ve ilerleyen a malarda DNaz kullanım gereklili ini ortadan kaldırmaktadır.
6. Ardından 400 µl kloroform eklenen tüpler vortekslenerek karı tırıldı.
7. 2-3 dk kadar oda ısısında bekletilen tüpler 12000 g de, 4⁰Cde 15 dk santrifüj edildi.
8. Santrifüj sonrasında tüplerde 3 faz gözlemlendi. En üstte yer alan renksiz sıvı faz, beyaz ara faz ve kırmızı renkli organik faz. Burada en üstte yer alan renksiz faz RNA'yı içermektedir.

9. RNA izolasyon i lemi için bu faz alınarak yeni bir santrifüj tüpüne aktarıldı.
10. Aktarılan örneklerin içerisine yaklaşık 600 µl %70'lik etil alkol eklendi ve pipetaj yapılarak karıştırıldı.
11. Kararımdan alınan 700 µl'lik örnekler 2 ml'lik ependorf tüplere yerleştirilen RNeasy Mini Spin kolonlarına transfer edildi.
12. 8000 g de (10000 rpm) oda sıcaklığında 15 s santrifüj edildi. Örneğin geri kalanı için işlem bir kez daha tekrarlandı.
13. Ardından 700 µl RWT tamponu Rneasy spin kolonuna eklendi ve 8000 g de 15 s santrifüj edilerek membran yıkandı.
14. Ardından 500 µl RPE tamponu RNeasy Mini Spin kolonu içerisine eklenerek önceki koşullarda santrifüj edildi.
15. Bu işlemin ardından tekrar 500µl RPE tamponu eklenen kolonlar bu sefer 8000 gde 2 dk santrifüj edildi.
16. Ardından yeni ependorf tüplere alınan kolonlar 1 dk en yüksek hızda santrifüj edildi.
17. Buradan alınan RNeasy spin kolonlar 1,5 ml lik yeni tüplere yerleştirildi, üzerine 50 µl RNaz free su eklendi ve 8000 g de 1 dk santrifüj edildi.
18. Bu işlem bir önceki adımda elde edilen elüatın kolona ilavesi ile tekrarlandı.
19. Ependorf tüpü içerisinde elde edilen RNA -80 °C de saklandı.



ekil 9. Çalı mada dokuların parçalanması için kullanılan parçalayıcı (Tissue Lyser).

3.2.4.1.3. RNA Konsantrasyonunun Ölçümü

1. zole edilen total RNA örneklerinin konsantrasyonları NanoDrop (Thermo Scientific) kullanılarak ölçüldü (ekil 10).

2. RNA Konsantrasyonu= $50(\text{sulandırma oranı}) \times 40(\text{sabit}) \times \text{OD}_{260} = \text{ng} / \mu\text{l}$.



ekil 10. Çalı mada kullanılan Nanodrop spektrofotometre

3.2.4.1.4. cDNA Eldesi

cDNA eldesi için öncelikle gDNA eliminasyon karı ımı hazırlandı. Yakla ık 5 µg RNA üzerine, 2 ml GE buffer ve toplam hacim 10 µl olacak ekilde nükleaz free su eklendi. 42 ° C’de 5 dk inkübe edildi. Ardından revers transkripsiyon karı ımı hazırlandı. 10 µl gDNA eliminasyon karı ımı içeren tüplere 10 µl revers transkripsiyon karı ımı eklendi. 42° C’de 15 dk inkübe edildi (Tablo 2).

Tablo 2. cDNA sentezi için kullanılan karı ım içeri i

Karı ım	Miktar (µl)
5X Buffer BC3	4
Kontrol P2	1
RE3 Revers Transkriptaz Mix	2
Nükleaz free water	3
Toplam	10

3.2.4.1.5. RT-PCR Reaksiyonunun Hazırlanması

PCR komponent karı ımı 5 ml’lik tüp içerisinde hazırlandı (Tablo 3).

Tablo 3. Bir reaksiyonluk PCR komponent karı ımı

Komponent	Miktar(µl)
RT2 SYBR Green Mastermix	12.5
cDNA sentez reaksiyonu	1
RT2 QPCR Primer Assay (10mM stok)	1
RNaz free water	10.5
Toplam	25

25 mikrolitre PCR komponent karı ımı rotor disk kuyucuklarına yüklendi (ekil 11). Ardından RT-PCR cihazı (Rotor Gene Q) a a ıdaki ekilde programlanıp, veriler elde edildi (ekil 12, 13).

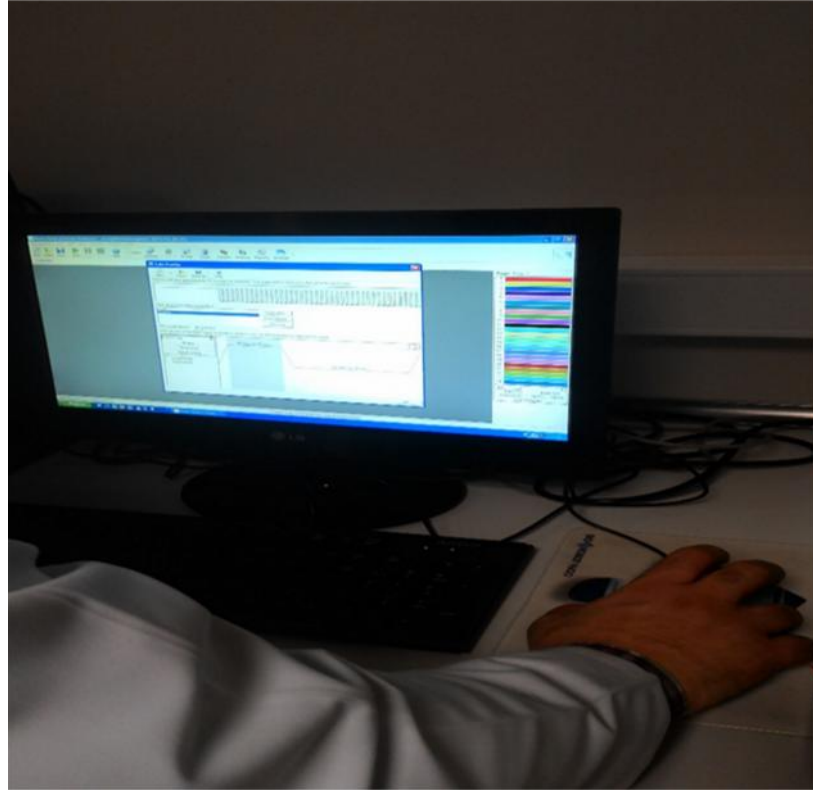
95° C'de 10 dk
95° C'de 15 s } 40 döngü
60° C'de 30 s }



ekil 11. PCR karı ımlarının rotor disk kuyucuklarına yüklenmesi



ekil 12. Ara tırmada kullanılan RT-PCR cihazı (Rotor Gene Q)



ekil 13. RT-PCR alı ması sırasında verilerin elde edilmesi

3.2.5. Verilerin De erlendirilmesi ve istatistiksel Analizler

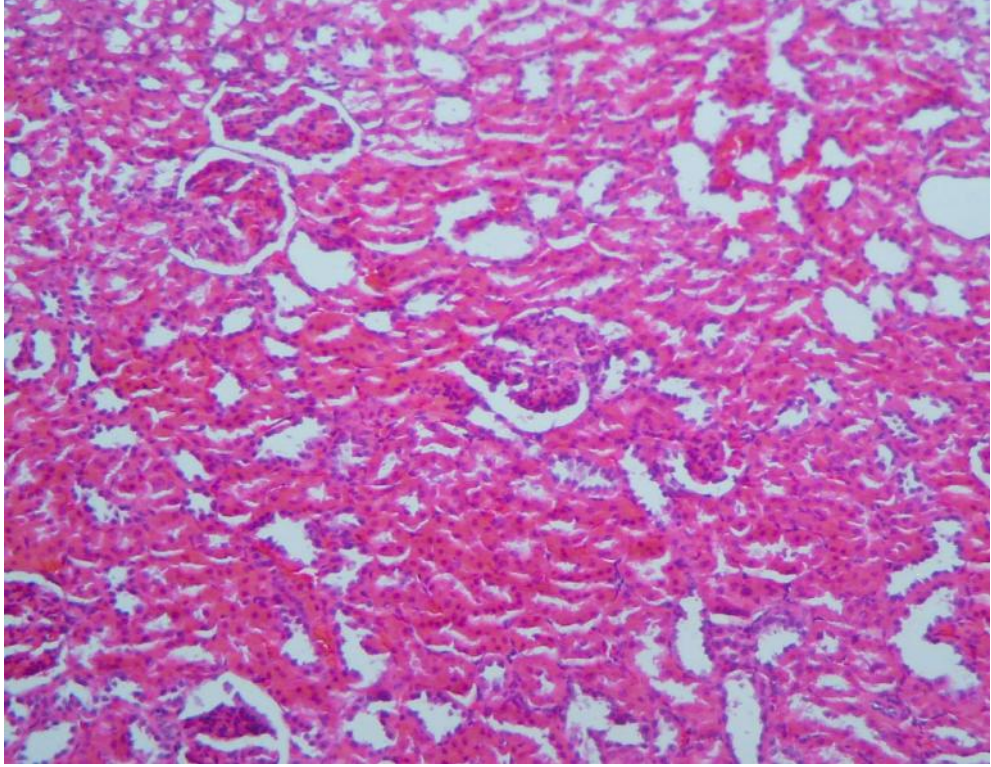
statistiksel de erlendirmede SPSS (Statistical Package for Social Sciences) v10.0 paket programı kullanıldı.

Böbrek örneklerinden ölçülen gen ifadesi düzeylerinin gruplar arası kar ıla tırılması, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık Student t testi ile de erlendirildi.

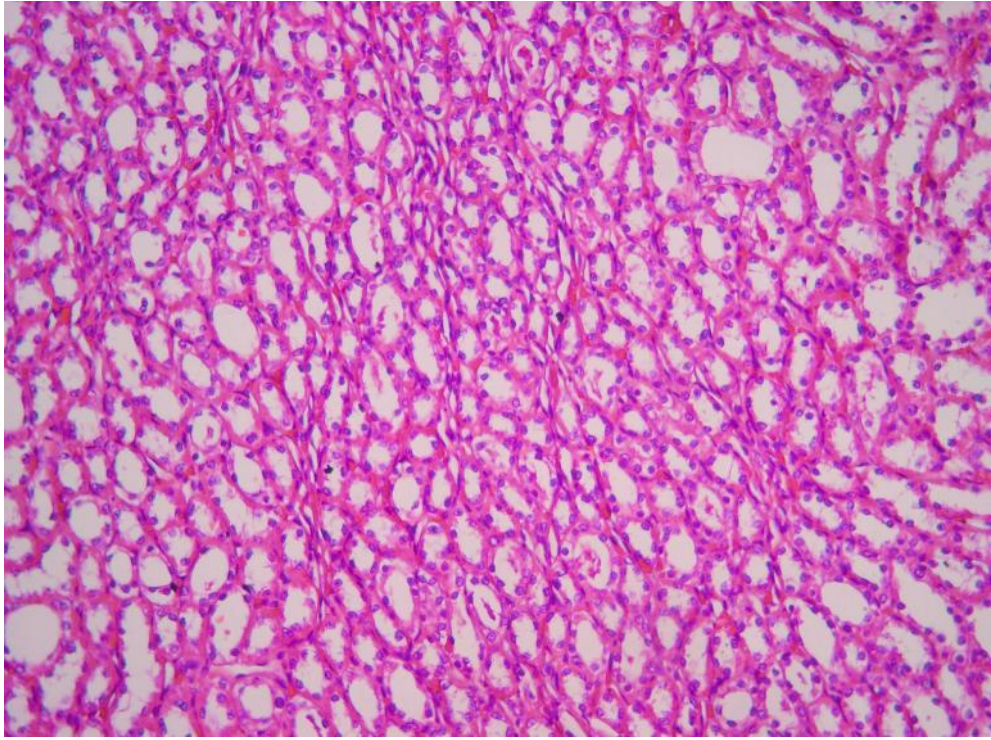
4. BULGULAR

4.1. Histolojik Bulgular

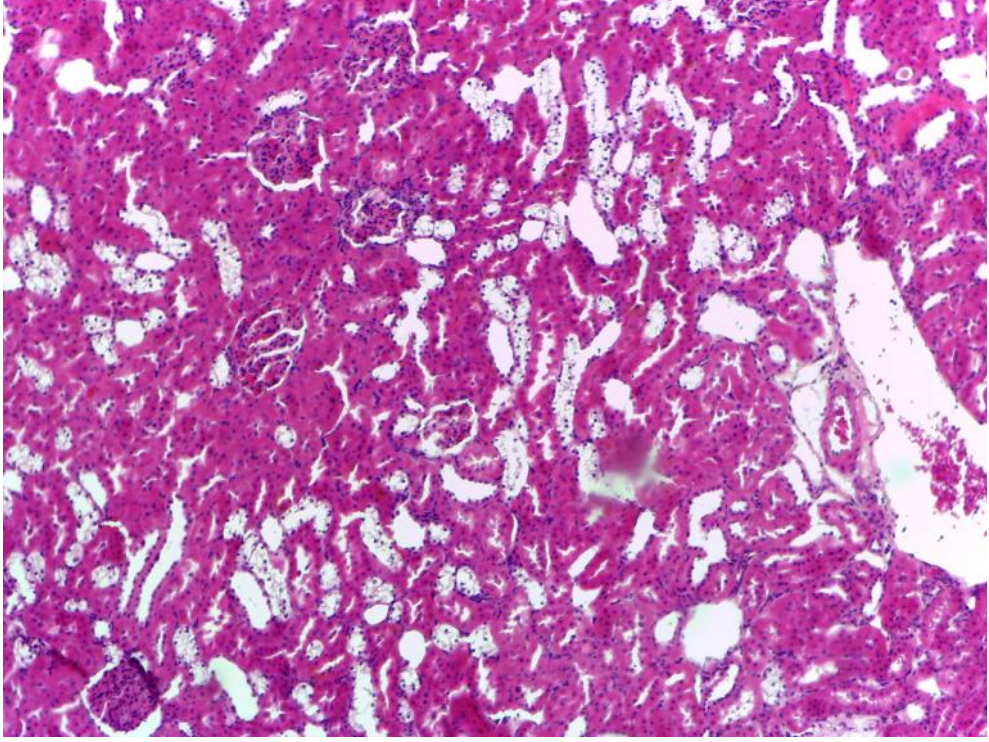
İlk mikroskobu incelemelerinde kontrol grubuna ait böbrek dokularında, glomerül ve tübül yapıları normal olarak izlendi (Resim 1,2). Diyabet grubuna ait böbrek dokularında kortekste proksimal ve distal tübüllerde dilatasyon, parankimde mononükleer hücre infiltrasyonu, glomerüllerde dejenerasyon ve hemorajik alanlar izlendi. Medulla bölgesinde ise; tübüllerde dilatasyon ve çok miktarda hemorajik alan görüldü. Hem korteks hem medulladaki tübüllerin çoğunda, vakuolar dejenerasyon izlendi (Resim 3,4). Diyabet + Silibinin 100µg/kg grubuna ait böbrek dokularında glomerüllerde diyabetik gruptakine benzer bulgulara rastlandı. Burada da kortekste tübüler dilatasyon ve vakuolar dejenerasyon, glomerüler dejenerasyon ve mononükleer hücre infiltrasyonunun devam ettiği görüldü. Medulladaki tübüllerde de dilatasyon ve vakuolar dejenerasyon izlendi. (Resim 5,6). Diyabet + silibinin 200µg/kg grubuna ait böbrek dokusu histolojik kesitlerinde Diyabet + Silibinin 100µg/kg grubuna benzer bulgulara rastlandı. (Resim 7,8). Silibinin 100µg/kg ve 200µg/kg gruplarında da kontrol grubuna benzer şekilde normal histolojik bulgulara rastlandı (Resim 9,10).



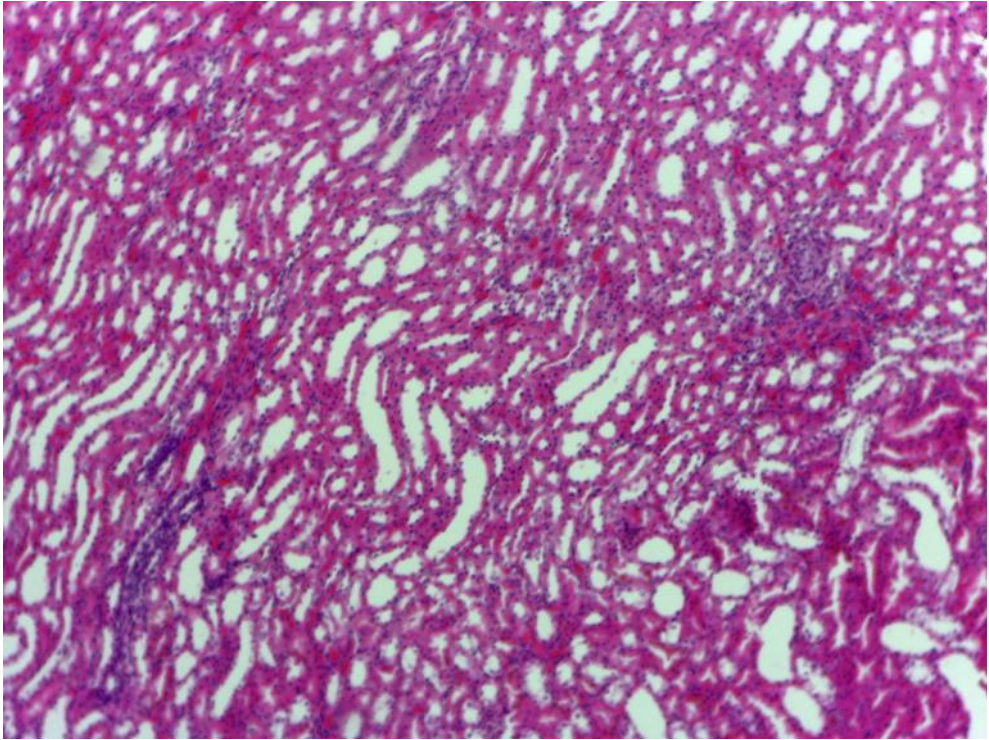
Resim 1. Kontrol grubuna ait sıçan böbrek kesitinin normal histolojik görünümü.
Korteks bölgesi (H-E) (X10).



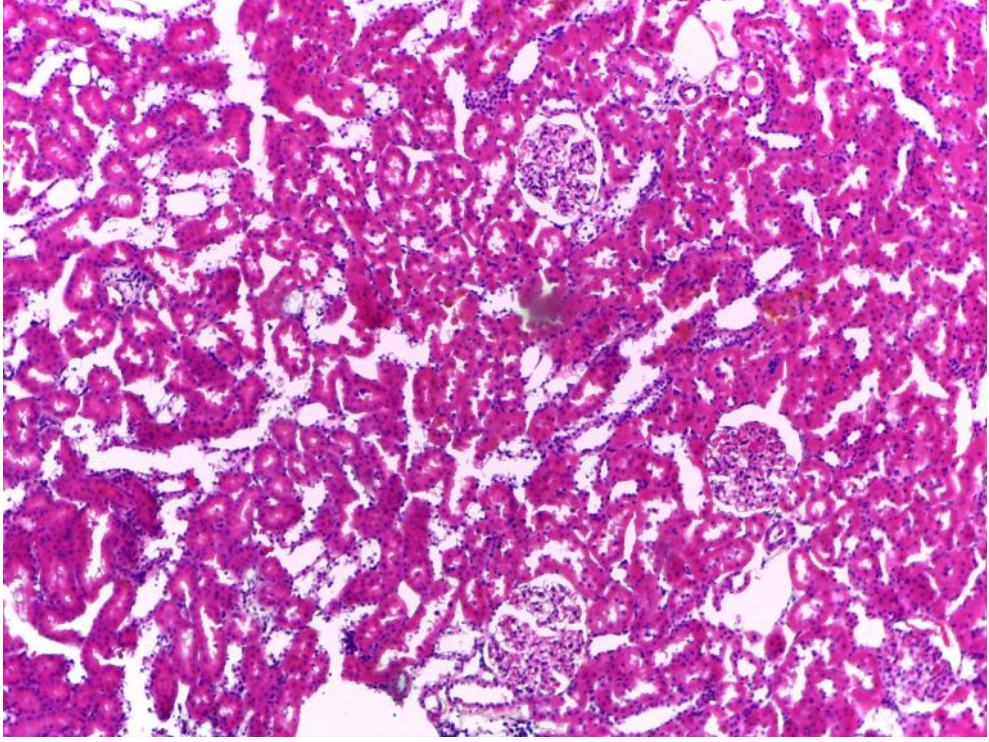
Resim 2. Kontrol grubuna ait sıçan böbrek kesitinin normal histolojik görünümü. Medulla bölgesi (H-E) (X10).



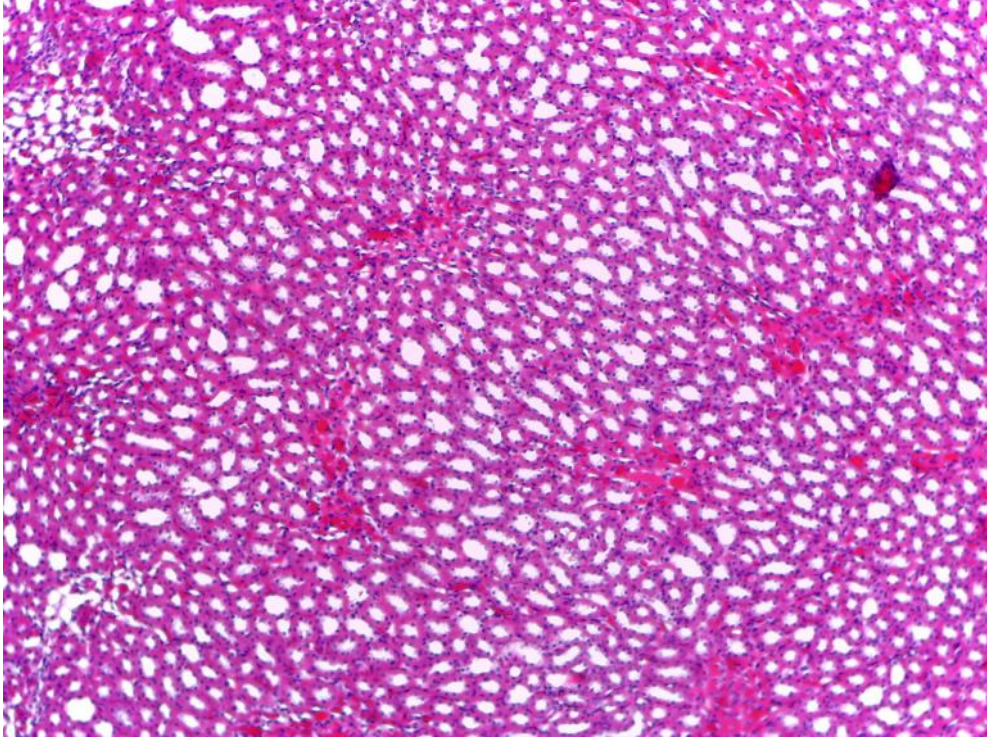
Resim 3. Diyabet grubuna ait sıçan böbrek kesitinin histolojik görünümü. Korteks bölgesi (H-E) (X10).



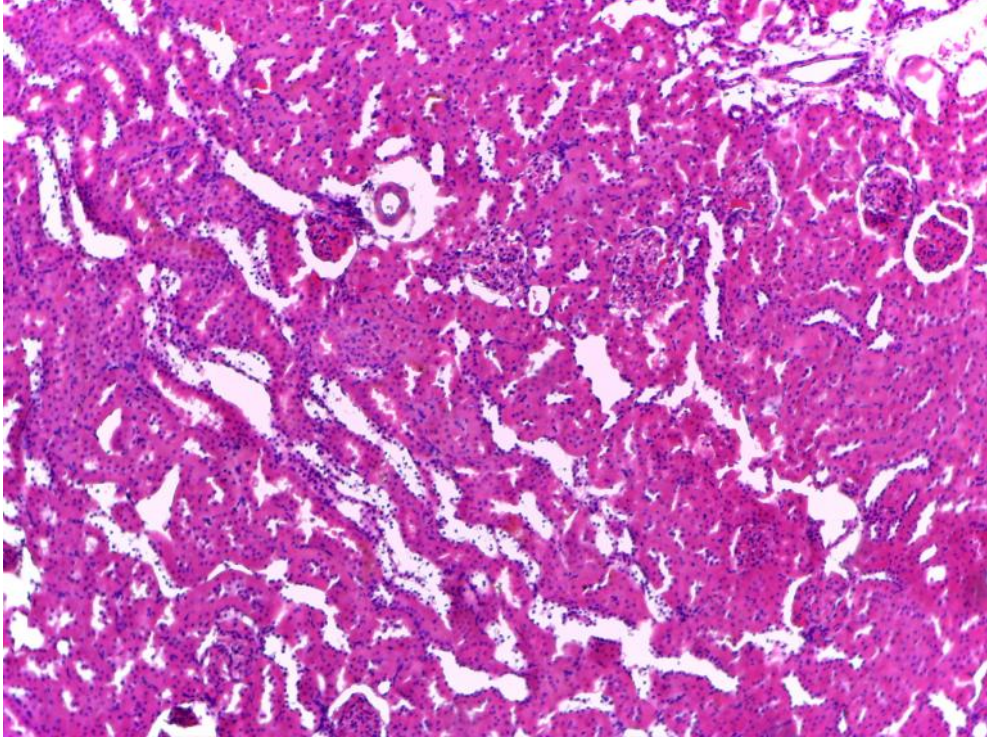
Resim 4. Diyabet grubuna ait sıçan böbrek kesitinin histolojik görünümü. Medulla bölgesi (H-E) (X10).



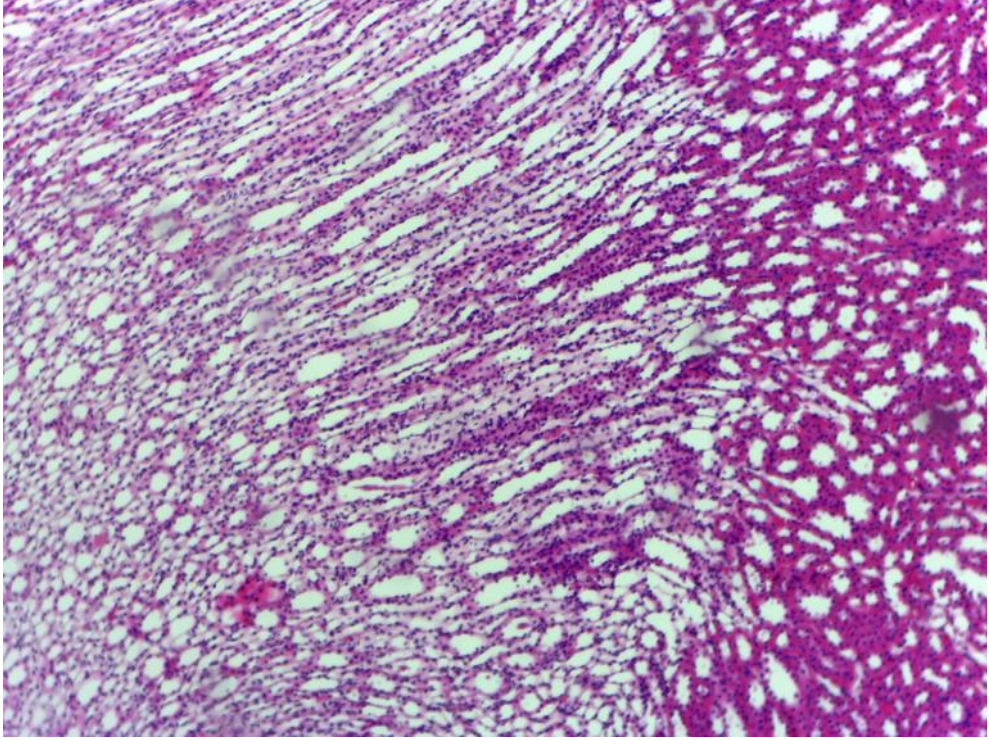
Resim 5. Diyabet + Silibinin 100µg/kg grubuna ait sıçan böbrek kesitinin histolojik görünümü. Korteks bölgesi (H-E) (X10).



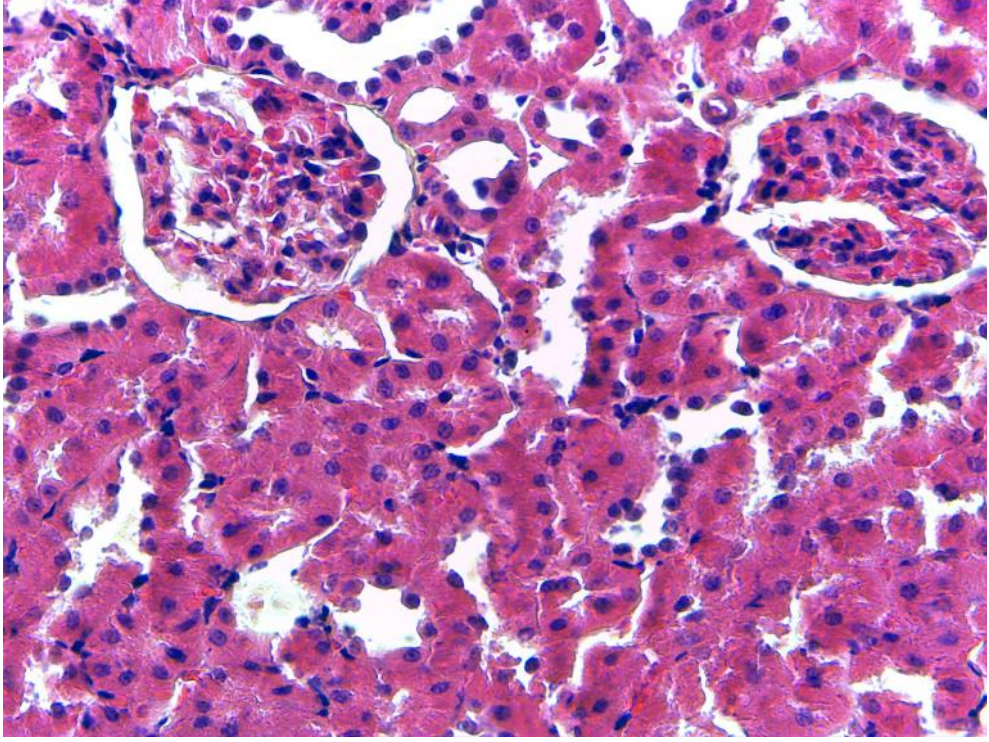
Resim 6. Diyabet + Silibinin 100µg/kg grubuna ait sıçan böbrek kesitinin histolojik görünümü. Medulla bölgesi (H-E) (X10).



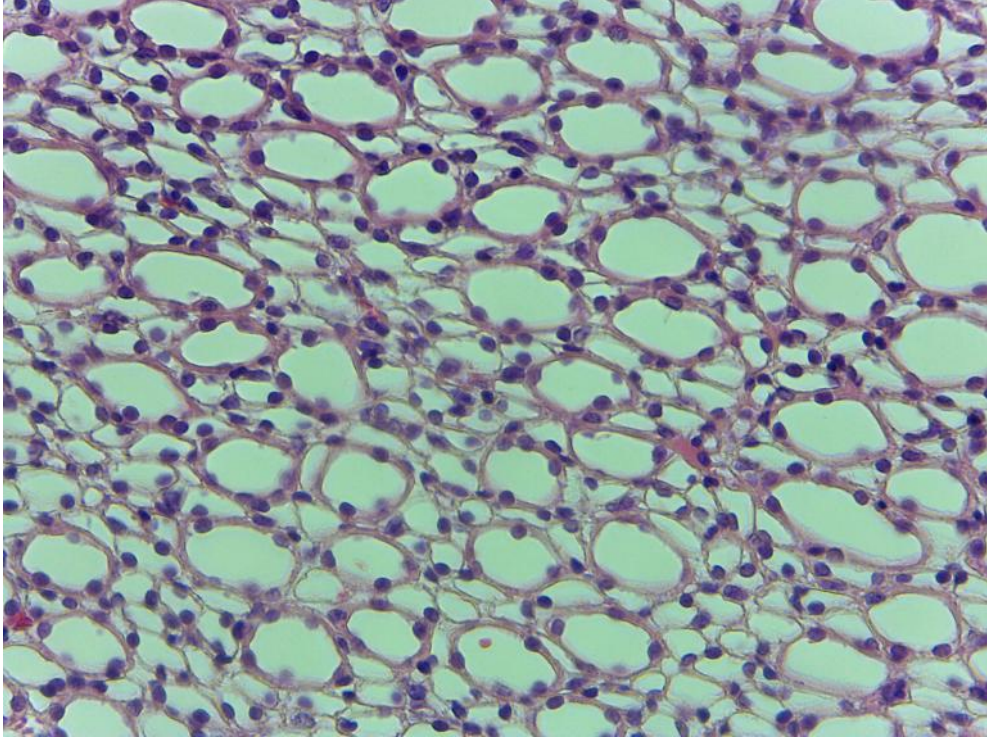
Resim 7. Diyabet + Silibinin 200 μ g/kg grubuna ait sıçan böbrek kesitinin histolojik görünümü. Kortex bölgesi (H-E) (X10).



Resim 8. Diyabet + Silibinin 200 μ g/kg grubuna ait sıçan böbrek kesitinin histolojik görünümü. medulla bölgesi (H-E) (X10).



Resim 9. Silibinin grubuna ait sıçan böbrek kesitinin normal histolojik görünümü.
Korteks bölgesi (H-E) (X40).



Resim 10. Silibinin grubuna ait sıçan böbrek kesitinin normal histolojik görünümü.
Medulla bölgesi (H-E) (X40).

4.2. Moleküler Bulgular

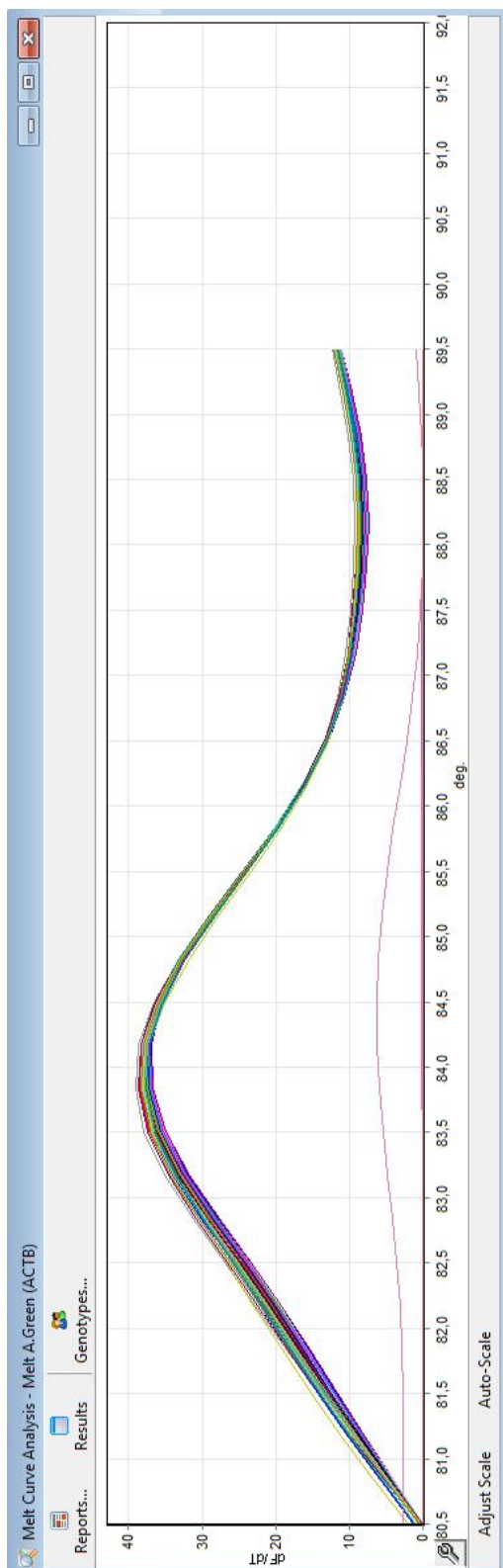
Çalı mamızda, nefropati üzerine silibinin etken maddesinin etkilerini ara tırmak ve diyabetik nefropatiyle ili kili olabilece ini dü ündü ümüz HIF-1 ve TLR-2 genleri ve 1 adet kalibratör gen (house keeping) RT-PCR ile çalı ılmı tır.

Alınan doku örneklerinin hepsinden RNA izolasyonu ba arılı ekilde yapılmı tır. Elde edilen RNA'ların kalitesi spektrofotometre ile ölçülmü tür.

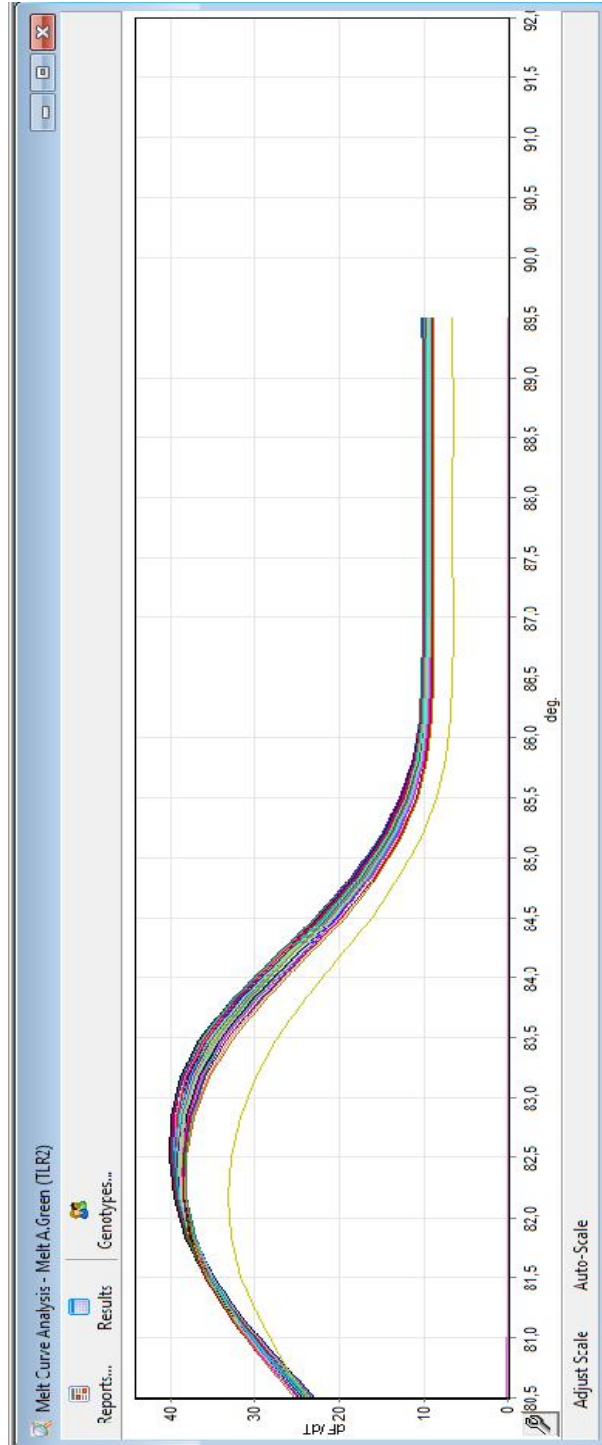
Daha sonra reverse transkriptaz kiti kullanılarak cDNA'lar elde edilmi tır.

RT² SYBR® Green qPCR Mastermix (Qiagen Cat. No. 330529) ile cDNA kombinasyonu RT² qPCR Assay için çalı ılmı tır.

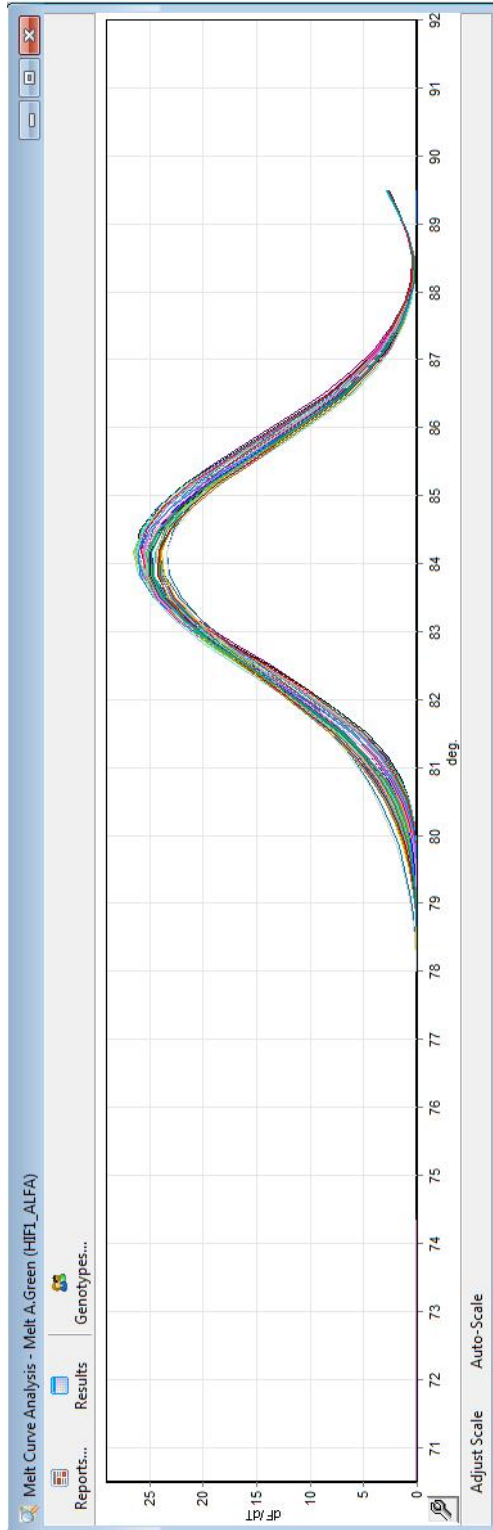
RT- PCR çalı ması sonucunda 3 adet gen de erlendirmeye alınmı tır. Bu çalı ma sonucu elde edilen bulgular her bir gen için tek tek de erlendirilerek sonuçlar hesaplanmı tır. Real-Time PCR cihazında kullanmı oldu umuz SYBR Green boyası özelli i gere i çift sarmal yapıya (DNA) ba landı nda ı ıma vermektedir. SYBR Green boyası melt analizi yapılan çalı mada farklı ürünlerin amplifiye edilip edilmedi inin anla ılması için kullanılmaktadır. Çift sarmal yapı hidrojen ba larıyla birbirlerine ba lıdır ve yeterli ısı verildi inde bu ba lar kopar. Melt analizi ile örneklerde ısı yükseltilir ve ba lar kopmaya ba lar. SYBR Green boyası çift sarmal yapıya ba lı oldu unda ı ıma verdi inden ba lar kopunca ı ıma olmayacaktır. E er bizim primer dimerlerimiz olsaydı normal DNA'dan daha az sayıda ba içerece inden dolayı normal ürünlerimizden daha dü ük bir ısıda ba ları kopacaktı ve ı ıma olmayacaktı ve melt analizinde biz bunu erken bir pik olarak görecektik. Genlerimizin melt analizi sonuçlarına ikinci bir pik görülmemesi bize farklı bir ürünün amplifiye olmadı ını gösterdi. Çalı maya ait erime e risi analizleri (“melting curve”) ve amplifikasyon grafikleri ekilde gösterilmi tir (ekil 14,15,16,17,18,19).



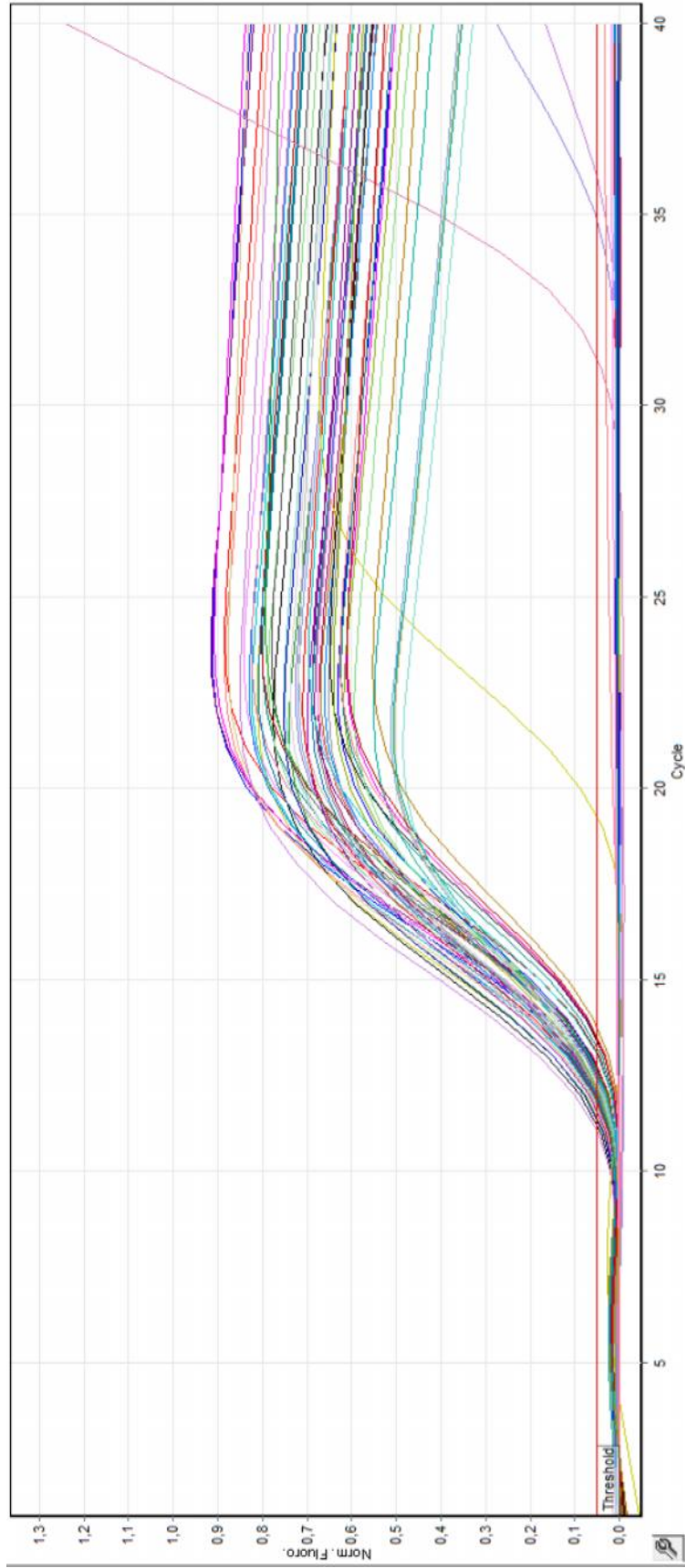
ekil 14. Beta actin geni erime e risi.



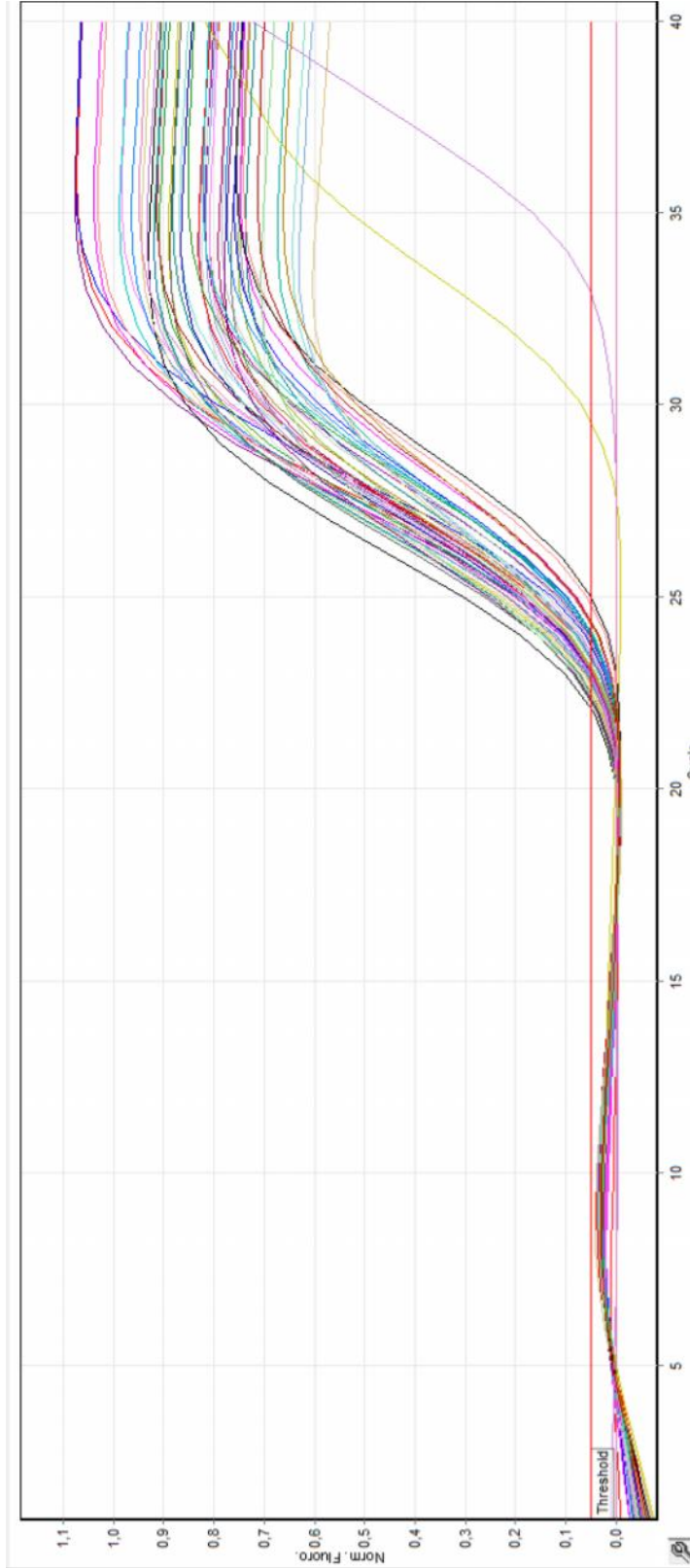
ekil 15. TLR-2 geni erime e risi.



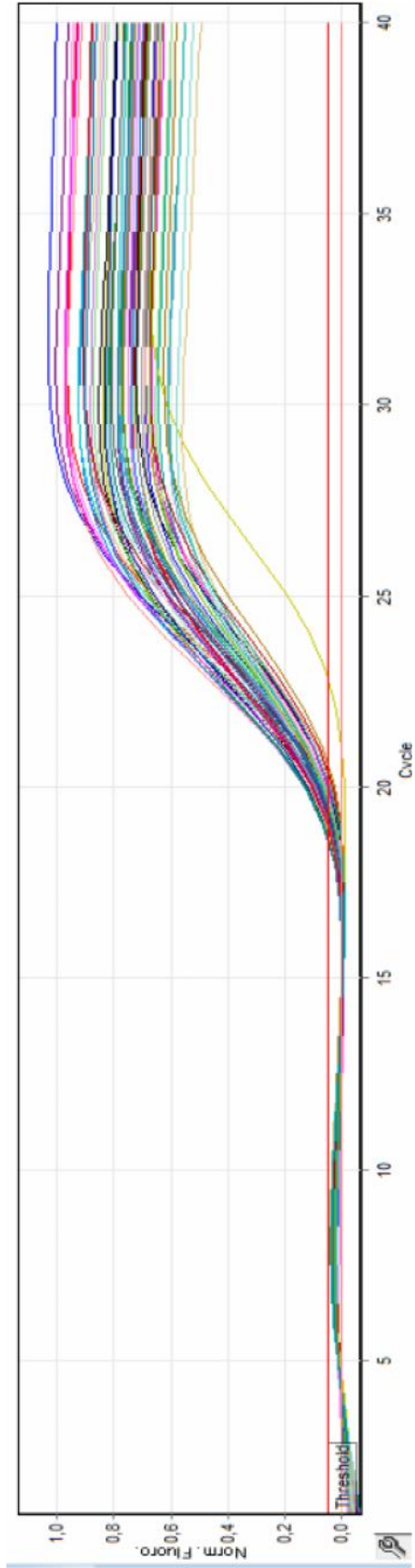
ekil 16. HIF 1 geni erime e risi.



ekil 17. Beta actin geni amplifikasyon e risi.



ekil 18. TLR 2 geni amplifikasyon e risi.



ekil 19. HIF 1 geni amplifikasyon e risi.

Tüm sonuçların uygun bir şekilde grafiksel sunumu amacıyla çalışmamızdaki kantitatif RT-PCR sonuçları ve p değerleri, tabloda ve grafikte gösterilmektedir (Tablo 5) (Grafik 3). Elde edilen veriler ortalama ve standart hata olarak ifade edilmiştir. Anlamlılık değeri olarak $p < 0,05$ kullanılmış ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). Ayrıca bu değerler renk skalası grafiğine dönüştürülmüştür (Şekil 20). Buradaki renk gradientleri normalize edilmiş ekspresyon sinyal değerlerini belirtmektedir.

RT-PCR çalışmasından elde edilen veriler 2^{-Ct} metodu kullanılarak analiz edilmiştir. RT-PCR çalışmasının sonuçları, her bir gen için elde edilen döngü sayısı (Ct) değeri olarak elde edilmektedir. Bu değer cihaz tarafından kalibratör olarak tanımlanan genler referans alınarak hesaplanmaktadır. Çalışmamızda her bir örnek için incelediğimiz genlere ait ortalama Ct değerleri de ayrıca hesaplanmıştır. Her bir gen için elde edilen Ct değeri referans olarak kullanılan bir veya daha çok housekeeping genin Ct değeri ile karşılaştırılarak Ct değeri elde edilmiştir. Çalışmamızda HIF-1 ve TLR-2 genlerine ait Ct değerleri ile housekeeping gen olarak kullandığımız Beta aktine ait Ct değeri karşılaştırılarak Ct değeri hesaplanmıştır. Birden fazla housekeeping gen kullanılması durumunda önce onların değeri normalize edilir (tek bir değerde birleştirilir) daha sonra Ct hesaplanır (100). Biz çalışmamızda 1 adet housekeeping gen kullandık. Bu nedenden dolayı bu amaçla normalizasyon işlemi yapmadık. Bu hesaplamaların ardından aşağıdaki denklemler yardımıyla 2^{-Ct} değerleri hesaplanmıştır. Hesapladığımız bu değerler tabloda ve grafikte görülmektedir (Tablo 4) (Grafik 1).

K: kontrol grubu, T: tedavi grubu, R: housekeeping gen, X: ilgili gen olmak üzere;

$$\Delta Ct_{KX} = Ct_{KX} - Ct_R, \quad \Delta Ct_{TX} = Ct_{TX} - Ct_R$$

$$\Delta \Delta Ct_X = \Delta Ct_{TX} - \Delta Ct_{KX}$$

$$\text{Kat değişimi} = 2^{-\Delta \Delta Ct_X}$$

Yukarıdaki denklemlerde de görüldüğü üzere 2^{-Ct} metodu ile hesaplanan değerler kullanılarak kontrol grubu ve tedavi grubu arasındaki gen ifadesi

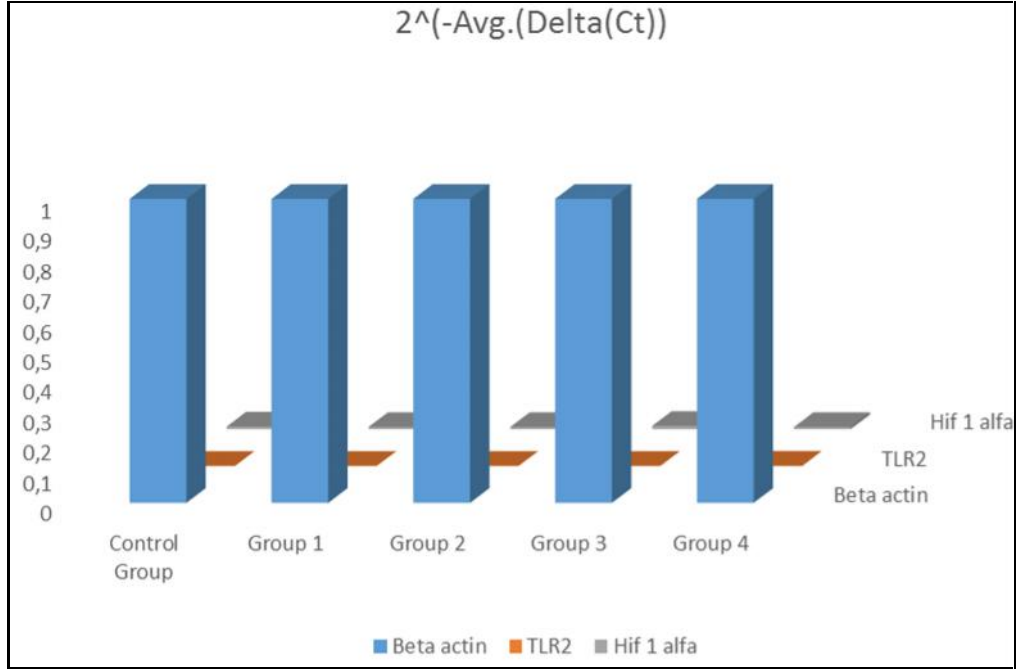
farklılıklarına karşılık gelen kat de i imi de erleri hesaplanır. Bu i lem sonrası çıkan de er 1'den büyükse, gen ifadesi kontrole göre o kadar kat artmış demektir. i lem sonrası çıkan de er 1'den küçükse a a ıdaki i lem uygulanır;

$$1/\text{Kat de i imi yani } 1/2^{-C_{Tx}}$$

Çıkan de er yine birden büyük olacaktır ancak bu defa gen ifadesinin artmış mı azaldı mını gösterecektir. De er kaç ise gen ifadesi kontrole göre o kadar kat azalmış demektir. Çalı mamızdaki genlerin kontrol grubu ile kıyaslandı nda di er gruplarda up ve down regülasyonları grafik halinde gösterilmiştir (Grafik 4).

Kat de i imi de eri -2 ve 2'den büyük olan de i imler önemsiz de i imler olarak belirtilmiştir. Çalı mamızda hesapladığımız kat de i im de erleri tabloda belirtilmiştir ve grafik olarak gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre genlerin ifadesinde kontrol grubu ile kıyaslandı nda di er gruplarda anlamlı bir artış ya da azalış görülmemektedir (Tablo 4) (Grafik 2).

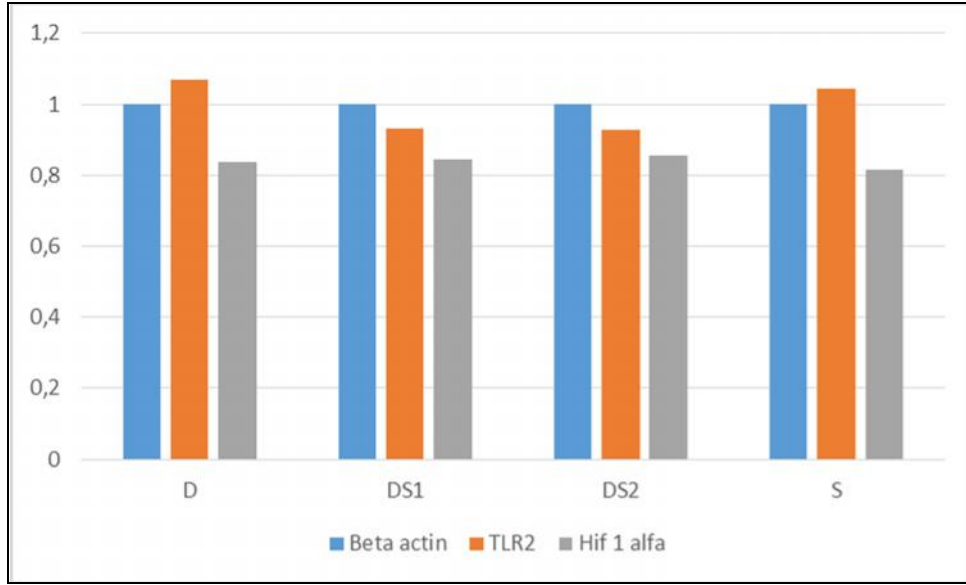
Kontrol grubu ile di er grupların genlerin ifade düzeyleri açısından incelenmesi amacıyla karşılaştırıldı ı, karşılaştırmalı saçılım grafikleri oluşturulmuştur. Bu grafiklerde kesikli çizgiler arasında kalan de erler ekspresyonda anlamlı bir de i imin olmadığını göstermektedir. Buna göre K grubu ile D (G1), DS1 (G2), DS2 (G3) ve S (G4) gruplarının karşılaştırıldı ı grafikler a a ıda verilmiştir olup, bunlar incelendi inde gruplar arasında HIF-1 ve TLR-2 genlerinin ifade düzeylerinde belirgin bir de i imin olmadığını görmektedir (Grafik 5,6,7,8). Ayrıca bunun haricinde D grubu ile karşılaştırıldı nda, K grubu hariç di er gruplar arasında genlerin ifade düzeyi arasındaki farklılıklar da incelenmiştir ve grafiklerde gösterilmiştir (Grafik 9,10,11).



Grafik 1. Grupların 2^{-Avg.(Delta(Ct))} de erleri

Tablo 4. Kat de i imi de erleri

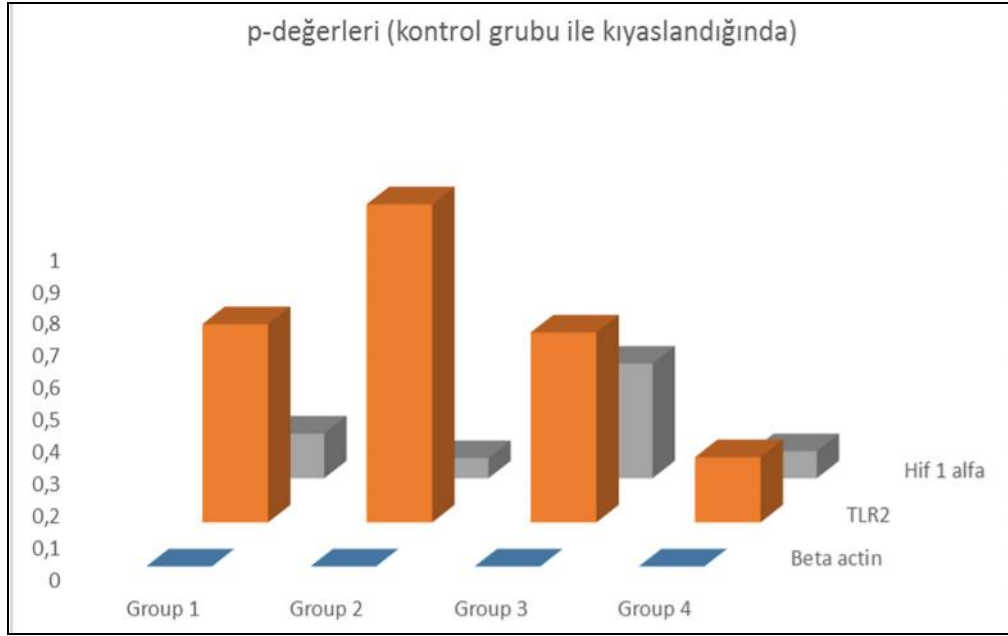
Gruplar \ Genler	D	DS1	DS2	S
Beta actin	1	1	1	1
TLR2	1,0687	0,9303	0,9278	1,0447
Hif 1 alfa	0,8356	0,8456	0,8547	0,8164



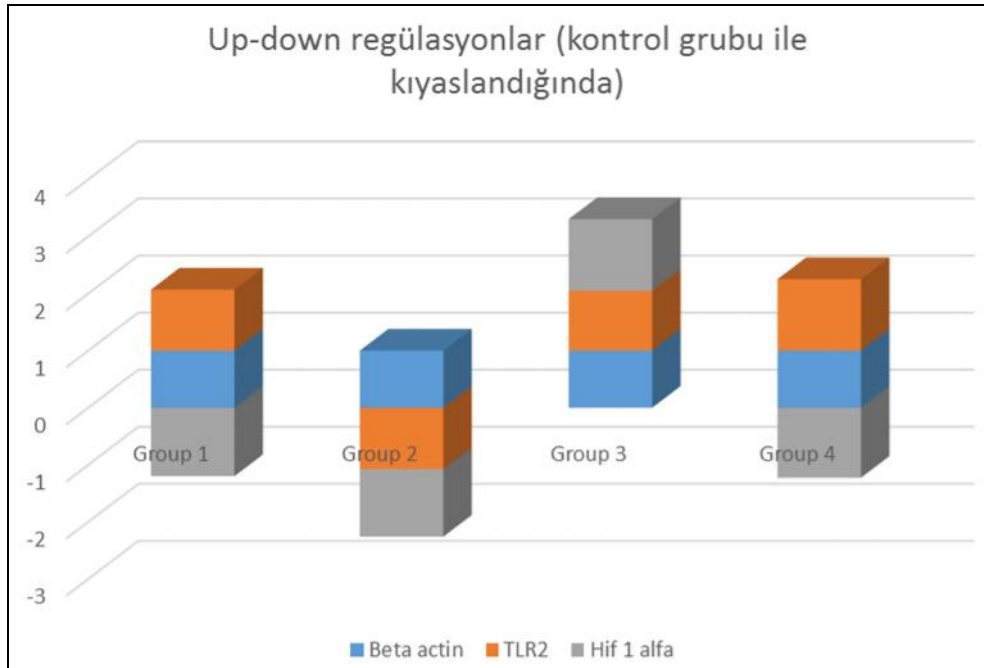
Grafik 2. Grupların kontrol grubuna göre kat de i imi

Tablo 5. p de eri

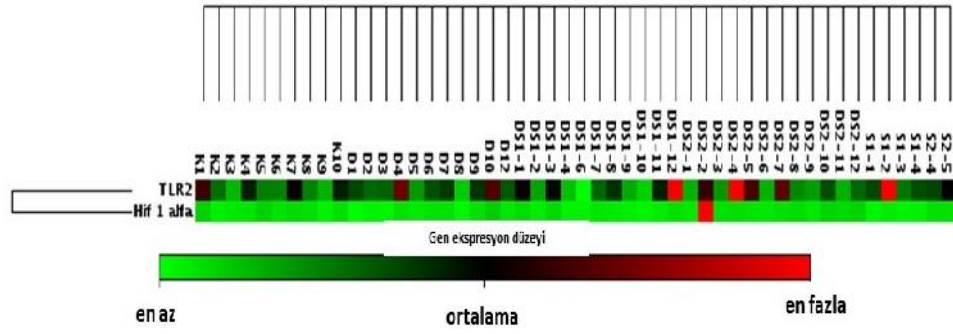
Gruplar	D	DS1	DS2	S
Genler				
TLR2	0,617036	0,990058	0,59127	0,202759
Hif 1 alfa	0,139313	0,062903	0,356908	0,08438



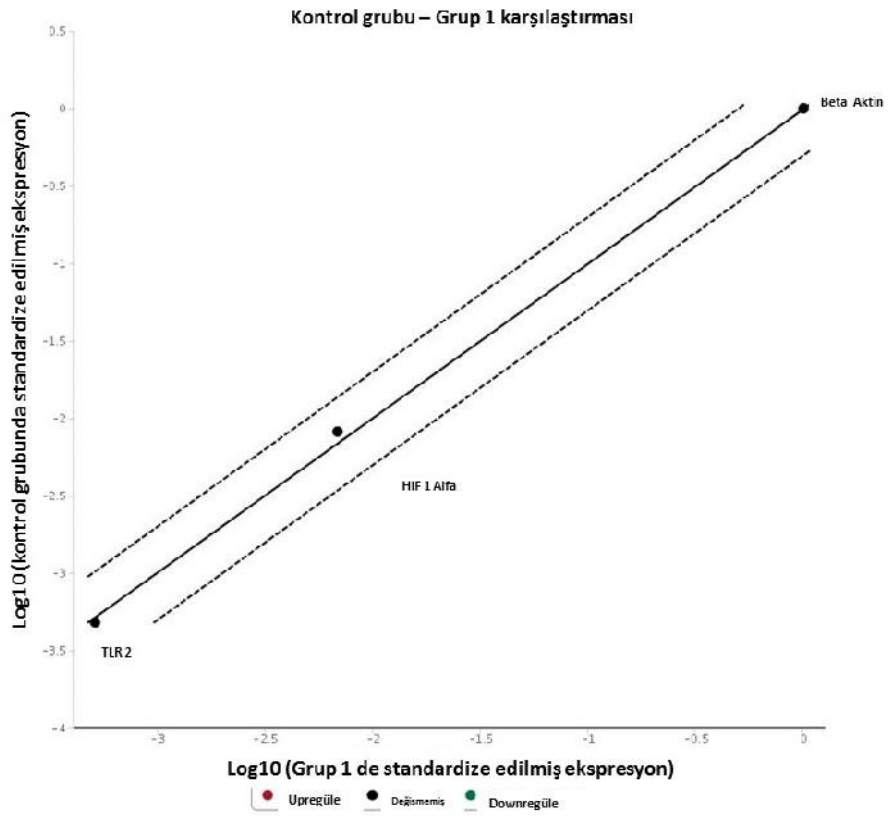
Grafik 3. Grupların kontrol grubuna göre p de erleri



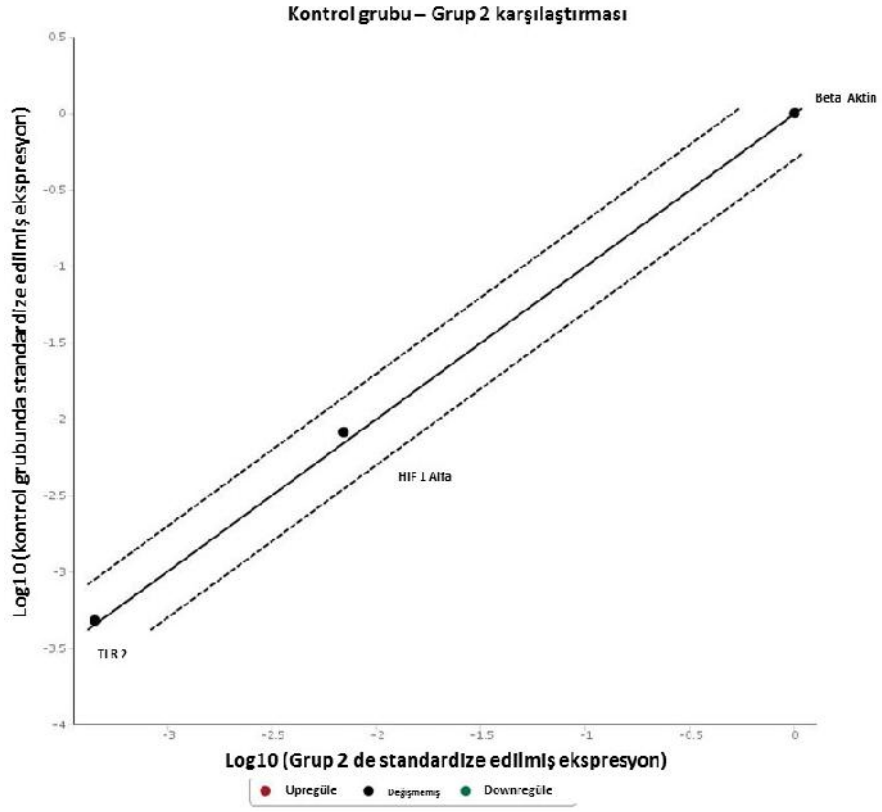
Grafik 4. Grupların kontrol grubuna göre up-down regülasyonları



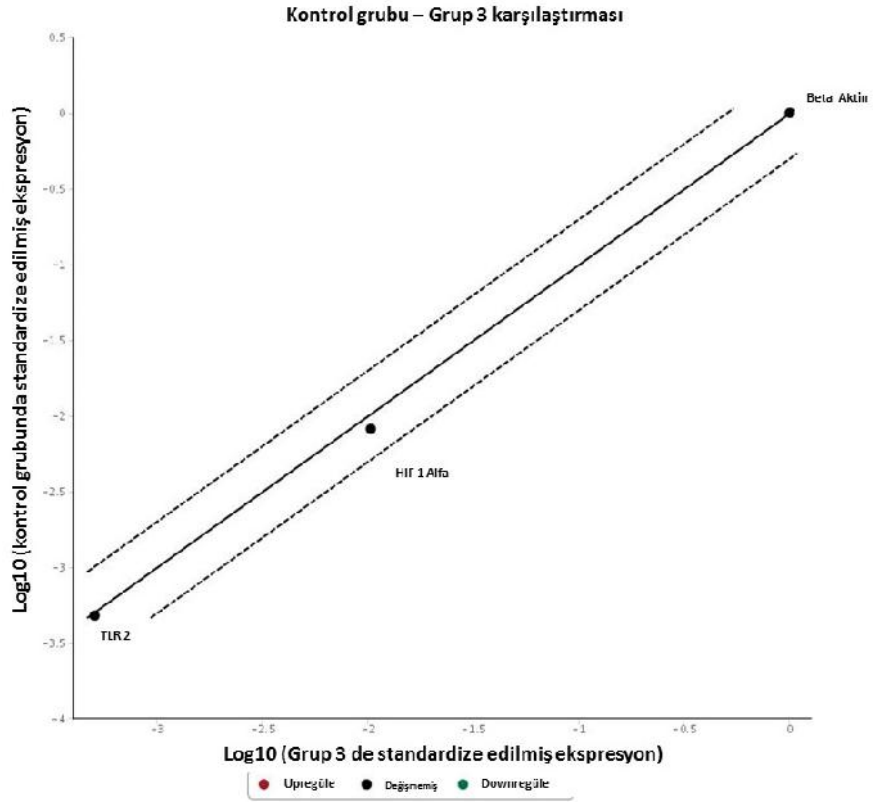
ekil 20. Gen ifadesi seviyelerinin renk ölçe i ile gösterilmesi



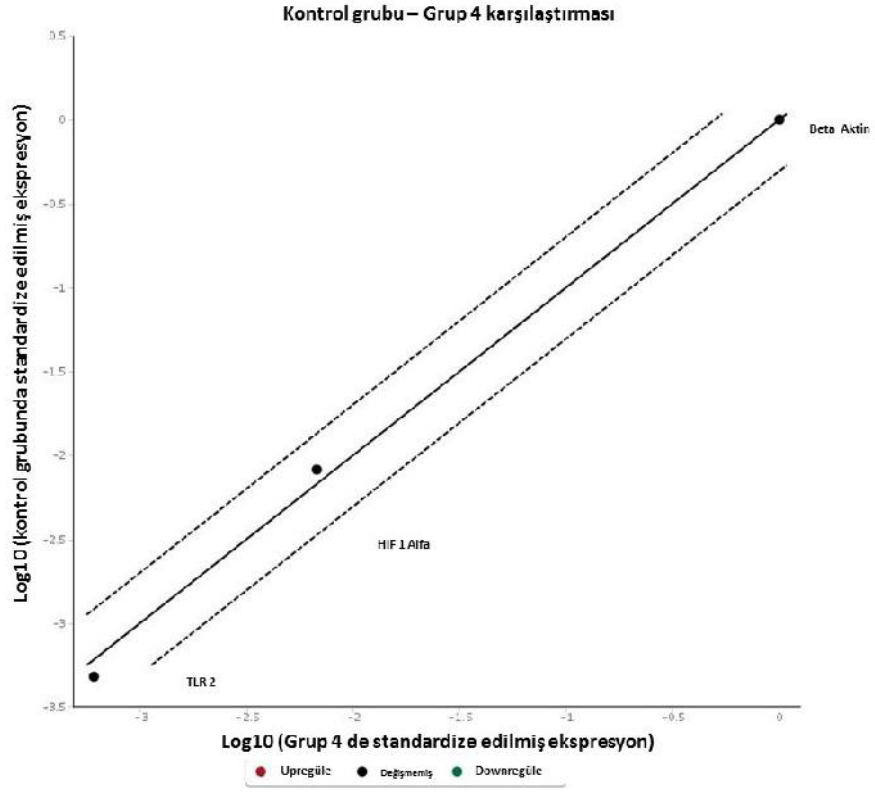
Grafik 5. Grup1-Kontrol kar ıla tırmalı saçılım e risi



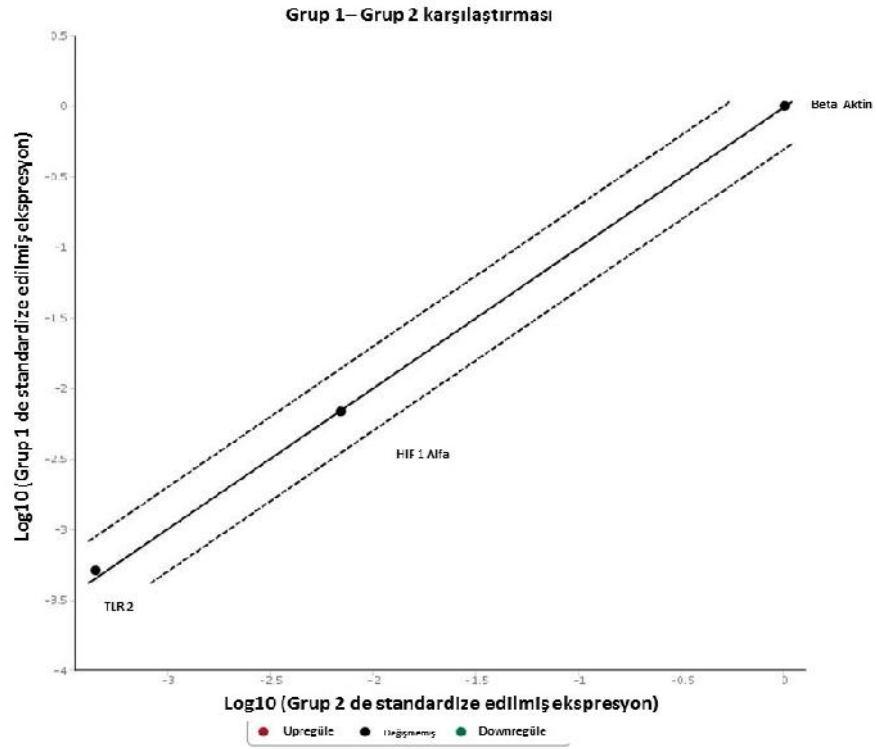
Grafik 6. Grup 2-Kontrol karşılaştırmasıyla tırmalı saçılım e risi



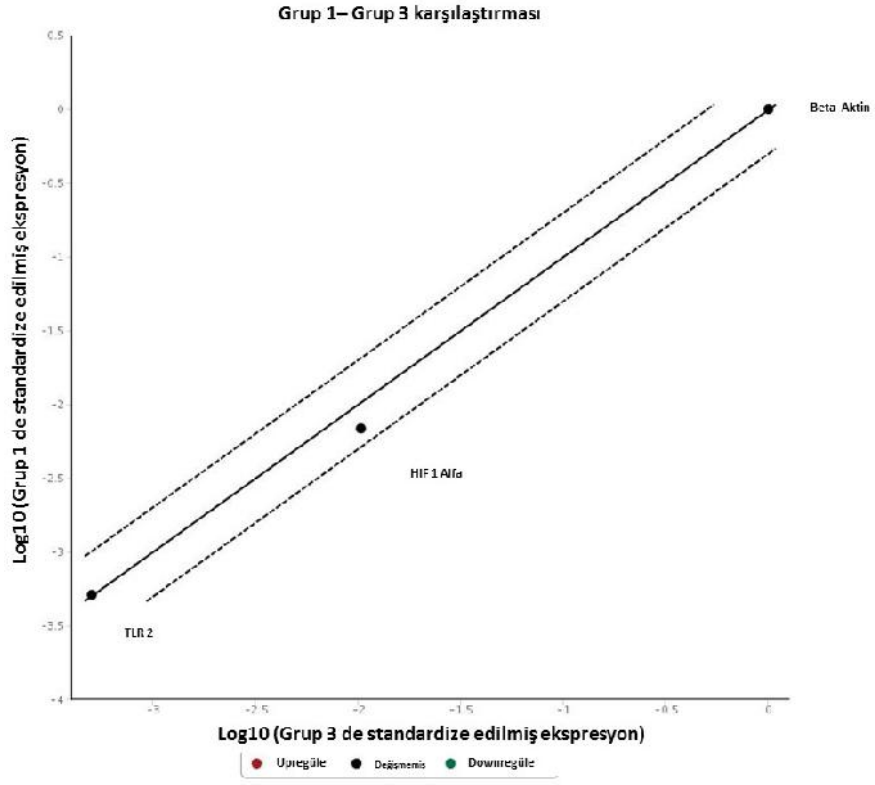
Grafik 7. Grup 3-Kontrol karşılaştırmasıyla tırmalı saçılım e risi



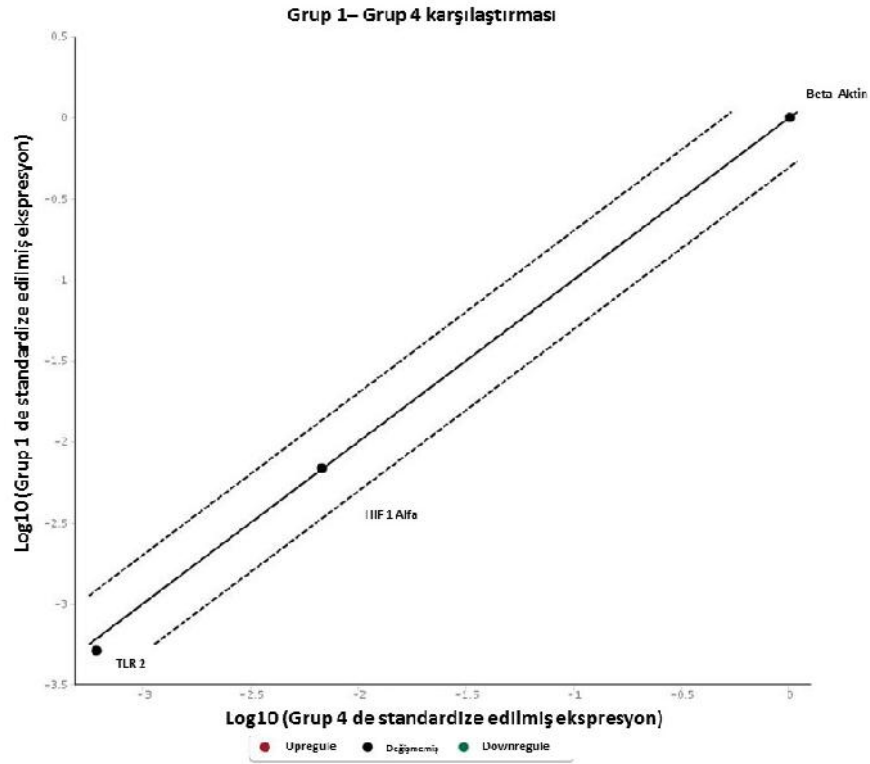
Grafik 8 Grup 4-Kontrol karşılaştırması tırmalı saçılım e risi



Grafik 9. Grup1- Grup 2 karşılaştırması tırmalı saçılım e risi



Grafik 10. Grup1- Grup 3 karşılaştırması



Grafik 11. Grup1- Grup 4 karşılaştırması

5. TARTI MA

Diabetes mellitus, pankreastan insülin salınımı yetersizli i ve/veya dokuların insüline olan cevabının bozulması sonucunda; karbohidrat, protein, ya metabolizmasını etkileyen önemli metabolik bir hastalıktır (101). Diyabet genellikle tip 1 ve 2 olmak üzere ikiye ayrılmı tır. Etiyolojisi ve patogenezi daha ayrıntılı anla ıldııkça tiplendirilmesi de sürekli yenilenmektedir. Belirli kesin kriterlere ra men, iki sınıfın çakı tı ı olgular nedeniyle iki sınıfın ayırımı bazen güçle mektedir (102).

Karbohidrat, lipid ve protein metabolizmasındaki anormalliklerin kayna ı, anobolik hormon olan insülinin önemindedir. skelet, ya ve karaci er gibi dokulara yeterli insülin cevabı verilememesi veya insülin direnci olu ması, insülin reseptörleri, sinyal transdüksiyon sistemi ve/veya genler ve enzimlerdeki defektler, bu metabolik anormalliklerden sorumludur. Septomların çe itlili i, diyabetin tipine ve devamlılı ına ba lıdır. Diyabet hastalarının bazıları özellikle tip 2 diyabetli hastalar, hastalı ın ilk zamanlarından itibaren asemptomatik olurken, belirgin hiperglisemi ve özellikle mutlak insülin eksikli i olan çocuklar; poliüri, polidipsi, polifaji, kilo kaybı, bulanık görmeden dolayı zarar görebilmektedirler. Kontrolsüz diyabet; ketoasidoz ya da nadir nonketotik hiperozmolar sendromu nedeniyle bilinçsizlik, komaya ve tedavi edilmedi i takdirde ölüme yol açabilmektedir (1).

DM'nin mikrovasküler ve makrovasküler olmak üzere iki tip komplikasyonu vardır. Retinopati, nefropati, nöropati mikrovasküler; periferik damar hastalı ı, koroner kalp hastalıkları, serebrovasküler hastalıklar makrovasküler komplikasyonlarıdır. Diyabet hastalarında son dönemde böbrek yetmezli i geli ti i için, diyabetik nefropati oldukça önemli bir sorundur.

Geli mi ülkelerde son dönem böbrek yetmezli inin en sık sebebini diyabetik nefropati (DN) olu turmaktadır ve görülme sıklı ı da giderek artmaktadır. Burada görülen böbrek hasarının temel sebepleri, diyabetin neden oldu u ve hipergliseminin indükledi i metabolik ve hemodinamik de i ikliklerdir. Ancak artan kanıtlar bu faktörlerin ötesinde daha kompleks mekanizmaların ve immün sistem aracılı

inflatuar süreçlerin diyabet ve komplikasyonlarının patofizyolojisinde önemli rol oynadığını göstermektedir. Birçok çalışmada diyabetik böbreklerde belirgin şekilde lökosit infiltrasyonu, artan kemokinler, adezyon molekülleri, enzimler, büyüme faktörleri ve nükleer faktörlerin ekspresyonunu göstermektedir (40). Diyabetik nefropatinin histolojik belirteçlerinden birisi glomerülde yoğun bir şekilde ekstraselüler matriks proteini birikimidir. Hiperglisemi tarafından tetiklenen metabolik, hemodinamik değişiklikler ve genetik yatkınlık glomerüler mezengial hücrelerde fonksiyonel değişikliklere neden olan başlıca etkenlerdir (103).

Aerobik organizmalar enerji üretebilmek için oksijene ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle oksijen düzeylerinde meydana gelen azalmalar bu canlılar ve hücreler için bir stres oluşturmaktadır. Hücreler ise bu durumla başa çıkabilmek için bir takım hücresel cevaplar oluşturur. Tüm bu hücresel cevaplar başta HIF'ler aracılığıyla düzenlenimi olmak üzere çeşitli hücresel yollar aracılığıyla düzenlenir (104).

Çalışmalar kronik böbrek hastalığının gelişiminde hipoksinin önemli bir yeri olduğunu göstermektedir. HIF-1 hücrelerin hipoksik koşullara adapte olabilmesi ve hipoksinin neden olabileceği hücre hasarına karşı korunabilmesi açısından oldukça önemlidir. Ancak HIF-1 ile artan VEGF ve diğer GF'ler gibi bazı sitokinlerin artışı glomerüloskleroza neden olan süreçlere neden olabilmektedir. Artan VEGF düzeyleri; kapiller bazal membranda ayrılmaya, glomerüler filtrasyon hızında artışı, proteinüriye, glomerüllere makrofaj ve mononükleer hücre göçüne ve ekstraselüler matriks birikimine neden olarak DN'de görülen glomerüloskleroza neden olabilmektedir (105).

Çoğunlukla dokulardaki oksijen oranı kan akımı ve dokunun oksijen kullanımını arasındaki denge ile sağlanır ancak böbreklerde böyle basit bir denge söz konusu değildir. Böbrekler kanı sadece metabolizma için kullanmaz aynı zamanda kan hacmi ve içeriğini de düzenlemek zorundadır. Artan böbrek kan akımı glomerüler filtrasyon hızını da artırır, bu durumda da sodyum reabsorpsiyonu artar ve bunun sonucu olarak da doku oksijen tüketimi artar. Böylece diyabet, glomerüler hiperfiltrasyona neden olur ve Na-K ATPaz aktivitesi ile sodyum ve glikoz reabsorpsiyonunu artırır ve buna bağlı olarak oksijen tüketimi artar. Bu nedenle diyabetik böbrekte hiperfiltrasyon, artan oksijen tüketimi ve artan oksijen

kullanımına neden olur ve daha fazla oksijen deste i gerektirir. Buna ba lı olarak da HIF-1 veya hedefindeki moleküller kronik böbrek hastalı na yol açar (106).

Dünya sa lık örgütünün verilerine göre bitkisel ilaçlar arasında Silibinin kullanımı %80'dir (107). *Silybum marianum* (L.) Gaertner (Meryemana diken) tohumu 2000 yıldan daha fazla zamandır hepatit, siroz, sarılık gibi karaci er ve safra kesesi hastalıklarının tedavisi, mantar zehirlenmesinde karaci erin korunmasında kullanılır. *Silybum marianum* (L.) Gaertner bitkisinin aktif komponenti ise Silmarin'dir. Silmarin kompleksinin esas komponenti Silibinin'dir (4). Silibinin güçlü bir antioksidan oldu u ve serbest radikalleri temizledi i gösterilmi tir. Son yıllarda antikanser ve radikal temizleyici özelliklerinden dolayı dikkatler bu flavonoide yo unla mı tır (51). Hücresel mekanizmalar arasında, Silibinin'in anahtar bir rol oynadı ı dü ünülmektedir. Silibinin'in antioksidan özelli inin yanısıra; hücre koruyucu, aniinflatuar, antikanserojen etkileri de gösterilmi tir. Ayrıca silibinin'in, STZ ile diyabet olu turulmu sıçanlarda ve tip2 diyabetli hastalarda proteinüriyi azalttı ı gözlenmi tir (4, 80, 89).

Diyabetik nefropatinin önlenmesi için; kan basıncının kontrol altında tutulması, kan ekerinin düzenlenmesi, protein alımının sınırlanması, sodyum ve fosfor kısıtlanması gibi uygulamalar yapılmaktadır ancak kesin bir çözüm bulunamamı tır (108).

Bu nedenlerden dolayı biz çalı mamızda hem literatüre DN iyile mesi ile ilgili bilimsel katkılar sa lamak, hem de hiçbir yan etkisi olmayan Silibinin maddesinin DN üzerindeki etkisini göstermek için, Wistar albino sıçanlar kullanarak STZ ile diyabet modeli olu turduk. Sonrasında Silibinin ile 28 günlük bir tedavi programı uyguladık. Sa böbrek dokusunda HIF-1 ve TLR-2 genlerinin ekspresyon düzeylerini RT-PCR metodu ile analiz edip, di er böbre i de histopatolojik olarak inceledik.

HIF-1 düzeylerinin de diyabetik nefropatide upregüle oldu u bilinmektedir. HIF-1 'nın doku metalloproteinaz inhibitörü (TMIP) ve plazminojen aktivatör inhibitörü gibi fibrojenik faktörleri aktive ederek kollajen birikimine neden olmaktadır. Bu nedenle HIF-1 upregülasyonunun iskemik hasara kar ı koruyucu

olmasına karşılık, uzun süreli HIF-1 aktivasyonunun kronik böbrek hastalığında zararlı olabileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır. (105,109)

Çalışmamızda istatistiksel olarak gruplar arasında HIF-1 mRNA ekspresyonlarında anlamlı bir fark görülmemiştir. (p>0,05). Silibinin'in HIF-1 ekspresyonunu deşifre etmediği gözlenmiştir. Benzer şekilde histolojik olarak da tedavi gruplarında düzelme bulgularına rastlanmamıştır.

Çalışmamızda HIF-1 mRNA düzeylerinde kontrol grubu ile kıyaslandığında diyabetik grupta literatür verilerinin aksine anlamlı bir upregülasyon gözlemlenmemiştir. Bu durum hayvanlarda oluşturulan diyabetik modeller arasındaki farklılıklarla ilişkilendirilebilir.

Çalışmamızda STZ ile diyabet indüklendikten sonra 28 günlük bir sürede deşifre edilmeleri yapılmıştır. Bu süre farklı çalışmalarda daha uzun veya daha kısa olarak tespit edilmiştir, çalışmamızda planlanırken diyabete bağlı komplikasyonların nedeni ile hayvan kaybı göz önünde bulundurularak optimum bir süre belirlenmeye çalışılmıştır. Bu anlamda HIF-1 düzeylerinde artışın olmaması ilk olarak deney süresinin kısa olması ve diyabetik nefropati oluşumu için yeterli süre sağlanamaması ile ilişkilendirilebilir. Ancak histolojik veriler diyabet modeli oluşturulmasının ardından 28 günlük sürede diyabetik nefropatinin gelişimini ve sürenin böbreklerde patoloji oluşumu için yeterli olduğunu göstermektedir. Bu nedenle HIF-1 düzeyleri ya literatürdeki verilerin aksine diyabetik nefropatide anlamlı şekilde yükselmektedir ya da bu yükselme patolojinin daha geç dönemlerinde gerçekleşmektedir. Bu durum da diyabetik nefropatide hipoksik koşulların oluşumu için daha fazla zamana ihtiyaç olduğunu işaret etmektedir. Burada yer alan bu moleküler mekanizmaların daha ayrıntılı olarak anlaşılması için ise özellikle standart koşulların sağlanması ancak farklı sürelerde HIF-1 düzeylerini kıyaslayan ve bir taraftan da diyabetik nefropatideki hipoksik koşulların takibini yapan çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Diğer taraftan insülin ve diğer bazı büyüme faktörlerinin HIF-1'yi stabilize ettiği bilinmektedir. Normal koşullarda hücrelerinde artan glikoz düzeyleri, glikozun hücre içine alınımını ve metabolizmasını artırmaktadır. Bunun sonucu olarak

ATP üretimi gerçekleşmekte, üretilen ATP etkisi ile ATP duyarlı potasyum kanalları kapanarak membran depolarizasyonuna ve insülin salınımına neden olmaktadır. Bu nedenle bozulmuş glikoz alımı, glukoz tarafından stimüle edilen insülin salınımını bozabilir. Çeşitli çalışmalar hem HIF-1 hemde HIF-1 'nin uygun insülin sekresyonunda oldukça önemli olduğunu göstermektedir. Çalışmalar HIF-1 'nin iki yönlü etkisi olduğunu göstermektedir. HIF-1 'nin çok az ya da çok fazla düzeylerde olması hücre fonksiyonlarını bozabilmektedir ve normal hücre fonksiyonları için optimal bir HIF-1 düzeyi olduğu düşünülmektedir. Tip 2 DM'li hastalardan izole edilen adacıklarda hem HIF-1 'nin hem de HIF1- 'nin azalmış ekspresyonu görülmektedir ve HIF-1 'nin demir elatörleri aracılığı olarak belirli düzeyde artırılması ile hücre fonksiyonlarında bir iyileşme görülmektedir. Hiperglisemi HIF-1 'nin yıkılmasına neden olmaktadır. HIF-1 'nin miyokard iskemisi olan farelerde aort ekspresyonu kardiyak hipertrofi ve fibrozisi inhibe etmekte ve miyokardiyal dolaşımı düzeltmektedir. Bu durum muhtemelen HIF-1 aracılığı VEGF düzeylerindeki artışa bağlıdır (110). Tüm bu çalışmalar HIF-1 'nin hem DN gelişiminde, hem de diyabetin seyirindeki mekanizmalarda yer alan kilit bir molekül olduğunu göstermektedir. Ancak özellikle diyabetik nefropatideki rolü için öncelikle böbrekte hipoksik koşulların geliştiği patolojik evreye ulaşılması gerektiği bizim çalışmamızca da kanıtlanmakla birlikte HIF-1 'nin diyabet patogeneziindeki etkisinin hastalığın erken veya geç dönemlerinde mi olduğunu dair yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Ancak bazı çalışmalar HIF-1 'nin diyabet gelişiminde özellikle erken dönemlerde etkili olabileceğini iddia etmektedir. Öyle ki; glikoz-bağımlı insülinotropik polipeptid (GIP), yağ ve glukoz mekanizmasına cevap olarak salgılanan bir hormondur. Bu hormonun seviyeleri obezite ve diyabette artmaktadır. Farelerle yapılan bir çalışmada; artan GIP sinyalizasyonunun, HIF-1 yoluyla aracılığıyla adipoz inflamasyonunu indüklediği ve insülin duyarlılığını bozduğunu gözlenmiştir (111).

İnsan retinal endotelial hücreleri (HREC) ve insan dermal mikrovasküler endotelial hücreleriyle (HDMEC) normoksik ve hipoksik şartlar altında yapılan bir çalışmada, HIF-1 ve Robo4 (Roundabout4)'ün fibrovasküler membranlar oluşturan

hayati bir öneme sahip oldu unu göstermiştir. HIF-1 geninin hipoksik ko ulla rda tHREC invazyonu ve proliferasyonunu, Robo4 up regülasyonunu transkripsiyonel olarak artı rdı ı gözlenmiştir (112). Bu ve benzeri çalı malar HIF-1 ekspresyonunun özellikle hipoksik ko ulla rda ve vasküler hücrelerde artı rına i aret etmektedir.

Çalı mamızda, böbrek dokusunda toplam HIF-1 ekspresyon düzeylerinde belirgin bir artı gözlemedik. Yeterli hipoksik ko ulla rın sa landı ı, immüno histokimya destekli böbrekteki vasküler yapılarda HIF-1 düzeylerini inceleyen çalı maların bu molekülün diyabetik nefropatideki rolünün anla ılmasına yardımcı olabilece ini dü ünülmektedir.

Sonuç olarak literatürdeki veriler HIF-1 'nın diyabet ve diyabetik nefropatide önemli bir molekül oldu unu göstermektedir. Ancak henüz bu molekülün tam olarak rolü ve hangi ko ulla rda hangi hücrelerde eksprese edildi i ve ne gibi süreçleri etkiledi i tam olarak bilinmemektedir. Her ne kadar çalı mamızda diyabetik grup böbrek dokularında HIF-1 ekspresyonu açısından anlamlı bir artı bulmasak da, elde etti imiz bu sonuç diyabetik nefropatide hipoksik ko ulla rın böbrekte olu mu için daha fazla zamana ihtiyaç oldu unu göstermektedir. Ayrıca diyabetik nefropatide böbrekte HIF-1 ekspresyonlarının incelenmesi için özellikle vasküler yapıların dikkate alındı ı yakla ımlara ihtiyaç olabilece ini göstermektedir. Bu gibi önemli patolojik olaylarda HIF-1 'nın rolünün tam olarak anla ılması ve potansiyel tedavi hedefi olarak kullanılabilmesi için daha fazla çalı ma gerekmektedir.

Diyabet; C-reaktif protein (CRP), inflamatuvar sitokin, kemokinler, adezyon molekülleri, monosit etkinli i ve adipoz doku düzensizli inin artmı seviyeleri ile karakterize pro-inflamatuvar bir durumdur. nfalasyon; NF- κ B aktivitesi, sitokinler, kemokinler, adezyon molekülleri, lökosit adezyonu ve lökositlerde artı la sonuçlanmaktadır. Bununla birlikte hiperglisemi aracılı inflamasyonun mikroveziküler komplikasyonlara nasıl neden oldu u hala net de ildir. Toll benzeri reseptörler (TLR), patojenle ili kili immün yanıtta önemli bir rol oynayan moleküler reseptörlerdir. Aktivasyonları sitokin/kemokinlerin üretimi ile sonuçlanan inflamatuvar cevabın ba latıldı ı sinyal kaskadını aktifle tirmektedir. Farklı hastalıklarda TLR'lerin ekspresyonu ile etkilerini de erlendiren birçok çalı ma yapılmı tır. Bu çalı malar sonucunda TLR-2 ve TLR-4'ün DM, ateroskleroz,

iskemi/reperfüzyon hasarına ba lı böbrek hastalıklarında, astım hastalı nda önemli rol oynadı ı görülmü tür. Tip 1 ve tip 2 DM'de TLR-2 ve 4'ün arttı ı gösterilmi tir. TLR-2 ve TLR-4'teki genetik eksikli in diyabetik nefropatide iyile me gösterdi i bildirilmi tir. Bununla birlikte diyabetik nefropati patogenezinde TLR'lerin rolü ke fedilememi tir (36).

talya'da yapılan bir derlemede, TLR-2 ve TLR-4'ün tip 2 diyabetes mellitus (T2DM) ba langıcında; TLR-2, TLR-7 ve TLR-9'un tip 1 diyabet ba langıcında (T1DM) önemli bir rol oynadı ı vurgulanmı tır (113). TLR'ler do al ba ı klık için anahtar rol oynamaktadırlar. nflamasyonda, kronik böbrek hastalıkları patogenezi ve diyabette önemli rol oynadı ndan; çalı mamızda STZ ile indüklenen sıçanların böbrek dokusunda TLR-2 geninin ekspresyon düzeylerinin, hiçbir yan etkisi olmayan Silibinin maddesinin DN üzerindeki etkisini göstermek için inceledik.

Çalı mamızda istatistiksel olarak gruplar arasında TLR-2 ekspresyonları için anlamlı bir fark görülmemi tir. ($p>0,05$). Benzer ekilde histolojik olarak da tedavi gruplarında düzelme bulgularına rastlanmamı tır.

Hindistan'da yapılan bir çalı mada; tip 2 DM'li hastalarda TLR-2'nin up regülasyonu gösterilmi tir (114).

Di er bir çalı mada ise, TLR-2'nin glomerüler endotel ve proksimal tübül epiteline lokalize oldu u gösterilmi tir. Diyabetik fare glomerülusu ve renal korteksinde TLR-2 mRNA ekspresyonları ölçülmü , diyabetik olmayan sıçanlara göre oldukça yüksek oldu u gözlenmi tir (115).

Çalı mamızda, TLR-2 geninin ekspresyonunun kontrol grubuna göre diyabet grubunda artması beklenirken birbirine yakın çıkmı tır. Bu durum diyabetik nefropati patogenezinde inflamasyonun 28 günden daha uzun sürede olu abilece i fikrini vermektedir.

Periferik kan monositleri do al ba ı klık sisteminde anahtar efektörlerdir. Sayıları ve sitokinlerin reseptör tanıma sisteminlerindeki bozukluk, monositlerin otoimmün tipteki diyabeti geli tirmesine katkı sa layabilmektedir. Tip 1 ve 2 DM'li hastalarda yapılan bir çalı mada; monosit hücrelerinin iki alt tipi olan CD14⁺⁺ ve

CD14⁺ün sayıları ve orantılarını analiz edip, TLR-2 TLR-4 reseptörlerinde potansiyel de i ikler çalı ılmı tır. Sonuçta, TLR-2 ekspresyonunun sa lıklı ki ilerle kar ıla tırıldı nda anlamlı ekilde azaldı ı, TLR-4 ekspresyonunun ise daha dü ük oldu u gözlenmi tir. Bu durumda kronik inflamasyonun uzun dönem DM’de ortaya çıkabilece i sonucuna varılmı tır (116).

Artım vasküler düz kas hücresi (VSMC) kasılması, diyabette damar disfonksiyonu patogenezinde erken ve kritik bir bulgudur. Son zamanlarda TLR-2’nin VSMC’de eksprese oldu u ve diyabette aktive edildi i gösterilmi tir. TLR-2’nin diyabetik kan damarlarında aktif oldu u ancak kasılmada rolünün olup olmadı mı anlamak için STZ indüklü sıçanlarda yapılan çalı mada, diyabetik kan damarlarında TLR-2’nin kasılmayı artırdı ı gözlenmi tir (117).

Diyaliz olmayan kronik böbrek patogenezi hastalarda proinflamatuvar durumu göstermek için bir çalı ma yapılmı , diyaliz olmayan kronik böbrek patogenezi hastalarda TLR-2 ve TLR-4’ün ekspresyonları arttı ı gözlenmi ve diyabeti etkiledi i sonucuna varılmı tır (118).

Çin’de yapılan bir çalı maya göre, TLR-2 ve 4 reseptörlerinde tek nükleotid polimorfizmlerinin TLR-4 (rs1927911, rs11536889, rs1927907, rs1927906, rs1927914, rs7873784 ve rs2149356) ve TLR-2 (rs1898830, rs3804099, rs4696480, ve 3804100) diyabetle ili kili oldu u gösterilmi tir (119).

Diyabetik nefropatide ekstraselüler matriks proteinlerinin ekspresyonu ve regülasyonu di er bir çalı mada anlatılmı , özellikle TLR-2 ve 4’ün TLR-2 ba ımlı ve TGF- ba ımlı kanallar ile ekstraselüler matriks ekspresyonunu de i tirip fibrojenik yanıt olu turabildi i açıklanmı tır. Bu moleküllerin sinyal yollarının tam olarak açıklanmasıyla DN tedavisi için olumlu adımlar atılabilece i vurgulanmı tır (120).

Paeonia lactiflora’dan çıkarılan *Paeonia*’nın Toplam glikozitlerinin (TGP), diyabetik böbrek hastalı nda antiinflamatuvar etki gösterdi i bildirilmi tir. Bu çalı mada, TLR-2’nin diyabetik sıçanların böbreklerinde önemli ekilde arttı ı TGP’nin bu sayıyı azalttı ı gözlenmi tir. TGP’nin bu etkisini, artan makrofaj

infiltrasyonu ve TLR-2 ekspresyonunu baskılayarak renal tübülointerstisyum hasarını önleyerek gösterdi i bildirilmi tir (121).

Çalı mamızın çıkı noktası ise en az diyabet kadar tehlikeli olan komplikasyonlardan biri konumundaki nefropati üzerine, yan etkisi olmayan silibinin etkilerini ara tırmak ve diyabetik nefropatiyle il kili olabilece ini dü ündü ümüz HIF 1 ve TLR-2 yolaklarının moleküler mekanizmalarını aydınlatmak sureti ile bu konuda yapılacak ara tırmalara veri sunabilmekti.

Bu amaçla çalı mamızda deneysel olarak diyabet olu turulmu sıçanlarda silibinin etken maddesinin HIF 1 ve TLR-2 genlerinin ekspresyon seviyelerine etkisini tedavi öncesi ve sonrası kar ıla tırıp, histokimyasal olarak da gösterdik.

Diyabetik nefropati patogenezinde önemli oldu unu dü ündü ümüz HIF 1 ve TLR-2 genlerinin ekspresyon seviyelerini silibininin de i tirebilece ini dü ündük ancak ara tırma sonunda anlamlı bir de i im gözlemedik.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Hipergliseminin diyabette mikrovasküler mekanizmaları nasıl indüklediğini geli mi mekanizmalar; protein kinaz C'nin (PKC) aktivasyonunun artışı, oksidatif stres, ileri glikozilasyon son ürünü (AGE) oluşumu ve artmış inflamasyon olarak gösterilmektedir. inflamasyon; NF- B aktivitesi, sitokinler, kemokinler, adezyon molekülleri, lökosit adezyonu ve lökositlerde artışla sonuçlanmaktadır. Bununla birlikte hiperglisemi aracılı inflamasyonun mikrovasküler komplikasyonlara nasıl neden olduğunu hala net değildir.

Çeşitli çalışmalar TLR aracılı inflamasyonun diyabetin ve diyabette gelişen komplikasyonların altında yatan temel faktör olduğunu ortaya koymaktadır. Bunun sonucu olarak da antiinflamatuvar tedavilerin bu komplikasyonların gelişiminin önlenmesi açısından kullanılabilirliği üzerine araştırmalar devam etmektedir. TLR'lerin inflamasyonu başlatan ve devam ettiren faktörler olması ise bunların terapötik hedefler olarak dikkat çekmesine neden olmaktadır. Ancak antiinflamatuvar ajanların çok sayıda hedef mekanizması olması nedeniyle böyle bir tedavi yaklaşımı deneysel nitelikte olmaktadır. Bu nedenle antiinflamatuvar tedavilerin hedef mekanizmaya yönelik seçici özellikte olması gerekmektedir.

Fitokimyasallar, doğal olarak bitkilerde oluşan ve insan sağlığını etkileyebilen kimyasal bileşiklerdir. Birçok çalışmada elde edilen kanıtlar, diyabetli bireylerin patolojilerden korunmada veya bunların iyileştirilmesinde inflamasyonu kontrol edebilen fitokimyasalların alınmasının etkili olabileceğini göstermektedir. Aktive olan hücrelerde inflamatuvar cevaplar, NF- B gibi inflamasyonun ana düzenleyici mekanizmaları aracılığı ile kontrol edilmektedir. Burada ise TLR-2 ve TLR-4'ün, aktive olan hücrelerde NF- B yolu üzerinden inflamasyon sürecine aracılık ettiğini görülmektedir. Bu bakımdan bu inflamatuvar yolların spesifik olarak fitokimyasallar aracılığı ile hedef alınması, diyabet ve ilişkili komplikasyonlardan korunma veya bunların iyileştirilmesinde etkili bir strateji olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bitkilerden elde edilen çe itli bile iklerin farklı mekanizmalar ile inflamatuvar süreçler üzerine etki etki etti i bilinmektedir. Bunlardan bazıları direkt TLR aracılı bazıları ise TLR ba ımsız bir mekanizma ile NF- B yola ı üzerinden etki göstermektedir.

Bu ekilde fitoterapötik yakla ımların diyabetle ili kili çe itli yollar üzerinden diyabetik komplikasyonlara kar ı etkilerinin oldu u bilinmekle birlikte, bu yakla ımlardaki etkinlik, doz, etki mekanizması ve uygun fitokimyasal dozları ile ilgili yeterli çalı ma bulunmamaktadır.

Tüm bu bilgiler ı ında;

-Bu çalı ma literatürde Silibinin ile HIF-1 ve TLR-2 gen ifadesi de i ikliklerini tanımlayan ilk çalı ma oldu unu dü ünüyoruz.

-Bu çalı ma sonucu elde edilen bulgular çe itli etkenler nedeniyle sınırlıdır

-HIF'ler, TLR'ler ve bunların sinyal iletim mekanizmasındaki moleküller önemli terapötik hedeflerdir ancak bununla ilgili olarak ilerde yapılacak çalı malarla;

-Bu verilerin daha fazla hayvan modeli ve daha uzun sürelerde çalı lması

-Diyabet patogenezi sürecine katıldı ı bildirilen bütün genlerin de il genomdaki bütün ifadelerinin ara tırılması,

-Yapılan gen ifadesi çalı malarının e zamanlı protein analiz çalı malarıyla desteklenmesi,

- İlgili moleküler mekanizmaların aydınlatılması gerekmektedir.

ÖZET

STZ (Streptozotosin) ile Diyabet Olu turulmu Ratların Böbrek Dokusunda Silibinin'in HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor-1 Alpha) ve TLR2 (Toll Like Receptor 2) Genlerinin mRNA Düzeylerine Etkisi

Silibinin, Silybum marianum (Deve dikenini) adı verilen bitkiden elde edilen bir flavanoiddir. Bu deneysel çalı mada; hücre koruyucu, antiinflamatuvar, antikanserojen, antioksidan etkileri olan ve proteüiniriyi azalttı ı bilinen Silibinin STZ ile diyabet oluturulan sıçanların böbreklerinde HIF-1 ve TLR2 genlerinin ekspresyon seviyelerine etkisini tedavi öncesi ve sonrası kar ıla tırıp, histokimyasal olarak da inceledik.

Çalı mamızda 5 grup bulunmakta olup: Kontrol Grubu, Diyabet Grubu (STZ 65 mg/kg, i.p. tek doz), Diyabetik Grup+100mg/kg Silibinin Tedavi Grubu, Diyabetik Grup+200mg/kg Silibinin Tedavi Grubu, Silibinin grubu (5 sıçana 100 mg/kg silibinin, 5 sıçana 200 mg/kg silibinin). Böbre in biri HIF-1 ve TLR2 genlerinin ekspresyon seviyeleri için de erlendirilirken, di er böbrek histopatolojik olarak de erlendirildi. Histolojik olarak ilaç alan gruplarda, diyabetik gruplara kıyasla anlamlı bir de i iklik gözlenmedi.

Alınan doku örneklerinden elde edilen total RNA'lar kullanılarak RT-PCR metodu ile 2 adet hedef gen ve bir adet kalibratör genin ifadesindeki de i iklikler incelendi. Elde edilen bulgular kontrol grubu ve di er gruplardaki örnekler ile kar ıla tırılmı tır. 2⁻ CT yöntemi ile kat de i imleri hesaplandı nda ve e ik -2/2 olarak alındı nda TLR2 geninde de i imler tespit edilmi tir ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamı tır (p>0,05).

Sonuç olarak Silibinin'in diyabetli sıçanların böbrek dokusunda olu an hasarda pek etkili olmadı ı görüldü.

Anahtar Kelimeler: Diyabet, Silibinin, HIF-1 , TLR2

ABSTRACT

The Effects of Silibin on mRNA Levels of HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor-1 alpha) and TLR2 (Toll Like Receptor 2) Genes in STZ Induced Diabetic Rats

Silibinin is a flavonoid derived from a plant called Silybum Marianum. In this experimental study we investigate the effects of silibinin which has anti-inflammatory, anticarcinogenic, antioxidant and cyto protective effects; on the expression levels of HIF-1 and TLR2 genes in the kidneys of STZ induced diabetic Rats before and after the treatment. We also investigate these effects by histochemically.

In our study, there were 5 groups: Control Group, Diabetic Group (STZ, 65 mg / kg, ip single dose), Diabetic Group + 100mg / kg Treatment Group of Silibinin, Diabetic Group + 200mg / kg treatment group of silibinin, Group of Silibinin (100 mg / kg and 200 mg / kg silibinin). One of the kidney was used to evaluate the expression levels of HIF-1 and TLR2 genes, the other kidney was used for histopathological study. Histologically, there was not observed any significant change in the Drug Groups, compared to the diabetic group.

Total RNAs obtained from the tissue samples were investigated for changes of expression levels of 2 target and 1 calibrator gene. The findings were compared with samples from the control group and the other group. When fold change calculated by 2^{-CT} method and when the threshold value taken as $-2/2$; some changes for expression levels of TLR-2 was identified, but no statistically significant change was found ($p > 0,05$).

As a result, Silibinin was not so effective in the kidney tissue damage of diabetic rats.

Keywords: Diabetes, Silibinin, HIF-1 , TLR2

KAYNAKLAR

1. Kharroubi AT, Darwish HM. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World journal of diabetes*. 2015;6(6):850.
2. Balamurugan K. HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer. *International Journal of Cancer*. 2015.
3. Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Molecular pharmacology*. 2006;70(5):1469-80.
4. Ken V, Walterova D. Silybin and silymarin-new effects and applications. *Biomedical Papers*. 2005;149(1):29-41.
5. Ross MH, Pawlina W. *Histology: A Text and Atlas, with Correlated Cell and Molecular Biology*, 6th Edition: Lippincott; 2014.
6. Patlak M. New weapons to combat an ancient disease: treating diabetes. *The FASEB Journal*. 2002;16(14):1853e-e.
7. Dallas J, editor *Diabetes, Doctors and Dogs: An exhibition on Diabetes and Endocrinology by the College Library for the 43rd St. Andrew's Day Festival Symposium*; 2011.
8. Luderitz B. *Principles of Diabetes Mellitus*: Springer; 1993.
9. Jorgens V. Oskar Minkowski (1858-1931). An outstanding master of diabetes research. *HORMONES-ATHENS-*. 2006;5(4):310.
10. Jolles S. Paul Langerhans. *Journal of clinical pathology*. 2002;55(4):243-.
11. Fossati P. [Edouard Laguesse at Lille in 1893 created the term "endocrine" and opened the endocrinology era]. *Histoire des sciences médicales*. 2003;38(4):433-9.
12. Simoni RD, Hill RL, Vaughan M. The discovery of insulin: the work of Frederick Banting and Charles Best. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(26):e15-e.

13. Shapiro J. Eighty years after insulin: parallels with modern islet transplantation. *Canadian Medical Association Journal*. 2002;167(12):1398-400.
14. Sanger F. The free amino groups of insulin. *Biochemical Journal*. 1945;39(5):507.
15. Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014;37(Supplement 1):S81-S90.
16. Zimmet PZ, Magliano DJ, Herman WH, Shaw JE. Diabetes: a 21st century challenge. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2014;2(1):56-64.
17. Jieli L, Rami J, Rémy B, Philippe B, Chang-Xian Z. Transdifferentiation of pancreatic β -cells into insulin-secreting cells: From experimental models to underlying mechanisms. *World journal of diabetes*. 2014;5(6):847-53.
18. Hui-Ping L, Tzu-Min C, Ru-Huei F, Chih-Pin C, Shao-Chih C, Yu-Hsiung T, et al. Applicability of adipose-derived stem cells in type 1 diabetes mellitus. *Cell transplantation*. 2015;24(3):521-32.
19. Forouhi NG, Wareham NJ. Epidemiology of diabetes. *Medicine*. 2014;42(12):698-702.
20. Surya S, Salam AD, Tomy DV, Carla B, Kumar RA, Sunil C. Diabetes mellitus and medicinal plants-a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2014;4(5):337-47.
21. Kerner W, Brückel J. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes: official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. 2014;122(7):384.
22. Chowdhury TA, Shaho S, Moolla A. Complications of diabetes: progress, but significant challenges ahead. *Annals of translational medicine*. 2014;2(12).
23. Ullah F, Afridi AK, Rahim F, Ashfaq M, Khan S, Shabbier G, et al. Knowledge Of Diabetic Complications In Patients With Diabetes Mellitus. *Journal of Ayub Medical College Abbottabad*. 2015;27(2):360-3.

24. Wolfsdorf JJ, Allgrove J, Craig ME, Edge J, Glaser N, Jain V, et al. Diabetic ketoacidosis and hyperglycemic hyperosmolar state. *Pediatric diabetes*. 2014;15(S20):154-79.
25. Bolaç ES. Diabetes Mellituslu Hastalarda Superfasiyal Radyal Sinirnin Lateral ve Medial Dallarının Elektrofizyolojik De erlendirmesi. Bolu: Abant zzet Baysal Üniversitesi; 2015.
26. Ak MO. Streptozotosin le Deneysel Olarak Diyabet Olu turulmu Sıçanlarda Selejilinin Nöroprotektif Etkisi. Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi; 2015.
27. Davey GC, Patil SB, O'Loughlin A, O'Brien T. Mesenchymal stem cell-based treatment for microvascular and secondary complications of diabetes mellitus. *Frontiers in endocrinology*. 2014;5.
28. Köseo lu Ö. Tip 2 Diyabetik Bireylerde Beslenme E itiminin Diyabet Durumu ve Beslenme Alı kanlıklarına Etkisi. Ankara: Ba kent Üniversitesi; 2015.
29. Yurt A. Streptozotosinle Diyabet Olu turulan Farelerde Üzüm Çekirde i Ekstresinin Nöropatik A rı Üzerine Etkileri. Malatya: önü Üniversitesi; 2015.
30. Martínez-Castelao A, Navarro-González JF, Górriz JLL, de Alvaro F. The Concept and the Epidemiology of Diabetic Nephropathy Have Changed in Recent Years. *Journal of clinical medicine*. 2015;4(6):1207-16.
31. López-Revuelta K, Abreu AA, Gerrero-Márquez C, Stanescu R-II, Marín MI, Fernández EP. Diabetic Nephropathy without Diabetes. *Journal of clinical medicine*. 2015;4(7):1403-27.
32. Ito J, Bacon RL, Phillips JT, Niles NR. *Medical Histology: A Text-Atlas with Introductory Pathology*: Springer New York; 2012.
33. Kierszenbaum AL, Tres L. *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*: Elsevier Health Sciences; 2015.
34. Tallitsch RB, Guastaferrri RS. *Histology: An Identification Manual*: Mosby/Elsevier; 2009.

35. Ziello JE, Jovin IS, Huang Y. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *Yale J Biol Med.* 2007;80(2):51-60.
36. Rajamani U, Jialal I. Hyperglycemia induces toll-like receptor-2 and-4 expression and activity in human microvascular retinal endothelial cells: Implications for diabetic retinopathy. *Journal of diabetes research.* 2014;2014.
37. Dasu MR, Devaraj S, Park S, Jialal I. Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes care.* 2010;33(4):861-8.
38. Devaraj S, Tobias P, Kasinath BS, Ramsamooj R, Afify A, Jialal I. Knockout of toll-like receptor-2 attenuates both the proinflammatory state of diabetes and incipient diabetic nephropathy. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2011;31(8):1796-804.
39. Könner AC, Brüning JC. Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism.* 2011;22(1):16-23.
40. Li F, Yang N, Zhang L, Tan H, Huang B, Liang Y, et al. Increased expression of toll-like receptor 2 in rat diabetic nephropathy. *American journal of nephrology.* 2010;32(2):179-86.
41. Çubukçu B SG, Meriçli AH, Sütlüoınar N, Mat A, Meriçli F. *Fitoterapi Yardımcı Ders Kitabı.* stanbul: stanbul Üniversitesi; 2002.
42. El-Abhar HS, Schaalán MF. Phytotherapy in diabetes: review on potential mechanistic perspectives. *World J Diabetes.* 2014;5(2):176-97.
43. Tanker M TN. *Farmakognozi.* Ankara: Ankara Üniv. Ecz. Fak. Yayınları 2003.
44. Morazzoni P, Bombardelli E. *Silybum marianum (Carduus marianus).* *Fitoterapia.* 1995;66(1):3-42.
45. Gümü çü A, Arslan, N. , Gürbüz, B. . Farklı ekim zamanlarının meryemana dikenini (*S. marianum*)'nin verim ve bazı özelliklerine etkisi. *Proceedings of XIIth International Symposium on Plant Originated Crude Drugs; Ankara*1998.

46. Tanker N, Koyuncu M, Co kun M. *Farmasötik Botanik*. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları Ders Kitabı. 1998(78):128-35.
47. Baytop T. *Therapy with medicinal plants in Turkey (Past and Present)*. 1999.
48. Ceylan A. *Tarla tarımı*. Ders Kitabı, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Yayın. 1994(491):69-75.
49. Gao Y, Theng SS, Mah W-C, Lee CG. Silibinin down-regulates FAT10 and modulate TNF- /IFN- -induced chromosomal instability and apoptosis sensitivity. *Biology open*. 2015:bio. 011189.
50. Kidd P, Head K. A review of the bioavailability and clinical efficacy of milk thistle phytosome: a silybin-phosphatidylcholine complex (Siliphos®). *Alternative Medicine Review*. 2005;10(3):193.
51. Gažák R, Purchartová K, Marhol P, Živná L, Sedmera P, Valentová K, et al. Antioxidant and antiviral activities of silybin fatty acid conjugates. *European journal of medicinal chemistry*. 2010;45(3):1059-67.
52. Sangeetha N, Nalini N. Silibinin modulates caudal-type homeobox transcription factor (CDX2), an intestine specific tumor suppressor to abrogate colon cancer in experimental rats. *Human & experimental toxicology*. 2014:0960327114530741.
53. Vinh PQ, Sugie S, Tanaka T, Hara A, Yamada Y, Katayama M, et al. Chemopreventive effects of a flavonoid antioxidant silymarin on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in male ICR mice. *Japanese journal of cancer research*. 2002;93(1):42-9.
54. Agarwal R, Agarwal C, Ichikawa H, Singh RP, Aggarwal BB. Anticancer potential of silymarin: from bench to bed side. *Anticancer research*. 2006;26(6B):4457-98.
55. Kohno H, Tanaka T, Kawabata K, Hirose Y, Sugie S, Tsuda H, et al. Silymarin, a naturally occurring polyphenolic antioxidant flavonoid, inhibits azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats. *International Journal of Cancer*. 2002;101(5):461-8.

56. Katiyar SK. Silymarin and skin cancer prevention: anti-inflammatory, antioxidant and immunomodulatory effects (Review). *International journal of oncology*. 2005;26(1):169-76.
57. Tyagi AK, Agarwal C, Chan DC, Agarwal R. Synergistic anti-cancer effects of silibinin with conventional cytotoxic agents doxorubicin, cisplatin and carboplatin against human breast carcinoma MCF-7 and MDA-MB468 cells. *Oncology reports*. 2004;11(2):493-9.
58. Singh RP, Dhanalakshmi S, Tyagi AK, Chan DC, Agarwal C, Agarwal R. Dietary feeding of silibinin inhibits advanced human prostate carcinoma growth in athymic nude mice and increases plasma insulin-like growth factor-binding protein-3 levels. *Cancer Research*. 2002;62(11):3063-9.
59. Singh RP, Deep G, Chittezhath M, Kaur M, Dwyer-Nield LD, Malkinson AM, et al. Effect of silibinin on the growth and progression of primary lung tumors in mice. *Journal of the National Cancer Institute*. 2006;98(12):846-55.
60. Gu M, Singh RP, Dhanalakshmi S, Agarwal C, Agarwal R. Silibinin inhibits inflammatory and angiogenic attributes in photocarcinogenesis in SKH-1 hairless mice. *Cancer Research*. 2007;67(7):3483-91.
61. Singh RP, Agarwal R. Prostate cancer prevention by silibinin. *Current cancer drug targets*. 2004;4(1):1-11.
62. Singh RP, Agarwal R. Prostate cancer chemoprevention by silibinin: bench to bedside. *Molecular carcinogenesis*. 2006;45(6):436-42.
63. Zi X, Zhang J, Agarwal R, Pollak M. Silibinin Up-Regulates Insulin-like Growth Factor-Binding Protein 3 Expression and Inhibits Proliferation of Androgen-independent Prostate Cancer Cells. *Cancer Research*. 2000;60(20):5617-20.
64. Gu HR, Park SC, Choi SJ, Lee JC, Kim YC, Han CJ, et al. Combined treatment with silibinin and either sorafenib or gefitinib enhances their growth-inhibiting effects in hepatocellular carcinoma cells. *Clinical and molecular hepatology*. 2015;21(1):49-59.

65. Wang Y, Liang W-C, Pan W-L, Law W-K, Hu J-S, Ip DT-M, et al. Silibinin, a novel chemokine receptor type 4 antagonist, inhibits chemokine ligand 12-induced migration in breast cancer cells. *Phytomedicine*. 2014;21(11):1310-7.
66. Kumar S, Raina K, Agarwal C, Agarwal R. Silibinin strongly inhibits the growth kinetics of colon cancer stem cell-enriched spheroids by modulating interleukin 4/6-mediated survival signals. *Oncotarget*. 2014;5(13):4972.
67. Gohulkumar M, Gurushankar K, Prasad NR, Krishnakumar N. Enhanced cytotoxicity and apoptosis-induced anticancer effect of silibinin-loaded nanoparticles in oral carcinoma (KB) cells. *Materials Science and Engineering: C*. 2014;41:274-82.
68. Zhu W, Zhang J-S, Young CY. Silymarin inhibits function of the androgen receptor by reducing nuclear localization of the receptor in the human prostate cancer cell line LNCaP. *Carcinogenesis*. 2001;22(9):1399-403.
69. Thelen P, Wuttke W, Jarry H, Grzmil M, Ringert R-H. Inhibition of telomerase activity and secretion of prostate specific antigen by silibinin in prostate cancer cells. *The Journal of urology*. 2004;171(5):1934-8.
70. Jiang C, Agarwal R, Lü J. Anti-angiogenic potential of a cancer chemopreventive flavonoid antioxidant, silymarin: inhibition of key attributes of vascular endothelial cells and angiogenic cytokine secretion by cancer epithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000;276(1):371-8.
71. Lu P, Mamiya T, Lu L, Mouri A, Niwa M, Kim H-C, et al. Silibinin attenuates cognitive deficits and decreases of dopamine and serotonin induced by repeated methamphetamine treatment. *Behavioural brain research*. 2010;207(2):387-93.
72. Tota S, Kamat PK, Shukla R, Nath C. Improvement of brain energy metabolism and cholinergic functions contributes to the beneficial effects of silibinin against streptozotocin induced memory impairment. *Behavioural brain research*. 2011;221(1):207-15.
73. Joshi R, Garabadu D, Teja GR, Krishnamurthy S. Silibinin ameliorates LPS-induced memory deficits in experimental animals. *Neurobiology of learning and memory*. 2014;116:117-31.

74. Wang Q, Zou L, Liu W, Hao W, Tashiro S-i, Onodera S, et al. Inhibiting NF- B activation and ROS production are involved in the mechanism of silibinin's protection against D-galactose-induced senescence. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2011;98(1):140-9.
75. Desai UN, Shah KP, Mirza SH, Panchal DK, Parikh SK, Rawal RM. Enhancement of the cytotoxic effects of Cytarabine in synergism with Hesperidine and Silibinin in Acute Myeloid Leukemia: An in-vitro approach. *Journal of cancer research and therapeutics*. 2015;11(2):352.
76. Bosch-Barrera J, Menendez JA. Silibinin and STAT3: A natural way of targeting transcription factors for cancer therapy. *Cancer treatment reviews*. 2015.
77. Bhatia V, Falzon M. Restoration of the anti-proliferative and anti-migratory effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D by silibinin in vitamin D-resistant colon cancer cells. *Cancer letters*. 2015;362(2):199-207.
78. Pirouzpanah M, Sabzichi M, Pirouzpanah S, Chavoshi H, Samadi N. Silibinin-Induces Apoptosis in Breast Cancer Cells by Modulating p53, p21, Bak and Bcl-x1 Pathways. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*. 2014;16(5):2087-92.
79. Abenavoli L, Capasso R, Milic N, Capasso F. Milk thistle in liver diseases: past, present, future. *Phytotherapy Research*. 2010;24(10):1423-32.
80. Gazak R, Walterova D, Kren V. Silybin and silymarin-new and emerging applications in medicine. *Current medicinal chemistry*. 2007;14(3):315-38.
81. Casas-Grajales S, Muriel P. Antioxidants in liver health. *World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics*. 2015;6(3):59.
82. Gillessen A, Herrmann WA, Kemper M, Morath H, Mann K. Effect of silymarin on liver health and quality of life. Results of a non-interventional study. *MMW-Fortschritte der Medizin*. 2014;156:120-6.
83. Lirussi F, Beccarello A, Zanette G, De Monte A, Donadon V, Velussi M, et al. Silybin-beta-cyclodextrin in the treatment of patients with diabetes mellitus and alcoholic liver disease. Efficacy study of a new preparation of an anti-oxidant agent. *Diabetes, nutrition & metabolism*. 2002;15(4):222-31.

84. Wellington K, Jarvis B. Silymarin: a review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. *BioDrugs*. 2001;15(7):465-89.
85. Dehmlow C, Erhard J, de Groot H. Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin. *Hepatology*. 1996;23(4):749-54.
86. Wang Y-K, Hong Y-j, Huang Z-Q. Protective effects of silybin on human umbilical vein endothelial cell injury induced by H₂O₂ in vitro. *Vascular pharmacology*. 2005;43(4):198-206.
87. Vessal G, Akmal M, Najafi P, Moein MR, Sagheb MM. Silymarin and milk thistle extract may prevent the progression of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Renal failure*. 2010;32(6):733-9.
88. Fallahzadeh MK, Dormanesh B, Sagheb MM, Roozbeh J, Vessal G, Pakfetrat M, et al. Effect of addition of silymarin to renin-angiotensin system inhibitors on proteinuria in type 2 diabetic patients with overt nephropathy: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *American Journal of Kidney Diseases*. 2012;60(6):896-903.
89. Khazim K, Gorin Y, Cavaglieri RC, Abboud HE, Fanti P. The antioxidant silybin prevents high glucose-induced oxidative stress and podocyte injury in vitro and in vivo. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2013;305(5):F691-F700.
90. Tuorkey MJ, El-Desouki NI, Kamel RA. Cytoprotective effect of silymarin against diabetes-induced cardiomyocyte apoptosis in diabetic rats. *Biomedical and Environmental Sciences*. 2015;28(1):36-43.
91. Soto C, Raya L, Pérez J, González I, Pérez S. Silymarin Induces Expression of Pancreatic Nkx6.1 Transcription Factor and β -Cells Neogenesis in a Pancreatectomy Model. *Molecules*. 2014;19(4):4654-68.
92. Kazazis C, Evangelopoulos A, Kollas A, Vallianou N. The therapeutic potential of milk thistle in diabetes. *The review of diabetic studies: RDS*. 2013;11(2):167-74.
93. Gargari BP, Mobasser M, Valizadeh H, Asghari-Jafarabadi M. Effects of *Silybum marianum* (L.) Gaertn.(silymarin) extract supplementation on antioxidant

status and hs-CRP in patients with type 2 diabetes mellitus: A randomized, triple-blind, placebo-controlled clinical trial. *Phytomedicine*. 2015;22(2):290-6.

94. Malekinejad H, Rokhsartalab-Azar S, Hassani-Dizaj S, Alizadeh-Fanalou S, Rezaabakhsh A, Amniattalab A. Effects of silymarin on the pharmacokinetics of atorvastatin in diabetic rats. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*. 2014;39(4):311-20.

95. Gadad PC, Matthews KH, Knott RM. Silymarin released from sterile wafers restores glucose impaired endothelial cell migration. *International journal of pharmaceutics*. 2013;457(1):40-9.

96. Like AA, Rossini AA. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science*. 1976;193(4251):415-7.

97. Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB. STZ transport and cytotoxicity: specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes*. 1994;43(11):1326-33.

98. Gispen WH, Biessels G-J. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends in neurosciences*. 2000;23(11):542-9.

99. Günel T. Quantitative Analysis Of Gene Expression ; Real-Time Pcr”: Scientific Letter. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 2007;27(5):763.

100. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ CT method. *methods*. 2001;25(4):402-8.

101. Öntürk, H., and H. Özbek. "Carried out of experimental diabetes and the measurement of glycemic activity." *General Medicine Journal* 17.4 (2007): 231-236.

102. Vionnet, A. C., and F. R. Jornayvaz. "[Classification of diabetes: an increasing heterogeneity]." *Revue medicale suisse* 11.477 (2015): 1234-1237.

103. Isoe, T., Y. Makino, K. Mizumoto, H. Sakagami, Y. Fujita, J. Honjo, Y. Takiyama, H. Itoh and M. Haneda. "High glucose activates HIF-1-mediated signal transduction in glomerular mesangial cells through a carbohydrate response element binding protein." *Kidney international*:2010:78(1): 48-59.

104. Majmundar, A. J., W. J. Wong and M. C. Simon. "Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress." *Molecular cell*.2010: 40(2): 294-309.
105. Xu, X., P. Chen, Q. Zheng, Y. Wang and W. Chen. "Effect of pioglitazone on diabetic nephropathy and expression of HIF-1 and VEGF in the renal tissues of type 2 diabetic rats." *Diabetes research and clinical practice*.2011 93(1): 63-69.
106. Takiyama, Y. and M. Haneda. "Hypoxia in diabetic kidneys." *BioMed research international* 2014.
107. van Wenum, E., R. Jurczakowski and G. Litwinienko. "Media effects on the mechanism of antioxidant action of silybin and 2, 3-dehydrosilybin: role of the enol group." *The Journal of organic chemistry*.2013:78(18): 9102-9112.
108. Kurt, M., A. Atmaca and A. Gürlek. "Diyabetik nefropati." *Hacettepe Tıp Dergisi*.2004:35: 12-17.
109. Tang, S. C., W. H. Yiu, M. Lin and K. N. Lai. "Diabetic Nephropathy and Proximal Tubular Damage." *Journal of Renal Nutrition*.2015: 25(2): 230-233.
110. Girgis, C. M., K. Cheng, C. H. Scott and J. E. Gunton. "Novel links between HIFs, type 2 diabetes, and metabolic syndrome." *Trends in Endocrinology & Metabolism*.2012: 23(8): 372-380.
111. Chen, S., F. Okahara, N. Osaki and A. Shimotoyodome. "Increased GIP signaling induces adipose inflammation via a HIF-1 -dependent pathway and impairs insulin sensitivity in mice." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*.2015: 308(5): E414-E425.
112. Tian, R., Z. Liu, H. Zhang, X. Fang, C. Wang, S. Qi, Y. Cheng and G. Su. "Investigation of the Regulation of Roundabout4 by Hypoxia-Inducible Factor-1 in Microvascular Endothelial CellsRegulation of Robo4 by HIF-1 ." *Investigative ophthalmology & visual science*.2015: 56(4): 2586-2594.
113. Santoni, M., K. Andrikou, V. Sotte, A. Bittoni, A. Lanese, C. Pellei, F. Piva, A. Conti, M. Nabissi and G. Santoni. "Toll like receptors and pancreatic diseases: from a pathogenetic mechanism to a therapeutic target." *Cancer Treatment Reviews*.2015.

114. Singh, K., N. K. Agrawal, S. K. Gupta, G. Mohan, S. Chaturvedi and K. Singh. "Genetic and epigenetic alterations in Toll like receptor 2 and wound healing impairment in type 2 diabetes patients." *Journal of diabetes and its complications*.2015;29(2): 222-229.
115. Sawa, Y., S. Takata, Y. Hatakeyama, H. Ishikawa and E. Tsuruga. "Expression of toll-like receptor 2 in glomerular endothelial cells and promotion of diabetic nephropathy by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide."2014.
116. Cejkova, P., I. Nemeckova, J. Broz and M. Cerna. "TLR2 and TLR4 expression on CD14⁺⁺ and CD14⁺ monocyte subtypes in adult-onset autoimmune diabetes."2015.
117. Schmidt, L. and M. A. Carrillo-Sepulveda. "Toll-like receptor 2 mediates vascular contraction and activates RhoA signaling in vascular smooth muscle cells from STZ-induced type 1 diabetic rats." *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*.2015: 1-14.
118. Zikou, X., C. C. Tellis, K. Rousouli, E. Dounousi, K. Siamopoulos and A. Tselepis. "Differential Membrane Expression of Toll-Like Receptors and Intracellular Cytokine Induction in Peripheral Blood Monocytes of Patients with Chronic Kidney Disease and Diabetic Nephropathy." *Nephron Clinical Practice* 2014;128(3-4): 399-406.
119. Huang, W., L. Nie, L. Zhang, L. Jing, F. Dong, M. Wang, N. Zhang, Y. Liu, B. Zhang and C. Chen (2014). "Association of TLR2 and TLR4 non-missense single nucleotide polymorphisms with type 2 diabetes risk in a southern Chinese population: a case-control study." *Genetics and molecular research*.2014;GMR 14(3): 8694-8705.
120. Hu, C., L. Sun, L. Xiao, Y. Han, X. Fu, X. Xiong, X. Xu, Y. Liu, S. Yang and F. Liu. "Insights into the mechanisms involved in the expression and regulation of extracellular matrix proteins in diabetic nephropathy." *Current medicinal chemistry*. 2015;22(24): 2858-2870.

121. Zhang, W., L. Zhao, S.-Q. Su, X.-X. Xu and Y.-G. Wu. "Total glucosides of Paeony attenuate renal tubulointerstitial injury in STZ-induced diabetic rats: Role of toll-like receptor 2." *Journal of pharmacological sciences*.2014:125(1): 59-67.

ÖZGEÇM

Uyru u	T.C
Do um Yeri ve Tarihi	Eski ehir-10/11/1983
Yazı ma Adresi :	SDÜ Tıp Fakültesi Dekanlığı 1 Tıbbi Biyoloji A.D, Morfoloji Binası Do u Kampüsü 32260 Çünür/ISPARTA
e-posta :	tsemerci@akdeniz.edu.tr, tugbasevimli@yahoo.com.tr

E T M B L G L E R

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Ö renim Alanı	Derece	Ba langıç/Biti Yılı
Türkiye	Süleyman Demirel Üniversitesi (Yatay geçi)	Tıp Fakültesi	Tıbbi Biyoloji AD.	Doktora	2012- 2016
Türkiye	Osmangazi Üniversitesi	Tıp Fakültesi	Tıbbi Biyoloji AD.	Doktora	2010
Türkiye	Akdeniz Üniversitesi	Tıp Fakültesi	Tıbbi Genetik	Yüksek Lisans	2006-2009
Türkiye	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyoloji (Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programı)	Lisans	2001-2005